

Aus der Klinik für Radiologie und Neuroradiologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Olav Jansen)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Dynamische kontrastmittelverstärkte  
Magnetresonanztomographie im  
Xenotransplantationsmodell der Riesenzellarteriitis**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Karolina Syed, geb. Antosik  
aus Slawno

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marcus Both

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Assad Haneya

Tag der mündlichen Prüfung: 20. September 2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05. August 2021

gez.: Prof. Dr. Oula Penate Medina

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI

1. Einleitung .....	1
1.1 Riesenzellarteriitis .....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese .....	1
1.1.3 Arteriitis temporalis als Manifestation der Riesenzellarteriitis .....	1
1.1.4 Extrakranielle Großgefäßvaskulitis als Manifestation der RZA .....	2
1.1.5 Diagnostik und Therapie der Riesenzellarteriitis .....	2
1.1.6 Magnetresonanztomographie in der Diagnostik und Therapiekontrolle der Riesenzellarteriitis .....	3
1.2 Dynamische Kontrastmittelverstärkte MRT (DCE-MRT) .....	4
1.2.1 Funktionsprinzip der DCE-MRT .....	4
1.2.2 Kontrastmittel .....	5
1.2.3 Interpretation und Beurteilung der DCE-Bildgebungsdaten .....	6
1.2.4 Semiquantitative Methode .....	6
1.2.5 Modellbasierte quantitative Methode .....	7
1.3 Zielsetzung und Fragestellung .....	10
2. Methoden .....	12
2.1 Material .....	12
2.2 Tiere .....	12
2.3 Versuchsdurchführung .....	13
2.3.1 Versuchsabschnitt an pfp / Rag 2 /- Mäusen .....	13
2.3.1.1 Versuchstiere .....	13
2.3.1.2 Arteria temporalis Biopsie .....	13
2.3.1.3 Gefäßtransplantation .....	14
2.3.1.3.1 Narkose und Analgesie der Tiere .....	14
2.3.1.3.2 Ablauf der Transplantation .....	14
2.3.2 Magnetresonanztomographie .....	15
2.3.2.1 MRT-Gerät .....	15
2.3.2.2 MRT Messprotokoll .....	16

2.3.2.3 Datenakquise .....	17
2.3.2.3.1 Tiervorbereitung .....	17
2.3.2.3.2 In vivo - MRT Messung .....	17
2.3.2.3.3 Tötung der Tiere .....	18
2.3.2.4 Nachbearbeitung der Daten.....	18
2.4 Perfusionsanalyse .....	18
2.4.1 Festlegung der regions of interest (ROI) .....	19
2.4.2 Signalintensität-Zeit-Kurven .....	19
2.4.3 Semiquantitative Parameter .....	20
2.4.4 Quantitative Parameter .....	20
2.5 Histologische Untersuchung .....	22
2.5.1 Aufbereitung des Gewebes für Paraffinschnitte .....	22
2.5.2 Aufbereitung der Paraffinschnitte für immunhistochemische Färbung ....	22
2.5.3 Immunhistochemische Makrophagenfärbung mit Anti-CD 68 Antikörper .	23
2.5.4 Akquisition und Graduierung der histologischen Aufnahmen .....	23
2.6 Statistik .....	24
3. Ergebnisse .....	25
3.1 Ergebnisse des tierexperimentellen Versuchsabschnittes .....	25
3.1.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere .....	25
3.1.2 Ergebnisse der dynamischen Kontrastmittelverstärkten MRT .....	25
3.1.2.1 Semiquantitative DCE-MRT Parameter .....	26
3.1.2.2 Quantitative DCE-MRT Parameter .....	28
3.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchung .....	31
3.2.1 Immunhistochemische Makrophagenfärbung .....	31
4. Diskussion .....	34
4.1 Xenotransplantatmodell als in vivo Kleintier-Modell einer aktiven Riesenzellarteriitis .....	34
4.2 Kontrastmittelaufnahme als bildmorphologisches Korrelat einer Riesenzellarteriitis in einem Xenotransplantatmodell .....	36
4.3 Multiparametrische DCE - MRT zur Evaluation der Perfusion bei Riesenzellarteriitis und Korrelation der gewonnenen Informationen mit der Histologie.....	40
4.4 Nutzen des vorliegenden Modells für die präklinische Bildgebung .....	46
4.5 Technische und methodische Limitationen einer DCE - MRT Untersuchung in einem Mausmodell .....	48
5. Zusammenfassung .....	51
6. Literaturverzeichnis .....	53
7. Anhang .....	67

7.1 Tabellarische Darstellung der Materialien .....	67
7.2 Danksagung .....	71
7.3 Lebenslauf .....	72

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: MRT-Bildgebung der A. temporalis bei 4 Patienten entsprechend der Graduierung auf der Vierpunkteskala (Bild aus Bley et al. 2007).....	4
Abbildung 2: Semiquantitative Parameter aus den Signalintensitäts-Zeit-Kurven (Bild aus Dijkhoff et al. 2017). .....	7
Abbildung 3: Offenes Zwei-Kompartiment-Modell als Grundlage des deskriptiven pharmakokinetischen Modells nach Brix (eigene Graphik). .....	8
Abbildung 4: Graphische Darstellung des Versuchsvorhabens (eigene Graphik)....	15
Abbildung 5: Kleintier - MRT Anlage (eigene Fotos). .....	16
Abbildung 6: Positionierung einer ROI. ....	19
Abbildung 7: Farblich kodierte Signalintensität-Zeit-Kurven für den zuvor definierten ROI Bereich. ....	20
Abbildung 8: Intensität-Zeit-Verlauf im humanen Biopsat und Kurvenfit nach dem deskriptiven Modell nach Brix (eigene Darstellung). .....	21
Abbildung 9: Mirax Midi Gerät zum Digitalisieren der Objektträger (eigenes Foto)...	24
Abbildung 10: Darstellung der Signalintensität (y-Achse, arbitrary units) im Verhältnis zum Meßzeitpunkt (x-Achse, Sekunden) innerhalb des Biopsates (rote Kurve) und des Muskels (blaue Kurve). .....	26
Abbildung 11: Darstellung der Signalintensitäts-Zeitkurven innerhalb des Biopsates mit dem zugehörigen Kurvenfit und extrahierten pharmakokinetischen Parametern.....	29
Abbildung 12: CD68-Makrophagenfärbung der humanen Makrophagen; Zusammenstellung der ATo-Präparate (links, originelle Arterienbiopsien) und ihrer korrespondierenden AT-Präparate (rechts, nach 21 Tagen aus der Maus explantierte Arterien). .....	31

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: American College of Rheumatologie: Kriterien für die Diagnose der Arteriitis temporalis.....	2
Tabelle 2: Tiere .....	12
Tabelle 3: Allgemeine Empfehlung für die Flüssigkeitsapplikation bei einer Maus (nach GV-SOLAS / TVT 2010) .....	13
Tabelle 4: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (Tag 1) und am letzten Tag des Experiments (Tag 21).....	25
Tabelle 5: Chemikalien und Medizinprodukte.....	67
Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterial.....	68
Tabelle 7: Software .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

a.u.	arbitrary units
Aa.	Arterien
AIF	arterial input funktion
AION	anterioren ischämischen Optikusneuropathie
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Arteria temporalis
AUC	Area under the curve
BfArM	Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BKS	Blutkörperchenenkungsgeschwindigkeit
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DCE	Dynamic Contrast Enhanced
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
EULAR	European League Against Rheumatism
FDG-PET	Fluorodeoxyglucose-Positronenemissionstomographie
FFPE	in Formalin fixiert und Paraffin eingebettet
FKDS	farbkodierten Duplex-Sonografie
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglinin
GE	Gradienten Echo
HF	Hochfrequenz
i.v.	intravenös
IFN- γ	Interferon-γ
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin 2
IVC	individually ventilated cage
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
pfp	pore-forming protein perforin Gen
R1	T1- Relaxivität
R2	T2- Relaxivität
ROI	region of interest
RZA	Riesenzellarteriitis
SD	Standardabweichung
SE	Spin-Echo
SI	Signalintensität
T1w	T1 Wichtung
T2w	T2 Wichtung
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit

Präfixe für die üblichen Längen, Maß und Gewichtseinheiten:

c	Centi
Da	Dalton
g	Gramm
k	Kilo
l	Liter
m	Meter
m	Milli
M	Mol
n	Nano
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\mu$	Mikro

# **1. Einleitung**

## **1.1 Riesenzellarteriitis**

### **1.1.1 Definition und Epidemiologie**

Die Riesenzellarteriitis (RZA) wird als primäre Vaskulitis der großen und mittleren Arterien klassifiziert. Dabei handelt es sich um eine systemische, granulomatöse Vaskulitis, bei der Entzündungszellinfiltrate zu Gefäßwanddestruktionen mit Folge von Aortenaneurysmata und reaktiven Stenosen peripherer Arterien führen (Weyand et Goronzy 1999, Jennette et al. 2013).

Die RZA ist eine Erkrankung überwiegend älterer Menschen, die Häufigkeit nimmt nach dem 50. Lebensjahr kontinuierlich zu (Hunder 2002, Nordboerg et. Nordboerg 2003). Die Erkrankung ist mit einer Prävalenz zwischen 24-30 Fällen pro 100.000 Einwohner im Alter von über 50 Jahren in der deutschen Bevölkerung die häufigste primäre Vaskulitis (Reinhold-Keller et al. 2000).

### **1.1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Ätiopathogenetisch wird ein bisher noch unbekanntes Antigen vermutet, welches in der Gefäßwand die Invasion von T-Zellen und im Rahmen einer Immunreaktion die Freisetzung von Entzündungsmediatoren induziert. Dem folgt eine Migration und Differenzierung von Makrophagen mit Bildung der typischen mehrkernigen Riesenzellen und Formation von Granulomen (Ma-Krupa et al. 2005, Dejaco et Wagner 2010). Es kommt zu Destruktionen insbesondere der Membrana elastica interna. Die nachfolgenden Reparationsprozesse begünstigen die Intimahyperplasie, die gesteigerte Angiogenese und Fibrosierung der Intima bis hin zu Stenosen und Gefäßverschlüssen (Weyand et al. 1996, Weyand et Goronzy 2003, 2009).

### **1.1.3 Arteriitis temporalis als Manifestation der Riesenzellarteriitis**

Das klinische Bild einer RZA ist heterogen. Zu den typischen Manifestationen gehören plötzlich neu aufgetretene Kopfschmerzen, Palpationsschmerzen der Schläferarterien, Visuseinschränkungen und schmerzbedingte Kau einschränkungen. Diese Symptome erscheinen meistens bei einer Vaskulitis der Arteria carotis externa und ihrer kranialen Äste, insbesondere der A. temporalis superficialis (Brack et al.1999). Die im Jahr 1990 formulierten Diagnosekriterien beziehen sich fast ausschließlich auf die A. temporalis und lassen bei der Erfüllung 3 der 5 Kriterien die

Diagnose der Arteriitis temporalis gegenüber einer anderen Vaskulitis zu (Hunder et al. 1990).

**Tabelle 1: American College of Rheumatologie: Kriterien für die Diagnose der Arteriitis temporalis (nach Hunder et al. 1990).**

1. Alter bei Erkrankungsbeginn $\geq$ 50 Jahre
2. Neu aufgetretener Kopfschmerz typischer Lokalisation
3. Auffälliger Palpationsbefund der Arteria temporalis superficialis
4. Beschleunigung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS)
5. Positiver Biopsiebefund mit histologischem Nachweis der Riesenzellarteriitis

Die Augenbeteiligung gehört zum gefährlichen Notfall bei RZA und kann zu irreversiblen Visusverlusten führen (Gonzales-Gay et al. 2000, Rahman et Rahman 2005, Salvarani et al. 2002). Für den systematischen Charakter der Erkrankung sprechen bei über 50 % der Patienten auftretende konstitutionelle Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust.

#### **1.1.4 Extrakranielle Großgefäßvaskulitis als Manifestation der RZA**

Die extrakraniell manifestierte RZA bildet ein unterschiedliches Spektrum der Erkrankung an der Aorta und ihren Abgängen (Nuenninghoff et al. 2003, Crow et al. 2009). An der Aorta führt die Entzündungsreaktion zur Gefäßwanddestruktion. Das Risiko der Entwicklung eines thorakalen Aortenaneurysmas ist daher 17-fach höher bei Patienten mit RZA gegenüber der Allgemeinbevölkerung (Evans et al. 1995). Die Vaskulitis der armversorgenden Arterien betrifft am häufigsten die A. axillaris, A. subclavia und A. brachialis (Schmidt et al. 2008) und kann wie die seltene Manifestation an den Beinarterien zu einer symptomatischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit führen (Le Hello et al. 2001, Kermani et al. 2009).

#### **1.1.5 Diagnostik und Therapie der Riesenzellarteriitis**

Die Diagnose der RZA wird im Zusammenschau von klinischen Symptomen (s. Tab. 1), Laborbefunden, histologischem Befund und bildgebenden Verfahren gestellt. Ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) kommen bei fast allen Patienten vor (Salvarani et Hunder 2001).

Als Goldstandard der RZA-Diagnostik gilt die Biopsie der Arterie temporalis

superficialis. Die Biopsie soll mind. 0,5-1 cm Länge haben und erfolgt einseitig. Der histologische Nachweis eines Infiltrats mit mononukleären Zellen und mehrkernigen Riesenzellen gilt als beweisend für die Diagnose der RZA. Die Gefahr falsch negativer Befunde lässt sich durch einen für die RZA typischen segmentalen Gefäßbefall erklären (Weyand et Goronzy 2003).

Als bildgebende Verfahren haben sich die Farbduplexsonographie (FKDS), die Computertomographie (CT), die CT-Angiographie, die Fluorodeoxyglucose-Positronenemissionstomographie (18 FDG-PET) und die hochauflösenden Magnetresonanztomographie (MRT) etabliert (Tatò et Hoffmann 2008).

Empfehlungen in der Therapie der RZA wurden durch die European League Against Rheumatism (EULAR) und andere nationale Gesellschaften definiert. Glukokortikoide sind die erste Therapieoption und ein Notfallmedikament. Das rasche Ansprechen auf das Medikament äußert sich mit deutlicher Besserung der Beschwerden (mit Ausnahme der Visusbeeinträchtigung) und Senkung der laborchemischen Parameter (Mahr et al. 2007, Salvarani et al. 2008). Eine chirurgische oder endoluminale Intervention ist erforderlich bei Aortenaneurysmen und im Falle eines ausbleibenden Erfolges der medikamentösen Therapie auch bei symptomatischen Gefäßstenosen an Extremitäten- und Viszeralarterien (Both et al. 2006, Bongartz et Mattenson 2006, Wipfler-Freißmuth et al. 2020).

Laut EULAR-Empfehlung beinhaltet die Verlaufskontrolle der RZA die Erfassung von Symptomen, das Monitoring der Kortikosteroidnebenwirkungen, wiederholte Laboruntersuchungen und alle zwei Jahre Röntgenaufnahme des Thorax (Mukhtyar et al. 2009).

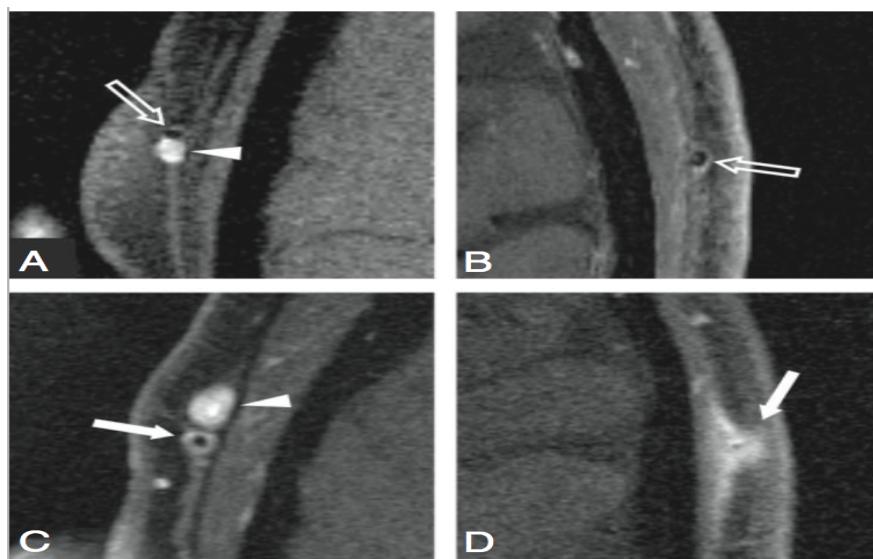
### **1.1.6 Magnetresonanztomographie in der Diagnostik und Therapiekontrolle der Riesenzellarteriitis**

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist für die Erstdiagnostik einer RZA ein etabliertes Verfahren, dessen Aussagekraft in einer multizentrischen Studie mit Sensitivität von 78,4% und Spezifität von 90,4% gezeigt wurde (Klink et al. 2014). Die MRT kann dabei die muralen Entzündungszeichen wie Wandverdickung und vermehrte Kontrastmittel-Aufnahme in der Gefäßwand darstellen. Die kraniale MRT zur Beurteilung der oberflächlichen Kopfarterien kann mit einer MR-Angiographie der Aorta und ihrer Äste kombiniert werden (Bley et al. 2005, Bley et al. 2009).

Mit T1-gewichteten Spin-Echo-Sequenzen kann die murale Kontrastmittel-

anreicherung der Arterienwand und ihre Wanddicke erfasst und anhand einer Vierpunkteskala gewertet werden (Bley et al. 2007).

**Abbildung 1: MRT-Bildgebung der A. temporalis bei 4 Patienten entsprechend der Graduierung auf der Vierpunkteskala (Bild aus Bley et al. 2007).**



Die Bilder A und B zeigen gesunde Arteria temporalis. In Fällen C und D liegt ein mit typischer Wandverdickung und starker Kontrastierung Riesenzellarteriitis vor (Pfeil). Der Pfeilkopf in A und C stellt eine durch den langsamen Blutfluss entstandene Kontrastierung des begleitenden Venenlumens dar.

Die MRT-Zeichen der Vaskulitis sind unter erfolgreicher Therapie in Korrelation zu Remission der serologischen und klinischen Befunde rückläufig (Bley et al. 2008).

## 1.2 Dynamische kontrastmittelverstärkte MRT (DCE-MRT)

### 1.2.1 Funktionsprinzip der DCE-MRT

Die DCE-MRT ist eine Technik, welche die Perfusion von Gewebe charakterisiert. Diese Methode beruht auf der dynamischen Erfassung von Bildern vor, während und nach der Verabreichung eines in der MRT-Bildgebung typischerweise Gadolinium-haltigen Kontrastmittels (KM). Das perfundierte Gewebe erscheint auf T1-gewichteten MR-Bildern mit höherer Signalintensität als vor Kontrastmittelgabe, und diese MR-Signalintensität korreliert mit der Konzentration des applizierten KM. Basierend auf einer repetitiven Bildakquisition lässt sich die zeitversetzte Signaländerung bei der Ankunft, Passage und beim Auswaschen von KM erfassen

und in Signalintensität-Zeit-Kurven darstellen. Der Verlauf der Kurve ist von Gewebeeigenschaften wie dem Gefäßdiameter, der Gefäßdichte, der Permeabilität und dem Volumen des extrazellulären, extravaskulären Raumes abhängig und erlaubt Rückschlüsse auf das zugrundeliegende Gewebe. Da in entzündlich verändertem Gewebe eine erhöhte Dichte an Kapillaren, eine gesteigerte Perfusion und verstärkte Extravasation durch Kapillarleckage vorliegen, kommt es zu einer beschleunigten Kontrastmittelanflutung und einer verstärkten Kontrastmittelanreicherung. Die gemessene Signalintensität kann also als Maß für die entzündliche Aktivität gewertet werden. Durch die Erfassung verschiedener Parameter ermöglicht die DCE-MRT die Darstellung, Charakterisierung und Quantifizierung der Hämodynamik (Tofts 1997, Ingrisch et Sourbron 2013).

### **1.2.2 Kontrastmittel**

Limitationen der nativen MRT in der Detektion und Charakterisierung von erkranktem Gewebe lassen sich mithilfe von Kontrastmitteln (KM) überwinden. Sie liefern deutlich besseren Bildkontrast und können für Perfusionsstudien genutzt werden.

Die niedermolekularen gadoliniumhaltigen Kontrastmittel z.B. Gd-DTPA (Gadopentetat-Dimeglumin) bestehen aus einem paramagnetischen Zentralatom und einem Komplexbildner (Reimer et Vosshenrich 2004). Während die Signalintensität der MR-Bilder durch den starken paramagnetischen Effekt des Gadoliniums bestimmt wird, hängen die pharmakokinetischen Eigenschaften von den Chelatbildnern ab. Diese Verbindungen werden den extrazellulären KM zugerechnet, da sie nicht von Zellen spezifisch aufgenommen werden. Nach i.v. Injektion und wenige Minuten dauernde Verteilung im Intravasalraum verteilen sie sich dosisunabhängig im extrazellulären Raum. Die Ausscheidung der Substanz erfolgt in unveränderter Form durch glomeruläre Filtration (Weinmann et al. 1984).

Für die hier vorgestellte Studie wurde das in Deutschland für klinische Untersuchungen zugelassene Standard-MRT-Kontrastmittel Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA) Magnograf® verwendet. Die Verbindung verteilt sich schnell im Extrazellulärraum, die Halbwertszeit beträgt bei Dosierung bis 0,25mmol/kgKg 90 Minuten, 24 Stunden post injektionem kann man 91% der ursprünglich verabreichten Menge im Urin wiederfinden (Jenapharm GmbH 2015).

