

Aus Charité Centrum 6 für Diagnostische und Interventionelle
Radiologie und Nuklearmedizin, Institut für Radiologie mit den Bereichen
Kinderradiologie und Neuroradiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Hamm

Habilitationsschrift

Molekulare Magnet-Resonanz-Tomographie bei kardiovaskulären Erkrankungen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Radiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Marcus R. Makowski

Eingereicht: 02/2012

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Professor Dr. Gerhard Adam
2. Professor Dr. Ingrid Hilger.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1. Einleitung und Fragestellung	4
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	4
1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und die arterielle Gefäßwand	4
1.3 Gefäßwandbildung mittels MRT	8
1.3.1 Molekulare Gefäßwandbildung	8
1.3.2 MRT der koronaren Gefäßwand	13
1.4 Fragestellung	18
2. Eigene Arbeiten.....	19
2.1 Bestimmung der arteriosklerotischen Plaquelast mittels eines elastinspezifischen MRT-Kontrast-mittels.....	19
2.2 MRT des koronaren Gefäßwandremodelings unter Verwendung eines elastinspezifischen Kontrast-mittels	23
2.3 Die nichtinvasive Bestimmung der entzündlichen Aktivität in arteriosklerotischen Plaques unter Verwendung einer Positivkontrast-Technik	24
2.4 In-vivo-Darstellung des intraplaque und endothel-assoziierten Fibrins bei arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen mittels molekularem MRT	26
2.5 „Myokardiale „First-Pass“ Perfusion bei Myokard-infarkten im Mausmodell	28
3. Diskussion.....	30
4. Zusammenfassung	44
5. Literatur	47

Abkürzungen

CNR	Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis
DE	Delayed Enhancement
EKG	Elektrokardiogramm
ESMA	Elastinspezifisches Kontrastmittel
FOV	Untersuchungsfeld
FTCA	Fibrinspezifisches Kontrastmittel
Gd	Gadolinium
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
R_1	Longitudinale Relaxationsrate
R_2	Transversale Relaxationsrate
SE	Spinecho
SNR	Signal-zu-Rauschen-Verhältnis
T_1	Longitudinale Relaxationszeit
T_2	Longitudinale Relaxationszeit
TE	Echozeit
TI	Inversionszeit
TR	Repetitionszeit
VSOP	Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particle

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind nach wie vor die häufigste Ursache der Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Krankheiten des kardiovaskulären Systems werden in 15 bis 20 Jahren voraussichtlich die Haupttodesursache darstellen. Dies ist auf die erhöhte Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen in Osteuropa und in Entwicklungsländern sowie auf die steigende Inzidenz von Diabetes mellitus und Adipositas in der westlichen Welt zurückzuführen (1, 2). Heutzutage sind Erkrankungen des kardiovaskulären Systems verantwortlich für ca. 38 % aller Todesfälle. Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in Europa von Männern unter 65 Jahren und die zweithäufigste Todesursache von Frauen dar (1, 2). Der Entwicklung neuer sowie der Optimierung bereits vorhandener Bildgebungstechniken wird daher, zur Verbesserung der Detektion und Quantifizierung von kardiovaskulären Erkrankungen, eine hohe Bedeutung zugemessen.

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und die arterielle Gefäßwand

Die „gesunde“ arterielle Gefäßwand ist aus drei unterschiedlichen Wandschichten aufgebaut (3). Endothelzellen stellen die innerste Schicht der Intima dar. Sie trennt die subendotheliale Proteoglykanschicht von der Blutbahn. Zusätzlich kommen in der Intima einzelne glatte Muskelzellen vor. Diese Zellen exprimieren verschiedene extrazelluläre Matrixproteine, wie z. B. unterschiedliche Arten von Elastin und Kollagen. In der gesunden Gefäßwand enthält die dünne Matrix der Intima jedoch nur minimale Mengen an Elastin- und Kollagenfasern, Proteoglykanen, Lamininen und Fibronektinen (4). Die „innere elastische Membran“ trennt die Intima von der Media und trägt wesentlich zur Gefäßwandintegrität bei. Die Media besteht in erster Linie aus dicht angeordneten glatten Muskelzellen. Die „äußere elastische

Membran“ trennt die Media von der Adventitia. Diese äußerste Gefäßwandschicht enthält in erster Linie verschiedene Kollagene sowie einzelne Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Es ist wichtig anzumerken, dass deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gefäßbetten bezüglich der relativen Zusammensetzung der Gefäßwand bestehen (5). Pathologische Veränderungen der Gefäßwand im Rahmen der Arteriosklerose finden in erster Linie in der arteriellen Intima statt. Zu diesen Veränderungen zählt die Infiltration von modifizierten Lipiden, wie z. B. „Low Density Lipoproteinen“ (LDL), Makrophagen und glatten Muskelzellen (Abbildung 1) (6). Die Arteriosklerose ist eine sich langsam entwickelnde Erkrankung, welche im Verlauf lange symptomlos bleibt. Symptomatisch wird diese Erkrankung, sobald der arteriosklerotische Plaque die Blutversorgung stark beeinträchtigt oder im Falle der Plaqueruptur. Dieser Prozess kann zu einer plötzlichen thrombotischen Verlegung des Gefäßlumens führen und subsequent zur Entwicklung eines Myokardinfarkts oder eines zerebralen Schlaganfalls (7). Arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen werden in den meisten Fällen durch die Infiltration von LDL in die – z. B. durch Nikotinkonsum vorgeschädigte – Intima initiiert (6). Innerhalb der Intima kommt es zur Oxidation von LDL, was die Aktivierung von Endothelzellen bewirkt. Endothelzellen beginnen, verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie das vaskuläre Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) und E-Selektin, zu exprimieren. Dies führt subsequent zur Aktivierung von Monozyten und weiterer proinflammatorischer Zellen. Innerhalb der Intima differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen und beginnen, modifizierte LDL-Partikel zu phagozytieren. Dies führt zur Transformation von Makrophagen in sogenannte Schaumzellen (Foam Cells). In diesem initialen Stadium der Arteriosklerose wird der sich entwickelnde arteriosklerotische Plaque als „fatty streak“ bezeichnet. Diese „fatty streaks“ können bereits in der Gefäßwand von sehr jungen Patienten nachgewiesen werden (6). Kommt es zu einem Fortschreiten der Arteriosklerose, beginnen aktivierte Makrophagen mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie weiterer Gewebefaktoren. Hiermit tragen sie zur Progression und Destabilisierung des arteriosklerotischen Plaques bei (6). Im nächsten Schritt kommt es zur

Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima. Diese proliferierenden glatten Muskelzellen stellen einen Hauptbestandteil der Neointima dar und sind für die Expression von extrazellulären Matrixproteinen, wie z. B. Elastin und Kollagen, verantwortlich (8). Freies Cholesterin, welches in erster Linie aus der Membran roter Blutkörperchen stammt, trägt maßgeblich zur Entwicklung des nekrotischen Kerns der Plaques bei (9). Falls sich diese entzündlichen Prozesse fortsetzen und modifizierte Lipide weiter den Plaque infiltrieren, kann es zu einer weiteren Vergrößerung des nekrotischen Kerns kommen. Parallel zu diesem Prozess zerstören Proteinasen extrazelluläre Matrixproteine, was zu einer deutlichen Ausdünnung der fibrösen Kappe des Plaques führen kann (8). Kommt es zur Plaqueruptur, gerät intravaskuläres Blut in direkten Kontakt mit der Matrix sowie mit exponierten Gewebefaktoren. Dies führt zur „Triggerung“ der Koagulationskaskade. Durch die Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin wird die Aktivierung von Thrombozyten initiiert. Bei einem Verschluss der stromabwärts gelegenen Arterie ist z. B. ein Myokardinfarkt oder Schlaganfall die Folge (6). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass arteriosklerotische Plaques mit einem prominenten nekrotischen Kern, positivem vaskulärem Remodeling sowie einer dünnen fibrösen Kappe mit einem hohen Rupturrisiko assoziiert sind (10, 11). Diese Art der arteriosklerotischen Plaques ist für ca. zwei Drittel aller symptomatischen Myokardinfarkte verantwortlich (12).

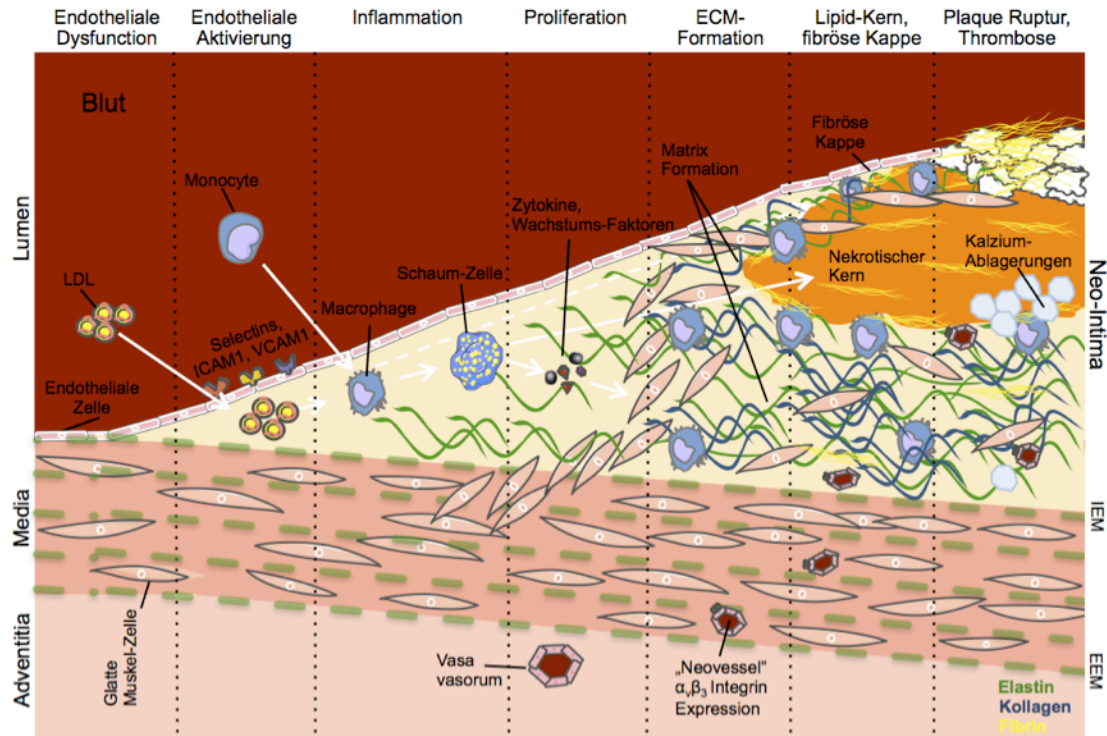


Abbildung 1.1: Graphische Darstellung der verschiedenen Entwicklungsstadien des arteriosklerotischen Plaques. IEM: Interne elastische Membran, EEM: Externe elastische Membran, ECM: Extrazelluläre Matrix, LDL: low density lipoprotein. Angepasst von Makowski et al, Radiology, 2012 in print.

1.3 Gefäßwandbildung mittels MRT

1.3.1 Molekulare Gefäßwandbildung

Kontrastmittel für die Darstellung von extrazellulären Plaquekomponenten

Im Rahmen der arteriosklerotischen Plaqueprogression exprimieren glatte Muskelzellen und Makrophagen verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie z. B. Elastin und Kollagen. Diese Proteine stellen einen bedeutenden Anteil des arteriosklerotischen Plaques dar (8). Ein Beispiel für ein Kontrastmittel, welches an extrazelluläre Plaquekomponenten bindet, ist Gadofluorine. Es ist ein gadoliniumbasiertes makrozyklisches Kontrastmittel mit sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Eigenschaften (13). Dieses Kontrastmittel hat eine längere Bluthalbwertszeit im Vergleich zu herkömmlichen Chelaten wie Gd-DTPA. In einem Kaninchenmodell der Arteriosklerose konnte eine starke Akkumulation von Gadofluorine in lipidreichen Plaques beobachtet werden (14). Neuere Veröffentlichungen haben auch die Kollokalisierung dieses Kontrastmittels mit angioneogenetischen Regionen (15) sowie kollagenreichen Regionen der Plaques gezeigt (16). Fibrin ist ein weiteres extrazelluläres Matrixprotein, welches in der Entwicklung und Progression von arteriosklerotischen Plaques eine wichtige Rolle spielt (17). Zusätzlich stellt es ein wichtiges Protein bei der Thrombusbildung nach Plaqueruptur dar. Verschiedene präklinische Studien haben ein niedermolekulares fibrinspezifisches Kontrastmittel (EP-2104) erfolgreich für die Bildgebung des Thrombus in den Karotiden (18), der Aorta (19, 20), den Lungenarterien (21) und den Koronararterien angewandt (19, 20). Eine hohe Sensitivität für die *in-vivo*-Fibrin-Visualisierung konnte aufgrund der hohen Relaxivität von EP-2104 erreicht werden. Die verabreichte Dosis von 4–7.5 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ war deutlich niedriger im Vergleich zu herkömmlichen, nichtzielgerichteten gadoliniumbasierten Kontrastmitteln (z. B. Gd-DTPA, typischerweise $\sim 0.1\text{--}0.2 \text{ mmol kg}^{-1}$). EP-2104 wurde bereits erfolgreich in Patienten zur Detektion von Thromben in der Aorta, der A. carotis und in den Koronargefäßen verwendet. Diese Studien gehören zu den ersten Bildgebungsstudien, welche die klinische „Translation“ eines

targetspezifischen gadoliniumbasierten MR-Kontrastmittels gezeigt haben (22). Größere Nanopartikel mit mehr als 50 000 Gadolinium-Atomen/Partikel wurden ebenfalls erfolgreich zur *in-vivo*-Detektion von Fibrin im Tiermodell verwendet, sind jedoch nicht in die klinische Anwendung translatiert worden (18).

