

Von drei untersuchten Zeitpunkten kristallisierten sich die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach Verabreichung des Kontrastmittels als geeignet zur Detektion von atherosklerotischen Läsionen im MRT heraus. Die MR-Technik wurde in diesen Experimenten optimiert: Als geeignete Sequenz wurde eine Inversion-recovery-turbo-FLASH Sequenz erwählt, welche ursprünglich zur Visualisierung von Myokardinfarkten entwickelt wurde (BARKHAUSEN et al 2003). Die genaue histologische Lokalisation des Kontrastmittels in der Plaque ist allerdings unbekannt, ein Zusammenhang mit Makrophagentätigkeit aufgrund der zuvor gelungenen Lymphographie wird bis dato angenommen (MISSELWITZ et al 1999). In beiden Geweben, den Lymphknoten und atherosklerotischen Läsionen kommen als gemeinsame Zellstruktur Makrophagen und Monozyten als Zellen des MPS vor. Dass sich auch USPIO-Partikel nach intravenöser Verabreichung intrazellulär in der Plaque befinden, stützte diese Annahme. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher insbesondere mit der histologischen Lokalisation dieses und eines zweiten Kontrastmittels (Gadophin-2), welches nekroseaffin (SAEED et al 2002, BARKHAUSEN et al 2002) ist.

### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Untersuchte Tiere**

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten an insgesamt 31 männlichen, adulten Kaninchen. Darunter befanden sich 27 homozygote WHHL-Kaninchen, die vom Züchter Covance USA erworben wurden, und 4 Weiße Neuseeländer Kaninchen (SPF) vom Züchter Ch. R. Kißlegg. Die Haltung und Fütterung der Tiere war standardisiert: Alle Kaninchen erhielten Futter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest mit der Bezeichnung V2373-000 ssniff K-H, Ered ad libitum (Ch-Bez. 9612450). Die Haltung erfolgte in Kaninchenkäfigen der Firma Scanbur. Die Käfiggröße betrug bei <3,5 kg KGW 2500 cm<sup>2</sup> und bei >3,5 kg KGW 3500cm<sup>2</sup>. Wasser erhielten die Tiere aus Wasserflaschen, bei Bedarf auch aus Trinknäpfen.

Alle Kaninchen besaßen zum Zeitpunkt der Experimente ein Gewicht von 3,5-4,2 kg. Die untersuchten WHHL Kaninchen waren 12-15 Monate alt, in diesem Alter ist die Wahrscheinlichkeit atherosklerotischer Veränderungen im Aortenbogen sehr hoch.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Narkose und Tötung

Die Kaninchen wurden für die MRT-Untersuchungen und zur Tötung zwecks histologischer Untersuchung intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur mit Xylazin (Rompun® 2% Injektionslösung, 20mg/ml; Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) und Ketaminhydrochlorid (Ketavet® Injektionslösung, 100 mg/ml; Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in der Mischspritze 1+1 1ml/kg narkotisiert.

Die Tötung der Kaninchen erfolgte an narkotisierten Tieren mittels intravenöser Applikation von 2 ml T61 über die laterale Ohrrendvene.

### 3.2.2 Kontrastmittel

Zwei paramagnetische Gd-haltige KM der Firma Schering wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

- Gadophrin-2, ZK 138542; Schering AG Berlin

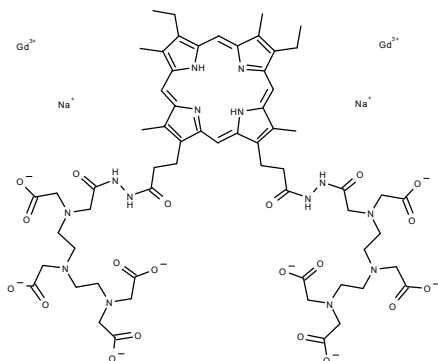
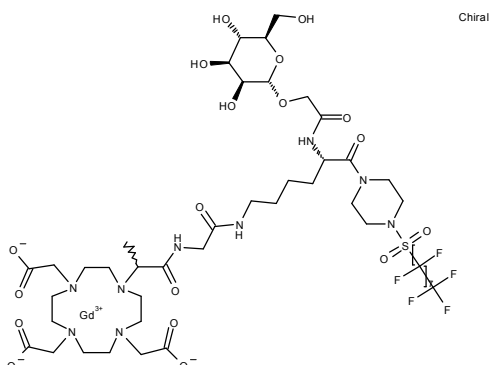


Abb. 1: Gadophrin-2

- Gadofluorine-M; ZK 203060; Schering AG Berlin

Abb. 2: Gadofluorine-M



Die Strukturformeln beider Substanzen unterscheiden sich sehr, dennoch weisen sie physikalisch-chemisch und pharmakokinetisch einige Gemeinsamkeiten auf: beide Substanzen, insbesondere Gadofluorine-M, sind lipophiler als andere extrazellulär verbleibende Kontrastmittel (Standard: Magnevist).

**Gadophrin-2** besitzt einen Porphyrinring mit zwei DTPA-Chelaten und ist eine im Licht instabile Verbindung. Aufgrund der Porphyrinanteile besitzt Gadophrin-2 eine Autofluoreszenz.

**Gadofluorine-M**, ein makrocyclisches Chelat mit großer Neigung zur Mizellenbildung, besitzt als Rückgrat ein Lysin, an dem sich ein Gd-Chelat, ein Zucker und eine lipophile Perfluorkette befinden. Gadofluorine-M ist trotz seiner Lipophilie aufgrund der mizellenbildenden Eigenschaften wasserlöslich. Die in Wasser ca. 5 nm großen Mizellen ermöglichen die Einlagerung von hydrophoben Verbindungen zwischen die lipophilen Seitenketten. Die wasserlösliche Mizelle ist somit in der Lage, wasserunlösliche Moleküle als Vehikel mit sich zu transportieren. Da Gadofluorine-M keine Autofluoreszenz besitzt, musste es zur Lokalisation im Gewebe für die Fluoreszenzmikroskopie markiert werden: Perfluoralkylindocarbocyanin (ZK247837, hergestellt von Dr. Licha, Schering AG) wurde als Feststoff in Gadofluorine-M-Lösung eingerührt und mittels Ultraschallbad (15 min bei 40°C) stabilisiert. Die Farbstoffmoleküle fügen sich aufgrund amphiphatischer Eigenschaften als Bestandteil in die Mizellenstruktur der Gadofluorine-M-Moleküle ein, so dass anschließend sogenannte Mischmizellen (1 mol%) mit fluoreszierenden Eigenschaften (Emission bei 580 nm und Anregungsbereich bei 520-550 nm) vorlagen. In der Annahme, dass eine Mizelle aus 100 Gadofluorine-M-Molekülen besteht, kommt ein Farbstoffmolekül auf eine Mizelle.

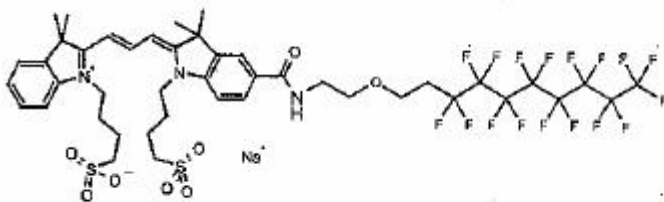


Abb. 3: Perfluoralkylindocarbocyanin,  $C_{44}H_{47}F_{17}N_3O_8S_2Na$ ; Farbstoff von Gadofluorine-M

Als superparamagnetisches Kontrastmittel wurden kleine Eisenoxidpartikel der Firma Schering im 2. Versuchsteil verwendet:

**SHU 555 C**: ZK 132281; Schering AG; ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ )

Sogenannte SPIO's (Superparamagnetic iron oxides) sind Nanopartikel bestehend aus stabilisierten Eisenoxiden mit sehr hohen T1 und T2 Relaxivities. Die besonders kleinen Partikel werden ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs) genannt. Im Unterschied zu den SPIO's werden die USPIOs aufgrund ihrer geringeren Größe weniger stark von den Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) phagozytiert und können somit länger im Blut und Extrazellularraum zirkulieren, bevor sie in der Leber, der Milz und den Lymphknoten akkumulieren (WEISSELDER et al 1990; SCHMITZ et al 2001 a und b; WEINMANN et al 2003).

Tabelle 3: Pharmakologische Eigenschaften der verwendeten Kontrastmittel bei der Ratte (Ergebnisse der Abteilung MRI & X-Ray, Schering AG Berlin)

	Magnevist (Referenz)	Gadophrin-2	Gadofluorine-M	SHU555C
Relaxivity bei 1,5 T in Plasma bei 37 °C(l/mmol s)	R1=4,2 R2=4,2	R1=12,4 R2=18,7	R1=16,5 R2=23,5	R1=11,9 R2=48,8
Bluthalbwertszeit	28 min	2-2,2 h	10 h	30-60 min

### 3.2.3 Versuchsablauf: Versuch 1

#### 3.2.3.1 Gruppenbildung (Tabelle 4)

Es wurden vier Gruppen (I-IV) aus je vier WHHL-Kaninchen und je einem Kontrollkaninchen (Weißer Neuseeländer = WN), sowie einer Kontrollgruppe (V), bestehend aus vier WHHL-Kaninchen gebildet: Die Tiere der **Versuchsgruppen I und II** erhielten Gadophrin-2. Gruppe I wurde 23,5 h p.i. im MRT untersucht und 24h p.i. zur histologischen Untersuchung und Substanzlokalisierung getötet, Gruppe II wurde 47,5 h p.i. im MRT untersucht und nach 48h p.i. zur histologischen Untersuchung und Substanzlokalisierung getötet.

Die **Gruppen III und IV** erhielten Gadofluorine-M. Gruppe III wurde 23,5 h p.i. im MRT untersucht und 24h p.i. zur histologischen Untersuchung und Substanzlokalisierung getötet, Gruppe IV wurde 47,5 h p.i. im MRT untersucht und 48h p.i. getötet.

Die Tiere der **Kontrollgruppe V** wurden zum Zeitpunkt 0, d.h. ohne Substanzgabe im MRT untersucht und anschließend zur histologischen Untersuchung getötet.

Tabelle 4: Gruppenbildung im Versuchsteil 1

Gruppe	Verabreichtes Kontrastmittel	Zeitpunkt (h p.i.) MRT-Untersuchung	Zeitpunkt (h p.i.) Histologische Untersuchung	Anzahl WHHL-Kaninchen	Anzahl WN-Kaninchen
I	Gadophrin-2	23,5	24	4	1
II	Gadophrin-2	47,5	48	4	1
III	Gadofluorine-M	23,5	24	4	1
IV	Gadofluorine-M	47,5	48	4	1
V	_____	0	nach MRT-Untersuchung	4	_____

### 3.2.3.1 Beschreibung der Versuchsdurchführung

#### 3.2.3.1.1 Versuch I

Kontrastmittelapplikation:

Alle Tiere der Gruppen I und II bekamen das Kontrastmittel (KM) Gadophrin-2 intravenös über die laterale Ohrrendvene verabreicht; die Tiere der Gruppen III und IV erhielten Gadofluorine-M-Mischmizellen. Den Tieren der Kontrollgruppe V wurde kein KM verabreicht. Die Konzentrationen und Dosierungen der KM können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Konzentration und Dosis der verabreichten Lösungen

Kontrastmittel	Konzentration	Dosis
Gadophrin 2	2 mmol Gd/l	200 µmol Gd/kg
Gadofluorine-M	1 mmol Gd/l	100 µmol Gd/kg

MRT-Untersuchung:

Gruppen I und III wurden 23,5 h, Gruppen II und IV 47,5 h nach KM-Applikation im MRT untersucht (siehe Tabelle 5). Die vier WHHL Kaninchen der Gruppe V bildeten die Basisgruppe und wurden ohne vorherige KM-Applikation untersucht. Alle Kaninchen mussten zur MRT-Untersuchung narkotisiert werden, um die notwendige Immobilisation der Tiere zu erreichen.

Sektion:

Die noch in der Narkose liegenden Tiere wurden zur weiteren histologischen Untersuchung ihrer Aortenbögen mit ca. 2 ml T 61 intravenös (laterale Ohrrendvene) getötet, ihre Aortenbögen präpariert, entnommen und in drei, den MRT-Schnittebenen entsprechende Teilstücke zerteilt und eingefroren.

Histologie und Mikroskopie:

Von allen Aortenteilstücken wurden im Kryostaten jeweils 6 Serienschritte angefertigt; ein Schnitt aller Serien wurde jeweils fluoreszenzmikroskopisch zur Substanzlokalisierung untersucht, die restlichen Schnitte der Serien wurden folgenden Färbemethodenverfahren unterzogen, die der Plaquescharakterisierung dienen und eine präzise Lokalisierung erst ermöglichen:

- Ölrot-O
- Hämalaun-Eosin
- Weigert-Elastica-van-Gieson
- Makrophagen-Antikörperfärbung (CD68)
- Monozyten-Antikörperfärbung (CD14)

#### 3.2.3.1.2 Versuchsteil 2

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte ein einfaches In-vitro-Modell erarbeitet werden, um das Anreicherungsverhalten von Kontrastmitteln an isolierten Blutgefäßen von WHHL Kaninchen zu untersuchen. Ziel hierbei war es, letztendlich die Basis für weiterführende Untersuchungen an humanem Plaquematerial zu schaffen, da die Übertragbarkeit tierexperimenteller Befunde am WHHL-Kaninchen aufgrund eines relativ unterschiedlichen Aufbaus der atheromatösen Läsionen nur bedingt gegeben ist. Hierzu wurden drei verschiedene Kontrastmittel auf ihr Anreicherungsverhalten in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden von WHHL-Kaninchen ex vivo in Abhängigkeit der Zeit untersucht.

Sektion:

Zur Gewinnung des In-vitro-Materials wurden thorakale und abdominale Aortenanteile von zuvor narkotisierten und euthanasierten WHHL-Kaninchen fettfrei präpariert und anschließend entnommen. Die Aorten wurden dann in ca. 5 mm dicke Ringe zerteilt und in eisgekühlter, isotoner Natriumchloridlösung gesammelt.

Kontrastmittelexposition:

In drei Petrischalen wurden jeweils Gadofluorine-M, Gadophrin-2 oder SHU 555 C gefüllt, diese wurden mit Eis gekühlt. Zum Zeitpunkt 0 wurden aus dem Sammelgefäß mit 60 isolierten Aortenringe jeweils 20 Stücke gewählt und in jede Petrischale gelegt. Nach Ablauf eines Zeitraums von 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min wurden jeweils vier Aortenringe jeder Petrischale wieder entnommen und zur Entfernung der, die Aortenbögen benetzenden Kontrastmittel zwei Minuten in einer Waschlösung (NaCl bei Gd-haltigen KM, Aqua pro injectionem bei eisenhaltigen KM) geschwenkt.

Histologie:

Die Aortenringe wurden nach Entfernung der äußerlichen Kontrastmittelreste in Stickstoff gekühlten Isopentan eingefroren und zur histologischen Untersuchung mittels Kryostaten in mikroskopische 2-er Serien-Schnittpräparate geschnitten. Jeweils ein Schnitt diente der morphologischen Untersuchung, der zugehörige zweite Schnitt wurde auf die Lokalisation der Kontrastmittel untersucht.

### **3.2.4 Magnetresonanztomographische Untersuchungen**

Die Aortenbögen der narkotisierten Kaninchen der vier Versuchsgruppen des 1. Versuchsteils wurden in vivo auf Anreicherung der paramagnetischen KM innerhalb der Aortenwand magnetresonanztomographisch untersucht. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften der verabreichten Gd-haltigen Kontrastmittel verkürzten sich in Anwesenheit von Kontrastmittelpartikeln innerhalb der Gefäßwand die Relaxationszeiten umliegender Protonen und stellten diese in der verwendeten Sequenz sehr signalreich dar.

#### **3.2.4.1 Magnetresonanztomographische Untersuchungstechnik**

Die MRT-Untersuchungen wurden am MRT der Firma Schering AG Berlin, Abteilung MRI & X-Ray Research, bei 1,5 Tesla durchgeführt. Es handelte sich um einen Kopfscanner (Prototyp OR91) mit kommerzieller Extremitäten- und Oberflächenspule der Fa. Siemens, Erlangen. Die Tiere wurden nach einem standardisierten Protokoll untersucht.

##### **3.2.4.1.1 MRT-Sequenzen**

Die MRT-Bilddaten setzen sich aus 4 Ebenen zusammen: einer Sagittalebene und drei axialen Ebenen.

Zur jeweiligen morphologischen Darstellung und Schichtselektion wurden zum Scannen der Sagittalebene half-Fourier-acquisition-single-shot (HASTE)-Sequenzen verwendet: Bei dieser Sequenz betrug die Repetitionszeit TR 700 msec, die Echozeit TE 60 msec und der Flip Winkel  $180^\circ$  (nt=32; db, turbofactor=171). HASTE ist eine Turbo-Spinechosequenz und dient der sequentiellen Aufnahme von hochaufgelösten T2-gewichteten Bildern. Die gesamte Bildinformation wird nach einem einzigen Anregungsimpuls gewonnen. Durch folgende  $180^\circ$ -Pulse werden alle Echos erzeugt. Das Bild erhält man nach Halb-Fourier-Rekonstruktion.

Es wurden drei standardisierte axiale Ebenen des Aortenbogens festgelegt und mit der HASTE-Sequenz gemessen. Anschließend wurden diese Ebenen zur Plaquedarstellung mit einer T1-gewichteten Inversion-recovery-turboflash-Sequenzen gemessen: Die Repetitionszeit betrug bei dieser Sequenz 300 ms, die Echozeit 4 ms, die Inversions-Zeit 120 msec, der Flip-Winkel  $20^\circ$ . Hierbei wurde das Bild zur Gewebekontrastierung stark T1 gewichtet. Paramagnetische Gd-

haltige MRT-Kontrastmittel verkürzen die Relaxationszeiten von Protonen in ihrer Umgebung, so dass eine Inversion-recovery-turboflash-Sequenz geeignet ist, die Kontrastmittel sehr signalstark, also sehr hell, in kontrastreicher Umgebung darzustellen und bei der Wahl einer geeigneten TI (Inversionszeit) manche Gewebe (hier Blut) vollständig aus dem Bild verschwinden zu lassen (signalarm = dunkel). Es wurden zwei verschiedene Messzeitpunkten ausgewählt, um den geeigneteren Untersuchungszeitpunkt mit geringerem Blutsignal herauszufinden. Die Aortenbögen wurden in drei axialen Ebenen untersucht: Schnittebene I erfolgte herznah vor dem ersten Abgang, dem Truncus brachiocephalicus (7), Schnittebene II im Truncus und Schnittebene III zwischen Truncus brachiocephalicus und A. subclavia (6) im Bogen.

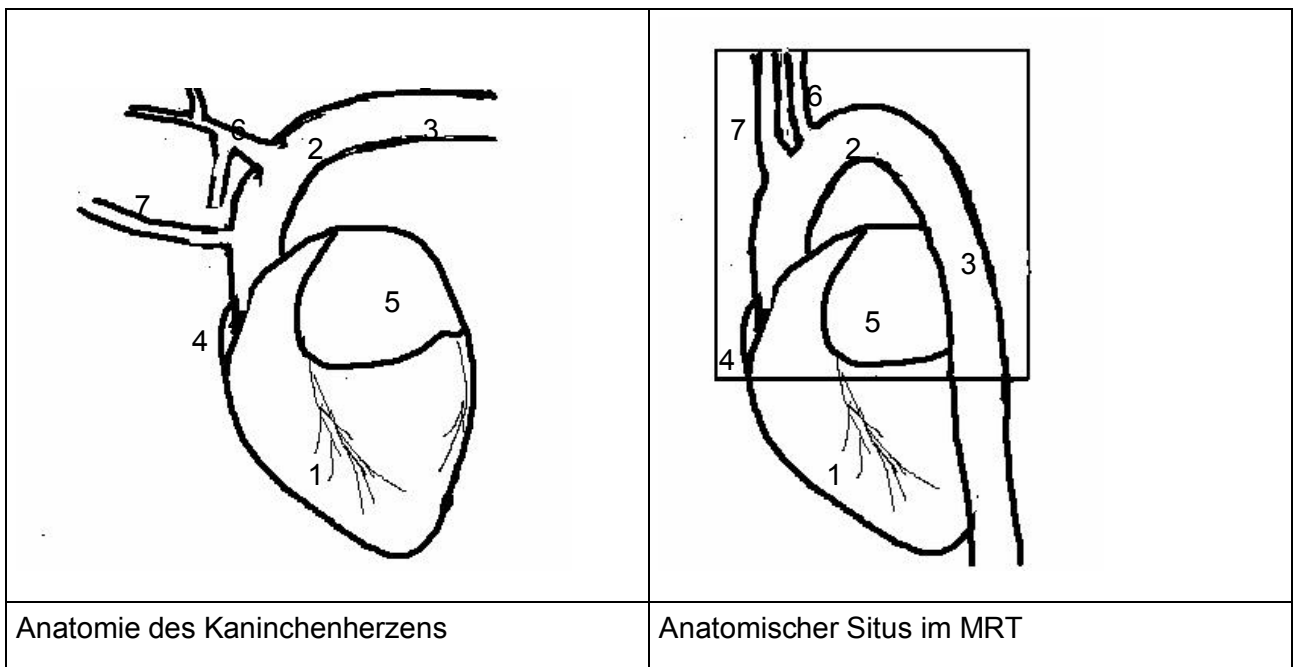


Abb. 4: Kaninchenherz (1) und seine Abgänge nahe des Aortenbogen: (2) Arcus aortae; (3) Aorta thoracica; (4) Auricula sinistra cordis; (5) Auricula dextra cordis; (6) Truncus brachiocephalicus; Arteria subclavia (7) (modifiziert nach POPESKO et al 1990).



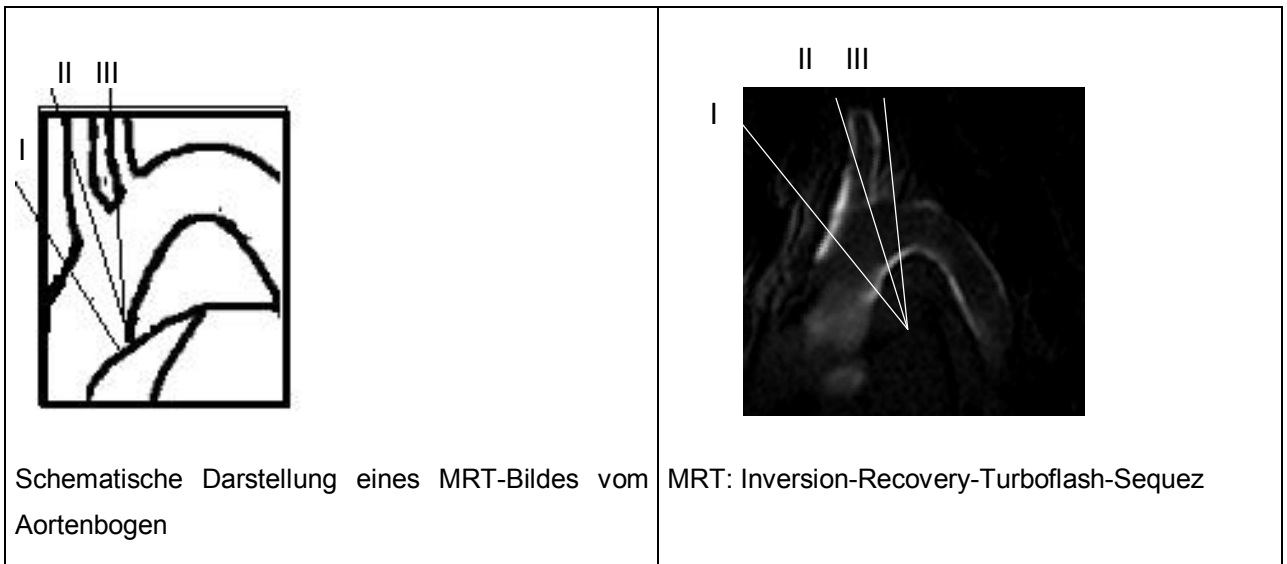


Abb. 5: MRT-Bild des Aortenbogens eines WHHL-Kaninchens, Sagittalebene, Inversion-recovery-turboflash-Sequenz, Ausschnitt. Kennzeichnung der axialen Messebenen (Aortenbogen I, II und III).