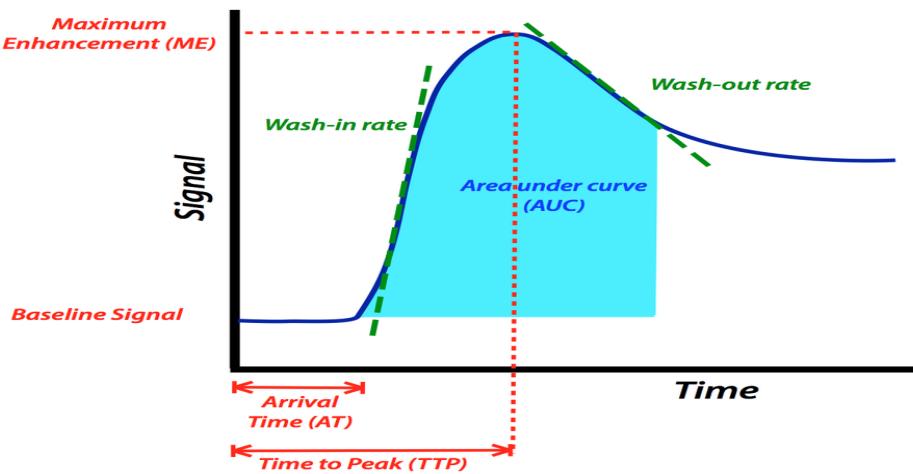
### **1.2.3 Interpretation und Beurteilung der DCE-Bildgebungsdaten**

Zur Bewertung der DCE-Bildgebungsdaten werden in der klinischen Radiologie neben der visuellen Einschätzung Signalintensität-Zeitkurven verwendet, welche die Anflutung und den Abstrom des Kontrastmittels repräsentieren. Eine typische Kurvenverlaufsform spiegelt dabei anatomische und physiologische Eigenschaften des untersuchten Gewebes sowie die Injektionsgeschwindigkeit, die Konzentration und die pharmakologischen Eigenschaften des Kontrastmittels wider. Der steile Anstieg der Kurve korreliert mit dem Blutfluss des Gewebes, und der Peak gibt den höchsten Kontrastmittelfluss an. Dem folgt ein KM-Leck in das Gewebeinterstitium, welcher durch eine Funktion der Kapillarfläche und Permeabilität charakterisiert ist. Der letzte Abschnitt der Kurve zeichnet den gesamten extrazellulären Raum im Gewebe und das interstitielle Plasmavolumen ab (Cuenod et Balvay 2013). Die Kontrastmittelaufnahme und die visuell geschätzte wash-in- / wash-out- Rate einer Läsion können Hinweise auf ihre Natur geben. Man kann zwischen folgenden Kurvenverlaufsformen unterscheiden: der „persistent increase“-Typ mit einem Signalintensitätsanstieg über die gesamte Untersuchungsdauer, der „plateau“- Typ mit stagnierender Intensität in der intermediären und späten Phase und der „decline after initial slope“-Typ mit einem frühen Intensitätsabfall in der intermediären und späten Untersuchungsphase. Die visuelle Analyse basiert auf einer rein subjektiven Bewertung eines erfahrenen Beobachters und liefert keine quantifizierbaren Daten (Khalifa et al. 2014).

### **1.2.4 Semiquantitative Methode**

Die semiquantitative Methode nutzt modellfreie empirische Parameter, die sich direkt aus den gemessenen Signalintensität-Zeitkurven ableiten lassen. Diese dynamischen Daten enthalten Informationen über Signalveränderungen, die durch Anflutungs- und Auswaschungsvorgänge eines applizierten Kontrastmittels im Zielgewebe begründet sind. Diese Parameter sind von äußeren Faktoren wie der arterial input function (AIF), Ort und Geschwindigkeit der Injektion und Herzfrequenz abhängig. Da diese Faktoren bei unterschiedlichen Messungen unterschiedlich sind, sind die modellfreien Parameter untereinander nur bedingt vergleichbar. Häufig verwendete Parameter sind in Abbildung 2 dargestellt.

**Abbildung 2: Semiquantitative Parameter aus den Signalintensitäts-Zeit-Kurven (Bild aus Dijkhoff et al. 2017).**



$T_A$ : Ankunftszeit zwischen Bolusinjektion des KM bis zum Auftreten des Kontrasts im Gewebe;  $T_P$  oder Time to peak (TTP): die Zeit bis zum Maximum der Signalsteigerung; wash-in slope:  $\Delta S/(T_P - T_A)$  maximale oder durchschnittliche Steigung im initialen Bereich der Kurve ; wash-out slope:  $S_{\max} - S_{\text{final}}/(T_{\max} - T_P)$  maximaler oder durchschnittlicher Abfall des Signals in der Auswaschphase; AUC: area under the curve Fläche unter der Signalintensitätskurve.

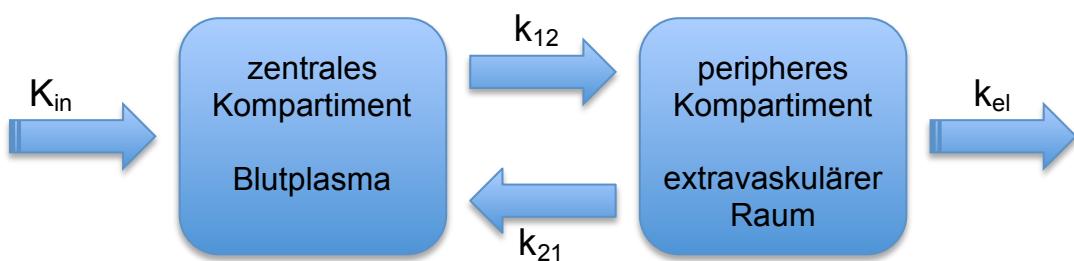
Die Perfusion eines Gewebes kann unter Verwendung oben genannten Datenpunkten aus der Signalintensität-Zeitkurve charakterisiert werden. Dies kann erreicht werden, indem die gesamte area under the curve und die durchschnittliche Signaländerung (sog. average Plateau) während der Gewebeverteilungsphase (wash out Phase) berechnet werden. Der Anstieg der relativen Signalintensität (SI) eines Bildpixels korreliert mit der Konzentration des Kontrastmittels im Gewebe. Des Weiteren können mit der modelfreien Methode keine physiologischen Informationen wie Gefäßpermeabilität oder Blutfluss ermittelt werden. Es besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen den kurvenbezogenen Messdaten und der zugrundeliegenden Physiologie des Gewebes (Dijkhoff et al. 2017, Khalifa et al. 2014).

### 1.2.5 Modellbasierte quantitative Methode

Das kinetische Zwei-Kompartiment-Modell von Brix (Brix et al. 1997) ist bei pharmakokinetischen Analysen der T1w DCE-MRT weit verbreitet und wurde unter anderem zur Detektion von Prostatatumoren (Kiessling et al. 2003), Mammatumoren

(Brix et al. 2004), Zervixkarzinomen (Hawighorst et al. 1997) und bei Knochenmarktumoren (Hawighorst et al. 1999, Moehler et al. 2001) verwendet. Das Modell beschreibt einen linearen Austausch des Kontrastmittels in beiden Richtungen zwischen einem zentralen intravaskulären Kompartiment und einem peripheren Kompartiment des extrazellulären, extravaskulären Raumes nach einer i.v. Infusion des KM. Das Brixmodell arbeitet mit einer konstanten KM-Abgabe über einen definierten Zeitraum, was die Bestimmung einer AIF überflüssig macht. Der Austauschprozess des KM zwischen den beiden Kompartimenten beschreiben die Konstante:  $k_{12}$  [1/min] und  $k_{21}$  [1/min] und die Elimination des KM aus dem zentralen Kompartiment wird durch die Transferkonstante  $k_{el}$  [1/min] definiert.

**Abbildung 3: Offenes Zwei-Kompartiment-Modell als Grundlage des deskriptiven pharmakokinetischen Modells nach Brix (eigene Graphik).**



Das Kontrastmittel wurde mit einer konstanten Rate  $K_{in}$  [g/min] intravenös in das zentrale Kompartiment verabreicht. Der extrazelluläre Raum des Gewebes ist durch die linearen Austauschprozesse in beiden Richtungen mit dem zentralen Kompartiment verbunden. Die Austauschkonstante  $k_{12}$  [1/min] und  $k_{21}$  [1/min] beschreiben den Transfer zwischen den beiden Kompartimenten; die  $k_{el}$  [1/min] beschreibt die Eliminierung des KM aus dem Blutplasma.

Ein linearer Zusammenhang zwischen der Relaxationsrate des kontrastmittelaufnehmenden Gewebes  $1/T_{1CM}$  und der KM-Konzentration im Gewebe  $C_T$  wird mit folgender Formel beschrieben:

$$\frac{1}{T_{1CM}} = \frac{1}{T_{10}} + \alpha C_T$$

$T_{1CM}$ : T1-Relaxationszeit des kontrastmittelaufnehmenden Gewebes;  $T_{10}$ : sog. native T1 Relaxationszeit des Gewebes vor der Injektion des KM;  $\alpha$ : spezifische Relaxationsrate des verwendeten Kontrastmittels, beträgt für Gd-DTPA in vitro  $4,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ;  $C_T$ : Kontrastmittelkonzentration

Unter Annahme, dass der KM sich nach der i.v. Infusion sofort mit dem Plasmavolumen vermischt und der Austausch zwischen Plasma und Gewebe in beiden Richtungen ungestört folgt, lassen sich die Änderungen der KM-Konzentration in den Kompartimenten ( $C_1$  im Blut und  $C_2$  im peripheren Kompartiment) mit folgenden Differentialgleichungen beschreiben:

$$C_1(t) = \frac{K_{in}}{V_1 k_{el}} (e^{k_{el}t'} - 1) e^{-k_{el}t}$$

$$C_2(t) = \frac{K_{in}}{V_1} \{a(e^{k_{el}t'} - 1)e^{-k_{el}t} - b(e^{k_{21}t'} - 1)e^{-k_{21}t}\}$$

$$a = \frac{k_{21}}{k_{el}(k_{21} - k_{el})}$$

$$b = \frac{1}{(k_{21} - k_{el})}$$

Unter der Annahme einer linearen Beziehung  $C_T = f_{ex}C_2$  zwischen der mittleren Gd-DTPA Gewebekonzentration  $C_T$  und der Gd-DTPA Konzentration  $C_2$  im extrazellulären Raum (Fraktion des extrazellulären Volumens  $f_{ex}$ ) lässt sich die relative Signalverstärkung  $S_{CM}(t)/S_0$  mit folgender Modellgleichung beschreiben:

$$\frac{S_{CM}(t)}{S_0} = 1 + \frac{A}{\tau} \{a(e^{k_{el}t'} - 1)e^{-k_{el}t} - b(e^{k_{21}t'} - 1)e^{-k_{21}t}\}$$

Diese Modellgleichung beschreibt also den Signalverlauf in Abhängigkeit der pharmakokinetischen Modellparameter, wobei  $S_{CM}(t)$  die Signalintensität nach der KM-Injektion und  $S_0$  die Signalintensität vor Injektion ist. Dabei ist die Amplitude A, die den Grad der MR-Signalverstärkung widerspiegelt, von den spezifischen Gewebeeigenschaften ( $T_{10}$ ,  $\alpha$ ,  $f_{ex}$ ), von gewählten Sequenzen (TR, TE) und der Infusionsrate  $K_{in}$  abhängig. Sie repräsentiert den Grad der Anreicherung und erlaubt damit die Bewertung des Plasmavolumens (Hoffmann et al. 1995).

Mit dieser Modellgleichung können aus den gemessenen Signalintensität-Zeit-Kurven weitere gewebespezifische Informationen als folgende pharmakokinetische Parameter extrahiert und analysiert werden:  $k_{21}$  [1/min] als gewebespezifischer Transportparameter, der die Geschwindigkeit des Signalanstiegs angibt und beides Perfusion und vaskuläre Permeabilität einer untersuchten Region charakterisiert und ein systemischer Parameter  $k_{el}$  [1/min], der als Eliminationsrate gilt und das Auswaschen von KM aus dem Gewebe angibt (Brix et al. 1991). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die modellbasierte Auswertung Rückschlüsse auf physiologische Parameter eines untersuchten Gewebes erlauben, die unabhängig von der individuellen Messung sind und die kinetische Antwort des Gewebes auf die intravenöse Infusion des paramagnetischen KM parametrisch darstellen.

### **1.3 Zielsetzung und Fragestellung**

Die MRT kann mit einer hohen räumlichen Auflösung und ausgezeichnetem Weichteilkontrast vaskulitische Entzündungszeichen wie Wandverdickung und vermehrte Kontrastmittelaufnahme der erkrankten Gefäßen präzise und unabhängig vom Untersucher darstellen. Es wird vermutet, dass die pathologische Kontrastmittelaufnahme inflammatorisch veränderter Gefäßwände durch eine entzündlich bedingte Neoangiogenese mit verstärkter Extravasation des Kontrastmittels mittels vaskulärer Leckage zustande kommt (Bley et al. 2005, Weyand et Goronzy 2013). In den EULAR- Empfehlungen wird die MRT neben der farbkodierten Duplex-Sonografie (FKDS) als Alternative zur invasiven histologischen Sicherung der Diagnose empfohlen (Dejaco et al. 2018). Kontrastmittelverstärkte dynamische Sequenzen wurden bisher nur kasuistisch bei Patienten mit einer Großgefäßvaskulitis angewandt (Hayashi et Kumazaki 1995).

Daher wäre erstrebenswert, derartige Methoden wissenschaftlich zu untersuchen und dann auch klinisch zu etablieren. Es ist inzwischen jedoch bekannt, dass die gadoliniumhaltigen Kontrastmittel bei Menschen zu unerwünschten Nebeneffekten wie einer zerebralen Ablagerung und einer nephrogenen systemischen Fibrose führen können (Kanda et al. 2014, Reiter et al. 2012, Nagel et al. 2016). Es ist deshalb sinnvoll, ein Tiermodell zu entwickeln, in dem das entzündliche Geschehen einer Riesenzellarteriitis reproduziert werden kann und mit dem dynamische kontrastverstärkte MRT-Protokolle vor der klinischen Anwendung am Menschen

evaluiert werden können. Dies wurde nach eigenem Wissen bis zum heutigen Zeitpunkt an der A. temporalis nicht durchgeführt. Mögliche Gründe dafür sind die geringe Größe des Gefäßes und technischen Anforderungen wie hohe räumliche und zeitliche Auflösung, die eine präzise Darstellung der Gefäßwand unter klinischen Bedingungen erschweren. Jedoch auch unabhängig von der klinischen Anwendung am Menschen könnte ein entsprechendes Tiermodell MRT-Studien beispielsweise zur Therapie-Kontrolle der Riesenzellarteriitis ermöglichen.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, in einem Kleintier-Modell die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Riesenzellarteriitis zu repräsentieren und diese mittels Perfusion durch einen Gadolinium-haltigen Kontrastmittel in vivo darzustellen und zu charakterisieren. In einem in vivo Xenotransplantationsmodell sollte ein humanes Biopsat der entzündeten A. temporalis nach subkutaner Implantation in eine immuninkompetente Maus einwachsen und Anschluss an die murine Mikrogefäßversorgung finden, analog zu einem ähnlichen, bereits von Wyand et al. etablierten Modell (Weyand et Goronzy 2003 a). Als Innovation bestand jetzt aber erstmalig die Intention, nach einer i.v. Applikation eines Gadolinium-haltigen Kontrastmittels die Perfusion im Xenotransplantat zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Ist es möglich, ein Xenotransplantatmodell der Riesenzellarteriitis als in vivo-Ansatz für Perfusionsstudien in der Vaskulitisbildung zu nutzen?
2. Bietet dieses Perfusionsmodell das Potenzial, in Zukunft dazu genutzt zu werden, um Therapieeffekte experimentell zu erforschen und zu optimieren?

## 2. Methoden

### 2.1 Material

Die verwendeten Chemikalien, Medizinprodukte, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind mit deren Bezugsquelle tabellarisch zusammengefasst und im Anhang zu finden. Alle weiteren nicht näher bezeichneten Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprachen dem üblichen Laborstandard.

### 2.2 Tiere

**Tabelle 2: Tiere**

Tiere	Bezugsquelle
10 pfp / Rag2 -/- Doppel Knock out Mäuse männlich weiblich (Taconic Modell PFPRAG-MM mit genetischem Hintergrund C57BL/6;129S6)	Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  (Taconic-Institut Quality Laboratory Animals and Services for Research, Taconic Europe, Denmark)

Die Versuche dieser Arbeit wurden an n=8 Doppel Knock out-Mäusen durchgeführt . Dabei handelt es sich um künstliche, nachgezüchtete Mutanten, die einen kombinierten genetischen Immundefekt aufweisen. Zum einen fehlt hier das „recombination activating gene 2“ (Rag2), das zusammen mit rag1 essentiell für die V(D)J-Rekombinase der Immunglobulinketten ist und eine Aplasie von T- und B-Zellen hervorruft. Zum anderen fehlt das „pore-forming protein perforin“ Gen (pfp), dem eine wichtige Rolle bei der Bildung der zytotoxischen T-Lymphozyten sowie der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zukommt.

## **2.3 Versuchsdurchführung**

Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz § 8a Abs. 1 und mit Genehmigung der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg (Tierversuchsantrag V 1307/591 - 00.33, Nr.30/12).

Es wurden *in vivo* Versuche an n=8 pfp / Rag 2 -/- Mäusen (2.2) durchgeführt.

### **2.3.1 Versuchsabschnitt an pfp / Rag 2 -/- Mäusen**

#### **2.3.1.1 Versuchstiere**

Alle Tiere hatten ein Alter zwischen 10 bis 14 Wochen und ein Gewicht im Bereich von 19g bis 34g. Die Tiere wurden vor und während der Experimente im zentralen Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Standardbedingungen (Raumtemperatur 21°C, relative Luftfeuchtigkeit 50 %, Hell-Dunkel-Wechsel alle 12 Stunden) in einem IVC Käfig pathogenfrei gehalten.

Die Tiere wurden täglich von ausgebildeten Tierpflegern versorgt. Die Fütterung erfolgte mit Alleinfutter für die Mauszucht und Sterilwasser.

Alle in dieser Studie gebrauchten Substanzen wurden nach Angabe der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS / TVT 2010 verabreicht.

**Tabelle 3: Allgemeine Empfehlung für die Flüssigkeitsapplikation bei einer Maus (nach GV-SOLAS / TVT 2010).**

s.c. ml/kg KGW	i.m. ml	i.p. ml/kg KGW	i.v. ml/kg KGW
10	0,03	10	5

#### **2.3.1.2 Arteria temporalis Biopsie**

Eine Biopsie der A. temporalis erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik unter dem Verdacht auf eine Riesenzellarteriitis in der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel. Vor dem Eingriff wurde eine ordnungsgemäße Aufklärung der Patienten durchgeführt; alle Patienten haben ihrer Teilnahme an dieser Studie schriftlich zugestimmt.

Die Probeentnahme der Schläfenarterie erfolgte in örtlicher Betäubung. Die Haut der Schläfe über der Arterie wurde eingeschnitten, das Gefäß freipräpariert und die

Arterie unterbunden. Daraufhin wurde ein Abschnitt von ca. 1cm herausgeschnitten und die Enden des Gefäßes ligiert. Am Ende des Eingriffs wurde die Haut wieder vernäht und ein Verband angelegt. Die Hälfte des entnommenen Arterienstückes wurde zwecks einer histologischen Untersuchung in das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck verschickt.

Das andere, ca. 5 mm lange Segment des Biopsates wurde unverzüglich nach der Entnahme in 5 ml RPMI Medium 1640 (mit L-Glutamine und Phenol Red Indicator) eingelegt und in einem sterilen Kunststoffrörchen bei Zimmertemperatur zwecks Implantation ins Tierlabor transportiert. Die Transportzeit lag bei ca. 1 Stunde.

### **2.3.1.3 Gefäßtransplantation**

#### **2.3.1.3.1 Narkose und Analgesie der Tiere**

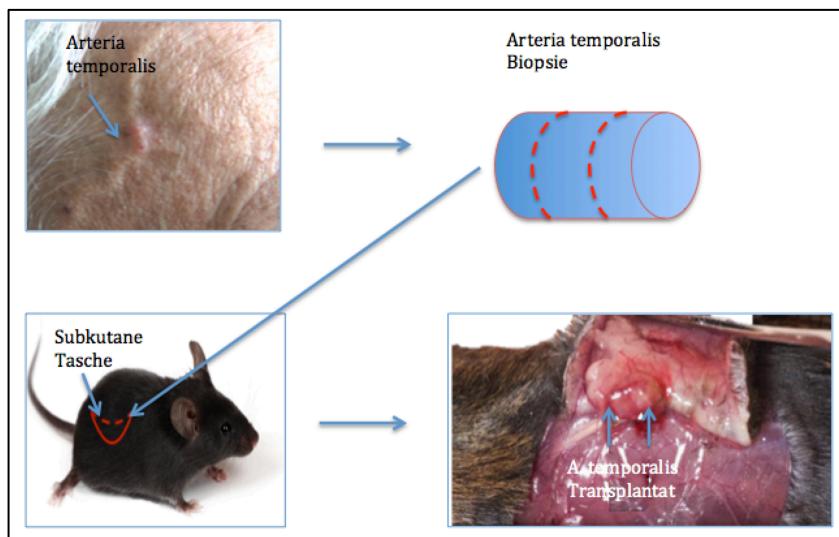
Vor der Narkose wurde ein aktuelles Gewicht der Tiere ermittelt. Um die Versuchstiere möglichst schonend und für eine relativ kurze Dauer von 25 Minuten zu narkotisieren, wurde eine Injektionsnarkose durchgeführt. Dafür wurde ein Gemisch aus Ketamin 100 mg/ml und Rompun 2% im Verhältnis 1,2 ml Ketamin und 0,8 ml Rompun und 8,0 ml 0,9% NaCl-Lösung in der Dosis 10 ml/kg KGW intraperitoneal appliziert. Die Tiefe der Narkose wurde anhand der Atemfrequenz und der Reaktion auf adäquate Schmerzreize beurteilt. Eine zusätzliche Verabreichung eines Analgetikums war nicht nötig, da der Ketamin Wirkstoff über eine lokale analgetische Wirkung verfügt (Klose et Hope 2002). Für die Injektion wurden Einmalspritzen und Kanülen verwendet.

#### **2.3.1.3.2 Ablauf der Transplantation**

Nach dem vollständigen Eintritt der Narkose und ihrer Kontrolle durch den Test des Zwischenzehenreflexes wurden die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen Augensalbe geschützt. Die Haut wurde an der Flanke über der hinteren Extremität mit einer Schermaschine rasiert und desinfiziert. Das Tier wurde in einer Bauchlage auf einer sterilen Unterlage positioniert. Mit einem Skalpell folgte ein Hautschnitt von ca. 8-10 mm und Präparieren einer subkutanen Tasche. Schließlich wurde das Biopsat in die Tasche gebracht und mit einer Pinzette leicht nach kranial vorgeschoben. Die Schnittränder wurden mit nicht resorbierbaren Hautklammern verschlossen.

Direkt nach Beendigung des Eingriffes wurde dem Tier zusätzlich als Schutz vor Austrocknung Flüssigkeitersatz in Form einer NaCl-Injektion 10ml/kg KG/h und als Schmerzmittel Carprofen 5mg/kg KG alle 24h s.c. in die aufgezogene Nackenfalte verabreicht. Das Tier wurde zum postoperativen Wärmen auf eine wassergefüllte Wärmematte gelegt, die an einem Umwälzthermostat angeschlossen war. In der sich anschließenden, 21-tägigen Einheilphase wurden die Tiere wie unter 2.3.1.1. beschrieben versorgt. Nach 7 Tagen erfolgte die Nahtentfernung.