Kontrastmittel für die Darstellung von zellulären Oberflächenmolekülen

Endotheliale Zelladhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), stellen Biomarker für die Detektion von initialen arteriosklerotischen Wandveränderungen dar. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der endothelialen Aktivierung und der anschließenden Transmigration von Entzündungszellen in die Neointima (23). Die Bildung von endothelialen Adhäsionsmolekülen ist von großer Bedeutung, da diese Moleküle vor allem in den frühen Entwicklungsstadien des arteriosklerotischen Plaques exprimiert werden. Da diese Proteine direkt von Endothelzellen exprimiert werden, sind sie für intravaskuläre Kontrastmittel zugänglich. Die *in-vivo*-Detektion von VCAM-1 wurde bereits erfolgreich in Tiermodellen der Arteriosklerose gezeigt. Die Bindung von VCAM-1-spezifischen Nanopartikeln im Aortenbogen konnte mithilfe von T2*-gewichteten MRT-Sequenzen nachgewiesen werden (24).

Kontrastmittel für die Darstellung von Makrophagen

Im initialen Stadium der Arteriosklerose reagiert das Immunsystem auf die extrazelluläre Ablagerung von Lipiden mit einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand (6). Sie umfasst die Migration von proinflammatorischen Zellen wie Monozyten in die Intima und deren Differenzierung in Makrophagen. Eine hohe Dichte von Makrophagen in der fibrösen Kappe ist eines der charakteristischen Merkmale von „vulnerablen“ oder rupturgefährdeten arteriosklerotischen Plaques (6). Verschiedene kontrastmittelbasierte Ansätze zur Visualisierung von Makrophagen wurden in den letzten Jahren entwickelt und getestet. Der in experimentellen Tiermodellen und Patienten am meisten untersuchte Ansatz basiert auf Eisenoxidpartikeln mit verschiedenen Beschichtungen wie z. B. Dextran

oder Citrat (25, 26). Der exakte Mechanismus, mit welchem Eisenoxidpartikel in arteriosklerotische Plaques aufgenommen werden, ist aktuell noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein möglicher Mechanismus basiert auf der Aufnahme von Eisenoxidpartikeln durch aktivierte Monozyten im Blut. Diese eisenbeladenen Monozyten migrieren anschließend in Areale mit hoher entzündlicher Aktivität im arteriosklerotischen Plaque. Alternativ könnten Eisenoxidpartikel durch die erhöhte endotheliale Permeabilität oder durch „leaky neovessels“ in den Plaque gelangen (26). Die erste erfolgreiche Demonstration der *in-vivo*-Makrophagen-Bildgebung wurde erstmals von Schmitz et al. und Ruehm et al. in einem Kaninchenmodell der Arteriosklerose gezeigt (27, 28). Kürzlich wurde zusätzlich nachgewiesen, dass Eisenoxidpartikel verwendet werden können, um die Makrophagenlast sowie die entzündliche Aktivität in Plaques quantitativ *in-vivo* zu bestimmen (29). Eisenoxidpartikel können im MRT visualisiert werden, da sie die lokale T2- und T2*-Relaxationszeit verkürzen, was zu einem nachweisbaren Signalverlust in T2- und T2*-gewichteten Sequenzen führt. In einigen Fällen kann es schwierig sein, diesen Effekt von dem Signalverlust, aufgrund von Artefakten, Blutungen oder an Wasser-Fett-Schnittstellen, zu differenzieren (30). Daher wurden mehrere Positivkontrast-Techniken in den letzten Jahren entwickelt, um die Empfindlichkeit für den *in-vivo*-Nachweis von Eisenoxidpartikeln zu erhöhen (31). Im Rahmen der Arteriosklerose sind die folgenden Positivkontrast-Techniken in verschiedenen Tiermodellen getestet worden: IRON: „Inversion Recovery“ mit ON-Resonanz-Wasser-Unterdrückung; GRASP: Gradientenecho-Akquisition für superparamagnetische Partikel; SGM: Suszeptibilitäts-Gradienten-Mapping (31–34). Alle diese Techniken erlauben die Detektion von eisenoxidmarkierten Zellen als hyperintense oder helle Voxel. Die IRON-Technik basiert auf einem frequenzselektiven Sättigungs-Vorpuls, der ON-Resonanz mit der Bandbreite von BW_{IRON} ist, um Signal von ON-Resonanz-Protonen zu unterdrücken. Dieser Sättigungspuls hat nur wenig Einfluss auf OFF-Resonanz-Protonen in der Nähe der Eisenoxidpartikel. Daher kann ein positives Signal im Bereich von Eisenoxidpartikeln visualisiert werden (32, 35). Die GRASP-Technik nutzt T2*-gewichtete Gradientenecho-Sequenzen mit einem reduzierten Rephasierungs-Z-

Gradienten. Dies ermöglicht die Erzeugung eines positiven Signals in Regionen mit Eisenoxidablagerungen, da diese Regionen rephasiert werden, während das Signal von anderen Geweben phasenverschoben bleibt (33, 36). Die SGM-Technik ist eine weitere Technik, welche für die Visualisierung von Eisenoxidpartikeln mit positivem Kontrast verwendet wurde. SGM nutzt die lokale Verschiebung im k-Raum, die durch Magnetfeldverzerrungen von Eisenoxidpartikeln erzeugt wird (Suszeptibilitäts-Gradient) (37, 38). Die messbaren Veränderungen im k-Raum korrelieren mit der lokalen Konzentration von Eisenoxidpartikeln (34, 38). IRON- und GRASP-Techniken erfordern dedizierte MRT-Sequenzen und das Wissen über die zu erwartenden Frequenzverschiebungen. SGM ist eine Post-Processing-Technik, die direkt in Verbindung mit 2D- oder 3D-Gradientenecho-Datensätzen angewandt werden kann.

Ein alternativer Ansatz für die Makrophagen-Bildgebung basiert auf paramagnetischen gadoliniumbasierten Mizellen, welche an den – auf aktivierten Makrophagen exprimierten – Scavenger-Rezeptor mit hoher Affinität binden (39). Lipoproteinbasierte Kontrastmittel können ebenfalls für die Bildgebung von makrophagenreichen Plaques verwendet werden. Im Rahmen der molekularen Bildgebung wurden modifizierte HDL-Partikel, welche die endotheliale Schranke überwinden, ausgiebig untersucht. Scheibenförmige und kugelförmige modifizierte HDL-Partikel wurden erfolgreich für die Plaquebildung in Mausmodellen der Arteriosklerose verwendet (40). Spätere Generationen von HDL-Partikeln wurden ebenfalls erfolgreich zur Charakterisierung von arteriosklerotischen Plaques eingesetzt (41, 42).

Kontrastmittel für die Bildgebung der Neovaskularisation

Im Rahmen der Progredienz von arteriosklerotischen Läsionen beginnen sich neue Blutgefäße in der Gefäßwand zu entwickeln. Dieser Prozess wird vermutlich durch die im Plaque lokal ausgeprägte Hypoxie ausgelöst (43). Die Entwicklung dieser neu gebildeten Gefäße (Neovessels) wird direkt mit Plaque-Instabilität in Verbindung gebracht. Aktivierte Endothelzellen dieser Neovessels exprimieren Oberflächenproteine, wie z. B. $\alpha_v\beta_3$, welche nicht von inaktiven Endothelzellen in

gesunden Geweben exprimiert werden (44). Zwei Strategien wurden verwendet, um diesen Prozess *in-vivo* zu detektieren. Ein Ansatz basiert auf der direkten Visualisierung von spezifischen Oberflächenmarkern auf neu gebildeten Blutgefäßen. Mittels gadoliniumbasierter $\alpha_v\beta_3$ -integrinspezifischer Liposomen wurde erfolgreich die lokal verstärkte Angiogeneese in einem Kaninchenmodell der Arteriosklerose *in-vivo* nachgewiesen (44). Alternativ ist es möglich, den durch die Angiogeneese erhöhten Blutfluss in der Adventitia direkt nachzuweisen. Dies kann durch die Anwendung dynamischer kontrastverstärkter (DCE) MRT-Verfahren erreicht werden (45). Klinisch verfügbare Kontrastmittel, wie z. B. Gd-DTPA, können zu diesem Zweck eingesetzt werden. Die lokale Signalintensität im Zielgewebe ist proportional zur lokalen Konzentration des Kontrastmittels. Dynamische kontrastverstärkte MRT-Verfahren erlauben die Messung von Signalintensität mit hoher zeitlicher Auflösung unter Verwendung von T1-gewichteten dynamischen MRT-Sequenzen (45).

Klinische molekulare Gefäßwandbildung

In Patienten mit Arteriosklerose wurde die molekulare MRT-Bildgebung überwiegend in der A. carotis mithilfe von Eisenoxidpartikeln (USPIO) durchgeführt. *In-vivo*-Patientenstudien haben gezeigt, dass sich in vulnerablen oder potenziell vulnerablen arteriosklerotischen Läsionen erhöhte Mengen von Eisenoxidpartikeln nachweisen lassen (26). Bereiche, welche *in-vivo* einen Signalverlust auf T2- und T2*-gewichteten Sequenzen zeigen, korrelieren *ex-vivo* gut mit makrophagenreichen Plaque-Arealen (46). In Patienten mit symptomatischer Erkrankung konnte, im Vergleich zu asymptomatischen Patienten, eine höhere Anzahl von Arealen mit Signalverlust nachgewiesen werden (47). Das Ansprechen von Niedrig- und Hochdosis-Atorvastatin-Therapie wurde kürzlich *in-vivo* mittels Eisenoxidpartikeln gemessen (48). Eine signifikante Reduktion der Eisenoxidaufnahme wurde nach Hochdosis-Therapie mit Atorvastatin gemessen. Ein möglicher Nachteil der Bildgebung unter Verwendung von Eisenoxidpartikeln ist die zeitverzögerte Bildgebung nach intravenöser Injektion. In der Regel beträgt der Zeitversatz mehr als 24 Stunden, da

Eisenoxidpartikel eine relativ lange Bluthalbwertszeit haben, welche für die Akkumulation der Partikel in arteriosklerotischen Plaques erforderlich ist (49). Ein molekulares gadoliniumbasiertes MRT-Kontrastmittel (EP2104) wurde ebenfalls erfolgreich für die direkte Thrombus-Visualisierung in der A. carotis eingesetzt. Dieses Kontrastmittel war das erste fibrinspezifische molekulare MRT-Kontrastmittel, welches in einem klinischen Umfeld erfolgreich getestet wurde (50).

1.3.2 MRT der koronaren Gefäßwand

Technische Herausforderungen

Der überwiegende Anteil von Myokardinfarkten und deren Komplikationen ist mit dem Vorliegen von arteriosklerotischen Plaques in den Koronargefäßen verbunden. Im Vergleich zu den Karotiden und der Aorta ist sowohl das native als auch das kontrastverstärkte MRT der Koronararterien technisch deutlich anspruchsvoller. Dies ist durch das deutlich kleinere Gefäßlumen der Koronararterien und die erhebliche Atem- und Herzbewegung bedingt. Verschiedene Ansätze wurden getestet, um die MRT-Sequenzakquisition auf die respiratorische und kardiale Bewegung anzupassen. In den ersten Jahren der koronaren MRT-Bildgebung wurden Atemanhaltetechniken verwendet, um durch Zwerchfellbewegung bedingte Artefakte zu unterdrücken. Die Atemanhaltedauer, und daher auch die Sequenz-Akquisition, waren in der Regel auf weniger als 20 s begrenzt. Daher wurde mit dieser Aufnahmetechnik nur eine relativ geringe räumliche Auflösung in der akquirierten Schicht erreicht. Zusätzlich kann der Zwerchfelldrift während des Atemanhaltens zu weiteren Bewegungsartefakten führen, welche nicht kompensiert werden können (51). Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden Navigator-Impulse entwickelt. Diese Navigatoren erlauben die kontinuierliche Aufzeichnung der Atembewegung und ermöglichen daher eine kontinuierliche Datenerfassung bei freier Atmung (52). Zu den neuesten Entwicklungen in der Navigator-Technologie gehören „ultrafast motion tracking“-Methoden (53), bewegungsangepasste Gating-Strategien (54) und die Verwendung

von multiplen Bild-Navigatoren (55). Aufgrund der Eigenbewegung der Koronararterien im Herzzyklus ist eine EKG-Synchronisation der Datenerfassung bei allen diesen Methoden zwangsläufig erforderlich.