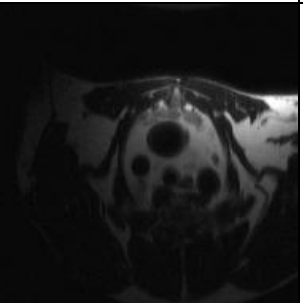
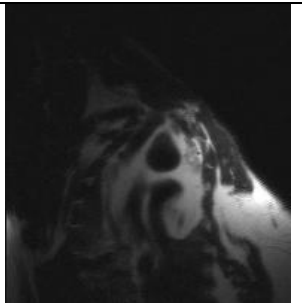
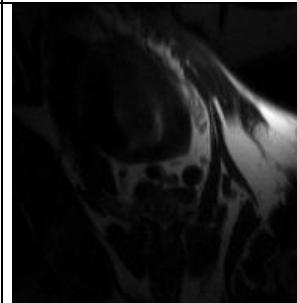
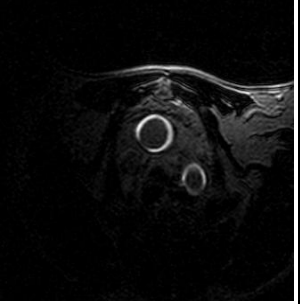
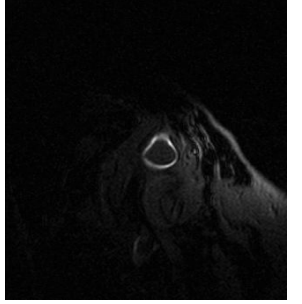

	Aortenteilstück I	Aortenteilstück II	Aortenteilstück III
Haste-Sequenz			
Inversion-Recovery-Turboflash-Sequenz			

Abb. 6: Axiale MR-Untersuchungen der drei Ebenen I (links), II (mitte) und III (rechts) des Aortenbogens in zwei verschiedenen Sequenzen: Oben Haste- und unten Inversion-recovery-turboflash-Sequenz.

### 3.2.4.1.2 Untersuchung der MRT-Bilddaten und Bildbearbeitung

Die MRT-Daten wurden als DICOM dokumentiert und mittels eines Programms (Microsoft Excel, Special, Zoom Images Dr. Bauer, MRI & X-Ray-Research, Schering AG Berlin) in Microsoft Excel

97 bildlich dargestellt und zur Korrelation den in Microsoft Word 97 bearbeiteten histologischen Befunden zugeführt. Die vergleichende Darstellung eröffnete die Möglichkeit, MR-Bilder untereinander in ihrer Signalintensität zu vergleichen und mit den histologischen Ergebnissen zu korrelieren.

#### 3.2.4.1.3 Wertungspunkte für Signalintensität zur semiquantitativen Auswertung

Die Merkmalsausprägungen des Merkmals Signalintensität wurden zur semiquantitativen Auswertung in Tabelle 6 codiert.

Tabelle 6: Codierung der Ausprägungen der Merkmals MR-Signalintensität

Codierung	Ausprägung
1	Schlechte bis keine MR-Signalintensität
2	Mittelmäßige MR-Signalintensität
3	Hohe MR-Signalintensität

### 3.2.5 Sektion / Gefrieren der Proben

#### 3.2.5.1 Versuchsteil 1: Sektion

Die Aortenbögen wurden nach MRT-Untersuchung, die Adventitia schonend, vom Mediastinum befreit und zwischen Herzbasis und kranial des Diaphragmas entnommen. Nach Entnahme wurden die Aortenbögen mit gekühlter, isotoner NaCl-Lösung feucht gehalten und in drei, den zuvor für die MRT-Untersuchung definierten Axialebenen I-III entsprechende Teilstücke zerteilt.

#### 3.2.5.2 Versuchsteil 2: Sektion

Die thorakalen Aorten wurden, die Adventitia schonend, vom Mediastinum und umgebenden Fettgewebe befreit in gesamter Länge entnommen. Nach Entnahme der Aorta wurde diese in ca. 5 mm dicke Aortenringe zerteilt und diese bis zum Versuchsbeginn in eisgekühlter, isotoner NaCl-Lösung aufbewahrt.

#### 3.2.5.3 Gefrieren der Proben

Die präparierten Aortenstücke, bzw. Aortenringe wurden in beiden Versuchen einzeln in, mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan (2-Methylbutane Isopentan von Fluka Chemie , 59080) 5 - 6 Sekunden eingefroren und anschließend auf Trockeneis zur Archivierung in beschriftete Alufolie eingewickelt. Die Lagerung der Organe erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6 Histologische Untersuchungen

Zur Verifizierung der Ergebnisse der MRT-Untersuchungen wurden alle Aortenbögen entsprechend der axialen MRT-Schnittebenen histologisch untersucht. Hierbei wurden ihre

atherosklerotische Gefäßwandveränderungen aufgesucht und charakterisiert. Die Läsionen wurden entsprechend ihrer Veränderungen in Plaquestadien eingeteilt. Zur Substanzlokalisierung wurden die nativen Serienschritte beider Versuche mikroskopisch untersucht: Die Kontrastmittel Gadophrin und Gadofluorine-M konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie histologisch detektiert und das verwendete eisenoxidhaltige Kontrastmittel per Eisennachweis modifiziert nach Quincke (BÖCK et al 1989) lokalisiert werden.

### **3.2.6.1 Schneiden der Proben**

Mittels eines Kryostaten der Firma Leica wurden 7-10 µm dicke Serien-Schnitte der Aortenstücke angefertigt und zum besseren Anhaften auf APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)-beschichtete Objektträger gezogen.

### **3.2.6.2 Histologische Schnittpräparate**

Die angefertigten Serien-Schnitte wurden zunächst 2-4 h bei Raumtemperatur zur Fixierung getrocknet und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Objektträger, die der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation der KM dienten, wurden ohne Trocknung und nativ bis zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmikroskopie bei -80°C aufbewahrt.

### **3.2.6.3 Mikroskopie**

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Axioplan Mikroskop durchgeführt. Folgende Zeiss Objektive „Plan-Neofluar“ fanden hierbei Verwendung: 1,25x; 2,5x; 10x; 20x. Die verwendete Kamera AVT Horn von Sony; AC Adaptor AA-P700 war mit einem KS 100 Imaging System Release 3.0 und einer Sony Bedieneinheit RMC-950 gekoppelt.

#### **3.2.6.3.1 Hellfeldmikroskopie**

Die mikroskopischen Untersuchungen der gefärbten Schnittpräparate und der ungefärbten nativen Schnitte erfolgten im Hellfeld des o.g. Mikroskops.

#### **3.2.6.3.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Anreicherung der Gd-haltigen Kontrastmittel in den Aortenteilstücken des Versuchteils 1 und den Aortenringen des Versuchteils 2 wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und lokalisiert. Hierbei wurden sowohl die Fluoreszenz-Intensität, als auch die Lokalisation beurteilt. Mit Hilfe der Sony Bedieneinheit Remote Control Unit RM-C950 konnte die Belichtungszeit durch Überlagerung von Einzelbildern verlängert werden. Bei Vergrößerungen kleiner als 10x wurde eine „Belichtungszeit“ von 150 Frames (engl. = Einzelbilder) gewählt; bei Vergrößerungen größer als 10x wurden 25 Frames gewählt. Die Software addiert zur Signalverstärkung einzelne Bilder, analog der Wahl einer bestimmten Belichtungszeit beim Fotoapparat.

### 3.2.6.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Ausrüstung

Das Mikroskop war mit der Auflichteinrichtung FI (4464 6 0) ausgestattet, die Fluoreszenzleuchte war mit einem Kollektor und Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50W versehen.

Filtersatz: Es kam ein Filtersatz der Firma Zeiss mit der Nummer 31 (1031-350) zur Anwendung.

- Exzitation: BP 565/30
- Beamsplitter: FT 585
- Emission: BP 620/60

### 3.2.6.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungstechnik

Alle ringförmigen Aorten-Querschnitte wurden jeweils an mehreren, mindestens aber an vier Stellen (Nord, Ost, Süd, West) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei den zugehörigen gefärbten Serienschnitten wurden diese Stellen mikroskopisch ebenfalls aufgesucht, so dass die fluoreszierenden Strukturen morphologisch zugeordnet werden konnten. Alle Untersuchungsreihen wurden digital fotografiert.

Zur Fluoreszenzmikroskopie gelangten die unfixierten, nativen Serienschnitte, die zuvor bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Um die Fluoreszenz den histologischen Strukturen grob zuordnen zu können, wurde die Fluoreszenzmikroskopie mit dem Auflicht-Hellfeldverfahren kombiniert, indem die normale Hellfeldbeleuchtung abwechselnd zu- und abgeschaltet wurde, ohne weitere Verstellungen vorzunehmen: Zur Hellfeldmikroskopie wurde der Reflektorschieber in Stellung I verbracht (UV-Filter) und der native Schnitt zunächst lichtmikroskopisch untersucht. Der Lichtweg der eingeschalteten Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50W wurde mit einem Schieber zur Schonung der Fluoreszenz-Halbwertzeit geschlossen. Nach digitaler Bildaufnahme im Hellfeld wurden im nächsten Schritt die Durchlichtbeleuchtung und die Filter am Filtermagazin des Stativfußes ausgeschaltet, der Reflektorschieber in Mittelstellung (II = Filtersatz 31 Zeiss) verbracht und dann der Lichtweg der HBO Lampe freigegeben. Das zur ersten Aufnahme zugehörige fluoreszenzmikroskopische Bild wurde ohne Bewegung des Objektisches digital fotografiert. Die entstanden Bilderreihen, bestehend aus je einem dunklen, aber fluoreszierenden Bild und einem Hellfeldbild des gleichen Bildausschnittes des nativen Präparates, wurden zur Fluoreszenzlokalisierung mittels eines dafür erstellten Computerprogramms (Microsoft Word 97 SR-2, Dr. Bauer, Schering) anschließend bearbeitet: Die schwarzen Bildflächen eines Bildes wurden subtrahiert, so dass lediglich die Fluoreszenz als eine Art Schablone bestehen blieb. Diese Schablone konnte dann bildtechnisch zur Hellfeldaufnahme des nativen Schnittpräparates addiert werden, so dass eine erste Einschätzung der Kontrastmittel-Lokalisation erfolgen konnte.

Zur subjektiven Beurteilung der Fluoreszenzintensität und der Zuordnung von Bewertungspunkten (s.u.) wurden alle digitalen Bilder der Dunkelfeld-Fluoreszenzmikroskopie vergleichend beurteilt. Zur Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensität der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen fanden 25 Frames (siehe Methoden) und das 10-er Objektiv Verwendung.

### 3.2.6.3.5 Wertungssystem für Fluoreszenzintensität zur semiquantitativen Auswertung

Die Merkmalsausprägungen der Fluoreszenzintensität wurden zur semiquantitativen Auswertung in Tabelle 7 codiert.

Tabelle 7: Codierung der Ausprägungen des Merkmals Fluoreszenzsignalintensität

Codierung	Ausprägung: Fluoreszenzsignalintensität
1	Keine bis schwache Fluoreszenzsignalintensität
2	Mittelmäßige Fluoreszenzsignalintensität
3	Hohe Fluoreszenzsignalintensität

## 3.2.7 Histologische Nachweismethoden

### 3.2.7.1 Versuchsteil 1

Von jedem Aortenbogenteilstück wurden die Serien-Kryoschnitte zur Charakterisierung und präzisen Fluoreszenzlokalisierung unterschiedlich nach ROMEIS (1989) gefärbt:

- Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) (siehe Anhang S. 116)

Die HE-Färbung diente der morphologischen Übersicht; Zytoplasma stellt sich zart rosa dar, Zellkerne blau. Verkalkungen stellen sich ebenfalls blau dar.

- Weigert-Elastica-van-Gieson-Färbung (siehe Anhang S. 117)

Durch die Anwendung von Eisenhämatoxylin, Pikrinsäure und Säurefuchsin werden die Kerne schwarz-braun, kollagene Fasern leuchtend rot und Muskulatur gelb gefärbt. Amyloid, Kolloid, Hyalin und Schleim färben sich gelb bis rot.

- ÖlrotO-Färbung (siehe Anhang S. 118)

Zur Darstellung der intimal angereicherten Lipide wird ein ÖlrotO-Nachweis durchgeführt, die Lipide stellen sich leuchtend rot dar, eine Hämalaun-Gegenfärbung stellt die Kerne blau dar.

Zur Zellgrenzendarstellung wurde eine Silberimprägnation nach Gomori (nach ROMEIS 1989) (siehe Anhang S. 119) nur beispielsweise durchgeführt. Prinzip der Färbung: Darstellung von Retikulिन- und Kollagenfasern durch Imprägnierung in ammoniakalischer Silbernitratlösung nach Sensibilisierung mit Eisenhämalaun. Retikulinfasern stellen sich schwarz und Kollagenfasern bräunlich dar. Zellkerne färben sich rot, das Zytoplasma leicht grünlich.

### 3.2.7.2 Versuchsteil 2

Von jedem Aortenteilstück wurde ein Serienschnitt mit HE (siehe 3.2.7.1) gefärbt. Serienschnitte, die von Aortenteilstücken, welche im Rahmen des 2. Versuchsteils mit eisenhaltigem KM inkubiert wurden, abstammen, wurden einem histochemischen Eisennachweis nach Quincke unterzogen:

- Eisennachweis nach Quincke (ROMEIS 1989) (siehe Anhang S. 119)

Zur Darstellung von zwei- und von dreiwertigen Eisen reduziert man die dreiwertige Form in zweiwertiges Eisen. Im zweiten Schritt (turnbull blau) formt Kaliumferrizyanid mit Eisenionen einen blauen Niederschlag. Eisen stellt sich dann blau dar, Kerne färben sich mit einer Kernechtrot-Gegenfärbung rot.

### 3.2.7.3 Eindecken

Die histologisch gefärbten Schnitte wurden maschinell mit dem Eindeckautomaten (Firma: Medite Meisei-Objektträger-Eindeckautomat RCM 90) mit Eukitt (Firma Kindler, Kunstharz-Eindeckmittel auf Xylolbasis) eingedeckt, ÖlrotO-gefärbte Schnitte wurden manuell in wasserlöslichem Ultramountmedium eingedeckt.

Färbeanleitungen befinden sich im Anhang ab S.116.

### 3.2.7.4 Immunhistochemische Nachweisverfahren

Zur Darstellung von Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischer Läsionen wurden die restlichen Serienschnitte des ersten Versuchsteils folgenden immunhistochemischen Nachweisverfahren unterzogen (BOENISCH 2003):

- Makrophagen Nachweis: Monoklonal Maus anti-human CD68 (DAKO)
- Monozyten Nachweis: Monoklonal Maus anti-human CD14 (DAKO)

Zur Prüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Kontrastmittelanreicherung und LDL Präsenz innerhalb der Plaques, wurden vereinzelt ein Apolipoprotein B 100-Nachweis durchgeführt: Goat polyclonal to human Apolipoprotein B 100 (ab7616-100) mit zugehörigem Link: Rabbit polyclonal to goat Ig G H&L (biotin) (ab 6740-1) von der Firma Abcam Ltd, Science Park, Cambridge, CB4 0FX UK.

Als Nachweissystem wurde ein Biotin-Streptavidin-Nachweissystem verwendet, bei dem der Sekundär-Antikörper (Ziege Anti-Maus) biotinyliert war. Als Label wurde Streptavidin konjugiert mit alkalischer Phosphatase verwendet. Die Anfärbung der Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte mit Hilfe eines Chromogen-Fast Red-Substrat-Systems (siehe Anhang S. 115).

Die Anleitung zum Färbevorgang befindet sich im Anhang S. 121.

### **3.2.8 Histologische Auswertung Versuch 1**

Die Untersuchung unterschiedlich gefärbter Serienschnitte eines Aortenbogenteilstückes ermöglichte eine Charakterisierung der Läsionen auf zellulärer und extrazellulärer Ebene. Die HE-Färbung erlaubte einen Überblick über das pathologische Ausmaß der atherosklerotischen Veränderungen, die Ölrot O-Färbung gab Aufschluss über den intra- und extrazellulären Lipidanteil der Läsionen, die Weigerts-Elastica-van-Gieson-Färbung über die extrazellulären Matrixverhältnisse: Elastische Fasern konnten von kollagenen Fasern und Muskelfasern differenziert werden. Die immunhistochemischen Nachweise detektierten die Zellen vom Mononukleären Phagozytensystem (MPS). Mit Hilfe der Charakterisierung der Plaques war es möglich, die zuvor detektierte und fotografierte Fluoreszenz präzise zu lokalisieren: Zur Charakterisierung wurden alle Aortenringe zunächst in der Übersicht (2,5x) mikroskopisch fotografiert, um dann mit dem 10x Objektiv möglichst genau die Stellen aufzusuchen, die bereits fluoreszenzmikroskopisch fotografiert wurden. Durch das vergleichende Betrachten der digitalen Fotografien aller Serienschnitte konnten sowohl die Plaques charakterisiert, als auch die Fluoreszenz lokalisiert werden. Alle Läsionen wurden zudem auf ihr Entwicklungsstadium beurteilt. Durch vergleichende Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Fotografien (Vergrößerung 10x; 25 Frames) verschiedener Aortenbogenteilstücke aller Versuchsgruppen konnten die Fluoreszenzintensitäten vergleichend semiquantitativ beurteilt werden.

#### **3.2.8.1 Wertungspunkte für die morphologischen Veränderungen**

Die Atherosklerose kann in verschiedenen Manifestationsformen auftreten, sie zeigt zwischen verschiedenen Tierarten, dem Menschen und den verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche Ausprägungen. Die Einteilung der Plaquestadien der untersuchten Aorten von WHHL-Kaninchen wurde in dieser Arbeit abweichend von der AHA-Klassifikation sowie dem morphologischen Schema von VIRMANI et al (2000) und STARY (2001) vorgenommen, da deren Einteilung auf Untersuchungen von humanem Material beruhen und die eigene histomorphologischen Befunde vom Tiermodell WHHL-Kaninchen sich diesen nicht zuordnen ließen. Die Einteilung der Plaques in Stadien erfolgte in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 8) in Anlehnung an die Pathogenese.

Die Atherosklerose unterliegt einer progressiven Entwicklung, histologische Schnitte entsprechen lediglich einer Momentaufnahme der Atherogenese, deshalb sind die atherosklerotischen Veränderungen eines Tieres altersabhängig. Gerade in älteren Tieren lassen sich Plaques verschiedener Entwicklungsstadien finden, während jüngere meist nur geringgradige pathologische Veränderungen aufweisen. Histologische Schnitte weisen in der Regel verschiedene Plaqueeentwicklungsstadien auf, zur Einteilung der Plaques in konkrete Plaquestadien wurden dann allerdings nur ihre maximalen Ausprägungen berücksichtigt.

Tabelle 8: Eigene Einteilung der Plaquestadien (siehe auch Abb. 4)

Plaquestadium	Histopathologische Veränderungen	Abbildung Nr.
0	Gesunde Gefäßwand ohne atherosklerotischen Veränderungen.	8
1	„Fatty Streaks“: ausschließlich extrazelluläre Lipidanreicherung innerhalb der Intima	9
2	Atherosklerotische Läsionen mit verdickter Intima durch extrazelluläre Anreicherung von Lipiden <u>und</u> Ansammlung von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (=MPS).	10
3	Atherosklerotische Läsionen in denen zahlreiche lipidbeladene Makrophagen vorkommen sowie wenige kollagene und elastische Fasern (Zellen des MPS > Matrix).	11 a+b
4	Atherosklerotische Läsionen mit vorwiegend dickerer, zellarmer und proteoglykanreicher Matrix (ungeordnete Faserbildung) sowie einigen lipidbeladenen Zellen vom MPS (Matrix > Zellen des MPS).	12
5	Atherosklerotische Läsionen mit vorwiegend dickerer, zellarmer und proteoglykanreicher Matrix (ungeordnete Faserbildung) sowie einigen lipidbeladenen Zellen vom MPS (Matrix > Zellen des MPS) und modifizierten Mediozyten (intrazelluläre Lipidanreicherung), welche sich nunmehr als Schaumzellen darstellen und durch Massen - Nekrosen zum „Lipid Core“ konfluieren. In diesem Stadium treten basal der Plaques viele Cholesterinkristalle (kristallisierte Lipide) mit induzierter Entzündung auf. Luminal befindet sich eine dünne fibröse Kappe.	13 a+b
6	Sklerose: Atherosklerotische Läsion mit vielfach verdickter Intima (mind. doppelt so dick wie die Media); die Plaque besteht vorwiegend aus gerichteten kollagenen und elastischen Fasern in einer fettigen zellarmen Matrix in der nur wenige Zellen des MPS anwesend sind.	14 a+b



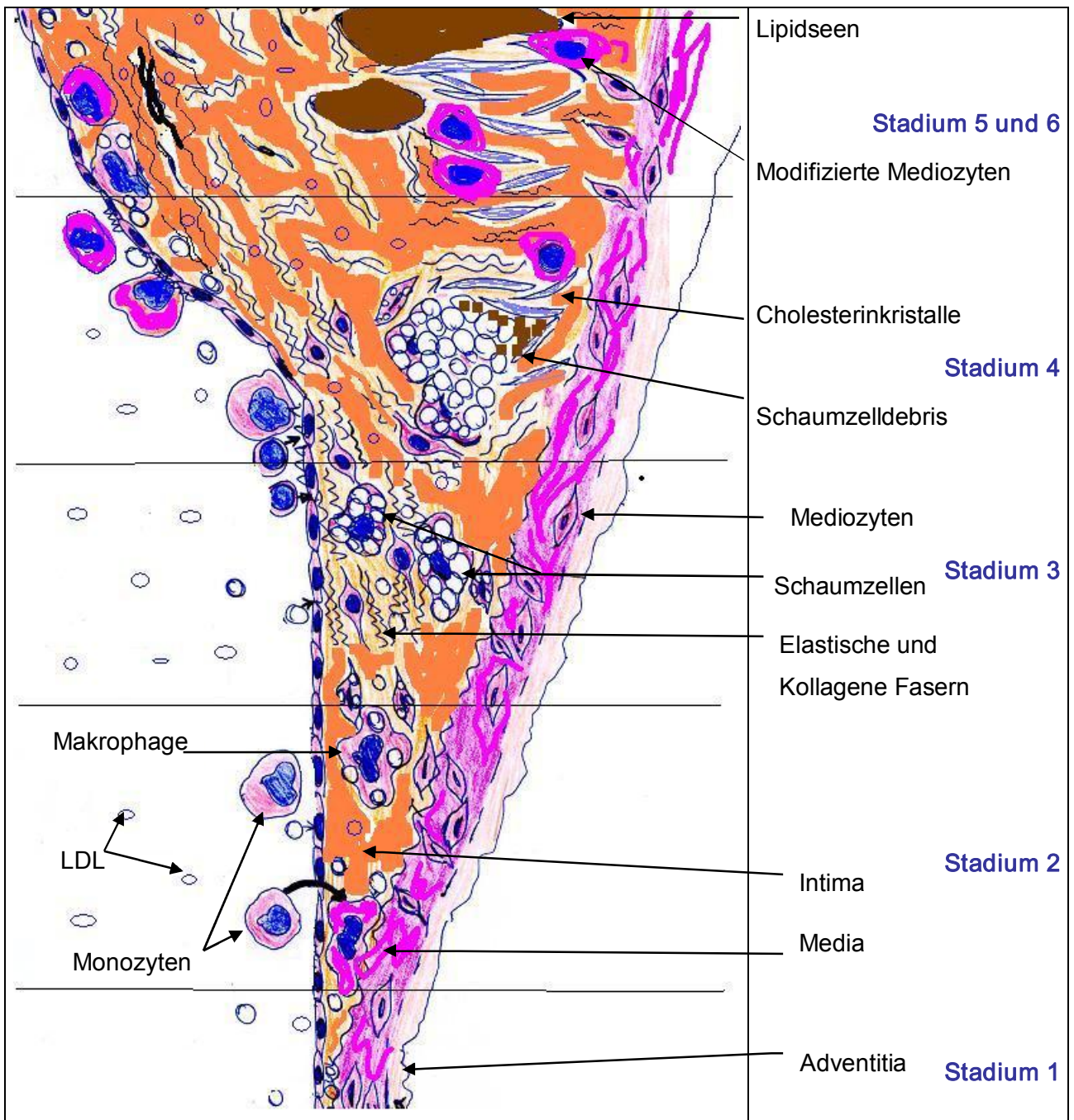


Abb. 7: Schematische Darstellung histopathologischer Veränderungen im atherosklerotischen Prozess und ihre Einteilung in Plaquestadien.

### 3.2.8.2 Bewertungssystem für die Kontrastmittellokalisierung:

Die Detektion der Fluoreszenz gab Aufschluss über die Anreicherung des Kontrastmittels in der Plaque. Um die Fluoreszenz zu lokalisieren, wurde jede Plaque in ihren Kompartimenten charakterisiert. Alle Aortenteilstücke wurden auf eine mögliche Korrelation (einer Kolokalisierung) zwischen nachgewiesenen Plaquebestandteilen (histochemischer oder immunhistochemischer Nachweis) und dem Fluoreszenzsignal untersucht.