**Abbildung 4: Graphische Darstellung des Versuchsvorhabens (eigene Graphik, eigene Fotos; Foto der Maus aus dem Seminar „Tierversuche in der Forschung“ unter Leitung von Dr. Haemisch, UKE Hamburg, 2012).**

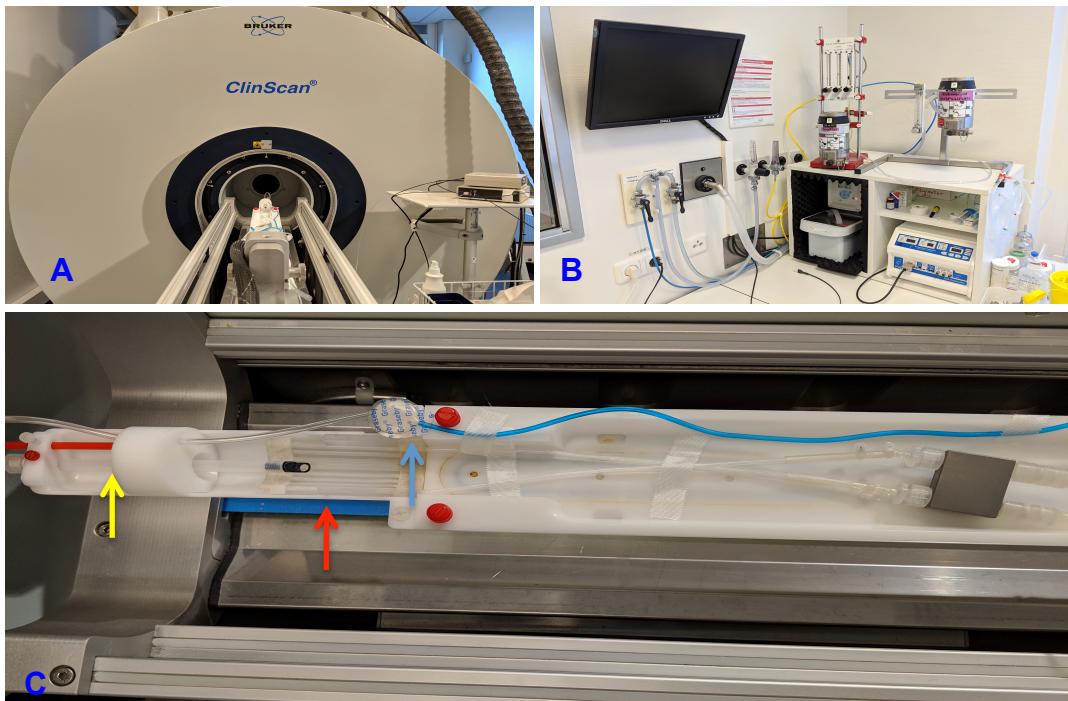


### 2.3.2 Magnetresonanztomographie

#### 2.3.2.1 MRT-Gerät

Die MRT-Untersuchung wurde mit ClinScan® (Bruker Biospin GmbH, Ettlingen) mit magnetischer Flussdichte von 7 Tesla in der Forschungsabteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie durchgeführt. Als Steuerungssoftware wurde syngo® MR B15 (Siemens healthcare, Erlangen) verwendet. Das System war mit wassergekühlten Gradientenspulen (maximale Gradientenstärke 630 mT/m) ausgerüstet. Als Sendespule wurde eine main transmission coil mit einem Außendurchmesser von 112 mm und einem Innendurchmesser von 86 mm genutzt. Zur Signalmessung wurde eine spezielle Oberflächenspule im „Single-Loop“ - Design für Kleintiere direkt über das Biopsat gelegt und am Körper mit einem Pflaster fixiert.

**Abbildung 5: Kleintier - MRT Anlage (eigene Fotos).**



A: Kleintier-MRT Scanner ClinScan®; B: 1,0-2,0% Isofluran/Luft-Anlage; C: MRT-Schlitten mit Wärmekissen (roter Pfeil), Nasenkegel mit Gaszufuhr (gelber Pfeil) und Small Animal Monitoring and Gating System (blauer Pfeil).

### 2.3.2.2 MRT Messprotokoll

#### a) Localizer

Eine Localizer Sequenz tfl\_loc wurde zur Erfassung der anatomischen Position des Arteria temporalis Biopsates und zur Planung der T1w-Sequenz verwendet.

#### b) Gd-DTPA-Serie

Um die Perfusion des Gd-DTPA-Kontrastmittels semiquantitativ und quantitativ auszuwerten, wurde die dynamische Kontrastmittelverstärkung mit einer Serie von zwischen 60 und 287 Aufnahmen im Abstand von jeweils 8,15 Sekunden erfasst. Hierfür wurden dynamische T1w-Gradienten-Echo-Sequenzen:

Dyn T1\_TR70Te mit TR (Repetitionszeit): 70ms, TE (Echozeit): 1,06ms, Schichtdicke: 0,7mm, FA (Flipwinkel): 20°, Matrix: 256 µm × 152 µm, FoV (field of view) %: 59,38 verwendet.

### **2.3.2.3 Datenakquise**

#### **2.3.2.3.1 Tiervorbereitung**

Nach Beendigung einer 21-tägigen Einheilphase wurden alle Tiere gewogen und wie folgt narkotisiert.

Die Tiere wurden in ein geeignetes Narkosegefäß gesetzt und ein 1,0 bis 2,0 % Isofluran/Luft-Gemisch des externen Isoflurandampfes wurde eingeleitet, bis Spontanbewegungen erloschen sind. Unter Kontrolle der Atmung wurde das Tier auf einer sterilen Unterlage bauchwärts positioniert. Nach der Kontrolle des Zwischenzehen-Reflexes und Anfeuchten der Augen mit Bepanthen® Augensalbe wurde der Schwanz des Tieres in einem Wasserbehälter bei 42°C zwecks Dilatation der Schwanzvenen erwärmt. Über der Abwärtsbiegung des Schwanzes wurde eine Einmalkanüle des zuvor vorbereiteten 80cm langen Katheterschlauches in die seitliche Schwanzvene vorgesoben und die Nadel mittels Hansaplast-Sprühpflaster® an der Stelle fixiert. Als Schutz vor Austrocknung wurde NaCl-Lösung in einer Dosis 10 ml/kg KG s.c. in die aufgezogene Nackenfalte injiziert. Das Tier wurde unmittelbar in ein entsprechendes Tierbett des MRT Geräts gebracht, über ein Drei-Punkt-Befestigungssystem (Zahnstange und Ohrenstöpsel) fixiert und über einen Nasenkegel für Gas der inneren Isoflurandampf-Anlage weiter anästhesiert. Hier war eine gute Narkosetiefe mit möglichst geringer Atemfrequenz notwendig, um Atemartefakte während der Messung zu vermeiden.

#### **2.3.2.3.2 In vivo - MRT Messung**

Während der MRT-Untersuchung wurde eine Elektrode des Small Animal Monitoring and Gating Systems am Rumpf der Maus mit einem Pflaster fixiert, um die biologischen Signale wie EKG und Atmung des Tieres während der Messung zu kontrollieren und gegebenenfalls anzupassen. Um die Körpertemperatur des Tieres während der Messung aufrecht zu erhalten, wurde das Tier mit einer temperaturgesteuerten Wärmedecke von 37°C zugedeckt.

Zuerst wurden Messungen mittels Localizer-Sequenzen und der Sequenzen vor der KM-Gabe durchgeführt.

Zum Nachweis einer Perfusion des humanen Biopsates wurde der Standard-Kontrastmittel Gd-DTPA Magnograf® 0,5 mmol/ml verabreicht.

Gd-DTPA Magnograf® wurde in einer Dosis von 0,15 mmol / kg KG i.v. über den Schwanzkatheter appliziert. Die Injektionszeit betrug hier eine Minute. Die zu

applizierende Kontrastmitteldosis pro Tier entsprach jeweils einem sehr kleinen Volumen von 5,9 $\mu$ l - bis 10,2 $\mu$ l und wurde im Verhältnis 1:10 in 0,9 % NaCl - Lösung verdünnt.

Ein MRT-Protokoll wie im Kapitel 2.3.2.2 beschrieben wurde für jedes Tier angewandt.

### **2.3.2.3.3 Tötung der Tiere**

Unmittelbar nach der letzten Messung wurden alle Tiere mit einer Überdosis Ketamin/Rompun-Gemisch (angesetzt wie unter 2.3.1.3.1.) von 15 bis 20 ml/kg KG i.p. in eine tiefe Narkose gelegt. Bei Reflexfreiheit der Hinterläufe wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt. Unter Verwendung eines Präparationsbesteckes wurde die Haut oberhalb des Biopsates eröffnet und das subkutan liegende Biopsat freipräpariert und entnommen. Die umliegenden Lymphknoten, die Milz und die Leber wurden explantiert und der histologischen Untersuchung zugeführt.

### **2.3.2.4 Nachbearbeitung der Daten**

Nach Beendigung der Bildakquisition lagen die erhobenen Primärdaten typischerweise vierdimensional (drei räumliche und eine zeitliche Dimension) in einem DICOM Format vor und wurden von der MRT-Konsole auf den Forschungsrechner mit integrierter Bild- und Datenverwaltungs-Software IMPAX 701 übertragen. Mit entsprechender Software konnten die Bilder primär durch einfaches Betrachten interpretiert werden, da die Areale mit erhöhter Perfusion gut abgegrenzt waren. Da jeder Bildpunkt in einem Zahlenwert kodiert ist, war die Berechnung der Perfusionsparameter in der Datennachverarbeitung möglich.

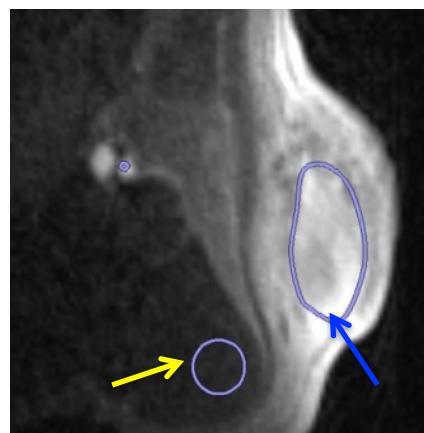
## **2.4 Perfusionsanalyse**

Die Perfusionsanalyse erfolgte region-of-interest (ROI)- basiert mit Erstellung von Zeit-Intensitätskurven und der Berechnung der semiquantitativen Parameter: upslop und area under the curve (AUC) und der quantitativen Parameter unter Anwendung eines pharmakokinetischen Modells nach Brix. Bei der Berechnung auf Basis einer ROI wurden die Signalintensitäten aller Bildpunkte der zuvor definierten Region für jeden einzelnen Zeitpunkt gemittelt, wodurch eine einzelne Signalintensität-Zeit-Kurve entsteht.

#### **2.4.1 Festlegung der regions of interest (ROI)**

Die computergestützte Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte unter Verwendung der MRT-Bilddatensätze der dynamischen Reihe, die zwischen 60 und 287 Einzelmessungen im Zeitabstand von 8,15 Sekunden beinhaltete. Für die semiquantitative Analyse wurde zuerst eine native Schicht vor der Kontrastierung aufgesucht, in der das Biopsat am besten zu sehen war. Eine gute Vergleichbarkeit der Anflutungsverhältnisse und eine vereinfachte Erkennung von Artefakten wurden ermöglicht, indem das umliegende Muskelgewebe als Referenzgewebe in die Analyse einbezogen wurden. Pro Versuchstier wurden zwei ROIs manuell gezeichnet: ROI über das Biopsat und ROI 1 über den benachbarten Muskel. Um Fehlmessungen zu vermeiden, wurde eine möglichst zentrale Lage in der zu untersuchenden, anatomischen Struktur gewählt mit Aussparung des Randbereichs. Die exakt eingezeichneten ROIs wurden in die übrigen Bilder derselben dynamischen Sequenz kopiert. Während der Datenanalyse wurde für die einzelnen ROIs ein Mittelwert der relativen Signalintensität (SI) für jeden einzelnen Zeitpunkt ermittelt, als Basis für die nachfolgend mitels Impax-Software erstellte Zeit-Intensitätskurve.

**Abbildung 6: Positionierung einer ROI. Das Biopsat ist mit blauem Pfeil, das Muskelgewebe mit gelbem Pfeil gekennzeichnet .**

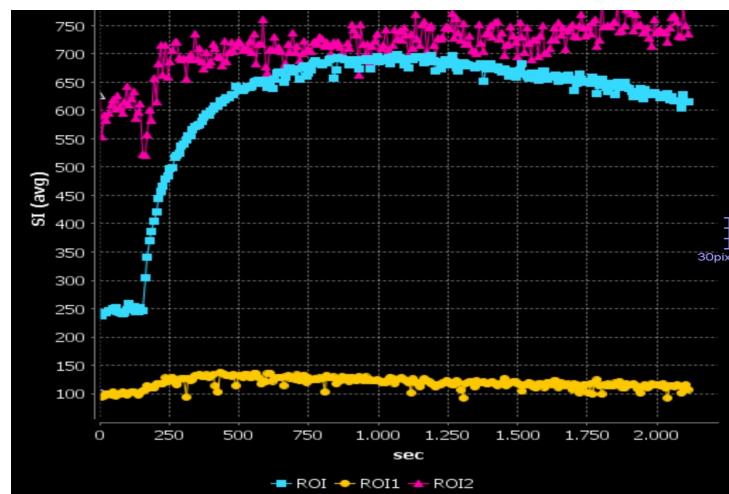


#### **2.4.2 Signalintensität-Zeit-Kurven**

Anschließend konnte das KM-Signal jeder ROI im zeitlichen Verlauf der dynamischen Reihe, welche mit der Kontrastmittelkonzentration korreliert und somit

ein Indikator der Gewebeperfusion ist, als farblich kodierte Signalintensität-Zeit-Kurve ausgedrückt werden.

**Abbildung 7: Farblich kodierte Signalintensität-Zeit-Kurven für den zuvor definierten ROI Bereich. Das Biopsat als blaue, das Muskelgewebe als gelbe und die A.iliac a als rote Kurve dargestellt.**



#### 2.4.3 Semiquantitative Parameter

Für die Perfusionsanalyse wurden folgende Parameter herangezogen:

upslope (wash-in slope) - als maximale Steigung während der frühen Kontrastmittel-Anflutungsphase; Für die Berechnung des upslope wurde eine lineare Regression mit 3 Punkten verwendet, die auf die ersten Sekunden der Zeitintensitätskurve angewendet wurde. Als Baseline wurde eine mittlere Signalintensität aus den Aufnahmen vor der Injektion des Kontrastmittels erfasst.

Area under the curve - als Fläche unter der Perfusionskurve, bestimmt anhand der Integralfunktion auf der Zeitintensitätskurve.

#### 2.4.4 Quantitative Parameter

Um gewebespezifische Informationen der Mikrozirkulation des KM als pharmakokinetische Parameter zu extrahieren, wurde ein Zwei-Kompartiment-Modell nach Brix mit der im Kapitel 1.2.3.2 beschriebenen Gleichungsabfolge eingesetzt. Hier wurden die gemessenen Signalintensitäten in Kontrastmittelkonzentrationen konvertiert und folgende pharmakokinetischen Parametern berechnet:

$k_{21}$  [1/min] - als gewebespezifischer Transportparameter, der die Geschwindigkeit der Signalveränderung angibt und Perfusion sowie vaskuläre Permeabilität einer untersuchten Region charakterisiert; Ein erhöhter Wert bedeutet hier eine große Durchlässigkeit der Gefäße für das Kontrastmittel.

$k_{el}$  [1/min] - als ein systemischer Parameter, der die Eliminationsrate repräsentiert und zur Bewertung der späten Post-Kontrast-Phase genutzt wird;

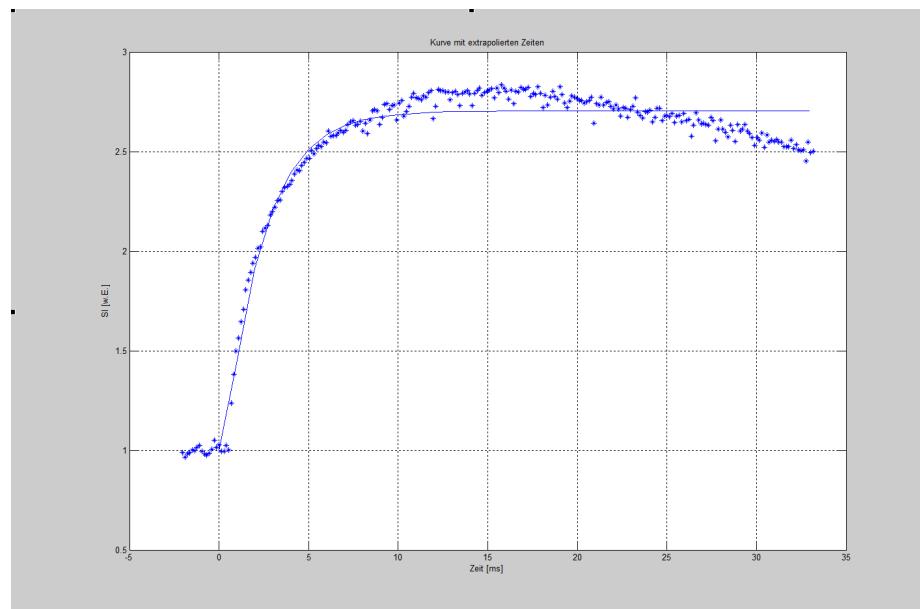
$A$  [a.u.] - die Amplitude, die den Grad der relativen Kontrastverstärkung (Anreicherung) angibt.

Des Weiteren musste die Modellgleichung mit den Parametern  $A$ ,  $k_{21}$  und  $k_{el}$  mittels Levenberg-Marquardt Fit-Algorithmus an den relativen Intensitätsanstieg in den gemessenen Signalintensität-Zeit-Kurven angepasst werden.

In Abbildung 8 ist als Beispiel eine Signalintensitäts-Zeit-Kurve mit gemessenen Datenpunkten und ein zugehöriges Fittingsergebnis als durchgehende Linie dargestellt.

**Abbildung 8: Intensität-Zeit-Verlauf im humanen Biopsat und Kurvenfit nach dem deskriptiven Modell nach Brix. Tabellarisch dargestellte extrahierte pharmakokinetische Parameter (eigene Darstellung).**

Datensatz	Tau [min]	A [a.u.]	K21 [1/min]	Kel [1/min]
AT6	3.5	2.8123	2.8911	0.4716



Oben dargestellt ist ein Verlauf eines Voxels aus dem humanen Biopsatgewebe. Diese Zeitserie enthält 260 Frames mit einer Zeitauflösung von 8,15 Sekunden und

einer Infusionsdauer von 1 Minute. Durch die gleichzeitige Betrachtung der Parameter A,  $k_{21}$  und  $k_{el}$  bekommt man einen vollständigen Eindruck der Dynamik des Kontrastmittels. Der Parameter Tau [min] steht für geschätzte Anflutungszeit im Biopsat selbst und wurde nicht näher betrachtet.

## 2.5 Histologische Untersuchung

### 2.5.1 Aufbereitung des Gewebes für Paraffinschnitte

Das entnommene Gewebe wurde mit Kochsalzlösung gespült und für die Histologie zur Fixation in 3,7 % phosphatgepufferter Formalinlösung in die Einbettkassette gelegt. Nach 18 Stunden wurde es in einer Reihe von Lösungen mit 50-, 70- und 90 % - 2-Propanolgehalt dehydriert und zur dauerhaften Fixierung mit flüssigem Paraffin Paraplast® Plus 56°C infiltriert. Dies erfolgte automatisch unter Verwendung eines Gewebeeinbettautomaten LEICA TP 1020.

Von dem FFPE-Gewebe (in Formalin fixiert und Paraffin eingebettet) wurden mittels eines Rotationsmikrotoms mehrere 5µm Dicke Querschnitte im Abstand von jeweils ca. 350µm angefertigt, auf Objekträger aufgebracht und anschließend 1 Stunde im Brutschrank bei 60 °C inkubiert.

Es wurde jeweils eine immunhistochemische Makrophagenfärbung durchgeführt.

### 2.5.2 Aufbereitung der Paraffinschnitte für immunhistochemische Färbung

Vor dem eigentlichen Färbeprotokoll musste eine Deparaffinisierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte stattfinden, um das Gewebe für die hydrophilen Reagenzien aufnahmefähig zu machen. Eine hitzeinduzierte Demaskierung des Antigens ist erforderlich, da es während der Fixierung zu Bildung von sogenannten „crosslinks“ (Konformationsänderungen) kommt, die zur Verdeckung antigener Strukturen führen. Um Hintergrundfärbungen zu verhindern, wurde ein Peroxidaseblock durchgeführt. Um die unspezifischen Bindungsstellen der Antigene zu blockieren, wurden die Proben in einem Blockiermedium inkubiert.

Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Entparaffinisierung und Rehydrierung: 2 × Xylol je 10 Minuten, 1 × Xylol/Ethanol, 2 × Ethanol 100%, 2 × Ethanol 96%, 1 × Ethanol 70%, mehrmalige Aqua dest. - Spülung
2. Antigen-Demaskierung: 3 Minuten mit Citratpuffer pH 6,0 im Drucktopf bei 40°

- kochen, 20 Minuten Abkühlung, Aqua dest. Spülung, 3 × 2 Minuten TBS-Waschung
3. Peroxidaseblock: 15 Minuten Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBS-Waschung 2 × 2 Minuten in Küvette
  4. Blockiermedium-Inkubation: 45 Minuten mit fettfreiem Milchpulver und Ak Diluent, 2 × kurz mit TBS waschen

### **2.5.3 Immunhistochemische Makrophagenfärbung mit Anti-CD 68 Antikörper**

Um die Entzündungsaktivität der transplantierten A. temporalis zu bestimmen und die Persistenz von humanen Gefäßwand-Makrophagen nachzuweisen, wurde eine Makrophagenfärbung mit anti-CD 68 Antikörper durchgeführt.

Hierfür wurde ein monoklonaler, aus dem Kaninchen stammender und gegen humane Makrophagen gerichteter anti-CD68-Antikörper (Abnova Corporation, Clone SP 251, MAB 12199) in Verdünnung 1:2000 verwendet.

Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen mit Rabbit IgG (Biocare medical, NC495 AA) mitgeführt. Die unten aufgeführten eigentlichen Färbeschritte folgen dem Protokoll, wie in 2.5.2 beschrieben:

1. Primäre Antikörper-Inkubation: 60 Minuten mit Anti-CD 68 Antikörper Abnova in Verdünnung 1:2000 in Antibody Diluent
2. Abspülen mit TBS: 5 Minuten in Küvette × 3
3. Sekundäre Antikörper-Inkubation: 30 Minuten mit Antikörper HRP-Polymer anti-Rabbit Zytomed
4. Abspülen mit TBS: 5 Minuten in Küvette × 3
5. Substrat-Inkubation: 10 Minuten bei Raumtemperatur mit AEC Substratsystem, Aqua dest. Spülung
6. Gegenfärbung mit Hämalaun: 4 Minuten Hämalaun-Infiltration, Aqua dest. Spülung
7. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe/Xylol
8. Eindecken mit Pertex™

### **2.5.4 Akquisition und Graduierung der histologischen Aufnahmen**

Zum Digitalisieren der Objektträger wurde das Mirax Midi (Fa. Carl Zeiss, Jena) Gerät aus dem Institut für Anatomie II des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf genutzt.