Native koronare Gefäßwandbildgebung

Die klinische Evaluation der koronaren Herzkrankheit basiert heutzutage in erster Linie auf der Beurteilung der Lumeneinengung im Rahmen der invasiven Koronarangiographie (unter Verwendung intravenöser Kontrastmittel). Arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen, besonders im frühen Stadium, können jedoch zu einer kompensatorischen Erweiterung sowohl der äußeren Gefäßwand als auch des Lumens führen, dem sogenannten positiven Remodeling (56). Diese Arten von Gefäßwandveränderungen können daher nicht sicher von der Koronarangiographie erfasst werden (57). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Vorkommen von positivem Gefäßwand-Remodeling mit Plaque-Vulnerabilität assoziiert ist (58, 59). Die direkte Darstellung der koronaren Gefäßwand kann daher wichtige Informationen beim Screening nach noch subklinischen Gefäßwandveränderungen liefern, welche über die reine Beurteilung des Gefäßlumens hinausgehen. Der intravaskuläre Ultraschall (IVUS) stellt den Referenz-Standard für die Beurteilung der koronaren Gefäßwand dar, ist jedoch ein invasives Verfahren. Die Multidetektor-Computertomographie, welche bereits erfolgreich zur Beurteilung von koronaren Gefäßwandveränderungen und besonders des Lumens (60) eingesetzt wurde, erlaubt keine direkte Darstellung der koronaren Gefäßwand. Zusätzlich ist der Einsatz der Multidetektor-Computertomographie aufgrund der verwendeten ionisierenden Strahlung und der Injektion von jodhaltigen Kontrastmitteln eingeschränkt. Dies ist von besonderer Bedeutung bei jungen Patienten oder im Falle, dass regelmäßige Kontrolluntersuchungen notwendig sind. Die koronare MRT-Bildgebung bietet die Möglichkeit der nichtinvasiven und direkten Darstellung der koronaren Gefäßwand ohne die Verwendung von intravenösen Kontrastmitteln und wurde bereits in multiplen klinischen Studien erfolgreich erprobt und validiert. Unter Benutzung von T2-gewichteten „black blood“-MRT-Sequenzen konnten eine

erhöhte Wanddicke sowie ein positives koronares Remodeling in Patienten mit koronarer Arteriosklerose detektiert und quantifiziert werden (61–63). Eine hohe „inter-study“-Reproduzierbarkeit konnte für diese Methode gezeigt werden (64). Da die koronare MRT-Gefäßwandbildung eine strahlungsfreie und kontrastmittelunabhängige Methode darstellt, ist deren Anwendung besonders reizvoll als Screening-Verfahren bei asymptomatischen und noch jungen Patienten. In frühen Pilotstudien wurde bereits das Potenzial der koronaren Gefäßwandbildung zur Evaluation der koronaren Wanddicke gezeigt (63). Bei einem Großteil der untersuchten Patienten in dieser Studie konnte keine wesentliche Einengung des Gefäßlumens nachgewiesen werden. Diese subklinischen koronaren Gefäßwandveränderungen waren daher mit positivem Remodeling vereinbar (63). In einer Querschnittsstudie wurde bei asymptomatischen Patienten mit langjährigem Diabetes Typ 1 mithilfe der MRT-Gefäßwandbildung eine deutlich höhere Gefäßwanddicke im Vergleich zu Patienten mit Normoalbuminurie nachgewiesen (65). Eine aktuelle Studie, welche ein großes asymptomatisches multi-ethnisches Studienkollektiv untersucht hat, konnte ein positives Remodeling in einer erstaunlich hohen Anzahl von Personen ohne vorbekannte koronare Herzkrankheit nachweisen (66). In einer weiteren vergleichbaren kürzlich veröffentlichten Studie konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (67). Diese Studien demonstrieren das Potenzial der koronaren Gefäßwandbildung zur Früherkennung von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen. Neben der direkten Gefäßwandcharakterisierung, mittels T2*-gewichteten Sequenzen, erlauben nicht kontrastmittelverstärkte T1-gewichtete Sequenzen eine weitere Charakterisierung der Gefäßwand sowie die direkte intrakoronare Thrombus-Detektion. Bereits in frühen Studien wurde ein hyperintensives Signal in nativen T1-gewichteten koronaren Gefäßwandsequenzen berichtet (68, 69). In darauffolgenden Studien wurde diese Form des Signalanstiegs in arteriosklerotischen Plaques näher untersucht. In diesen Studien wiesen arteriosklerotische Plaques ein verstärktes positives Remodeling, eine verstärkte Ultraschallschwächung (im IVUS), niedrige Hounsfield-Einheiten (im MSCT) und vermehrte Verkalkungen auf (70). Alle diese Eigenschaften wurden mit

potenziell instabilen arteriosklerotischen Plaques in Verbindung gebracht. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte unsere Gruppe die Durchführbarkeit der direkten intrakoronaren Thrombus-Detektion bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom unter Verwendung von nativen T1-gewichteten MRT-Sequenzen zeigen (71). Die paramagnetische Wirkung von Methämoglobin, mit fünf ungepaarten Elektronen, in akuten Thrombi wurde ausgenutzt, um intrakoronare Thrombi direkt visualisieren zu können. Der Nachweis oder Ausschluss eines intrakoronaren Thrombus konnte mit hoher Genauigkeit erreicht werden (71).

Kontrastmittelverstärkte Darstellung der koronaren Gefäßwand

Die kontrastmittelverstärkte MRT-Bildgebung stellt einen alternativen und komplementären Ansatz zur nativen Untersuchung der koronaren Gefäßwand dar. T1-gewichtete Sequenzen erlauben die direkte Messung der Kontrastmittelaufnahme in die koronare Gefäßwand. Im klinischen Alltag werden für die MRT-Bildgebung in erster Linie unspezifische extrazelluläre Kontrastmittel (wie zum Beispiel Gd-DTPA) verwendet. Diese Kontrastmittel extravasieren nach intravenöser Injektion schnell in die Gefäßwand und reichern sich aufgrund eines erhöhten Verteilungsvolumens oder der erhöhten Angiogeneese besonders in der arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand an. In Gefäßabschnitten, welche ein sogenanntes „Delayed Enhancement“ aufweisen, korreliert das Ausmaß der Kontrastmittelanreicherung mit der Schwere der Arteriosklerose (68). In Patienten mit Riesenzellarteriitis sowie Takayasu-Arteriitis ist ebenfalls eine vorübergehende Kontrastmittelaufnahme in die koronare Gefäßwand gemessen worden, welche in Verbindung mit dem Vorliegen einer akuten entzündlichen Reaktion und einer Ödembildung gebracht worden ist (68). Ein vergleichbares Anreicherungsmuster wurde in der Gefäßwand von Patienten nach akutem Myokardinfarkt beschrieben (72). Es konnte gezeigt werden, dass die koronare Gefäßwandkontrastmittelaufnahme direkt nach einem Myokardinfarkt erhöht war (72). Drei Monate nach Myokardinfarkt konnte keine erhöhte Kontrastmittelaufnahme mehr gemessen werden, was in erster Linie mit einem Rückgang der entzündlichen koronaren Wandveränderungen in Verbindung steht.

Insgesamt zeigen diese Studien, dass sowohl die Art der Plaquezusammensetzung (z. B. fibrös vs. atheromatös) (73) als auch akute entzündliche Veränderungen (74, 75) mit der Anreicherung von extrazellulären unspezifischen Kontrastmitteln assoziiert sein können. Da nur limitierte Daten zur nativen und kontrastmittelverstärkten MRT der Koronararterien vorliegen, sind weitere prospektive Studien notwendig, um die klinische Bedeutung dieser Techniken für die bessere Diagnose und Charakterisierung der koronaren Arteriosklerose zu ermitteln.

1.4 Fragestellung

Im Rahmen der hier vorliegenden Habilitation wurden verschiedene molekulare Marker, wie Elastin, Fibrin und Eisenoxidpartikel (VSOP), für die *in-vivo*-Charakterisierung von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen in Tiermodellen untersucht. Das ApoE-Knockout-Mausmodell (ApoE^{-/-}) wurde zur primären Untersuchung und Evaluation der MRT-Marker etabliert. In diesem Tiermodell lassen sich arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen, welche auf histologischer Ebene direkt mit Veränderungen in Patienten vergleichbar sind, nachweisen und untersuchen. Neben „Standard“-T1- und T2*-gewichteten MRT-Sequenzen wurden neu entwickelte und verbesserte MRT-Sequenzen angewandt. Hierzu zählen das Suszeptibilitäts-Gradienten-Mapping und T1-Mapping, welches zur *in-vivo*-Quantifizierung des Kontrastmittelsignals angewandt wurde. Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Habilitation untersucht: Welche Rolle spielt Elastin bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques und könnte es einen neuen *in-vivo* Marker zur Bestimmung der Plaquelast darstellen? Können VSOPs, als Makrophagen-Marker, mit Hilfe eines neuen Positivkontrast-Verfahrens *in-vivo* visualisiert und quantifiziert werden? Welche Rolle spielt Fibrin bei der Plaqueeentwicklung und könnte es einen Marker zum nicht-invasiven Staging von arteriosklerotisch Plaques darstellen? Lässt sich das Ausmaß eines Myokardinfarkts, als Folge der Arteriosklerose, *in-vivo* im Mausmodell mit Hilfe der „First-Pass“-Perfusion visualisieren? Die im Rahmen der *in-vivo*-MRT-Messungen gewonnenen Ergebnisse wurden mit Daten aus Histologie, Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie und induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie verglichen und korreliert. Über die Kleintierexperimente hinaus wurde die Translation eines neuen elastinspezifischen Kontrastmittels in die Koronararterie eines Schweinmodells getestet. Dieses Modell erlaubte es, die Eigenschaften und *in-vivo*-Bildgebungsqualitäten des Kontrastmittels unter klinischen Bedingungen zu testen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Bildgebung der Koronararterien aufgrund der starken Bewegung dieses Gefäßbetts große Herausforderungen an die MRT-Bildgebung darstellt.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Bestimmung der arteriosklerotischen Plaquelast mittels eines elastinspezifischen MRT-Kontrastmittels

In der kardiovaskulären Bildgebung stehen verschiedene Methoden zur Detektion und Quantifizierung von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen zur Verfügung. Die Bestimmung der arteriosklerotischen Plaquelast und der Progression der Gefäßwandveränderungen sowie die Evaluation des Therapieansprechens standen immer im Mittelpunkt. Die ersten Studien zu dieser Fragestellung wurden unter Verwendung der Koronarangiographie durchgeführt. Da mit dieser Technik nur das Lumen mithilfe von röntgendichtem Kontrastmittel visualisiert werden kann, erlaubt diese Methode nur eine indirekte Aussage über den Status der Gefäßwand. Diese Studien haben jedoch bereits einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der koronaren Gefäßwunderkrankung und der assoziierten kardiovaskulären Mortalität gezeigt. Der intravaskuläre Ultraschall und die optische Kohärenztomographie sind Methoden, welche speziell für die Darstellung und Charakterisierung der Gefäßwand entwickelt wurden. Der invasive Charakter dieser Bildgebungstechniken macht ein Screening und regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen jedoch nur eingeschränkt realisierbar. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Elastin bei der Plaquentwicklung, mithilfe eines neuen elastinspezifischen Kontrastmittels (ESMA, BMS753951) *in-vivo* zu untersuchen. Zusätzlich sollte getestet werden, ob die arteriosklerotische Plaquelast *in-vivo* mit Hilfe dieses Markers gemessen werden kann. Weiterhin sollte evaluiert werden, ob es mithilfe dieses neuen Kontrastmittels möglich ist, die Krankheitsprogression sowie das Therapieansprechen *in-vivo* zu detektieren und zu quantifizieren. Pharmakokinetik, Bioverteilung und Stabilität von paramagnetischen ^{158}Gd -markierten ESMA ($\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{-Gd}$) wurden bestimmt. ESMA ist ein Kontrastmittel mit relativ niedrigem Molekulargewicht (855.95 Dalton), welches bezüglich seiner Größe vergleichbar ist mit den heutzutage eingesetzten MRT-Kontrastmitteln. Die gemessene Blut-Klearance von ^{153}Gd -ESMA

war relativ schnell. Die Aufnahme und Bindung in der Aorta erreichte ca. 30 Minuten nach intravenöser Injektion ($13.2 \pm 2.3 \% \text{ ID g}^{-1}$) ein Maximum und blieb für mehr als 120 Minuten nahezu konstant. Andere Gewebe, insbesondere Herz, Lunge und Muskeln, zeigten eine relativ geringe Aufnahme und ein schnelles Auswaschen von ESMA aus dem Gewebe. Die *in-vitro* und *in-vivo* metabolische Stabilität $^{153}\text{Gd-ESMA}$ in Mäusen war höher als 85 %. Die *in-vitro*- und *in-vivo*-Plasmaprotein-Bindung von $^{153}\text{Gd-ESMA}$ war geringer als 50 %. Insgesamt reflektieren diese Messungen ein günstiges pharmakokinetisches *in-vivo*-Profil von ESMA. Zur Untersuchung der Rolle von Elastin bei der Progression der Arteriosklerose wurden MRT-Untersuchungen bei männlichen C57BL/6J-ApoE^{-/-}-Mäusen 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn einer fettreichen Diät (HFD) durchgeführt. Zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung auf die Plaque-Progression wurde Pravastatin einer Gruppe von Mäusen über 12 Wochen verabreicht. 20 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse wurden als Kontrollen verwendet. Delayed-Enhancement-Inversion-Recovery-3D-Gradientenecho-Sequenzen (DE-MRT) und T1-Mapping-Sequenzen (T1-Mapping) wurden verwendet. Messungen nach Gabe von Gd-DTPA und $^{158}\text{Gd-ESMA}$ lagen 24 Std. auseinander, um ein vollständiges Auswaschen des Kontrastmittels zu gewährleisten. Nach intravenöser Injektion von $^{158}\text{Gd-ESMA}$ wurde eine schrittweise und deutliche Steigerung des Plaque-CNRs *in-vivo* gemessen. In der Pravastatin-Gruppe wurde ein Rückgang des Plaque-CNRs nachgewiesen. Diese zeitlichen Veränderungen des Plaque-CNRs korrelierten gut mit der Quantifizierung des (Tropo-)Elastingehalts durch Immunoblots ($R^2 = 0.74$, $P < 0.05$) und der Elastindichte in der Elastica-van-Gieson-Färbung ($R^2 = 0.78$, $P < 0.05$). Darüber hinaus zeigte sich eine enge Korrelation zwischen dem *in-vivo*-CNR und der *ex-vivo*-Quantifizierung des Kontrastmittels mittels der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS). Messungen der R1-Relaxivität bestätigten diese Ergebnisse. Nach intravenöser Injektion von $^{158}\text{Gd-ESMA}$ wurde ein stetiger Anstieg der R1-Werte über den Zeitraum der 12-Wochen-HFD gemessen. In der mit Statinen behandelten Gruppe wurde eine Abnahme des Plaque-R1 gemessen. Zusätzlich konnte eine enge Korrelation zwischen R1 und ICP-MS-Werten etabliert werden ($R^2 = 0.76$, $P < 0.05$).