Die Bewertung der Lokalisation der Fluoreszenz, bzw. der Kontrastmittel erfolgte anhand der histologischen und immunhistologischen Färbungen der Aorten-Serienschnitte. Als mögliche Loci kristallisierten sich die zellarme, fettige Matrix (Mf) und zellreiche, CD14- und/oder CD68- positive Kompartimente (MPS) heraus. Wurde eine Kolokalisation von Fluoreszenz und einer bzw. beider Kompartimente festgestellt, wurde ein '+' vergeben. War eines der Kompartimente 'Mf' oder 'MPS' eindeutig frei von Fluoreszenz, wurde ein '--' vergeben. Je Tier gelangten drei Aortenbogenteilstücke zur histologischen Untersuchung, so dass je Tier folgende Ergebnisse möglich waren:

Tabelle 9: Bewertungssystem für die Lokalisation

Alle drei Aortenbogenteilstücke zeigten eine Lokalisation im Kompartiment MPS/Mf	+++	3
Zwei von drei Aortenbogenteilstücke zeigten eine Lokalisation im Kompartiment MPS/Mf	+ + -	2
Eins von drei Aortenbogenteilstücke zeigte eine Lokalisation im Kompartiment MPS/Mf	+ - -	1
Keines der Aortenbogenteilstücke zeigte eine Lokalisation im Kompartiment MPS/Mf	- - -	0

### 3.2.8.3 Statistische Auswertung:

Zur Diskussion wurde ein Zusammenhang bzw. Unterschied zwischen den Kontrastmitteln und ihrer Lokalisation mit Hilfe eines Chi<sup>2</sup>-Tests und anhand obigen Bewertungssystems ermittelt.

Der Chi<sup>2</sup>-Test ist geeignet, zwei Merkmale simultan zu betrachten und deren Beziehung zueinander zu untersuchen. Die Häufigkeit der beobachteten Lokalisation des Kontrastmittels Gadophrin-2 (Merkmal 1) konnte vergleichend mit der von Gadofluorine-M im zellreichen CD14/68-positiven (MPS) Kompartiment betrachtet werden. Anschließend wurden die Kontrastmittel vergleichend für die Lokalisation in der zellarmen, fettigen Matrix betrachtet.

Ziel war es, die Unterschiede oder Gemeinsamkeiten im Anreicherungsverhalten beider Kontrastmittel heraus zu finden.

### 3.2.9 Histologische Auswertung Versuch 2

In Versuch 2 wurden insgesamt 60 Aortenringe von 7 WHHL-Kaninchen in vitro mit den Kontrastmitteln Gadophrin-2, Gadofluorine-M und SHU 555-C unterschiedlich lang inkubiert und anschließend histologisch auf die Anreicherung der Kontrastmittel in den Plaques untersucht. Von Interesse war es, herauszufinden, ob die Kontrastmittel überhaupt in der Lage sind, sich auch ex vivo innerhalb atherosklerotisch veränderter Blutgefäße anzureichern und wenn, in welchem Zeitraum. Lange Zeiträume würden Gewebe ex vivo nachteilig beeinflussen, so dass die Zeit eine wichtige Rolle für die Findung eines In-vitro-Modells spielt. Die in vitro inkubierten

Aortenteilstücke wurden hierzu nach dem Versuch gefroren, um Serien-Kryoschnitte anzufertigen.

Die paramagnetischen Kontrastmittel Gadophrin-2 und Gadofluorine-M wurden histologisch mittels Fluoreszenzmikroskopie in nativen Kryoschnitten detektiert. Ein zweiter Serienschnitt wurde histologisch gefärbt und diente jeweils der morphologischen Orientierung im Gewebe. Das superparamagnetische Kontrastmittel SHU 555-C, bestehend aus Eisenoxidpartikeln, wurde durch Eisennachweis nach Quincke (siehe Punkt 3.2.7.2) detektiert.

Je Zeitpunkt und Kontrastmittel gelangten vier Aortenringe (n=4) zur histologischen Untersuchung. Die Schnitte der Aortenringe wurden zunächst fluoreszenzmikroskopisch untersucht und digital im Hell- und Dunkelfeld fotografiert. Anschließend wurden die selben Stellen der Aortenringe im histologisch gefärbten Schnitt aufgesucht, um gegebenenfalls das Fluoreszenzsignal zu lokalisieren.

Die In-vitro-Untersuchungen mit SHU 555-C wurden lichtmikroskopisch untersucht, da beim Färbeprozess eine Gegenfärbung mit Kernechtrot im selben Schnitt stattfand.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Zur histologischen Charakterisierung und Einteilung der Plaquestadien

##### 3.3.1.1 Normbild der Aortenbogenwand

**Gesunde Aorten** sind als herznahe Gefäße Arterien vom elastischen Typ. Histologisch-anatomisch besitzen sie folgenden Wandaufbau von innen nach außen:

**Intima** (Tunica interna):

- Lamina endothelialis
- Stratum subendothelialis
- Membrana elastica interna

**Media** (Tunica media):

- Membrana elastica externa

**Adventitia** (Tunica adventitia)

Die **Intima** bildet die innere Wandauskleidung der Gefäße und besteht aus einer einschichtigen Lamina endothelialis, dem Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna. Der geschlossene Endothelverband (Lamina endothelialis) ist die innerste Wandauskleidung, sie dient dem transversalem Stofftransport, verhindert den Austritt von Blut und wirkt einem Gefäßverschluss (Thrombenbildung) entgegen. Das Endothel wird von dem verbreiterten Stratum subendotheliale (Endothel mit Stratum basale) unterlagert. Das Stratum subendotheliale enthält als zelluläre Bestandteile Fibrozyten, Histozyten und glatte Muskelzellen (sogenannte Mediozyten) und als Faserbestandteile vereinzelt kollagene und elastische Fasern, die mit dem elastischen Gewebe der Tunica media in engem Kontakt stehen. Zwischen Stratum subendotheliale und Media befindet sich in den Arterien die Membrana elastica interna.

Die **Media** ist bei den Arterien vom elastischen Typ aus gefensterten elastischen Fasernetzen aufgebaut, um die sogenannte „Windkesselfunktion“ zu ermöglichen. Dazwischen verlaufen zirkulär angeordnet mehrere Schichten glatte Muskelzellen (Mediozyten), die einzeln mit den elastischen Faserbündeln Verbindung aufnehmen und so ein elastisch-muskuläres System entstehen lassen. Außen liegt den Gefäßen eine dichte kollagenfaserreiche, fibroelastische **Tunica adventitia** an, die einer Überdehnung entgegenwirkt und als lockere Verschiebeschicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung steht.

Die **Eigenblutversorgung** erfolgt in den äußeren Schichten der Tunica media und Tunica adventitia durch Vasa vasorum. Die inneren Schichten der Media und Intima sind gefäßlos und werden durch Diffusion aus dem zirkulierenden Blut ernährt. Die Aufnahme der

Nährstoffe erfolgt dabei durch das Endothel und deren Weitertransport durch das Maschenwerk der elastischen Fasern bis in die Tunika media. Die innere Wandauskleidung erneuert sich durch mitotische Teilungen der Endothelzellen.

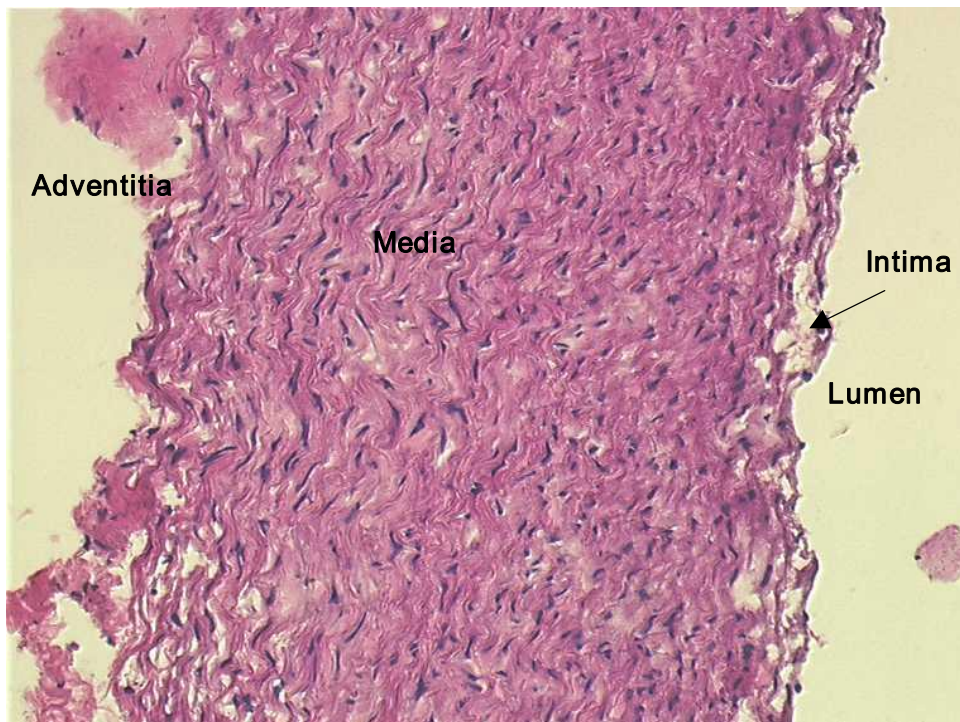


Abb. 8: Kaninchenaorta ohne pathologische Veränderungen. HE-Färbung, Kryoschnitt, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

### 3.3.1.2 Charakterisierung und Einteilung der Plaques

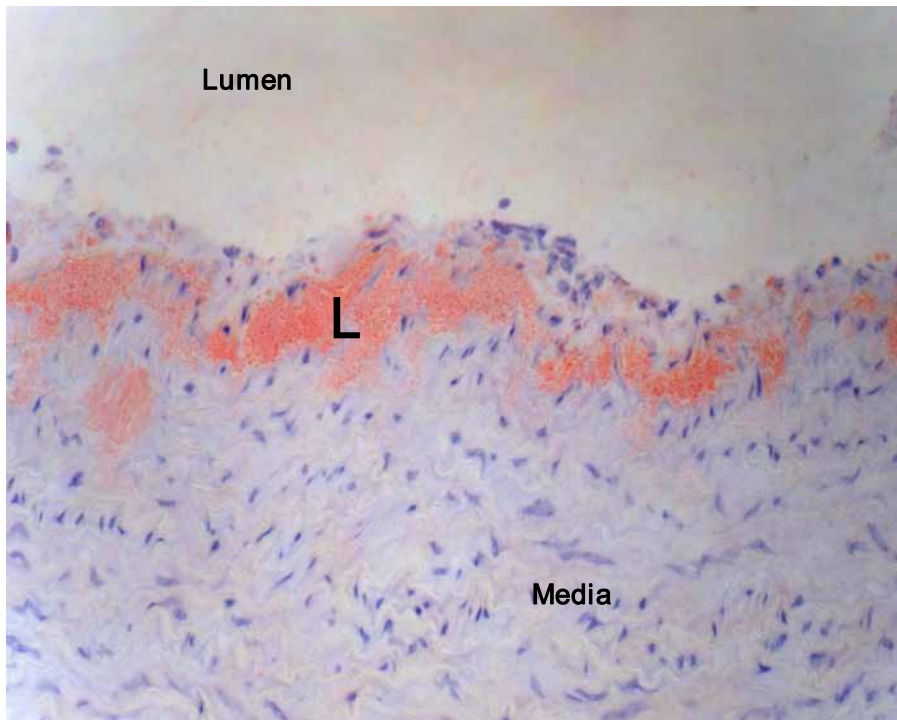


Abb. 9: **Stadium 1**, Aorta mit extrazellulärer Lipidanreicherung (L); ÖlrotO, Kryoschnitt, Objektiv 20-fach, Okular 10-fach.

Im frühesten Anfangsstadium (**Stadium 1**, Abb. 9) der Atherosklerose beim WHHL-Kaninchen ist mittels histochemischen Fettnachweis histologisch zunächst eine extrazelluläre, „feinstaubige“ Lipidanreicherung zu beobachten. Zeitnah wandern die ersten Monozyten aus der Blutbahn in die Intima ein, wandeln sich zu Makrophagen um und beginnen mit der Phagozytose der Lipidtröpfchen. Monozyten sind die größten der im Blut zirkulierenden Leukozyten (12-20 µm), ihr schwach basophiles Zytoplasma besitzt nur eine geringe Anzahl von Ribosomen und ER, ist aber sehr reich an Mitochondrien, Golgi-Feldern und azurophiler Granula. Diese Granula sind als primäre Lysosomen Träger einer Vielzahl proteinspaltender Enzyme. Mittels unterschiedlich geformter Oberflächenorganellen, so genannten Pseudopodien oder Mikrovilli sind sie pinozytotisch aktiv. Monozyten zirkulieren als Blutmakrophagen kurzzeitig (zwei Tage) im Blut, verlassen aktiv die Blutbahn und bewegen sich amöboid im interstitiellen Bindegewebe. Es wird eine Lebensdauer von 60-90 Tage angenommen. Monozyten sind im wesentlichen Bestandteil des **Mononukleären Phagozytensystems (MPS)**. Während sich die eingewanderten Makrophagen mit der Phagozytose der sich ständig zunehmenden Menge an Lipidpartikel beschäftigen, migrieren, angezogen durch entsprechende Entzündungsmediatoren, laufend weitere Monozyten in die Intima ein. Im **Stadium 2** ( Abb. 10) besitzen die Makrophagen durch die übermäßige Lipidphagozytose bald ein wabiges und umfangreiches Zytoplasma und werden nunmehr

Schaumzellen oder Lipophagen genannt. Die AHA nennt dieses Stadium atherosklerotischer Veränderungen fatty Streaks, da die pathologische Veränderung sich bereits makroskopisch als erhabener Fettstreifen darstellt.

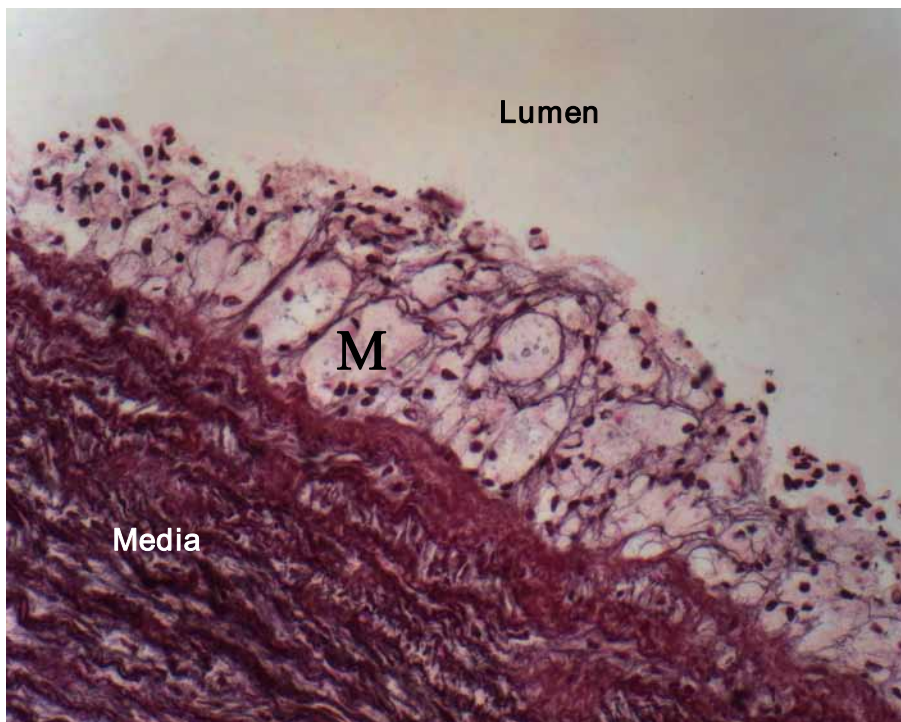


Abb. 10: Plaque im **Stadium 2**; Gomori Silberimprägnation, Kryoschnitt, extrazelluläre und intrazelluläre Lipidanreicherung (**M**= Makrophagen / Monozyten). Objektiv 20-fach, Okular 10-fach.

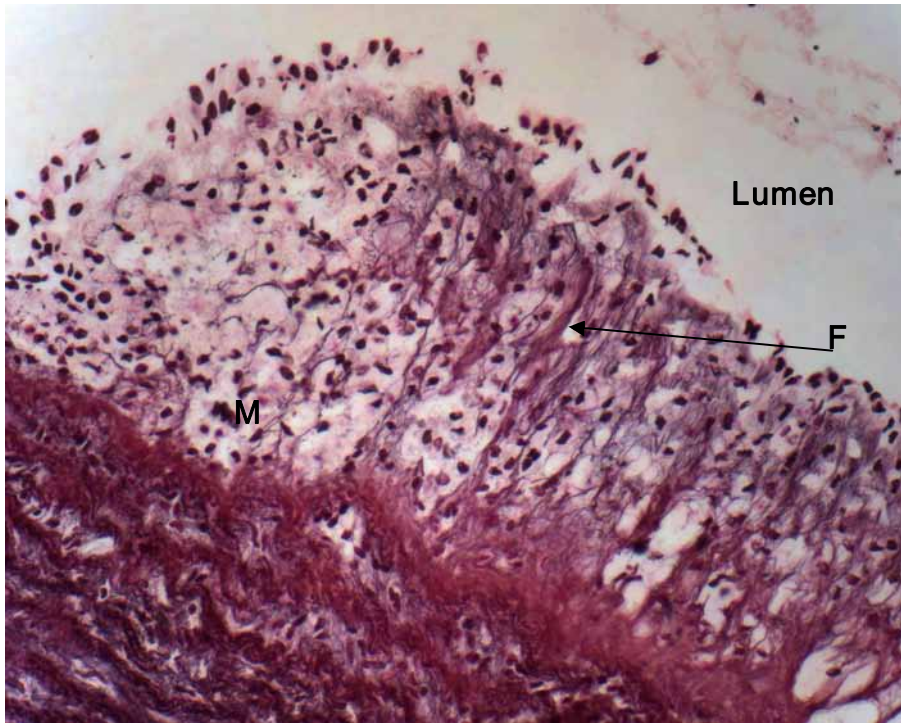


Abb. 11a: Atherosklerotische Läsion im **Stadium 3**; F= Fasern, M= Monozyten / Makrophagen; Gomori Silberimprägnation, Kryoschnitt, Objektiv 20-fach, Okular 10-fach.

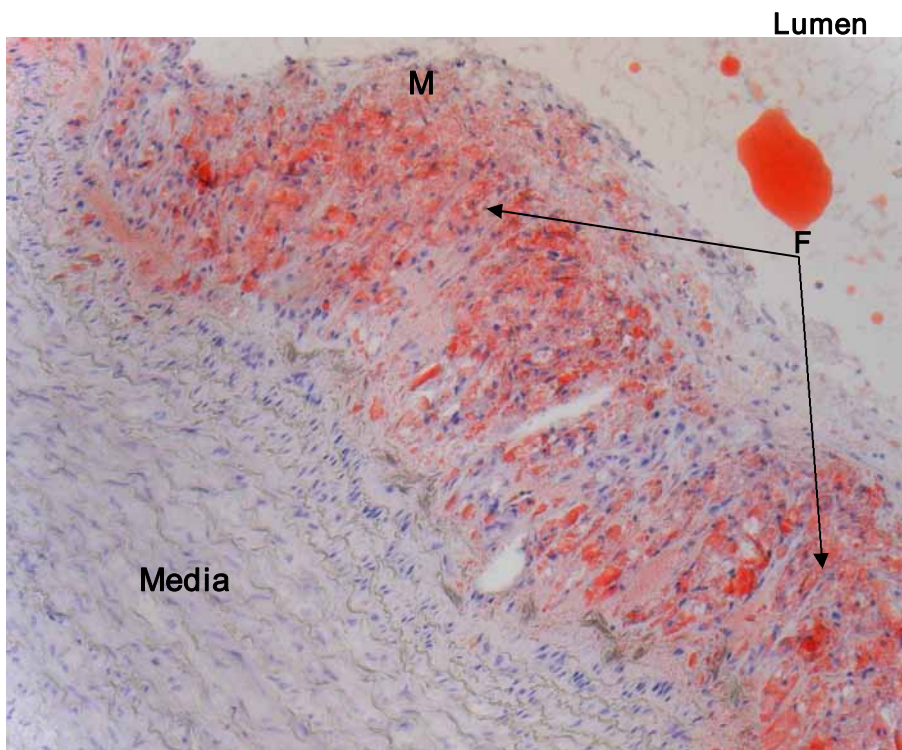


Abb. 11b: Atherosklerotische Läsion im **Stadium 3**; F= Fasern, M= Monozyten / Makrophagen; ÖlrotO, Kryoschnitt, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.



Im **Stadium 3** (Abb. 11 a und b) beruht die intimale Verdickung neben der fortwährenden Lipid-anreicherung und Monozytenmigration auf einer beginnenden Synthese von Proteoglykanen und elastischen bzw. kollagenen Fasern durch intimale Fibrozyten.

**Stadium 4** (Abb.12) zeichnet sich durch übermäßige Bindegewebsproduktion aus. Die Bindegewebsfasern erscheinen ungeordnet, was auf die ungenügende Reife der Fasern oder deren teilweisen enzymatischen Abbau zurückzuführen ist. Der Anteil extrazellulärer Matrix ist verhältnismäßig groß, Zellen vom Mononukleären Phagozytose System kommen dagegen nur in geringer Anzahl vor.

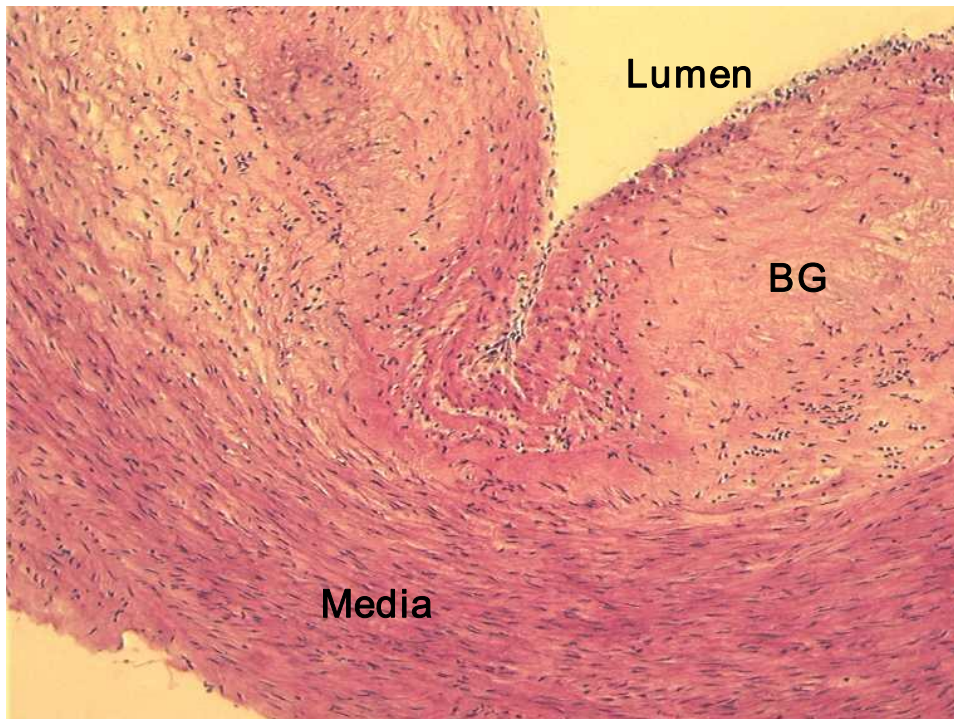


Abb. 12: Atherosklerotische Veränderung im **4. Stadium**: Der Anteil des Bindegewebes (=BG) ist nunmehr größer als der Anteil an Zellen des MPS. Die bindegewebigen Strukturen sind sehr lipidhaltig. Kryoschnitt, HE-Färbung, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

Im **Plaquestadium 5** (Abb. 13 a und b) ist die Atherogenese weit fortgeschritten, neben großen bindegewebigen Anteilen treten Zellen des MPS wieder verstärkt auf. Durch Phagozytose extrazellulärer Lipidmassen stellen sie sich als Schaumzellen dar. Größere Lipidmassen wurden von nekrotischen Schaumzellen in die Tiefe entlassen und bilden sogenannte Lipidseen oder durch Kristallisierung Cholesterinkristalle. Mediozyten wandern aus der Media in die Plaque hinein und können als modifizierte Mediozyten Lipide und Zelltrümmer phagozytieren und Muskelfasern bilden.