**Abbildung 9: Mirax Midi Gerät zum Digitalisieren der Objektträger (eigenes Foto).**



Nach der Auswahl zwischen einem manuellen und automatischen Modul, wurden mit Hilfe der Werkzeugleiste unterschiedliche Scanoptionen und Einstellungen der zu scannenden Regionen vorgenommen, Artefakte und Kanten von Deckgläsern entfernt und Bereiche mit schwachem Kontrast markiert. Die digitalisierten Bilddaten wurden dann mittels der Panoramic Viewer® 1.15.4 Software betrachtet und analysiert.

Das Ausmaß der Makrophagen- Färbung wurde visuell semiquantitativ graduiert als:

- 0= nicht vorhanden
- 1= gering ausgeprägt
- 2= moderat ausgeprägt
- 3= stark ausgeprägt.

## 2.6 Statistik

Die semiquantitativen Daten (AUC und upslope) wurden mit dem Mittelwert ( $M$ ) und mit der Standardabweichung ( $SD$ ) für alle Biopsatregionen und Muskel als Referenzgewebe beschrieben. Die quantitativen Daten ( $A$ ,  $k_{21}$  und  $k_{el}$ ) wurden für jedes Biopsat separat berechnet, die Mittelwerte und Standardabweichung wurden ermittelt und in Abhängigkeit voneinander betrachtet. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm MATLAB® (MathWorks, Natick, USA). Aufgrund der geringen Gruppenstärke wurde auf die Anwendung statistischer Testverfahren verzichtet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse des tierexperimentellen Versuchsabschnittes**

##### **3.1.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere**

Für den tierexperimentellen Versuchsabschnitt wurden insgesamt 8 pfp / Rag2 Doppel Knock out Mäuse eingesetzt. Diese wurden zu Versuchsbeginn mit einem Gewicht zwischen 19g und 34g bezogen. Am Tag 21 nach der Biopsat-Implantation lag das Gewicht der Tiere zwischen 19,7g und 34g. Die durchschnittliche prozentuelle Gewichtszunahme lag demnach bei 2 %.

**Tabelle 4: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (Tag 1) und am letzten Tag des Experiments (Tag 21).**

<b>Tier-Nr.</b>	<b>Gewicht Tag 1</b>	<b>Gewicht Tag 21</b>
AT 54004	22	23
AT 5743	22	22,7
AT 6142	22	22,5
AT 7677	19	19,7
AT 7529	21,3	22
AT 8294	34	34
AT 8579	22	23
AT 8578	24	24
durch. Gewicht in gramm	23,29 = 100%	23,86 = 102%

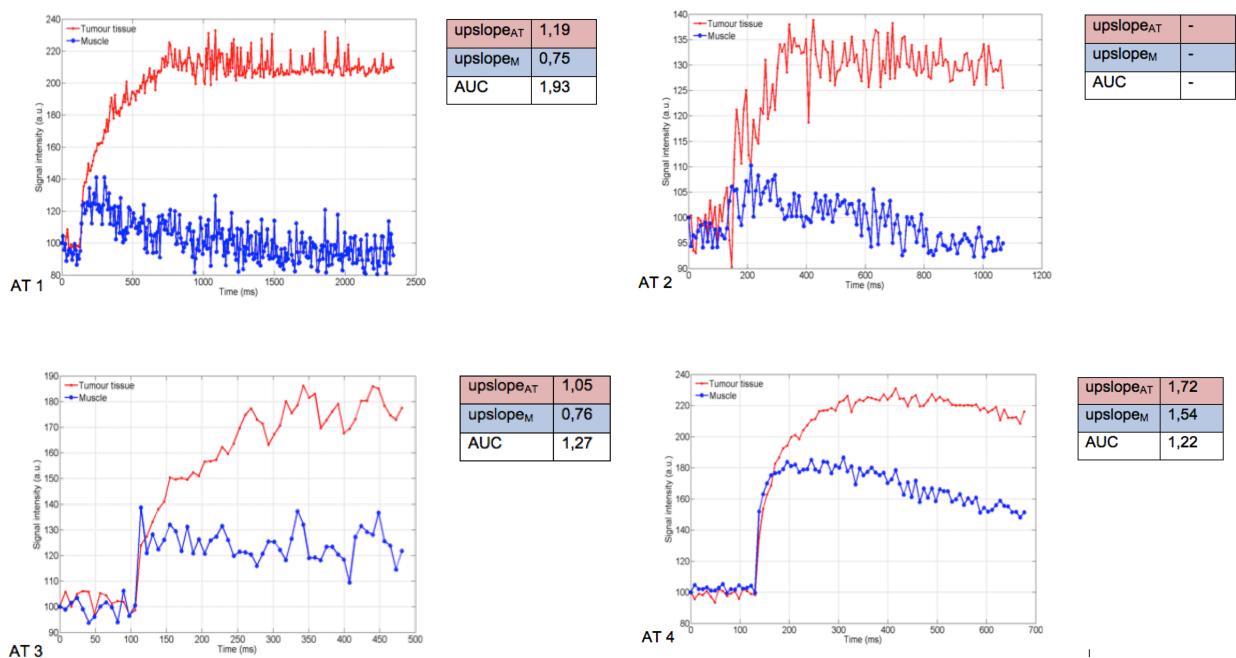
##### **3.1.2 Ergebnisse der dynamischen kontrastmittelverstärkten MRT**

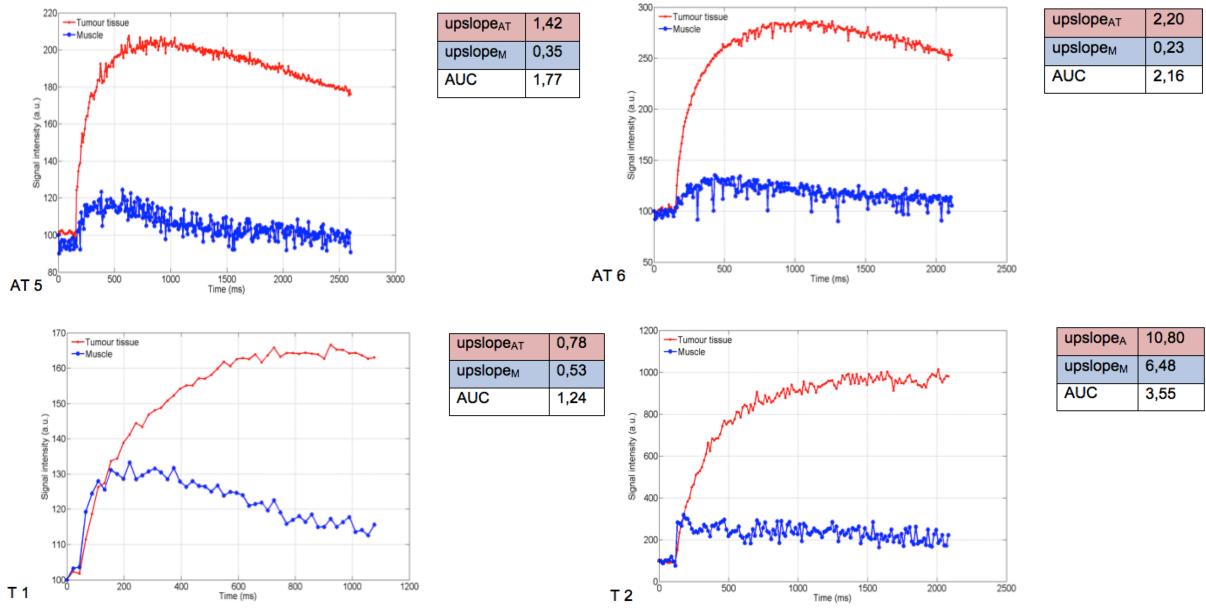
Die Kontrastmittelperfusion wurde bei allen 8 Versuchstieren erfolgreich durchgeführt und gut toleriert. 7/8 Untersuchungen der dynamischen Reihen zeigten eine für die Analyse suffiziente Bildqualität, d.h. relevante Suszeptibilitätsartefakte oder limitierende Bewegungsartefakte waren bei optimaler Sedierung und gleichmäßigeren Atemexkursionen hier nicht aufgetreten.

### 3.1.2.1 Semiquantitative DCE-MRT Parameter

Für n=6 humane A. temporalis-Biopsate (AT1 - AT6), sowie für n=2 native, aus dem Schwein stammende Gefäßtransplantate (T1, T2), wurden Signalintensität-Zeit-Kurven erstellt und daraus die Parameter upslope und area under the curve (AUC) abgeleitet. In einem Fall (Datensatz AT2) war die Auswertung der Parameter durch Rauschen in den Datensätzen nicht möglich, ursächlich war offenbar eine geringe Bewegung des Versuchstieres. Als Kontrollmessung wurden Intensität-Zeit-Verläufe aus dem benachbarten murinen Muskelgewebe erstellt.

**Abbildung 10:** Darstellung der Signalintensität (y-Achse, arbitrary units) im Verhältnis zum Meßzeitpunkt (x-Achse, Sekunden) innerhalb des Biopsates (rote Kurve) und des Muskels (blaue Kurve). AT1 - AT6 primär entzündliche humane Biopsate der A. temporalis; T1 und T2 Kontrollarterie (A. carotis) aus dem Schwein.





Jede Kurve spiegelt die nachweisbaren Änderungen des empfangenen MRT-Signals als Funktion der Zeit, innerhalb der zuvor definierten ROI, kurz vor der Kontrastmittelapplikation, während der Anflutungsphase (wash-in) und in der Spätphase wider.

Als Resultat ergab sich für upslope in den primär entzündlichen humanen Arterien ( $n=5$ ) ein Mittelwert von  $M = 1,5$  ( $SD = 0,5$ ) und in den gesunden Schweinearterien ( $n=2$ ) ein Mittelwert von  $M = 5,8$  ( $SD = 7,1$ ). Im Vergleich dazu lag der upslope Mittelwert im angrenzenden murinen Muskelgewebe bei  $M = 0,7$  ( $SD = 0,5$ ) bei Tieren mit humanen Arterien und bei  $M = 3,5$  ( $SD = 4,2$ ) bei Tieren mit porkinen Arterien.

Der Mittelwert für AUC lag bei  $M = 1,7$  ( $SD = 0,4$ ) für die humanen Gefäße und bei  $M = 2,4$  ( $SD = 1,6$ ) für die Schweinearterien.

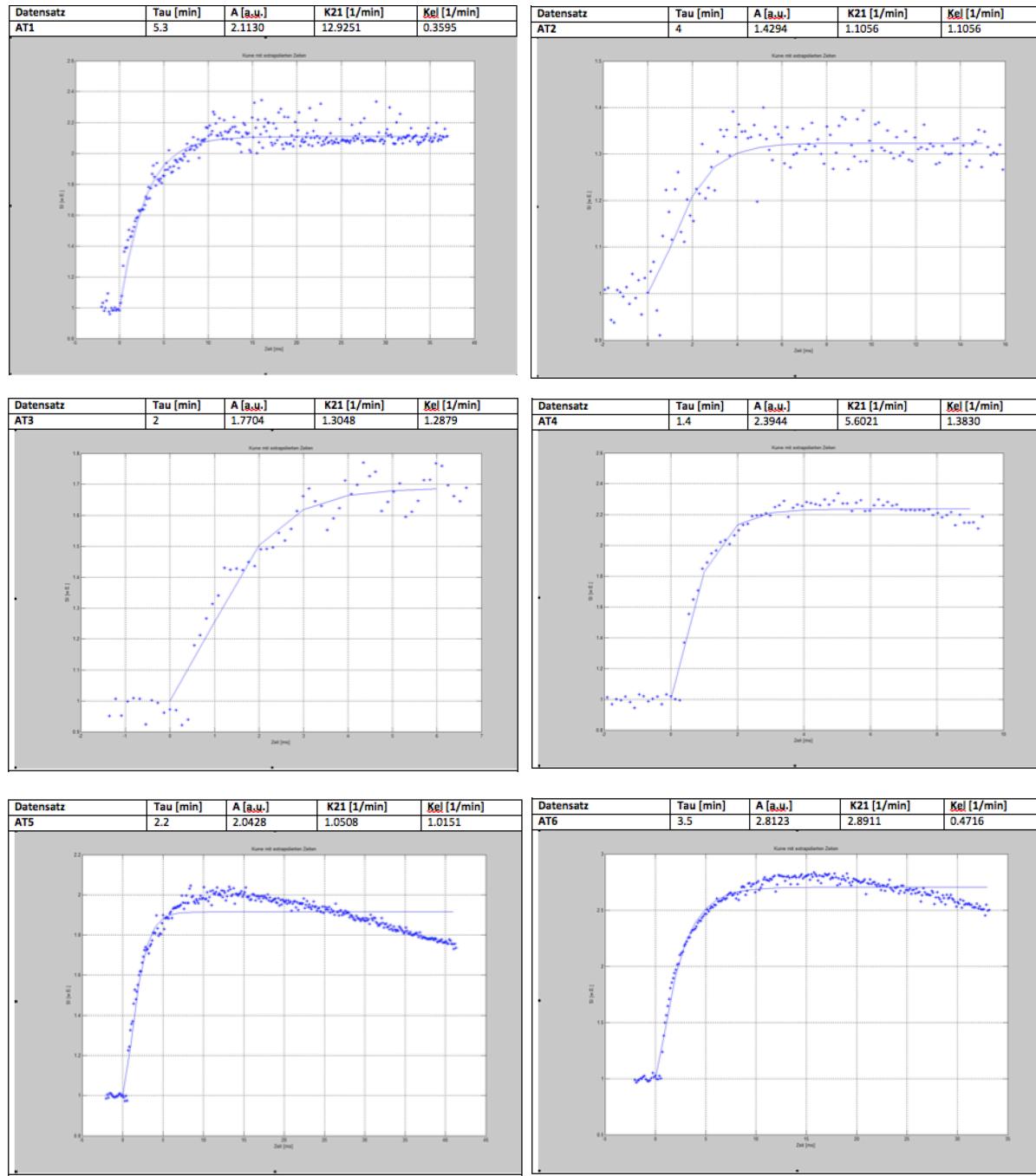
Als Fazit lässt sich sagen, dass sämtliche Biopsate eingewachsen waren und eine markante Perfusion aufwiesen, die jeweils sogar noch ausgeprägter war als das murine Muskelgewebe. Da in dieser Serie nur zwei Schweinearterien als Kontrollpräparate vorlagen, lässt sich aus den vorliegenden Werten allerdings nicht statistisch definieren, ob signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Arterien vorlagen.

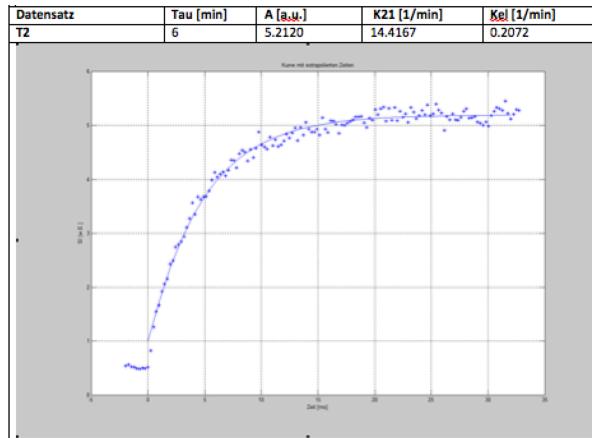
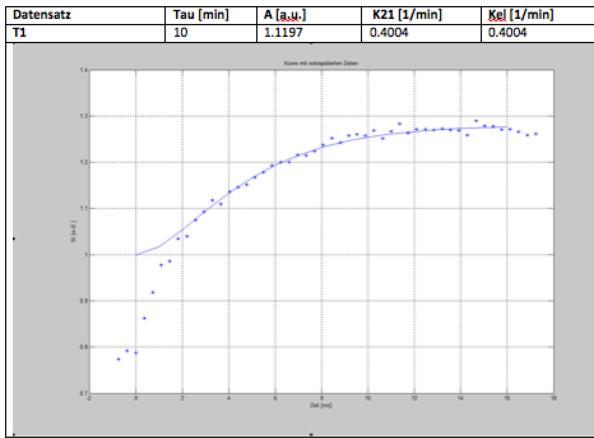
Während alle Muskelgewebe-Kurven mit einem offensichtlich geringeren Signalanstieg und kontinuierlich abfallendem Verlauf in Richtung der Basislinie relativ vergleichbar sind, haben die Gefäßkurven untereinander einen eher heterogenen Verlauf. Im Gegensatz zum Muskel kommt es hier schneller zur Anflutung und Steigung der Kurve bis zum Maximum der Signalintensität, in der Spätphase lassen sich dann zwei Effekte unterscheiden: ein Plateau-Effekt wie in den Kurven AT1 und AT2 und ein moderater wash out - Effekt in den Kurven AT5 und AT6. Die Kurven in den Schweinearterien T1 und T2 zeigen nach einem anfänglichen steilen Anstieg einen Plateau-Charakter in der Spätphase. Auch hinsichtlich des Kurvenverlaufes in der Spätphase ergaben sich somit keine hinlänglichen Hinweise auf Unterschiede zwischen den primär entzündlichen humanen und den gesunden porkinen Transplantaten.

### **3.1.2.2 Quantitative DCE-MRT Parameter**

Für n=6 humane A. temporalis Biopsate (AT1 - AT6), sowie für n=2 native, aus dem Schwein stammende Gefäßtransplantate (T1, T2), wurden zu den Signalintensität-Zeit-Verläufen dazu gehörige Fittingkurven erstellt, die den Signalverlauf in Abhängigkeit der pharmakokinetischen Modellparametern beschreiben. Die Kontrastmittelkinetik wurde in diesem Modell durch folgende drei Parameter: A,  $k_{21}$  und  $k_{el}$  repräsentiert.

**Abbildung 11:** Darstellung der Signalintensitäts-Zeitkurven innerhalb des Biopsates mit dem zugehörigen Kurvenfit und extrahierten pharmakokinetischen Parametern. AT1 - AT6 primär entzündliche humane Biopsate der A. temporalis; T1 und T2 Kontrollbiopsate aus dem Schwein.





Die gewebespezifische Transportkonstante  $k_{21}$  [1/min], die den initialen Anstieg der Kurve charakterisiert und stark von der Perfusion und Permeabilität der Läsion dominiert wird, lag bei den primär entzündlichen humanen Transplantaten bei einem Mittelwert von  $M = 4,1$  ( $SD = 4,6$ ) und bei den porkinen Transplantaten beim Mittelwert von  $M = 7,4$  ( $SD = 9,9$ ). Die Amplitude A [a.u.], die den Grad an Kontrastveränderung widerspiegelt, lag bei den humanen Transplantaten beim Mittelwert von  $M = 2,1$  ( $SD = 0,5$ ) und bei den porkinen Transplantaten beim Mittelwert von  $M = 3,2$  ( $SD = 2,9$ ). Die Eliminationskonstante  $k_{el}$  [1/min], die zu Bewertung der späten Kontrast-Phase genutzt wird, lag beim Mittelwert von  $M = 0,9$  ( $SD = 0,4$ ) für humane Transplantate und beim  $M = 0,3$  ( $SD = 0,1$ ) für porkine Transplantate.

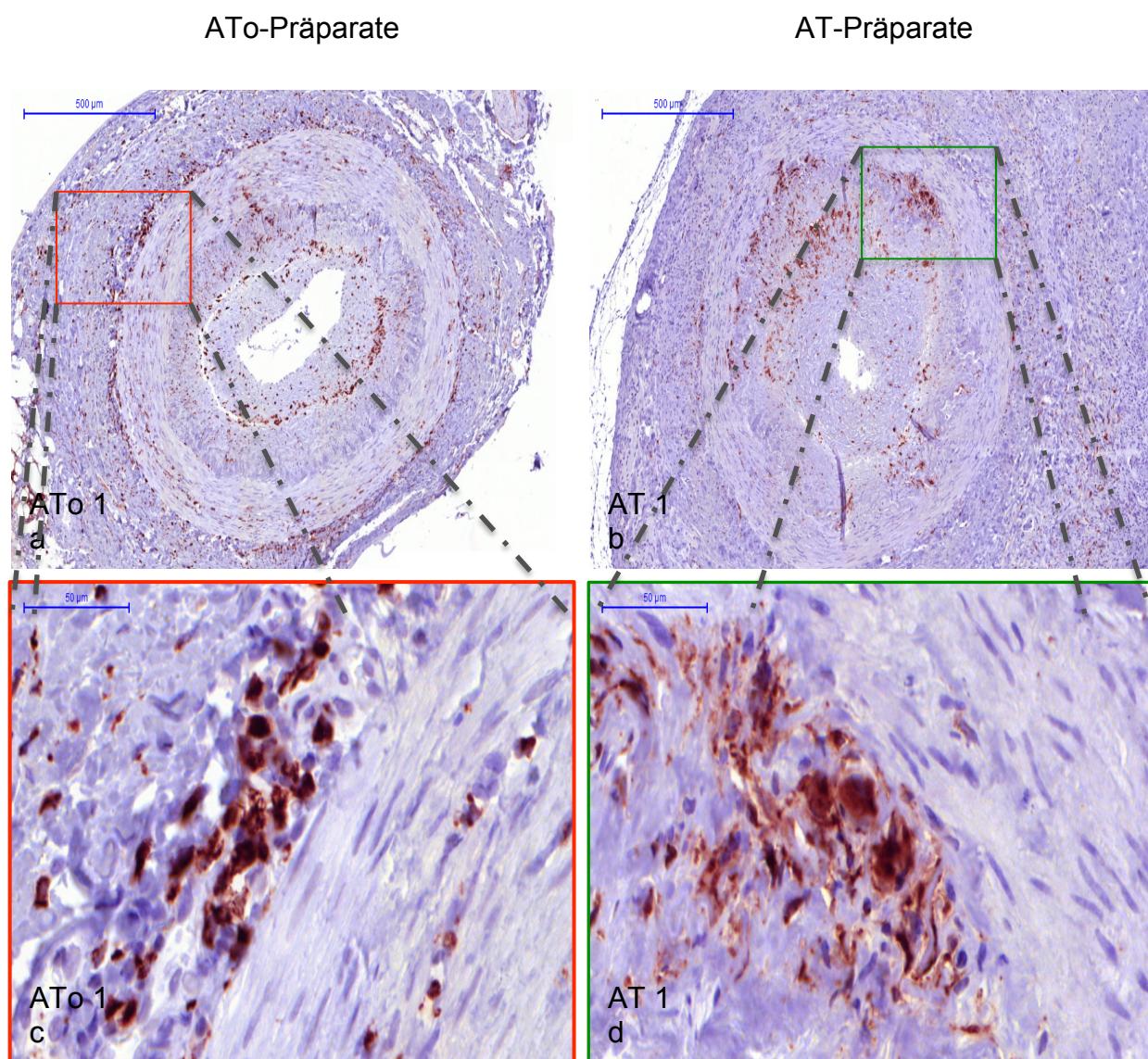
Es lässt sich feststellen, dass die Extraktion der quantitativen Parameter und die Evaluation der Kontrastmittelkinetik in allen Biopsaten erfolgreich war, was ein gelungenes Einwachsen und erfolgreiche Perfusion der Xenotransplantate bedeutet. Eine dynamische Bildgebung war somit in unserem Modell an den Temporalbiopsaten möglich. Die vorliegenden Ergebnisse der quantitativen Analyse liefern jedoch keinen Hinweis darauf, dass in den durchgeführten Versuchen die Detektion einer Vaskulitis mit Differenzierung gegenüber nicht entzündlichen Arterien anhand einer verstärkten Anflutung oder einer erhöhten Leckage des Kontrastmittels möglich war.