Zur Quantifizierung der Menge von Gadolinium in der Gefäßwand wurden ICP-MS in einer Untergruppe von Plaqueproben von Kontroll- (C57BL/6J) und ApoE^{-/-}-Mäusen durchgeführt (n = 3 pro Gruppe). Eine Zunahme der Anreicherung des Kontrastmittels von der Kontrollgruppe (211.4 ± 26.7 µM) auf die 4-Wochen-HFD-Gruppe (229.7 ± 37.1 µM, P > 0.05 versus Kontrolle), 8-Wochen-HFD-Gruppe (330.9 ± 32.7 µM, P < 0.05 im Vergleich zu 4-Wochen-HFD-Gruppe) und 12-Wochen-HFD-Gruppe (494.8 ± 37.7 µM, P < 0.05 im Vergleich zu 8-Wochen-HFD-Gruppe) konnte gemessen werden. In ApoE^{-/-}-Mäusen unter Therapie mit Pravastatin wurde die Abnahme der Gadolinium-Konzentration (370.1 ± 32.0 µM, P < 0.05 im Vergleich zu 12-wöchigen HFD) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen auf 12-Wochen-HFD gemessen. Um die geringe unspezifische Anreicherung von ESMA in arteriosklerotischen Plaques zu bestätigen, wurden induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie(ICP-MS)-Untersuchungen in drei weiteren Mäusen auf einer 12-wöchigen HFD 10, 25 und 35 Minuten und 24 Stunden nach der Verabreichung von 0.2 mmol kg⁻¹ Gd-DTPA durchgeführt. Gadolinium-Konzentrationen von 57.4 ± 20.1 µM, 35.3 ± 10.0 µM, 30.7 ± 6.4 µM und 5.9 ± 1.4 µM konnten gemessen werden. Darüber hinaus inkubierten wir Aorten von ApoE^{-/-}-Mäusen mit steigenden Mengen von ¹⁵⁸Gd-ESMA (1-100 mM) *ex-vivo*. Die Anreicherung wurde subsequent mittels ICP-MS gemessen. Eine maximale gebundene Konzentration von ¹⁵⁸Gd-ESMA von 24.6 mM, mit einem linearen Verhalten für niedrigere Inkubationskonzentrationen, konnte gemessen werden. Bei höheren Inkubationskonzentrationen wurde die Abweichung von der linearen Korrelation beobachtet. Um die *in-vivo*-Spezifität von ¹⁵⁸Gd-ESMA zu untersuchen, wurden *in-vivo*-Kompetitionsexperimente durchgeführt. Die Prä-Injektion einer zehnfach höheren Dosis (im Vergleich zu der normalerweise injizierten Dosis von ¹⁵⁸Gd-ESMA) von nonparamagnetischem lanthanmarkiertem ESMA (La-ESMA, 2 mmol kg⁻¹, Tag 2) führte zu einem deutlichen Rückgang des CNRs nach ¹⁵⁸Gd-ESMA-Injektion im Vergleich zur Injektion von ¹⁵⁸Gd-ESMA (0.2 mmol kg⁻¹, Tag 1). Kein signifikanter Unterschied zwischen Prä-Scans an den Tagen 1 und 2 und nach der Injektion von non-paramagnetischem La-ESMA am Tag 2 konnte gemessen werden. Die *in-vivo*-Kompetitionsversuche wurden in drei ApoE^{-/-}-Mäusen (12-

Wochen-HFD) durchgeführt. Niedrige *in-vivo* gemessene CNR-Werte in diesen Mäusen korrelierten mit geringen Konzentrationen in der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS, Gd: $164.3 \pm 74.6 \mu\text{M}$) im Vergleich zu Kompetitons-versuchen. Insgesamt konnte in dieser Studie die Möglichkeit der nichtinvasiven Detektion und Quantifizierung der Plaquelast in einem ApoE^{-/-}-Mausmodell mittels eines elastinspezifischen MRT-Kontrastmittels gezeigt werden.

Bibliographischen Angaben des Artikels:

Makowski MR, Wiethoff AJ, Blume U, Cuello F, Warley A, Jansen CH, Nagel E, Razavi R, Onthank DC, Cesati RR, Marber MS, Schaeffter T, Smith A, Robinson SP, Botnar RM. Assessment of atherosclerotic plaque burden with an elastin-specific magnetic resonance contrast agent. *Nature Medicine*. 2011 Mar;17(3):383-8.

2.2 MRT des koronaren Gefäßwandremodelings unter Verwendung eines elastinspezifischen Kontrastmittels

Die extrazelluläre Matrix spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose und In-Stent-Restenose. Elastin ist einer der wesentlichen Bestandteile der extrazellulären Matrix. Die verstärkte Synthese der extrazellulären Matrix führt typischerweise zu arteriellem Remodeling und subsequest zur arteriellen Stenose oder In-Stent-Restenose nach Stent-Implantation. Ziel dieser Studie war es, ein neuartiges elastinbindendes MRT-Kontrastmittel (ESMA, BMS-753951) zur Detektion und Quantifizierung des vaskulären Remodelings in der Koronararterie zu testen. Das vaskuläre Remodeling der Koronararterie wurde in sechs Schweinen durch endotheliale Denudation und Stent-Implantation induziert. Nach 28 Tagen wurde mittels „Delayed Enhancement“-MRT (DE-MRT) die koronare Gefäßwand vor und nach der intravenösen Injektion von Gadolinium-Diethylentriaminpentaessigsäure (Gd-DTPA) untersucht. Zwei Tage später wurde die DE-MRT-Untersuchung vor und nach der Injektion von ESMA wiederholt. Das Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis (CNR) wurde im Bereich der induzierten Gefäßwandverletzung bestimmt. Nach der Injektion von ESMA konnte mittels DE-MRT ein starkes Signal in der durch den Stent verletzten Koronararterienwand nachgewiesen werden. In der ESMA-Gruppe konnte ein 3-fach höheres Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis (CNR) im Vergleich zur ballonverletzten sowie zur Kontroll-Koronararterie (21 ± 6 versus 7 ± 3 und 6 ± 4 ; $P \leq 0.001$) gemessen werden. Die mittels EMSA *in-vivo* gemessene Fläche des koronaren Remodelings korrelierte gut mit der *ex-vivo* gemessenen Fläche (Histologie, $R^2 = 0.86$, $P < 0.05$). In dieser Studie wurde gezeigt, dass ein elastinspezifisches MRT-Kontrastmittel die nichtinvasive Detektion und Quantifizierung des vaskulären Remodelings in der Schweine-Koronararterie ermöglicht. Dieser neuartige Ansatz könnte für die nichtinvasive Beurteilung des koronaren Remodelings bei Patienten mit Verdacht auf koronare Arteriosklerose von Bedeutung sein.

2.3 ..Die nichtinvasive Bestimmung der entzündlichen Aktivität in arteriosklerotischen Plaques unter Verwendung einer Positivkontrast-Technik

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques und sind wesentlich an deren Destabilisierung beteiligt. Das Ziel dieser Studie war es, die Anwendung von VSOPs (very small superparamagnetic iron oxide particles) für die nichtinvasive Messung der inflammatorischen Aktivität von arteriosklerotischen Plaques zu testen. Ein ApoE^{-/-}-Mausmodell wurde zur Untersuchung der verschiedenen Stadien der Plaque-Entwicklung verwendet. Zur Darstellung der VSOP-Anreicherung mittels positivem Kontrast wurde das „Susceptibility Gradient Mapping (SGM)“ angewendet. 300 $\mu\text{mol Fe kg}^{-1}$ wurden 24 und 48 Stunden vor der finalen MRT-Untersuchung intravenös injiziert. Im Verlauf der Plaqueentwicklung konnte eine zunehmende Aufnahme der VSOPs gemessen werden. Die gleichzeitige Gabe von Pravastatin führte zu einer signifikanten Abnahme der VSOP-Anreicherung. Die mittels MRT *in-vivo* erzielten Ergebnisse wurden durch induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie und Histologie *ex-vivo* validiert. Die Anwendung des SGM-MRTs erlaubte die Erzeugung von Positivkontrast-Bildern. Die *in-vivo*-Signalstärke, gemessen in mT m^{-1} in „SG Parameter Maps“, zeigte eine signifikante Korrelation mit dem *ex-vivo* gemessenen absoluten Eisengehalt ($R^2 = 0.70$, $P < 0.05$) sowie der Makrophagendichte ($R^2 = 0.71$, $P < 0.05$).

Insgesamt konnte in dieser Studie die Zunahme der Eisenoxidaufnahme (*in-vivo*-SGM-MRT, *ex-vivo*-Histologie und induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie) mit dem Fortschreiten der Plaqueentwicklung gezeigt werden. Der mittels SGM-MRT erzeugte positive Kontrast erlaubte eine deutliche Visualisierung der intraplaque-Eisenoxidanreicherung. Zusätzlich erlaubte die Bestimmung der Signalintensität (mT m^{-1}) in „SG Parameter Maps“ die Quantifizierung der im Plaque angereicherten Eisenoxidpartikel.

Bibliographischen Angaben des Artikels:

von Bary C, Makowski MR, Preissel A, Keithahn A, Warley A, Spuentrup E, Buecker A, Lazewatsky J, Cesati R, Onthank D, Schickl N, Schachoff S, Hausleiter J, Schömig A, Schwaiger M, Robinson S, Botnar RM. MRI of coronary wall remodeling in a swine model of coronary injury using an elastin-binding contrast agent. *Circulation Cardiovasc Imaging*. 2011 Mar;4(2):147-55. Epub 2011 Mar 4.

2.4 *In-vivo*-Darstellung des intraplaque und endothel-assoziierten Fibrins bei arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen mittels molekularem MRT

Kürzlich veröffentlichte Post-mortem-Studien haben gezeigt, dass intraplaque und endothel-assoziiertes Fibrin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Arteriosklerose spielen. Ziel dieser Studie war es, die Rolle von Fibrin bei der Plaqueeentwicklung mithilfe eines fibrinspezifischen MRT-Markers (FTCA, EPIX Pharmaceuticals, Lexington, USA) zu evaluieren. Delayed-Enhancement-MRT des Truncus brachiocephalicus wurde vor sowie 90 Minuten nach der Injektion von FTCA (n = 8 pro Gruppe) durchgeführt. Das Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis (CNR) und die longitudinalen Relaxationszeiten (R1) der arteriosklerotischen Plaques wurden bestimmt und mit *ex-vivo*-Fibrindichte-Messungen aus immunhistologischen Schnitten sowie Gadolinium-Konzentrationen (gemessen durch induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie, ICP-MS) verglichen. Nach der intravenösen Injektion von FTCA wurde ein signifikanter Anstieg ($P < 0.05$) der Kontrastmittelaufnahme im Truncus brachiocephalicus *in-vivo* gemessen. CNR-Messungen waren in guter Übereinstimmung mit *ex-vivo*-Fibrindichte-Messungen aus der Immunhistochemie ($y = 2.4 \times 11.3$, $R^2 = 0.82$) und der ICP-MS ($y = 0.95 \times 7.1$, $R^2 = 0.70$). Arteriosklerotische Plaques im Spätstadium zeigten die stärkste Zunahme des *in-vivo*-CNRs, R1s und der *ex-vivo*-Fibrindichte sowie von Gadolinium-Konzentrationen ($P < 0.05$).

Insgesamt wurde in dieser Studie das Potenzial von FTCA für die Detektion und Quantifizierung des intraplaque und endothel-assoziierten Fibrins bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen gezeigt. FTCA könnte von besonderer Bedeutung für die *in-vivo*-Klassifikation arteriosklerotischer Plaques (frühe, stabile Plaques vs. entwickelte, potenziell instabile Plaques) sein.

Bibliographischen Angaben des Artikels:

Makowski MR, Forbes SC, Blume U, Warley A, Jansen HP, Schuster A, Wiethoff AJ, Botnar RM. In vivo assessment of intraplaque and endothelial fibrin in ApoE^{-/-} mice by molecular MRI. *Atherosclerosis*, 2012 Jan; Epub x.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.008

2.5 „Myokardiale „First-Pass“ Perfusion bei Myokardinfarkten im Mausmodell

Die Folge der koronaren Arteriosklerose kann das Auftreten eines Myokardinfarkts durch die Verminderungen der myokardialen Perfusion sein. Die myokardiale Perfusion kann bereits in Patienten mithilfe des MRTs bestimmt werden. In dieser Studie wurde eine neue „First-Pass“-Perfusions-MRT-Methode zur Bildgebung in Kleintieren entwickelt. Auf einem klinischen 3.0T-MRT-Scanner (Philips Healthcare, Best, Niederlande) wurde eine 10-fache k-Raum- und zeitliche Unterabtastungsmethode mit eingeschränkter Bildrekonstruktion angewandt. Aufgrund der verwendeten kt-Hauptkomponentenanalyse konnte eine räumliche Auflösung von $0.2 \times 0.2 \times 1.5 \text{ mm}^3$ und eine zeitliche Auflösung von 43 ms erreicht werden. Diese Methode wurde erfolgreich in fünf gesunden Mäusen und in vier Mäusen (C57BL/6J) mit Myokardinfarkt bei einer Herzfrequenz von 495 ± 46 Schlägen/min getestet. Signalintensität-Zeit-Profile zeigten einen myokardialen Signalanstieg von $141.3 \pm 38.9 \%$ im Myokard von gesunden Mäusen, verglichen mit $44.7 \pm 32.4 \%$ in infarzierten Segmenten. Der mittlere myokardiale Blutfluss, welcher mithilfe der Fermi-Funktion für eingeschränkte Entfaltung errechnet wurde, betrug in Mäusen der Kontrollgruppe $7.3 \pm 1.5 \text{ ml/g/min}$. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit bereits in der Literatur veröffentlichten Richtwerten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der myokardialen Perfusion zwischen den drei verwendeten myokardialen Segmenten gefunden. In infarzierten Segmenten wurde ein signifikant erniedrigter myokardialer Blutfluss gemessen $1.2 \pm 0.8 \text{ ml/g/min}$ ($P < 0.01$). Dies war die erste Arbeit, welche zeigte, dass „First-Pass“-Perfusions-MRT-Messungen im Mausmodell möglich sind. Alle Ergebnisse wurden an einem klinischen 3.0T-MRT-Scanner und mithilfe einer kt-Unterabtastungsmethode erzielt. Da alle Daten auf einem klinischen MRT-Scanner mit klinisch anwendbaren Sequenzen erzielt wurden, könnte dies eine direktere Translation von Messergebnissen aus Kleintier-Experimenten auf Humanstudien ermöglichen und somit zur Entwicklung neuerer spezifischer MRT-Perfusionssequenzen beitragen.