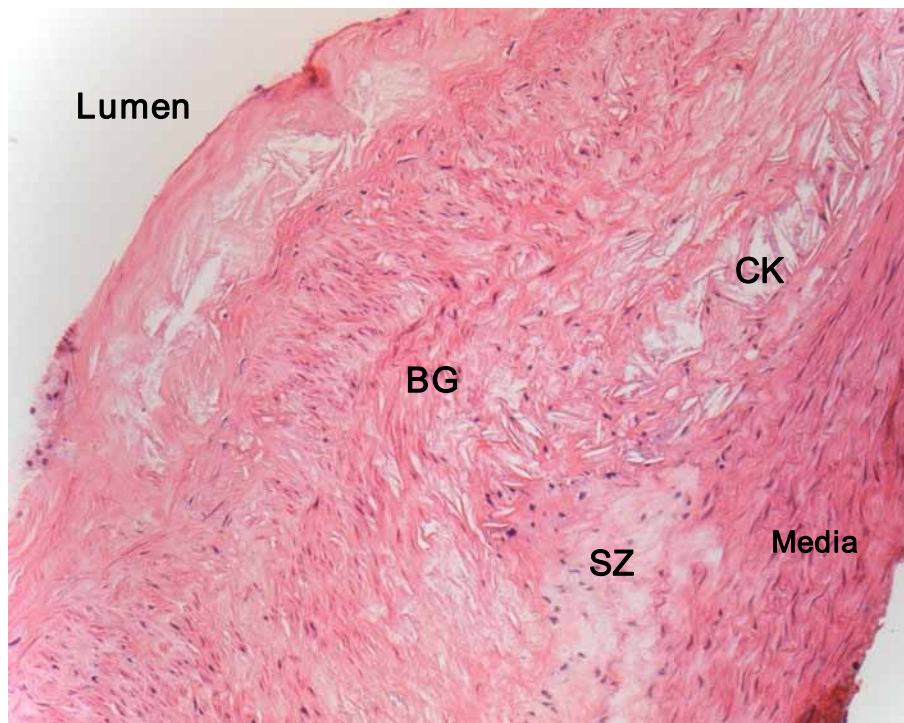


Abb. 13a: **Stadium 5**: Atherosklerotische Veränderungen mit Schaumzellen (=SZ), bindegewebigen Strukturen (=BG) und Cholesterinkristallen (=CK); Kryoschnitt, HE-Färbung, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

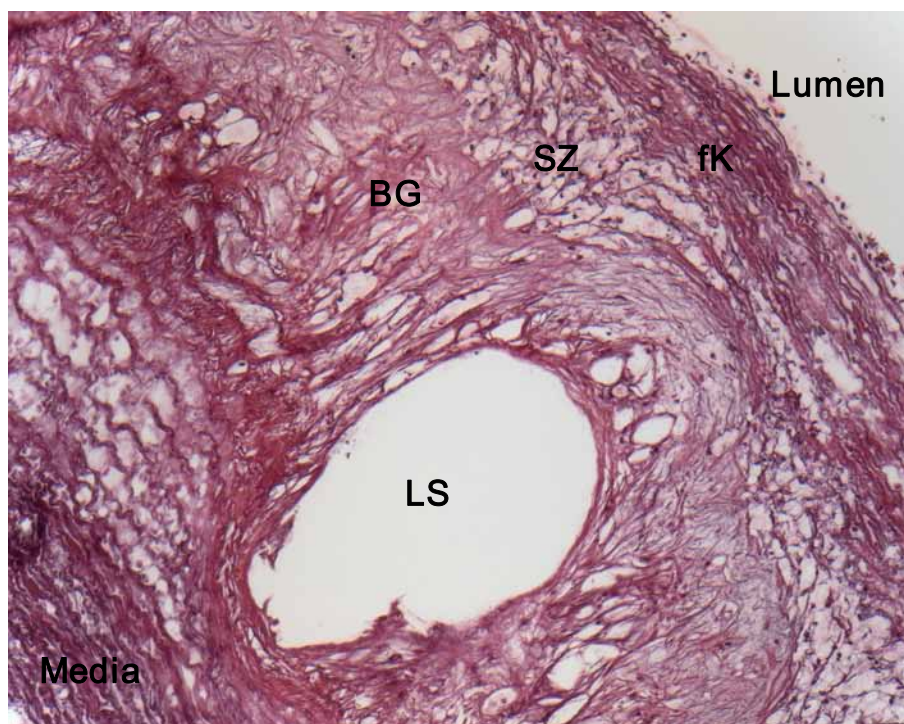


Abb. 13b: **Stadium 5**, atherosklerotische Veränderungen mit Lipidsee (=LS), ungeordneten bindegewebigen Strukturen (=BG) und Schaumzellen (=SZ) nah einer fibrösen Kappe (=fK). Kryoschnitt, Silberimprägnation nach Gomori, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

Im **Stadium 6** (Abb. 14 a+b) zeichnen sich die atherosklerotischen Veränderungen beim WHHL Kaninchen durch starke Sklerosierung / Vernarbung der Intima aus, die dadurch das Vielfache der Media einnimmt. Zudem ist die Intima aufgrund anhaltender Lipidanreicherung sehr fetthaltig und durch Massennekrosen und Apoptosen zellarm und faserreich. Die Fasern sind zum Teil allerdings unreif oder bereits durch Proteasen enzymatisch angegriffen, so dass sie zum großen Teil ungeordnet erscheinen. Obwohl in der Tiefe außer Cholesterinkristallen und Nekrosen keine akuten Prozesse mehr erkennbar sind, können bereits oberhalb der dicken fibrösen Kappe neue entzündliche Prozesse stattfinden: Aufgrund des progressiven Charakters der Atherosklerose migrieren subendothelial neue Monozyten ein, die sich zu gewebständigen Makrophagen differenzieren und die zahllosen Lipide phagozytieren.

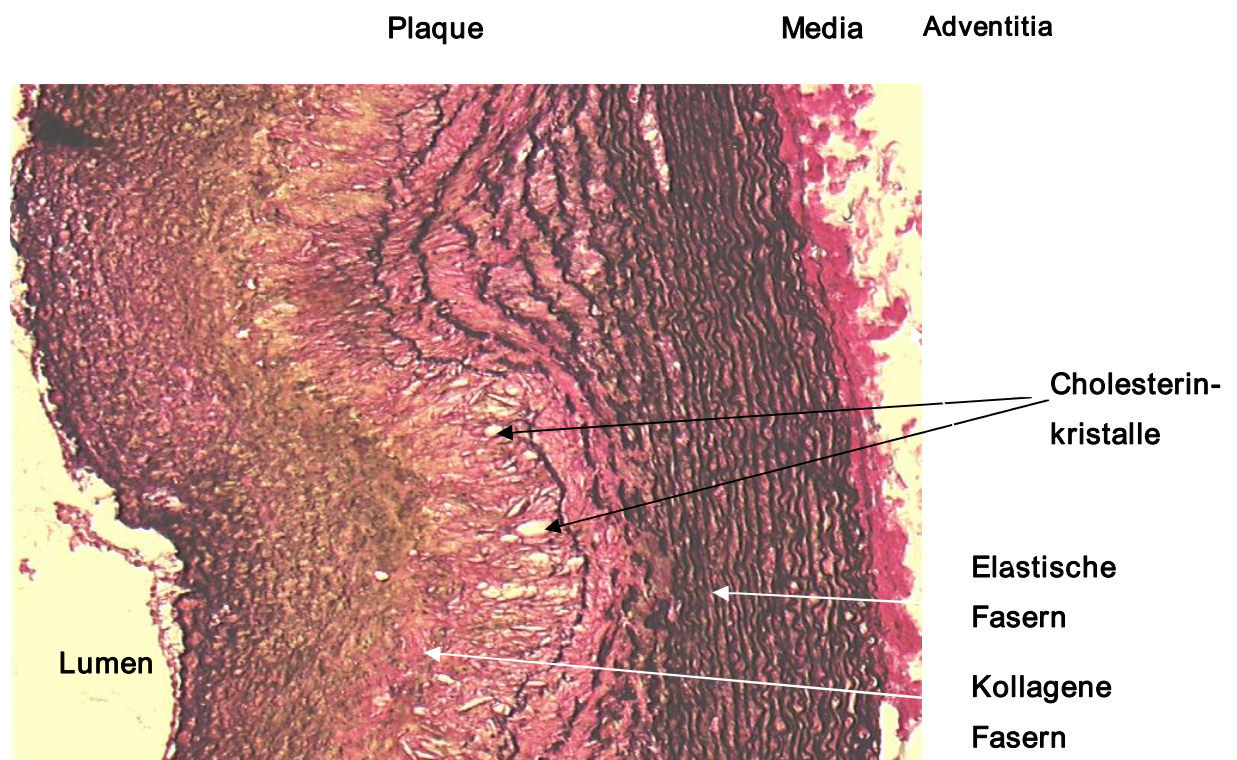


Abb. 14a: **Stadium 6** beinhaltet einen sehr dicken fibrösen, zellarmen Anteil, in der Tiefe sind spitze Cholesterinkristalle (nadelförmige „Löcher“) sichtbar. Das Bindegewebe (rosa und schwarz-braun) erscheint insgesamt sehr locker, ungeordnet: Es ist sehr fetthaltig und ödematös, die Fasern sind unreif oder bereits enzymatisch angedaut. Kryoschnitt, Weigert-Elastica-van-Gieson-Färbung, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

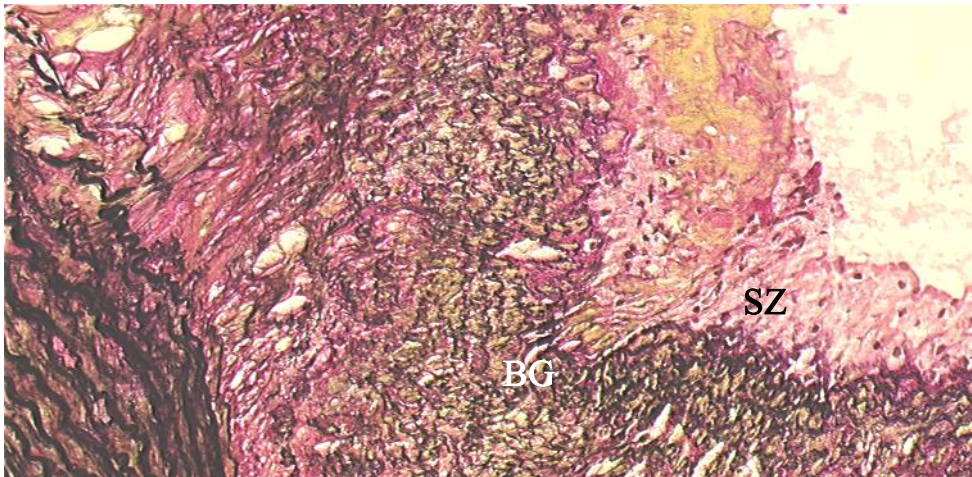


Abb. 14b: **Stadium 6**, in dieser pathologischen Gefäßwandveränderung wechseln sich Schichten von Schaumzellen (=SZ) und zellarmen, faserreichen (=BG) Arealen ab. Kryoschnitt, Weigert-Elastica-van-Gieson-Färbung, Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

### 3.3.1.3 Häufigkeit der Plaquestadien (Verteilung)

Zur Untersuchung der Plaquestadien gelangten insgesamt 60 Aortenteilstücke: Pro Versuchsgruppe (Gruppen I-V) vier WHHL-Kaninchen à drei Untersuchungseinheiten (5 x 4 x 3 = 60).

98% aller Aortenteilstücke der WHHL-Kaninchen waren atherosklerotisch verändert. Ein Aortenteilstück (2%) wies keine Plaques auf. Veränderungen, in denen geringe extrazelluläre Lipidanreicherungen (Stadium 1) in einer nicht- oder unwesentlich verdickten Intima auffielen, kamen häufig als Nebenbefund vor, aber nur einmal als maximale Ausprägung: Ein Aortenbogen-teilstück (2%) eines WHHL Kaninchen der Baselinegruppe wurde dem **Stadium 1** zugeteilt.

Läsionen mit intimaler Verdickung durch extrazelluläre Lipidanreicherung und Monozyten-/ Makrophageninfiltration (**Stadium 2**) konnten bei drei Aortenteilstücken (5%) als maximale Gefäßwandveränderung beobachtet werden. 9 von 60 Aortenteilstücken (15%) zeigten Veränderungen, welche als **Stadium 3** definiert wurden. 12 von 60 Aortenteilstücke (20%) zeigten atherosklerotische Veränderungen im **4. Stadium** und 22 von 60 Aortenteilstücken (37%) zeigten das **Plaquestadium 5**. Das als sehr stabil zu betrachtende **Stadium 6** der Atherosklerose zeigten 14 von 60 (23%) Aortenteilstücke als maximale Ausprägung (siehe Abb.15).

Die atherosklerotischen Veränderungen in der Altersgruppe 12-15 Monate alter WHHL Kaninchen sind sehr unterschiedlich. Am häufigsten vertreten war Stadium 5, gefolgt von Stadium 6 und 4. 70% der Aortenbogenteilstücke befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt im fortgeschrittenen Stadium. Entzündungsreaktionen sind Literaturangaben zufolge beim Menschen das wesentliche Ereignis der Atherosklerose und gelten als Initiator einer möglichen Plaqueruptur. Bei den WHHL-Kaninchen konnten massive Entzündungsreaktionen bei den Stadien 2-5 beobachtet werden. 77% der untersuchten Aortenteilstücke befanden sich in diesen entzündlichen Phasen der Atherogenese. Stadium 6 wurde beim WHHL-Kaninchen eher durch seine zellarme und faserreiche Struktur als bereits vernarbte Läsion identifiziert, in diesem Stadium befanden sich ein Viertel (23%) der untersuchten Aortenteilstücke.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Aortenteilstücken kamen keine lumenverengende Plaques vor. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass bei weitergehenden Untersuchungen stenotische Gefäße bei WHHL-Kaninchen bereits beobachtet werden konnten.

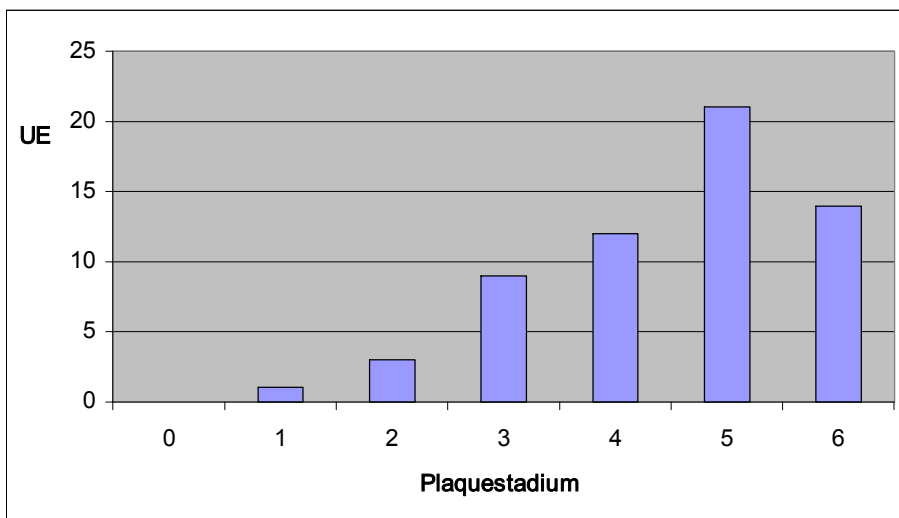


Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der Plaquestadien 0-6. Stadium 4, 5 und 6 waren sehr häufig vertreten. UE= Untersuchungseinheit (Anzahl Aortenbogenteilstücke)

### 3.3.2 Nachweis von Gadophrin-2 und Gadofluorine-M in Plaquesformationen nach In-vivo-Applikation (Versuch 1)

#### 3.3.2.1 MRT

##### 3.3.2.1.1 Ergebnisse der MRT-Untersuchung nach Verabreichung von Gadophrin-2

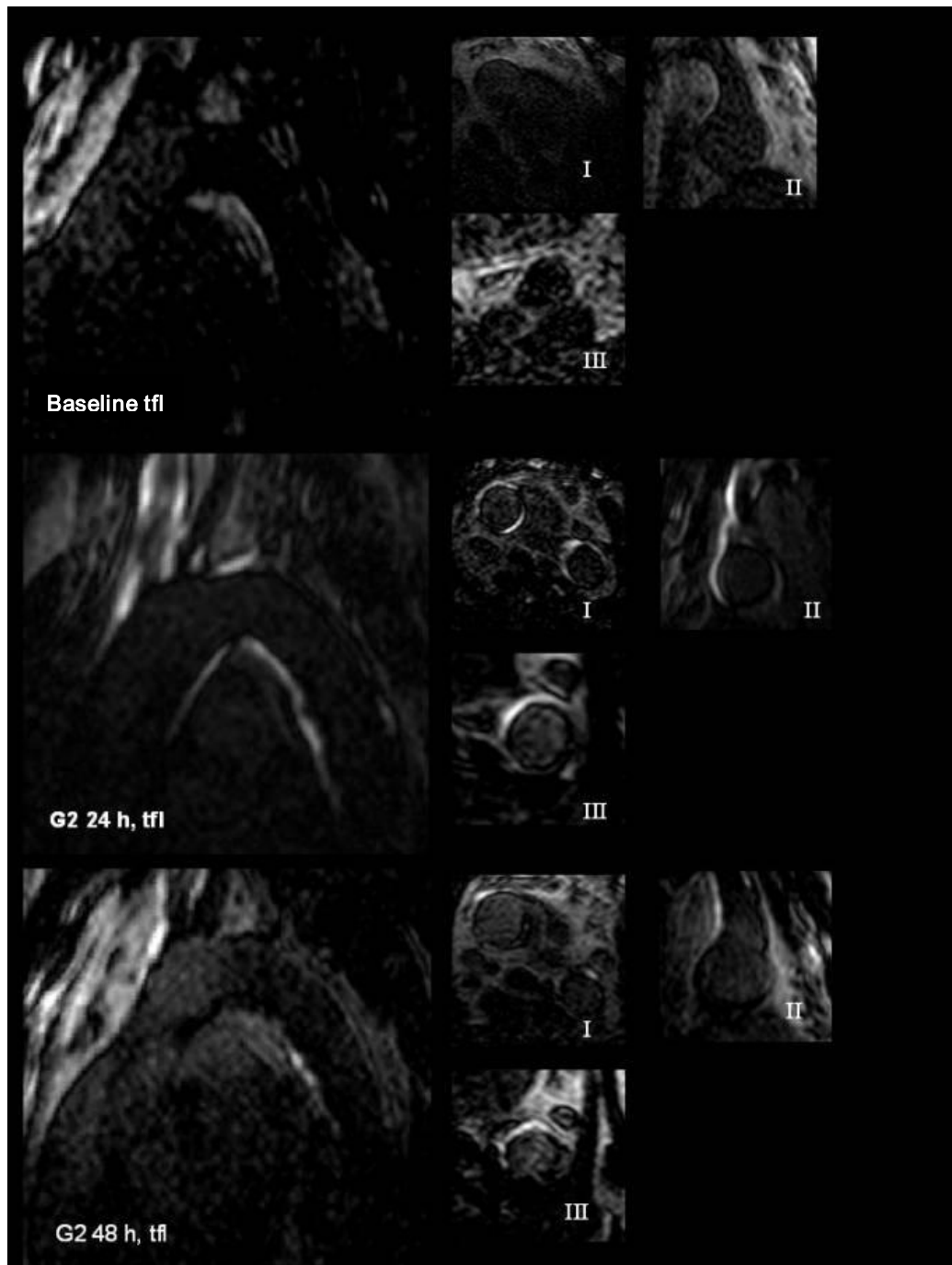


Abb. 15: Vergleichende Ergebnisse von MRT-Untersuchungen an WHHL-Kaninchen zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h nach G2-Applikation anhand eines Beispiels. Sequenz: turboflash. Die atherosklerotischen Wandveränderungen lassen sich am besten 24h p.i. darstellen.

Bei den MRT-Untersuchungen der Aortenbögen nach Verabreichung von Gadophrin-2 konnten gegenüber den Baseline-Tieren, die kein Kontrastmittel erhielten, eine Steigerung des Enhancement innerhalb der atherosklerotisch veränderten Aortenwände erzielt werden.

**Zum Untersuchungszeitpunkt 24h p.i. Gadophrin-2** zeigten 5 von 12 Aortenbogenteilstücken eine hohe MRT-Signalintensität (3 Punkte). Die Gefäßwände besaßen laut anschließender histologischer Untersuchung pathologische Veränderungen in den Stadien 2, 3, 4 und zweimal im Stadium 5.

Weitere 6 von 12 Aortenteilstücken zeigten ein mittelmäßiges Signal (2 Punkte). Die histologischen Untersuchungen dieser Gefäßstücke zeigten dreimal Veränderungen im Stadium 3, zweimal Veränderungen im Stadium 5 und einmal im Stadium 2.

In einem von 12 Fällen konnte keine ausreichende Signalverstärkung (1 Punkt) der Gefäßwand im MRT beobachtet werden, obwohl das Aortenbogenteilstück atherosklerotische Veränderungen im Stadium 3 aufwies.

**Zum Untersuchungszeitpunkt 48h p.i. Gadophrin-2** zeigten 8 von 12 Aortenbogenteilstücken eine mittelmäßige MRT-Signalintensität (2 Punkte), davon befanden sich alle Plaques in den Stadien 4 bis 5.

Bei vier Untersuchungseinheiten (Plaquestadien: 2x Stadium 5, 2x Stadium 3) wurde nur ein schwaches oder gar kein Signal (1 Punkt) beobachtet.

Der geeignetere Untersuchungszeitpunkt lag bei 24h nach Kontrastmittelapplikation von Gadophrin-2, da im Gegensatz zum Untersuchungszeitpunkt 48h p.i. in 5 von 12 Fällen ein hohes Signal in atherosklerotischen Läsionen erzielt werden konnte.

Die MRT-Bilder in Abb. 15 zeigen Beispiele von MRT-Untersuchungen zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden nach Verabreichung von G2.

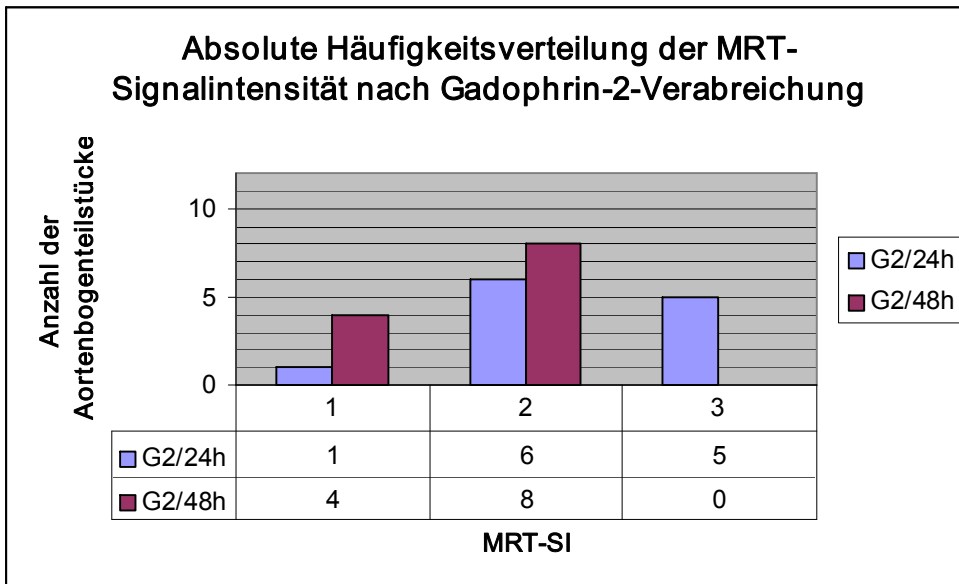


Abb. 16: Die Abbildung zeigt die Häufigkeitsverteilung der MRT-Signalintensitäten bezogen auf die Gesamtanzahl der Untersuchungseinheiten einer Versuchsgruppe bei Verwendung des Kontrastmittels Gadophrin-2 nach 24 und 48 Stunden. In der Gruppe G2/24h wurden 11 von 12 Aortenbogenteilstücken mit einer MRT-Signalintensität von 2 und 3 (mittlere und hohe SI) bewertet, während in der Gruppe G2/48h kein Gefäßstück mit 3 bewertet werden konnte, die Signalintensität vielmehr in allen Fällen schwach bis mittelmäßig bewertet wurde. Der bessere Untersuchungszeitpunkt war 24h p.i.