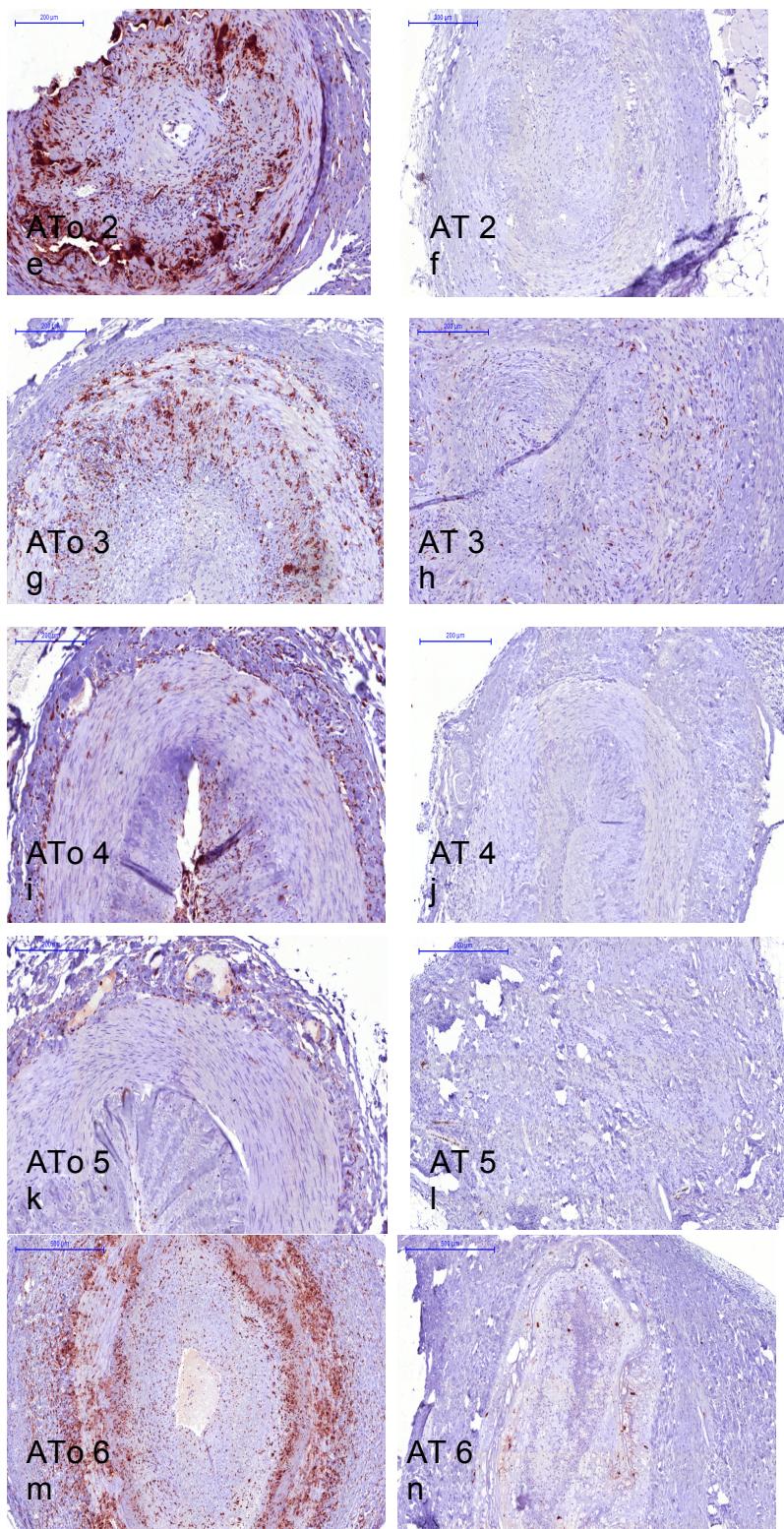
## 3.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

### 3.2.1 Immunhistochemische Makrophagenfärbung

Um die Entzündungsaktivität der humanen, transplantierten Arterien zu untersuchen und die Persistenz von resistenten Gefäßwand-Makrophagen nachzuweisen, wurde eine Makrophagenfärbung mit Anti-CD68-Antikörpern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt.

**Abbildung 12:** CD68-Makrophagenfärbung der humanen Makrophagen; Zusammenstellung der ATo- Präparate (links, initiale A. temporalis-Biopsien) und ihrer korrespondierenden AT- Präparate (rechts, nach 21 Tagen aus der Maus explantierte Arterien).





a: Makroskopische Darstellung eines Biopsates der A. temporalis in CD68-Immunfärbung; b: Makroskopische Darstellung eines Xenotransplantates der gleichen humanen A. temporalis nach der Explantation aus der Maus; c: Mikroskopische Darstellung eines Ausschnittes aus

selbigem Biopsat; d: Mikroskopische Darstellung eines Ausschnittes aus selbigem Transplantat mit Abbildung von drei Riesenzellen. Weitere Gegenüberstellungen initiale Biopsie – Transplantat: e - f, g – h, i – j, k- l, m- n.

Die immunhistochemische Untersuchung auf CD68 Expression zeigte in allen Originalbiopsien (ATo-Präparate, links) positive Befunde mit Nachweis von intramuralen Makrophagen. Die humanen Makrophagen waren in den Originalbiopsien mäßig bis stark, vor allem an der Grenze zwischen Adventitia und Media und entlang der Lamina elastica interna lokalisiert und durch dunkelbraune, granulare zytoplasmatische Färbung zu erkennen (Abb. 12 a, b, c, d, e, g, i, k und m). Um die residuelle Entzündungsaktivität der verbliebenen Makrophagenpopulation zu untersuchen, wurde das Ausmaß der Makrophagen-Färbung in den Xenotransplantaten (AT- Präparate, Abb. 12 rechts) visuell evaluiert und semiquantitativ wie folgt graduiert:

0 = nicht vorhanden in Präparaten AT 2, AT 4 und AT 5

1 = gering ausgeprägt im Präparat AT 6

2 = moderat ausgeprägt im Präparat AT 3

3 = stark ausgeprägt im Präparat AT 1.

Die Analyse ergab somit eine deutlich geringere Makrophagen-Präsenz in den Xenotransplantaten (AT- Präparate, Abb. 12 rechts) als in den initialen Originalbiopsien (ATo- Präparate, Abb. 12 links), womit nachgewiesen wurde, dass innerhalb von 3 Wochen im murinen Modell ein Makrophagenverlust in den Biopsaten aufgetreten war.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Xenotransplantatmodell als in vivo Kleintier-Modell einer aktiven Riesenzellarteriitis**

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob ein murines Xenotransplantationsmodell einer Riesenzellarteriitis (Arteriitis temporalis) für experimentelle in vivo-MRT-Perfusionsstudien etabliert werden kann.

Für die hier vorgestellte Arbeit wurde die variierte Form eines Modells von Weyand et al. verwendet, das in der Vergangenheit in immunologischen Riesenzellarteriitis-Studien erfolgreich eingesetzt wurde. Bei dem urprünglichen Modell wurde das Biopsat einer entzündlich befallenen A. temporalis superficialis subkutan in SCID (severe combined immunodeficiency)-Mäuse implantiert (Brack et al. 1997a, Weyand et Goronzy 2003a, Pryshchep et al. 2008, Chen et al. 2015). Studien zur bildgebenden Diagnostik lagen hiermit nach unserem Kenntnisstand bisher allerdings noch nicht vor.

Die Auswahl dieses Modells für unsere Studie stützte auf der Beschreibung, dass das Einwachsen des humanen Arteria temporalis Biopsates nach einer subkutanen Implantation in einer immuninkompetenten Maus nach einer Woche abgeschlossen ist und die aktive Entzündung des Gewebes bis zu zwei Monaten persistiert (Weyand et al. 2002). Die für die Erkrankung typischen CD68<sup>+</sup>-Makrophagen und CD3<sup>+</sup>T-Zellen als dominante Zellpopulationen überleben in dem Transplantat und eine aktive Zellproliferation und Expression der typischen CD4 Marker ist in allen Schichten des implantierten Biopsates anzutreffen. Die funktionelle Kompetenz der transplantatresistenten T-Zellen und Makrophagen wurde durch die kontinuierliche Expression der typischen Zytokinen IL-2, IFN-γ, IL-6 und TGF-β1 nachgewiesen (Brack et al. 1997a).

Den autonomen Entzündungscharakter dieses Modells nutzten mehreren Forschungsgruppen, um Therapieeffekte bei Riesenzellarteriitis experimentell zu erforschen und neue Erkenntnisse zur biologischen Aktivität der Erkrankung zu gewinnen. Die Arbeitsgruppe um Weyand et al. berichtet von hemmender Wirkung der Acetylsalicylsäure (ASS) auf die Zytokintranskription von IFN-γ in der zuvor subkutan implantierten, entzündeten Arterienwand. Dieses T-Zell-abhängige Zytokin spielt eine Schlüsselrolle in der Riesenzellarteriitis und sein Gewebespiegel korreliert mit der Bildung von Riesenzellen, der Verdickung der Intima, ischämischen

Komplikationen und der Neoangiogenese (Weyand et al. 2002). Unterschiedliche Wirkungsmechanismen und Einschränkungen von Glukokortikoiden wurden im ähnlichen Tierexperiment *in vivo* untersucht. Hier wurden SCID-Maus-Chimären 3 Wochen nach der subkutanen Transplantation der Arteria temporalis über unterschiedlich lange Zeitfenster, mit unterschiedlich hohen Dosen von Prednisolon behandelt. Während die kontinuierliche, immunsuppressive Therapie die T-Zell-Komponente in dem entzündlichen Infiltrat weitgehend reduzierte, blieben die TGF- $\beta$ 1-produzierende Makrophagen steroidresistent und könnten eine Erklärung für die Chronizität der Krankheit liefern und den sofortigen Rückfall nach Absetzen der Steroidtherapie erklären (Brack et al. 1997b). Abgeleitet vom Weyand-Modell nutzte eine Arbeitsgruppe um Chen das entzündliche humane Temporalarterien-Biopsat und bettete es in die Vorderwand der Bauchaorta von SCID-Mäuse ein. Hier versuchte man den physiologischen Verhältnissen eines direkten Kontaktes zu dem zirkulierenden Blutfluss zu entsprechen, um so eine immunsuppressive Behandlung mit vom Myxomavirus stammender Serpin *in vivo* zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass die Therapie die Intimalentzündung und CD11 B<sup>+</sup>-Zellinfiltrate im Biopsat signifikant reduzierte und die Expression von IL-1 $\beta$  positiv beeinflusste (Chen et al. 2015).

Die oben genannten Studien legen nahe, dass zelluläre und nichtzelluläre Komponenten einer Riesenzellarteriitis in einem Mausmodell mehrere Wochen nach der Transplantation bestehen bleiben, unabhängig von der direkten Blutzufuhr des Patienten sind und dass keine fundamentalen Veränderungen des Entzündungsherdes durch die Transplantation zu erwarten sind. Dieses Xenotransplantatmodell repräsentiert somit ein vitales Krankheitsmodell einer Riesenzellarteriitis mit vielversprechenden Optionen für die experimentelle Kleintierforschung dar.

In unserem Modell wurde ein ca. 5 mm langes Segment einer humanen A. temporalis subkutan am Hinterlauf einer immuninkompetenten pfp / Rag2 -/- Doppel Knock out Maus implantiert. Durch die Immundefizienz dieser Mäusepopulation, sowohl an funktionsfähigen B- und T-Lymphozyten, als auch an natürlichen Killerzellen und ihre hohe genetische Stabilität innerhalb dieser Population, konnten ideale Bedingungen für die geplante Versuchsreihe geschaffen und das Risiko einer Abstoßungsreaktion des humanen Gewebes vermieden werden. Das andere Segment des Biopsates wurden der histopathologischen Untersuchung zwecks

Diagnosesicherung im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck unterzogen, und die Diagnose einer Arteriitis temporalis wurde in allen, also 6 von 6 Fällen bestätigt. In der Implantation folgenden, 21-tägigen Ruhephase entwickelten die Testtiere eine physiologische Gewichtszunahme von 2 %, was impliziert, dass die Tiere zu keinem Zeitpunkt des Experiments in ihren biologischen und funktionellen Fähigkeiten beeinträchtigt waren. Das Fortbestehen der krankheitstypischen Entzündung sollte eine einzigartige Möglichkeit bieten, die Kinetik der Aufnahme und des Auswaschens vom Gd - DTPA - Kontrastmittel einer entzündeten Arterie unter Verwendung von DCE - MRT zu untersuchen und mittels semiquantitativer und quantitativer Parameter zu beschreiben.

## **4.2 Kontrastmittelaufnahme als bildmorphologisches Korrelat einer Riesenzellarteriitis in einem Xenotransplantatmodell**

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass eine aktive Riesenzellarteriitis in einem Xenotransplantatmodell anhand einer Perfusionsuntersuchung detektiert und charakterisiert werden kann, baut auf einer mehrfach in der Literatur beschriebenen Erkenntnis auf, dass die kontrastverstärkte MRT-Bildgebung in der Lage ist, entzündliche Gefäßwandveränderungen bei Riesenzellarteriitis darzustellen.

Erstmals im Jahr 1999 ist eine MRT- Darstellung der entzündeten Temporalarterie mittels kontrastmittelverstärkter T1- gewichteten Sequenzen in parasagittaler Schichtrichtung beschrieben worden. Anders und Kollegen berichteten von einer segmentalen, perivaskulären Kontrastmittelanreicherung der Temporalarterie und einer guten Korrelation dieser Gefäßabschnitte mit dem histopathologisch bestimmten krankheitstypischen Bild einer Riesenzellarteriitis (Anders et al. 1999). Im Jahr 2005 wurde von Bley und Kollegen ein optimiertes, hochauflösendes MRT- Protokoll zur exakten und schnellen Beurteilung der Arterienwand und des Gefäßlumen der Arteria temporalis superficialis mit einem 1,5 - Tesla - Scanner vorgestellt. Anhand einer Fallserie von 20 Patienten mit Verdacht auf eine Arteriitis temporalis ist es der Forschungsgruppe gelungen eine konzentrische KM-Aufnahme und Wandverdickung der A. temporalis in Übereinstimmung mit den ACR-Kriterien und der anschließend durchgeführten Biopsie darzustellen. Die auffälligen Arteriensegmente, so genannte „skip lesions“ konnten gegenüber gesunden, nicht entzündeten Gefäßabschnitten abgegrenzt werden und das charakteristische

segmentale Verteilungsmuster einer Riesenzellarteriitis konnte so identifiziert werden (Bley et al. 2005).

Zur Beurteilung des Entzündungsgrades einer A. temporalis entwickelte Bley et al. eine semiquantitative Auswertungsskala, die die Kontrastmittelaufnahme der Arterienwand bzw. des perivaskulären Gewebes und die Wanddicke der Arterie zusammenfasst. Anhand der hochauflösenden kontrastverstärkten MRT wurden die Kriterien Wandverdickung  $\geq 0,6\text{mm}$  und deutlich sichtbare murale KM - Aufnahme als Zeichen einer entzündlichen Wandveränderung gewertet (Bley et al. 2007).

Bei Verwendung von Gd- DTPA als Kontrastmittel, das schnell aus dem Gefäßsystem in den extrazellulär-extravaskulären Raum übergeht, spiegelt sich die Morphologie der erkrankten Gefäßwand in der erhöhten Signalintensität auf den T1-gewichteten Bildern mit einem zirkulären, hyperintensen Signal wider. Choe et al. vermuten, dass die murale Kontrastmittelmehrreicherung durch die gesteigerte Neoangiogenese und Dilatation im Bereich des Vasa vasorum des betroffenen Gefäßes zustande kommt (Choe et Lee 1998, Choe et al. 1999). In seiner Studie zu Takayasu-Arteriitis, welche wie die RZA eine primäre Großgefäßvaskulitis darstellt, legen Desai et al. nahe, dass bei einer aktiven Entzündung ein erhöhtes Verteilungsvolumen und das längere Auswaschen von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln auf einen durch die Entzündung vergrößerten Zwischenraum der Gefäßwand, also durch das erhöhte extrazelluläre Volumen zurück zu führen ist (Desai et al. 2005). Die Ergebnisse von Cyran und Kollegen, die funktionelle Parameter der Mikrozirkulation von MR- Tracer-Partikel untersuchten, widersprechen dem und deuten darauf hin, dass Arteriitis hauptsächlich durch eine erhöhte Endothelleckage des entzündeten Gewebes gekennzeichnet ist (Cyran et al. 2011). Alle diese Autoren sind sich jedoch einig, dass die DCE-MRT nützliche Informationen zur Identifizierung und Quantifizierung der Entzündungsaktivität liefern kann. Eine dynamische Perfusionsuntersuchung einer Arteria temporalis gab es nach unserem Wissen bis jetzt nicht. Mögliche Gründe dafür sind die geringe Größe des Gefäßes und die technischen Limitationen wie die erforderliche hohe räumliche und zeitliche Auflösung in der klinischen Bildgebung.

In unserer Perfusionsstudie war für die Darstellung eines ca. 5 mm langen Biopsat-Segments eine sehr hohe Auflösung gewährleistet. Alle Testtiere wurden dafür an Tag 21 nach der Implantation im 7 Tesla-Kleintier-Scanner, unter Verwendung einer T1- gewichteten Gradientenecho-Sequenz mit einer räumlichen Auflösung von 256

$\mu\text{m} \times 152 \mu\text{m}$  und einer Schichtdicke von  $0,7 \text{ mm}$  untersucht. Der Einsatz einer hochauflösenden Oberflächenspule ermöglichte detaillierte und kontrastreiche, morphologische Darstellungen der humanen Temporal- und Schweinearterien in der Maus. Für die Reduktion von Bewegungsartefakten wurde ein kleintierangepasstes EKG- und Atemsteuerungsgerät während der Messung verwendet. Damit konnte das Biopsat mit einem zirkulären, hyperintensen Signal in hoher Bildqualität und mit guter Signalausbeute in der Maus visualisiert werden.

Die qualitative Auswertung der DCE-MRT Daten orientierte sich am Verlauf der Signalintensität-Zeit-Kurven im Transplantat im Vergleich zum gesunden Muskel als Referenzgewebe. In allen Transplantarterien konnten wir KM-Flusskurven mit schnellem Signalanstieg und einer zeitlich ausgedehnten Plateaubildung in der Kurve generieren. In den meisten Transplantaten dominierte das Plateau, während das Auswaschprofil des Kontrastmittels in Form eines wash out - Effektes in nur 2 humanen Biopsaten nach einer Messzeit von über 30 Minuten visualisiert werden konnte. Die Erklärung für das Plateau liefert die pharmakokinetische Eigenschaft des Gd-DTPA-Komplexes. Aufgrund der fehlenden oder minimalen biochemischen Wechselwirkung mit dem Organismus kommt es zu seiner raschen Extravasation aus dem Gefäßbett ins interstitielle Kompartiment und zur schnellen extravasalen, extrazellulären Verteilung im Gewebe. Der fehlende wash out - Effekt in der Kurve könnte auf das undichte Gefäßsystem, eine heterogene Mikroumgebung und/oder auf den vergrößerten extrazellulären interstitiellen Volumen zurück zu führen sein, der in entzündlich verändertem Gewebe im Allgemeinen größer als im gesunden Gewebe ist. Die zeitlich ausgedehnte Plateaubildung steht somit für eine kontinuierliche Ansammlung der Substanz im Biopsat. Im benachbarten Muskel als Referenzgewebe setzte eine langsame Auswaschrate an, im Transplantat blieb jedoch eine eher unveränderte Kontrastierung als „late-enhancement“ über die gesamte Messzeit erhalten.

Diese Beobachtung machte auch eine Forschungsgruppe um Bley im Jahr 2006, die eine murale Kontrastierung in Temporalarterien nach einer i.v. Bolusinjektion von  $0,1 \text{ mmol / kg KG Magnevist } \circledR$  unter Verwendung T1- gewichteten Spin-Echo-Sequenzen evaluierte. Hier zeigte sich auch eine unveränderte hyperintense Signalverstärkung der Arteria temporalis superficialis bei wiederholten Messungen nach einer, acht und fünfzehn Minuten (Bley et al. 2006). Eine Publikation zu kontrastmittelverstärkter MR- Bildgebung bei Patienten mit aktiver Takayasu Arteriitis

beschreibt ebenso einen späten Hyperenhancement-Effekt des KM, welcher zwanzig Minuten nach KM-Bolus in der entzündeten Aortenwand unverändert beobachtet werden konnte (Choe et al. 1999). Liu et al. haben erforscht, dass die verzögerte Signalverstärkung der wichtigste Befund in Differenzierung zwischen einem aktiven Prozess der Erkrankung im Frühstadium und einem stabilen Spätstadium ist (Liu et al. 2017). In einer anderen Studie zu Takayasu Erkrankung war die gemessene anhaltende Signalintensität nach ca. zweiundzwanzig Minuten im Bereich der Aortenwandverdickung nur bei Patienten mit erhöhten serologischen Entzündungsmarker CP und ESR erkannt worden, nicht aber bei Patienten mit normalen Plasmawerten (Desai et al. 2005).

Demzufolge könnte die von uns beobachtete anhaltende Signalintensität in den untersuchten Biopsaten als Ansammlung des Kontrastmittels, bedingt durch die bestehende Inflammation im Transplantat, interpretiert werden.

Im Widerspruch dazu stehen jedoch die Ergebnisse kontrastmittelverstärkter T1-gewichteten Gradientenechosequenzen der gesunden Schweinecarotiden. Der ersten Anflutungsphase folgte hier ebenfalls eine starke Anreicherung der Substanz im Transplantat ohne eine sichtbare Eliminierung in der späten Phase, wie sie in den Muskel-Messungen zu finden war. Unsere Erwartung, dass in den gesunden Schweinearterien-Transplantaten eine schwache Anflutung, eine geringere Anreicherung und eine kürzere Verweildauer des Gadoliniums gegenüber dem Transplantat des humanen entzündlichen Gewebes zustande kommt, wurde nicht erfüllt. Als Ursache hierfür zu erwägen ist zum einen die im Vergleich zum Initialstatustatus ausweislich der finalen histologischen Untersuchung nach Explantation der Biopsate reduzierte entzündliche Aktivität der A.temporalis-Segmente. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass der artifizielle Charakter des Xenotransplantationsmodells allein durch den Prozess der murinen Neo-Vaskularisation sowohl der Arteriitis-Transplantate als auch der inaktiven Transplantate einen so starken Einfluss auf die Kontrastmittelperfusion haben könnte, dass Effekte durch entzündliches Gewebe hier möglicherweise keine relevanten Auswirkungen mehr aufweisen.

### **4.3 Multiparametrische DCE - MRT zur Evaluation der Perfusion bei Riesenzellarteriitis und Korrelation der gewonnenen Informationen mit der Histologie**

Um die Kontrastmittelperfusion in humanen Biopsaten und Schweinecarotiden funktionell zu bewerten, wurde das Signal während der dynamischen Sequenzen durch ROI-Messungen erfasst.

Verschiedene semiquantitative Parameter wie time to peak, max. Verstärkung oder wash out können verwendet werden, um die Signaleigenschaften zu bestimmen und zu interpretieren (Khalifa et al. 2014). Wir haben uns gezielt für die Parameter upslope und AUC entschieden, da wir davon ausgegangen sind, dass diese Parameter am besten den Grad der frühen Kontrastverstärkung im Transplantat demonstrieren.

Die AUC und upslope sind im wesentlichen Parameter der Anreicherungsrate und hängen daher von verschiedenen physikalischen und physiologischen Faktoren ab, einschließlich der gewählten MR-Sequenzen, Kontrastdosierung, Injektionsgeschwindigkeit, Mikrogefäßdichte, Zusammensetzung des extrazellulären Raums und venöser Abfluss. Alle diese Faktoren tragen zu Intensität des KM-Signals bei und beeinflussen dadurch die Kurvenverläufe (Cuenod et al. 2013). In unserem Experiment bestand die Maßgabe, alle physikalischen Größen wie MR-Sequenzen, zeitliche und räumliche Auflösung, Kontrastmittelinfusionszeit und Kontrastmitteldosis gleich zu halten (Brix et al. 1991, Brix et al. 1997, Verma et al. 2012). Trotz festgelegter Injektionszeit kann die manuelle Applikation des Kontrastmittels unwillkürlich zu leicht unterschiedlichen Einspritzraten geführt haben, die wiederum die Form der Kurve, vor allem in upslope, verändern und einen interindividuellen Vergleich in der limitierten Kohorte der Versuchstiere erschweren kann.

Der Parameter AUC als Fläche unter Kontrastkurve wurde als Integral aus den Signal-Intensität-Zeitkurven abgeleitet und zur halbquantitativen Auswertung der Perfusion im Biopsat verwendet. Der Mittelwert für AUC lag bei  $M = 1,7$  ( $SD = 0,4$ ) für die humanen Gefäße und bei  $M = 2,4$  ( $SD = 1,6$ ) für die Schweinearterien.

Gegen unsere Erwartung war dieser Parameter in den gesunden Schweinearterien höher als in den humanen Biopsaten. Die AUC sollte mit Kontrastmitteleinstrom in

dem entzündlichen Biopsat korrelieren, der durch erhöhte Endothelleckage bei höherer Gefäßdichte ebenfalls höher erwartet wurde als bei den gesunden Schweinecarotiden. Die AUC spiegelt dabei den Blutfluss, die Gefäßpermeabilität und den Anteil des interstitiellen Raums wider und gehört zu gut reproduzierbaren und aussagestarken DCE-MRT Parametern (Galbraith et al. 2002). Oto und Kollegen nutzten die AUC Werte zum Nachweis von Darmentzündung bei Morbus Crohn und beschreiben diesen als empfindlich gegenüber pathologisch bedingten Veränderungen der Gefäßintegrität (Oto et al. 2009). Des Weiteren gehört der AUC zu den primären Endpunkten für die Verwendung in den klinischen Phase I / II - Studien zu onkologischen antivaskulären Therapien (Leach et al. 2003). Mross et al. setzten die DCE-MRT Analyse und AUC Parameter zur Evaluation der Tumorvaskularisation in der antivaskulären Tumortherapie ein. Hier wurde eine Abnahme der ermittelten AUC um 50% in Korrelation zu Reduktion der Tumorblutversorgung erreicht, was als Zeichen für ein Therapieansprechen verstanden wurde (Mross et al. 2005).

Der zweite von uns ermittelte Wert war der upslope, definiert als die maximale Steigung zwischen dem Einsetzen des Kontrastmittelzuflusses und dem Zeitpunkt der Spitzenintensität auf der Zeitintensitätskurve. Für seine Berechnung wurde eine lineare Regression mit 3 Punkten auf der Kurve verwendet. Unsere Analyse ergab einen schnelleren upslope Mittelwert von  $M = 1,5$  ( $SD = 0,5$ ) in den humanen Transplantaten gegenüber dem murinen Muskelgewebe ( $M = 0,7$ ,  $SD = 0,5$ ), was auf eine höhere Perfusion im Biopsatsegment hinweist. Der upslope in den porkinen Arterien lag mit dem Mittelwert von  $M = 5,8$  ( $SD = 7,1$ ) deutlich höher als im angrenzenden Muskelgewebe ( $M = 3,5$ ,  $SD = 4,2$ ). Unsere Annahme, dass „gesunde“ Gefäße durch eine schwache Anreicherung mit langsamer Steigung der Kurve gegenüber pathologisch veränderten „undichten“ Gefäßen sich abzeichnen, wurde nicht erfüllt. Dabei gilt der upslope als Parameter der Anreicherungsrate, korreliert mit der Durchblutung des Gewebes und spiegelt seinen Perfusionsstatus wider. In der Tumordiagnostik machte die Interpretation dieses Parameters eine Abschätzung der Dignität von Geweben möglich, da die höhere Gefäßpermeabilität und Kapillardichte aggressiver Läsionen einen starken Einfluss auf das Muster der Kontrastmittelanreicherung hatten (Knopp et al. 1999). Seine Sensitivität und Spezifität bei der Erkennung von Prostatatumoren lag bei 96% und 82% und wurde auf seine Präferenz für schwache Integrität der Gefäßwand und Größe des Interstitialraums im Krebsgewebe zurückgeführt (Kim et al. 2005). Szabó et al.

stellten fest, dass insbesondere die frühe Signalverstärkungsphase für Nachweis von Mammakarzinomen die größte Bedeutung hatte (Szabó et al. 2003). Isebaert et al. zeigten, dass eine höhere upslope rate alleine und in Kombination mit höherer wash-out rate einen sehr genauen Parameter zur Erkennung und Lokalisierung von Prostatatumoren darstellt (Isebaert et al. 2012). Der upslope Index wurde auch in der myokardialen Perfusionsbildgebung eingesetzt und konnte signifikant zwischen ischämischem und gesundem Myokard während der First-Pass-Untersuchung unterscheiden (So et al. 2007). Die Autoren dieser Studien beschreiben, dass die Verwendung von upslop die Leistung der MRT in Erkennung und Lokalisierung von pathologisch verändertem Gewebe verbessern kann.

Um eine gute diagnostische Genauigkeit des upslope und AUC gewährleisten zu können, mussten wir hohe zeitliche Auflösungen von nicht länger als 10 Sekunden im Messprotokoll beibehalten. Dadurch wurden mehrere Bildpunkte während des ersten Durchgangs des KM durch Zielgewebe erfasst und der frühzeitige Enhancement der Anflutung konnte besser detektiert werden. Upslope ist im Gegensatz zu wash out und der pharmakokinetischen Parameter wie  $K^{trans}$  oder  $Ve$  demgegenüber empfindlich und eine zu geringe zeitliche Auflösung könnte zu falschen Schätzungen und verminderter diagnostischer Aussagekraft führen (Othman et al. 2016). Knopp schlägt deshalb vor, mindestens 3 verschiedene Bilderfassungen durchzuführen, während der KM verabreicht wird (Knopp et al. 2001). Um diesen Kriterien zu entsprechen, wählten wir eine Erfassungszeit von 8 Sekunden über die gesamte Untersuchungszeit und eine verlängerten Dauer der KM-Verabreichung mit einer angemessenen Injektionsrate von 60 Sekunden. Die Schnelligkeit der Erfassung erforderte ihrerseits, dass größere Voxel d.h. niedrige Matrixgrößen gewählt werden mussten, um ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis der Aufnahmen aufrecht zu erhalten. Die Matrixgröße in unserem Experiment lag somit bei  $256 \mu\text{m} \times 152 \mu\text{m}$ .

Auf Basis der DCE-MRT wurde die Signalintensität in Kontrastmittelkonzentration konvertiert und unter Anwendung vom deskriptiven pharmakokinetischen Kompartimentmodell nach Brix die Verteilungskinetik des Kontrastmittels mit folgenden Parametern: Variable A, die Eliminationskonstante  $k_{el}$  und die Transferkonstante  $k_{21}$  beschrieben.

Dabei wurden die Parameter der einzelnen Datensätze nicht alleine betrachtet und miteinander verglichen, sondern verschiedene Aspekte der Perfusion durch die

gleichzeitige Betrachtung der aussagekräftigsten Parameter A und  $k_{21}$  analysiert. Die kombinierte Betrachtung dieser Parameter lassen gute Rückschlüsse auf das Anreicherungsverhalten des untersuchten Regions zu, während der Parameter  $k_{el}$  direkt proportional zu der Konstante  $K_{in}$  ist und dadurch weniger aussagestark ist.

Bei drei humanen Biopsaten (AT1, AT5, AT6) und einem aus dem Schwein stammenden Biopsat lagen die Datensätze über 30 Minuten Messzeitdauer, wodurch die Beurteilung der Kontrastmitteldynamik in der späten Phase ermöglicht wurde. Auffällig war hier der Datensatz AT1 der entzündlichen Temporalarterie und T2 der nativen Schweinecarotis mit den höchsten  $k_{21}$  Werten, den hohen A Werten bei niedrigsten  $k_{el}$  Werten (für AT1  $k_{21}$ : 12,9251, A: 2,1130 und  $k_{el}$ : 0,3595; für T2  $k_{21}$ : 14,4167, A: 5,2120 und  $k_{el}$ : 0,2072). In beiden Fällen haben die Kurven einen schnellen Anstieg, hohe Amplitude und geringe Auswaschrate, welche einen Plateau-Effekt in der Spätphase hervorruft. Hier sind die Intensitäts-Zeit-Verläufe und Kurvenfit sehr ähnlich, obwohl es sich um verschiedene Geweben handelt (entzündlich human versus gesund tierisch). Im Vergleich zu AT1 zeigen die Datensätze AT5 und AT6 der humanen Arterien moderate  $k_{21}$  bei höheren  $k_{el}$  Werten (für AT5  $k_{21}$ : 1,0508, A: 2,0428,  $k_{el}$ : 1,0151; für AT6  $k_{21}$ : 2,8911, A: 2,8123,  $k_{el}$ : 0,4716). Die Verläufe dieser Kurven haben also einen wie bei AT1 schnellen Anstieg mit ähnlich hoher Amplitude, in der Spätphase ist jedoch deutlich erkennbare Auswaschung mit höheren  $k_{el}$  Werten auffällig. Man erkennt, dass die alleinige Betrachtung eines Parameters nicht ausreicht und keine Aussagen erlaubt. Beim AT1 und AT5 ist der Parameter A sehr ähnlich (A: 2,1130 versus A: 2,0428), obwohl die Kurven in der Spätphase unterschiedlich aussehen. Beim AT1 (humane Temporalarterie mit Plateau) und AT6 (humane Temporalarterie mit wash out) ähneln sich die  $k_{el}$  Werte ( $k_{el}$ : 0,3595 versus  $k_{el}$ : 0,4716), während Parameter  $k_{21}$  unterschiedlich groß ausfallen ( $k_{21}$ : 12,9251 versus  $k_{21}$ : 2,8911). Das bedeutet, dass man nur durch gleichzeitige Betrachtung mehrerer Parameter einer ROI einen vollständigen Eindruck der Dynamik des Kontrastmittels bekommt und dass diese Parameter nicht einzeln untereinander verglichen werden können. Es lässt sich erkennen, dass humane Temporalarterien untereinander unterschiedliche pharmakokinetische Darstellungen der KM-Kinetik aufweisen, obwohl es sich in allen Fällen um primär entzündliche histologisch bestätigte Inflammationsherden einer Riesenzellarteriitis handelt. Die Tendenz der Heterogenität der Ergebnisse, die in der qualitativen Analyse schon erkennbar war, setzte sich also in der quantitativen

Analyse weiter fort. Durch den Vergleich der Datensätze und Kurvenverläufe zwischen humanen entzündlichen und porkinen entzündungsfreien Biopsaten verstärkte sich der Verdacht, dass die in der Temporalarterie angenommene Entzündung nach 21 Tagen Versuchsdauer nicht relevant in den Perfusionsstudien zum Tragen kommt bzw. die Persistenz der Inflammation in der Gefäßwand hinterfragt werden musste.

Um die Korrelation zwischen den gewonnenen funktionellen DCE-MRT Parametern und dem histomorphologischen Hintergrund der Erkrankung zu untersuchen, nutzten wir die Analyse der CD68-Färbung der explantierten Transplantate. Mit einem gegen humane Makrophagen gerichteten anti CD68-Antikörper wurden die humanen Makrophagen in den aus der Maus explantierten Temporalarterien dargestellt, um die bestehende Entzündungsaktivität des Gewebes nach 21 Tage Versuchsdauer nachzuweisen. Entgegen der Erwartung und im Widerspruch zu ähnlichen in der Literatur beschriebenen Xenotransplantatmodellen zeigten histologische Proben einen massiven Verlust der Makrophagen in dem explantierten Gewebe. Eine geringe restliche Persistenz dieser Zellen im Sinne einer residuellen entzündlichen Aktivität konnte in nur drei Biopsaten (AT1, AT3, und AT6) nachgewiesen werden. Diese Restaktivität der Entzündung kam jedoch in den Perfusionskurven nicht zum Ausdruck. Während die Kurve im Biopsat AT1 einen Plateaucharakter hatte, zeigte die Kurve im Biopsat AT6 einen eindeutigen wash-out Effekt. Die Ergebnisse der Transplantate mit histologisch nachgewiesener Restaktivität erlaubten keine Differenzierung gegenüber Temporalis-Biopsaten ohne Restaktivität und gegenüber porkinen Arterien. Es konnte somit kein Zusammenhang zwischen den histologischen Informationen und den multiparametrischen MRT-Daten dargestellt werden.

Im Vergleich zwischen frischen, nicht implantierten und implantierten humanen Gewebeproben einer Riesenzellarteritis beschrieben Weyand und Kollegen, dass nach 4 Wochen transplantatresidente Makrophagen noch reichlich vorhanden waren und ihre funktionelle Kompetenz in der Synthesefortsetzung ihrer typischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TGF- $\beta$ 1 weiter bestand. Gleichwohl fanden diese Forscher heraus, dass die Zahlen der gewebeinfiltrierenden T-Zellen in 4 von 5 untersuchten Transplantaten um 40% - 70% durch Sterben und Emigration sanken. Die Forschungsgruppe um Weyand suggeriert zudem, dass der überwiegenden Mehrheit

der noch proliferierenden Zellen im Entzündungsinfiltrat der CD68-Marker fehlt und die Makrophagen sehr wahrscheinlich nicht „nachgefüllt werden“ um eine Entzündung aufrecht zu erhalten (Brack et al. 1997a). Der fast vollständige Verlust der Makrophagen in unserem Versuch überrascht jedoch, und nach einer möglichen Ursache muss gesucht werden. Im Gegensatz zu anderen Forschungsgruppen, bei denen die Temporalarterien eingefroren und in flüssigem Stickstoff bis zu Implantation gelagert wurden (Brack et al. 1997a, Brack et al. 1997b), wurden in unserem Versuchsaufbau frisch gewonnenen Arterien bei Zimmertemperatur in einem RPMI Medium bis zu Transplantation aufbewahrt. An dieser Stelle könnte also eine zu lange Zeit zwischen der Biopsieentnahme am Patienten und Implantation in die Maus für den starken Verlust der Makrophagenpopulation diskutiert werden. Durch methodische und örtliche Gegebenheiten lag diese Zeit in unserem Experiment zwischen 1,5 und 2,5 Stunden und könnte für die Vitalität der Zellen nicht unbedeutend sein. Die Lebensfähigkeit der Zellen in sowohl frischen wie in tiefgefrorenen Arterienproben wurde jedoch von Chen et al. untersucht und in beiden Fällen als hervorragend bezeichnet. Im Sinne der gewebezerstörenden Immunantwort sollten solche Arteriensegmente funktionell unabhängige Einheiten sein, die keinen direkten Zustrom von Zellen, Mediatoren oder Antigenen aus dem Blutkreislauf des Patienten erfordern (Chen et al. 2015).

Ein möglicher künftiger Ansatz zur Optimierung dieses Modells wäre ein Einsatz von isolierten humanen mononukleären Zellen (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell), die direkt nach der Biopsie-Transplantation zusätzlich in die Maus verabreicht werden könnten. Die Mäuse pfp / Rag2 -/- Doppel Knock out gehören zu immundefizienten Mutanten, denen T-, B- und Killerzellen fehlen; durch die PBMC-Infusion und das Eindringen der zirkulierenden entzündlichen Zellen in die transplantierte Arterie könnte womöglich die entzündliche Aktivität im Biopsat nach 21 Tagen besser aufrecht erhalten werden. Dieser Ansatz wurde in einer Studie von Chen untersucht und ergab, dass eine zusätzliche PBMC-Infusion im Xenograftmodell in Assoziation zu Intimaverdickung und zu erhöhter Präsenz der humanen T-Zellen in Transplantaten steht (Chen et al. 2015).

Die weitere Recherche zu den ähnlichen Xenograftmodellen hat keinen Hinweis oder Verbesserungsvorschlag für unseren Versuchsaufbau ergeben. Für ähnlichen Vorhaben wäre möglicherweise empfehlenswert, erstens histologisch zu untersuchen, inwiefern sich die Makrophagenpopulation in transplantierten Aa.

temporales nach 7, 14 und 21 Tagen nach Implantation verändert, und zweitens die Zeit zwischen Biopsie bis zu Implantation zu reduzieren.

#### **4.4 Nutzen des vorliegenden Modells für die präklinische Bildgebung**

Präklinische Tiermodelle sind in der Forschung schon seit langem genutzt und unerlässlich, um menschliche Krankheiten besser zu verstehen, neue Technologien zu entwickeln und ihre Potenziale und Grenzen zu definieren. Quantitative DCE - MRT - Studien als in vivo Kleintierexperimente sind in der Literatur jedoch wenig anzutreffen. Dabei bieten die Kleintiermodelle einen experimentellen Rahmen zur Bewertung der MRT - Wirksamkeit mit gleichzeitig hohen diagnostischen Aussagen über den Charakter, Vaskularisation und Perfusion des Zielgewebes. Mit dem speziell konstruierten und auf die Anatomie und Physiologie des Kleintiers angepassten MRT System gelingt eine Perfusion - Bildgebung mit höchstem Weichteilkontrast in sehr hoher zeitlicher und örtlicher Auflösung. Man benötigt ein bedeutend kleineres Kontrastmittel - Volumen bei gleichzeitig kleineren Tierchargen, da jedes Tier seine eigene Kontrolle darstellen kann und es sind Langzeituntersuchungen an einem Tier ohne invasive Biopsien möglich. Die Optimierung der Untersuchungs- und Aufnahmeparameter kann der experimentellen Fragestellung während der Messung angepasst werden. Die universelle Verwertbarkeit der Bildergebnisse, die Möglichkeit der elektronischen Datenverarbeitung und der qualitativen und quantitativen Datenanalysen bieten weitere Vorteile der experimentellen Kleintier - MRT - Forschung dar.

Da die DCE - MRT vaskuläre Effekte erfassen kann, eignet es sich insbesondere für therapeutischen Monitoring bei einer Vielzahl von Krankheiten die den Blutfluss beeinflussen, wie z.B. bei Myokardinfarkt, Schlaganfall, Organtransplantation und Krebserkrankungen. Muruganandham und Kollegen veröffentlichten eine in vivo Studie zu Hemmung der Tumorangiogenese in einem menschlichen Lungentumor - Xenotransplantatmodell, in dem antiangiogenische Effekte anhand DCE - MRT nachgewiesen wurden. Bei behandeltem Tumor war eine visuelle Abnahme der Kontrastierung im Tumor, die Reduktion der upslope Werte um 50% und Ak<sub>ep</sub> Parameter um 44% als ein positives Ansprechen auf die Behandlung mit signifikanter Wachstumsverzögerung und Abnahme der Mikrogefäßdichte des Tumors

interpretiert worden (Muruganandham et al. 2006). Die Forschungsgruppe um Evelhoch untersuchte ein neuartiges Targeting-Mittel an einem murinen und humanen Adenocarcinom-Modell unter Berechnung des AUC-Parameters und beschreibt diesen als geeignet für die Quantifizierung antivaskulärer Wirkung bei krebstherapeutischen Ansätzen. In dieser Studie wurde eine wesentliche Linksverschiebung der AUC-Kurven nach der Behandlung als eine arzneimittelinduzierte Senkung der KM-Aufnahme dokumentiert, welche als Abnahme der Tumorperfusion und als positives Ansprechen auf die Behandlung verstanden wurde. In allen behandelten Maus - und Menschtumoren konnten die Forscher eine signifikante dosisabhängige Reduktion der mittleren AUC-Werte zwischen 6% und 93% verzeichnen (Evelhoch et al. 2004).

Ein wie hier vorgestellter Xenotransplantatmodell einer Riesenzellarteritis gab es nach unserer Erkenntnis in der Durchführung von MRT- Perfusionsstudien bisher noch nicht. Dabei konnten wir einen ausgeprägten positiven T1- Effekt von Gadolinium-basiertem Kontrastmittel in humanem A. temporalis Biopsat zeigen und seine Kinetik anhand der Perfusionsparameter beschreiben. Das bedeutet, dass das Biopsat einen suffizienten Anschluss an die murine Mikrogefäßversorgung gefunden hat und seine Perfusion in diesem Modell multiparametrisch dargestellt werden kann. Trotzdem ist dieses Konstrukt als Perfusionsmodell für Vaskulitisbildgebung in vorliegender Form nicht zu empfehlen. Die Ursache dafür liegt darin, dass die entzündliche Aktivität, die wir im Biopsat nach 21 Tagen Versuchsdauer vermuten, in diesem Perfusionsmodell nicht zum Ausdruck kommt und sowohl die Perfusionskurven als auch die multiparametrischen Werte keine Differenzierung zwischen Kontrollgewebe und krankem Gewebe erlauben. Der artifizielle Charakter dieses Implantationsmodells überwiegt wahrscheinlich den Einfluss, den ein restliches entzündliches Geschehen im Biopsat noch hat. Daraus resultierten in vorliegender Studie Flusskurven, die zu inkonsistent erscheinen und mit dem angenommenen entzündlichen Prozess nicht korrelieren. So gehört der Parameter upslope prinzipiell zu einem entscheidenden Indiz, dass Hinweise auf ein entzündliches oder tumoröses Geschehen im Gewebe oder Organ liefert und z.B. in der Prostata-Bildgebung für Malignität steht (Isebaert et al. 2012). In unserem Versuch war der upslope jedoch sowohl in den humanen Riesenzellarteritis- Abschnitten als auch in den gesunden stabilen Schweinecarotiden stark ausgeprägt, sodass sich hieraus kein Hinweis auf eine Krankheitsaktivität ableiten ließ.

Desweiteren wird in der Spätphase der Gd-DTPA Anreicherung erwartet, dass in pathologisch stark perfundiertem Gewebe wie z.B. im Tumor ein schneller wash out in der Flusskurve auftritt oder durch stark ausgeprägten kapillary Leack ein massiver Übertritt des Kontrastmittels ins Interstitium als Plateau erkennbar wird. Die Tendenz in den von uns erstellten Flusskurven war hier ebenso diffus und erlaubte keine Demarkierung einer entzündlichen Aktivität. Die Spätphase war sowohl in den gesunden Schweinecarotiden wie in den humanen Biopsaten von einem ausgedehnten Plateau dominiert. Eine Ausnahme bildeten zwei humane Biopsate, die einen wash out-Effekt nach 30 Minuten Messzeit zeigten. Damit konnten die in der aktuellen Arbeit erhobenen Ergebnisse nicht eindeutig interpretiert werden und als Hinweis zur Abschätzung der Krankheitsaktivität nicht genutzt werden.

Als Konsequenz der diskutierten Sachverhalte ist vom Einsatz der DCE-MRT bei vorliegendem Versuchsaufbau und der gegebenen Fragestellung abzuraten. Dafür gibt es zwei Gründe: Erstens ergibt sich aus den Perfusionsparametern der Xenotransplantate keine Graduierung einer möglichen zugrundeliegenden entzündlichen Aktivität. Dies kann auch auf der weiteren wesentlichen Problematik eines fast vollständigen Verlustes einer entzündlichen Makrophagenaktivität im Xenotransplantat basieren. Das Modell eignet sich somit in vorliegender Variante nicht zur Vaskulitisbildung, und von seinem Einsatz als Perfusionsmodell in experimentellen *in vivo* Therapiestudien muss somit abgeraten werden.

#### **4.5 Technische und methodische Limitationen einer DCE - MRT Untersuchung in einem Mausmodell**

Die Anwendung der DCE-MRT bei der präklinischen Kleintierforschung birgt eine Reihe von Herausforderungen. Die semiquantitativen Ergebnisse der Perfusionsparameter upslop und area under the curve hängen von der genauen Positionierung der ROIs ab. Die Festlegung der ROI, der die zu vergleichenden Areale bestimmt und damit die erfassten Unterschiede beeinflusst, ist dabei ein entscheidender Schritt und besonders in den Mausgefäßen problematisch. Hier kam es zwischenzeitlich zu einer geringen Bewegung des Tieres, was in Verbindung mit einem sehr kleinen Messareal von ca. 0,7mm Durchmesser eine Festlegung der ROI im Gefäß erschwerte. In manchen Fällen mussten die einzelnen ROIs zu den unterschiedlichen Zeitpunkten manuell und einzeln bestimmt werden, was mit einem

zeitlich sehr hohen Aufwand verbunden war. Zur optimalen Anlage einer ROI im murinen Gefäß besteht bis dato keine Empfehlung. Die daraus resultierende, uneinheitliche Verwendung erschwert die Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse.

Bei Betrachtung der Kontrastmittelkinetik ist zu berücksichtigen, dass die Dynamik der Konzentration von GD-DTPA zum Zeitpunkt der Messung in großem Maße von den individuellen Faktoren wie Herzfrequenz, arterial input function (AIF), Injektionsgeschwindigkeit und Ort der Injektion, aber auch vom Scannertyp und technischen Einstellungen abhängt. Da diese Faktoren bei jeder Messung verschieden sind, handelt es sich um relative Ergebnisse, die nur begrenzt miteinander vergleichbar sind (Khalifa et al. 2014).

Eine quantitative Analyse der Perfusion kann durch eine AIF optimiert werden, die separat für jedes Versuchstier bestimmt werden sollte. Eine direkte Bestimmung der AIF am Zielgewebe war in unserer Studie aufgrund der Fokussierung auf die Transplantate nicht möglich. Die von Theis et. al vorgeschlagene Lösung, die gefittete AIF aus den akquirierten MRT - Datensätzen nach KM - Gabe im linken Ventrikel des Herzens zu gewinnen, zeigte eine sehr ausgeprägte interindividuelle Variabilität der AIF, die sich dann in den ermittelten Parametern widerspiegelt (Theis et al. 2008). Allerdings verhinderte die anatomische Positionierung des Biopsates am Hinterlauf der Maus auch eine gleichzeitige Abbildung vom Herz und Biopsat zum Zeitpunkt der Injektion, wodurch die parallele Bestimmung der AIF am Herzen während der Untersuchung nicht möglich war. Zur Lösung dieses Problems nutzten wir den deskriptiven, pharmakokinetischen Zwei-Kompartiment-Modell nach Brix, das mit einer langsamen, klar definierten KM - Infusion arbeitet und somit die schwierige Bestimmung einer AIF an der Maus umgehen lassen hat. Diese deskriptive Methode mit Erstellung der Parameter A,  $k_{el}$  und  $k_{21}$  des zugrunde liegenden Modells kann aber nicht mit physiologischen Größen wie regionalem Blutfluss oder dem regionalen Blutvolumen in Beziehung gesetzt werden.

Als mögliche weitere technische Limitation ist die manuelle Gabe des Kontrastmittels zu nennen. Kritisch ist dies hinsichtlich des Parameters wash-in / upslope zu bewerten, da dieser Parameter explizit die Kontrastmittelanflutung wiedergibt. Zur Verbesserung der Methodik könnte der Einsatz eines MRT - Perfusors für Kleintiere zur Vereinheitlichung der Applikationsgeschwindigkeit und

zur gezielten Gabe am Anfang eines Messintervalls beitragen. Ein Perfusion in dieser Form stand uns nicht zur Verfügung.

In dieser Pilotstudie haben wir insgesamt 8 Versuchstiere eingeschlossen, davon waren nur zwei mit gesunden Schweinearterien als Kontrolltiere untersucht worden. Dieser geringe Stichprobenumfang von Tieren stellt eine Limitation der Studie dar. Da sich aus den Perfusionskurven und den extrahierten Parameter im Vergleich zwischen den Kontrollproben und den humanen Biopsien keine Hinweise auf Kennzeichen entzündlicher Veränderungen ergaben, haben wir als Konsequenz im vorliegenden Versuchsaufbau auf weitere Versuchstiere als Kontrolltiere bewusst verzichtet, da der weitere Einsatz von Versuchstieren auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht gerechtfertigt gewesen wäre.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Perfusion von humanen Biopsaten der A. temporalis superficialis in einem murinen Xenotransplantat-Tiermodell unter Verwendung der dynamischen kontrastmittelverstärkten Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) nachgewiesen werden kann und ob die dabei erhobenen Perfusionsparameter Hinweise auf das Ausmaß der entzündlichen Aktivität ergeben. Um dies zu überprüfen, wurden Temporalarterien- Biopsate ( $n = 6$ ) von Patienten mit nachgewiesen aktiver Riesenzellarteritis subkutan in immuninkompetente pfp / Rag2 Doppel Knock out- Mäuse implantiert. Als Referenzgewebe für die Untersuchung wurden zwei ( $n = 2$ ) gesunde, aus dem Schwein stammende Arteria carotis- Abschnitte in der gleichen Art in Mäuse dieser Population implantiert. Nach 21 Tagen folgte dann im Rahmen einer dynamischen MRT- Untersuchung die i.v. Applikation eines Gadolinium- haltigen Kontrastmittels. Die Perfusion des Kontrastmittels wurde semiquantitativ aus den Signalintensität- Zeitkurven in allen transplantierten Gefäßen im Vergleich zum Muskelgewebe analysiert und mittels der Perfusionsparameter upslope und area under the curve charakterisiert. Zur quantitativen Analyse der T1- gewichteten dynamischen kontrastverstärkten MRT (DCE-MRT) wurde ein deskriptives, pharmakokinetisches Modell nach Brix verwendet und die Kontrastmitteldynamik durch die Parameter Amplitude A,  $k_{21}$  und  $k_{el}$  repräsentiert.

Die Kontrastverstärkung wurde in 8 von 8 der vaskulären Transplantaten in den Intensitäts-Zeitkurven nachgewiesen und zeigte sich dort jeweils ausgeprägter als in dem Muskelgewebe der Versuchstiere, beweisend für ein Einwachsen aller Biopsate mit suffizienter Vaskularisation durch murine Neo-Angiogenese. Die mit DCE-MRT erhobenen Parameter upslope, AUC, A,  $k_{el}$  und  $k_{21}$  spiegelten somit die Perfusion der Xenotransplantate wider, hatten jedoch keine nachweisbare Aussagekraft über die Art des Implantates und über den Effekt einer entzündlichen Aktivität: Die Auswirkung einer initialen Inflammation fand keinen Ausdruck in den Flusskurven und den hieraus berechneten Parametern. Ursächlich ist vermutlich zumindest anteilig ein über das in der Literatur beschriebene Ausmaß hinausgehender Verlust der Makrophagenpräsenz in den Temporalarterien während des dreiwöchigen Zeitraumes der Transplantation.

Allerdings erbrachte auch die Perfusions-Analyse der Biopsate, bei denen eine

restliche entzündliche Aktivität noch vorhanden war, gegenüber derjenigen, bei denen keine nachweisbaren Makrophagen mehr existent waren, keine fassbaren Unterschiede in den Perfusionswerten und Flusskurven. Offenbar überwiegt in diesem Xeno-Transplantationsmodell der hiermit verbundene artifizielle Charakter der Vaskularisation den Einfluss entzündlicher Gefäßwandveränderungen auf die Perfusion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich dieses Modell in der dargestellten Form trotz des erfolgreichen Einwachsens der Transplantate als Perfusionsmodell für die Vaskulitisbildung als nicht praktikabel erwiesen hat und dass daher von seinem Einsatz bei ähnlichen Fragestellungen oder in experimentellen Therapieverlaufsstudien abzuraten ist. Als Ausblick auf mögliche künftige Anwendungen dieses Tiermodells in Perfusionsstudien der Riesenzellarteriitis könnte erwogen werden, ob eine Optimierung dieses Modells beispielsweise durch eine Modifikation mittels postoperativer Interleukin- oder Zell- Infusionen zur Aufrechterhaltung der Entzündungsaktivität im Xenotransplantat erfolgen kann.

## **6. Literaturverzeichnis**

**Anders, H. J., Sigl, T., Sander, A., Coppenrath, E., Pfluger, T., Kellner, H. (1999):** Gadolinium contrast magnetic resonance imaging of the temporal artery in giant cell arteritis. *J. Rheumatol.*, 26, 2287-2288

**Arbab, A. S., Bashaw, L. A., Miller, B. R., Jordan, E. K., Lewis, B. K., Kalish, H., Frank, J. A. (2003):** Charakterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiol.*, 229, 838-846

**Baldursson, O., Steinsson, K., Björnsson, J., Lie, J. T. (1994):** Giant cell arteritis in Iceland: an epidemiologic and histopathologic analysis arthritis. *Rheum.*, 37, 1007-1012

**Beache, G. M., Khalifa, F., Gimel'farb, G., El-Baz, A. (2014):** Fully automated framework for the analysis of myocardial first-pass perfusion MR images. *Med. Phys.*, 41(10), 102305/1-18

**Bley, T. A., Geiger, J., Jacobsen, S. (2009):** High-resolution MRI for assessment of middle meningeal artery involvement in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.*, 68(8), 1369-1370

**Bley, T. A., Markl, M., Wieben, O. (2006):** Inflammatory hyperenhancement persists in delayed high-resolution MRI in giant cell arteritis. *Am. J. Roentgenol.*, 186, 1197-1198

**Bley, T. A., Markl, M., Schelp, M., Uhl, M., Frydrychowicz, A., Vaith, P., Peter, H-H., Langer, M., Warnatz, K. (2008):** Mural inflammatory hyperenhancement in MRI of giant cell (temporal) arteritis resolves under corticosteroid treatment. *Rheum.*, 47, 65-67

**Bley, T. A., Reinhard, M., Hauenstein, C., Markl, M., Warnatz, K., Hetzel, A., Uhl, M., Vaith, P., Langer, M. (2008):** Comparison of duplex sonography and high-

resolution magnetic resonance imaging in the diagnosis of giant cell (temporal) arteritis. *Arthritis Rheum*, 58(8), 2574-2578

**Bley, T. A., Uhl, M., Carew, J., Markl, M., Schmidt, D., Peter, H-H., Langer, M., Wieben, O. (2007):** Diagnostic value of high-resolution MR imaging in giant cell arteritis. *Am. J. Neuroradiol*, 28, 1722-1727

**Bley, T. A., Wieben, O., Uhl, M., Miehle, N., Langer, M., Henning, J., Markl, M. (2005):** Integrated head-thoracic vascular MRI at 3 T: assessment of cranial, cervical and thoracic involvement of giant cell arteritis. *Magma*, 18, 193-200

**Bley, T. A., Wieben, O., Uhl, M., Vaith, P., Schmidt, D., Warnatz, K., Langer, M. (2005):** Assessment of the cranial involvement pattern of giant cell arteritis with 3T magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*, 52(8), 2470-2477

**Bongartz,T., Matteson, E. L. (2006):** Large-vessel involvement in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol*, 18, 10-17

**Both, M., Aries, P. M., Müller-Hülsbeck, S., Jahnke, T., Schäfer, P. J., Gross, W. L., Heller, M., Reuter, M. (2006):** Balloon angioplasty of arteries of the upper extremities in patients with extracranial giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis*, 65, 1124-1130

**Brack, A., Geisler, A., Martinez-Taboada, V. M., Younge, B. R., Goronzy, J. J., Weyand, C. M. (1997a):** Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Molecular Medicine*, 3, 530-543

**Brack, A., Martinez-Taboada, V., Stanson, A., Goronzy, J. J., Weyand, C. M. (1999):** Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*, 42(2), 311-317

**Brack, A., Rittner, H. L., Younge, B. R., Kaltschmidt, C., Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (1997b):** Glucocorticoid-mediated repression of cytokine gene transcription in human arteritis-SCID chimeras. *J. Clin. Invest.*, 99(12), 2842-2850

**Brix, G., Kiessling, F., Lucht, R., Darai, S., Wasser, K., Delorme, S., Griebel, J. (2004):** Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magn Reson Med*, 52(2), 420-429

**Brix, G., Semmler, W., Port, R., Schad, L. R., Layer, G., Lorenz, W. J. (1991):** Pharmacokinetic parameters in CNS Gd-DTPA enhanced MR imaging. *J Comput Assist Tomogr*, 15(4), 621- 628

**Brix, G., Schreiber, W., Hoffmann, U., Gückel, F., Hawighorst, H., Knopp, M. V. (1997):** Methodische Ansätze zur quantitativen Beurteilung der Mikrozirkulation im Gewebe mit der dynamischen Magnetresonanztomographie. *Radiol*, 6, 470-480

**Chen, H., Zheng, D., Ambadapadi, S., Davids, J., Ryden, S., Samy, H., Bartee, M., Sobel, E., Dai, E., Liu, L., Macaulay, C., Yachnis, A., Weyand, C., Thoburn, R., Lucas, A. (2015):** Serpin treatment suppresses inflammatory vascular lesions in temporal artery implants (TAI) from patients with giant cell arteritis. *PLoS*, 10(2), 1-15

**Choe, Y. H., Lee, W. R. (1998):** Magnetic resonance imaging diagnosis of Takayasu arteritis. *Int. J. Cardiol*, 66(1), 175-179

**Choe, Y. H., Kim, D. K., Koh, E. M., Do, Y. S., Lee, W. R. (1999):** Takayasu arteritis: diagnosis with MR imaging and MR angiography in acute and chronic active stages. *J. Magn Reson Imaging*, 10, 751-757

**Crow, R. W., Katz, B. J., Warner, J. E. A., Alder, S. C., Zhang, K., Schulman, S., Digre, K. B. (2009):** Giant cell arteritis and mortality. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64(3), 365-369

**Cuenod, C. A., Balvay, D. (2013):** Perfusion and vascular permeability. Basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. *Diagn Interv Imaging*, 94, 1187-1204

**Cyran, C. C., Sourbron, S., Bochmann, K., Habs, M., Pfefferkorn, T., Rominger, A., Raya, J. G., Reiser, M. F., Dichgans, M., Nikolaou, K., Hacker, M., Saam, T. (2011):** Quantification of supra-aortic arterial wall inflammation in patients with arteritis using high resolution dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. Initial results in correlation to (18F)-FDG PET/CT. *Invest. Radiol.*, 46, 594-99

**Dejaco, C., Wagner, A. D. (2010):** Die Pathogenese der Großgefäßvaskulitiden. *Arthritis Rheuma*, 4, 193-198

**Dejaco, C., Ramiro, S., Duftner, C., Besson, F. L., Bley, T. A., Blockmans, D., Brouwer, E., Cimmino, M. A., Clark, E., Dasgupta, B., Diamantopoulos, A. P., Direskeneli, H., Iagnocco, A., Klink, T., Neill, L., Ponte, C., Salvarani, C., Slart, R. H. J. A. , Whitlock, M., Schmidt, W. A. (2018):** EULAR recommendations for the use of imaging in large vessel vasculitis in clinical practice. *Ann Rheum Dis*, 77, 636-664

**Desai, M. Y., Stone, J. H., Foo, T. K., Hellmann, D. B., Lima, J. A., Bluemke, D. A. (2005):** Delayed contrast-enhanced MRI of the aortic wall in Takayasu's Arteritis: initial experience. *AJR*, 184(5), 1427-1431

**Dijkhoff, R. A. P., Maas, M., Martens, M. H., Papanikolaou, N., Lambregts, D. M. J., Beets, G. L., Beets-Tan, R. G. H. (2017):** Correlation between quantitative and semiquantitative parameters in DCE-MRI with a blood pool agent in rectal cancer: can semiquantitative parameters be used as a surrogate for quantitative parameters? *Abdom Radiol*, 42, 1342-1349

**Evans, J. M., Bowles, C. A., Bjornsson, J., Mullany, C. J., Hunder, G. G. (1994):** Thoracic aortic aneurysm and rupture in giant cell arteritis. A descriptive study of 41 cases. *Arthritis Rheum*, 37, 1539-1547

**Evans, J. M., O'Fallon, W. M., Hunder, G. G. (1995):** Increased incidence of aortic aneurysm and dissection in giant cell (temporal) arteritis. A population-based study. Ann Intern Med,122, 502-507

**Evelhoch, J. L., LoRusso, P. M., He, Z. , DelProposto, Z., Polin, L., Corbett, T. H., Langmuir, P., Wheeler, C., Stone, A., Leadbetter, J., Ryan, A. J., Blakey, D. C., Waterton, J. C. (2004):** Magnetic resonance imaging measurements of the response of murine and human tumors tot he vascular-targeting agent ZD6126. Clin Cancer Res,10(10), 3650-3657

**Falini, B., Flenghi, L., Pileri, S., Gambacorta, M., Bigerna, B., Durkop, H., Eitelbach, F., Thile, J., Pacini, R., Cavaliere, A., Martelli, M., Carderelli, N., Sabattini, E., Poggi, S., Stein, H. (1993):** A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. Am J Pathol,142(5), 1359-1372

**Galbraith, S. M., Lodge, M. A., Taylor, N. J., Rustin, G. J., Bentzen, S., Stirling, J. J., Padhani, A. R. (2002):** Reproducibility of dynamic contrast-enhanced MRI in human muscle and tumours: comparison of quantitative and semi-quantitative analysis. NMR Biomed,15, 132-42

**Gonzalez-Gay, M. A., Blanco, R., Rodriguez-Valverde, V., Martinez-Taboada, V. M., Delgado-Rodriguez, M., Figueiroa, M., Uriarte, E. (1998):** Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis: predictors and response to treatment. Arthritis Rheum, 41, 1497-1504

**Gonzalez-Gay, M. A., Garcia-Porrúa, C., Hajeer, A. H., Dababneh, A., Ollier, W. E. (2000):** HLA-DRB1\*04 may be a marker of severity in giant cell arteritis. Ann Rheum Dis, 59(7), 574-575

**Gonzalez-Gay, M. A., Rubiera, G., Piñeiro, A., Garcia-Porrúa, C., Pego-Reigosa, R., Gonzalez-Juanatey, C., Sanchez-Andrade, A., Llorca, J. (2005):** Ischemic heart disease in patients from Northwest Spain with biopsy proven giant cell arteritis. A population based study. J Rheumatol, 32(3), 502-506

**Hawighorst, H., Libicher, M., Knopp, M., Moehler, T. M., Kauffmann, G. W., van Kaick, G. (1999):** Evaluation of angiogenesis and perfusion of bone marrow lesions: Role of semiquantitative and quantitative dynamic MRI. J Magn Reson Imaging, 10, 286-294

**Hayashi, H., Kumazaki, T. (1995):** Case report: inflammatory abdominal aortic aneurysm-dynamic Gd-DTPA enhanced magnetic resonance imaging features. Br J Radiol, 68, 321-323

**Hendrick, R. E., Nelson, T. R., Hendee, W. R. (1984):** Optimizing tissue contrast in magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging, 2(3), 193-204

**Henes, J. C., Müller, M., Krieger, J., Balletshofer, B., Pfannenberg, A. C., Kanz, L., Kötter, I. (2008):** [18F] FDG-PET/CT as a new and sensitive imaging method for the diagnosis of large vessel vasculitis. Clin Exp Rheumatol, 26(49), 48-53

Hoffmann, U., Brix, G., Knopp, M. V., Hess, T., Lorenz, W. J. (1995): Pharmacokinetic mapping of the breast: a new method for dynamic MR mammography. Magn Reson Med, 33(4), 506-514

**Holness, C., Simmons, D. (1993):** Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. Blood, 81, 1607-1613

**Hunder, G. G. (2002):** Epidemiology of giant-cell arteritis. Cleve Clin J Med, 69, 79-82

**Hunder, G. G., Bloch, D. A., Michel, B. A., Stevens, M. B., Arend, W. P., Calabrese, L. H., Edworthy, S. M., Fauci, A. S., Leavitt, R. Y., Lie, J. T., Lightfoot, R. W., Masi, A. T., McShane, D. J., Mills, J. A., Wallace, S. L., Zvaifler, N. J. (1990):** Criteria for the classification of giant cell arteritis. Arthritis Rheum, 33, 1122-1128

**Ingrisch, M., Sourbron, S. (2013):** Tracer-kinetic modeling of dynamic contrast-enhanced MRI and CT. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 40(3), 281-300

**Isebaert, S., De Keyzer, F., Haustermans, K., Lerut, E., Roskams, T., Roebben, I., Van Poppel, H., Joniau, S., Oyen, R. (2012):** Evaluation of semiquantitative dynamic contrast-enhanced MRI parameters for prostate cancer in correlation to whole-mount histopathology. Eur J Radiol, 81(3), 217-22

**Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., Florens-Suarez, L. F., Gross, W. L., Guillemin, L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Jayne, D. R., Kallenberg, C. G. M., Lamprecht, P., Langford, C. A., Lugmani, R. A., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., Ozen, S., Pusey, C. D., Rasmussen, N., Rees, A. J., Scott, D. G. I., Specks, U., Stone, J. H., Takahashi, K., Watts, R. A. (2013):** Revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. Arthritis Rheum, 65(1), 1-11

**Kanda, T., Ishii, K., Kawaguchi, H., Kitajima, K., Takenaka, D. (2014):** High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: Relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. Radiol, 270(3), 834-841

**Kermani, T. A., Matteson, E. L., Hunder, G. G., Warrington, K. J. (2009):** Symptomatic lower extremity vasculitis in giant cell arteritis: a case series. J Rheumatol, 36(10), 2277-2283

**Khalifa, F., Soliman, A., El-Baz, A., El-Ghar, M. A., El-Diasty, T., Gimel'farb, G., Ouseph, R., Dwyer, A. C. (2014):** Models and methods for analyzing DCE-MRI: a review. Med Phys, 41(12), 1-32

**Kiessling, F., Lichy, M., Grobholz, R., Farhan, N., Heilmann, M., Michel, M. S., Trojan, L., Werner, A., Rabe, J., Delorme, S., Kouczor, H-U., Schlemmer, H-P. (2003):** Detektion von Prostatakarzinomen mit T1-gewichteter Kontrastmittel-unterstützter dynamischer MRT. Wertigkeit des Zweikompartimentmodells. Radiol, 43(6), 474-480

**Kim, J. K., Hong, S. S., Choi, Y. J., Park, S. H., Ahn, H., Kim, C. S., Cho, K. S. (2005):** Wash-in rate on the basis of dynamic contrast-enhanced MRI: usefulness for prostate cancer detection and localization. *J Magn Reson Imaging*, 22, 639-46

**Klein, R. G., Hunder, G. G., Stanson, A. W., Sheps, S. G. (1975):** Large artery involvement in giant cell (temporal) arteritis. *Ann Intern Med*, 83, 806-812

**Klink, T., Geiger, J., Both, M., Ness, T., Heinzelmann, S., Reinhard, M., Holl-Ulrich, K., Duwendag, D., Vaith, P., Bley, T. A. (2014 ):** Giant cell arteritis: diagnostic accuracy of MR imaging of superficial cranial arteries in initial diagnosis-results from a multicenter trial. *Radiol*, 273(3), 844-852

**Klose, R., Hoppe, U. (2002):** (S)-Ketamin. Aktuelle interdisziplinäre Aspekte. Springer, Berlin

**Knopp, M. V., Giesel, F. L., Marcos, H., von Tengg-Kobligk, H., Choyke, P. (2001):** Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in oncology. *Top Magn Reson Imaging*, 12(4), 301-308

**Knopp, M. V., Weiss, E., Sinn, H. P., Mattern, J., Junkermann, H., Radeleff, J., Magener, A., Brix, G., Delorme, S., Zuna, I. , van Kaick, G. (1999):** Pathophysiologic basis of contrast enhancement in breast tumors. *J Magn Reson Imaging*, 10(3), 260-266

**Le Hello, C., Levesque, H., Jeanton, M., Cailleux, N., Galateau, F., Peillon, C., Veyssier, P., Watelet, J., Letellier, P., Courtois, H., Maiza, D. (2001):** Lower limb giant cell arteritis and temporal arteritis: followup of 8 cases. *J Rheumatol*, 28(6), 1407-1412

**Leach, M. O., Brindle, K. M., Evelhoch, J. L., Griffiths, J. R., Horsman, M., Jackson, A., Jayson, G., Judson, I. R., Knopp, M. V., Maxwell, R. J., McIntyre, D., Padhani, A., Price, P., Rathbone, R., Rustin, G., Tofts, P., Tozer, G. M., Vennart, W., Waterton, J. C., Williams, S. R., Workman, P. (2003):** Assessment of

anti-angiogenic and anti-vascular therapeutics using magnetic resonance imaging: recommendations for appropriate methodology for clinical trials. Br J Radiol, 76, 87-91

**Liu, M., Liu, W., Li, H., Shu, X., Tao, X., Zhai, Z. (2017):**

Evaluation of takayasu arteritis with delayed contrast-enhanced MR imaging by a free-breathing 3D IR turbo FLASH. Medicine, 96(51), e9284

**Ma-Krupa, W., Jeon, M. S., Spoerl, S., Tedder, T. F., Goronzy, J. J., Weyand, C. M. (2004):** Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. J Exp Med, 199(2), 173-183

**Ma-Krupa, W., Kwan, M., Goronzy, J. J., Weyand, C. M. (2005):** Toll-like receptors in giant cell arteritis. Clin Immunol, 115, 38-46

**Mahr, A. D., Jover, J. A., Spiera, R. F., Hernández-García, C., Fernández-Gutiérrez, B., Lavalley, M. P., Merkel, P. A. (2007):** Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. Arthritis Rheum, 56(8), 2789-2797

**Moehler, T. M., Hawighorst, H., Neben, K., Egerer, G., Hillengass, J., Max, R., Benner, A., Ho, A. D., van Kaick, G., Goldschmidt, H. (2001):** Bone marrow microcirculation analysis in multiple myeloma by contrast-enhanced dynamic magnetic resonance imaging. Int J Cancer, 93(6), 862-868

**Mross, K., Drevs, J., Müller, M., Medinger, M., Marmé, D., Henning, J., Morgan, B., Lebwohl, D., Masson, E., Ho, Y. Y., Günther, C., Laurent, D., Unger, C. (2005):** Phase I clinical and pharmacokinetic study of PTK/ZK, a multiple VEGF receptor inhibitor, in patients with liver metastases from solid tumours. Eur J Cancer, 41 (9), 1291-1299

**Mukhtyar, C., Guillevin, L., Cid, M. C., Dasgupta, B., de Groot, K., Gross, W., Hauser, T., Hellmich, B., Jayne, D., Kallenberg, C. G. M., Merkel, P. A., Raspe, H., Salvarani, C., Scott, D. G. I., Stegeman, C., Watts, R., Westman, K., Witter, J.,**

**Yazici, H., Lugmani, R. (2009):** EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. Ann Rheum Dis, 68, 318-323

**Muruganandham, M., Lupu, M., Dyke, J. P. (2006):** Preclinical evaluation of tumor microvascular response to a novel antiangiogenic/antitumor agent RO 0 281501 by dynamic contrast-enhanced MRI at 1.5 T. Mol Cancer Ther, 5, 1950-1957

**Nagel, E., Lotz, J., Schulz-Menger, J., Bruder, O., Müllerleile, K., Schwaiger, M., Bengel, F., Kelle, S., Steen, H., Vogl, T. J. (2016):** Zerebrale Gadoliniumablagerungen bei der Magnetresonanztomographie des Herzens. Kardiologe, 10, 371-373

**Ness, T., Auw-Hädrich, C., Schmidt, D. (2006):** Temporal arteritis (giant cell arteritis). Clinical picture, histology and treatment. Ophthalmol, 103, 296-301

**Nordborg, E., Nordborg, C. (2003):** Giant cell arteritis: epidemiological clues to its pathogenesis and an update on its treatment. Rheumatol, 42, 413-421

**Nuenninghoff, D. M., Hunder, G. G., Christianson, T. J., McClelland, R. L., Matteson, E. L. (2003):** Mortality of large-artery complication (aortic aneurysm, aortic dissection and/or large-artery stenosis) in patients with giant cell arteritis. A population-based study over 50 years. Arthritis Rheum, 48(12), 3532-3537

**Othman, A., Falkner, F., Weiss, J., Kruck, S., Grimm, R., Martirosian, P., Nikolaou, K., Notohamiprodjo, M. (2016):** Effect of temporal resolution on diagnostic performance of dynamic contrast-enhanced MRI of the prostate. Invest Radiol, 51(5), 290-296

**Oto, A., Fan, X., Mustafi, D., Jansen, S. A., Karczmar, G. S., Rubin, D. T., Kayhan, A. (2009):** Quantitative Analysis of dynamic contrast enhanced MRI for assessment of bowel inflammation in Crohn's disease: pilot study. Academic Radiol, 16(10), 1223-1230

**Proven, A., Gabriel, S. E., Orces, C., O'Fallon, W. M., Hunder, G. G. (2003):**

Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and treatment outcomes. Arthritis Rheum, 49(5), 703-708

**Pryshchev, O., Ma-Krupa, W., Younge, B. R., Goronzy, J. J., Weyand, C. M. (2008):** Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. Circulation, 118(12), 1276-1284

**Rahman, W., Rahman, F. Z. (2005):** Giant cell (temporal) arteritis: an overview and update. Surv Ophthalmol, 50, 418-28

**Reimer, P., Vosshenrich, R. (2004):** Kontrastmittel in der MRT. Substanzen, Wirkungen, Pharmakologie und Zulassung. Radiologe, 44, 273-283

**Reinhold-Keller, E., Zeidler, A., Gutfleisch, J., Peter, H., Gross, W. L., Raspe, H. (2000):** Giant cell arteritis is more prevalent in urban than in rural populations: results of an epidemiological study in primary systemic vasculitides in Germany. Rheumatology, 39(12), 1396-1402

**Reiter, T., Ritter, O., Prince, M. R., Nordbeck, P., Wanner, Ch., Nagel, E., Bauer, W. R. (2012):** Minimizing risk of nephrogenic systemic fibrosis in cardiovascular magnetic resonance. J Cardiovasc Magn Reson, 14, 1-11

**Rummeny, E. J., Reimer, P., Heindel, W. (2002):** Ganzkörper-Tomographie. Thieme, Stuttgart, 27-35, 29-30, 476, 207-210, 295-296

**Saam, T., Habs, M., Cyran, C. C., Grimm, J., Pfefferkorn, T., Schüller, U., Reiser, M. F., Nikolaou, K. (2010):** Neue Aspekte der MRT-Bildgebung zur Diagnostik der Großgefäßvaskulitiden sowie der primären Angiitis des zentralen Nervensystems. Radiol, 50, 861-871

**Salvarani, C., Hunder, G. G. (2001):** Giant cell arteritis with low erythrocyte sedimentation rate: frequency of occurrence in a population based study. Arthritis Rheum, 45, 140-145

**Salvarani, C., Cantini, F., Boiardi, L., Hunder, G. G. (2002):** Polymyalgia rheumatica and giant-cellarteritis. N Engl J Med, 347, 261-271

**Salvarani, C., Cantini, F., Hunder, G. G. (2008):** Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. Lancet, 372, 234-245

**Schmidt, W. A., Gromnica-Ihle, E. (2011):** Polymyalgia rheumatica und Riesenzellarteriitis (Arteriitis temporalis). In: Busse, O., Fleig, W. E., Mayet, W. J. Rationelle Diagnostik und Therapie in der Inneren Medizin: Leitlinien-basierte Empfehlungen für die Praxis. Elsevier, München, 2012

**Schmidt, W. A., Seifert, A., Gromnica-Ihle, E. J., Krause, A., Natusch, A. (2008):** Ultrasound of proximal upper extremity arteries to increase the diagnostic yield in large-vessel giant cell arteritis. Rheumatology, 47, 96-101

**Schmitz, S. A., Coupland, S. E., Gust, R., Winterhalter, S., Wagner, S., Kresse, M., Semmler, W., Wolf, K-J. (2002):** Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Invest Radiol, 35(8), 460-471

**Schwitter, J., Nanz, D., Kneifel, S., Bertschinger, K., Büchi, M., Knüsel, P. R., Marincek, B., Lüscher, T. F., Von Schulthess, G. K. (2001):** Assessment of myocardial perfusion in coronary artery disease by magnetic resonance: a comparison with positron emission tomography and coronary angiography. Circulation, 103(18), 2230-2235

**Simon, G. H., von Vopelius-Feldt, J., Fu, Y., Schlegel, J., Pinotek, G., Wendland, M. F., Chen, M. H., Daldrup-Link, H. E. (2006):** Ultrasmall supraparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of antigen-induced arthritis: a comparative study between SHU 555 C, ferumoxtran-10 and ferumoxytol. Invest Radiol, 41(1), 45-51

**So, M., Yang, K. C., Wu, C. C., Wu, Y. W., Yu, H. Y., Tseng, R. Y., Tseng, W. Y. (2007):** First-pass myocardial perfusion cardiovascular magnetic resonance at 3 Tesla. *J Cardiovasc Magn Reson*, 9(4), 633-644

**Szabó, B. K., Aspelin, P., Kristoffersen, W., Tot, T., Boné, B. (2003):** Invasive breast cancer: correlation of dynamic MR features with prognostic factors. *Eur Radiol*, 13(11), 2425-2435

**Tatò, F., Hoffmann, U. (2008):** Giant cell arteritis: a systemic vascular disease. *Vasc Med*, 13(2), 127-140

**Theis, D., Keil, B., Heverhagen, J. T., Béhé, M., Klose, K-J., Fiebich, M. (2008):** Bestimmung der arteriellen Inputfunktion in einem Mausmodell an einem klinischen MRT-System. *Z Med Phys*, 18, 85-90

**Tofts, P. S. (1997):** Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR Imaging. *J Magn Reson Imaging*, 7(1), 91-101

**Turetschek, K., Preda, A., Floyd, E., Shames, D. M., Novikov, V., Roberts, T. P., Woody, J. M., Fu, Y., Carter, W. O., Brasch, R. C. (2003):** MRI monitoring of tumor response following angiogenesis inhibition in an experimental human breast cancer model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30(3), 448-455

**Weinmann, H. J., Brasch, R. C., Press, W. R., Wesbey, G. E. (1984):** Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *Am J Roentgenol*, 142(3), 619-624

**Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (1999):** Arterial wall injury in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*, 42(5), 844-853

**Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (2003a):** Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med*, 349, 160-169

**Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (2003b):** Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. Ann Intern Med, 139, 505-515

**Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (2009):** Pathogenesis of medium- and large-vessel vasculitis. Z Rheumatol, 68, 100-107

**Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (2013):** Immune mechanisms in medium and large-vessel vasculitis. Nat Rev Rheumatol, 9(12), 731-740

**Weyand, C. M., Kaiser, M., Yang, H., Younge, B., Goronzy, J. J. (2002):** Therapeutic effects of acetylsalicylic acid in giant cell arteritis. Arthritis Rheum, 46, 457-466

**Weyand, C. M., Wagner, A. D., Bjornsson, J., Goronzy, J. J. (1996):** Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. J Clin Invest, 98, 1642-1649

**Wipfler-Freißmuth, E., Dejaco, C., Both, M. (2020):** Langzeitkomplikationen, Monitoring und interventionelle Therapien bei Großgefäßvaskulitiden. Z Rheumatol, 79, 523-531

## 7. Anhang

### 7.1 Tabellarische Darstellung der Materialien

Tabelle 5: Chemikalien und Medizinprodukte

Chemikalien und Medizinprodukte	Bezugsquelle
AEC Substratsystem Dako	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Anti-CD 31-Antikörper Rabbit polyclonal, Isotype IgG ab 124432 Lot: GR 135939-2	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD 68-Antikörper Rabbit monoclonal reacts to human, Isotype IgG Clone: SP 251 MAB: 12199 Lot: 140427 LVC	Abnova Corporation, Taipei, Taiwan
Anti-CD 68-Antikörper Rabbit polyclonal reacts to mouse, Isotype IgG MBS: 175328 Lot: 01511120118105	MyBioSource, San Diego, USA
Antikörperverdünnungspuffer Antibody Diluent medac B1-31 C Lot: 150511002	medac GmbH, Wedel, Deutschland
HRP-Polymer anti-Rabbit Antikörper Ref: ZUC032-006 Lot: N354-2	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Carprofen, Rimadyl®	Zoetis GmbH, Schweiz
Citratpuffer, Dako Retrieval Solution S 1699	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formalinlösung 3,7% in 0,1mol Na-Phosphatpuffer, pH Wert 7,4	fertig angesetzt

Hansaplast-Sprühpflaster®	Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran/Luft-Gemisch, Forene®	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin 100 mg/ml	Fa. Gräub, Bern, Schweiz
Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA) Magnograf®	Bayer Pharma AG, Berlin, Deutschland
Peroxidaseblock S 2023 Lot: 20012698	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rabbit IgG Negativkontrolle, NC495 AA Lot: 120214	Biocare medical, Concord, USA
2-Propanol 50%,70%,90%	Riedel-de Haën AG, Seelze
Rompun 2%	Bayer Pharma AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Medium Ref.:52400025, Gibco®	Gibco® by Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA
Wachs Paraplast® plus	McCormick Scienitific, St.Louis, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterial**

Geräte und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Einmalskalpell, Fig.: 11	Aesculap GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Einmalspritzen, Injekt®-F, 1ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäß 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfhütchen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Einbettkassetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gewebeeinbettautomat LEICA TP 1020	MC Labor OHG, Albstadt, Deutschland
Hydrophober Stift, Elite PAP	Bio Trend, Köln, Deutschland
Kanülen, Sterican®, 0,30 × 12 BL/LB	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Klebeband, Transpore 3M	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Insulinspritzen 11-40 10×1ml, 0,30×8 BD Micro-Fine™	BD Medical, Heidelberg, Deutschland
Isofluran Anlage	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland
Isofluran Dampfer Vapor 19.3	Dräger, Lübeck, Deutschland
Katheter-Schlauch, Leukosilk©	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Main transmission coil, „singel loop“coil	Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland
Mirax® Midi®-Scanner Marlin	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland
MRT 7-Tesla Kleintier-Scanner ClinScan®	Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland
Pertex™	Medite, Nunningen, Deutschland
Pinzette Lot : 4080.16	Stainless Stoma, Tuttlingen, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pippetenspitzen Tip Stack Pack	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Präparierschere Jameson 150mm	Aesculapt GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Präzisionswaage EK-4000H	A&D Company, Limited, Tokyo, Japan
Schermaschine Aesculapt Exacta	Aesculapt Suhl GmbH, Suhl, Deutschland
Small Animal Monitoring and Gating System, Model 1025	SA Instruments Inc, New York, USA
Wärmematte, New T/Pump Warm Water Recirculator	Gaymar Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
Wärmesystem MRT, Thermo Scientific SC100	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Verlängerungsleitung für Druck-Infusionssysteme	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

**Tabelle 7: Software**

Softwarereprodukte	Bezugsquelle
IMPAX SE	AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
MATLAB®	MathWorks, Natick, USA
Microsoft Office® 2007	Microsoft Corporation, USA
Panoramic MIDI®, Panoramic Digital Slide Scanner	3DHISTECH, Budapest, Ungarn
Panoramic Viewer® 1.15.4	3DHISTECH, Budapest, Ungarn
Syngo MR B15	Siemens Medical Solutions Inc, USA

## **7.2 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Marcus Both für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit, der Bereitstellung der finanziellen Mittel, sowie seinem großen Engagement an diesem Projekt bedanken. Die wertvollen Ratschläge, konstruktiven Verbesserungsvorschläge, die stets offene Tür und freundliche Art haben mich immer wieder in meinem Promotionsvorhaben bestärkt und motiviert.

Ganz besondere Dankesworte möchte ich an Herrn PD Dr. med. Sebastian Ullrich und Prof. Dr. med. Schumacher für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes richten. Herrn Michael Kaul verbleibe ich sehr dankbar für seine fachliche Kompetenz und zeitintensive Unterstützung während der experimentellen Arbeiten.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. med. Konstanze Holl-Ulrich, Frau Dr. med. Nina Kesel, Frau Susanne Feldhaus, Frau Gabriele Trompke und Frau Jana Humbert für Ihre sehr hilfsbereite, zeitintensive Unterstützung während der Laborarbeiten, fachlichen Austausch und wertvolle Anregungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Mona Salehi Ravesch für Ihre außerordentlich engagierte Mithilfe, die mir die Fertigstellung meiner Dissertation ermöglicht hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Rizwan Syed bedanken, ohne dessen unermüdliche Unterstützung meines Wunsches einer Promotion, immer noch ein Wunsch geblieben wäre. Seine liebevolle und bedingungslose Unterstützung trotz der Entbehrungen, die er in dieser Zeit erfahren hat, haben mir viel Kraft und Raum für meine persönliche Weiterentwicklung gegeben.

## **7.3 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Karolina Syed, geb. Antosik  
Geburtstag: 1. September 1981  
Geburtsort: Slawno, Polen  
Familienstand: verheiratet

### **Schulische Ausbildung**

09/1988 - 06/1990 Grundschule Cisowo, Polen  
09/1990 - 05/2000 Zeromski-Gymnasium in Darlowo, Polen  
05/2000 Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

05/2000 - 08/2000 Vorbereitungskurse zum Psychologiestudium an der Danziger Universität  
09/2000 - 01/2002 Deutschkurs an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
04/2002 - 12/2007 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel  
04/2014 - jetzt Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Klinik für Radiologie und Neuroradiologie

### **Praktische Tätigkeiten**

04/2008 - 11/2008 Tätigkeit als Assistentzahnärztin in Zahnarztpraxis Dr. Kreitz in Elmshorn, Deutschland  
11/2008 - 09/2009 Tätigkeit als Assistentzahnärztin in Zahnarztpraxis Dr. Moritz in Kiel, Deutschland  
01/2010 - 09/2010 Tätigkeit als Assistentzahnärztin in Zahnarztpraxis Dr. Köpcke, Dres. Bock in Rendsburg, Deutschland  
10/2010 - 12/2015 Selbständigkeit als Zahnärztin in Zahnarztpraxis Dres. Bock, Syed und Freudenhammer in Rendsburg, Deutschland

### **Zitable Abstracts**

Both M, Kaul M, Salehi Raves M, Syed K, Humbert J, Will O, Schumacher U, Jansen O, Ullrich S (2019)

Dynamic contrast enhanced MRI in a xenotransplant model of giant cell arteritis.

DOI: 10.26044/ecr2019/C-3621

European Congress of Radiology 2019, 27. Februar - 3. März 2019, Wien, Österreich;

### **Promotion**

Die Untersuchungen, Experimente und Auswertungen zu dieser Arbeit fanden im Zeitraum vom April 2014 bis April 2017 statt.