Bibliographischen Angaben des Artikels:

Makowski MR, Jansen C, Webb I, Chiribiri A, Nagel E, Botnar R, Kozrke S, Plein S. First-pass contrast-enhanced myocardial perfusion MRI in mice on a 3-T clinical MR scanner. *Magn Reson Med.* 2010 Dec;64(6):1592-8.

3. Diskussion

Die kontrastmittelverstärkte molekulare MRT-Bildgebung bezieht sich auf die nichtinvasive Darstellung biologischer Prozesse auf zellulärer und subzellulärer Ebene. Mithilfe dieser Methode können die *in-vivo*-Charakterisierung und Erkennung von normalen und pathologischen Veränderungen auf molekularem Level erzielt werden. Im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren erreicht die MRT eine hervorragende räumliche Auflösung und einen hohen Weichteilkontrast und bietet die Möglichkeit, simultan Anatomie, Funktion und Veränderungen auf molekularer Ebene zu erfassen (76). Im Gegensatz zu anderen bildgebenden Modalitäten, wie z. B. SPECT (Single-Photon-Emission-Computed-Tomography) und PET (Positronen-Emissions-Tomographie), hat die MRT eine inhärent geringere Empfindlichkeit für die *in-vivo*-Detektion von Kontrastmitteln. Dies kann die präzise *in-vivo*-Detektion von niedrig exprimierten molekularen Markern erschweren. Das Ziel dieser Arbeit war es, drei neue molekulare MRT-Kontrastmittel in Kombination mit speziell entwickelten T1- und T2*-Quantifizierungsmethoden im Kontext verschiedener kardiovaskulärer Krankheitsmodelle zu evaluieren. Die molekulare MRT unter Verwendung von gadolinium- und eisenoxidbasierten Kontrastmitteln hat großes Potenzial für die Charakterisierung von kardiovaskulären Erkrankungen in Patienten. Unspezifische MRT-Kontrastmittel wurden bereits klinisch ausführlich für die *in-vivo*-Gewebecharakterisierung evaluiert. Das „Late Enhancement“-MRT hat sich zum Goldstandard für die nichtinvasive Visualisierung und Quantifizierung von Myokardinfarkten entwickelt. Die molekulare MRT-Bildgebung unter Verwendung spezifischer Kontrastmittel spielt bereits eine wichtige Rolle in der Grundlagenforschung sowie bei der Evaluation neu entwickelter Arzneimittel. Mehrere neue molekulare MRT-Kontrastmittel befinden sich bereits in klinischen Zulassungsverfahren. Das Ziel der molekularen Bildgebung – und speziell der molekularen MRT-Gefäßwandbildung – ist die direkte *in-vivo*-Charakterisierung pathologischer Prozesse auf molekularer Ebene. Molekulare MRT-Kontrastmittel könnten eine deutlich frühere Detektion von pathologischen

Prozessen erlauben und daher das frühere Einleiten von präventiven Maßnahmen (z. B. medikamentös) ermöglichen. Zusätzlich könnte die Evaluierung des Therapieansprechens direkt *in-vivo* beurteilt werden. Im Vergleich zum molekularen MRT haben nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren wie PET und SPECT den Vorteil, dass nur sehr niedrige Dosen des Kontrastmittels injiziert werden müssen. Daher können Liganden schnell in die klinische Anwendung gebracht werden. Diese Modalitäten sind jedoch mit einem erheblichen Maß an Strahlenbelastung verbunden und erreichen nur eine eingeschränkte räumliche Auflösung. Für die Darstellung und Evaluation des kardiovaskulären Systems bietet die MRT-Bildgebung mit ihrer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung verschiedene Vorteile. Dies gilt besonders für die Beurteilung der relativ dünnen Gefäßwand sowie der myokardialen Perfusion. Diese genannten Vorteile können auch sehr nützlich für die *in-vivo*-Darstellung von molekularen Kontrastmitteln sein. Zusätzlich ermöglicht die MRT die Kombination der molekularen Informationen mit anatomischen und physiologischen MRT-Daten, die bereits mittels „Standard“-MRT-Methoden erzeugt werden können. Verschiedene molekulare MRT-Kontrastmittel wurden bereits erfolgreich in humanen Studien angewendet. Zu diesen gehören auch das in dieser Arbeit verwendete makrophagenspezifische (VSOP, Charité, Berlin) sowie das fibrinspezifische MRT-Kontrastmittel (FTCA, EPIX Pharmaceuticals, Lexington, USA).

***In-vivo*-Messung der arteriosklerotischen Plaquelast unter Verwendung eines elastinspezifischen MRT-Kontrastmittels im Maus- und Schweinemodell**

Arteriosklerotische Plaques im ApoE^{-/-}-Mausmodell zeigen viele Ähnlichkeiten mit arteriosklerotischen Plaques im Menschen. Die Plaques entwickeln sich wie im Menschen von zunächst „fatty streaks“ bis hin zu komplexen Läsionen. Daher wurde dieses Modell zur Untersuchung verschiedener MRT-Kontrastmittel verwendet. Zur Untersuchung der Rolle des Elastins bei der Progression der Arteriosklerose wurden MRT-Untersuchungen bei männlichen C57BL/6J-ApoE^{-/-}-Mäusen 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn einer fettreichen Diät (HFD)

durchgeführt. Zur Evaluation der therapeutischen Wirkung auf die Plaqueprogression wurde Pravastatin verabreicht. 20 Wochen alte männliche C57BL/6J-Mäuse dienten als Kontrollen. Acht Mäuse wurden zu jedem Zeitpunkt vor der Gabe von EMSA, nach der Gabe von Gd-DTPA (unspezifisches Kontrastmittel zur Kontrolle) und nach der Gabe von ^{158}Gd -ESMA untersucht. Es wurden „Delayed-Enhancement“-Inversion-Recovery-3D-Gradientenecho-Sequenzen (DE-MRT) und eine T1-Mapping-Sequenz (T1-Mapping) angewandt. In nativen Gefäßwand-Scans konnte nur ein niedriges Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis (CNR) in der Gefäßwand gemessen werden. Ähnliche Ergebnisse, mit einer geringen bis keiner visuell erkennbaren Kontrastmittelaufnahme, wurden nach der Gabe von Gd-DTPA gemessen. Nach intravenöser Injektion von ^{158}Gd -ESMA konnte ein deutliches Signal im Bereich der Gefäßwand mittels DE-MRT in allen Kontroll- (C57BL/6J) und ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Die Bestimmung des prozentualen Atherom/Media-Volumens (PAMV) wurde durch die Definition der inneren und äußeren Querschnittsflächen der Gefäßwand erreicht. Diese Messmethode ist vergleichbar mit der bereits etablierten Plaquelast-Messung im intravaskulären Ultraschall (prozentuales Atherom-Volumen). Ein Anstieg des PAMV konnte zu allen Zeitpunkten nach Gabe der fettreichen Diät nachgewiesen werden. In der Pravastatin-Gruppe fanden wir eine Abnahme des PAMV im Vergleich mit Mäusen auf einer 12-wöchigen HFD. *In-vivo*-PAMV-Messungen zeigten eine enge Korrelation mit *ex-vivo*-Messungen auf Elastica-van-Gieson(EVG)-gefärbten histologischen Schnitten. Die zeitlichen Veränderungen des Plaque-CNRs korrelierten eng mit der Quantifizierung des (Tropo-)Elastingehalts (mittels Western-Immunoblot, $R^2 = 0.74$, $P < 0.05$) und der Elastindichte in EVG-Färbungen ($R^2 = 0.78$, $P < 0.05$). Darüber hinaus konnte eine enge Korrelation zwischen CNR und induktiver gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) nachgewiesen werden. Messungen der R1-Relaxivität bestätigten diese Ergebnisse. Nach Verabreichung von ^{158}Gd -ESMA wurde ein stetiger Anstieg der R1-Werte über die 12-Wochen-HFD nachgewiesen. In der mit Statinen behandelten Gruppe wurde eine Abnahme des Plaque R1 gemessen. Zusätzlich konnte eine enge Korrelation zwischen R1- und ICP-MS-Werten etabliert werden ($R^2 = 0.76$,

$P < 0.05$). Zur direkten Quantifizierung der Menge an Elastin in der Gefäßwand führten wir ein Western-Immunoblotting durch ($n = 5$ pro Gruppe). Es zeigte sich eine allmähliche und signifikante Zunahme des (Tropo-)Elastingehalts während der 12-wöchigen Exposition mit HFD. In der behandelten Gruppe konnte ein signifikant niedrigerer (Tropo-)Elastingehalt nachgewiesen werden. Der Anstieg des Signals im Western-Immunoblotting (mit elastinspezifischen Antikörpern) spiegelt die Erhöhung des (Tropo-)Elastingehalts in der extrazellulären Matrix des Plaques wider. Diese Messungen wurden mit einem konstanten Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Gehalt geeicht. Zur Quantifizierung des in der Gefäßwand gebundenen Kontrastmittels wurden induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie(ICP-MS)-Messungen in einer Untergruppe von Plaqueproben von Kontroll- (C57BL/6J) und ApoE^{-/-}-Mäusen durchgeführt ($n = 3$ pro Gruppe). Eine Zunahme von der Kontrollgruppe ($211.4 \pm 26.7 \mu\text{M}$) auf die 4-Wochen-HFD ($229.7 \pm 37.1 \mu\text{M}$, $P > 0.05$ versus Kontrolle), die 8-Wochen-HFD ($330.9 \pm 32.7 \mu\text{M}$, $P < 0.05$ im Vergleich zur 4-Wochen-HFD) und die 12-Wochen-HFD ($494.8 \pm 37.7 \mu\text{M}$, $P < 0.05$ im Vergleich zur 8-Wochen-HFD) konnte nachgewiesen werden. In ApoE^{-/-}-Mäusen unter Therapie mit Pravastatin wurde eine Abnahme der Gadolinium-Konzentration ($370.1 \pm 32.0 \mu\text{M}$, $P < 0.05$ im Vergleich zur 12-wöchigen HFD) gemessen. Um die geringe unspezifische Anreicherung in arteriosklerotischen Plaques zu demonstrieren, wurden ICP-MS in drei weiteren Mäusen auf einer 12-wöchigen HFD 10, 25 und 35 Min. und 24 Std. nach der Verabreichung von 0.2 mmol kg^{-1} Gd-DTPA durchgeführt. Gadolinium-Konzentrationen von $57.4 \pm 20.1 \mu\text{M}$, $35.3 \pm 10.09 \mu\text{M}$, $30.7 \pm 6.4 \mu\text{M}$ und $5.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$ konnten *ex-vivo* nachgewiesen werden. Um die *in-vivo*-Spezifität von ¹⁵⁸Gd-ESMA zu Elastin zu evaluieren, wurden entsprechende *in-vivo*-Kompetitionsexperimente durchgeführt. Die Prä-Injektion einer zehnfach höheren Dosis (im Vergleich zu der normalerweise injizierten Dosis von ¹⁵⁸Gd-ESMA) von nonparamagnetischem lantheummarkiertem ESMA (La-ESMA, 2 mmol kg^{-1} , Tag 2) führte zu einem deutlichen Rückgang des CNRs nach ¹⁵⁸Gd-ESMA-Injektion im Vergleich zur Injektion von ¹⁵⁸Gd-ESMA (0.2 mmol kg^{-1} , Tag 1). Kein signifikanter Unterschied zwischen Prä-Scans an den Tagen 1 und 2 und nach der Injektion von

nonparamagnetischem La-ESMA am Tag 2 konnte nachgewiesen werden. Niedrige *in-vivo* gemessene CNR-Werte in diesen Mäusen waren vereinbar mit geringen Konzentrationen in den induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) Messungen (Gd: $164.3 \pm 74.6 \mu\text{M}$) im Vergleich zu Kompetitionsversuchen. Zusätzliche *ex-vivo*-Versuche wurden durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurden steigende Konzentrationen von radioaktiven ESMA mit ^{153}Gd -ESMA und plaquereichen Aortas (vom Kaninchen) in einen *ex-vivo*-Gewebe-Bindungs-Assay inkubiert. Die Bindung von ^{153}Gd -ESMA in der plaquereichen Aorta verringert sich invers mit der radioaktiven ESMA-Konzentration. Steigende Konzentrationen von ESMA verdrängten die Bindung von ^{153}Gd -ESMA mit einer halbmaximalen Inhibitionskonzentration von 0.33 mM. Die Ergebnisse dieser Inhibitionsexperimente sind vereinbar mit einer niedrigeren Affinität von ESMA zu seiner spezifischen Bindungsstelle. Zur Bestimmung der Gadolinium-Verteilung innerhalb der arteriellen Gefäßwand nach ^{158}Gd -ESMA-Injektion wurden Röntgenspektren an verschiedenen Stellen in der Gefäßwandprobe mittels elektronenmikroskopischer Methoden aufgenommen ($n = 3$). Die Verteilung von Gadolinium in der Gewebeprobe wurde subsequent gemessen. Es zeigte sich eine Kollokalisierung von Gadolinium mit elastischen Fasern ($n = 3$). Als Kontrolle wurde die räumliche Verteilung von Natrium und Kalium gemessen, es wurde jedoch kein spezifisches Verteilungsmuster beobachtet. Die *in-vitro* und *in-vivo* metabolische Stabilität ^{153}Gd -ESMA in Mäusen war höher als 85 %. Die *in-vitro*- und *in-vivo*-Plasmaprotein-Bindung von ^{153}Gd -ESMA war geringer als 50 %. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse ein günstiges pharmakokinetisches Profil von ESMA. Insgesamt haben wir in dieser Studie erstmals erfolgreich ein neues elastinspezifisches MRT-Kontrastmittel zur Charakterisierung arteriosklerotischer Plaques angewendet. Wir haben die Möglichkeit der nichtinvasiven Detektion sowie Quantifizierung der Plaquelast in einem ApoE-Knockout-Mausmodell gezeigt. Zusätzlich konnte die erfolgreiche *in-vivo*-Bestimmung von Plaqueprogression und -regression gezeigt werden. Nach der intravenösen Injektion von ESMA erlaubte die Evaluation der Plaquequerschnittsflächen die *in-vivo*-Bestimmungen der arteriosklerotischen Plaquelast mit hoher räumlicher