### 3.3.2.1.2 Ergebnisse der MRT-Untersuchung nach Verabreichung von Gadofluorine-M

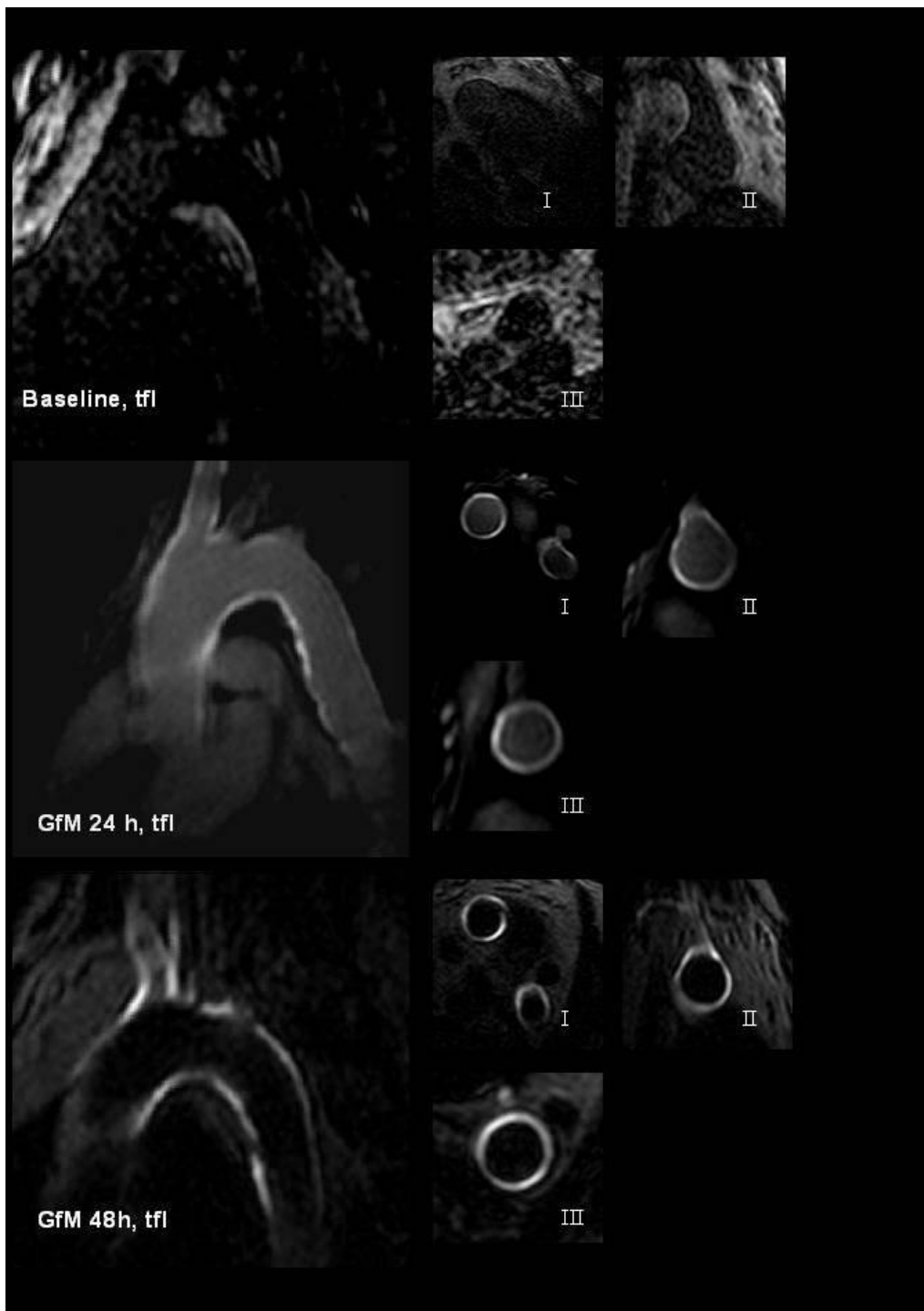


Abb. 17: Vergleichende Ergebnisse von MRT-Untersuchungen mit Gadofluorine-M an WHHL-Kaninchen zu den Zeitpunkten 0, 24h und 48h anhand eines Beispiels. Sequenz: turboflash. Den besten Kontrast erzielte man 48h p.i.

Bei den MR-tomographischen Untersuchungen der Aortenbögen nach Verabreichung von Gadofluorine-M-Mischmizellen konnte gegenüber den Baseline-Tieren eine deutliche Signalverstärkung innerhalb der Aortenwände aller atherosklerotisch veränderten Aortenteilstücke der WHHL-

Kaninchen erzielt werden.

Zum **Untersuchungszeitpunkt 24h** nach Verabreichung von Gadofluorine-M-Mischmizellen stellten sich 6 Untereinheiten sehr signalreich (3 Punkte) dar, davon erwiesen sich alle Aortenteilstücke in den histologischen Untersuchungen als besonders stark atherosklerotisch verändert: Drei zeigten Veränderungen im Plaquestadium 5 und drei im Stadium 6. Die restlichen 6 Aortenteilstücke gaben ein mittelmäßiges Signal (2 Punkte) ab, ihre Gefäßwände waren unterschiedlich stark pathologisch verändert: 1x Stadium 2 und 4, jeweils 2x Stadium 5 und 6 (siehe Abb. 18).

Die Signalintensität des Blutes war zum Zeitpunkt 24h p.i. noch sehr hoch, so dass der Kontrast zwischen Gefäßwänden und dem Blut schlecht war und eine Diagnostik erschwerte.

Zum **Zeitpunkt 48h p.i.** stellen sich die Gefäßwände aller Aortenbogenteilstücke mit hoher MRT-Signalintensität (3 Punkt) dar. Da das Blut zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine Signalintensität mehr hatte, entstand ein deutlicher Kontrast zwischen Gefäßläsion und Blut. 9 der 12 Aortenbogenteilstücke stellten sich in den anschließenden histologischen Untersuchungen als hochgradig verändert heraus: Sie zeigten alle Veränderungen im Stadium 6. Die restlichen 3 Aortenteilstücke befanden sich histologisch in den Plaquestadien 3 und 4 (siehe Abb.18).

Beide Untersuchungszeitpunkte sind zur diagnostischen Darstellung atherosklerotischer Plaques geeignet. Aufgrund des geringeren Hintergrundrauschens und des besseren Signals bei vergleichbarer Sequenz ist der Untersuchungszeitpunkt 48h p.i. zur Detektion atherosklerotischer Plaques besser geeignet als 24h. Die Abbildung 17 zeigt Beispiele von MRT-Untersuchungen an WHHL-Kaninchen zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden nach Verabreichung von GfM-Mischmizellen.

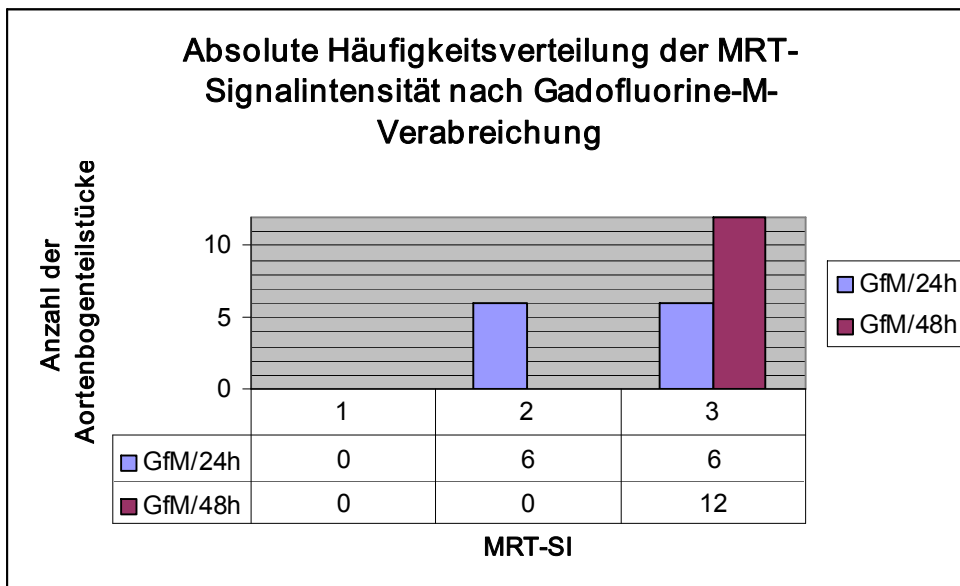


Abb. 18: Die Grafik zeigt die relative Häufigkeit der Ergebnisse von MRT-Untersuchungen (Signalintensität) an WHHL-Kaninchen zu den Zeitpunkten 24h und 48h nach Verabreichung des Kontrastmittels Gadofluorine-M-Mischmizellen. In der Gruppe GfM/48h konnte häufiger eine hohe MRT-Signalintensität festgestellt werden als in der Gruppe Gfm/24h, hier war bei der Hälfte der Aortenbogenteilstücke nur eine mittelmäßige Signalintensität feststellbar.

### 3.3.2.1.3 G2 und GfM im Vergleich

GfM detektiert die atherosklerotisch veränderten Blutgefäßwände sicherer (alle Aortenteilstücke zeigten eine mindestens befriedigende Signalintensität) und mit stärkerer Signalintensität als G2 zu beiden Zeitpunkten.

### 3.3.2.1.4 Gadofluorine-M- und Gadophrin-2-Kontrollen

Zur Kontrolle wurden beide Kontrastmittel an Weißen Neuseeländer Kaninchen, die keine atherosklerotische Gefäßläsionen entwickeln, getestet: ihnen wurden in gleicher Dosis beide Kontrastmittel verabreicht und ihre Aortenbögen auf Kontrastmittelanreicherung im MRT nach 24 und 48 Stunden untersucht. Die Aortenbögen der Kontrolltiere stellten sich im MRT zu den untersuchten Zeitpunkten kontrastarm dar. Die Kontrastmittel konnten nicht innerhalb der gesunden Gefäßwände der Kontrolltiere detektiert werden, sie reicherten sich beide nicht innerhalb der untersuchten Zeitpunkte in den Gefäßwänden an. Auch in der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Aortenbogenteilstücke konnte keine Kontrastmittelanreicherung beobachtet werden.

Die Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der MRT-Untersuchungen der vier Weißen Neuseeländer Kaninchen anhand je eines Beispiels.

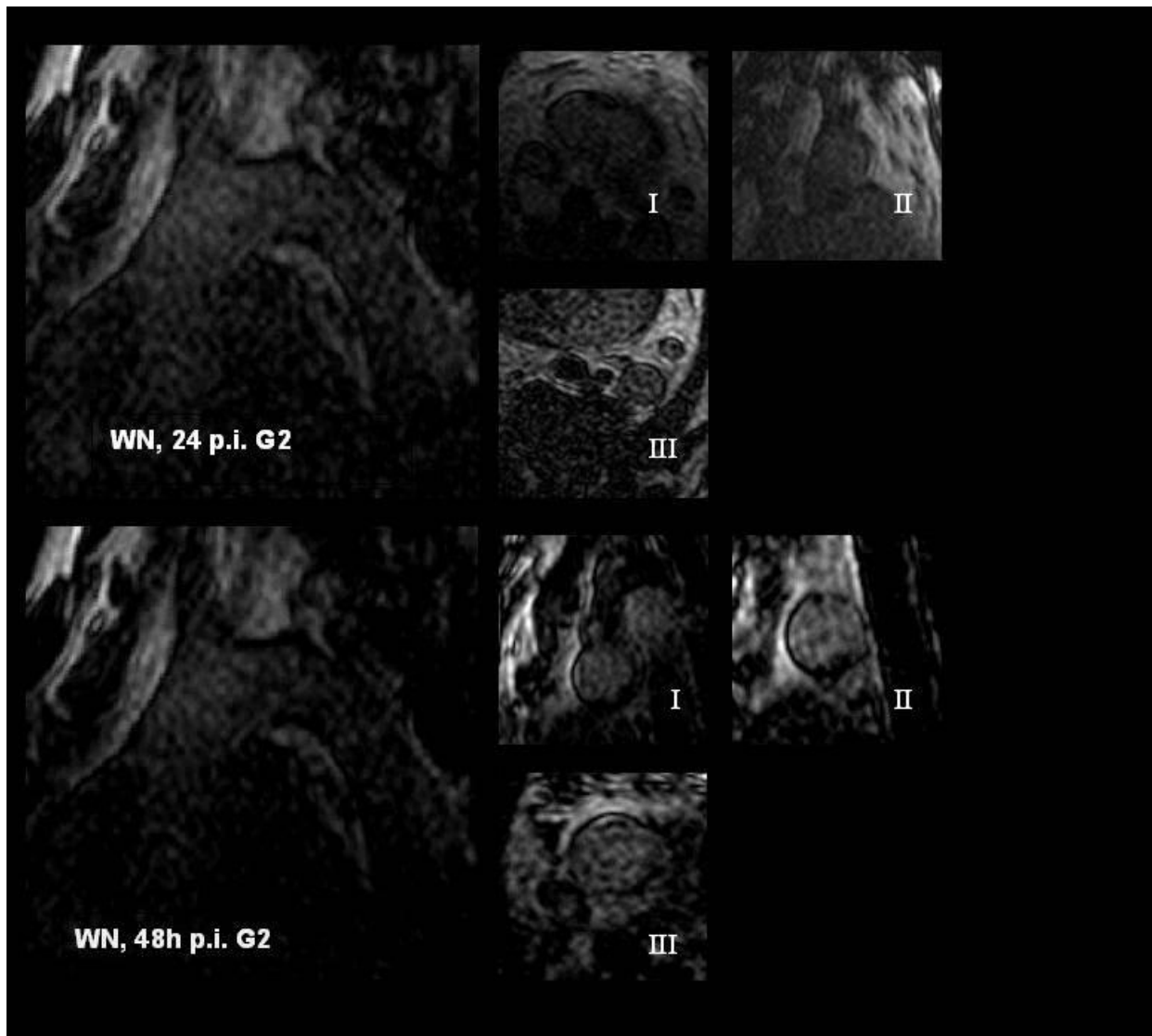


Abb. 19: MRT Untersuchungen der Weißen Neuseeländer-Kontrollkaninchen 24h und 48h nach Gadophrin-2-Verabreichung, Turboflashsequenz 15\_T1120. Die Gefäßwände zeigen keinerlei Signalverstärkung nach Gadophrin-2-Applikation.

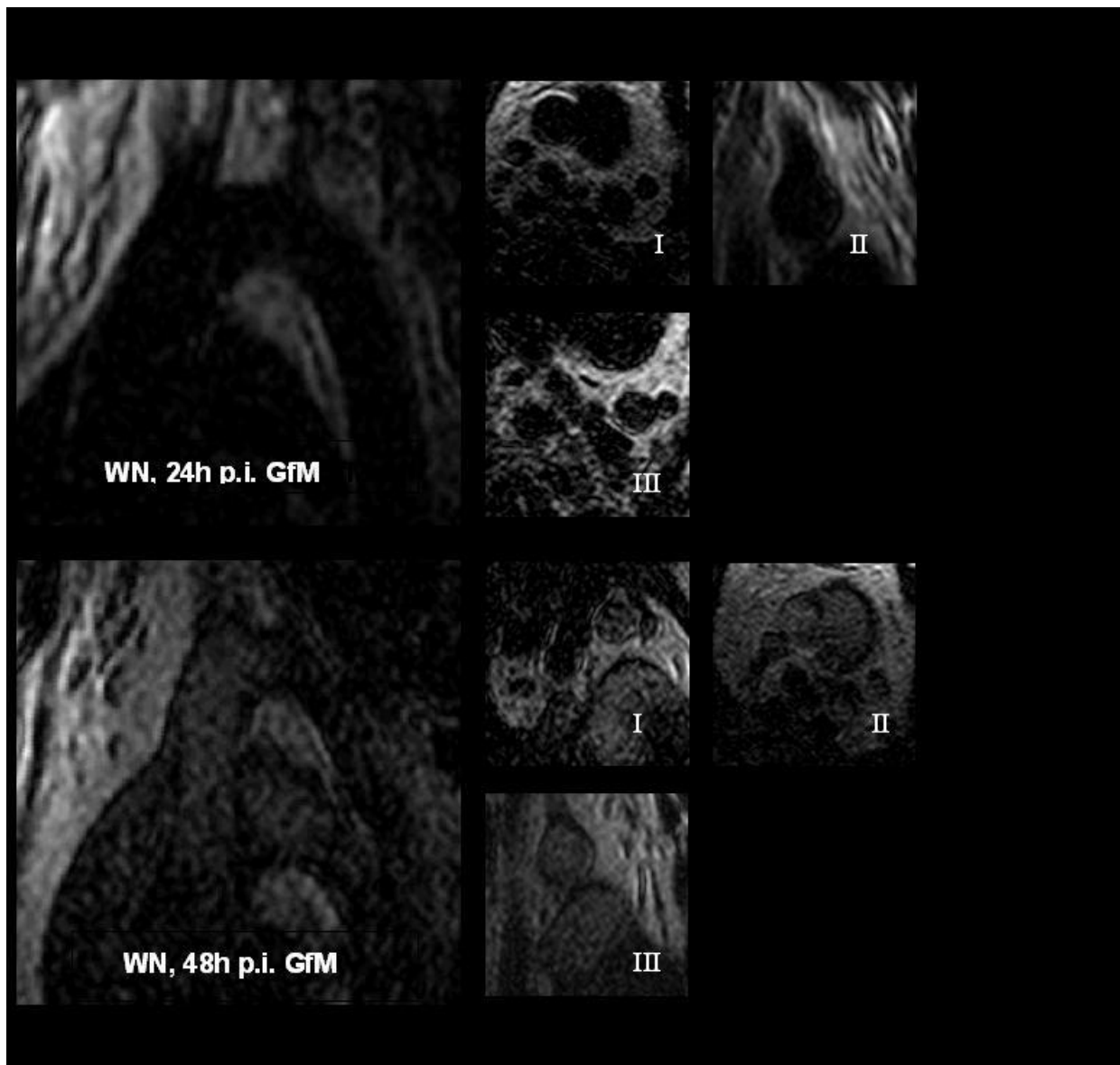


Abb.10: MRT Untersuchungen der Weißen Neuseeländer-Kontroll-Kaninchen 24h und 48h nach Gadofluorine-M-Mischmizellen-Verabreichung, Turboflashsequenz 15\_T1120. Die Gefäßwände zeigen keinerlei Signalverstärkung nach Gadofluorine-M-Applikation.

### 3.3.2.2 Histologischer Nachweis

#### 3.3.2.2.1 Fluoreszenz

Nach erfolgten Untersuchungen im MRT wurden den, noch im narkotisierten Zustand euthanasierten Tieren die Aortenbögen entnommen und in die drei, den axialen MRT-Untersuchungsebenen entsprechenden Teilstücken I, II und III zerteilt. Von den tiefgefrorenen Proben wurde eine Serie von Kryoschnitten angefertigt, von denen jeweils ein Schnitt nativ fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurde. Schnittpräparate von Aorten der WHHL-Kaninchen, in denen sich Gd-haltige Kontrastmittel nach vorheriger Verabreichung anreicherten, zeigten im nativen Kryoschnitt bei Anregung mit grünem Licht konzentrationsabhängig rote Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität. Hierbei fluoresziert Gadophrin-2 primär aufgrund seines Porphyrinbestandteils. Gadofluorine-M wurde mit einem Farbstoff markiert. Im Fluoreszenzmikroskop stellten sich die Kontrastmittel als rotes Leuchten auf dunklem Untergrund dar.

#### 3.3.2.2.2 Detektion und Intensität

**Vergleichende Untersuchungen zur Fluoreszenz-Intensität:** Die histologischen Bilddaten wurden hinsichtlich Kontrastmittel-Signalintensität, Fluoreszenz-Signalintensität, Atherosklerose- bzw. Plaquestadium und der KM-Lokalisation vergleichend untersucht, semiquantitativ ausgewertet und die Ergebnisse in einer Rohdatentabelle (siehe Tabelle 17, Seite 123) zusammengefasst.

Die Intensität des rot-fluoreszenzierenden Leuchtens konnten mit Hilfe digitaler Fotos miteinander verglichen werden. Die Belichtungszeiten wurden hierzu während der digitalen Aufnahmetechnik konstant beibehalten. Die Intensität der Fluoreszenz wurde vergleichend subjektiv beurteilt und mittels eines Punkte-Bewertungssystems (1-3, siehe Seite 41) semiquantitativ bewertet. Die Ergebnisse befinden sich als Rohdatentabelle (siehe Seite 116) im Anhang.

**Detektion:** Es stellte sich das Problem, das rote Leuchten auf schwarzem Untergrund einer histologischen Struktur zuzuordnen. Bei Zuschalten von Licht war zwar eine grobe Orientierung im Präparat möglich, jedoch keine morphologische Gewebebestimmung. Die Lokalisation der Fluoreszenz war in den nativen, ungefärbten Schnitten deshalb weder in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen noch im Hellfeld genau zu bestimmen. Zur genauen Plaquecharakterisierung und Kontrastmittellokalisation wurden Serienschritte angefertigt, die ergänzend mikroskopisch untersucht werden konnten. Mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer und histochemischer Färbungen der restlichen Serienschritte wurden zunächst alle Plaques charakterisiert und mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verglichen. Fluoreszierende Strukturen konnten so anhand der Serienschritte histologisch

identifiziert werden.

Zum Verständnis der Anreicherungsmechanismen wurden die Schnitt-Serien insbesondere auf eine Kolokalisation der Fluoreszenz mit anderen, für die Atherosklerose charakteristischen Plaquestrukturen untersucht.

### Fluoreszenz-Intensität von Gadophrin-2:

Gadophrin-2 zeichnete sich insbesondere zum **Untersuchungszeitpunkt 24h p.i** durch eine starke Fluoreszenz aus. Die Methode der Kontrastmitteldetektion durch Fluoreszenzmikroskopie erwies sich bei dem porphyrinhaltigen Gadophrin-2 als sehr geeignet.

24 Stunden nach der Verabreichung von Gadophrin-2 zeigten neun von zwölf Schnittpräparaten der Aortenteilstücken der WHHL-Kaninchen aus der G2/24h Gruppe eine hohe Fluoreszenz-Signalintensität (3 Punkte). Mittelmäßig (2 Punkte) stellte sich die Fluoreszenz von drei weiteren dar. Im Durchschnitt war die Fluoreszenzintensität in dieser Gruppe hoch.

Bei den Schnittpräparaten der Aorten aus der **Gruppe II (G2/48h)** konnten bei Fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung eine insgesamt schwächere Fluoreszenz beobachtet werden: Nur zwei der Untersuchungseinheiten zeigten eine hohe Fluoreszenz-Signalintensität. Sieben Schnittpräparate fluoreszierten mittelmäßig, bei drei Aortenteilstücken wurde höchstens eine schwache Signalintensität beobachtet. Die Fluoreszenz-Signalintensität war in der Gruppe II nur mittelmäßig (siehe Abb.21a).

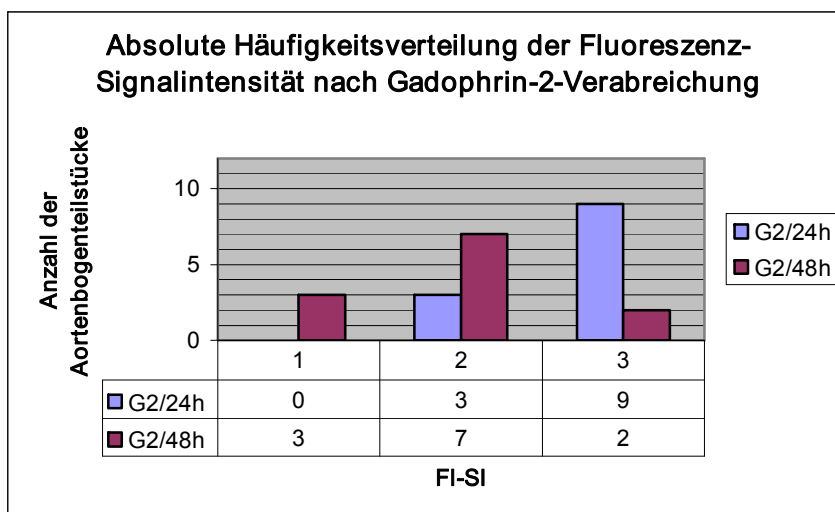


Abb. 21a: Absolute Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten in nativen Histoschnitten der WHHL Kaninchen **24h p.i. G2** und **48h p.i. G2**: Nach 24h entstand durchschnittlich eine gute Signalintensität, nach 48h war im Durchschnitt ein mittelmäßiges Fluoreszenz-Signal zu beobachten.

Da die Fluoreszenzintensität in der gewählten Substanzkonzentration bei gleicher Schnittdicke proportional zur Anreicherungskonzentration ist, kann hier von einer höheren Kontrastmittelkonzentration in den Plaques 24 Stunden p.i. ausgegangen werden. 48 Stunden nach Verabreichung von Gadophrin-2 hat sich die Konzentration an KM-Molekülen in den Plaques wieder reduziert.

#### **Fluoreszenz-Intensität von Gadofluorine-M-Mischmizellen:**

Gadofluorine-M-Mischmizellen zeichneten sich bei beiden Untersuchungszeitpunkten durch eine hohe Fluoreszenz-Signalintensität aus. Die Methode der Kontrastmitteldetektion durch Fluoreszenzmikroskopie erwies sich bei dem mit einem Farbstoff markierten Gadofluorine-M als ebenfalls geeignet.

#### **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung 24h p.i. GfM:**

Fünf Aortenbogenteilstücke zeigten histologisch eine hohe Fluoreszenzintensität, weitere fünf fluoreszierten mittelmäßig und zwei Aortenstücke nur schwach bis ungenügend. Die Durchschnittliche Fluoreszenzintensität betrug rund 2 und war somit mittelmäßig.

#### **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung 48h p.i. GfM:**

Bei der Gruppe IV (GfM/48h) konnte eine hohe Fluoreszenz bei sieben histologischen Proben beobachtet werden, fünf Proben besaßen eine mittelmäßige Intensität. Insgesamt wurden bei dem Untersuchungszeitpunkt 48h p.i. ein deutlicheres und einheitlicheres Fluoreszenzsignal beobachtet. Die durchschnittliche Fluoreszenz-Signalintensität war zur Detektion ausreichend hoch (siehe Abb.21b).



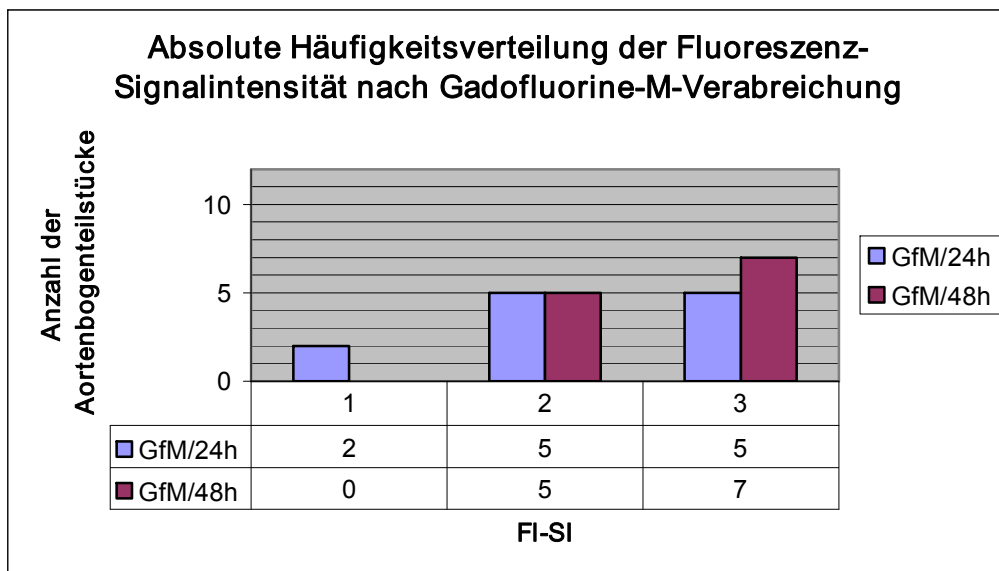


Abb. 21b: Absolute Häufigkeit der Fluoreszenz-Signalstärken in nativen Histoschnitten der WHHL Kaninchen 24h p.i. GfM und 48h p.i. GfM. Es waren keine nennenswerten Unterschiede feststellbar.

### 3.3.2.2.3 Lokalisation

Als mögliche Ausprägungen der Lokalisation kristallisierten sich anhand erster Ergebnisse die

- lipid- und faserreiche, zellarme und ödematöse Matrix (fettige Matrix = fM) oder
- Zellen vom Monozytären Phagozytensystem (MPS)

als Kompartimente heraus. Eine gleichzeitige Anreicherung in beiden Kompartimenten war ebenfalls möglich.

Alle histochemisch und immunhistochemisch gefärbte Serienschritte wurden im Zuge der Fluoreszenzdetektion auf eine Kolokalisation o.g. Kompartimente mit der Fluoreszenz im zugehörigen nativen Kryoschnitt untersucht, die Ergebnisse wurden in der Rohdatentabelle vermerkt: wenn die Fluoreszenz in Zellen des MPS und/oder der Matrix lokalisiert wurde, gab es ein `+`, andernfalls ein `—`

#### 3.3.2.2.3.1 Gadophrin-2

**24 Stunden p.i.** konnte bei allen 12 Untersuchungseinheiten eine Kolokalisation der Fluoreszenz im nativen Kryoschnitt mit der fettigen Matrix (zellarm, lipid- und faserreich) beobachtet werden; Bei 10 von 12 Aortenteilstücken war die Fluoreszenz gleichzeitig mit CD14-/CD68-positiven Bezirken kolokalisiert (siehe Abbildung 22). Grundsätzlich fluoreszierten die atherosklerotischen Veränderungen großflächig. In zwei Fällen war die Fluoreszenz ausschließlich mit der fettigen Matrix kolokalisiert (siehe Abbildung 24).

**48 Stunden p.i.** wurde bei 8 von 12 Aortenteilstücken eine Kolokalisation von Gadophrin-2 mit ÖlrotO-positiven, zellarmen Arealen, der fettigen Matrix beobachtet, darunter befanden sich 6 Aortenteilstücke, deren Fluoreszenz auch gleichzeitig mit CD14-/CD68-positiven Arealen kolokalisiert waren (siehe Abbildung 22).

Bei 10 von 12 Aortenteilstücken war die Fluoreszenz mit CD14- und CD68-positiven Bezirken kolokalisiert: Davon konnte in 4 Fällen eine ausschließliche Kolokalisation mit Zellen des MPS festgestellt werden (siehe Abbildung 26), bei 6 Untersuchungseinheiten wurde die Fluoreszenz in CD14-/CD68-positiven und ÖlrotO-positiven, zellarmen Bezirken detektiert (siehe Abbildung 22).

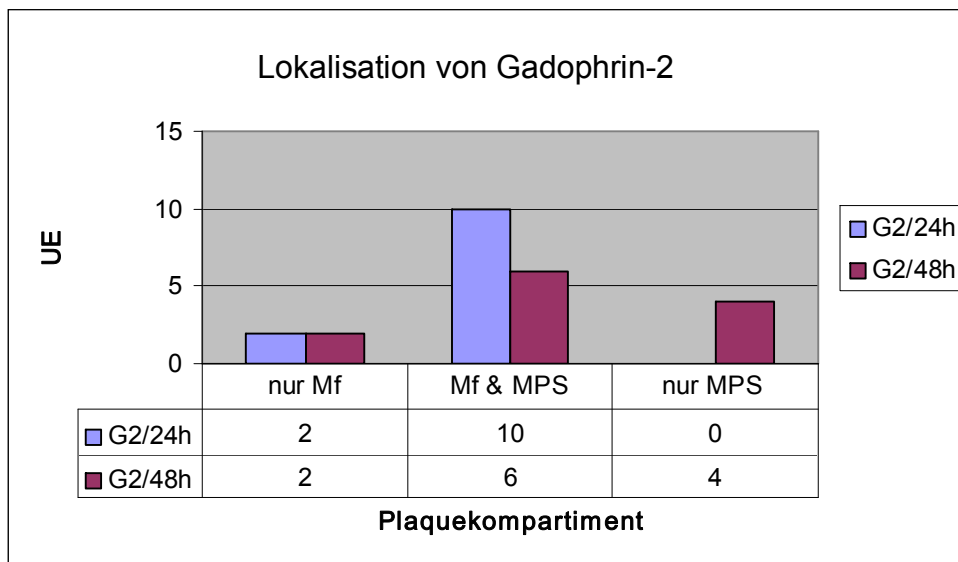


Abb. 22: Lokalisation von Gadophrin-2/24 und 48 Stunden p.i.; Mf = fettige, zellarme und faserreiche Matrix; MPS = Mononukleäres Phagozytensystem; UE = Untersuchungseinheit. 24h p.i. befand sich G2 vorwiegend in beiden Kompartimenten (Mf & MPS), 48h p.i. erhöht sich der Anteil an Untersuchungseinheiten, bei denen eine zelluläre Lokalisation im MPS beobachtet werden konnte.

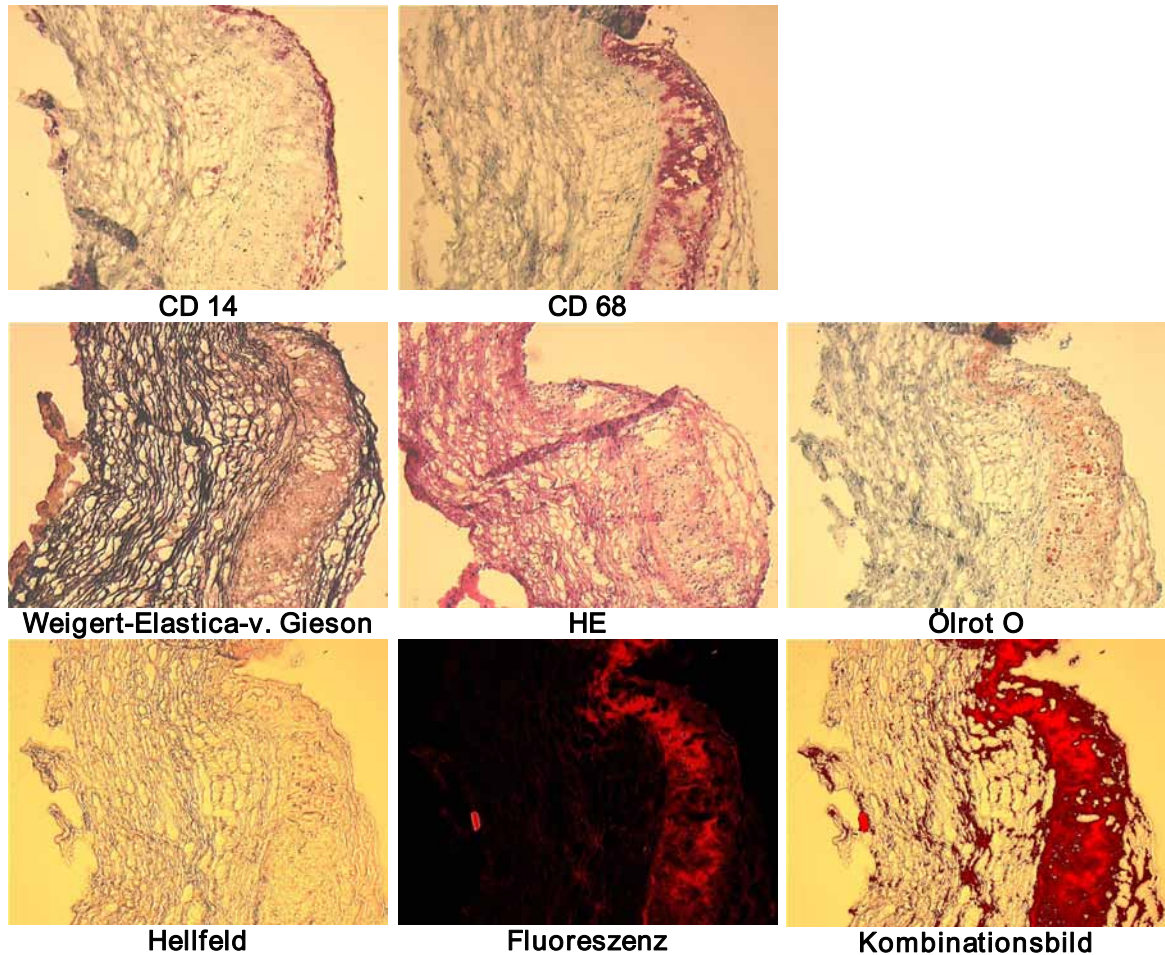


Abb. 23: Beispiel einer Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe I (**Gadophrin-2/24h p.i.**): Gute Fluoreszenzintensität in der gesamten Plaque, diese enthält viele CD68-positive Zellen und eine fettige, ödematöse und kollagene Matrix subendothelial mit elastischer Kappe. Die Fluoreszenz befindet sich in der gesamten Plaque unterhalb der Kappe elastischer Fasern, die Media zeigt kaum Fluoreszenz. Dieses Ergebnis wurde bei 10 von 12 Fällen beobachtet. Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

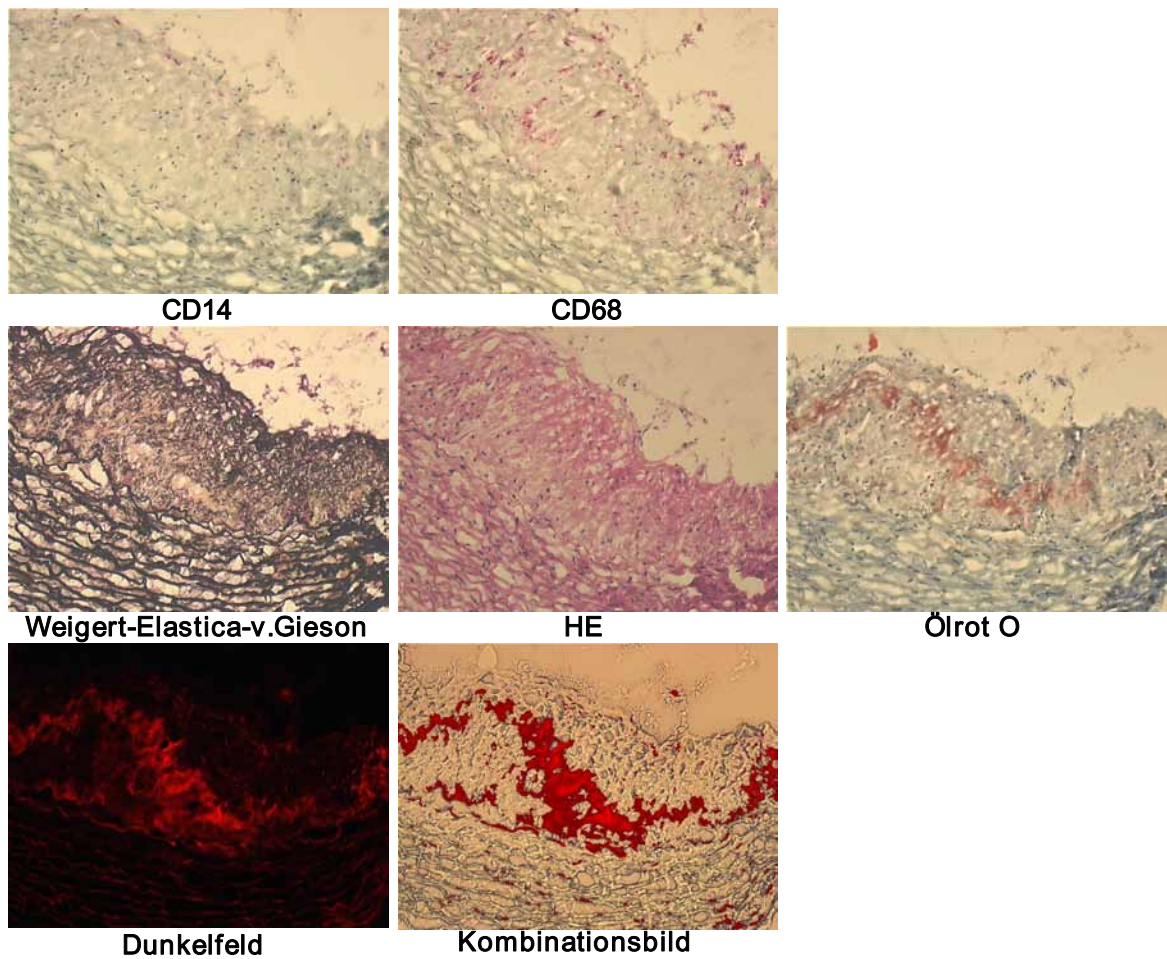


Abb. 24: Beispiel einer Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe I (Gadophrin-2/24h p.i.): Diese Plaque enthält eine fettige, ödematöse Matrix, die reich an elastischen Fasern ist und arm an CD68-positiven Zellen. Die Fluoreszenz befindet sich hier ausschließlich in dem ÖlrotO-positiven, zellarmen Areal. Dieses Ergebnis kam bei 2 von 12 Untersuchungseinheiten vor. Objektiv 20-fach, Okular 10-fach.

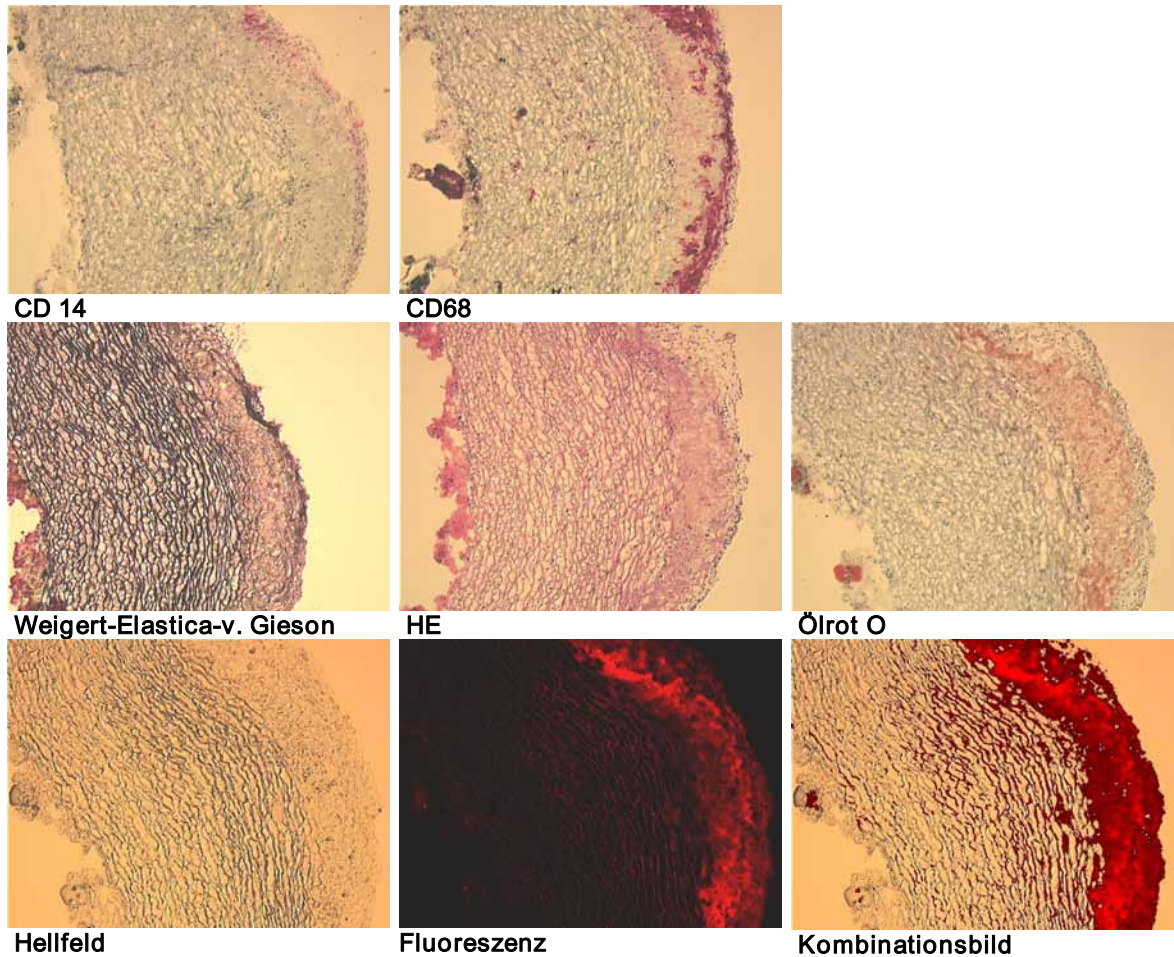


Abb. 25: Beispiel einer Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe II (**Gadophrin-2/48h p.i.**): Plaque mit guter Fluoreszenzintensität in der gesamten Plaque, dieser enthält viele CD68-positive Zellen und eine fettige, ödematöse und kollagene Matrix. Die Fluoreszenz befindet sich in der gesamten Plaque, am intensivsten ist sie allerdings zwischen den Zellen des MPS und des ÖlrotO-positiven Bereichs. Die Media zeigt wenig Fluoreszenz. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei 6 von 12 Teilstücken beobachtet werden. Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

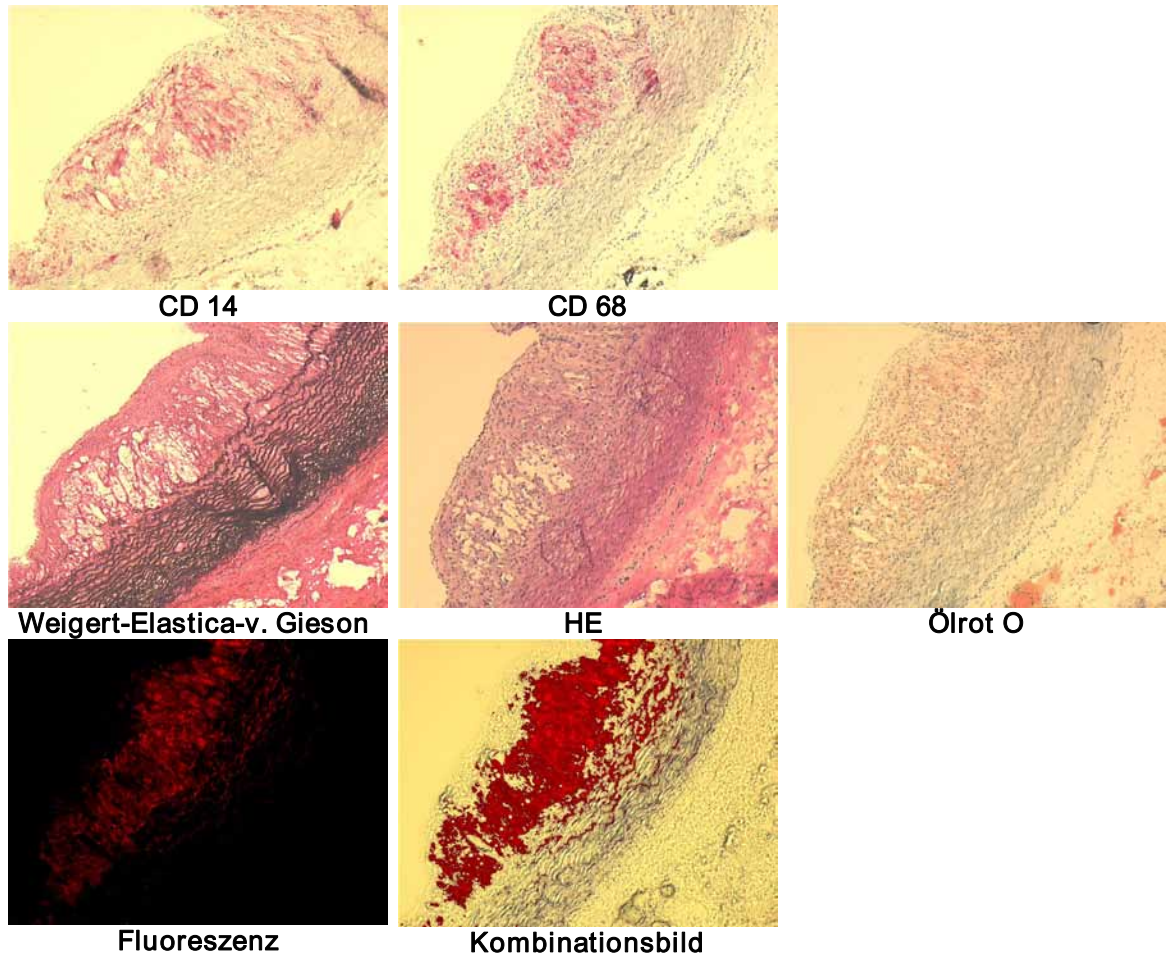


Abb. 26: Beispiel einer Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe II (**Gadophrin-2/48h p.i.**): Plaque mit guter Fluoreszenzintensität, diese enthält viele CD14- und CD68-positive Zellen und sehr wenig fettige, ödematöse und kollagenreiche Matrix. Die ÖlrotO-positiven Bereiche stellen hier den Lipidanteil der Schaumzellen dar. Die Fluoreszenz ist mit zellreichen, CD14- und CD68-positiven Arealen kolokalisiert, die Media zeigt kaum Fluoreszenz. 4 von 12 Aortenteilstücke zeigten ein ähnliches Ergebnis. Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

### 3.3.2.2.3.2 Gadofluorine-M

**24h p.i.** konnte die Fluoreszenz bei allen Aortenteilstücken der WHHL Kaninchen in zellarmen, lipidreichen und ÖlotO-positiven Arealen detektiert werden (Abbildung 27). Gleichzeitig konnte bei zwei Aortenteilstücken an einigen Stellen eine Kolokalisation mit CD14-/CD68-positiven Arealen festgestellt werden (siehe Abbildung 28).

Auch **48h p.i.** wurde die Fluoreszenz ebenfalls bei allen untersuchten Aortenteilstücken innerhalb zellarmer, lipidreicher und ÖlotO-positiver Areale lokalisiert (siehe Abbildung 30). Eine gleichzeitige Lokalisation innerhalb CD14-/CD68-positiver Bereiche konnte zu diesem Zeitpunkt bei 4 von 12 Teilstücken (33,33%) an einigen Stellen beobachtet werden (siehe Abbildung 27).

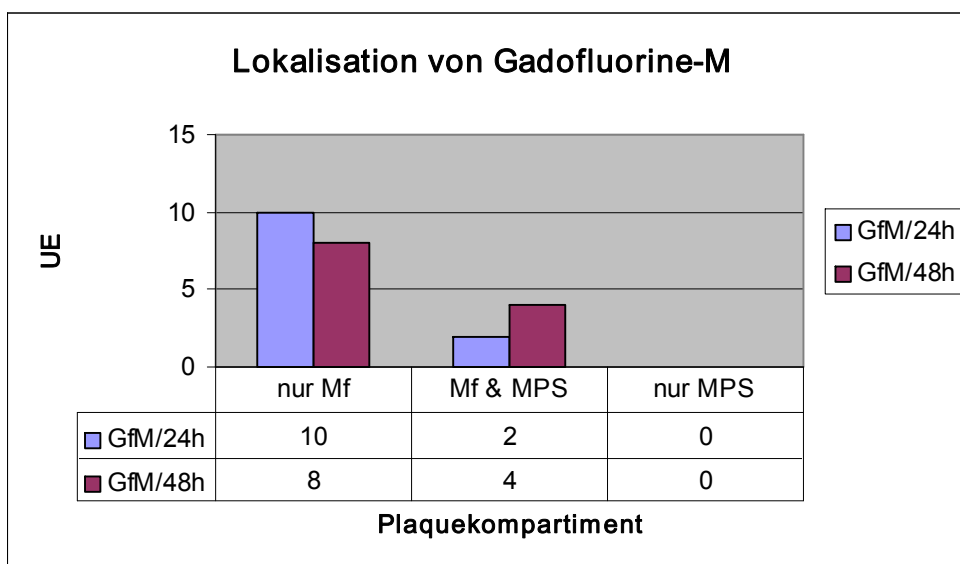


Abb. 27: Lokalisation der Fluoreszenz 24h und 48h p.i. Gadofluorine-M. Mf = fettige, zellarme und faserreiche Matrix; MPS = Mononukleäres Phagozytensystem; UE = Untersuchungseinheit. 24h p.i. befand sich GfM vorwiegend in der fettigen Matrix, 48h p.i. erhöht sich der Anteil an Untersuchungseinheiten, bei denen eine zelluläre Lokalisation in der Mf und dem MPS beobachtet werden konnte.

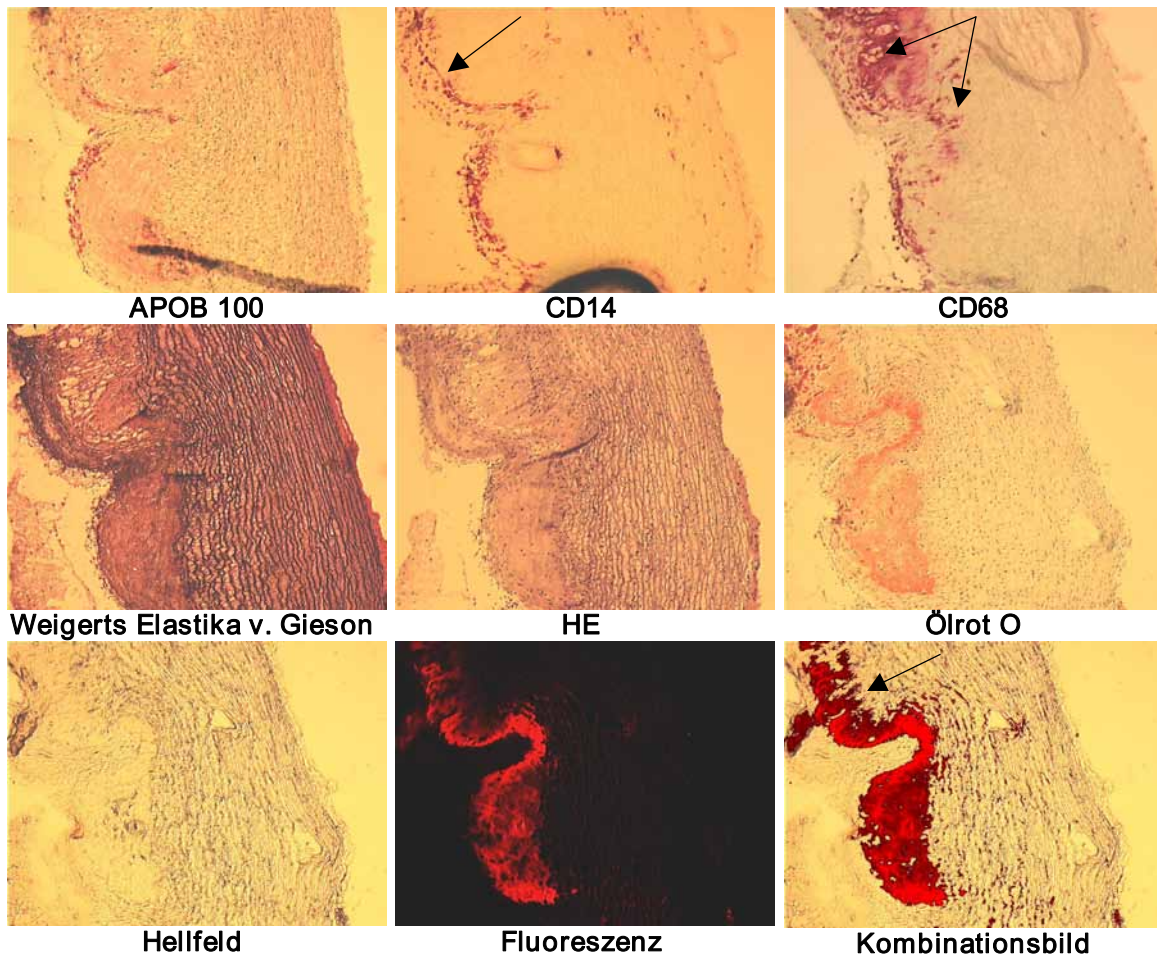


Abb. 28: Beispiel einer Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe III (**Gadofluorine-M/24h**): In diesem Beispiel ist eine deutliche Kolokalisation mit ÖlrotO-positiven Bereichen erkennbar. Luminal ist hier im oberen Bildausschnitt (siehe Pfeile) eine zusätzliche Kolokalisation mit CD68-positiven Bereichen zu vermuten. Ähnlich wie in diesem Beispiel stellte sich noch ein weiteres (insgesamt 2 von 12) Aortenteilstücke dar. Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.



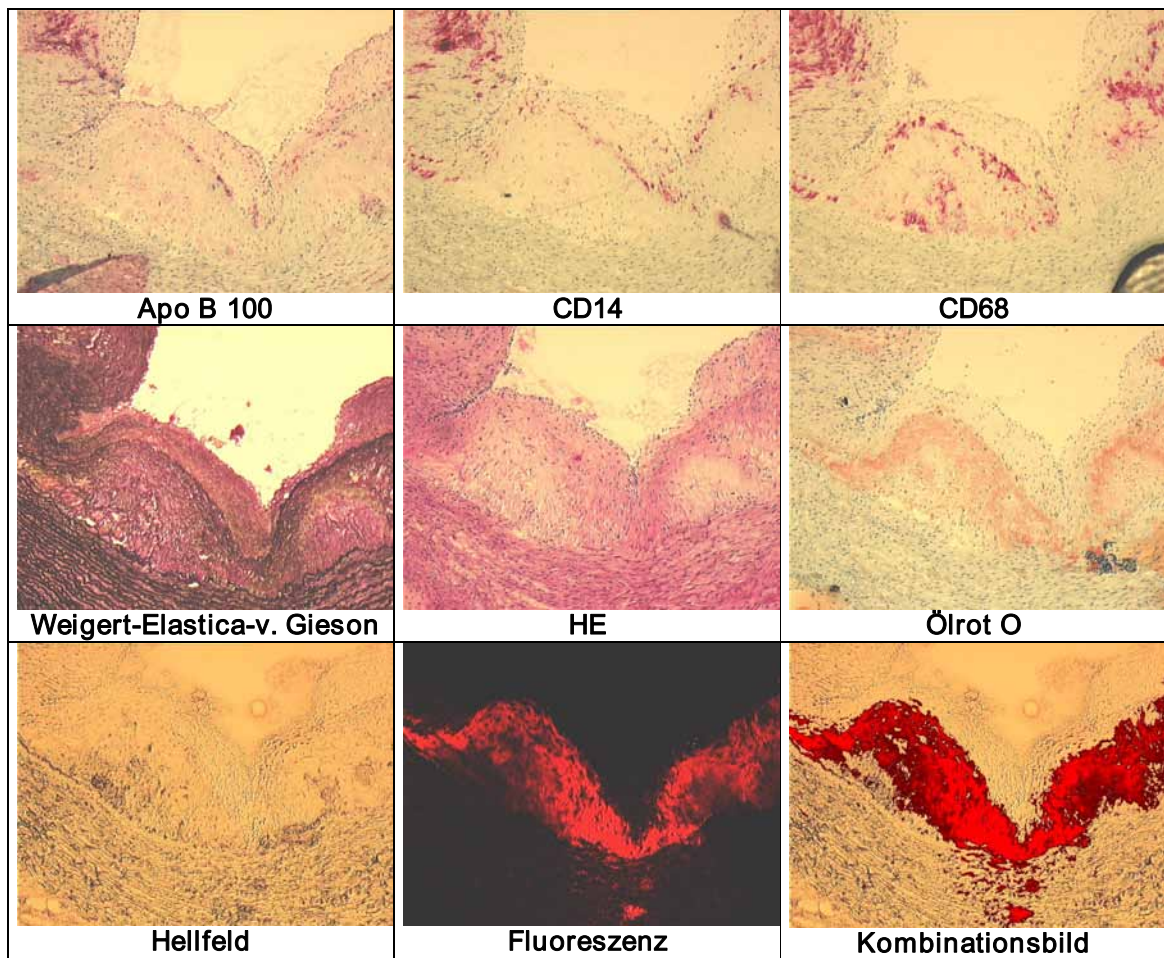


Abb. 29: Beispiel einer Serienuntersuchung eines weiteren Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe III (**Gadofluorine-M/24h**): In diesem Beispiel ist eine ausschließliche Kolo-kalisation mit ÖlrotO-positiven Bereichen erkennbar Gadofluorine-M 24h. MPS-positive Bereiche zeigen im zugehörigen Serienschnitt keine Fluoreszenz. Ähnlich wie dieses Beispiel stellte sich die Serienuntersuchungen bei 10 von 12 Aortenbogenteilstücken dar. Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

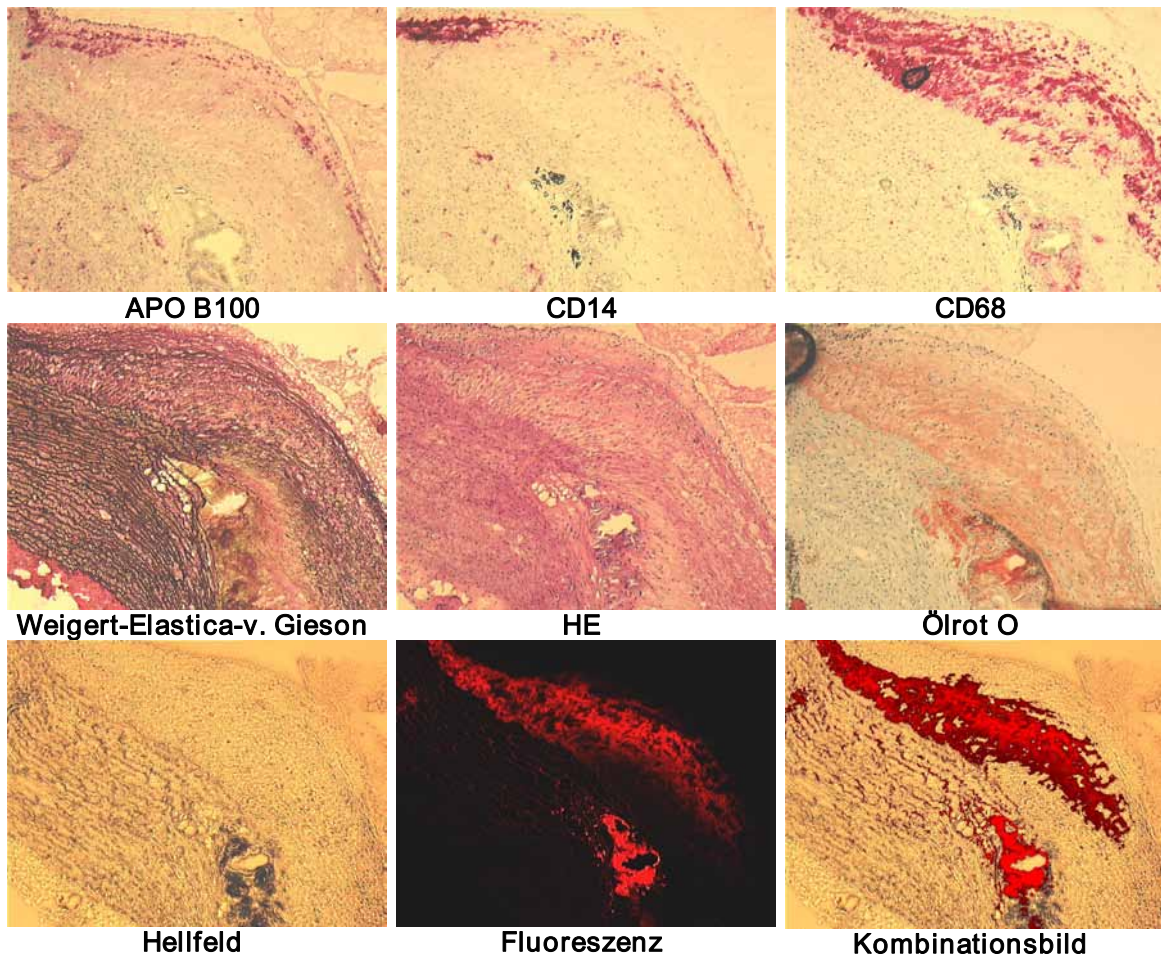


Abb. 30: Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe IV (**Gadofluorine-M/48h**): In diesem Beispiel ist eine deutliche Kolokalisation mit ÖlotO-positiven Bereichen zu beobachten, die allerdings gleichzeitig sehr makrophagenreich sind: Auch in CD68-positiven Bereichen ist im zugehörigen Serienschnitt Fluoreszenz erkennbar. Ähnlich wie in diesem Beispiel stellten sich in dieser Versuchsgruppe noch drei weitere (insgesamt 4 von 12) Aortenteilstücke dar. Die Fluoreszenz im unteren Teil ist auf Autofluoreszenz der Kalkansammlung in diesem Bereich zurückzuführen. Objektiv 10-fach, Okular 10-fach.

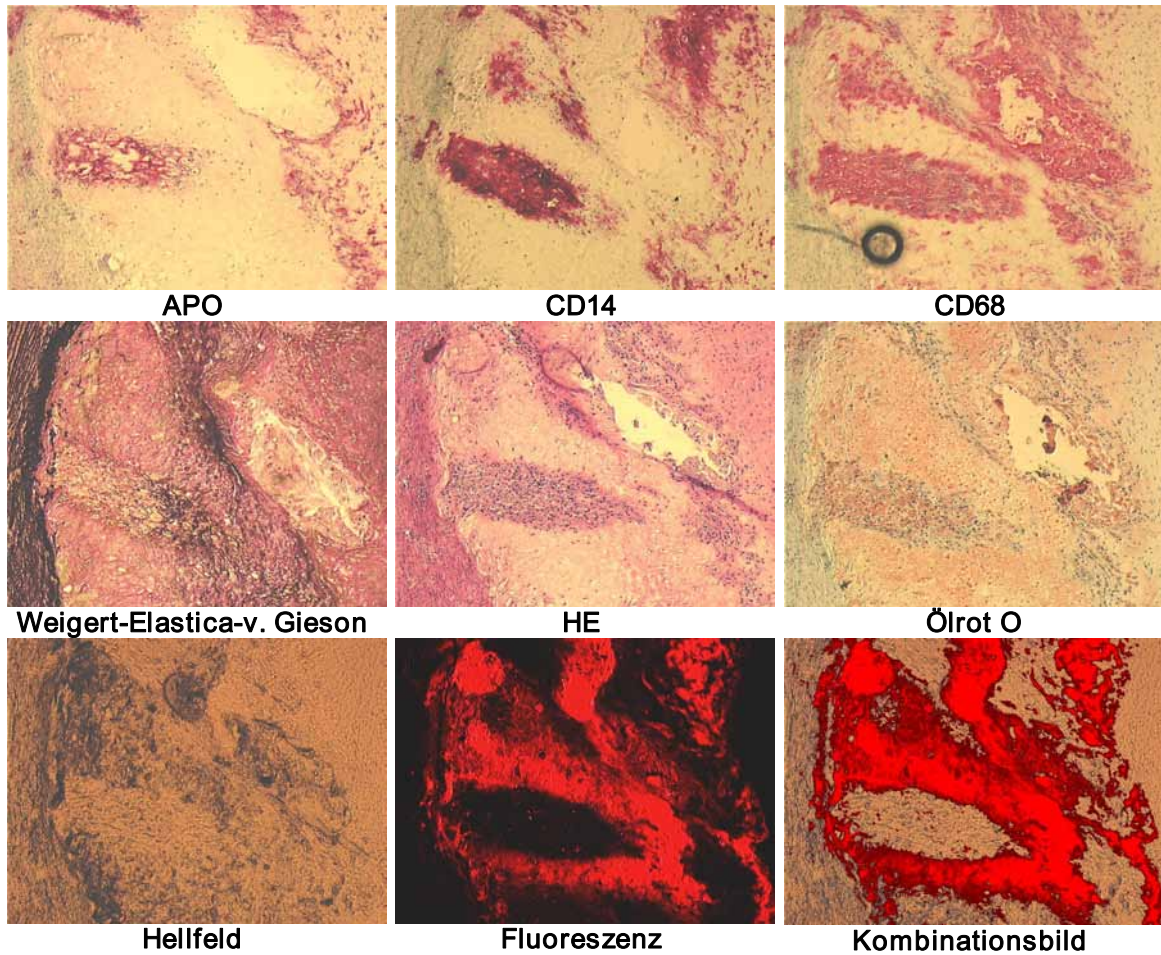


Abb. 31: Beispiel einer Serienuntersuchung eines Aortenteilstückes aus der Versuchsgruppe IV (**Gadofluorine-M/48h**): Hier ist eine deutliche Kolokalisation mit ÖlrotO-positiven Bereichen zu beobachten. CD68-positive, zellreiche Bereiche werden hier deutlich ausgespart. Ähnlich wie in diesem Beispiel stellten sich in dieser Versuchsgruppe noch sieben weitere 8 von 12 Aortenteilstücken dar. Objektiv 20-fach, Okular 10-fach.

### 3.3.2.2.3.3 Kontrollen

Kontrolle der Gewebespezifität beider Kontrastmittel:

Zur Kontrolle, ob sich die Kontrastmittel zielgerecht, also ausschließlich in atherosklerotisch erkrankten Gefäßwänden, anreichern, wurden neben den atherosklerosekranken WHHL-Kaninchen auch gesunde Weiße Neuseeländer Kaninchen untersucht. In jede Versuchsgruppen I-IV wurde jeweils ein Weißes Neuseeländer Kaninchen integriert und ihre Aortenbögen ebenfalls erst im MRT und anschließend histologisch auf Kontrastmittelanreicherung im Fluoreszenzmikroskop untersucht: In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz-Intensitäten festgestellt werden. Beide Kontrastmittel reicherten sich nicht innerhalb histologischer Strukturen der gesunden Blutgefäße an.

Methodenkontrolle:

Um die Signalverstärkende Wirkung der Kontrastmittel im MRT beurteilen zu können, muss die Signalintensität von atherosklerotisch erkrankten Gefäßwänden im MRT als Basis bekannt sein. Ebenso müssen die fluoreszierenden Eigenschaften von Plaquebestandteilen bekannt sein, um eine Aussage über eine Kontrastmittelanreicherung im Gewebe in Form von fluoreszierenden Molekülen treffen zu können. Hierzu wurde die Gruppe V gebildet: In dieser Gruppe, bestehend aus vier WHHL-Kaninchen, kam kein Kontrastmittel zur Verwendung. Diese Gruppe diente ausschließlich der Methodenkontrolle; an ihnen wurden alle Untersuchungen ohne vorherige Kontrastmittelapplikation durchgeführt. In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden hier schwache Fluoreszenzsignale von elastischen Fasern der Media und von Verkalkungen beobachtet, die auf Autofluoreszenz beruhen.

### 3.3.2.2.4 Korrelation von MRT-Signalstärke und Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Plaquestadium

**Gadophrin-2/24h p.i.:**

Tabelle 10: Fluoreszenz- und MRT-Signalstärke in Abhängigkeit des Plaquestadiums. Obere Reihe Plaquestadien (PS) 0-6; Mittlere Reihe Fluoreszenzsignalintensität (FL-S); Untere Reihe MRT-Signalintensität (MRT-S) der zuvor untersuchten Aortenbogenteilstücke.

PS	0, n=0		1, n=0		2, n=2		3, n=5				4, n=1	5, n=4			6, n=0	
FL-SI					3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	3	3
MRT-SI					3	2	2	3	2	2	1	3	3	3	2	2

In der Versuchsgruppe Gadophrin-2/24h wurden histologisch die Plaquestadien 2, 3, 4 und 5 diagnostiziert.

In der Gruppe I (G2/24h) konnte bei 2 Untersuchungseinheiten histologisch das **Plaquestadium 2** diagnostiziert werden, die Fluoreszenzsignalintensität in den zugehörigen nativen Kryoschnitten wurde als hoch beurteilt. Im MRT konnten mit Gadophrin 2, 24h p.i. ebenfalls mittelmäßige bis hohe Signalintensitäten im Plaquestadium 2 beobachtet werden.

Das **Plaquestadium 3** wurde in 5 Fällen histologisch diagnostiziert, das Fluoreszenzsignal war in vier von fünf Fällen sehr intensiv. Bei der vorherigen MRT-Untersuchung wurde das Signal von Gadophrin-2 in der Gefäßwand überwiegend als mittelmäßig, einmal als sehr hoch bzw. sehr gering beurteilt.

Auch das **Stadium 4** konnte mittels Gadophrin-2 24h p.i. einmal detektiert werden: Die Anreicherung von G2 konnte durch ein starkes Fluoreszenzsignal innerhalb der Plaque und einer hohen MRT-Signalintensität nachgewiesen werden.

Das **Plaquestadium 5** trat in der G2/24h-Gruppe viermal auf, das Fluoreszenzsignal innerhalb der Plaques wurde als mittelmäßig bis hoch beurteilt. Im MRT stellten sich die Läsionen des Stadiums 5 durch Gadophrin-2 mit besserer Signalintensität dar.

Gadophrin-2 war in der Lage, 24 Stunden nach Verabreichung Plaques der Stadien 2 bis 5 zu detektieren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Anreicherung innerhalb der atherosklerotischen Veränderungen nachgewiesen werden. In gesunden Gefäßwandanteilen und Anteilen der Media reicherte sich Gadophrin-2 zum Zeitpunkt 24h nach Verabreichung nicht oder nur in unbedeutenden Mengen an.

**Gadophrin-2/48h p.i.:**

Tabelle 11: Fluoreszenz- und MRT-Signalstärke in Abhängigkeit vom Plaquestadium. Obere Reihe Plaquestadien (PS) 0-6; Mittlere Reihe Fluoreszenzsignalintensität (FL-S); Untere Reihe MRT-Signalintensität (MRT-S) der zuvor untersuchten Aortenbogenteilstücke.

PS	0, n=0	1, n=0	2, n=0	3, n=2		4, n=4				5, n=6				6, n=0		
FL-SI				3	2	2	3	1	2	1	2	2	2	1	2	
MRT-SI				1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	

In der Versuchsgruppe Gadophrin-2/48h wurden histologisch die Plaquestadien 3, 4 und 5 diagnostiziert.

Das **Plaquestadium 3** konnte bei 2 Aortenteilstücken festgestellt werden, in einem Fall wurde die Fluoreszenz-Intensität als hoch, einmal als mittelmäßig empfunden. Mittels MRT-Untersuchung konnte nur eine schwache Signalintensität innerhalb der atherosklerotisch veränderten

Gefäßwände beobachtet werden.

Vier Aortenteilstücke des **Stadiums 4** zeigten vorwiegend ein ausreichendes MRT-Signal in den Gefäßwänden der WHHL Kaninchen, das Fluoreszenzsignal der zugehörigen Kryoschnitte war im Durchschnitt befriedigend.

Das **Plaquestadium 5** wurde innerhalb der Versuchsgruppe sechs mal diagnostiziert: Im Durchschnitt war das Fluoreszenz- und MRT-Signal nur mittelmäßig, zweimal gering .

Die schwächere Fluoreszenz ist Indiz einer geringeren Konzentration innerhalb der Plaques 48h nach Verabreichung des Kontrastmittels Gadophrin-2. Die geringe Plaquekonzentration wirkte sich auf die Signalintensität im MRT aus.

#### GfM-Mischmizellen/24h p.i.:

Tabelle 12: Fluoreszenz- und MRT-Signalstärke in Abhängigkeit des Plaquestadiums. Obere Reihe Plaquestadien (PS) 0-6; Mittlere Reihe Fluoreszenzsignalintensität (FL-S); Untere Reihe MRT-Signalintensität (MRT-S) der zuvor untersuchten Aortenbogenteilstücke.

PS	0, n=0	1, n=0	2, n=1	3, n=0	4, n=1	5, n=5					6, n=5				
FL-SI			3		1	1	3	3	2	3	2	3	2	2	2
MRT-SI			2		2	2	3	2	3	3	3	3	3	2	2

In der Versuchsgruppe III (GfM/24h) wurden histologisch Plaques im Stadium 2, 4, 5 und 6 diagnostiziert.

Das **Stadium 2** war einmal vertreten, das Signal in der MRT-Untersuchung war hier mittelmäßig, die Fluoreszenz im zugehörigen Kryoschnitt sehr signalstark.

Auch das **Stadium 4** wurde einmal diagnostiziert: Die MRT-Signalstärke war auch hier mittelmäßig, jedoch war das zugehörige Fluoreszenzsignal nur sehr schwach.

In 5 Fällen konnten die Aortenbogenteilstücke mittels histologischer Untersuchungen dem **Stadium 5** zugeordnet werden. Die MRT-Untersuchungen zeigten eine mittelmäßige bis hohe Signalintensität atherosklerotisch veränderter Gefäßwände. Das Fluoreszenzsignal in den zugehörigen Kryoschnitten wurde bis auf einmal ebenfalls hoch bewertet.

Das **Stadium 6** zeigten 5 Aortenbogenteilstücke in der Versuchsgruppe GfM/24h: Die atherosklerotischen Veränderungen konnten im MRT 24h nach Verabreichung von GfM-Mischmizellen detektiert werden, die Gefäßwände wurden sehr gut (3x) bis mittelmäßig (2x) signalintensiv dargestellt. Die Fluoreszenzsignalintensität war in den zugehörigen

Schnittpräparaten hoch und zweimal mittelmäßig.

### GfM-Mischmizellen/48h p.i.:

Tabelle 13: Fluoreszenz- und MRT-Signalstärke in Abhängigkeit des Plaquestadiums: obere Reihe Plaquestadien (PS) 0-6; Mittlere Reihe Fluoreszenzsignalintensität (FL-S); Untere Reihe MRT-Signalintensität (MRT-S) der zuvor untersuchten Aortenbogenteilstücke.

PS	0, n=0	1, n=0	2, n=0	3, n=1	4, n=2	5, n=0	6, n=9									
FL-SI				3	3	3		3	3	2	2	2	2	3	2	3
MRT-SI				3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3

Die Versuchsgruppe IV (GfM/48h) besaß atherosklerotische Veränderung, die den Stadien 3, 4 und 6 zugeordnet wurden.

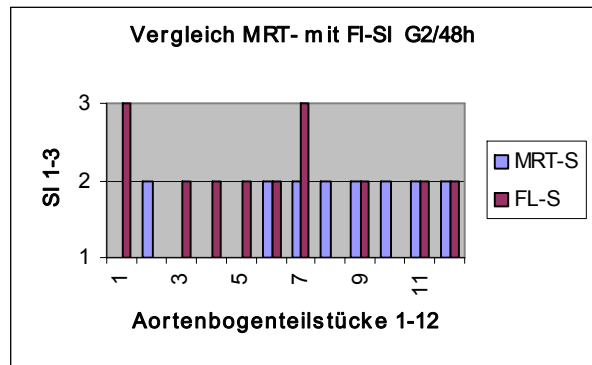
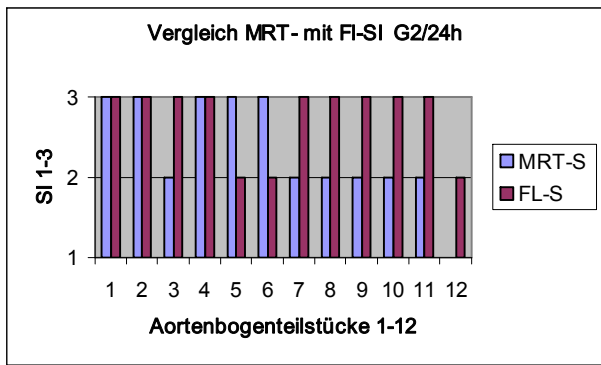
Atherosklerotische Veränderungen im **Stadium 3** wurden einmal beobachtet, das zugehörige Aortenbogenteilstück zeigte während einer MRT-Untersuchung eine hohe Signalintensität der Gefäßwand, auch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der zugehörigen Gefrierschnitte zeigten ein gutes Signal.

Die atherosklerotischen Veränderungen von zwei Aortenbogenteilstücken konnten histologisch dem **Stadium 4** zugeordnet werden. In beiden Fällen wurde das MRT-Signal und die Fluoreszenzsignalintensität der zugehörigen Kryoschnitte als hoch empfunden.

9 von 12 Aortenbogenteilstücke wurden in histologischen Untersuchungen dem **Stadium 6** zugeordnet: Das MRT-Signal erschien in allen Fällen sehr gut, die pathologisch veränderten Gefäßwände wurden sehr deutlich dargestellt. Auch die Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der zugehörigen Schnittpräparate zeigten ein überwiegend hohes Signal.

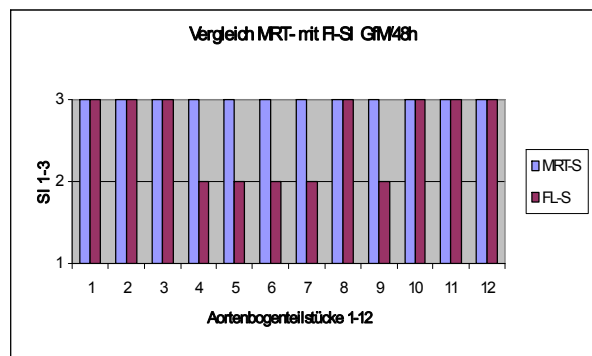
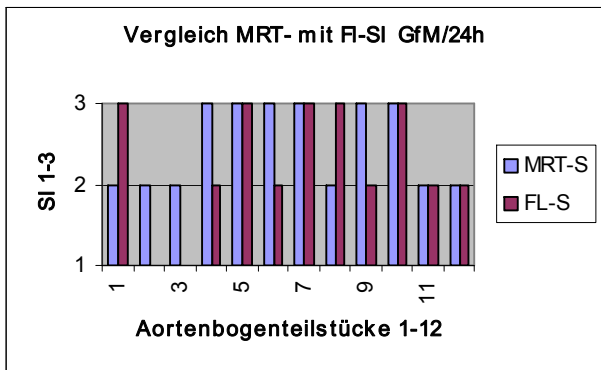
#### 3.3.2.2.5 Korrelation der MRT-und Fluoreszenz- Signalintensitäten

Die semiquantitative Codierung der MRT-Signalintensität und Fluoreszenzsignalintensität wurde auf einen möglichen Zusammenhang geprüft. In den Abbildungen 33 wurden die Bewertungen der Signalintensitäten aus MRT und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen jedes Aortenbogenteilstückes graphisch dargestellt. Hier zeigt sich bei Gadophrin-2 zum Zeitpunkt 24h p.i. und bei Gadofluorine-M zum Zeitpunkt 48h p.i. eine gute Korrelation zwischen MRT- und Fluoreszenzsignalintensität.



32a

32b



32c

32d

Abb. 32a-d: Vergleich MR- mit Fluoreszenzsignal oben links Gruppe 1; Oben rechts Gruppe 2; Unten links Gruppe 3; Unten rechts Gruppe 4

In den Abb. 32 wurde die MRT-Signalintensität gegen die Fluoreszenzsignalintensität aufgetragen. Mit einigen Ausreißern gruppieren sich die Werte annähernd um die Gerade (1:1-Korrelation), so dass von einer Korrelation ausgegangen werden kann. Bei Gadophrin-2 wurde insgesamt die Fluoreszenz stärker als das MRT-Signal bewertet, bei Gadofluorine-M verhielt es sich umgekehrt: Das MRT-Bild war signalintensiver als die Fluoreszenz der Schnittpräparate. Vermutlich ist die Fluoreszenz-Quantenausbeute von Gadophrin-2 besser als von Gadofluorine-M-Mischmizellen. Dagegen fällt die Relaxivity für Gadofluorine-M höher als für Gadophrin-2 aus. Diese beobachtete Tendenz wird auch durch die Abbildung 33 a (G2/24h) und d (GfM/48h) bestätigt.



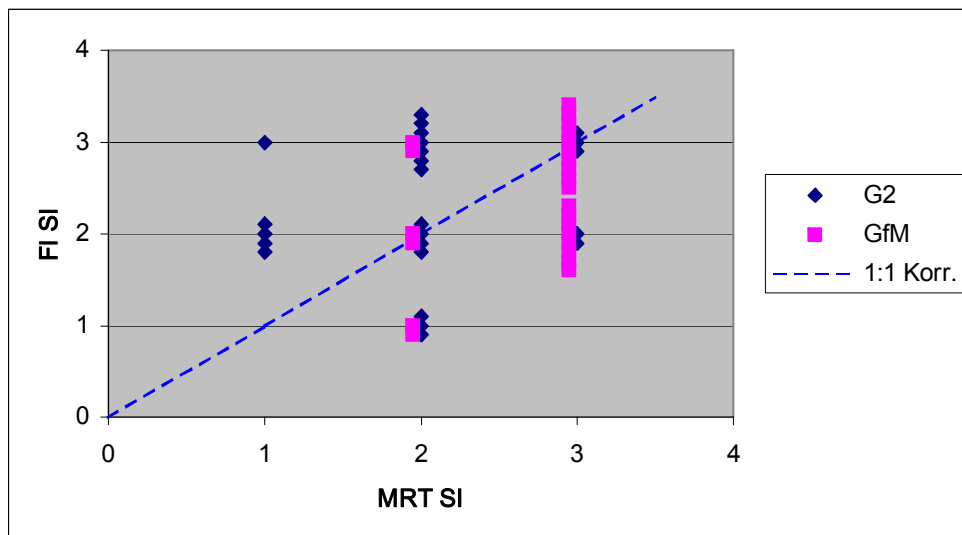


Abb. 33: Korrelation der Signalintensitäten: Fluoreszenz zur MRT.

### 3.3.2.2.6 Vergleich der Kontrastmittellokalisierungen

Zum Vergleich beider Kontrastmittel untereinander wurde die Häufigkeit der Kolo-kalisation von je drei Aortenschnitten je Tier für je 8 Tiere aufgetragen, einmal für MPS und einmal für Mf. Um einen Unterschied, bzw. Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Gadophrin-2 und Gadofluorine-M zu ermitteln, wurde ein Chi<sup>2</sup>-Test angewandt. Zunächst wurde die Anreicherung im zellreichen, CD14/68-positiven Kompartiment (MPS) vergleichend untersucht: Die Anzahl der vergebenen '+' in drei Untersuchungseinheiten ist bei Gadophrin-2 signifikant höher als bei Gadofluorine-M. Der Chi<sup>2</sup>-Test ergab ein Ergebnis von p=0,0175. Anschließend wurde die Anreicherung in der Mf vergleichend untersucht: Die Anzahl der vergebenen '+' unterschieden sich hier nicht signifikant. Gadofluorine-M zeigte eine unerwartet starke Anreicherung in der zellarmen, fettigen Matrix (Tabelle 14).

Tabelle 14: Lokalisation der Kontrastmittel im zellreichen, CD14/68-positiven Kompartiment (MPS) im Vergleich.

Kontrastmittel	Anzahl der vergebenen '+' je Tier				Total
	0	1	2	3	
MPS Gadophrin-2	0	1	2	5	8
MPS Gadofluorine-M	3	4	1	0	8
Mf Gadophrin-2	1	0	1	5	8
Mf Gadofluorine-M	0	0	0	8	8

### 3.3.3 Nachweis von Gadophrin-2, Gadofluorine-M und SHU 555C in Plaques nach in vitro-Applikation (Versuch 2)

Zur Untersuchung der Anreicherungsmechanismen der plaqueaffinen Kontrastmittel Gadophrin-2, Gadofluorine-M und SHU 555C, sowie zur Entwicklung eines möglichen In-vitro-Modells wurden Aortenringe von WHHL-Kaninchen in Kontrastmittelbädern für unterschiedliche Zeiträume in vitro getränkt und anschließend histologisch untersucht.

#### 3.3.3.1 Gadophrin-2

Gadophrin-2 konnte bereits nach 5 minütiger Inkubation der Aortenringe in Gadophrin-2-Lösung (siehe Abb. 35 a und b) im Plaque anhand seiner Fluoreszenz lokalisiert werden (3 von 4 Aortenringen). Mit Hilfe einer ÖlrotO-Färbung konnte zu allen Untersuchungszeitpunkten eine verstärkte Anreicherung in lipidreichen und zellarmen Plaquekompartimenten festgestellt werden. Innerhalb der Media konnte keine oder nur sehr wenig Fluoreszenz detektiert werden. Die Adventitia zeigte trotz unmittelbarem Kontakt mit dem Kontrastmittel keine nennenswerte Fluoreszenz. In gesunden Gefäßwandabschnitten wurde keine Fluoreszenz detektiert (siehe Abb. 34 a-f).

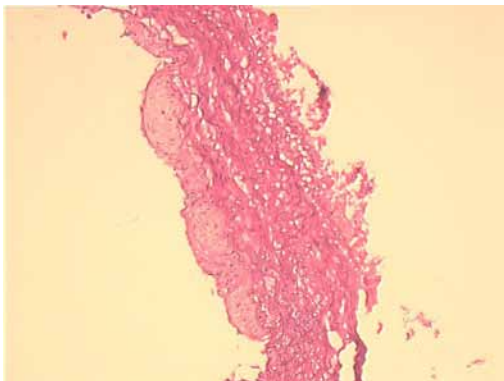


Abb. 34a: Plaque im Stadium 2, HE-Färbung, Objektiv 5-fach, Okular 10-fach

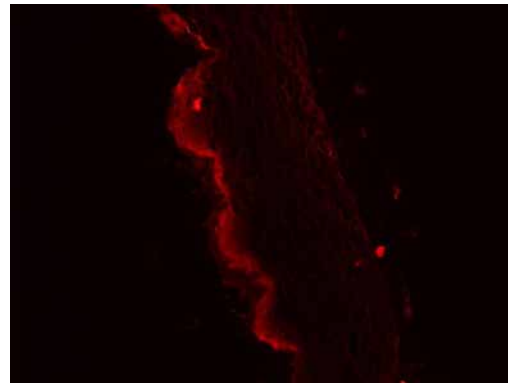


Abb.34b: Fluoreszenzmikroskopie des nativen Schnitts (li) nach 5 minütiger Inkubation in G2-Lösung,

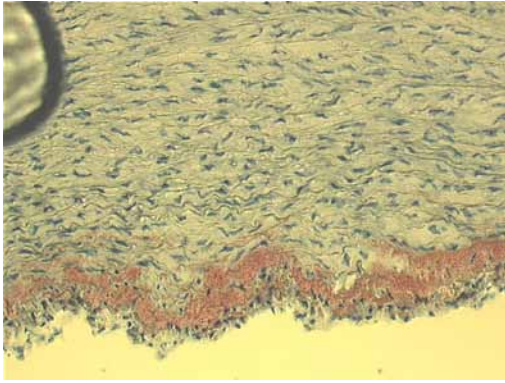


Abb. 34c: Plaque im Stadium 1, ÖlrotO-Färbung, Objektiv und Okular 10-fach.

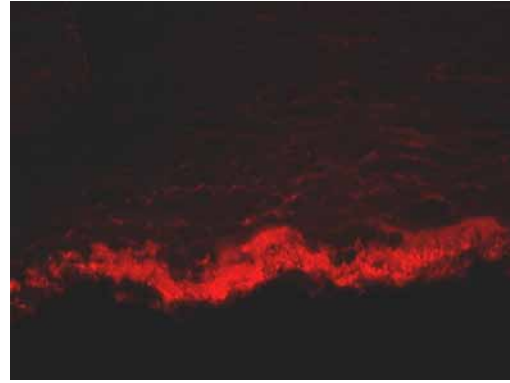


Abb. 34d: Fluoreszenzmikroskopie des nativen Schnitts (li) nach 15 minütiger Inkubation in G2-Lösung



Abb.34e: Plaque im Stadium 0 bis 6, HE-Färbung, Objektiv 2,5-fach, Okular 10-fach

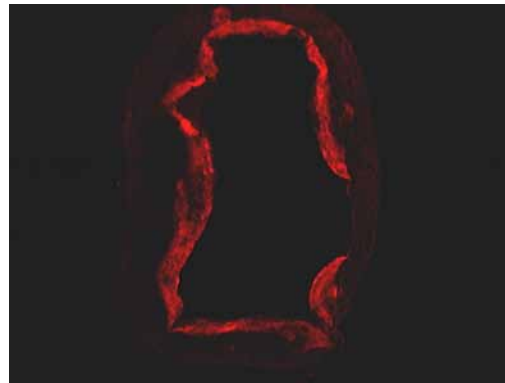


Abb.34f: Fluoreszenzmikroskopie des nativen Schnitts (li) nach 60 minütiger Inkubation mit G2

Abb. 34 a-f: Lokalisation von Gadophrin-2 nach In-vitro-Inkubation in Abhängigkeit der Zeit

### 3.3.3.2 Gadofluorine-M-Mischmizellen

Die Aortenringe wurden 5-120 min in Gadofluorine-M-Mischmizellen (2 mmol Gd/l NaCl) inkubiert. Bereits nach 5 min konnten sehr schmale fluoreszierende Kontrastmittel-Banden endothelial und subendothelial beobachtet werden (siehe Abb. 36 a bis f). Diese haben sich zwar mit der Zeit intensiviert, so dass die Fluoreszenz sich maximal im luminalen Drittel der Läsion befand.

Die Adventitia zeigte bis zu Inkubationszeiten von 30 min eine schwache Fluoreszenz, bei Inkubationszeiten von 60 oder 120 min eine deutliche Fluoreszenz.

In gesunden Gefäßwandabschnitten reicherte sich Gadofluorine-M zu keinem Zeitpunkt an (siehe Abb. 35 c und d).

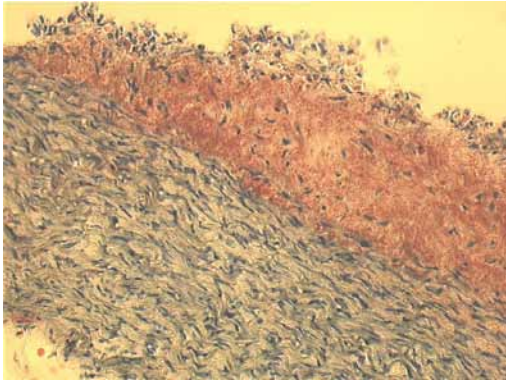


Abb. 35a: Plaque im Stadium 3; ÖlrotO-Färbung, Objektiv und Okular 10-fach

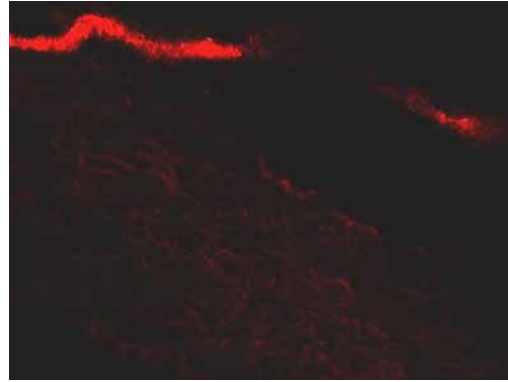


Abb. 35b: Fluoreszenzmikroskopie des nativen Schnitts (li) nach 15 minütiger Inkubation mit GfM



Abb. 35c: Plaque im Stadium 0 bis 2; ÖlrotO-Färbung, Objektiv 2,5-fach, Okular 10-fach

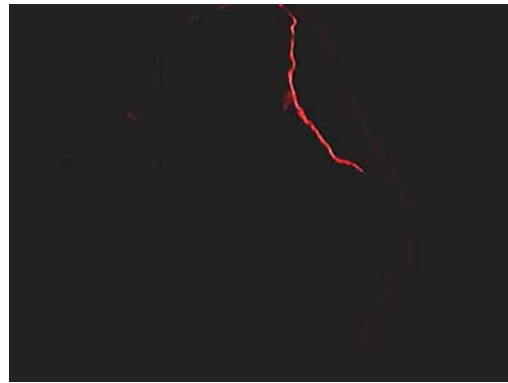


Abb. 35d: Fluoreszenzmikroskopie des nativen Schnitts (li) nach 60 minütiger Inkubation mit G2

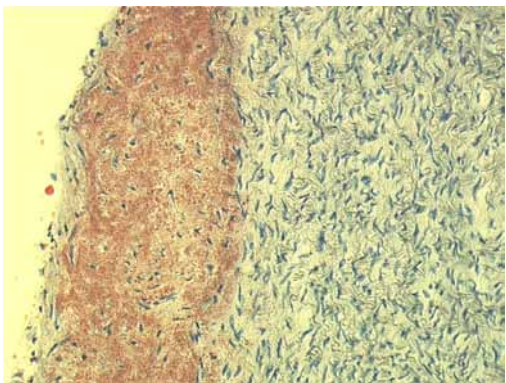


Abb. 35e: Plaque im Stadium 3; ÖlrotO-Färbung, Objektiv20-fach, Okular 10-fach

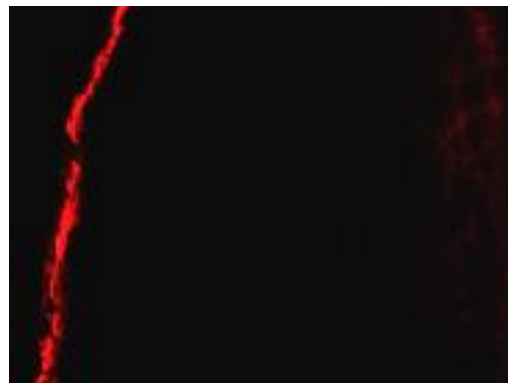


Abb. 35f: Fluoreszenzmikroskopie des nativen Schnitts (li) nach 120 minütiger Inkubation mit G2

Abb. 35 a-f: Lokalisation von Gadofluorine-M-Mischmizellen nach In-vitro-Inkubation in Abhängigkeit der Zeit

### 3.3.3.3 SHU 555 C

SHU 555 C besteht aus ultrakleinen Eisenoxidpartikeln (USPIO), die vorzugsweise von Zellen des MPS aufgenommen werden. Ihre histologische Lokalisation gelang mit Hilfe eines modifizierten Eisen-Nachweises nach Quincke. Die Aortenringe wurden 5 bis 120 min in SHU 555C (10 mmol Fe/l aqua injectionem) inkubiert. Die USPIOs konnten sich lediglich nach 30 bis 120 minütiger Inkubation intraendothelial (siehe Abb. 36b) anreichern. Generell konnte eine Lokalisation innerhalb der Adventitia ab 15 minütiger Inkubation beobachtet werden (siehe Abb. 37a). Eine Anreicherung in Plaques trat nicht auf.

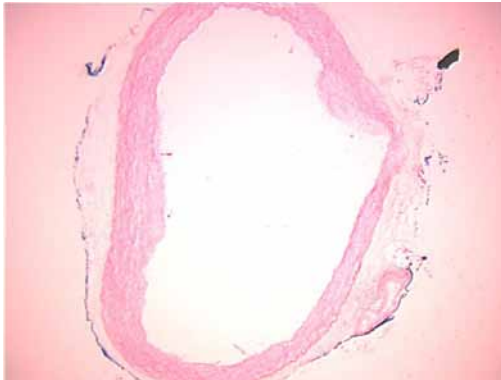


Abb. 36a: Plaques im Stadium 0 bis 2, Quincke-Färbung nach 15 minütiger Inkubation in SHU 555C, Objektiv 2,5-fach Okular 10-fach

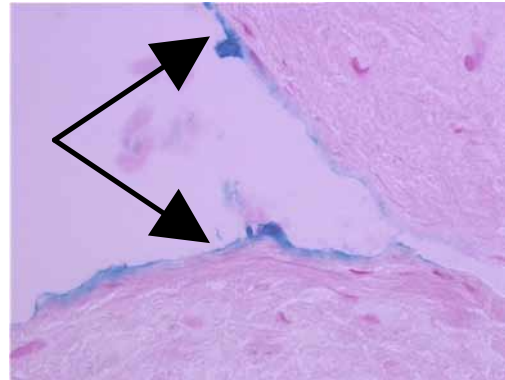


Abb. 36b: Plaque im Stadium 5, Quincke-Färbung nach 60 minütiger Inkubation in SHU 555C, Objektiv 20-fach Okular 10-fach

Abb. 36 a und b: Lokalisation von SHU 555C nach In-vitro-Inkubation in Abhängigkeit von Inkubationsdauer.