Auflösung. *In-vivo*-Messungen waren in guter Übereinstimmung mit *ex-vivo* histomorphometrischen Messungen. Zusätzlich konnten quantitative Veränderungen im Elastingehalt in der Plaquematrix durch Signalintensitätsmessungen nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine Kolo-kalisation von ESMA mit elastischen Fasern. *In-vivo*-Kompetitionsexperimente mit nicht paramagnetischen Lantheum-ESMA resultierten in einer deutlichen Reduktion des intraplaque-CNRs und der Gadolinium-Konzentration. Die Messungen bestätigen die Spezifität von ESMA für Elastin. Das starke Signal, welches mithilfe dieses Kontrastmittels erzeugt werden kann, resultiert aus der Kombination von hoch exprimierten Zielproteinen mit der schnellen Clearance des Kontrastmittels aus dem Blut-Pool. Wir beobachteten einen Anstieg der Relaxivität von ESMA, wenn es an Elastin gebunden war. Dies führte zu einer deutlichen Erhöhung des Signals von der Gefäßwand. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit dem Verhalten anderer zielgerichteter niedrig-molekularer Kontrastmittel, wie EP2104R. Im Kontext der Arteriosklerose könnte ESMA die nichtinvasive Detektion von arteriosklerotischen Plaques ermöglichen. Zusätzlich eröffnet es die Möglichkeit zur Messung der Plaqueprogression und -regression. Darüber hinaus erlaubt ESMA die spezifische Beurteilung von Veränderungen im Elastingehalt in der extrazellulären Matrix, was eine zusätzliche Charakterisierung der Plaquezusammensetzung auf molekularem Level ermöglicht. Aufgrund des hohen CNRs erlaubt ESMA eine zuverlässige und schnelle Anwendung von T1-Mapping-Methoden, was zu einer erhöhten Standardisierung der Messergebnisse führt. Besonders die Kombination aus *in-vivo*-Plaquelast-Bestimmung und Matrix-Elastin-Zusammensetzung könnte weitere nützliche Informationen für die Beurteilung der Arteriosklerose liefern. Die Gefäßwandbildgebung mittels MRT mit und ohne Verwendung von nichtspezifischen Kontrastmitteln wurde bereits in klinischen Studien für die *in-vivo*-Risikostratifizierung von Patienten mit arteriosklerotischen Wandveränderungen in der A. carotis sowie den Koronararterien erfolgreich angewendet. Die Beurteilung der koronaren Gefäßwanddicke durch das nicht kontrastverstärkte „black blood“-MRT (eine MRT-Sequenz zur Hervorhebung der

Gefäßwand bei gleichzeitiger Unterdrückung des Signals aus dem Blut) ist derzeit auf die Darstellung ausgewählter Koronararteriensegmente beschränkt und hat aufgrund der Komplexität und Länge des Bildgebungsprotokolls noch keinen Eingang in die klinische Routine gefunden. Kontrastmittelverstärkte Ansätze mit unspezifischen Kontrastmitteln, wie Gd-DTPA, sind bereits in klinischen Studien getestet worden. Diese klinisch zugelassenen Kontrastmittel extravasieren schnell in den extravaskulären Raum und reichern sich in der Gefäßwand, als Folge des erhöhten Verteilungsvolumens, der erhöhten endothelialen Permeabilität oder als Folge von Neovaskularisation, an. Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Verwendung eines Ansatzes, der in die humanen Koronararterien „translatiert“ werden kann. Die Bestimmung der Plaquelast kann bereits mit der nicht kontrastverstärkten 3D-koronaren Gefäßwandbildung erfolgreich umgesetzt werden. Diese Methode ist jedoch abhängig vom Blutfluss und kann nicht in einer klinisch angemessen kurzen Untersuchungszeit angewandt werden. Typischerweise sind für die Bildakquisition nichtkartesische k-Raum-Trajektorien und moderne Bildrekonstruktionsalgorithmen erforderlich. Zusätzlich kann nur ein koronares Segment pro 3D-Scan erfasst werden. Darüber hinaus sind eine exakte Bewegungskompensation und eine hohe räumliche Auflösung notwendig. Daher sind diese Ansätze derzeit nicht für ein Screening, welches im Idealfall die Visualisierung aller Koronararterien ermöglichen würde, geeignet. Ein kontrastmittelbasierter Ansatz, wie wir ihn in dieser Arbeit untersucht und validiert haben, ist potenziell zuverlässiger, in einer klinischen Umgebung einfacher zu implementieren und blutflussunabhängig. Solch ein Ansatz kann mit einer robusten kartesischen k-Raum-Abtastung und etablierten „Late Enhancement“-Protokollen durchgeführt werden, welche bereits klinisch für Myokardinfarkt-Bildgebung akzeptiert sind. Darüber hinaus kann es als „Whole Heart“-Protokoll, vergleichbar mit der kardialen Computertomographie, implementiert werden. Um die Anwendbarkeit dieser Methode in den Koronararterien in einem klinischen Umfeld zu testen, wurden weitere Experimente im Schweinmodell durchgeführt. Koronares Remodeling wurde durch die Implantation eines „MRT lucent“-Stents sowie der Verletzung der

Koronararterien mittels Ballondilatation induziert. Sechs Schweine wurden in dieser Studie untersucht. „Late-Enhancement“-MRT -Sequenzen erlaubten die selektive Visualisierung der verletzten Gefäßabschnitte nach intravenöser Injektion von ESMA. Zusätzlich konnte ein starkes Wand-Enhancement in der elastin-reichen Aorta sowie in der A. pulmonalis nachgewiesen werden. Die *in-vivo* gemessene Fläche des Wand-Enhancements korrelierte gut mit der *ex-vivo* gemessenen Fläche aus histologischen Daten ($R^2 = 0.86$, $P < 0.05$).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass ESMA die nichtinvasive Beurteilung der Plaqueprogression und -regression im ApoE-Knockout-Mausmodell (ApoE^{-/-}) der Arteriosklerose erlaubt. Darüber hinaus konnten, mittels Signalintensitäts- und T1-Mapping-Methoden, Veränderungen im Elastingehalt des arteriosklerotischen Plaques quantifiziert werden. Die Translation von ESMA in die Koronararterie eines Schweinmodells zeigte die Möglichkeit der nichtinvasiven Bestimmung des koronaren Remodelings. Insgesamt bietet ESMA großes Potenzial für die nichtinvasive Beurteilung der Plaquelast, vergleichbar mit bereits durch den intravaskulären Ultraschall (IVUS) eingeführten Quantifizierungsmethoden.

Die nichtinvasive Bestimmung der entzündlichen Aktivität in arteriosklerotischen Plaques unter der Verwendung einer Positivkontrast-Technik

In dieser Studie konnten wir erfolgreich die zunehmende Eisenoxidaufnahme, mit der Progression des arteriosklerotischen Plaques unter Verwendung einer Positivkontrast-Technik (SGM-MRT, mT m^{-1}), visualisieren und quantifizieren. Die Einheit (mT m^{-1}) der Kontrastverstärkung in SG-Parameterkarten war in guter Übereinstimmung mit *ex-vivo*-Messungen aus der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) sowie histologischen Färbungen für Eisen und Makrophagen. Diese Studie zeigte, dass SG-Parameterkarten zusätzliche nützliche Informationen (zu T2*-gewichteten Bildern) bei der Evaluation der intraplaque-Eisenoxidaufnahme liefern können. Obwohl andere Gruppen bereits erfolgreich die Eisenoxidaufnahme im Rahmen der Arteriosklerose in präklinischen und klinischen Studien untersucht haben, sind einige Ergebnisse dieser Studie neu. Zum

einen konnten wir zeigen, dass Eisenoxid-Akkumulationen nichtinvasiv im Truncus brachiocephalicus von ApoE^{-/-}-Mäusen visualisiert werden können. Alle Untersuchungen wurden bei klinisch relevanten Feldstärken (3.0 T) mit klinisch anwendbaren MRT-Sequenzen durchgeführt. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Anwendung von SG-Parameterkarten die Quantifizierung von Eisenoxidpartikeln in arteriosklerotischen Plaques mit der Einheit (mT m^{-1}) erlaubt. Verschiedene superparamagnetische Partikel werden derzeit in Phase I–III in den Vereinigten Staaten und Europa untersucht und sollten daher potenziell für eine breitere klinische Anwendung in naher Zukunft verfügbar sein. Schmitz et al. und Ruehm et al. (27, 28) waren die ersten Gruppen, welche berichteten, dass Eisenoxidpartikel von Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques aufgenommen werden und mittels der MRT nichtinvasiv detektiert werden können. Seitdem wurden multiple präklinische und klinische Studien mit Eisenoxidpartikeln durchgeführt. Eisenoxidpartikel können aufgrund der durch sie verursachten Verkürzung der lokalen T₂- und T₂*-Relaxationszeit als Signalauslöschung detektiert werden. Dieser Negativkontrast-Ansatz ist jedoch mit einigen Einschränkungen verbunden: In anatomischen Regionen mit geringem intrinsischem CNR können Eisenoxidablagerungen schwierig vom umgebenden Gewebe diskriminiert werden (30). Das Vorhandensein von Bewegungsartefakten, Blutungen und Verkalkungen kann ebenfalls zur Signalauslöschung führen (26, 30). Um die Sensitivität der *in-vivo*-Eisenoxid-Detektion zu erhöhen, wurden verschiedene Positivkontrast-Techniken entwickelt und in den letzten Jahren untersucht. Drei Positivkontrast-Techniken (SGM, IRON und GRASP) wurden im Kontext der Arteriosklerose untersucht (31–33). Alle Techniken ermöglichten die Detektion von eisenoxidmarkierten Zellen als hyperintense Voxel. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der durch die Anwendung dieser Techniken erzeugte positive Kontrast die Sensitivität für den Nachweis von Eisenoxidablagerungen, im Vergleich zu den negativen Kontrast T₂*-gewichteten Bildern, erhöht. Da Positivkontrast-Techniken ausschließlich Bereiche von Eisenoxidablagerungen darstellen, können aus diesen Sequenzen keine anatomischen Informationen gewonnen werden. Zusätzliche Scans sind daher notwendig, um anatomische

Informationen zu erhalten. Die GRASP- und die IRON-Technik erfordern genaue Kenntnisse über die zu erwartenden Frequenzverschiebungen und das entsprechende Pulssequenzdesign. Das SGM-MRT ist eine Nachbearbeitungstechnik, die in Kombination mit beliebigen 2D- oder 3D-Gradientenecho-Datensätzen angewandt werden kann.

Insgesamt konnten wir in dieser Studie zeigen, dass SGM-MRT die sensitive Detektion und Quantifizierung von intraplaque-Eisenoxidpartikeln in einem Mausmodell der progressiven Arteriosklerose nach VSOP-Injektion ermöglicht. Die intravenös injizierten Eisenoxidpartikel kolokalisierten *ex-vivo* mit Plaque-Makrophagen. Die Magnitude (mT m^{-1}) der SGM-Messungen zeigte eine gute Korrelation mit der Menge der intraplaque-Eisenoxidpartikel. *In-vivo*-Ergebnisse wurden durch *ex-vivo*-Messungen, wie induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) und Immunhistologie/Histologie, validiert. SGM-MRT könnte nützlich für die sensitive *in-vivo*-Detektion und Quantifizierung von Eisenoxid-Nanopartikeln in makrophagenreichen arteriosklerotischen Plaques sein.

***In-vivo*-Messung des intraplaque und endothel-assoziierten Fibrins bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen mittels molekularem MRT**

In dieser Studie haben wir erfolgreich gezeigt, dass die sensitive Detektion von intraplaque und endothel-assoziiertem Fibrin bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen in einem ApoE^{-/-}-Mausmodell mithilfe eines fibrinspezifischen MR-Kontrastmittels (FTCA, EPIX Pharmaceuticals) möglich ist. Fibrin-Anreicherungen konnten selektiv am Ort des arteriosklerotischen Plaques visualisiert werden, während das umgebende Blut-Pool- und Weichteilsignal unterdrückt blieb. Arteriosklerotische Plaques im Spätstadium zeigten das stärkste Signal-Enhancement nach FTCA-Injektion. Eine deutliche Korrelation des *in-vivo*-CNRs mit *ex-vivo*-Fibrindichte-Messungen in immunhistologischen Schnitten konnte gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine signifikante Korrelation des *in-vivo*-CNRs mit *ex-vivo*-Gadolinium-Konzentrationsmessungen (mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie) nachgewiesen. Diese Beobachtungen

sind im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten humanen Autopsiestudie, die deutlich verstärkte Ablagerungen von Fibrin in fortgeschrittenen arteriosklerotischen potenziell vulnerablen Plaques nachweisen konnte (17). Dies war die erste Studie, welche die Durchführbarkeit der *in-vivo*-Fibrin-Detektion und -Quantifizierung während der Progression der Arteriosklerose nachweisen konnte. Zusätzlich konnte das Ansprechen auf eine Statintherapie nichtinvasiv quantifiziert werden. An dieser Stelle ist es wichtig anzumerken, dass in keinem der untersuchten Tiere intraluminale Thromben nachgewiesen werden konnten. Das Vorkommen von Fibrin in verschiedenen Stadien der Plaqueentwicklung (vor Plaqueruptur) in der Aorta und den Koronararterien wurde bereits vor Jahrzehnten beobachtet (77). Fibrin spielt eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis von inflammatorischen Monozyten/Makrophagen, der Proliferation von glatten Muskelzellen und der Angiogenese (78). Eine kürzlich publizierte Studie hat gezeigt, dass Neovessels einen Weg darstellen könnten, über welchen Fibrin in den arteriosklerotischen Plaque vor dessen Ruptur gelangen könnte (17). Es konnte gezeigt werden, dass Fibrin in erster Linie im Spätstadium von arteriosklerotischen Plaques nachzuweisen ist (3, 9). Tavora et al. stellten die Hypothese auf, dass der Austritt von Fibrin aus neu gebildeten Blutgefäßen ein Auslöser für die Ausbildung des nekrotischen Kerns und damit der Übergang vom Früh- in das Spätstadium der arteriosklerotischen Plaqueentwicklung sein könnte (17). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Fibrin einen neuartigen Biomarker für das Vorhandensein und die Entwicklung des nekrotischen Kerns und der Unterscheidung zwischen dem sogenannten „Preatheroma“ und „Atheroma“ darstellen könnte. Selbst unter Anwendung histopathologischer Methoden kann diese Unterscheidung *ex-vivo* schwierig sein (17). Dies war die erste Studie, welche sich speziell der Untersuchung von Fibrin im Rahmen der arteriosklerotischen Plaqueentwicklung mittels eines fibrinspezifischen MRT-Kontrastmittels (FTCA, EPIX Pharmaceuticals) widmete. Alle bisher veröffentlichten Studien, welche fibrinspezifische Kontrastmittel verwendeten, konzentrierten sich auf die Detektion von intraluminale Thromben (19, 79, 80). Das in dieser Studie untersuchte fibrinspezifische Kontrastmittel wurde bereits erfolgreich in Patienten

zur molekularen Detektion von fibrinreichen Thromben angewendet (18, 20, 22). Dies war die erste Studie, welche zeigte, dass FTCA einen nützlichen Marker für die *in-vivo*-Detektion und Charakterisierung von arteriosklerotischen Plaques darstellen könnte. Darüber hinaus konnte das Therapieansprechen *in-vivo* mithilfe dieses fibrinspezifischen Kontrastmittels evaluiert werden. FTCA könnte eine besondere Rolle bei Patienten mit hohem Risiko für das Vorliegen einer koronaren Arteriosklerose oder in Patienten, bei welchen arteriosklerotische Läsionen bereits im Rahmen der Koronarangiographie oder Computertomographie(CT)-Angiographie detektiert wurden, spielen. In dieser Patientengruppe könnte FTCA einen Marker für die *in-vivo*-Differenzierung zwischen einer sehr frühen Entwicklungsstufe der Arteriosklerose, dem sogenannten „Preatheroma“ (extrazelluläre Lipidanlagerungen ohne nekrotischen Kern oder pathologische Verdickung der Intima, PIT), und einem fortgeschrittenen Stadium, dem sogenannten „Atheroma“ („Fibroatheroma“ oder „thin-cap Fibroatheroma“) darstellen. Die *in-vivo*-Differenzierung zwischen frühen stabilen arteriosklerotischen Läsionen und weiter fortgeschrittenen, möglicherweise instabilen arteriosklerotischen Läsionen könnte von großer klinischer Bedeutung sein (17). Obwohl die Plaqueruptur die primäre Ursache des akuten koronaren Syndroms darstellt, wurde gezeigt, dass die sogenannte Plaqueeosion ebenfalls eine wichtige Ursache für die Entwicklung der koronaren Thrombose bei Patienten darstellt (81). Die Plaqueeosion kommt deutlich häufiger bei weiblichen Patienten vor, mit einer Inzidenz von bis zu 25 % der Patientinnen mit akutem Myokardinfarkt (81). In diesem Patientenkollektiv könnte FTCA ebenfalls einen interessanten Biomarker für die *in-vivo*-Detektion dieser pathologischen Gefäßwandveränderungen darstellen (7, 82, 83). Fibrin spielt zusätzlich bei der Entwicklung von In-Stent-Restenosen nach der Implantation von medikamentenbeschichteten Koronarstents eine große Rolle. Hier könnte ein weiterer Anwendungsbereich von FTCA liegen. Insgesamt könnte die *in-vivo*-Detektion von Fibrin mittels FTCA eine wesentliche Rolle bei der frühen nichtinvasiven Identifizierung von Patienten mit einem erhöhten Risiko für Plaqueruptur, Plaqueeosion und In-Stent-Restenose spielen. Zusammenfassend

zeigte diese Studie, dass die molekulare MRT unter Verwendung von FTCA die selektive Bildgebung und Quantifizierung von intraplaque und endothel-assoziiertem Fibrin im ApoE^{-/-}-Mausmodell erlaubt. In diesem Modell und in humanen Autopsiestudien konnte gezeigt werden, dass es zu einer besonders starken Fibrinanreicherung in weitentwickelten, potenziell vulnerablen arteriosklerotischen Plaques kommt. FTCA könnte daher einen nützlichen Marker für die *in-vivo*-Erkennung und Charakterisierung von fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques darstellen.

Myokardiale „First-Pass“ Perfusion bei Myokardinfarkten im Mausmodell

Die Folge der koronaren Arteriosklerose kann das Auftreten eines Myokardinfarkts durch die Verminderungen der myokardialen Perfusion sein. Die myokardiale Perfusion kann bereits in Patienten mithilfe des MRTs bestimmt werden. Dies war die erste Studie, welche die Durchführbarkeit der „First-Pass“ myokardialen Perfusion im Mausmodell untersucht. In dieser Studie wurde eine neue kt-Unterabtastungsmethode zur Perfusionsmessung bei sehr hohen Herzfrequenzen (mehr als 500 Schläge pro Minute) im Kleintiermodell verwendet. Die untersuchte kt-Unterabtastungsmethode bietet mehrere potenzielle Verbesserungen gegenüber den bisher verwendeten Spin-Labeling-MRT-Methoden. Zu diesen zählen insbesondere die schnellere Datenerfassung und eine engere Korrelation mit klinisch eingesetzten Bildgebungsprotokollen. Die in dieser Studie verwendete „First-Pass“ myokardiale Perfusionssequenz basiert auf der stark beschleunigten Datenerfassung mittels der sogenannten kt-PCA-Methode. Es konnte sowohl eine hohe räumliche Auflösung (0.2 x 0.2 mm in der akquirierten Schicht) als auch eine hohe zeitliche Auflösung (43 ms) erreicht werden. Im Vergleich zu den bereits weitgehend automatisierten kt-SENSE-Protokollen im Menschen wurden ein höherer Beschleunigungsfaktor (10 vs. 5–8) und eine geringere Anzahl von Trainingsprofilen angewendet, um die erforderliche Akquisitionsgeschwindigkeit zu erreichen (84). In dieser Studie haben Signal-Zeit-Intensitätsprofile keine Anzeichen für die zeitliche Tiefpassfilterung gezeigt und die berechneten myokardialen Flussgeschwindigkeiten waren vergleichbar mit bereits

veröffentlichten Referenzwerten (85–88). Infarzierte myokardiale Segmente zeigten signifikant verringerte Perfusionswerte. Da diese Studie auf einem klinischen 3T-MRT-Scanner durchgeführt wurde – mit einem Untersuchungsprotokoll, welches bereits klinisch verwendeten Protokollen sehr ähnlich ist – können gewonnene Daten einfacher in die klinische Anwendung translatiert werden. Insgesamt konnten wir in dieser Studie einen neuen Ansatz für die Messung der „First-Pass“ myokardialen Perfusion bei Myokardinfarkten im Mausmodell validieren. Die gemessenen myokardialen Blutflussgeschwindigkeiten (ml/mg/min) lagen innerhalb der erwarteten Referenzwerte. Da die MRT in der klinischen kardiovaskulären Bildgebung und in der Grundlagenforschung im Rahmen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine immer wichtigere Rolle spielt, könnte diese Methode ein nützliches Instrument zur systematischen Untersuchung der Rolle von Ischämie bei Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Bluthochdruck oder Herzinsuffizienz im Tiermodell darstellen.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene molekulare MRT-Marker in Kombination mit T1- und T2*-Quantifizierungsmethoden im Kontext der Arteriosklerose charakterisiert. Die Evaluation eines elastinspezifischen Kontrastmittels (ESMA), makrophagenspezifischen Kontrastmittels (VSOP) und fibrinspezifischen Kontrastmittels (FTCA) wurde im ApoE^{-/-}-Mausmodell der Arteriosklerose durchgeführt. Zur Untersuchung der entsprechenden *in-vivo*-Marker, im Rahmen der Progression der Arteriosklerose, wurden MRT-Untersuchungen bei männlichen C57BL/6J-ApoE^{-/-}-Mäusen 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn einer fettreichen Diät (HFD) durchgeführt (n = 8). Zur Evaluation der therapeutischen Wirkung auf die Plaqueprogression wurde Pravastatin gegeben (40 mg kg⁻¹ Körpergewicht pro Tag, n = 8). 20 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse (n = 8) dienten als Kontrollen. *In-vivo* gemessene Daten wurden *ex-vivo* mithilfe verschiedener Methoden validiert. Hierzu zählten das elektronenmikroskopische Mapping der Kontrastmitteldistribution, das Western-Immunoblotting sowie verschiedene weitere histologische und immunhistochemische Methoden. Die Anwendung eines elastinspezifischen Kontrastmittels bietet großes Potenzial für die nichtinvasive Beurteilung der Plaquelast und des koronaren Remodelings, welche wichtige *in-vivo*-Marker für die Risikostratifizierung der koronaren Arteriosklerose darstellen. Mithilfe eines makrophagenspezifischen Kontrastmittels, in Kombination mit der Entwicklung einer neuen Positivkontrast-Technik, konnte die Makrophagenlast arteriosklerotischer Plaques *in-vivo* quantifiziert werden. Das untersuchte fibrinspezifische Kontrastmittel erlaubt die selektive Visualisierung von plaque-assoziiertem Fibrin. Dies könnte von besonderer Bedeutung für die *in-vivo*-Klassifikation arteriosklerotischer Plaques (frühe, stabile Plaques vs. entwickelte, potenziell instabile Plaques) sein.

Insgesamt bietet die molekulare MRT unter Verwendung zielgerichteter gadolinium- und eisenoxidbasierter Kontrastmittel großes Potenzial für die klinische Evaluierung von kardiovaskulären Erkrankungen. Unspezifische MRT-Kontrastmittel werden in der klinischen Routine für die *in-vivo*-

Gewebecharakterisierung eingesetzt. Das „Late Enhancement“ hat sich bereits als Goldstandard für die Visualisierung und Quantifizierung des myokardialen Infarkts etabliert. Die molekulare MRT-Bildgebung mit zielgerichteten Kontrastmitteln spielt bereits eine wichtige Rolle in der Grundlagenforschung. Mehrere neuartige molekulare MRT-Kontrastmittel stehen aktuell vor ihrer klinischen Zulassung. Das große Potenzial der molekularen MRT-Bildgebung liegt in der Detektion von Alterationen auf molekularem Level, welche kein morphologisches Korrelat zeigen. Molekulare Informationen, welche deutlich über morphologische Informationen hinausgehen, könnten die frühere Detektion von pathologischen Veränderungen, wie zum Beispiel initialen arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen, ermöglichen. Die Anwendung einer solchen Methode könnte die frühere Einleitung von therapeutischen Maßnahmen erlauben und zur Prävention verschiedener Erkrankungen beitragen. Zusätzlich könnte eine solche Technik die nichtinvasive und direkte Evaluation des Therapieansprechens ermöglichen und somit die Optimierung und Individualisierung verschiedener Therapieschemata ermöglichen. Im Vergleich zur molekularen MRT haben nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren (PET und SPECT) den Vorteil, dass nur sehr niedrige Dosen von Kontrastmitteln injiziert werden müssen. Dies erlaubt die schnelle Evaluation dieser Substanzen in humanen Studien. Der Einsatz dieser Modalitäten ist jedoch mit einer Strahlenbelastung verbunden und es kann nur eine sehr eingeschränkte räumliche Auflösung erreicht werden. Für die Evaluation des kardiovaskulären Systems bietet die MRT-Bildakquisition mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung zahlreiche Vorteile. Diese werden besonders bei der Darstellung der sehr dünnen Gefäßwand sowie der myokardialen Perfusion mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung deutlich. Die MRT ermöglicht zusätzlich die Integration der molekularen Informationen mit anatomischen und physiologischen MRT-Daten, die bereits mittels „konventionellen“ MRT-Sequenzen erlangt werden können. Zukünftige Entwicklungen im Bereich des molekularen MRTs liegen besonders im Bereich des Designs und der Synthese von neuen zielgerichteten Markern mit deutlich höheren Relaxivitätswerten sowie der Entwicklung neuer sensitiver Detektionsverfahren.

Insgesamt hat die molekulare MRT großes Potenzial, alle Aspekte der kardiovaskulären Bildgebung – vom frühen Screening von Patienten bis hin zur Evaluation des Therapieansprechens in frühen und fortgeschrittenen Krankheitsstadien – deutlich zu erweitern.

5. Literatur

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1498-1504.
2. Rosamond W, Flegal K, Friday G, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007;115:69-6171.
3. Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177-8.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
5. Martini F, Tallitsch R. *Human Anatomy: International Edition, 6/E*: Pearson Higher Education, 2009.
6. Libby P, Ridker PM, Hansson GrK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-325.
7. Sato Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Asada Y. Incidence of asymptomatic coronary thrombosis and plaque disruption: comparison of non-cardiac and cardiac deaths among autopsy cases. *Thromb Res* 2009;124:19-23.
8. Krettek A, Sukhova GK, Libby P. Elastogenesis in human arterial disease: a role for macrophages in disordered elastin synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:582-7.
9. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-2325.
10. Narula J, Garg P, Achenbach S, Motoyama S, Virmani R, Strauss HW. Arithmetic of vulnerable plaques for noninvasive imaging. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2008;5 Suppl 2:S2-10.
11. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, et al. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *The New England journal of medicine* 2011;364:226-35.
12. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek J, Virmani R. Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation* 1998;97:2110-2116.
13. Meding J, Urich M, Licha K, et al. Magnetic resonance imaging of atherosclerosis by targeting extracellular matrix deposition with gadofluorine M. *Contrast Media & Molecular Imaging* 2007;2.
14. Sirol M, Itskovich VV, Mani V, et al. Lipid-rich atherosclerotic plaques detected by gadofluorine-enhanced in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2004;109:2890-6.
15. Sirol M, Moreno P, Purushothaman K, et al. Increased Neovascularization in Advanced Lipid-Rich Atherosclerotic Lesions Detected by Gadofluorine-M-Enhanced MRI: Implications for Plaque Vulnerability. *Circulation: Cardiovascular Imaging* 2009;2:391-396.

16. Ronald JA, Chen Y, Belisle AJ, et al. Comparison of gadofluorine-M and Gd-DTPA for noninvasive staging of atherosclerotic plaque stability using MRI. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009;2:226-34.
17. Tavora F, Cresswell N, Li L, Ripple M, Burke A. Immunolocalisation of fibrin in coronary atherosclerosis: implications for necrotic core development. *Pathology* 2010;42:15-22.
18. Flacke S, Fischer S, Scott MJ, et al. Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation* 2001;104:1280-5.
19. Botnar RM, Buecker A, Wiethoff AJ, et al. In vivo magnetic resonance imaging of coronary thrombosis using a fibrin-binding molecular magnetic resonance contrast agent. *Circulation* 2004;110:1463-6.
20. Botnar RM, Perez AS, Witte S, et al. In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent. *Circulation* 2004;109:2023-9.
21. Spuentrup E, Buecker A, Katoh M, et al. Molecular Magnetic Resonance Imaging of Coronary Thrombosis and Pulmonary Emboli With a Novel Fibrin-Targeted Contrast Agent. *Circulation* 2005.
22. Spuentrup E, Botnar RM, Wiethoff A, et al. MR imaging of thrombi using EP-2104R, a fibrin specific contrast agent: initial results in patients. *European Radiology* 2008;18:1995-2005 (11).
23. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-91.
24. Nahrendorf M, Jaffer F, Kelly K, et al. Noninvasive Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Imaging Identifies Inflammatory Activation of Cells in Atherosclerosis. *Circulation* 2006;114:1504-1511.
25. Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, et al. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 2004;39:394-405.
26. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, et al. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;107:2453-8.
27. Ruehm SG, Corot C, Vogt P, Kolb S, Debatin JF. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001;103:415-22.
28. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Invest Radiol* 2000;35:460-71.
29. Morishige K, Kacher DF, Libby P, et al. High-resolution magnetic resonance imaging enhanced with superparamagnetic nanoparticles measures macrophage burden in atherosclerosis. *Circulation* 2010;122:1707-15.

30. Farrar CT, Dai G, Novikov M, et al. Impact of field strength and iron oxide nanoparticle concentration on the linearity and diagnostic accuracy of off-resonance imaging. *NMR Biomed* 2008;21:453-63.
31. Liu W, Dahnke H, Jordan EK, Schaeffter T, Frank JA. In vivo MRI using positive-contrast techniques in detection of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *NMR Biomed* 2008;21:242-50.
32. Korosoglou G, Weiss RG, Kedziorek DA, et al. Noninvasive detection of macrophage-rich atherosclerotic plaque in hyperlipidemic rabbits using "positive contrast" magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:483-91.
33. Mani V, Briley-Saebo KC, Itskovich VV, Samber DD, Fayad ZA. Gradient echo acquisition for superparamagnetic particles with positive contrast (GRASP): sequence characterization in membrane and glass superparamagnetic iron oxide phantoms at 1.5T and 3T. *Magn Reson Med* 2006;55:126-35.
34. Makowski MR, Varma G, Wiethoff A, et al. Non-Invasive Assessment of Atherosclerotic Plaque Progression in ApoE^{-/-} Mice Using Susceptibility Gradient Mapping. *Circulation. Cardiovascular imaging* 2011.
35. Stuber M, Gilson WD, Schar M, et al. Positive contrast visualization of iron oxide-labeled stem cells using inversion-recovery with ON-resonant water suppression (IRON). *Magn Reson Med* 2007;58:1072-1077.
36. Mani V, Briley-Saebo KC, Hyafil F, Fayad ZA. Feasibility of in vivo identification of endogenous ferritin with positive contrast MRI in rabbit carotid crush injury using GRASP. *Magn Reson Med* 2006;56:1096-106.
37. Reichenbach JR, Venkatesan R, Yablonskiy DA, Thompson MR, Lai S, Haacke EM. Theory and application of static field inhomogeneity effects in gradient-echo imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997;7:266-79.
38. Dahnke H, Liu W, Herzka D, Frank JA, Schaeffter T. Susceptibility gradient mapping (SGM): a new postprocessing method for positive contrast generation applied to superparamagnetic iron oxide particle (SPIO)-labeled cells. *Magn Reson Med* 2008;60:595-603.
39. Amirbekian V, Lipinski MJ, Briley-Saebo KC, et al. Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:961-6.
40. Frias JC, Ma Y, Williams KJ, Fayad ZA, Fisher EA. Properties of a versatile nanoparticle platform contrast agent to image and characterize atherosclerotic plaques by magnetic resonance imaging. *Nano letters* 2006;6:2220-4.
41. Cormode DP, Briley-Saebo KC, Mulder WJ, et al. An ApoA-I mimetic peptide high-density-lipoprotein-based MRI contrast agent for atherosclerotic plaque composition detection. *Small* 2008;4:1437-44.

42. Chen W, Vucic E, Leupold E, et al. Incorporation of an apoE-derived lipopeptide in high-density lipoprotein MRI contrast agents for enhanced imaging of macrophages in atherosclerosis. *Contrast Media Mol Imaging* 2008;3:233-42.
43. Purushothaman KR, Sanz J, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Atherosclerosis neovascularization and imaging. *Curr Mol Med* 2006;6:549-56.
44. Winter PM, Morawski AM, Caruthers SD, et al. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles. *Circulation* 2003;108:2270-2274.
45. Kerwin WS, O'Brien KD, Ferguson MS, Polissar N, Hatsukami TS, Yuan C. Inflammation in carotid atherosclerotic plaque: a dynamic contrast-enhanced MR imaging study. *Radiology* 2006;241:459-68.
46. Trivedi RA, Mallawarachi C, U-King-Im J-M, et al. Identifying inflamed carotid plaques using in vivo USPIO-enhanced MR imaging to label plaque macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1601-1606.
47. Howarth SP, Tang TY, Trivedi R, et al. Utility of USPIO-enhanced MR imaging to identify inflammation and the fibrous cap: a comparison of symptomatic and asymptomatic individuals. *European journal of radiology* 2009;70:555-60.
48. Tang TY, Howarth SP, Miller SR, et al. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;53:2039-50.
49. Tang TY, Patterson AJ, Miller SR, et al. Temporal dependence of in vivo USPIO-enhanced MRI signal changes in human carotid atheromatous plaques. *Neuroradiology* 2009;51:457-465.
50. Vymazal J, Spuentrup E, Cardenas-Molina G, et al. Thrombus imaging with fibrin-specific gadolinium-based MR contrast agent EP-2104R: results of a phase II clinical study of feasibility. *Invest Radiol* 2009;44:697-704.
51. Holland AE, Goldfarb JW, Edelman RR. Diaphragmatic and cardiac motion during suspended breathing: preliminary experience and implications for breath-hold MR imaging. *Radiology* 1998;209:483-9.
52. Stuber M, Botnar RM, Danias PG, Kissinger KV, Manning WJ. Submillimeter three-dimensional coronary MR angiography with real-time navigator correction: comparison of navigator locations. *Radiology* 1999;212:579-87.
53. Spuentrup E, Manning WJ, Botnar RM, Kissinger KV, Stuber M. Impact of navigator timing on free-breathing submillimeter 3D coronary magnetic resonance angiography. *Magn Reson Med* 2002;47:196-201.

54. Hackenbroch M, Nehrke K, Gieseke J, et al. 3D motion adapted gating (3D MAG): a new navigator technique for accelerated acquisition of free breathing navigator gated 3D coronary MR-angiography. *Eur Radiol* 2005;15:1598-606.
55. Nehrke K, Bornert P, Manke D, Bock JC. Free-breathing cardiac MR imaging: study of implications of respiratory motion--initial results. *Radiology* 2001;220:810-5.
56. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-1375.
57. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001;103:2705-10.
58. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:297-303.
59. Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation* 2002;105:939-43.
60. Achenbach S, Ropers D, Hoffmann U, et al. Assessment of coronary remodeling in stenotic and nonstenotic coronary atherosclerotic lesions by multidetector spiral computed tomography. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;43:842-7.
61. Botnar RM, Stuber M, Kissinger KV, Kim WY, Spuentrup E, Manning WJ. Noninvasive coronary vessel wall and plaque imaging with magnetic resonance imaging. *Circulation* 2000;102:2582-7.
62. Fayad ZA, Fuster V, Fallon JT, et al. Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging. *Circulation* 2000;102:506-10.
63. Kim WY, Stuber M, Bornert P, Kissinger KV, Manning WJ, Botnar RM. Three-dimensional black-blood cardiac magnetic resonance coronary vessel wall imaging detects positive arterial remodeling in patients with nonsignificant coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:296-9.
64. Hazirolan T, Gupta SN, Mohamed MA, Bluemke DA. Reproducibility of black-blood coronary vessel wall MR imaging. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2005;7:409-13.
65. Kim WY, Astrup AS, Stuber M, et al. Subclinical coronary and aortic atherosclerosis detected by magnetic resonance imaging in type 1 diabetes with and without diabetic nephropathy. *Circulation* 2007;115:228-235.
66. Miao C, Chen S, Macedo R, et al. Positive remodeling of the coronary arteries detected by magnetic resonance imaging in an asymptomatic population: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1708-15.
67. Gerretsen SC, Kooi ME, Kessels AG, et al. Visualization of Coronary Wall Atherosclerosis in Asymptomatic Subjects and Patients with Coronary Artery Disease Using Magnetic Resonance Imaging. *PLOS One* 2010;5:e12998.

68. Yeon SB, Sabir A, Clouse M, et al. Delayed-Enhancement Cardiovascular Magnetic Resonance Coronary Artery Wall Imaging Comparison With Multislice Computed Tomography and Quantitative Coronary Angiography. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;50:441-447.
69. Maintz D, Ozgun M, Hoffmeier A, et al. Selective coronary artery plaque visualization and differentiation by contrast-enhanced inversion prepared MRI. *Eur Heart J* 2006;27:1732-1736.
70. Kawasaki T, Koga S, Koga N, et al. Characterization of Hyperintense Plaque With Noncontrast T1-Weighted Cardiac Magnetic Resonance Coronary Plaque Imaging Comparison With Multislice Computed Tomography and Intravascular Ultrasound. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2009;2:720-728.
71. Jansen CHP, Perera D, Makowski MR, et al. Detection of Intracoronary Thrombus by Magnetic Resonance Imaging in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2011;In Print.
72. Ibrahim T, Makowski MR, Jankauskas A, et al. Serial contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging demonstrates regression of hyperenhancement within the coronary artery wall in patients after acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009;2:580-8.
73. Yuan C, Zhang S-x, Polissar NL, et al. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation* 2002;105:181-185.
74. Cai J, Hatsukami TS, Ferguson MS, et al. In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology. *Circulation* 2005;112:3437-3444.
75. Langerak SE, Kunz P, Vliegen HW, et al. Improved MR flow mapping in coronary artery bypass grafts during adenosine-induced stress. *Radiology* 2001;218:540-547.
76. Johnson GA, Benveniste H, Black RD, Hedlund LW, Maronpot RR, Smith BR. Histology by magnetic resonance microscopy. *Magn Reson Q* 1993;9:1-30.
77. Bini A, Fenoglio JJ, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 1989;9:109-121.
78. Falk E, Fernandez-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol* 1995;75:11.
79. Sirol M, Aguinaldo JG, Graham PB, et al. Fibrin-targeted contrast agent for improvement of in vivo acute thrombus detection with magnetic resonance imaging. *Atherosclerosis* 2005;182:79-85.
80. Sirol M, Fuster V, Badimon JJ, et al. Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance imaging and a fibrin-targeted contrast agent. *Circulation* 2005;112:1594-1600.

81. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* 1999;82:269-72.
82. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47:C13-8.
83. Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, Sumiyoshi A, Asada Y. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart* 2005;91:526-30.
84. Pedersen H, Kozerke S, Ringgaard S, Nehrke K, Kim WY. k-t PCA: temporally constrained k-t BLAST reconstruction using principal component analysis. *Magn Reson Med* 2009;62:706-16.
85. Richer C, Domergue V, Gervais M, Bruneval P, Giudicelli JF. Fluospheres for cardiovascular phenotyping genetically modified mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:396-404.
86. Raher MJ, Thibault H, Poh KK, et al. In vivo characterization of murine myocardial perfusion with myocardial contrast echocardiography: validation and application in nitric oxide synthase 3 deficient mice. *Circulation* 2007;116:1250-7.
87. Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M. Myocardial blood flow mapping in mice using high-resolution spin labeling magnetic resonance imaging: influence of ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. *Magn Reson Med* 2005;53:601-6.
88. Trabold F, Pons S, Hagege AA, et al. Cardiovascular phenotypes of kinin B2 receptor- and tissue kallikrein-deficient mice. *Hypertension* 2002;40:90-5.
89. Judenhofer MS, Wehrl HF, Newport DF, et al. Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. *Nat Med* 2008;14:459-65.
90. Kircher MF, Mahmood U, King RS, Weissleder R, Josephson L. A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. *Cancer Res* 2003;63:8122-5.

6. Erklärung

§ 4 Abs.3 der HabOmed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift