

**Technische Universität München**

**Fakultät für Medizin**

Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie

Klinikum rechts der Isar

**Molekulare Bildgebung des Myokardinfarktes unter Verwendung von T1-Mapping und Gadofluorine P bei 7 Tesla kombiniert mit ex-vivo Validierung mittels MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS**

**Laura Walburga Hoffmann**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender:** Prof. Dr. Jürgen Schlegel

**Prüfende der Dissertation:**

1. Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
2. Prof. Dr. Axel Walch

Die Dissertation wurde am 25.08.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.02.2021 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Myokardinfarkt und Infarktheilung</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese .....	1
1.1.2	Ventrikuläres Remodeling .....	2
<b>1.2</b>	<b>Überblick aktueller kardialer in-vivo Bildgebungsverfahren</b> .....	<b>4</b>
1.2.1	Magnetresonanztomographie zur molekularen Bildgebung des Herzens .....	5
1.2.2	Cine-Magnetresonanztomographie .....	6
1.2.3	Late Gadolinium Enhancement (LGE).....	7
1.2.4	Quantifizierung mittels T1-Mapping .....	7
1.2.5	Kardiale MRT-Bildgebung im Mausmodell.....	8
1.2.6	Spezifische molekulare MR-Kontrastmittel .....	9
<b>1.3</b>	<b>Überblick über ex-vivo Validierungsmethoden der bildgebenden Verfahren</b> <b>10</b>	
1.3.1	Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-IMS) .....	11
1.3.2	Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). 12	
<b>1.4</b>	<b>Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Experimentelles Design</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Mausmodell</b> .....	<b>18</b>
2.2.1	Versuchstiere .....	18
2.2.2	Experimentelle Infarktinduktion .....	19
<b>2.3</b>	<b>Magnetresonanztomographie</b> .....	<b>21</b>
2.3.1	Hardware .....	21
2.3.2	Molekulare Magnetresonanztomographie Kontrastmittel .....	22
2.3.2.1	Gadolinium-DTPA .....	22
2.3.2.2	Gadofluorine M.....	22
2.3.2.3	Gadofluorine P .....	23
2.3.3	Sequenztechniken.....	24
2.3.4	Vorbereitung der Versuchstiere.....	26
2.3.5	Kontrastmittelapplikation .....	28
<b>2.4</b>	<b>Post-Mortem Analysen</b> .....	<b>29</b>
2.4.1	Euthanasie der Versuchstiere und Organentnahme .....	29

2.4.2	Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-IMS)	29
2.4.3	Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS)	31
2.4.4	Histologie	32
<b>2.5</b>	<b>Auswertung</b>	<b>32</b>
2.5.1	Magnetresonanztomographie	32
2.5.1.1	Relaxivitätsmessungen	33
2.5.1.2	Cine-Magnetresonanztomographie	34
2.5.1.3	Late Gadolinium Enhancement	36
2.5.1.4	T1-Mapping	38
2.5.2	Ex-vivo Analysen mittels MALDI-TOF-IMS, LA-ICP-MS und Histologie	41
2.5.3	Statistische Auswertung	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Magnetresonanztomographie</b>	<b>44</b>
3.1.1	Relaxivität der Kontrastmittel ex vivo	44
3.1.2	In vivo Bildgebung	45
3.1.2.1	Kinetik der Anreicherung der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P	45
3.1.2.2	Gadofluorine P zur Beurteilung der myokardialen Heilung und des Remodelings nach Myokardinfarkt	48
3.1.2.3	Vergleich der Anreicherung von Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P mit der linksventrikulären Herzfunktion	52
<b>3.2</b>	<b>Ex-vivo Validierung der magnetresonanztomographisch ermittelten Daten</b>	<b>55</b>
3.2.1	Analyse der Gadofluorine P Konzentration mittels MALDI-TOF-IMS	55
3.2.2	Analyse der Gadofluorine P Konzentration mittels elementarer LA-ICP-MS	58
3.2.3	Beurteilung der Synthese extrazellulärer Matrix mittels Histologie	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Wahl des Tiermodells</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Bildgebungsstrategie</b>	<b>65</b>
4.2.1	Das MRT als gewählte Bildgebungsmodalität zur Beurteilung des Remodelings	65
4.2.2	Wahl der Feldstärke	67
4.2.3	Gadofluorine P als molekulares Kontrastmittel	68
4.2.4	T1-Mapping als semi-quantitative Methode	70
<b>4.3</b>	<b>Gadofluorine P zur Beurteilung der myokardialen Heilung und des Remodelings nach Myokardinfarkt</b>	<b>71</b>
<b>4.4</b>	<b>MALDI-TOF-IMS, LA-ICP-MS und Histologie zur ex-vivo Validierung der Bildgebung</b>	<b>73</b>
<b>4.5</b>	<b>Limitationen</b>	<b>76</b>

<b>5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>105</b>

## I Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen nach wie vor die Gruppe der häufigsten Erkrankungen in Industrienationen dar. Heutzutage werden viele akute Myokardinfarkte überlebt und der Fokus der klinischen Forschung verlagert sich hin zu einem besseren Verständnis der Umbau- und Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt. Durch ein genaueres Verständnis dieser Prozesse soll das Auftreten und der Progress einer Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt vermindert werden und damit die Prognose verbessert werden. Nach aktuellem Stand der Forschung spielt die Bildung extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle im Rahmen der Infarktheilung. Sowohl eine vermehrte als auch eine verminderte Synthese wirken sich negativ auf die Prognose nach einem Myokardinfarkt aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die magnetresonanztomographische Bildgebung in Kombination mit den ex-vivo Methoden Histologie, MALDI-TOF-IMS (Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization-Time of Flight-Imaging Mass Spectrometry) und LA-ICP-MS (Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry) zur Charakterisierung der Umbauprozesse nach ischämischer Schädigung des Herzmuskels verwendet. Ziel war es ein kombiniertes Verfahren aus in-vivo Bildgebung und ex-vivo Validierung zu etablieren um damit das Kontrastmittel Gadofluorine P in Bezug auf seine Darstellung extrazellulärer Matrix evaluieren und quantifizieren zu können.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Kinetikanalysen von Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P erstellt, um den bestmöglichen Messzeitpunkt im Zeitverlauf zu ermitteln. Diese wurden sowohl mittels Magnetresonanztomographie (Late Gadolinium Enhancement und T1-Mapping) als auch mittels massenspektrometrischer Verfahren ermittelt. Hierbei zeigte sich eine stabile Anreicherung von Gadofluorine P zwischen 15-45 Minuten mit der höchsten Anreicherung nach 15 Minuten. Darauf basierend wurde das Messprotokoll für die folgenden Versuche erstellt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P in Bezug auf ihre Eigenschaften bei der in-vivo Darstellung des myokardialen Remodelings im Sinne der Bildung extrazellulärer Matrix verglichen. Die

Kontrastmittel wurden dafür im Zeitverlauf zu einem 1- und 6-Wochen Zeitpunkt gemessen. Um in dieser Arbeit eine Quantifizierbarkeit der Ergebnisse zu erlangen, wurde das semi-quantitative Verfahren des T1-Mappings verwendet. Für Gadofluorine P zeigten sich im Vergleich zu Gd-DTPA und Gadofluorine M signifikant erhöhte  $R_1$ -Werte nach 6 Wochen verglichen mit dem 1-Wochen Zeitpunkt. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Akkumulation von Gadofluorine P (im Gegensatz zu Gd-DTPA und Gadofluorine M) im Bereich des Infarktes im Zeitverlauf der Infarktheilung zunimmt. Zusätzlich zeigte das gemessene Gadofluorine P Signal nach 6-Wochen eine starke Korrelation mit der Ejektionsfraktion. Ein solcher Zusammenhang ließ sich nicht bei Gd-DTPA und Gadofluorine M feststellen. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass Gadofluorine P eine hohe Affinität an Proteine der extrazellulären Matrix aufweist und im Rahmen der Infarktheilung vermehrt anreichert, da eine vermehrte Synthese im Rahmen der Narbenbildung stattfindet. Außerdem wurde davon ausgegangen, dass eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix zur Ausbildung einer stabilen myokardialen Narbe führt, die mit einer verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion einhergeht.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die in-vivo gewonnenen Daten zu Gadofluorine P ex-vivo mittels Histologie, MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS validiert. In der Histologie konnte eine verstärkte Bildung von extrazellulärer Matrix nach 6 Wochen nachgewiesen werden. Die MALDI-TOF-IMS Ergebnisse zusammen mit den LA-ICP-MS Ergebnissen konnten die in-vivo gemessenen Ergebnisse im Sinne einer Zunahme der tatsächlichen Gadofluorine P Konzentrationen im Infarktgewebe nach 6 Wochen ebenfalls stützen. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich Gadofluorine P vermehrt im Bereich der myokardialen Narbe anreichert.

Unter Zusammenschau der Ergebnisse konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass Gadofluorine P zur Darstellung extrazellulärer Matrix nach Myokardinfarkt geeignet ist und mit einem kombinierten Vorgehen mit in-vivo, sowie ex-vivo Bildgebungsmethoden eine quantitative Beurteilung der Gadofluorine P Verteilung im Myokard möglich ist.

## II Abkürzungsverzeichnis

CT .....	<i>Computertomographie</i>
EvG .....	<i>Elastica van Gieson</i>
EZM .....	<i>extrazelluläre Matrix</i>
FOV .....	<i>Field-of-view</i>
Gd-DTPA .....	<i>Gadolinium-diethylene triamine penta-acetic acid</i>
HFpEF .....	<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>
KG .....	<i>Körpergewicht</i>
KHK .....	<i>Koronare Herzkrankheit</i>
LAD .....	<i>Left anterior descending artery</i>
LA-ICP-MS.....	<i>Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry</i>
LGE.....	<i>Late Gadolinium Enhancement</i>
MALDI-TOF-IMS.....	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization-Time of Flight-Imaging Mass Spectrometry</i>
MMF.....	<i>Medetomidin-Midazolam-Fentanyl</i>
MOLLI .....	<i>Modified Look-Locker Inversion-recovery</i>
NaCl.....	<i>Natrium-Chlorid</i>
PET .....	<i>Positronen-Emissionstomographie</i>
$r_1$ .....	<i>Relaxivität</i>
$R_1$ .....	<i>Relaxationsrate</i>
ROI .....	<i>Region of Interest</i>
RR.....	<i>Herzschlag</i>
SD.....	<i>Standardabweichung</i>
SNR .....	<i>Signal-to-noise-Ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)</i>
SPECT .....	<i>Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie</i>
T .....	<i>Tesla</i>
TE .....	<i>Echozeit</i>
TR.....	<i>Repetitionszeit</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Myokardinfarkt und Infarktheilung

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen trotz einer kontinuierlich sinkenden Mortalität auch heute noch die häufigste Todesursache in Industrienationen dar. (Cannon, 2013) Betrachtet man die Situation anhand absoluter Zahlen fällt sogar eine Zunahme kardiovaskulärer Todesfälle auf. (Abubakar et al., 2015) Weltweit starben 2016 17,9 Millionen Menschen aufgrund einer kardiovaskulären Erkrankung, das entspricht 31% aller Todesfälle. (World Health Organization, 2017) Unter den kardiovaskulären Erkrankungen stellt der akute Myokardinfarkt in den westlichen Nationen eine häufige Todesursache dar. (Statistisches Bundesamt, 2015) Eine der am häufigsten auftretenden kardiovaskulären Erkrankungen ist die koronare Herzkrankheit (KHK). Über die nächsten Jahre wird es weltweit zu einer weiteren Zunahme der ischämischen koronaren Herzkrankheit kommen. (Cannon, 2013) Unter einer KHK versteht man ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch im Bereich des Herzmuskels. (Riede et al., 2017) Kommt es nicht nur zu einem Missverhältnis, sondern zu einer absoluten Koronarinsuffizienz in einem Versorgungsgebiet der Koronararterien spricht man von einem akuten Myokardinfarkt. Dieser hat den Untergang von Herzmuskelgewebe zur Folge. (Riede et al., 2017). Der akute Myokardinfarkt resultiert häufig aus der Ruptur eines vulnerablen atherosklerotischen Plaques. (Libby, 2013)

Heutzutage werden viele Myokardinfarkte überlebt und der Fokus in der klinischen Versorgung und der prä-klinischen Forschung richtet sich vermehrt auf die nach dem Infarkt stattfindenden Prozesse der myokardialen Infarktheilung und des ventrikulären Remodelings. (Guidry et al., 1999) So konnte beispielsweise in der CARE-Studie gezeigt werden, dass vor allem Patienten im Alter >60 Jahre vermehrt zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz neigen und diese in bis zu 8-14% der Patienten im Verlauf nach Myokardinfarkt auftritt. (Lewis et al., 2003)



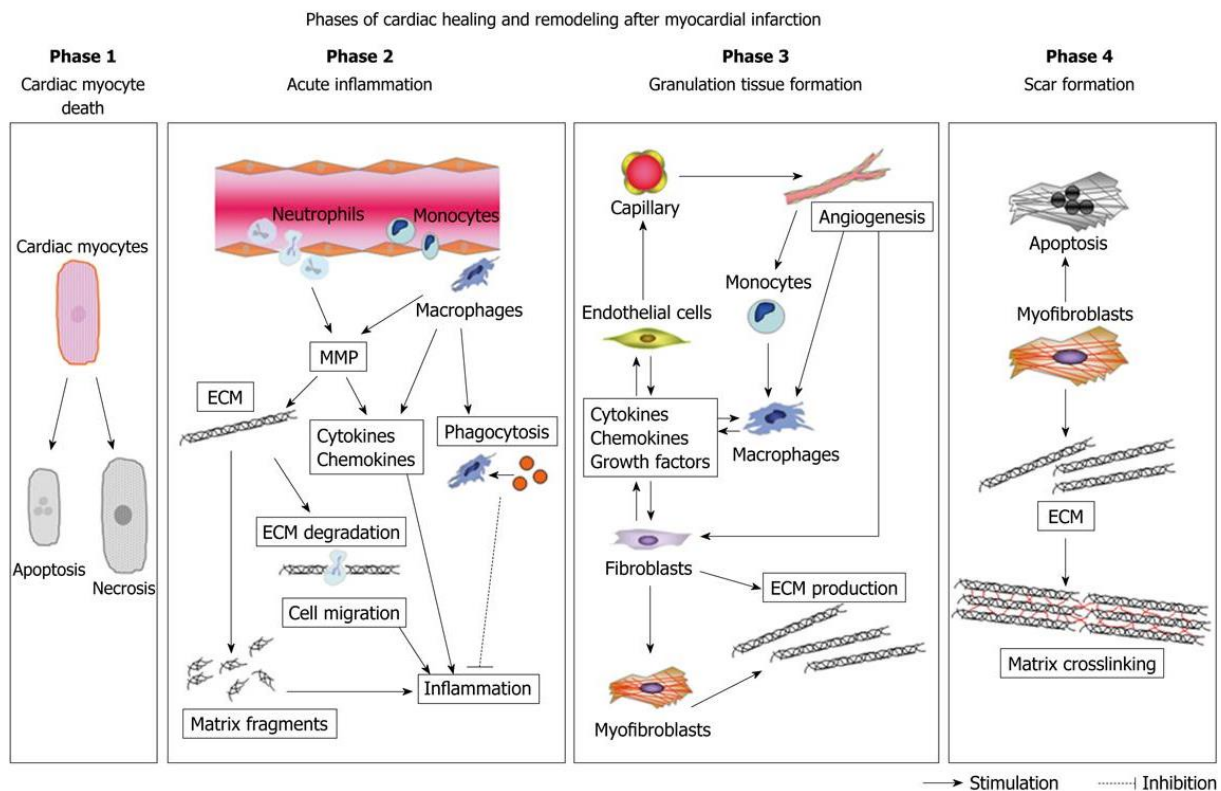
### 1.1.2 Ventrikuläres Remodeling

In der Folge eines Myokardinfarktes kommt es zu Veränderungen auf zellulärer und extrazellulärer Ebene des Herzmuskelgewebes. Ursache hierfür ist der Zelluntergang von Kardiomyozyten während der ischämischen Phase des Myokardinfarktes. Die Ischämie entsteht durch die Unterbrechung des Blutflusses in der Koronararterie und daraus resultierender Minderversorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff. (Curley et al., 2018; DeWood et al., 1980). Die damit verbundene Hypoxie auf Zellebene setzt verschiedene biochemische Prozesse in Gang. Beispielhaft zu nennen sind hier Veränderungen der Glykolyse hin zu einer anaeroben Form und daraus folgende Veränderungen der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Transporter mit resultierender Nekrose. (Avkiran, 2003) (Walls et al., 2011)

Zu Beginn sind diese Ischämie-getriggerten Veränderungen reversibel, gehen jedoch bei Persistenz in eine irreversible Nekrose über. Typischerweise breitet sich diese Nekrose vom Endokard in den subepikardialen Bereich aus und wird in der Literatur als „Wellenfront-Phänomen“ bezeichnet. (Reimer et al., 1979; Reimer et al., 1977). Im Rahmen der Ischämie kommt es zusätzlich zu einer Ödembildung im Bereich des Myokards. Typisch ist eine Zunahme des Ödems im Rahmen der Reperfusion nach Ischämie und eine darauffolgende kontinuierliche Rückbildung im Rahmen der Infarktheilung. (Wisenberg et al., 1988).

Der Heilungsablauf nach Myokardinfarkt kann in drei Phasen gegliedert werden: Inflammation, Proliferation und Ausreifung (Curley et al., 2018) (van der Laan et al., 2013). In einigen Quellen findet sich als zusätzliche erste Phase die Apoptose und Nekrose in direktem Zusammenhang zum Infarktereignis. (Matsui et al., 2010) In der ersten Phase nach Apoptose und Nekrose, beginnend direkt nach dem akuten Ereignis, kommt es durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Chemokinen und Komplementfaktoren zur Einwanderung von Leukozyten. Durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren leiten insbesondere differenzierte Makrophagen den Beginn der proliferativen Phase ein. In der proliferativen Phase kommt es zu einer Zellvermehrung von Fibroblasten und Neubildung von Gewebe im Bereich des Myokardinfarktes. Dies geschieht hauptsächlich durch die Synthese von extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten (van den Borne et al., 2010) und die Neubildung von vaskulären Strukturen. In der dritten Phase kommt es durch die

Apoptose von Fibroblasten und vaskulären Zellen zur Kollagenbildung mit Ausbildung einer Narbe im Myokard. (Jugdutt, 2003) (Civitarese et al., 2017) (Frangogiannis, 2006) (van der Laan et al., 2013) (Souders et al., 2009) Der gesamte Prozess von akutem Myokardinfarkt bis zur Ausbildung einer Narbe, erforscht im Mausmodell, dauert circa 2-3 Wochen. (Gray et al., 2013)



**Abbildung 1: Überblick über die verschiedenen Phasen der Heilung und des Remodelings nach Myokardinfarkt.** Phase 1 beschreibt in dieser Abbildung den akuten Prozess des Zelluntergangs während und kurz nach dem Myokardinfarkt. Hier finden sowohl Prozesse der Apoptose, als auch der Nekrose statt. In Phase 2 kommt es daraufhin zu einer akuten inflammatorischen Reaktion mit Einwanderung verschiedenster Entzündungszellen und Degranulation dieser. In der dritten Phase kommt es zur Formierung von Granulationsgewebe. Hier kommt es zur Ausbildung neuen Gewebes und Angiogenese durch Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen. In der vierten und letzten Phase kommt es zur weiteren Synthese von extrazellulärer Matrix und Vernetzung dieser zu einer stabilen Narbe. (Matsui et al., 2010)

Das Ausmaß des kardialen Remodelings und damit die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist abhängig von der Infarktgröße. Der Infarktgröße wird hierbei eine große prognostische Relevanz zugeschrieben. (Eitel et al., 2010) Es gibt jedoch auch Hinweise in der Literatur, dass Ausmaß und Ablauf der Leukozyteninfiltration eine wichtige Rolle in der Infarktheilung und dem kardialen

Remodeling spielen. (Ibanez et al., 2015) (Baxter, 2002) (Han et al., 2017) (Jung et al., 2017)

Damit es zu einem kardialen Funktionserhalt ohne Ausbildung einer Herzinsuffizienz kommt, ist eine ausgeglichene Balance zwischen Synthese und Abbau extrazellulärer Matrix von essenzieller Bedeutung. Sowohl ein Überschuss als auch ein Mangel kann im weiteren Krankheitsverlauf zu Komplikationen führen. So birgt eine überschießende Bildung die Gefahr einer erhöhten Steifigkeit des Myokards mit abnehmender Compliance und damit einhergehender diastolischer Pumpfunktionsstörung im Sinne einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). (Frangogiannis, 2017) Eine verminderte Bildung von extrazellulärer Matrix hingegen kann ein vergrößertes Infarktareal, sowie eine abnehmende Wanddicke im Bereich des Infarktes zur Folge haben. Hierdurch steigt das Risiko für eine linksventrikuläre Dilatation mit resultierender Herzinsuffizienz enorm. (Konstam et al., 2011) Auch das Risiko für aneurysmatische Erweiterungen der Herzwand bis hin zur Herzwand-Ruptur sind möglich. (Gray et al., 2013) (Ma et al., 2013) (Ma et al., 2012)

## 1.2 Überblick aktueller kardialer in-vivo Bildgebungsverfahren

Um den Prozess der Infarktheilung und des kardialen Remodelings auf molekularer Ebene genauer nachvollziehen zu können, werden in-vivo bildgebende Methoden genutzt, sogenannte „molekulare Bildgebungsverfahren“. Möglich ist das durch spezifisch an molekulare Strukturen bindende Substanzen, die dann durch bildgebende Verfahren sichtbar gemacht werden können. (Phelps, 2000) (Massoud et al., 2003) Die MRT-Bildgebung ist eine der primären Bildgebungsmodalitäten in der Darstellung des kardialen Remodelings und soll in dieser Arbeit im Fokus stehen.

Weitere häufig genutzte Bildgebungsverfahren stellen vor allem nuklearmedizinische Verfahren wie die Einzelphotonen-Emissionscomputer-tomographie (SPECT) oder die Positronen-Emissionstomographie (PET) dar. (Curley et al., 2018). Mit der SPECT Bildgebung sind mit neueren Geräten Ortsauflösungen von 4 mm möglich (Bhusal et al., 2018), mit der PET-Bildgebung von bis zu 2-4 mm möglich. Ein Vorteil der SPECT-Bildgebung ist die zusätzliche Darstellung von Ischämiezuständen im Herzmuskel, wohingegen andere Bildgebungsarten nur eine morphologische und funktionelle Beurteilung der Herzwand erlauben. (Wagner et al., 2003) Für die molekulare

nuklearmedizinische Bildgebung mittels SPECT oder PET sind spezifisch an Moleküle der extrazellulären Matrix bindende Tracer vorhanden mit denen die Vorgänge des kardialen Remodelings dargestellt werden können. (Greenwood et al., 2012) (Curley et al., 2018)

Die Echokardiographie ist weit verbreitet, um die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zu bestimmen, sowie einen Überblick über die Pump- und Klappenfunktion zu erhalten. Zusätzlich lassen sich Komplikationen wie ein Perikarderguss erkennen. Neuere Anwendungsgebiete sind die Stress-Echokardiographie zur Darstellung einer klinisch latenten koronaren Herzkrankheit und die Kontrast-Echokardiographie. (Pontone et al., 2017) Letztere erhöht die diagnostische Genauigkeit der Echokardiographie und verstärkte die Verwendung vor allem in der Diagnostik der stabilen Angina pectoris. (Chahal et al., 2010) In Zukunft könnte sich die Echokardiographie von der aktuell vor allem funktionell genutzten Anwendung hin zu einer Gewebedarstellung entwickeln. So zeigen erste Studien, dass sich Narbengewebe nach Myokardinfarkt in der Echokardiographie ähnlich wie im MRT darstellen lässt. (Gaibazzi et al., 2016)

Eine weitere Methode ist die Computertomographie. Sie wird häufig bei Angina pectoris Beschwerden und niedriger Vortestwahrscheinlichkeit hinsichtlich eines Myokardinfarktes zum Ausschluss durchgeführt. Aktuelle Entwicklungen gehen hin zu Charakterisierung und Schweregradeinteilung der Koronararterienplaques. So werden aktuell Studien zu Perfusions-CT und fractional flow reserve CT durchgeführt, beides Methoden, um die funktionelle Relevanz von Koronarstenosen einschätzen zu können. (Pontone et al., 2015) Die Methode des dual-energy CTs erlaubt es die Beschaffenheit und Morphologie der Plaques genauer zu charakterisieren. (Andreini et al., 2015) Insbesondere auf die Magnetresonanztomographie soll aufgrund der guten Darstellbarkeit extrazellulärer Matrix im weiteren Verlauf eingegangen werden.

### **1.2.1 Magnetresonanztomographie zur molekularen Bildgebung des Herzens**

Die MRT-Bildgebung wird zunehmend in der klinischen und prä-klinischen Forschung genutzt. (Vassiliou et al., 2018) (Hundley et al., 2010) Aufgrund des guten Weichteilkontrastes kommt sie häufig zur genaueren Beurteilung der Beschaffenheit des Myokards zum Einsatz. Es können Ödeme und Nekrosen, wie sie bei der

Myokarditis auftreten gut dargestellt werden. (Gannon et al., 2019) Außerdem kann sie neben der Echokardiographie genutzt werden, um die ventrikuläre Ejektionsfraktion zu bestimmen. (Muser et al., 2018) Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind die MR-Angiographie zur anatomischen Beurteilung von Koronararterien und Bypässen. (Pontone et al., 2017)

Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass mit der durch MRT-Bildgebung möglichen Darstellung von kardialer Infarktheilung und Remodeling nach einem Herzinfarkt prognostische Aussagen in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz getroffen werden können. (Konstam et al., 2011) Im Vergleich zu anderen Bildgebungsverfahren hat das MRT viele Vorteile. Es kommt zu keiner Verwendung von potenziell schädlicher ionisierender Strahlung. Es können Auflösungen im Bereich von  $<1$  mm erreicht werden. Zudem ist die MRT-Bildgebung in der Darstellung von narbigem Gewebe vorherrschend. (Klein et al., 2002) Zusätzlich zeichnet sich das MRT durch eine gute Darstellbarkeit von Weichteilgeweben aufgrund eines hohen Weichteilkontrasts aus. (Sammet, 2016) Durch die verschiedenen möglichen Sequenzen ist es zudem möglich sowohl gut aufgelöste anatomische Bilder als auch Funktionsparameter zu bestimmen. (Sosnovik et al., 2007) Heutzutage gibt es eine Vielzahl an verwendbaren Sequenzen in der kardialen MRT-Bildgebung, welche je nach Fragestellung vielfältig eingesetzt werden können. (Vassiliou et al., 2018) Im Folgenden sind die Grundlagen der häufigsten Sequenzen erläutert, beginnend mit der Cine-Sequenz.

### **1.2.2 Cine-Magnetresonanztomographie**

Cine-Sequenzen werden üblicherweise genutzt, um eine funktionale Bildserie des Herzens zu erhalten. Sie stellen eine gute Methode zur Darstellung der Ventrikelgröße, der Wandbewegungen und zur Quantifizierung der systolischen Funktion dar. (Bellenger et al., 2000) (Becker et al., 2018) Typischerweise wird zur Erstellung dieser Sequenz eine zweidimensionale Gradientenechosequenz verwendet. Wichtig für eine gute Bildqualität ist die Synchronisation der Bildakquisition mit EKG-Signal und Atmung. Die Cine-Sequenz bietet einen guten Kontrast in der Darstellung des Herzens und lässt das Blut hyperintens und das Myokard hypointens erscheinen. (Chan et al., 2012) Es werden mehrere Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten des Herzzyklus erstellt und kumuliert, um daraus eine Videosequenz der gesamten Herzaktion

erstellen zu können. Aufgrund der genannten Möglichkeiten stellt die Cine-Sequenz die Methode der Wahl zur funktionalen Beurteilung des Herzens dar. (Lorenz et al., 1999) (Chan et al., 2012) (Vassiliou et al., 2018)

### **1.2.3 Late Gadolinium Enhancement (LGE)**

Die LGE-Sequenz wird in der akuten Infarkt Diagnostik zur Darstellung der Nekrose genutzt. Es lässt sich verlässlich die Infarktgröße darstellen. Zusätzlich wird die LGE-Sequenz genutzt, um im Verlauf die strukturellen Veränderungen des kardialen Remodelings zu untersuchen. (Chan et al., 2012) Im klinischen Alltag wird LGE in der kardialen Bildgebung vielfach zur kardialen Vitalitätsdiagnostik eingesetzt. (Romero et al., 2012) (Dastidar et al., 2016) Bei der LGE-Sequenz handelt es sich um eine T1-gewichtete Darstellung des Herzens nach Administration von Gadolinium-haltigem Kontrastmittel, im klinischen Alltag meistens des Chelates Gadolinium-diethylene triamine penta-acetic acid (Gd-DTPA). (Chan et al., 2012) (Vassiliou et al., 2018) Gadolinium-haltiges Kontrastmittel reichert sich vorwiegend im extrazellulären Raum an und führt dort zu einer Verkürzung der T1-Zeit mit Zunahme der Signalintensität. Seine Eigenschaften sorgen dafür, dass es im Bereich von Nekrosen, fibrotischen und narbigen Bereichen länger nachweisbar ist als in vitalem Gewebe. Daraus ergibt sich der Name des Late Gadolinium Enhancements in diesen pathologisch veränderten Bereichen. (Choi et al., 2001) (Dastidar et al., 2016) (Chan et al., 2012)

### **1.2.4 Quantifizierung mittels T1-Mapping**

Ein Problem in der bisherigen MRT-Bildgebung ist die mangelnde Möglichkeit einer Quantifizierung der Gadolinium-Anreicherung im Gewebe. (Baxa et al., 2016) Das T1-Mapping ermöglicht eine direkte Messung der T1-Zeit. Hierdurch wird die Auswertung unabhängiger von der Erfahrung des Untersuchers und insgesamt vergleichbarer. (Mewton et al., 2011) (Pattanayak et al., 2015) Vor allem im Bereich der molekularen Bildgebung ist T1-Mapping eine vielversprechende Variante um extrazelluläre Matrix und andere Gewebe quantitativ darstellen zu können. (Kammerlander et al., 2016) Das T1-Mapping stellt hierbei im Vergleich zum LGE eine wesentlich sensitivere Bildgebungsmodalität dar, um bereits geringe Veränderungen in der Gewebsstruktur des Myokards darzustellen. Besonders zur Diagnostik von kardialen Erkrankungen mit interstitieller Manifestation im Sinne einer Inflammation oder Kardiomyopathie wird das T1-Mapping im klinischen Kontext häufig verwendet. (Mewton et al., 2011) (Puntmann

et al., 2016) Trotz der vielversprechenden Ergebnisse ist weitere Forschung notwendig. (Moon et al., 2013).

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Formen der Relaxation unterschieden, T1-Relaxation (longitudinale Spin-Gitter Relaxation) und T2-Relaxation (transversale Spin-Spin Relaxation). (Curley et al., 2018) (Sosnovik et al., 2007) (Vassiliou et al., 2018) (James et al., 2012) (Jivraj et al., 2014) Grundlage des T1-Mappings stellt eine T1-gewichtete Aufnahme nativ oder nach Applikation von Kontrastmittel dar. Mit der Methodik des T1-Mappings ist es möglich, die T1-Relaxationszeiten pro Pixel direkt darzustellen. Um zu dieser Darstellung zu gelangen müssen diverse Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der T1-Relaxation aufgenommen werden. (Vassiliou et al., 2018) (Ridgway, 2010) Die registrierte T1-Relaxationszeit ist die Zeit, zu der die Magnetisierung auf 63% des Ausgangswertes zurückgegangen ist. (Mewton et al., 2011) Die T1-Zeit stellt somit eine Abklingkonstante für die exponentielle Relaxation der Magnetisierung in der longitudinalen Achse dar. (Taylor et al., 2016) Zur Erstellung der T1-Maps werden standardmäßig Modified Look-Locker Inversion-recovery (MOLLI) Sequenzen oder hiervon abgewandelte Versionen verwendet. (Messroghli et al., 2004) (Piechnik et al., 2010) Für die Erstellung der Look-Locker Sequenz wird ein Inversionspuls gesetzt, um daraufhin die Abklingkurve der T1-Relaxation zu erstellen. Für das kardiale T1-Mapping erfolgt die Bildakquisition in den auf den Inversionspuls folgenden Diastolen. Dieser Prozess wird nach einer kurzen Pause und jeweils leicht veränderten Inversionszeiten mehrmals wiederholt. So ist es möglich eine möglichst akkurate Abbildung der T1-Relaxationskurve zu erhalten. Im nächsten Schritt werden die Bilder anhand ihrer Inversionszeit sortiert und die T1-Zeit jedes Pixels an die Abklingkurve angepasst. Diese Werte werden für jeden Pixel des Bildes ermittelt und in einem speziellen Computerprogramm zu einer T1 Kartierung, der sogenannten Map verrechnet. (Taylor et al., 2016) Kontrastmittel führt, je nach Stärke der Anreicherung, typischerweise zu einer Verkürzung der T1-Relaxationszeit. Durch die direkte Umwandlung von Relaxationszeiten pro Pixel in Grau- oder Farbwerte ergibt sich die quantitative Aussagekraft dieser Methode. (Moon et al., 2013) (Pattanayak et al., 2015)

### **1.2.5 Kardiale MRT-Bildgebung im Mausmodell**

Zur Erforschung des kardialen Remodelings mittels molekularen Bildgebungsverfahren sind präklinische Tiermodelle notwendig. Insbesondere das

Mausmodell stellt ein etabliertes Modell zur Erforschung des Herzens dar, da die Anatomie und Physiologie des Herzens dem Menschen ähnlich sind. (Rai et al., 2017) (Milani-Nejad et al., 2014) Häufig in der kardiovaskulären Forschung verwendet werden weibliche Mäuse des Typs C57BL/6J. Dieser Typ Maus verfügt verglichen mit anderen Mauslinien über ein kompetentes Immunsystem und ist somit in Bezug auf Heilungsprozesse wie die Myokardheilung mit dem Menschen vergleichbar. Typischerweise werden weibliche Mäuse aufgrund der einfacheren Käfighaltung, sowie des Einflusses der Östrogen-Rezeptoren auf den Gefäßen verwendet. (Rani S. Sellers, 2017) (R. S. Sellers et al., 2012) (Cavasin et al., 2004) (Otsuki et al., 2003) Das Mausmodell stellt eine gute und reproduzierbare Möglichkeit der Infarktinduktion dar. (Milani-Nejad et al., 2014) Viele Studien konnten zeigen, dass die Vorgänge des Remodelings nach Myokardinfarkt im Mausmodell ähnlich denen im menschlichen Körper sind. In beiden Fällen kommt es zu Beginn zu einem inflammatorischen Prozess mit darauffolgend stattfindender Angiogenese, Zellproliferation, Kollageneinlagerung und Narbenbildung. (Gray et al., 2013) (Patten et al., 1998) (Muthuramu et al., 2014)

### **1.2.6 Spezifische molekulare MR-Kontrastmittel**

Mit den oben beschriebenen LGE und T1-Mapping Sequenzen ist eine Darstellung des Myokardinfarktes und der Infarktgröße möglich. Um die Prozesse der Infarktheilung und des kardialen Remodelings darstellen und daraus prognostische Aussagen in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ableiten zu können, ist es wünschenswert spezifisch an extrazelluläre Matrix bindende Kontrastmittel zu verwenden, die für die Umbauprozesse nach stattgehabtem Herzinfarkt hoch relevant sind. (Ramos et al., 2018) (Mavrogeni et al., 2017) (Geelen et al., 2012)

Heutzutage gibt es eine breite Auswahl an spezifisch bindenden Kontrastmitteln, die beispielsweise spezifisch an Kollagen (Helm et al., 2008) (Caravan et al., 2007) oder Elastin (Wildgruber et al., 2014) binden. Im Rahmen des kardialen Remodelings kommt es zu einer Zunahme an extrazellulärer Matrix und somit einer verstärkten Anreicherung von Kontrastmittel in diesem Bereich. (Dastidar et al., 2016)

Ein spezifisches Kontrastmittel stellt ein an Elastin-bindendes MRT-Kontrastmittel dar. Elastin spielt eine wichtige Rolle in Remodeling-Prozessen im Herzen und den Gefäßen, beispielweise nach Myokardinfarkt. So wurden Elastin-spezifische



Kontrastmittel in verschiedenen Studien zur Gefäßdarstellung (Reimann et al., 2018) (Makowski et al., 2012) (Botnar et al., 2014) (Okamura et al., 2014) und zur Darstellung von Remodeling Vorgängen verwendet. Von Bary et al. und Wildgruber et al. stellten mittels Elastin-spezifischer Kontrastmittel das Remodeling im Bereich des Herzes dar. (von Bary et al., 2011) (Wildgruber et al., 2014)

Ein spezifisches Gadolinium-haltiges Kontrastmittel, welches für die experimentelle Magnetresonanztomographie entwickelt wurde, ist Gadofluorine M. Hierbei handelt es sich um ein makrozyklisches, amphiphiles Kontrastmittel. Verglichen mit Gd-DTPA zeichnet es sich durch eine höhere Relaxivität und längere Plasmahalbwertszeit aus. (Sirol et al., 2004) (Misselwitz et al., 1999) (Misselwitz, 2006) (Aichler et al., 2015) Im Bereich der kardiovaskulären Forschung wurde Gadofluorine M erfolgreich in mehreren Studien zur Darstellung von atherosklerotischen Plaques in der MRT-Bildgebung verwendet. (Sirol et al., 2009) (Ronald et al., 2009) (Zheng et al., 2008) (Meding et al., 2007) Es konnte gezeigt werden, dass Gadofluorine M spezifisch an Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder Proteoglykane bindet. (Barkhausen, 2003) (Meding et al., 2007) Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass sich mehr Gadofluorine M im Infarktbereich als im gesunden Myokard anreichert. (Aichler et al., 2015)

Ein neues Kontrastmittel stellt Gadofluorine P dar. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung von Gadofluorine M. Viele Eigenschaften, wie der amphiphile Charakter und die spezifische Bindungsaffinität an Moleküle der extrazellulären Matrix sind daher sehr ähnlich zu Gadofluorine M. Ein Hauptunterschied ist eine kürzere Halbwertszeit. (Sheng et al., 2011) Bislang gibt es wenige Studien zu möglichen Anwendungsgebieten von Gadofluorine P. Vor allem im Bereich der kardialen Infarkt bildgebung gibt es bis jetzt keine Studien mit der Anwendung von Gadofluorine P.

### **1.3 Überblick über ex-vivo Validierungsmethoden der bildgebenden Verfahren**

In den vergangenen Jahren war es zwar möglich die Gadolinium-Aufnahme ex-vivo im Gewebe zu quantifizieren und mit den Bildgebungsdaten zu korrelieren, jedoch lange nicht eine orts aufgelöste Messung durchzuführen. Somit konnte die real vorhandene

Kontrastmittelkonzentration im Gewebe nicht validiert werden. Eine Validierung der in-vivo gemessenen Kontrastmittelkonzentration ist wichtig um verschiedene Bildgebungsmethoden miteinander vergleichen und evaluieren zu können. Die orts aufgelöste ex-vivo Messung kann hierbei als Referenzwert verwendet werden. (Aichler et al., 2015) Da es sich bei dem oben erwähnten T1-Mapping um eine in-vivo Bildgebung handelt, ist zwar das Bildgebungssignal quantifizierbar, dieses Signal spiegelt jedoch aufgrund von biologischen Vorgängen und Faktoren nicht zwingend die reell vorhandene Menge an Kontrastmittel im Gewebe wider. (Aichler et al., 2015) Das liegt vor allem an der oftmals nicht-linearen Korrelation von in-vivo Signal und ex-vivo gemessener Gadolinium-Konzentration. (Kochebina et al., 2019) (Ramalho et al., 2016) So sind beispielsweise chemische Einflüsse, die Oxygenierung oder auch der Verteilung der Gadolinium-Moleküle im Intra- oder Extrazellularraum mögliche Quellen für individuelle Unterschiede der Signalintensität. (Tanimoto et al., 2001) (Terreno et al., 2006) (Aichler et al., 2015) Es handelt sich beim T1-Mapping somit um ein semi-quantitatives Verfahren. In der letzten Zeit wurden neue ex-vivo Methoden, die eine ortsauflösende Quantifizierung des Gadolinium-Kontrastmittels im Gewebe erlauben, entwickelt. (Gessel et al., 2014) (Kaya et al., 2017) (Spraggins et al., 2016) (Hachmoller et al., 2017) (P. Kim et al., 2018) Auf diese soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### **1.3.1 Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-IMS)**

Die MALDI-TOF-IMS Methode stellt eine Möglichkeit mit guter Ortsauflösung zur Darstellung von Gadolinium im Gewebe dar. (Aichler et al., 2015) Mit der zugrundeliegenden Technik der MALDI-TOF-IMS können verschiedenste endogene, sowie auch exogen zugeführte Moleküle, wie Medikamente, Tracer oder Kontrastmittel dargestellt werden. Für all diese Moleküle wird es dadurch möglich ex-vivo im Gewebe mit guter Ortsauflösung die Verteilung spezifischer Moleküle aufzuzeigen. (Norris et al., 2013) 2009 konnte erstmals ein Gadolinium-haltiges MRT-Kontrastmittel mittels MALDI-TOF-IMS in Mäuselebern dargestellt und validiert werden. (Acquadro et al., 2009) Darauf folgend konnte gezeigt werden, dass verschiedenste Gadolinium-haltige Kontrastmittel nach in-vivo Gabe ex-vivo dargestellt werden können. So zeigten Aichler et al., dass MALDI-TOF-IMS zur Validierung der MRT-Bildgebung nach Myokardinfarktinduktion im Mausmodell möglich ist. (Aichler et al., 2015)

### **1.3.2 Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS)**

Das oben vorgestellte MALDI-TOF-IMS Verfahren ist Matrix-basiert und verfügt über ein Auflösungsvermögen von bis zu 50 µm und kann somit zur Analyse von Molekülen wie Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln eingesetzt werden.

LA-ICP-MS hingegen benötigt keine Matrix und verfügt über ein Auflösungsvermögen von ca. 5 µm und ist damit zur Analyse des elementaren Gadoliniums auf zellulärer Ebene geeignet. Es stellt aufgrund des Auflösungsvermögens spezifisch nur das Gadolinium-Ion dar und nicht das gesamte Kontrastmittel-Molekül. In den letzten Jahren konnte in ersten Studien gezeigt werden, dass die LA-ICP-MS eine gute Methode darstellt um die Verteilung von Gadolinium im Gewebe ex-vivo quantitativ nachweisen zu können. (Kamaly et al., 2010) (Birka et al., 2015) (Managh et al., 2013) Es konnte gezeigt werden, dass in Kombination mit der MRT-Bildgebung zusätzliche Informationen über die Verteilung von Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln im Gewebe möglich sind (Pugh et al., 2012) Insbesondere Gadolinium-Ablagerungen im Gehirn konnten nur schwer in der MRT-Bildgebung nachgewiesen werden. Mittels LA-ICP-MS konnte in verschiedenen Studien ein verbesserter und quantitativer Nachweis der Ablagerungen gelingen. (Clases et al., 2019) (Fingerhut et al., 2018)

## **1.4 Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit**

Kardiales Remodeling stellt einen wichtigen Umbauprozess mit Einfluss auf Verlauf und Prognose der Erkrankung nach einem Myokardinfarkt dar. Um die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Vorgänge besser zu verstehen, kommt der molekularen Bildgebung ein großer Stellenwert zu. Zusätzlich könnte in Zukunft mit Hilfe von bildgebenden Methoden das patienten-individuelle kardiale Remodeling dargestellt werden. Darauf basierende Diagnose- und Therapiekonzepte könnten dem Übergang in eine Herzinsuffizienz nach stattgefundenem Myokardinfarkt frühzeitig entgegenwirken. (Jivraj et al., 2014)

Nach aktuellem Stand der Forschung spielt die Bildung extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle im Rahmen der Infarktheilung. Sowohl eine vermehrte als auch eine verminderte Bildung führen zu prognostisch schlechteren Verläufen durch vermehrte Steifigkeit oder Ausdünnung des Myokards. (Frangogiannis, 2017) (Konstam et al.,

2011) Die Vorgänge im Rahmen des kardialen Remodelings konnten in den letzten Jahren vermehrt durch molekulare Bildgebung mit zielgerichteten Kontrastmitteln dargestellt werden. Mit Gadofluorine M konnte gezeigt werden, dass ein Kontrastmittel spezifisch an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Kollagen bindet. In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass Gadofluorine P als Abkömmling vergleichbare Bindungseigenschaften aufweist und aufgrund der günstigeren kinetischen Eigenschaften zur Darstellung der EZM-Bildung geeignet ist.

Diese Arbeit fokussierte sich auf Gadofluorine P und seine Rolle im Rahmen der Infarktheilung und des Remodelings. Hierbei wurde das Kontrastmittel verglichen mit dem unspezifischen klinischen Referenzstandard Gd-DTPA und dem experimentell genutzten Gadofluorine M. In dieser Arbeit wurde in-vivo MRT-Bildgebung mit ex-vivo Validierung durch massenspektrometrische Verfahren kombiniert, um eine Quantifizierung der Gadofluorine P Akkumulation zu erreichen.

Grundlage dieser Arbeit war die Hypothese, dass sich mittels Gadofluorine P die Bildung extrazellulärer Matrix im Verlauf der Infarktheilung darstellen und verfolgen lässt. Zusätzlich sollte nachgewiesen werden, dass sich die genaue Verteilung von Gadofluorine P im Gewebe ex-vivo mittels massenspektrometrischer Verfahren darstellen und quantifizieren lässt.

Um diese Hypothese zu bekräftigen sollten anhand eines Mausmodells nach permanenter Ligatur der LAD verschiedene Experimente in einem 7 Tesla (T) Kleintier-MRT mit Hilfe der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P durchgeführt werden. Hierbei wurde Gadofluorine P hinsichtlich seiner Visualisierung in Bezug auf die Bildung extrazellulärer Matrix nach Myokardinfarkt beurteilt. Zur ex-vivo Validierung der im MRT gewonnenen Daten wurden zusätzlich Untersuchungen mittels MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS, sowie einer Elastica van Gieson (EvG) Färbung durchgeführt.

Die Arbeit basierte auf den folgenden Hypothesen:

- Gadofluorine P ermöglicht eine Beurteilung der Bildung extrazellulärer Matrix, insbesondere der Kollagenbildung, im Zeitverlauf nach stattgehabtem Infarkt

- Eine verstärkte Gadofluorine P Signalintensität spricht für eine vermehrte Narbenbildung im Bereich des Infarktes aufgrund von vermehrter Synthese extrazellulärer Matrix
- Eine erhöhte Gadofluorine P Intensität geht im Sinne einer vermehrten extrazellulären Matrixbildung mit einer erhöhten Ejektionsfraktion einher
- Gadofluorine P ist in seiner Fähigkeit extrazelluläre Matrix in-vivo darzustellen Gd-DTPA und Gadofluorine M überlegen
- Massenspektrometrische Verfahren komplementieren die Ortsauflösung und Quantifizierung von Gadofluorine P und können die tatsächlich im Gewebe aufgenommene Kontrastmittelmenge darstellen

Aus den Hypothesen ergaben sich die folgenden konkreten Fragestellungen für diese Arbeit:

- Charakterisierung des Verhaltens der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P im Sinne einer Kinetik im Zeitverlauf zur Ermittlung der jeweils höchsten Kontrastmittelkonzentration um den optimalen Messzeitpunkt festzulegen
- Vergleich der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P zum 1- und 6- Wochen Zeitpunkt zur Erfassung eines frühen und eines späten Zeitpunktes der Infarktheilung und der fortschreitenden Bildung extrazellulärer Matrix
- Vergleich des Verhaltens der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P hinsichtlich der Darstellung von extrazellulärer Matrix zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt
- Korrelation der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion
- Ex-Vivo Validierung der in-vivo ermittelten Intensität von Gadofluorine P mittels massenspektrometrischer Verfahren wie LA-ICP-MS und MALDI-TOF-IMS

Basierend auf den konkreten Fragestellungen wurden die experimentellen Versuche unter Einbeziehung von in-vivo MRT-Bildgebung und ex-vivo massenspektrometrischer Verfahren entwickelt und durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Experimentelles Design

Die für diese Arbeit gewählte Methodik diente der in-vivo Darstellung und nachfolgenden ex-vivo Validierung von Heilungs- und Remodelingvorgängen im Herzen nach Myokardinfarkt. Die dafür verwendeten Methoden ließen sich in zwei Kategorien einteilen. Zuerst wurden mit einem 7 Tesla MRT in-vivo Aufnahmen zur Darstellung der Herzfunktion und Kontrastmittelaufnahme angefertigt. Darauffolgend wurden die dort gemessenen Werte mit massenspektrometrischen Verfahren, sowie Histologie validiert.

Vor der eigentlichen in-vivo Bildgebung wurden zur Identifizierung der geeigneten Kontrastmittelkonzentration Relaxivitätsmessungen von Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P durchgeführt. MRT-Kontrastmittel sind vorrangig durch ihre Relaxivität charakterisiert. Die Relaxivität variiert vor allem in Abhängigkeit der Feldstärke und des Lösungsmediums. Die Messungen der Kontrastmittel erfolgten jeweils bei Feldstärken von 1, 3 und 7 Tesla. Die Kontrastmittel wurden hierfür in 0,9%iger Natrium-Chlorid (NaCl)-Lösung, sowie in menschlichem Blutserum seriell verdünnt.

Auf Basis der Relaxivitätsmessungen konnte die geeignete Konzentration der Kontrastmittel für die weitere in-vivo Bildgebung festgelegt werden. Zum 1-Wochen Zeitpunkt wurde zuerst eine Kontrastmittel-Kinetik durchgeführt, um den Zeitpunkt des maximalen Signals des Kontrastmittels zu erfassen, um darauf die nachfolgenden Versuche aufzubauen. Eine separate Kinetik wurde für jeweils Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P erstellt. Hierzu wurden in 5-minütigen Abständen bis zu einer Gesamtdauer von 120 Minuten abwechselnd LGE und T1-Mapping Aufnahmen angefertigt (n=6).

Um den Heilungsprozess und das kardiale Remodeling optimal zu verfolgen, wurden die darauffolgenden MRT-Bildgebungen jeweils zu einem 1- (n=5) und 6-Wochen (n=5) Zeitpunkt durchgeführt. Der 1-Wochen Zeitpunkt wurde hierbei gewählt, um kurz nach Infarktinduktion das Ausmaß und die frühen Heilungsvorgänge im Infarkt darzustellen. Der 6-Wochen Zeitpunkt wurde gewählt, um das Ausmaß und die

zeitliche Entwicklung des kardialen Remodelings und die damit einhergehende Funktionseinschränkung des Herzens zu beurteilen.

Zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt wurden die gleichen Bildgebungsprotokolle verwendet. Hierbei wurde jeweils zuerst eine native Cine-Aufnahme jedes Versuchstiers angefertigt, um die kardiale Funktion im Zeitverlauf zu beurteilen. Daraufhin wurden an jeweils drei verschiedenen Tagen die Kontrastmittel – Gd-DTPA, Gadofluorine P und Gadofluorine M – gespritzt. Dieser zeitliche Abstand war wichtig, um sicherzustellen, dass das vorherige Kontrastmittel komplett aus dem Körper der Maus ausgeschieden wurde. Es wurden daraufhin jeweils zum 1- als auch zum 6-Wochen Zeitpunkt in denselben 5 Versuchstieren LGE und T1-Mapping Messungen mit allen drei Kontrastmitteln – Gd-DTPA, Gadofluorine P und Gadofluorine M – über 20 Minuten nach Injektion des Kontrastmittels durchgeführt.

Nach Abschluss der in-vivo Versuche erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere und die Proben wurden für die ex-vivo Versuche aufbereitet. Das Ziel der ex-vivo Validierungsmethoden war es eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix zu verifizieren und die Kontrastmittelkonzentration von Gadofluorine P räumlich aufgelöst zu quantifizieren. Hiermit sollten die in-vivo gemessenen Signalintensitäten der Gadofluorine P Messungen bestätigt und objektiv quantifiziert werden.

Zuerst wurden auch hier jeweils zum 1-Wochen Zeitpunkt mit MALDI-TOF-IMS (n=1 pro Zeitpunkt) und LA-ICP-MS (n=3 pro Zeitpunkt) Kinetiken angefertigt. Bei beiden Methoden wurde eine Kinetik über einen Zeitraum von 60 Minuten erstellt mit jeweils Messungen zu 7 verschiedenen Zeitpunkten. Ziel dieser Kinetiken war es, den in der in-vivo MRT-Bildgebung gemessenen Zeitpunkt der höchsten Signalintensität mit dem Zeitpunkt der höchsten gemessenen Konzentration ex-vivo zu validieren.

Danach wurden die ex-vivo Methoden MALDI-TOF-IMS, LA-ICP-MS und Histologie genutzt um die in-vivo gemessenen Proben zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt zu validieren. MALDI-TOF-IMS wurde hierbei angewendet, um die Intensität des in-vivo gemessenen MRT-Signals räumlich aufgelöst zu erfassen und die Kontrastmittelkonzentration zu quantifizieren. Für diese Versuche wurden dieselben

---

Mäuse der MRT-Bildgebung nach der Euthanasie zum 6-Wochen Zeitpunkt verwendet (n=5). Für den 1-Wochen Zeitpunkt wurden separate Mäuse untersucht (n=5).

LA-ICP-MS wurde zusätzlich eingesetzt, da es eine höhere Ortsauflösung als MALDI-TOF-IMS aufweist und zur Analyse einzelner Gadolinium-Elemente geeignet ist. Es wurden jeweils 3 separate Mäuse zu einem 1- (n=3) und 6-Wochen (n=3) Zeitpunkt untersucht.

Zusätzlich wurde eine Histologie mit Elastica-van-Gieson Färbung genutzt, um die Bildung extrazellulärer Matrix nachzuweisen und die MALDI-TOF-IMS Konzentration auf ein histologisches Bild mappen zu können. Hierfür wurden n=9 Mäuse zu einem 1-Wochen Zeitpunkt und n=12 Mäuse zu einem 6-Wochen-Zeitpunkt untersucht.



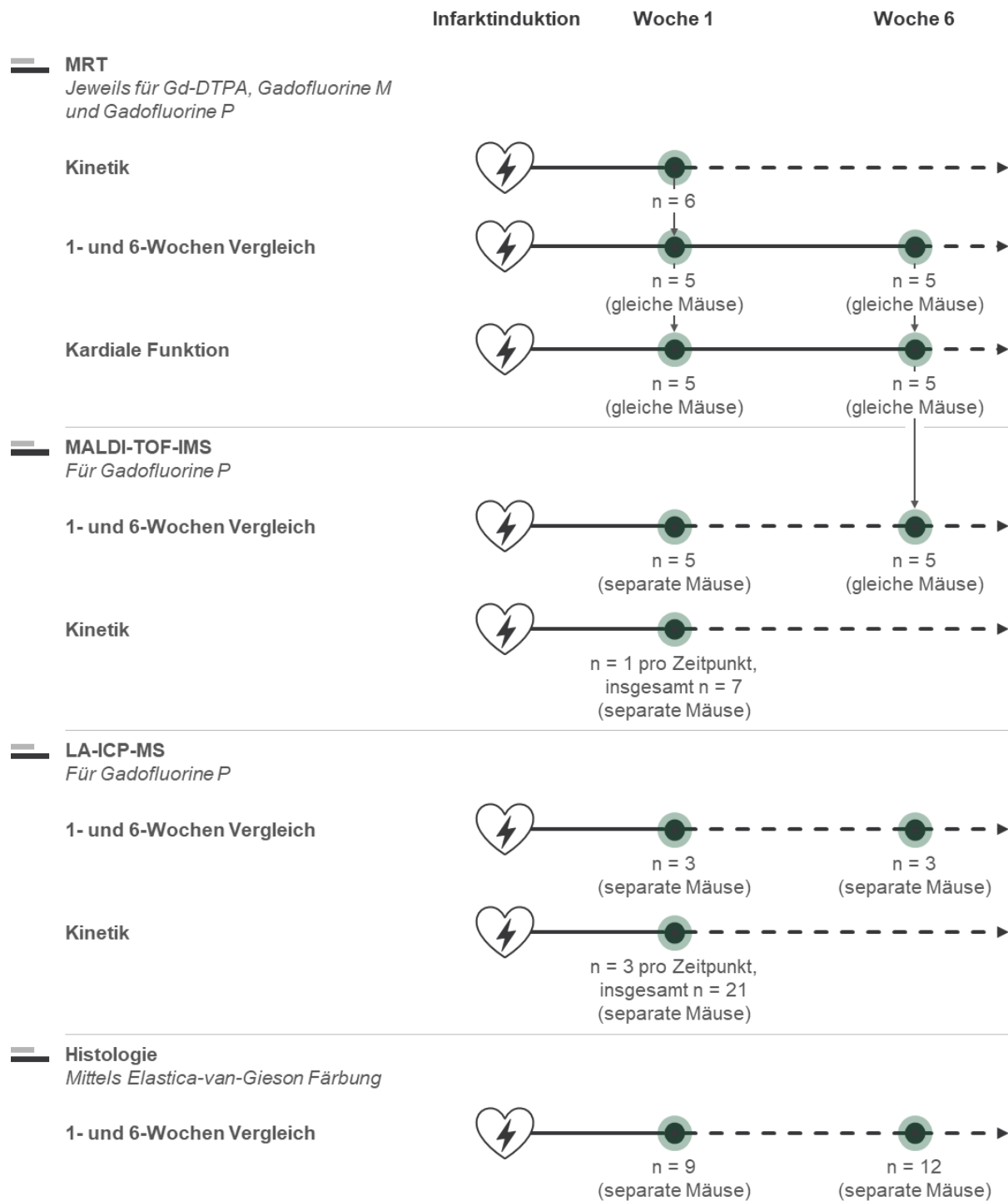


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

## 2.2 Mausmodell

### 2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Alle Tierversuche sind unter Protokoll Nummer 85-13 von der Regierung von Oberbayern genehmigt und

wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz, sowie der deutschen Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt.

### 2.2.2 Experimentelle Infarktinduktion

Für das Projektvorhaben wurde durch eine permanente Ligatur der linken absteigenden Koronararterie (LAD = left anterior descending artery), wie in der Literatur beschrieben (Wildgruber et al., 2014) ein Myokardinfarkt induziert. Zur Durchführung der Operation werden die Mäuse in Narkose gelegt. Diese erfolgt durch eine intraperitoneale Injektion der Kombination Medetomidin-Midazolam-Fentanyl (MMF).

<b>Medikamentenname</b>	Medetomidin	Midazolam	Fentanyl
<b>Medikamentengruppe</b>	Alpha2-Rezeptor-Agonist	Benzodiazepin	Opioid
<b>Handelsname</b>	Dormitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland	Dormicum®, Hoffmann-La Roche, Grenzbach-Wyhlen, Deutschland	Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
<b>Dosis</b>	0,5 mg/kg	5,0 mg/kg	0,05 mg/kg

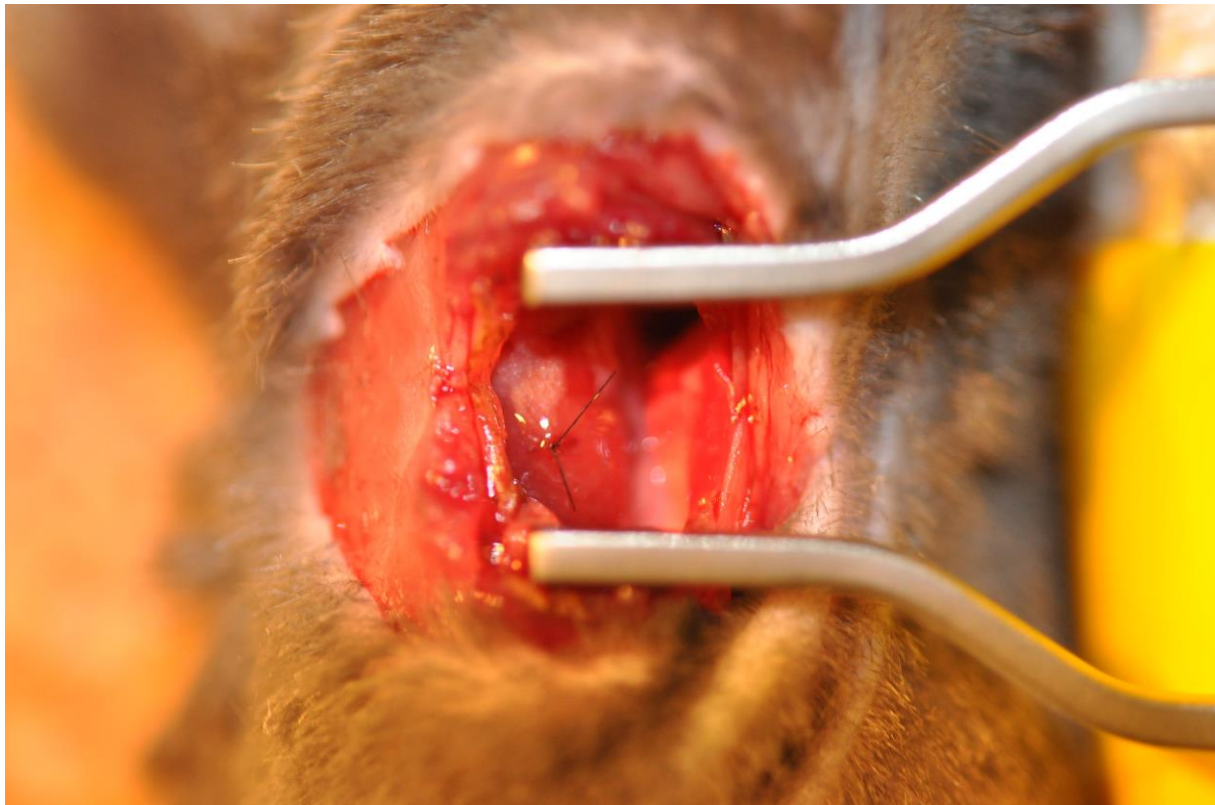
**Tabelle 1: Verwendete Medikamente zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose während der experimentellen Infarktinduktion**

Zum Schutz vor Austrocknung der Kornea wurde den Versuchstieren sobald sie in Narkose liegen Bepanthen® Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Vor Durchführung der Thorakotomie erfolgte eine Intubation der Maus mit einem 22 Gauge Venenverweilkatheter (EXEL Safelet Cath, EXELINT International Co., USA), welcher als Tubus genutzt wurde. Um darauffolgend die Atmung aufrechtzuerhalten wurde die Maus ventiliert (Hugo Sachs Elektronik-Havard Aparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland). Die Ventilation erfolgte konstant mit einer Rate von ca. 134 Beatmungen pro Minute. Zur Beatmung wurde ein Volumen von 0,18 ml bei einem 100%igem Sauerstoffgehalt verwendet. Zur

Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurden ein Heizkissen (Beurer GmbH, Ulm, Deutschland) und eine Rotlichtlampe (Philips, Hamburg, Deutschland) genutzt.

Nach erfolgreicher Intubation und gesicherter Beatmung der Maus erfolgte eine links-laterale Thorakotomie. In Höhe des 4.-5. Interkostalraums wurde ein dorso-ventraler Hautschnitt gesetzt. Nach stumpfem Durchtrennen der verschiedenen Muskelschichten des Thorax erfolgte die Eröffnung der Pleura und damit die Eröffnung des Brustkorbs. Im Folgenden Schritt wurde der Perikardbeutel eröffnet um Sicht auf den linken Herzventrikel zu erlangen. Nach Aufsuchen des linken Herzohres wurde circa 2 mm unter diesem die linke absteigende Koronararterie mit einem 8-0 Ethilonfaden (Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) unterstochen und anschließend ligiert. Erfolgte daraufhin eine Weißfärbung des Myokardgewebes sprach dies für die richtige Lage der Ligatur und die einsetzende Ischämie des Herzmuskels. Nach Sicherstellung der korrekten Lage der Ligatur erfolgte die Einlage einer Thoraxdrainage unterhalb des 4. Interkostalraums. Hierzu wurde eine Venenverweilkanüle (Venisystems™, Hospira Inc., Irland) verwendet. Der Verschluss des Thorax erfolgte schichtweise mit einem 6-0 Ethilonfaden (Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Daraufhin wurde mit einer 1 ml Insulinspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zur Vermeidung eines Pneumothorax die verbleibende Luft aus dem Thoraxraum abgezogen und daraufhin die Thoraxdrainage gezogen.

Vorbeugend erhielten die Mäuse zur postoperativen Analgesie Buprenorphin 0,05 mg/kg s.c. (Temgesic®, Essex Pharma, München, Deutschland) und Carprofen 4 mg/kg s.c. (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), welche auch noch für 72 h mit jeweils 24-stündiger Gabe fortgesetzt wurden. Zur Antagonisierung der Narkose wurden 2,5 mg/kg Atipamezol (Antisedan®, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland), 0,5 mg/kg Flumazenil (Anexate®, Roche, Grenzach-Wyhlen) und 1,2 mg/kg Naloxon (Naloxon®, Inresa, Freiburg) (AFN) verwendet. Die Extubation erfolgte sobald sichere Abwehrzeichen der Maus zu erkennen waren und eine Spontanatmung mit kontinuierlichem Rhythmus zu beobachten war.



**Abbildung 3: Eröffneter Thorax der Maus nach erfolgter permanenter Ligatur der LAD**

## **2.3 Magnetresonanztomographie**

### **2.3.1 Hardware**

Zur MRT Messung wurde ein 7 Tesla Kleintier-MRT (GE Discovery MR901, Agilent Technologies UK Inc., Oxford, United Kingdom) mit einem  $300 \text{ mTm}^{-1}$  Hochfeld-Gradienten-System und einem  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  Quadratur-Birdcage-Resonator mit einem Innendurchmesser von 72 mm verwendet. Hierbei wurde der Birdcage-Resonator nur zum Senden verwendet und die Signale wurden mit einer flexiblen 2-Kanal Arrayspule (P-H02LE-070-01507-001 V01, RAPID Biomedical GmbH, Rimpfing, Deutschland) empfangen.

Zur Durchführung der Relaxivitätsmessungen wurden zusätzlich ein klinisches 3-Tesla MRT (Ingenia, Philips Healthcare, Niederlande), sowie ein 1 Tesla Festkörper NMR Spektrometer (Magritek Spinsolve Carbon, Aachen, Deutschland) verwendet.

## 2.3.2 Molekulare Magnetresonanztomographie Kontrastmittel

### 2.3.2.1 Gadolinium-DTPA

Gd-DTPA der Firma Bayer Schering Pharma AG (Berlin, Deutschland) ist ein lineares Gadolinium-haltiges Kontrastmittel. Gd-DTPA wurde in diesem Versuchsaufbau als Referenz verwendet, da es das klinisch am weitesten verbreitete MRT-Kontrastmittel mit den größten Erfahrungswerten ist. Bei Gd-DTPA handelt es sich um ein extrazelluläres Kontrastmittel ohne spezifische Bindungseigenschaften. Nach intravenöser Injektion akkumuliert es unspezifisch im Extrazellularraum und führt dort zu einer Erhöhung der Signalintensität. Dies geschieht im Rahmen einer T1-Messung durch eine verstärkte T1-Relaxation durch direkten Einfluss der Gadolinium-Moleküle auf die Relaxation der Wasserstoff-Protonen. (Phinikaridou et al., 2013) (Sirol et al., 2004)

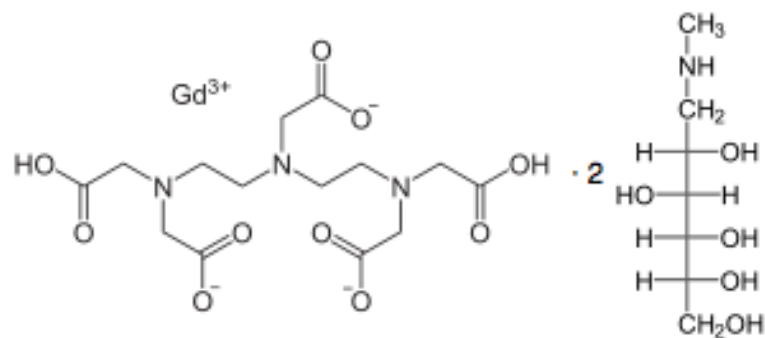


Abbildung 4: Strukturformel Gd-DTPA

<b>Molekulargewicht</b>	938,26 g/mol
<b>Halbwertszeit (Plasma)</b>	ca. 30 min in Kaninchen (Barkhausen, 2003)

Tabelle 2: Chemische Eigenschaften Gd-DTPA

### 2.3.2.2 Gadofluorine M

Gadofluorine M ist ein rein präklinisches amphiphiles, makrozyklisches Gadolinium-haltiges Kontrastmittel. Der im Gadofluorine M enthaltene Wirkstoff ist ein Gadolinium-GlyMe-DOTA-Perfluorooctyl-Mannose-Konjugat. Die Herstellung von Gadofluorine M erfolgt durch Anhängen einer Perfluorooctyl-Kette und einer zuckerhaltigen funktionellen Gruppe an einen Gadolinium-haltigen Rest. Gadolinium an sich hat

hydrophile Eigenschaften, die durch die zusätzlich angehängte Mannose erhöht werden. (Misselwitz et al., 2004) Die hydrophoben Eigenschaften basieren auf der angehängten Perfluorooctyl-Kette. Beides in Kombination macht Gadofluorine M zu einem amphiphilen Kontrastmittel. (Meding et al., 2007)

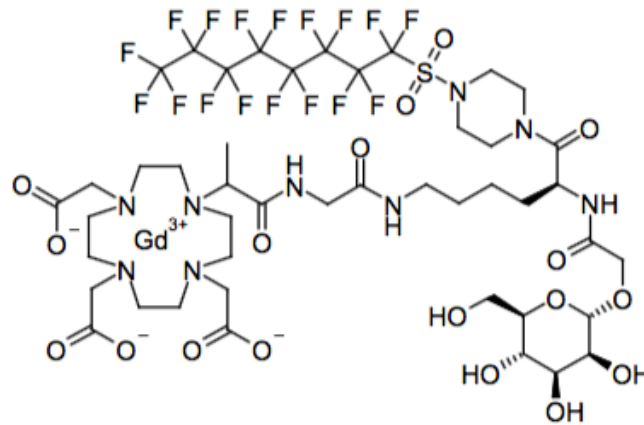


Abbildung 5: Strukturformal Gadofluorine M

<b>Molekulargewicht</b>	1528 g/mol
<b>Halbwertszeit (Plasma)</b>	ca. 10h in Kaninchen (Barkhausen, 2003)

Tabelle 3: Chemische Eigenschaften Gadofluorine M

### 2.3.2.3 Gadofluorine P

Gadofluorine P ist eine Weiterentwicklung des Gadofluorine M, welches aufgrund der langen Halbwertszeit im Serum nicht mehr verwendet wird (invivoContrast GmbH, Berlin, Deutschland). Durch Ersetzen des Lysinrestes mit einer kürzeren Ethylendiamine-Verbindung und Ersetzen des Zuckerrestes mit einem kurzen Polyethylenglykol entsteht aus Gadofluorine M die Weiterentwicklung Gadofluorine P. Gadofluorine P zeigt einen vergleichbaren amphiphilen Charakter wie Gadofluorine M. Gadofluorine P ist aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften durch eine hohe Proteinbindeaffinität unter anderem zu Proteinen extrazellulärer Matrix gekennzeichnet. In wässriger Lösung bildet Gadofluorine P Mizellen, welche nach Bindung an Proteine aufgespalten werden. Zusätzlich soll Gadofluorine P über eine Aufnahme in den interstitiellen Raum und einen Abbau durch das retikuloendotheliale System verfügen. (invivoContrast GmbH, 2009)

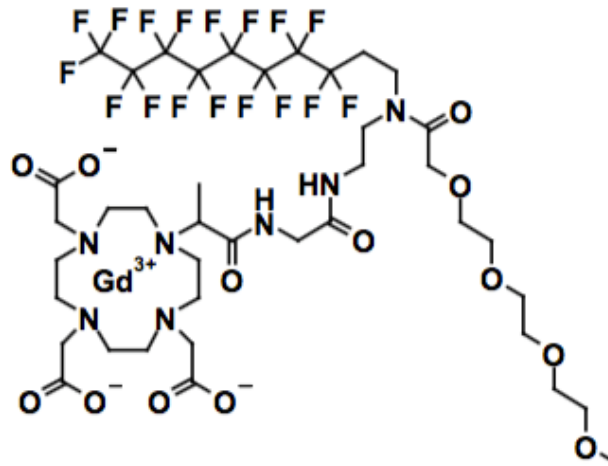


Abbildung 6: Strukturformel Gadofluorine P

<b>Molekulargewicht</b>	1322,17 g/mol
<b>Halbwertszeit (Plasma)</b>	ca. 2h in Kaninchen (Cho et al., 2015) (invivoContrast GmbH, 2009)

Tabelle 4: Chemische Eigenschaften Gadofluorine P

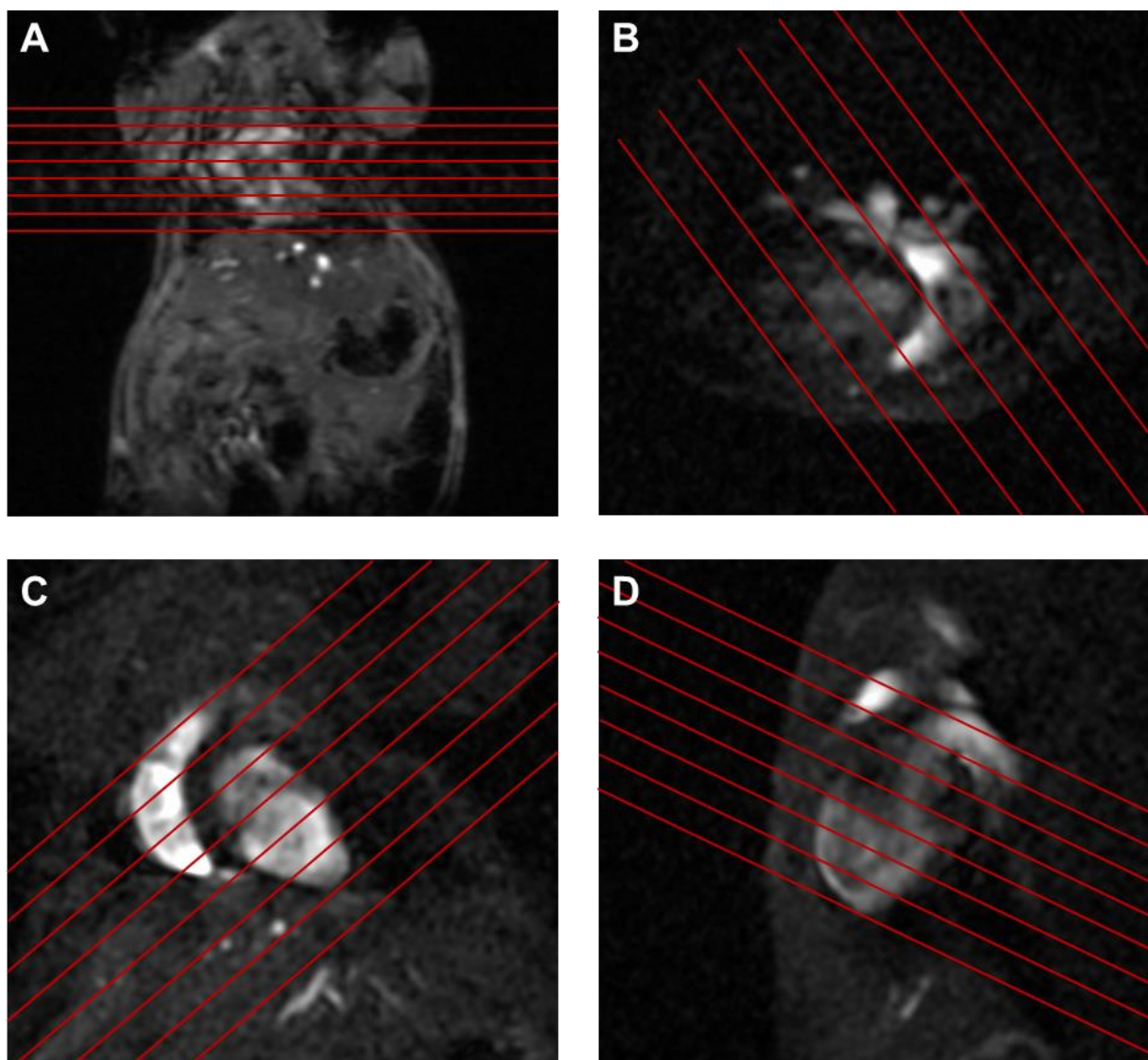
### 2.3.3 Sequenztechniken

Die Relaxivität ist ein aussagekräftiges Charakteristikum von Kontrastmitteln und bezeichnet die Veränderung der Relaxationsrate des Kontrastmittels. Die Relaxivität variiert vor allem in Abhängigkeit der Feldstärke und des Lösungsmediums. Die Relaxivität von Gd-DTPA, Gadofluorine P und Gadofluorine M wurde daher bei verschiedenen Feldstärken sowohl in Humanserum als auch in Natrium-Chlorid-Lösung bestimmt. Humanserum wurde verwendet, da Proteine die Relaxivität beeinflussen. (Rohrer et al., 2005) Für die Relaxivitätsmessungen der Kontrastmittel wurden folgende Sequenzen verwendet:

1 Tesla	3 Tesla	7 Tesla
Festkörper NMR Spektrometer	MOLLI Sequenz: Field-of-view (FOV) 140 x 140 mm, Matrix 112 x 112, Schichtdicke 3 mm, Repetitionszeit (TR) 5,0 ms, Flip-Winkel 5°	Look Locker Sequenz: Field-of-view FOV 30 x 30 mm, Matrix 192 x 192, Schichtdicke 1 mm, Repetitionszeit (TR) 7,6 ms Flip-Winkel 60°

Tabelle 5: Übersicht der für die Relaxivitätsmessungen verwendeten Sequenzen

Die MRT-Bildgebung ermöglichte eine Darstellung des Herzens in verschiedenen Schnittebenen. Hierbei wurde der Bereich zwischen Herzspitze und Aortenbogen dargestellt. Zur standardisierten Darstellung der Herzen wurde zur Planung der spezifischen Schnittebenen zuerst eine triplanare Localizer-Sequenz im nativen Zustand angefertigt. Um die spätere Schnittführung in allen drei Raumebenen festzulegen, wurden 8 Schnittebenen jeweils koronar, axial und sagittal durch das Herz gelegt. Diese 8 Schnittebenen wurden daraufhin in den nachfolgenden Cine, LGE und T1-Sequenzen verwendet und sind in der nachfolgenden Abbildung genauer dargestellt.



**Abbildung 7: Darstellung der Localizer-Sequenzen (A: 3 Plane koronar, B: axial, C: koronar, D: sagittal)**



Nach Injektion der Kontrastmittel wurde eine segmentierte inversion-recovery fast gradient echo sequence mit folgenden Parametern angefertigt: FOV 30 x 30 mm, Matrix 192 x 192 (in-plane resolution 156 mm x 156 mm), Schichtdicke 1 mm, TR/Echozeit (TE) 7,6 ms/3,1 ms, Flip-Winkel 60°, 4 Reihen/Herzschlag (RR) Intervall, 2 Scans, 8 Kurzachsen-Schnitte). Die Inversionszeit wurde auf 350 ms gesetzt. Das Triggern mittels EKG-Elektroden wurde so gewählt, dass eine effektive TR von 1 s zwischen zwei Inversionen entstand.

Nach Anfertigung der LGE Sequenzen wurde dieselbe Schnittführung zur Erstellung der T1-Mapping Schnitte verwendet. Zur Erstellung des T1-Mappings wurde eine EKG-getriggerte Look-Locker Sequenz verwendet. Hierbei wurde augenblicklich nach dem EKG-Trigger-Signal ein nicht-selektiver adiabatischer Inversionspuls appliziert. Auf diesen folgte eine Fast Spoiled Gradient Echo Sequenz mit segmentierter k-Raum Akquisition. Die Bildakquisition erfolgte über eine Dauer von 2-3 RR-Intervallen. Danach erfolgte eine Pause für 2-3 RR-Intervalle zur vollständigen T1-Relaxation. Daraus ergab sich eine effektive TR-Zeit von 3 s zwischen zwei Inversionen. Die verwendeten spezifischen Parameter der Sequenz sind im Folgenden aufgelistet: FOV 30 x 30 mm, Matrix 128 x 128 (in-plane resolution 234 mm x 234 mm), Schichtdicke 1 mm, TR/TE 5,1 ms/1,3 ms, Flip-Winkel 8°, 4 Reihen/RR Intervall, 2 Scans, komplette Scanzeit ca. 8 min.

#### **2.3.4 Vorbereitung der Versuchstiere**

Zu Beginn des Versuchs wurden die Mäuse durch eine Isofluran-Narkose (cp-pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland; Medical Supplies & Services Int. Ltd., Keighley, United Kingdom) betäubt. Dazu wurde die Maus in einen mit einem Isofluran-Sauerstoff Gemisch durchströmten Behälter gelegt. Hierbei wurden zu Beginn 3 % Isofluran mit 2 l Sauerstoff verwendet. Im weiteren Verlauf wurde die Maus mit dem Kopf in eine Vorrichtung gelegt in der kontinuierlich Isofluran in einer Konzentration von circa 2 % vermischt mit 2 l Sauerstoff herausströmte. In diesem Zustand wurde der Maus ein Zugang in eine der Schwanzvenen gelegt. Hierzu wurde eine handelsübliche 30 Gauge Kanüle (B. Braun Melsungen AG, Puchheim, Deutschland) verwendet. Im Anschluss an diese Nadel befand sich ein circa 1 m langer Polyethen-Schlauch (Innendurchmesser: 0,28 mm, Außendurchmesser: 0,61 mm, Smiths Medical International Ltd., Kent, United Kingdom). Dieser war notwendig, um

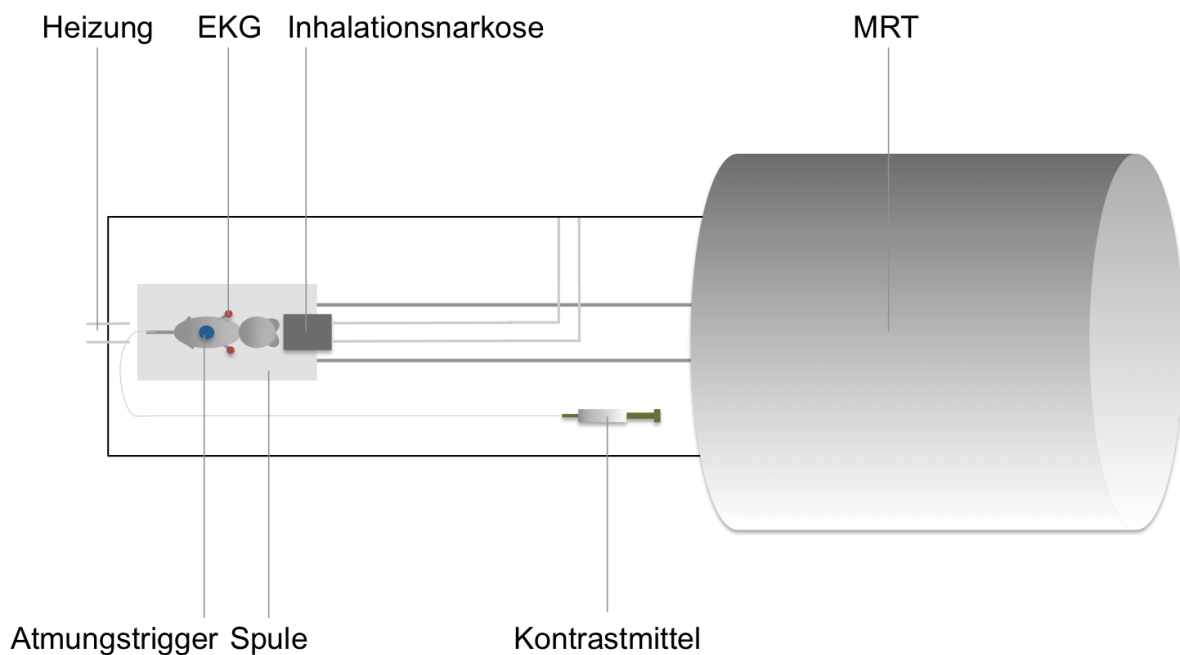
später während der MRT Messungen das Kontrastmittel in die Maus injizieren zu können ohne ihre Lage erneut zu verändern. Zur Überprüfung der Durchgängigkeit und richtigen Lage des Zugangs wurde dieser mit 0,9 %iger NaCl- Lösung (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gespült. Hierzu wurden 1 ml Spritzen (Braun, Puchheim, Deutschland) verwendet. Während der Vorbereitung lag die Maus zur Vermeidung von Auskühlung auf einer Wärmedecke (Bosotherm 1200, 1500, Bosch+Sohn GmbH & Co. KG, Jungingen, Deutschland). Zusätzlich wurden die empfindlichen Augen des Tieres mittels Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) geschützt.



**Abbildung 8: Maus in Narkose mit liegendem Schwanzvenenkatheter (schwarzer Pfeil) und Natrium-Chlorid-Spritze**

Die MRT-Untersuchung erfolgte unter einer Isofluran-Narkose (DRE Veterinary Equipment, Williamson Ct, USA) mit 2 % Isofluran und 2 l Sauerstoff. Die Maus wurde in Bauchlage in die MRT-Spule hineingelegt, wobei die Schnauze in einer Vorrichtung zur kontinuierlichen Versorgung mit Narkosegas und Sauerstoff angebracht wurde. Zur Überwachung der Narkose wurde die Atemfrequenz mittels eines Sensors (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Deutschland) bestimmt. Zudem erfolgte die gesamte Messung unter einer EKG-Triggerung bei freier Atmung (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Deutschland). Zur EKG-Messung wurden Kupferelektroden an den beiden

Vorderfüßen der Maus mit Elektrodengel (P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland) befestigt. Zur Adjustierung der Position im MRT wurde ein Positionierungssystem verwendet (SWIFT 210, 72 mm Cradle Manual, Varian, Inc. NMR Systems, USA) Während der gesamten Messung wurde die Körpertemperatur der Maus mittels einer Luft-betriebenen Heizung (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Deutschland) kontinuierlich bei 38° Celsius gehalten um Auskühlung und damit einhergehende Verfälschung der Messwerte zu verhindern.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchstieres mit benötigtem Equipment im MRT**

### 2.3.5 Kontrastmittelapplikation

Die Applikation der Kontrastmittel erfolgte jeweils nach Positionierung der Maus und darauffolgender Erstellung der Localizer-Sequenzen. Durch die Katheterisierung der Schwanzvene war es möglich das Kontrastmittel zu applizieren, ohne die Position der Maus im MRT zu verändern. Die Applikation der Kontrastmittel erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die erste LGE-Messung wurde kurz nach Injektion des Kontrastmittels gestartet. Die erste T1-Mapping Messung erfolgte nach 15 Minuten. Wurde eine Kinetik über 120 Minuten Laufzeit erstellt, so erfolgten die Messungen von LGE und T1-Mapping abwechselnd im 5 Minuten-Takt. Die verwendeten Konzentrationen der injizierten Kontrastmittel basieren auf Erfahrungswerten, Studienlage und Herstellerangaben. Es wurden ausreichend hohe Dosen gewählt, um eine ausreichende Kontrastmittel-

Konzentration im Zielgewebe sicherzustellen. Die injizierten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Kontrastmittel	Gd-DTPA	Gadofluorine M	Gadofluorine P
Konzentration	200 $\mu\text{mol/kg KG}$ (Körpergewicht)	300 $\mu\text{mol/kg KG}$	200 $\mu\text{mol/kg KG}$

Tabelle 6: Konzentration der injizierten Kontrastmittel

## 2.4 Post-Mortem Analysen

### 2.4.1 Euthanasie der Versuchstiere und Organentnahme

Nach der letzten Messung mit Gadofluorine P wurden einige Organe der Maus zur ex-vivo Validierung der erhobenen Bilddaten entnommen. Das Ziel der ex-vivo Validierungsmethoden war es eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix zu verifizieren und die Kontrastmittelkonzentration von Gadofluorine P räumlich aufgelöst zu quantifizieren. Hiermit sollten die in-vivo gemessenen Signalintensitäten der Gadofluorine P Messungen bestätigt und objektiv quantifiziert werden. Das Herz wurde hierfür in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff sofort schock gefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.2 Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-IMS)

Die Methode der MALDI-TOF-IMS Bildgebung wurde verwendet, um die Intensität des in-vivo gemessenen MRT-Signals ex-vivo zu bestätigen. Das MALDI-TOF-IMS Verfahren arbeitete hierbei über eine Quantifizierung der Kontrastmittelkonzentration direkt im Gewebe, diese Daten konnten dann auf die jeweiligen histologischen Schnitte gemappt werden um die in-vivo gemessenen Intensitäten zu evaluieren und zu validieren. Die MALDI-TOF-IMS Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie am Helmholtz Zentrum München (Prof. Walch) durchgeführt.

Zur Durchführung der MALDI-TOF-IMS Analysen wurden, wie in der Literatur beschrieben, Schnitte der gefrorenen Herzen mit einer Dicke von  $12\ \mu\text{m}$  angefertigt. (Aichler et al., 2015) Die Schnitte wurden im nächsten Schritt auf mit Indium-Zinn-Oxid beschichteten leitfähigen Glasträgern (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)

angebracht. Zur weiteren Vorbereitung wurden die fixierten Schnitte mit 1:1 Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 0,1% Nonidet P-40 (Nonylphenoxyethylpolyethoxyethanol 40, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) behandelt. Danach wurden die angefertigten Schnitte in einem Vakuumtrockner für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Mittels MALDI-TOF-IMS war es möglich durch eine Kombination von Matrix-Assistierter Laser-Desorption-Ionisierung und Flugzeitanalyse zur Massenspektrometrie die Masse der Kontrastmittel im Herzgewebe zu ermitteln. Dies war orts aufgelöst mit einer Auflösung von bis zu 70  $\mu\text{m}$  möglich.

Nach Trocknung der Schnitte von Leber und Herz wurde eine Matrixlösung mittels eines ImagePrep Spray Gerätes (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) bestehend aus 7 g/l CHCA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 70%iger Methanol und 0,2%iger Trifluoressigsäure (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aufgebracht. Die Messungen wurden mit einem Ultraflex III MALDI TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Die Messungen wurden mit einer Auflösung von 70  $\mu\text{m}$  und einer Rate von 1,0 GS/s im Positiv-Modus durchgeführt, wobei jeder Messposition 200 gepulste Laserstrahlen zugeführt wurden.

Mit der oben beschriebenen Methode wurde zum 1-Wochen-Zeitpunkt eine MALDI-TOF-IMS-Kinetik angefertigt, um den Zeitpunkt der maximalen Konzentration des Kontrastmittels zu erfassen und darauf die nachfolgenden Versuche aufzubauen. Hierfür wurden in einem separaten Versuch die Herzen der Mäuse (n=1 pro Zeitpunkt) zu den Zeitpunkten 0, 8, 15, 21, 30, 40 und 60 Minuten nach Injektion von Gadofluorine P entnommen. Die Zeitpunkte wurden korrelierend zu den Zeitpunkten der in-vivo gemessenen Gadofluorine-P-Kinetiken gewählt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Zusätzlich wurden alle zum 6-Wochen-Zeitpunkt mit Gadofluorine P gemessenen Mäuse (n=5) mittels MALDI-TOF-IMS ausgewertet, um die Kontrastmittelkonzentration nach erfolgtem Remodeling quantifizieren zu können.

### 2.4.3 Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS)

Bei MALDI-TOF-IMS handelt es sich um ein Matrix-basiertes Verfahren zur Darstellung von Molekülen mit einem maximalen Auflösungsvermögen bis ca. 50  $\mu\text{m}$ , wohingegen die LA-ICP-MS zur Analyse einzelner Gadolinium-Elemente geeignet ist. Dabei kann ein Auflösungsvermögen von bis zu 5  $\mu\text{m}$  erreicht werden. LA-ICP-MS wurde daher zusätzlich verwendet, da es eine höhere Ortsauflösung als MALDI-TOF-IMS hatte. Die LA-ICP-MS Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Uwe Karst, Institut für Analytische Chemie der Wilhelms-Universität Münster, durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Analyse wurden Gefrierschnitte des Herzens in einer Dicke von 10  $\mu\text{m}$  mittel des Kryomikrotoms CRYPSTAR NX70 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland) angefertigt. Zur Fixierung wurde TissueTek® verwendet und die Schnitte wurden auf Objektträger aus Glas (VWR, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen.

Die Quantifizierung erfolgte mittels Matrix-angepasster Kalibrierungsstandards. Diese wurden auf Gelatinebasis hergestellt, indem 100 mg Gelatine mit 900  $\mu\text{l}$  Gadolinium-Lösung vermischt wurden. Die Gadolinium-Lösungen hierfür wurden in Konzentrationen von 1-750 mg/l verwendet. Die Matrix-angepassten Gelatinestandards wurden nachfolgend bei 60°C homogenisiert und ebenfalls 10  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte hergestellt. Im nächsten Schritt wurden 50 mg des Gelatinestandards in 2%iger Salpetersäure auf Konzentrationen von 1-30  $\mu\text{l/l}$  verdünnt. Alle Lösungen enthielten als internen Standard 1  $\mu\text{g/l}$  Holmium (1000  $\mu\text{g/l}$  Ho, SCP Science, Quebec, Kanada). Es wurden sechs Gadolinium-Standards mit Konzentrationen von 5-30  $\mu\text{l/l}$  basierend auf ICP-Standards (1000 mg/l Gd, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zur Quantifizierung der gelösten Gelatine-Standards benutzt.

Die Bestimmung der Gadolinium-Konzentrationen der Kalibrierungsstandards erfolgte mittels ICP-MS-Analyse mit dem Gerät iCAP™ Q (ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland), welches zusätzlich mit einem Autosampler ASX-560, PFA MicroFlow Zerstäuber, Zyklon-Sprühkammer, Nickel-Probennehmer und Nickel-Skimmer ausgestattet war.

Zuerst wurden auch hier jeweils zum 1-Wochen Zeitpunkt LA-ICP-MS (n=3 pro Zeitpunkt) Kinetiken angefertigt, um den in der in-vivo MRT-Bildgebung gemessenen Zeitpunkt des höchsten Signals mit dem Zeitpunkt der höchsten gemessenen Konzentration ex-vivo zu validieren. Die Kinetiken wurden zu den Zeitpunkten 0, 8, 15, 20, 30, 40 und 60 Minuten nach Injektion von Gadofluorine P entnommen. Die Zeitpunkte wurden korrelierend zu den Zeitpunkten der in-vivo gemessenen Gadofluorine-P-Kinetiken gewählt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Zusätzlich wurden Mäuse (n=3) zum 1- und 6-Wochen-Zeitpunkt nach Gabe mit Gadofluorine P mittels LA-ICP-MS ausgewertet, um die Kontrastmittelkonzentration nach und vor erfolgtem Remodeling im Zeitverlauf quantifizieren und mit den in-vivo Daten vergleichen zu können.

#### **2.4.4 Histologie**

Nachdem die Messungen mittels MALDI-TOF-IMS abgeschlossen waren, wurden die vorhandenen Schnitte mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um die Matrix zu entfernen. Zur Darstellung von elastischen und kollagenen Fasern erfolgte daraufhin die Färbung mit Elastica van Gieson (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) nach dem Standardprotokoll des Helmholtzzentrums München. Dabei erfolgte zuerst eine Färbung mit Resorcin-Fuchsin zur Färbung der elastischen Komponenten. Als nächster Schritt erfolgte eine Färbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin zur Färbung der Zellkerne. Im letzten Schritt erfolgte eine Gegenfärbung mit Van Gieson Pikrofuchsin Lösung. In dieser Färbung zeigten sich schließlich die Zellkerne braun-schwarz, das Zytoplasma gelb-bräunlich, die elastischen Fasern lila und die kollagenen Fasern rot. In einem nachfolgenden Schritt wurden die Messergebnisse der MALDI-TOF-IMS Analyse auf die jeweiligen histologischen Schnitte gemappt, um einen Vergleich der gemessenen Kontrastmittelkonzentration mit den gefärbten Kollagenfasern zu ermöglichen.

### **2.5 Auswertung**

#### **2.5.1 Magnetresonanztomographie**

Die Bilder wurden hinsichtlich verschiedener Parameter mit der frei-verfügbaren Software OsiriX DICOM Viewer (<http://www.osirix-viewer.com>, OsiriX Foundation, Genf, Schweiz) ausgewertet.

### 2.5.1.1 Relaxivitätsmessungen

Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P wurden jeweils in 0,9%iger Natrium-Chlorid Lösung (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) oder menschlichem Blutserum seriell verdünnt, hierbei wurden letztendlich Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM erwirkt. Die Kontrastmittel wurden jeweils bei Feldstärken von 1, 3 und 7 Tesla gemessen. Pro verdünnter Konzentration, Kontrastmittel und Feldstärke wurden jeweils 3 Messungen vollzogen. Aus diesen 3 Messungen wurde daraufhin der Mittelwert gebildet. Die Spektren der Proben des 1 Tesla Spektrometers wurden mit dem Programm MestReNova (MestReLabs, Santiago de Compostela, Spanien) analysiert, hierbei wurde ein Peak Fitting durchgeführt und basierend auf der Anpassungskurve die T1-Zeiten berechnet. Die Relaxationsrate der Proben berechnete sich daraus wie folgt:

$$\text{Relaxationsrate } (R_1) = 1/T_1\text{-Zeit}$$

Aus der Geraden bestehend aus der Relaxationsrate auf der Y-Achse und der Konzentration des Kontrastmittels auf der X-Achse konnte durch Berechnung der Steigung die Relaxivität ( $r_1$ ) berechnet werden:

$$\text{Relaxivität } (r_1) = \frac{\Delta R_1}{\Delta \text{Konzentration}}$$

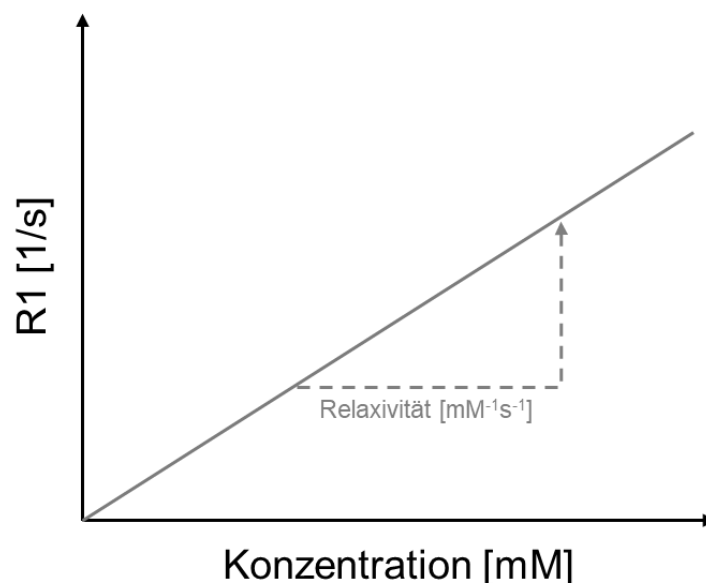
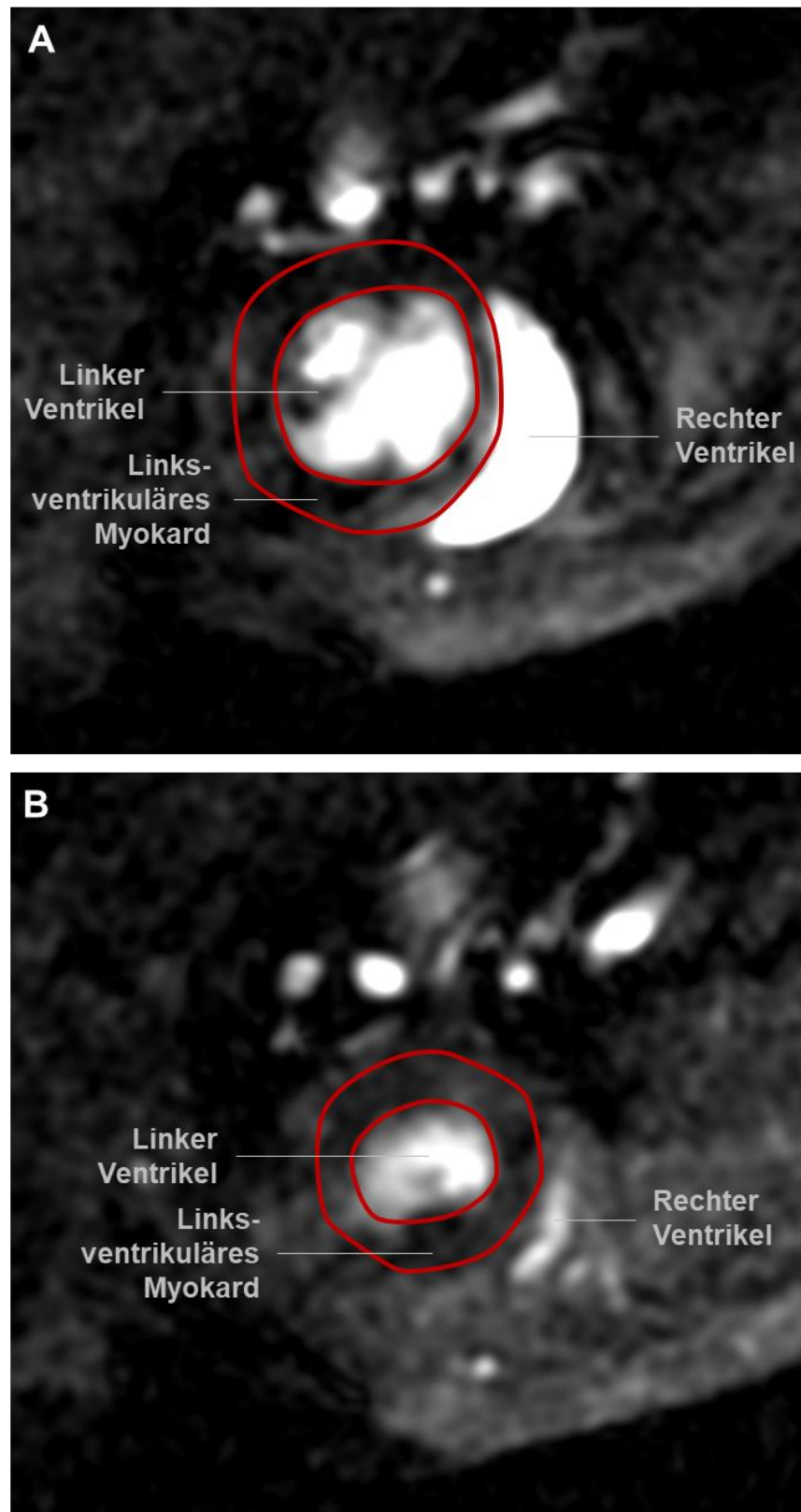


Abbildung 10: Veranschaulichung der Relaxivitätsberechnung



### **2.5.1.2 Cine-Magnetresonanztomographie**

Um die Herzfunktion im Zeitverlauf des Remodelings auswerten zu können, wurden nativ angefertigte Cine-Sequenzen verwendet. Ziel hierbei war es die noch vorhandene Ejektionsfraktion (%) nach Myokardinfarkt zu ermitteln. Zur Berechnung dieser wurden in einem ersten Schritt die endsystolischen und enddiastolischen Volumina ermittelt. Hierzu wurde jeweils endsystolisch, sowie enddiastolisch die Fläche des linken Ventrikels auf den 8 Kurzachsenschnitten vermessen. Dazu wurden Kreise um die Herzhöhle, sowie um das linksventrikuläre Myokard in allen 8 Schnitten gelegt.



**Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Auswertung der Cine-Sequenzen in der kurzen Achse**

**(A: enddiastolisch und B: endsystolisch)**

---

*Endsystolisches Volumen = Summe der intrakavitären Flächen des linken Ventrikels der 8 Kurzachsenschnitte am Ende der Systole*

*Enddiastolisches Volumen = Summe der intrakavitären Flächen des linken Ventrikels der 8 Kurzachsenschnitte am Ende der Diastole*

Aus den nun gewonnenen Ergebnissen für endsystolisches und enddiastolisches Volumen konnten die gesuchten Parameter Schlagvolumen und Ejektionsfraktion wie folgt berechnet werden:

*Schlagvolumen = Enddiastolisches Volumen – endsystolisches Volumen*

*Ejektionsfraktion = Schlagvolumen : enddiastolisches Volumen x 100*

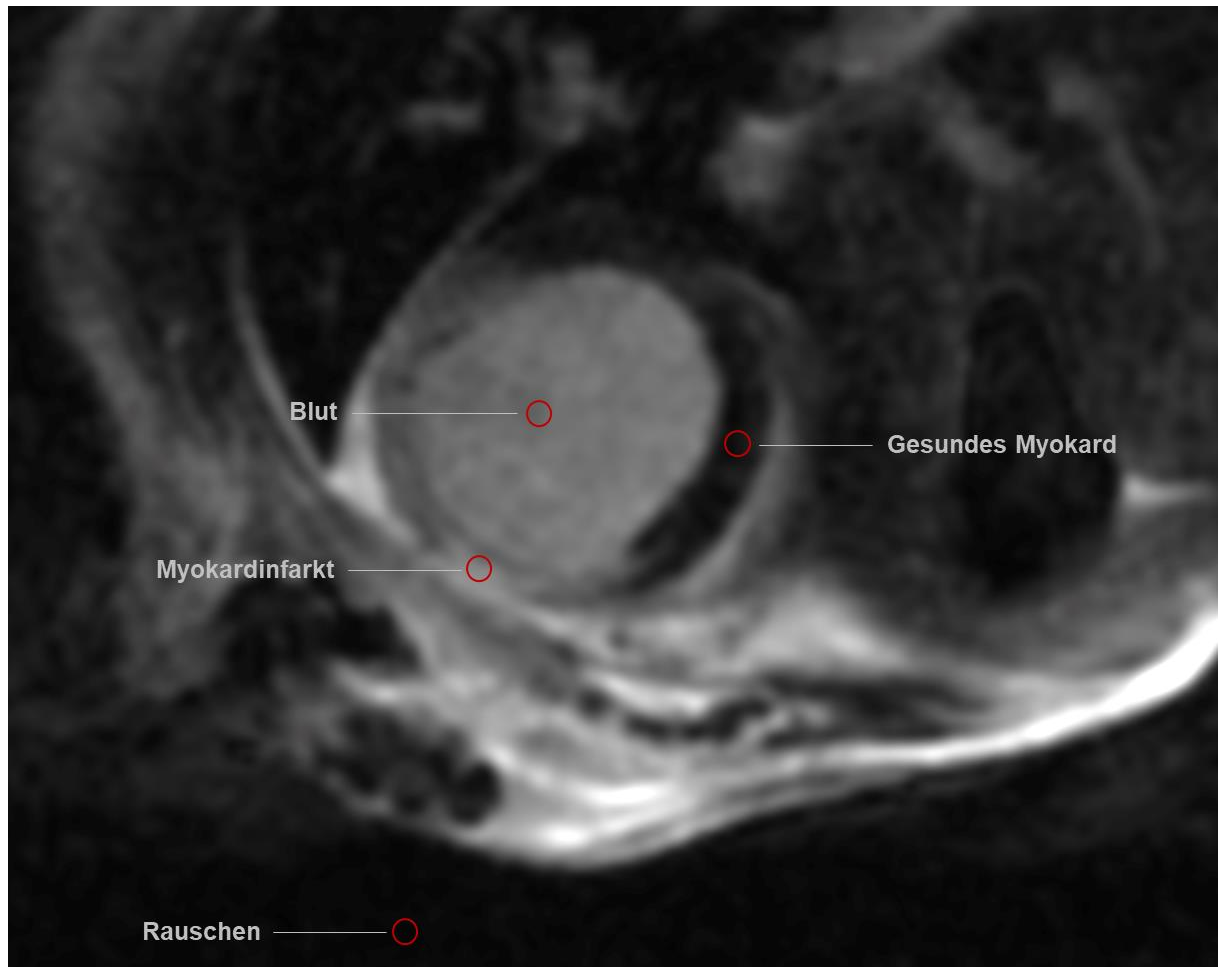
### **2.5.1.3 Late Gadolinium Enhancement**

Das Late Gadolinium Enhancement hatte zum Ziel die Signal-to-noise-Ratios (SNR) für den Bereich des Infarktes, des gesunden Myokards und des Blutes im Herzventrikel zu erhalten. Zur Messung der Signalintensitäten wurden kleine Regions of Interest (ROIs) zentral in die zu messenden Bereiche gelegt. Abzulesen waren dann die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der Signalintensitäten der gewählten ROIs. Es wurden ROIs in folgende Bereiche gelegt: Infarkt, gesundes Myokard und Blut. Um die Signal-to-noise-Ratio zu bilden wurde zudem eine ROI in den Bereich außerhalb des Körpers der Maus gelegt um dort die Signalintensität des Rauschens (Noise) zu erfassen. Aus diesen Werten erfolgte die Berechnung der SNRs wie folgt:

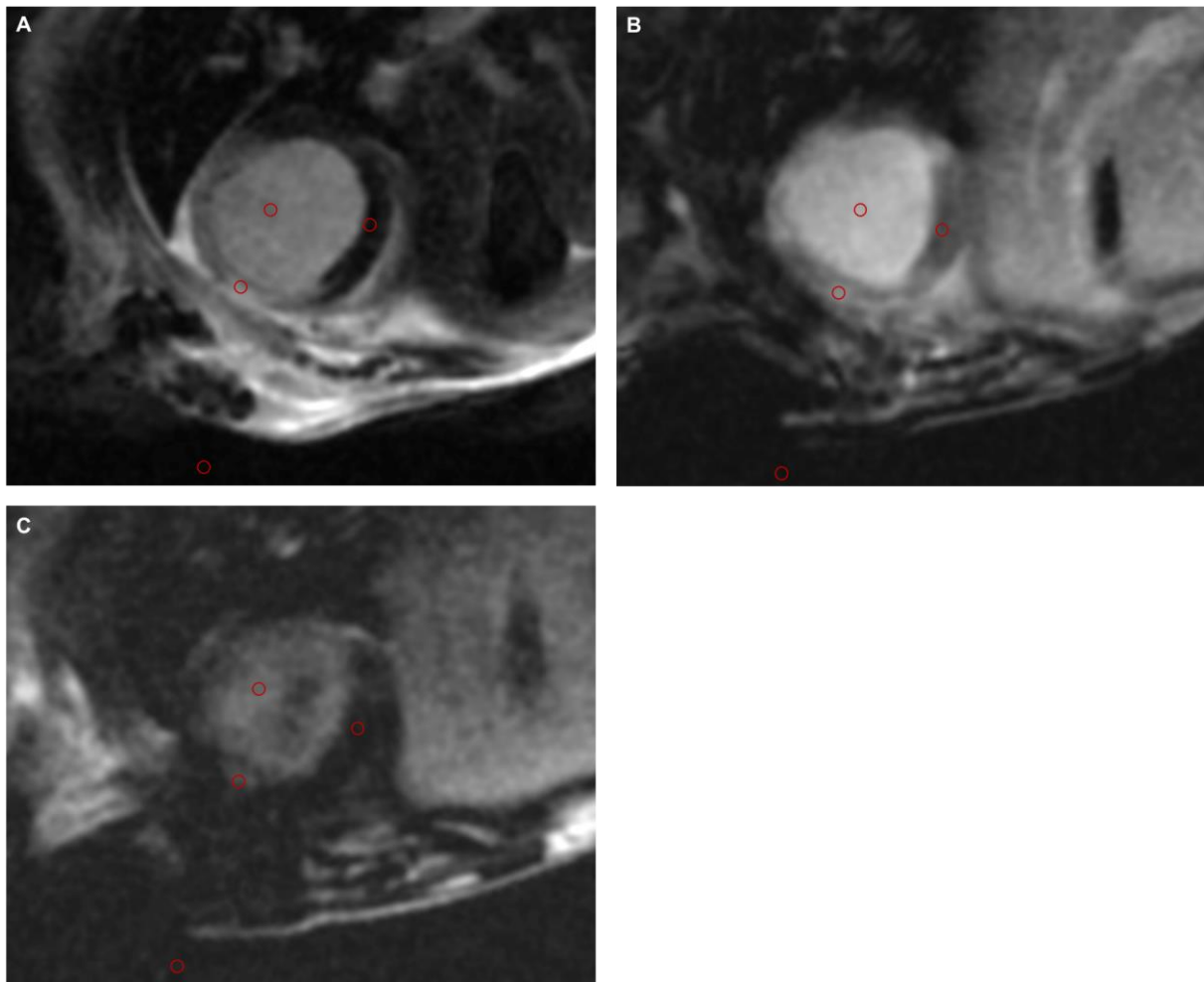
*SNR Infarkt = Mittelwert der Signalintensität des Infarktes : Standardabweichung des Rauschens*

*SNR gesundes Myokard = Mittelwert der Signalintensität des gesunden Myokards : Standardabweichung des Rauschens*

*SNR Blut = Mittelwert der Signalintensität des Blutes : Standardabweichung des Rauschens*



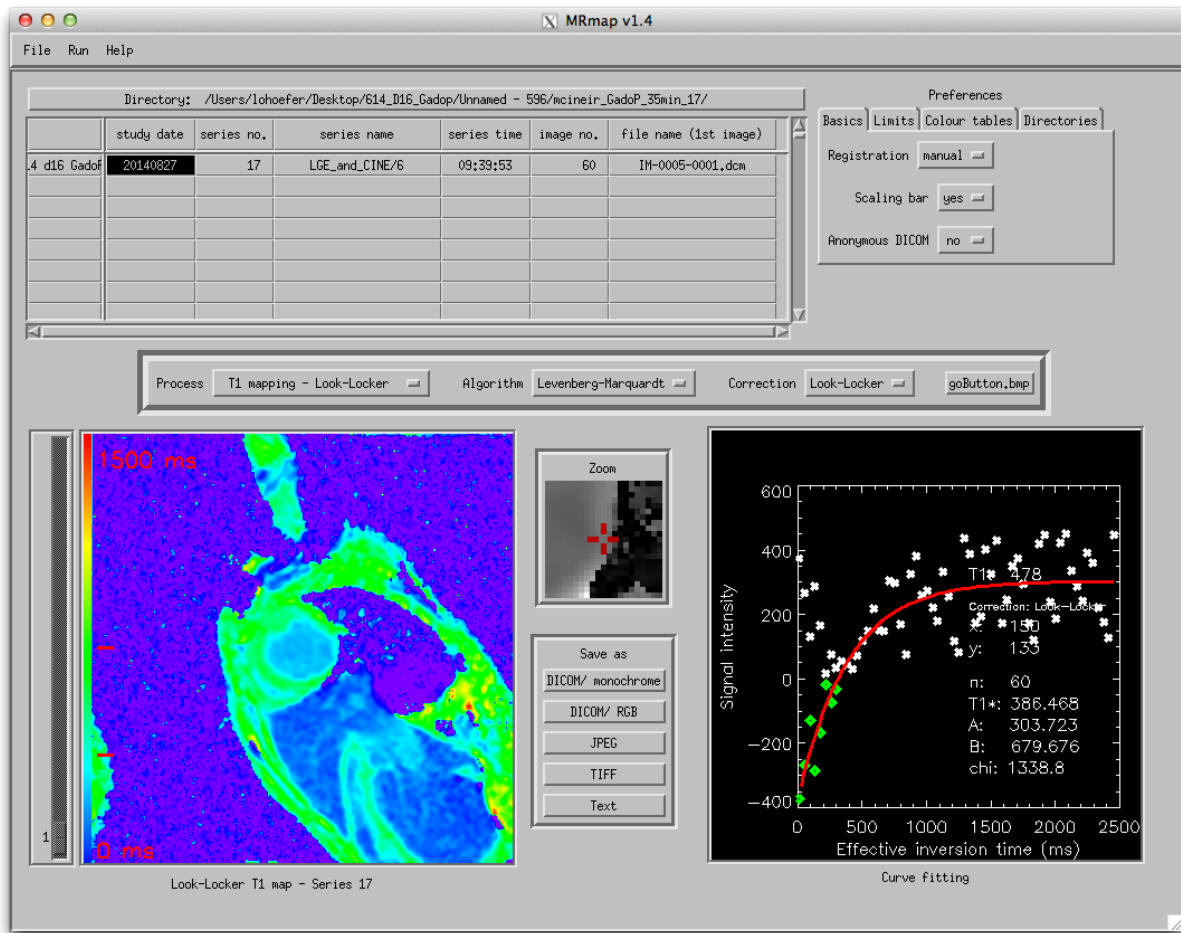
**Abbildung 12:** Exemplarischer Darstellung der Auswertung der LGE-Sequenzen, ROIs erkennbar in Blut, gesundem Myokard, infarziertem Myokard und Rauschen



**Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Auswertung der verschiedenen Kontrastmittel im LGE, A: Gd-DTPA, B: Gadofluorine M, C: Gadofluorine P (Detaillierte Beschriftung siehe Abb. 12)**

#### **2.5.1.4 T1-Mapping**

Die Erstellung der T1-Maps erfolgte zunächst basierend auf den Look-Locker Daten durch die Nutzung der von Messroghli et al. entwickelten frei verfügbaren Software MRmap v1.4 (Messroghli et al., 2010) Die Software erlaubte es T1-Maps basierend auf DICOM-Daten zu berechnen. Dies erfolgte durch ein 3-Parameter Levenberg-Marquardt-Kurvenanpassungsverfahren mit einer Korrektur für ausleseinduzierte Abweichung der Relaxationskurve.(Deichmann et al., 1999) Hierbei wurde aus 60 Einzelbildern eine fertige T1-Map erstellt.



**Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der T1-Map unter Verwendung von Look-Locker Daten**

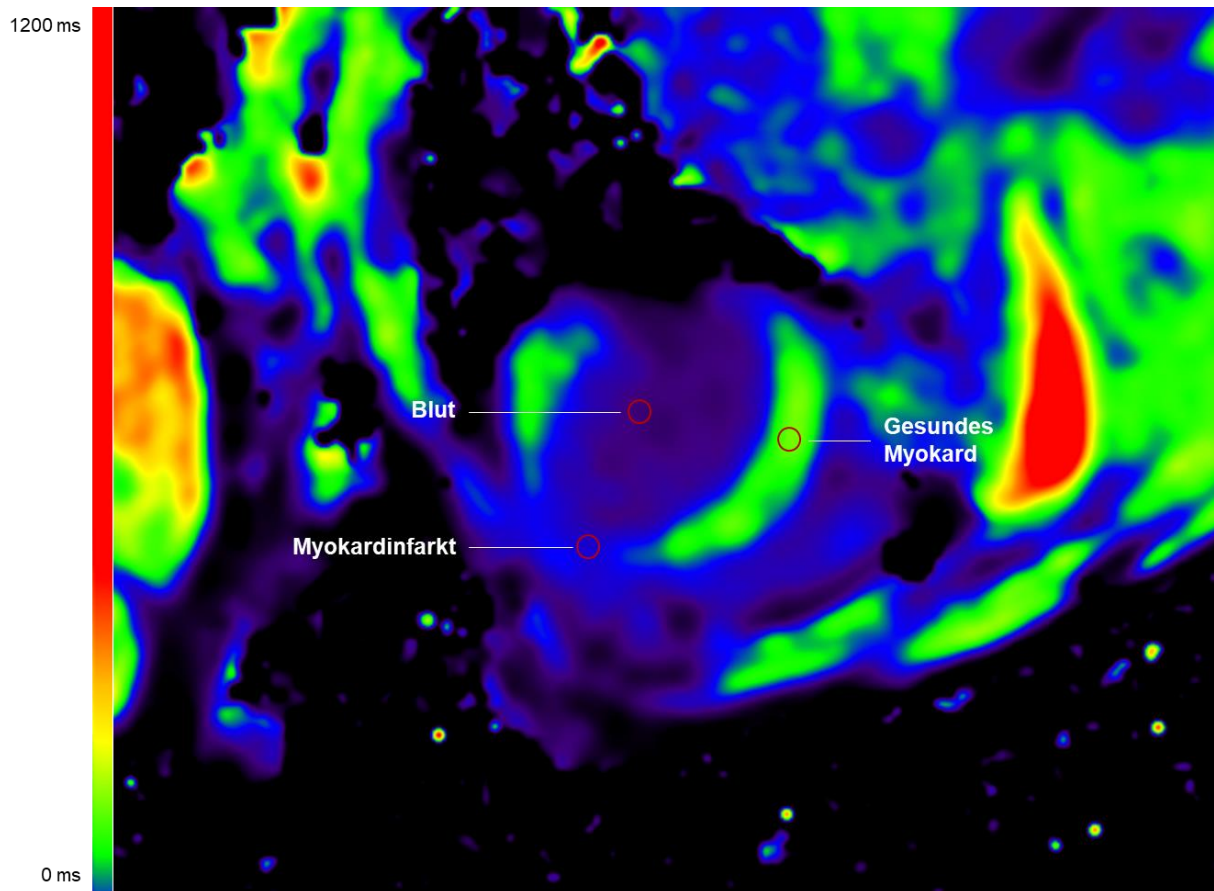
Beim T1-Mapping wurden ebenso wie oben beschrieben die Mittelwerte der Signalintensitäten jeweils des Myokardinfarktes, des gesunden Myokards, sowie des Blutes gemessen. Hierbei wurden die im LGE benutzten ROIs zentral in die zu messenden Bereiche der T1-Maps gelegt. Daraus folgend konnten wie folgt die Relaxationsraten berechnet werden:

*Relaxationsrate ( $R_1$ ) Infarkt =  $1/T_1$ -Wert in ms des Infarktes  $\times 1000$*

*Relaxationsrate ( $R_1$ ) gesundes Myokard =  $1/T_1$ -Wert in ms des gesunden Myokards  $\times 1000$*

*Relaxationsrate ( $R_1$ ) =  $1/T_1$ -Wert des Blutes  $\times 1000$*

Anders als beim LGE konnten die so errechneten Werte direkt genutzt werden, da das Rauschen bei der Erstellung der T1-Maps rausgerechnet wurde.



**Abbildung 15: Exemplarischer Darstellung der Auswertung der T1-Map, ROIs erkennbar in Blut, gesundem Myokard und infarziertem Myokard**

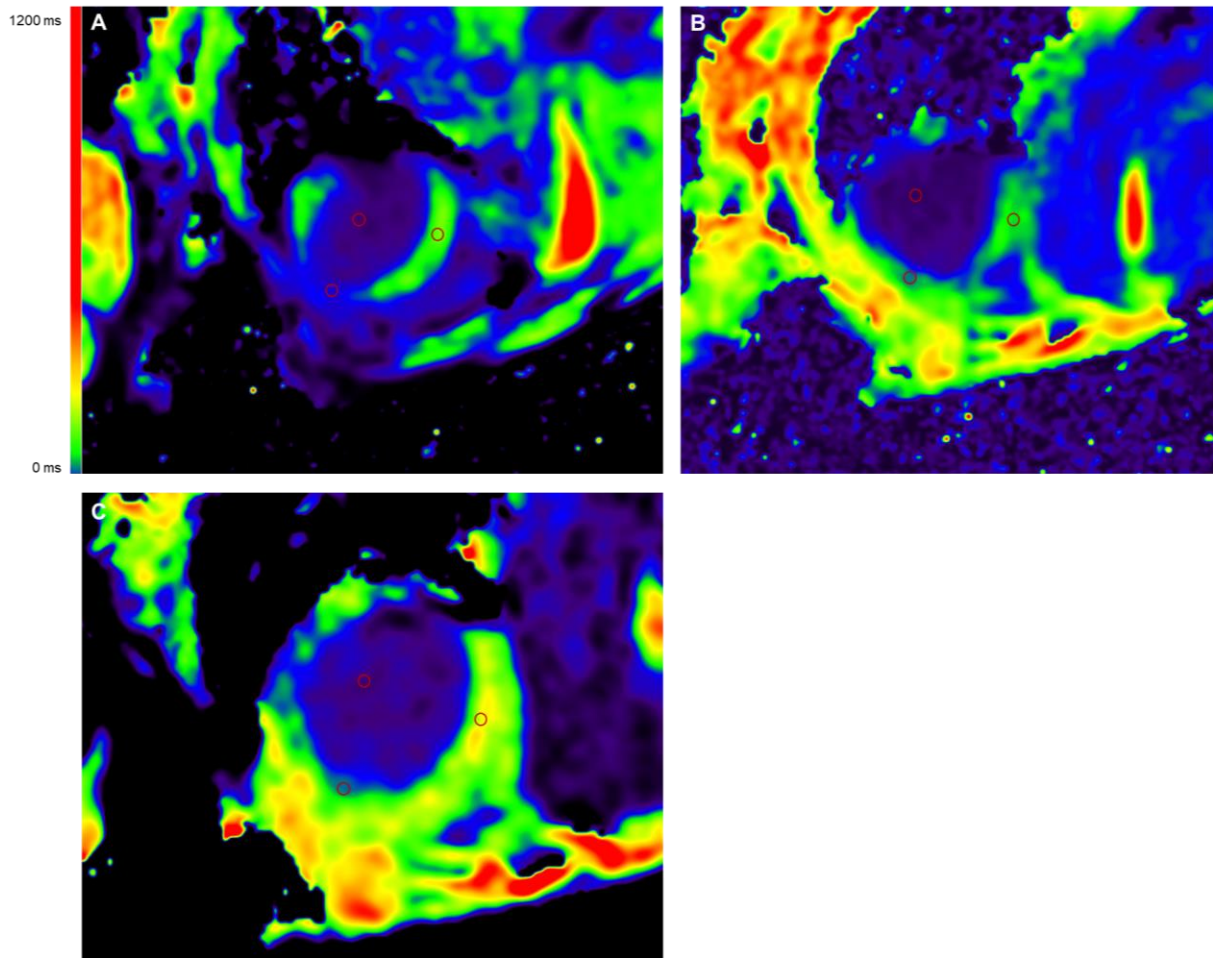


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der Auswertung der verschiedenen Kontrastmittel im T1-Mapping, , A: Gd-DTPA, B: Gadofluorine M, C: Gadofluorine P (Detaillierte Beschriftung siehe Abb. 15)

## 2.5.2 Ex-vivo Analysen mittels MALDI-TOF-IMS, LA-ICP-MS und Histologie

Die mit Elastica van Gieson gefärbten Schnitte wurden mittels eines digitalen Scanning-Systems (Mirax Desk, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) bei 20-facher Vergrößerung eingescannt und mit Hilfe der FlexImaging 4.0 Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) mit den gewonnenen massenspektrometrischen Daten zusammengeführt.

Zur Detektion der Menge an Gadofluorine P mittels MALDI-TOF-IMS wurde mit einer Standardkurve gearbeitet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden auf den gleichen Objektträger, auf dem der getrocknete Schnitt des Herzens aufgebracht war zusätzlich Leberschnitte aufgebracht. Auf diese wurden standardisierte Mengen an Gadofluorine P (0,05 – 0,01 mg/ml entsprechend 0,3782 – 0,0076 mM) getropft. Durch



Messung der Leberschnitte ließ sich ein Diagramm aus Signalintensität auf der Y-Achse und der dazugehörigen Gadofluorine P Konzentration auf der X-Achse erstellen. Im nachfolgenden Schritt wurde nun der Anschnitt des Herzens gemessen. Vergleich man die Signalintensität des Herzens mit der Signalintensität der Standardkurve, ließ sich daraus die im Myokard vorhandene Konzentration des Gadofluorine P berechnen.

Die Analyse der Gadolinium-Elemente in den Mäuseherzen mittels LA-ICP-MS erfolgte mit dem ICP-IMS Modell iCAP™ TQ (ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland), wobei Sauerstoff als Reaktionsgas verwendet wurde. Zur Quantifizierung wurde das Gadolinium-Isotop  $^{158}\text{Gd}$  verwendet und Massen-Verweilzeiten von 0,07 – 0,1 s für die Gadolinium-Isotope eingestellt. Im ersten Schritt wurden die Gefrierschnitte der Herzen durch eine fokussierte Laserstrahlung mittels eines LSX-213 G2<sup>+</sup> Laser-Ablations-Systems mit HeEX II Ablationszelle (Teledyne CETAC, Thousand Oaks, USA) abladiert und daraufhin mit Helium als Trägergas in die induktiv-gekoppelte Plasmaquelle des Massenspektrometers transportiert. Die abladierten Bereiche variierten in ihrer Größe zwischen 15 – 40  $\mu\text{m}$  bei angepasster Scangeschwindigkeit zwischen 45 – 120  $\mu\text{m/s}$ . Es wurden jeweils 9 Reihen pro Gelatine-Standard mit denselben Parametern abladiert. Zur Quantifizierung des enthaltenen Gadoliniums wurden daraufhin die durchschnittlich gemessenen Intensitäten mittels externer Kalibrierung verwendet.

Die histologischen Schnitte für sich allein betrachtet wurden mittels der öffentlich verfügbaren Software Definiens Enterprise Image Intelligence Suite (Definiens AG, München, Deutschland) hinsichtlich der Intensität der EvG-Färbung analysiert. Hierfür wurden für jeden digitalisierten Schnitt ROIs im Bereich des Herzens definiert. In diesen Bereichen wurde daraufhin die Intensität der EvG-Färbung identifiziert und quantifiziert. Die Auswertemethode basierte auf der Färbeintensität, der Morphologie des Gewebes, der Umgebung und der spezifischen Färbeeigenschaften. Hiermit konnten gefärbte Bereiche mit elastischen Fasern von weißen Bereichen im Gewebe unterschieden werden. Die relevante weiße Fläche und die relative Intensität der EvG-Färbung im Vergleich zur Gesamtoberfläche des Gewebes wurde anschließend berechnet. Die Daten wurden als Mittelwerte der Spitzenintensitäten angegeben.

### **2.5.3 Statistische Auswertung**

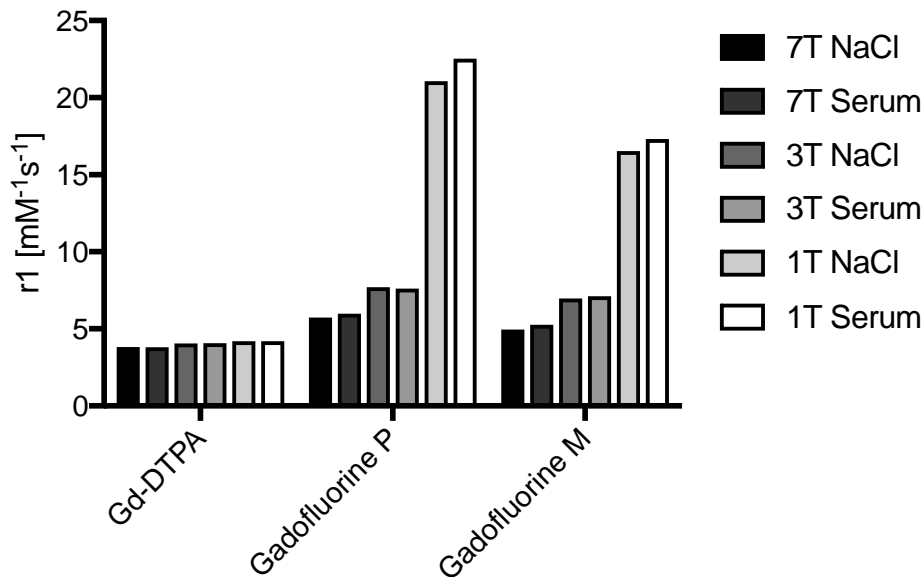
Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 7 durchgeführt. Die Analyse von Werten im Zeitverlauf zum Vergleich der Kinetiken verschiedener Konzentrationen der Kontrastmittel erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post-hoc Test für multiple Vergleiche. Der Vergleich von Werten zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt erfolgte mit einem ungepaarten zweiseitigen student's t-test. Der Vergleich von  $R_1$ -Werten und Konzentrationswerten mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion erfolgte mittels linearer Regression. Die nachfolgenden Ergebnisse wurden dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) oder Dotplot-Diagramme mit Mittelwert und 95% Konfidenzintervall. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Magnetresonanztomographie

#### 3.1.1 Relaxivität der Kontrastmittel ex vivo

Vor der eigentlichen in-vivo Bildgebung wurden zur Findung der geeigneten Kontrastmittelkonzentration Relaxivitätsmessungen von Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P durchgeführt. Die Relaxivität variiert vor allem in Abhängigkeit der Feldstärke und des Lösungsmediums. Die Relaxivität ( $r_1$ ) von Gd-DTPA, Gadofluorine P und Gadofluorine M wurde daher bei verschiedenen Feldstärken sowohl in Humanserum als auch in Natrium-Chlorid-Lösung bestimmt. Zu erkennen war, dass bei allen Kontrastmitteln unabhängig von der verwendeten Feldstärke kein oder nur ein geringer Unterschied der Relaxivität im Humanserum im Vergleich zur Natrium-Chlorid-Lösung bestand. Gd-DTPA zeigte kaum eine Veränderung der Relaxivität bei abnehmender Feldstärke (4,2  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 1T, 4,1  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 3T und 3,8  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 7T im Humanserum). Gadofluorine P (17,0  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 1T, 7,6  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 3T und 6,0  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 7T im Humanserum), sowie Gadofluorine M (17,3  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 1T, 7,2  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 3T, 5,3  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 7T im Humanserum) zeigten eine starke Abhängigkeit der Relaxivität von der verwendeten Feldstärke, wobei die Relaxivität bei 7T jeweils am geringsten und bei 1T am höchsten ausgeprägt war. Es ließ sich erkennen, dass das Relaxivitätsniveau insgesamt bei Gd-DTPA am niedrigsten ausgeprägt war und Gd-DTPA die geringste Abhängigkeit von der Feldstärke aufwies. Gadofluorine P zeigte das höchste Relaxivitätsniveau mit dem größten Abfall bei hohen Feldstärken.



**Abbildung 17: Darstellung der Relaxivität ( $r_1$ ) der drei Kontrastmittel (Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P) in Serum und Natrium-Chlorid-Lösung bei jeweils 1T, 3T und 7T. Es zeigte sich bei allen drei Kontrastmitteln kaum Unterschied der Relaxivität in Humanserum und Natrium-Chlorid, sowie eine Abhängigkeit der Relaxivität von der Feldstärke. Hierbei wies Gadofluorine P die höchste Abhängigkeit auf, gefolgt von Gadofluorine M, wohingegen Gd-DTPA kaum Abhängigkeit der Relaxivität von der Feldstärke aufwies.**

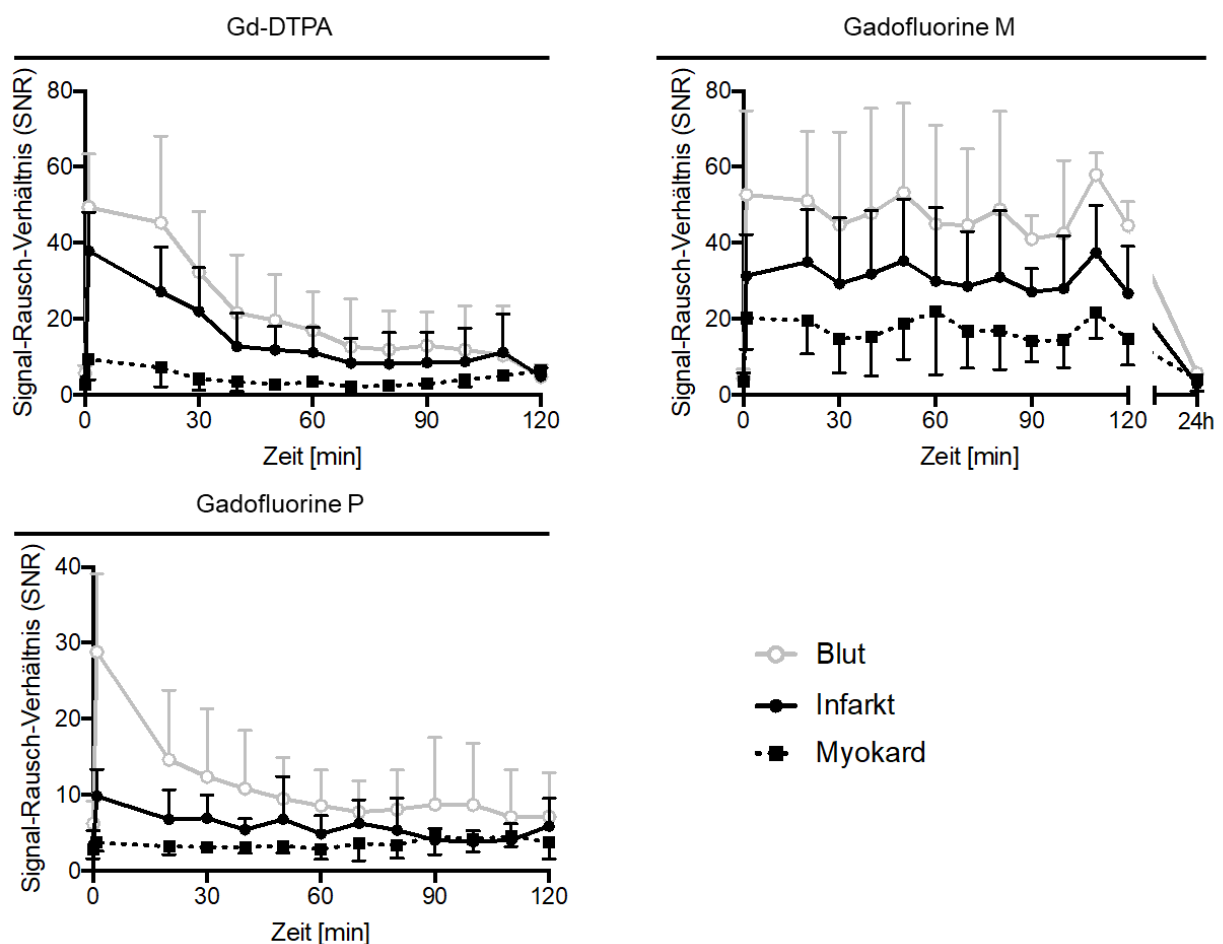
### 3.1.2 In vivo Bildgebung

#### 3.1.2.1 Kinetik der Anreicherung der Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P

Zum Vergleich der Kontrastmittelanreicherungen von Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P im Zeitverlauf und damit einhergehend der Findung des geeigneten Zeitpunktes für die weiteren Versuche, wurden Kinetik Analysen durchgeführt. Die Bildgebung fand eine Woche nach Infarktinduktion bei einem  $n = 6$  statt. In Abbildung 18 sind die ermittelten Daten aus den Late Gadolinium Enhancement Sequenzen erkennbar und in Abbildung 19 die Ergebnisse des T1 Mappings.

In der Analyse der Late Gadolinium Enhancement Sequenzen (Abb. 18) zeigte sich ein Anstieg der Kontrastmittelanreicherung für alle drei Kontrastmittel kurz nach der Injektion. Ein Anstieg war in allen Kompartimenten erkennbar, am stärksten jedoch im Blut gefolgt vom infarzierten Myokard und nur einem geringen Anstieg im gesunden Myokard. Dieser Anstieg fiel bei Gd-DTPA mit einem Anstieg des Signal-Rausch-Verhältnisses im Infarkt auf 37,9 am größten aus, gefolgt von 32,4 bei Gadofluorine M

und dem geringsten Anstieg mit 9,9 bei Gadofluorine P. Ein Abfall der Kontrastmittelanreicherung ließ sich im Zeitverlauf für alle drei Kontrastmittel sowohl im Infarkt als auch in den Kompartimenten Blut und gesundem Myokard feststellen. Gadofluorine P zeigte hierbei die kürzeste Verweildauer im Infarkt, wobei eine konstante Anreicherung zwischen 20 – 80 Minuten stattfindet. Bei Gd-DTPA zeigte sich eine stabile Anreicherung zwischen 40 – 110 Minuten. Gadofluorine M zeigte die längste Nachweisbarkeit im Infarkt und den anderen Kompartimenten und kehrte erst nach 24 Stunden auf den Ausgangswert zurück. Eine konstante Anreicherung zeigte sich zwischen 0 – 120 Minuten und möglicherweise noch über den Messzeitraum hinaus.



**Abbildung 18: Darstellung der Kontrastmittelanreicherung im Zeitverlauf nach Injektion des**

**Kontrastmittels zum Zeitpunkt 0 min mittels Late Gadolinium Enhancement.** Die Messung

erfolgte als in-vivo MRT-Kinetik mittels Late Gadolinium Enhancement Sequenzen. Dargestellt sind

die Kinetiken der Anreicherung für Gd-DTPA (links oben), Gadofluorine M (rechts oben) und

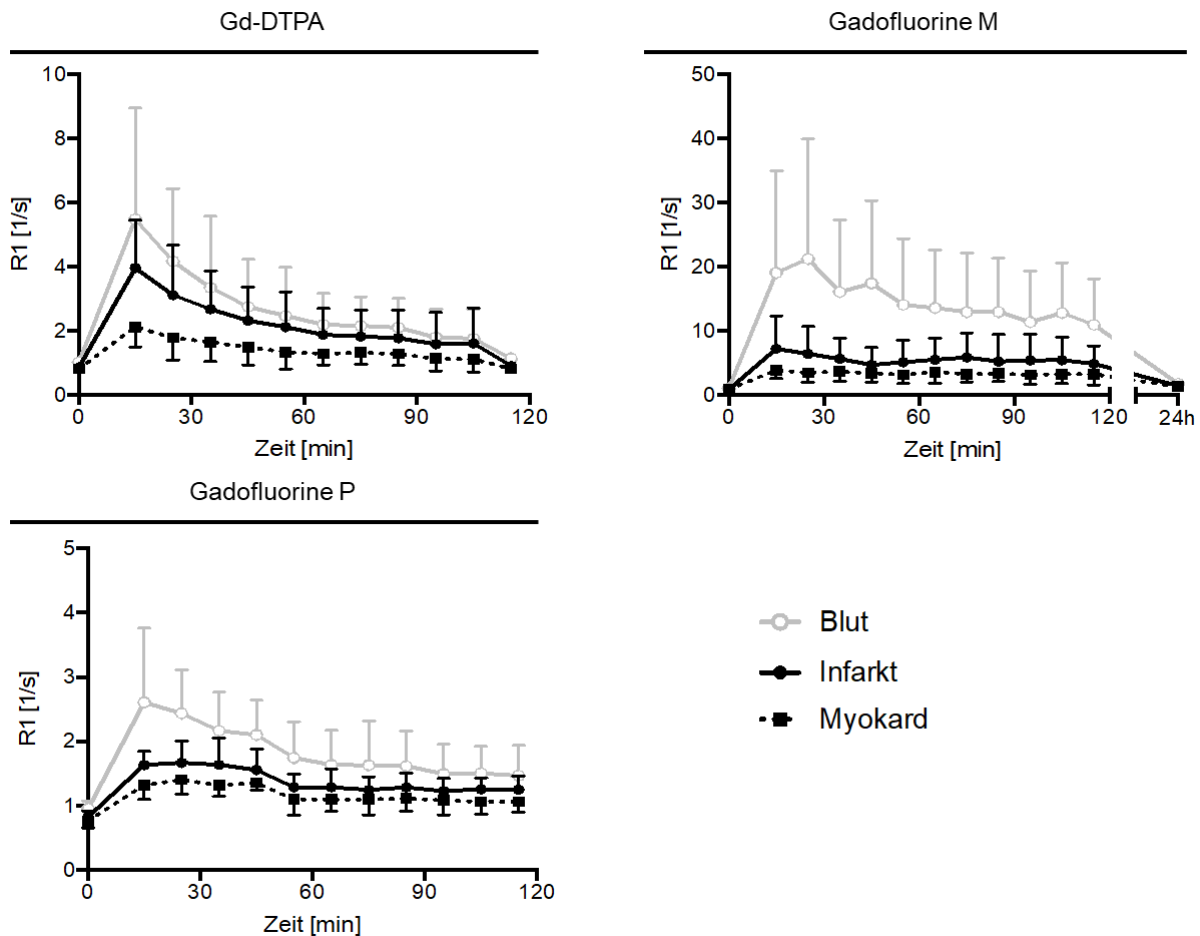
Gadofluorine P (links unten) nach Injektion der jeweiligen Kontrastmittel in denselben Mäusen (n = 6).

Die Messungen erfolgten eine Woche nach Infarktinduktion zuerst mit Gd-DTPA, am darauffolgenden

Tag mit Gadofluorine P und am darauffolgenden Tag mit Gadofluorine M. Die Kontrastmittel-

anreicherung ist mittels des Signal-Rausch-Verhältnisses für Blut, Infarkt und gesundem Myokard dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen für Blut und Infarkt als +SD und für das gesunde Myokard als –SD dargestellt.

In der Analyse der T1-Mapping Sequenzen (Abb. 19) zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Kontrastmittelanreicherung für alle drei Kontrastmittel kurz nach der Injektion. Ein Anstieg war auch hier in allen Kompartimenten erkennbar, am stärksten jedoch im Blut gefolgt vom infarzierten Myokard und nur einem geringen Anstieg im gesunden Myokard. Dieser Anstieg fiel – anders als in den LGE-Sequenzen – bei Gadofluorine M mit einem Anstieg des  $R_1$ -Wertes im Infarkt auf  $4,0 \text{ s}^{-1}$  am größten aus, gefolgt von  $7,3 \text{ s}^{-1}$  bei Gd-DTPA und dem geringsten Anstieg mit  $1,6 \text{ s}^{-1}$  bei Gadofluorine P. Ein Abfall der Kontrastmittelanreicherung ließ sich im Zeitverlauf für alle drei Kontrastmittel sowohl im Infarkt als auch in den Kompartimenten Blut und gesundes Myokard feststellen. Gadofluorine P zeigte hierbei die kürzeste Verweildauer im Infarkt, wobei eine stabile Anreicherung zwischen 15 – 45 Minuten stattfand. Bei Gd-DTPA zeigte sich ein stärkerer Peak zum Zeitpunkt 15 Minuten und darauffolgend ein kontinuierlicher Abfall der Kontrastmittelanreicherung im Myokard bis in Minute 115 kein Unterschied mehr zwischen gesundem und infarziertem Myokard zu verzeichnen war. Gadofluorine M zeigte auch im T1-Mapping die längste Nachweisbarkeit im Infarkt und den anderen Kompartimenten und kehrte erst nach 24 Stunden auf den Ausgangswert zurück. Eine konstante Anreicherung zeigte sich zwischen 0-120 Minuten. Sowohl in der LGE-Darstellung als auch im T1-Mapping zeigten sich die höchsten Werte für SNR bzw.  $R_1$  im Blut, gefolgt von der infarzierten Region und dem gesunden Myokard. Das T1-Mapping stellt ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Kontrastmittelanreicherung dar. Im direkten Vergleich von LGE- und T1-Mapping-Sequenzen zeigten letztere deutlich weniger Streuung. Beim T1-Mapping wird der direkte Wert der Magnetisierung im Sinne eines semiquantitativen Verfahrens gemessen, wohingegen bei der LGE-Sequenz ein Signal zu Rausch Verhältnis gemessen wird, welches das Rauschen als Störgröße enthält.



**Abbildung 19: Darstellung der Kontrastmittelanreicherung im Zeitverlauf nach Injektion des Kontrastmittels zum Zeitpunkt 0 min mittels T1-Mappings.** Dargestellt sind die Kinetiken der Anreicherung für Gd-DTPA (links oben), Gadofluorine M (rechts oben) und Gadofluorine P (links unten) nach Injektion der jeweiligen Kontrastmittel in denselben Mäusen ( $n = 6$ ). Die Messungen erfolgten eine Woche nach Infarktinduktion zuerst mit Gd-DTPA, am darauffolgenden Tag mit Gadofluorine P und am darauffolgenden Tag mit Gadofluorine M. Die Kontrastmittelanreicherung ist mittels der  $R_1$ -Werte für Blut, Infarkt und gesundes Myokard dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit werden die Standardabweichungen für Blut und Infarkt als +SD und für das gesunde Myokard als -SD dargestellt.

### 3.1.2.2 Gadofluorine P zur Beurteilung der myokardialen Heilung und des Remodelings nach Myokardinfarkt

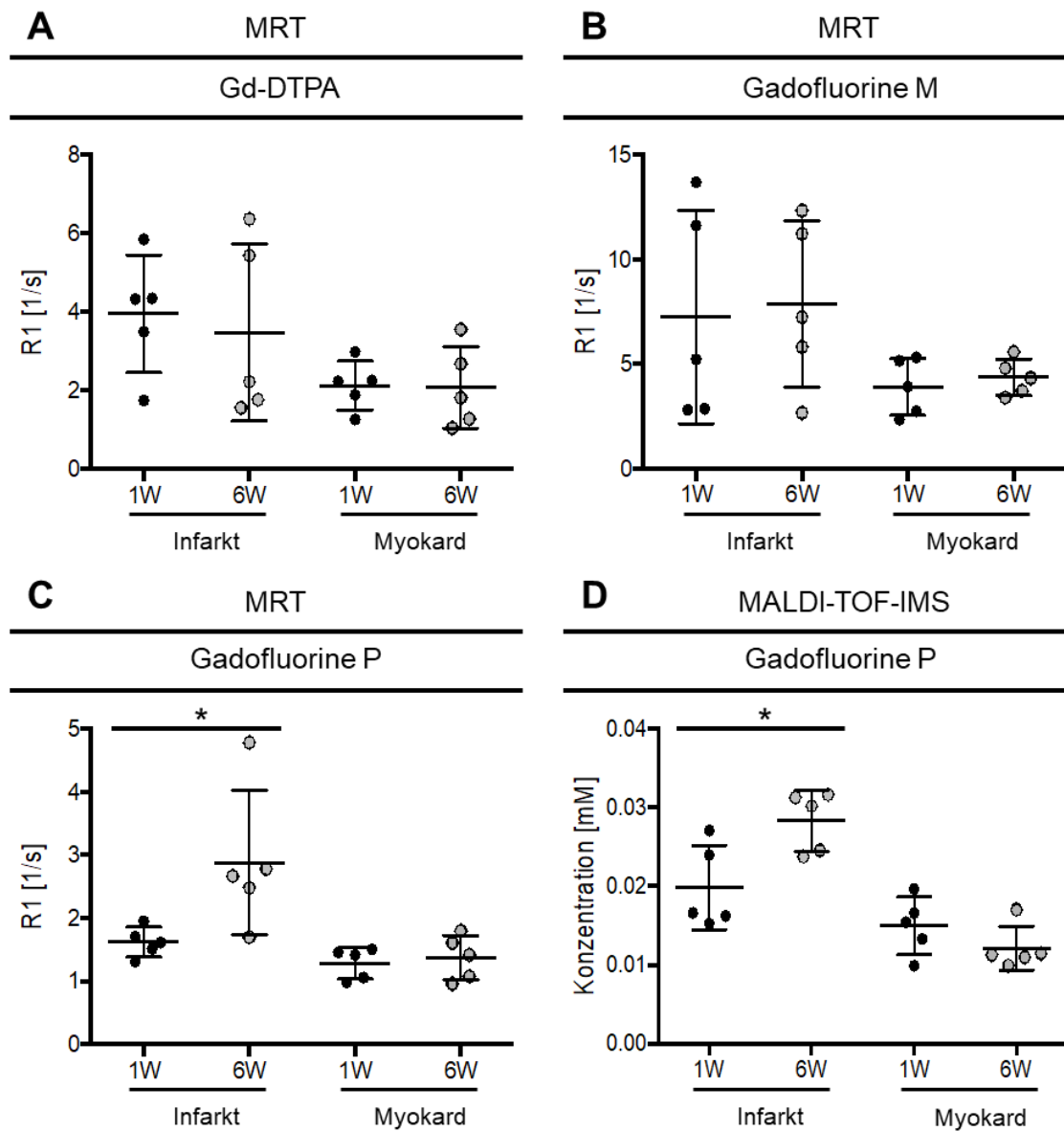
Zur Beurteilung der drei Kontrastmittel hinsichtlich der Darstellung des myokardialen Heilverhaltens und Remodelings des Herzens nach Myokardinfarkt wurden dieselben Mäuse ( $n = 5$ ) zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Infarktinduktion magnetresonanztomographisch mit den jeweiligen Kontrastmitteln untersucht. Zum 6-Wochen Zeitpunkt erfolgte die Gadofluorine P Messung am Schluss, sodass die Mäuseherzen danach ex-vivo mittels MALDI-TOF-IMS hinsichtlich der

vorherrschenden Gadofluorine P Konzentration untersucht werden konnten. Hiermit sollten die in-vivo gemessenen Intensitäten ex-vivo validiert werden.

Sowohl die  $R_1$ -Werte für Gd-DTPA als auch für Gadofluorine M wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem 1- und 6-Wochen Zeitpunkt auf.  $R_1$ -Werte für Gd-DTPA waren im infarzierten Myokard nach einer Woche  $4,0 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$  und nach 6 Wochen sogar erniedrigt mit  $3,5 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$ .  $R_1$ -Werte für Gadofluorine M waren im infarzierten Myokard nach einer Woche  $7,3 \pm 2,3 \text{ s}^{-1}$  und nach 6 Wochen  $7,9 \pm 1,8 \text{ s}^{-1}$  und zeigten zwar einen leichten jedoch nicht signifikanten Anstieg. Im Gegensatz dazu ließ sich ein signifikanter Unterschied für Gadofluorine P darstellen. Hierbei zeigten sich signifikant höhere Werte nach 6 Wochen ( $2,9 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$ ) im Vergleich zu Woche 1 ( $1,6 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ ) ( $p=0,04$ ). (Abb. 20C)

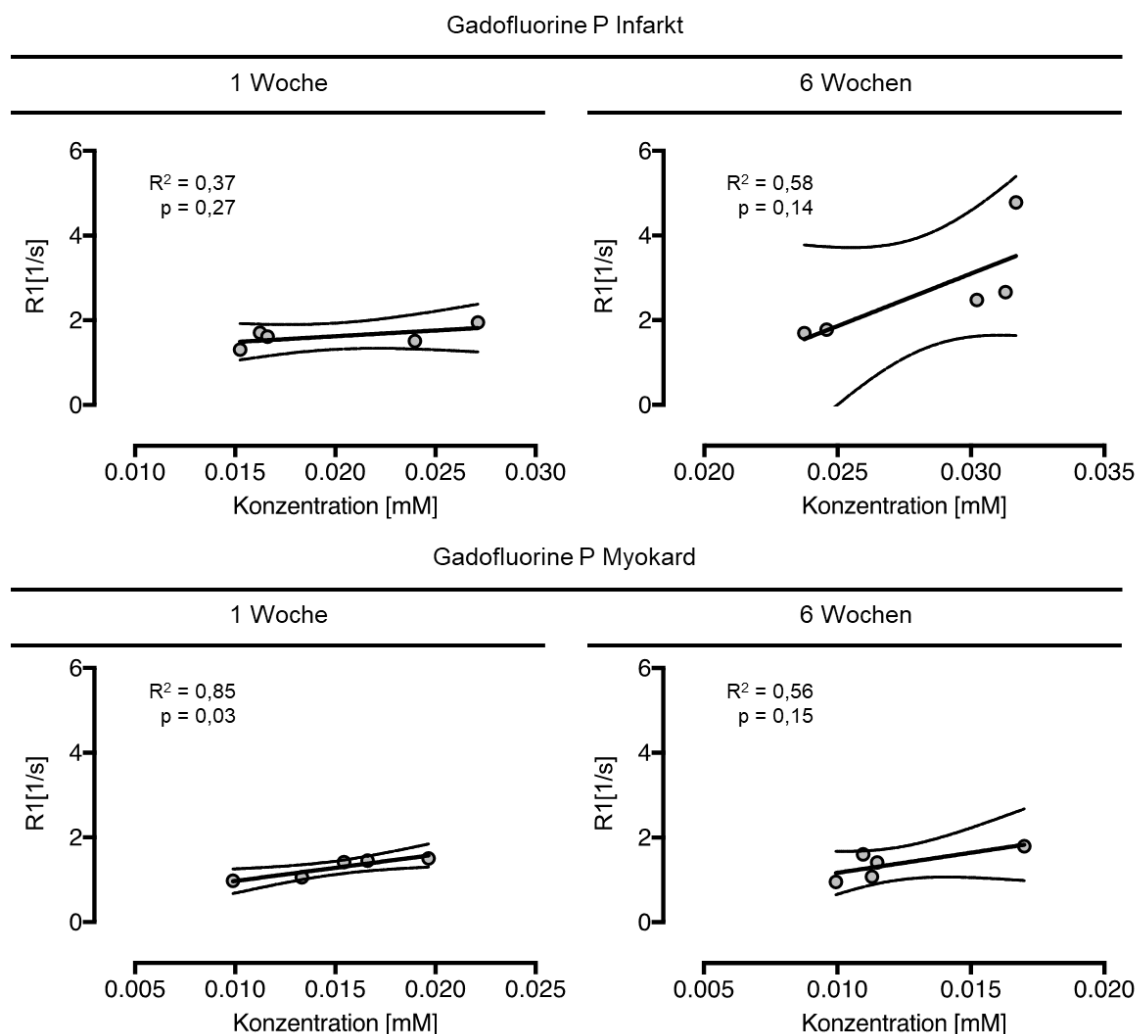
In der nachfolgend durchgeführten ex-vivo Analyse der Kontrastmittelkonzentration von Gadofluorine P mittels MALDI-TOF-IMS konnten die im MRT beobachteten Unterschiede bestätigt werden (Abb. 20D). Es zeigte sich korrespondierend zum im MRT gezeigten signifikanten Anstieg der gemessenen Intensität ebenfalls in der Massenspektrometrie ein signifikanter Anstieg ( $p = 0,02$ ) der Kontrastmittelkonzentration im Infarkt von Woche 1 ( $0,02 \pm 0,002 \text{ mM}$ ) zu 6 ( $0,03 \pm 0,002 \text{ mM}$ ).





**Abbildung 20: Kontrastmittelanreicherung in Infarkt und gesundem Myokard zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt.** A)-C) Vergleich der  $R_1$ -Werte für Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Infarktinduktion in denselben Mäusen über die Zeit gemessen ( $n = 5$ ). D) Vergleich der Konzentrationen von Gadofluorine P ex-vivo ermittelt mittels MALDI-TOF-IMS zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt ( $n = 5$  zum 1-Wochen Zeitpunkt (zusätzliche Mäuse) und  $n = 5$  zum 6-Wochen Zeitpunkt (entsprechen Mäusen der MRT-Bildgebung)). \* indiziert einen  $p$ -Wert  $< 0,05$  im ungepaarten zweiseitigen student's t-test

Es zeigte sich in der nachfolgend erstellten Korrelation der  $R_1$ -Werte mit den in der MALDI-TOF-IMS gemessenen Konzentrationen von Gadofluorine P nur eine moderate Korrelation, sowohl für den Infarkt als auch das gesunde Myokard. Im Bereich des Infarktes zeigte sich zum 1-Wochen Zeitpunkt mit einem  $R^2=0,37$  eine geringe Korrelation von  $R_1$ -Werten und ex-vivo gemessener Konzentration. Zum 6-Wochen Zeitpunkt konnte eine verstärkte Korrelation der Messwerte ( $R^2=0,58$ ) festgestellt werden, wobei höhere  $R_1$ -Werte mit höheren ex-vivo Konzentrationen einhergingen. Für das gesunde Myokard konnte sowohl zum 1- als auch 6-Wochen Zeitpunkt eine moderate Korrelation mit  $R^2=0,85$  und  $R^2=0,56$  nachgewiesen werden. (Abb. 21)

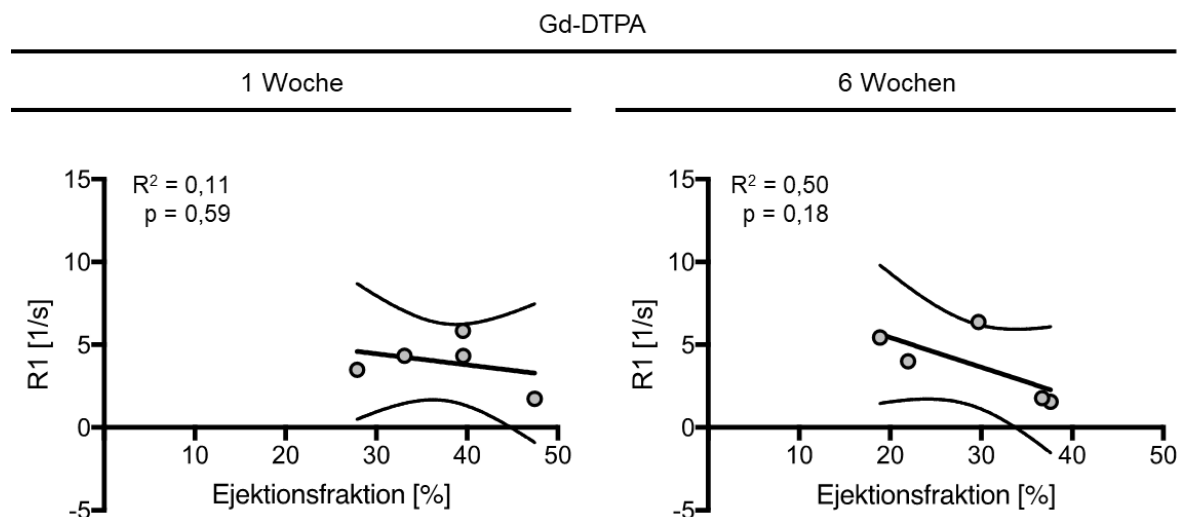


**Abbildung 21: Korrelation der  $R_1$ -Werte mit den ex-vivo gemessenen Gadofluorine P Konzentrationen mittels MALDI-TOF-IMS (n = 5 pro Zeitpunkt) im Infarkt (obere Reihe) und gesundem Myokard (untere Reihe).** Es war im Infarkt nur eine moderate Korrelation zum 1-Wochen Zeitpunkt ( $R^2 = 0,37$ ), als auch zum 6-Wochen Zeitpunkt ( $R^2 = 0,58$ ) erkennbar. Auch im Myokard war nur eine moderate Korrelation mit  $R^2 = 0,85$  nach 1 Woche und  $R^2 = 0,56$  nach 6 Wochen erkennbar.

### 3.1.2.3 Vergleich der Anreicherung von Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P mit der linksventrikulären Herzfunktion

Zur Evaluation des Zusammenhangs zwischen Kontrastmittelanreicherung und linksventrikulärer Herzfunktion wurde ergänzend die Herzfunktion mittels CINE-Sequenzen bestimmt. Die Grundlage dieses Versuchs war, dass eine vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix im Bereich des Infarktes zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion führt und mit einem geringeren Risiko der Herzinsuffizienz einhergeht. Es sollte untersucht werden, inwiefern sich mit den drei genutzten Kontrastmitteln die zunehmende Bildung extrazellulärer Matrix zum 6-Wochen Zeitpunkt darstellen und mit einer verbesserten LVEF korrelieren lässt. Für Gadofluorine P wurden die LVEFs zur Validierung der in-vivo Ergebnisse zusätzlich mit den ex-vivo Konzentrationen der MALDI-TOF-IMS Analyse korreliert.

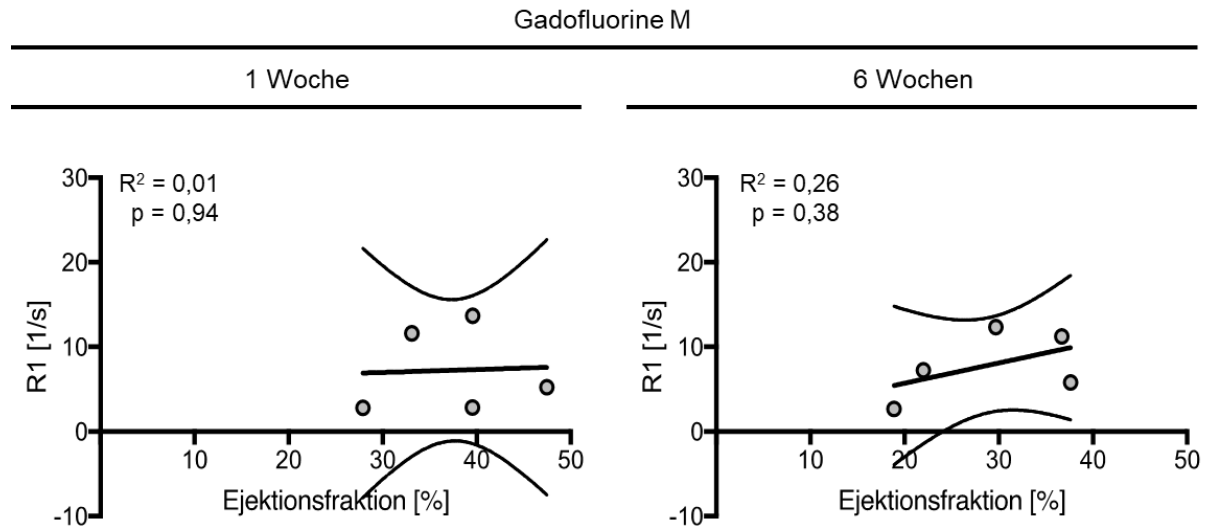
Bei der Verwendung von Gd-DTPA war zum 1-Wochen Zeitpunkt keine Korrelation der  $R_1$ -Werte mit der linksventrikulären Herzfunktion erkennbar ( $R^2 = 0,11$ ,  $p = 0,59$ ). Zum 6-Wochen Zeitpunkt zeigte sich eine inverse Korrelation ( $R^2 = 0,50$ ,  $p = 0,18$ ) (Abb. 22). Dies deutet daraufhin, dass Gd-DTPA die zunehmende Bildung extrazellulärer Matrix nicht ausreichend darstellen kann.



**Abbildung 22: Korrelation der Gd-DTPA Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion**

**zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt.** Korrelation der  $R_1$ -Werte mit den dazugehörigen Ejektionsfraktionen der Mäuse ( $n = 5$ ). Nach einer Woche war keine Korrelation erkennbar. Zum 6-Wochen Zeitpunkt war eine negative Korrelation erkennbar.

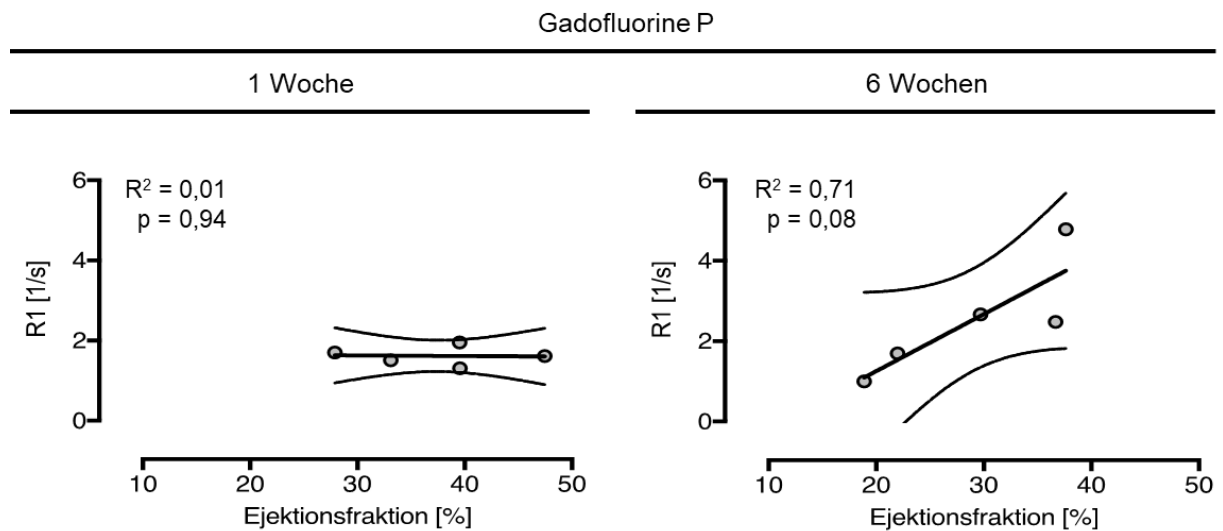
Auch die Analyse der Gadofluorine M Ergebnisse ergab sowohl nach einer ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = 0,94$ ), als auch nach 6 Wochen ( $R^2 = 0,26$ ,  $p = 0,38$ ) keine relevante Korrelation zwischen  $R_1$ -Werten und zugehörigen Ejektionsfraktionen. (Abb.23)



**Abbildung 23: Korrelation der Gadofluorine M Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt.** Korrelation der  $R_1$ -Werte mit den dazugehörigen Ejektionsfraktionen der Mäuse ( $n = 5$ ).

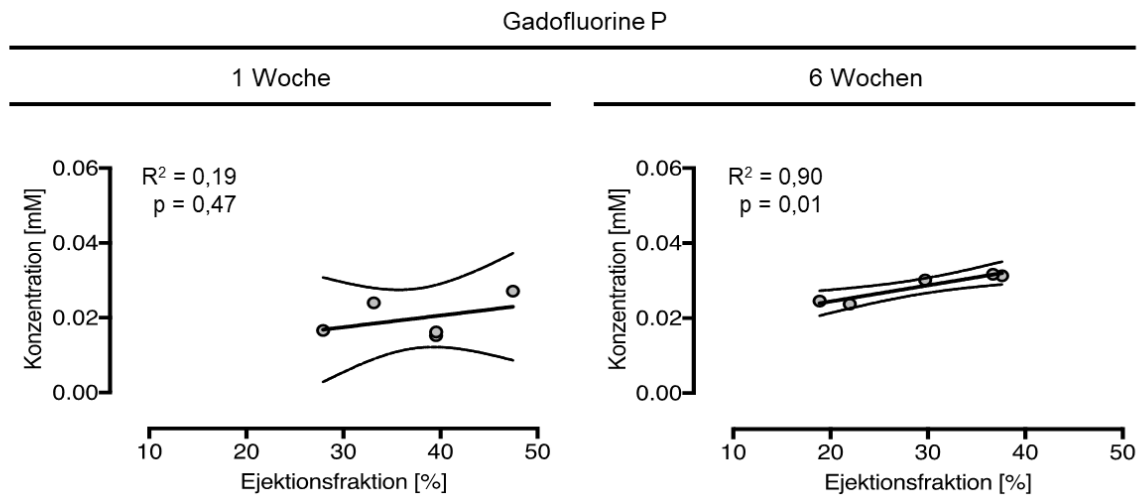
Bei der Verwendung von Gadofluorine P, auf welchem der Fokus in dieser Arbeit lag, war keine Korrelation der  $R_1$ -Werte mit der linksventrikulären Herzfunktion nach einer Woche erkennbar ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = 0,94$ ), jedoch eine positive Korrelation nach 6 Wochen ( $R^2 = 0,71$ ,  $p = 0,08$ ) (Abb.24). Gadofluorine P schien in diesem Zusammenhang die Zunahme der extrazellulären Matrix gut darzustellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Gadofluorine P im Vergleich mit den anderen Kontrastmitteln mit einem  $R^2 = 0,71$  die stärkste Korrelation der  $R_1$  Werte mit der Ejektionsfraktion nach 6 Wochen aufwies. Gadofluorine M hingegen wies zu beiden Zeitpunkten nur eine sehr geringe Korrelation auf. Die Bildgebung mit Gd-DTPA verzeichnete als einziges Kontrastmittel eine negative Korrelation, bei der eine zunehmende linksventrikuläre Funktion mit abnehmenden  $R_1$ -Werten korrelierte. Die negative Korrelation war nach 6 Wochen stärker ausgeprägt als nach einer Woche.



**Abbildung 24: Korrelation der Gadofluorine P Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt.** Korrelation der  $R_1$ -Werte mit den dazugehörigen Ejektionsfraktionen der Mäuse ( $n = 5$ ) Während zum 1-Wochen Zeitpunkt keine Korrelation zu erkennen war, ließ sich 6 Wochen nach Myokardinfarkt eine positive Korrelation erfassen.

Zur Validierung der in-vivo erfassten Ergebnisse für Gadofluorine P wurden diese ex-vivo validiert. Für Gadofluorine P zeigte auch der Vergleich von lokaler ex-vivo Konzentration des Kontrastmittels im Infarkt mit der Ejektionsfraktion zum 1-Wochen Zeitpunkt nur eine geringe Korrelation ( $R^2 = 0,19$ ,  $p = 0,47$ ). Zum 6-Wochen Zeitpunkt ließ sich hier jedoch eine statistisch signifikante Korrelation feststellen ( $R^2 = 0,90$ ,  $p = 0,01$ ) (Abb. 25), welche stärker ausgeprägt war als die in Abbildung 24 zu erkennende Korrelation der  $R_1$ -Werte mit der Ejektionsfraktion. Sowohl die in-vivo als auch die ex-vivo Erkenntnisse für Gadofluorine P bestärkten die Hypothese, dass Gadofluorine P an Bestandteile der extrazellulären Matrix bindet und eine vermehrte Bildung dieser mit einer verbesserten kardialen Funktion einhergeht.



**Abbildung 25: Korrelation der Gadofluorine P Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt.** Korrelation der Konzentrationen mit den dazugehörigen Ejektionsfraktionen der Mäuse ( $n = 5$  pro Zeitpunkt). Während zum 1-Wochen Zeitpunkt nur eine geringe Korrelation erkennbar war, zeigte sich nach 6 Wochen eine signifikante positive Korrelation.

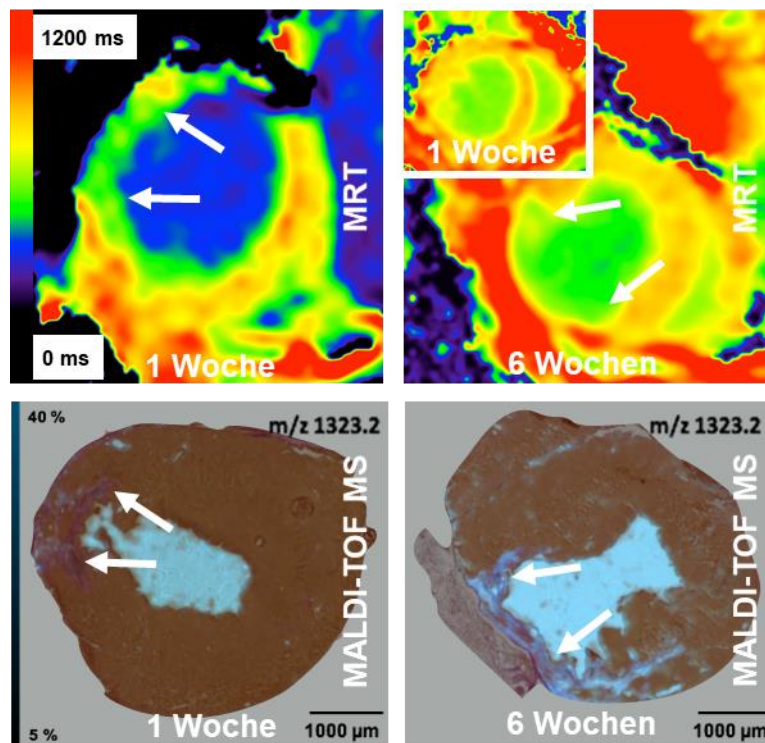
## 3.2 Ex-vivo Validierung der magnetresonanztomographisch ermittelten Daten

### 3.2.1 Analyse der Gadofluorine P Konzentration mittels MALDI-TOF-IMS

Durch MALDI-TOF-IMS war es möglich in vivo appliziertes Gadofluorine P im Bereich des Herzens post mortem zu visualisieren und zu quantifizieren. Mit Hilfe der Histologie erfolgte die Zuordnung der MALDI-TOF-IMS Daten zu den Bereichen des gesunden und infarzierten Myokards.

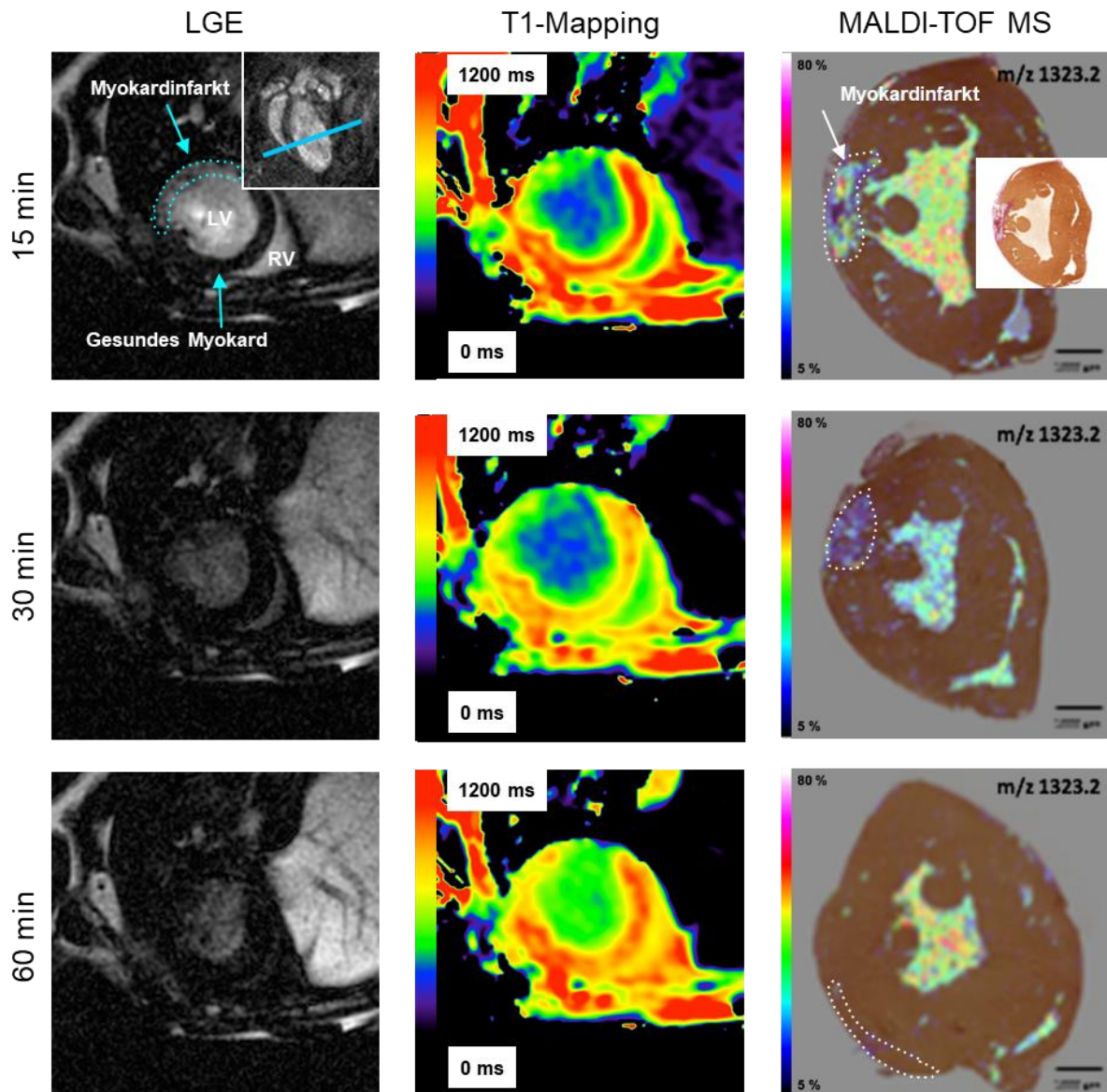
Die folgende Grafik (Abb. 26) zeigt visuell den Zusammenhang der in-vivo und ex-vivo Bildgebung nach Gadofluorine P Gabe. Sowohl für den 1- als auch den 6-Wochen Zeitpunkt wurde für die in-vivo und ex-vivo Bildgebung dieselbe Maus verwendet. Diese Mäuse wurden nach der Euthanasie zum 6-Wochen Zeitpunkt der MALDI-TOF-IMS Analyse und Histologie zugeführt. Um den 1-Wochen Zeitpunkt darzustellen wurden zusätzliche Mäuse für MALDI-TOF-IMS und Histologie verwendet.

Zu beiden Zeitpunkten ließ sich schon rein optisch ein Zusammenhang des in der MRT-Bildgebung gemessenen Infarktareals mit den MALDI-TOF-IMS und histologischen Daten erkennen.



**Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der Gadofluorine P Anreicherung in-vivo (T1-Maps obere Reihe) und ex-vivo (MALDI-TOF-IMS fusioniert mit EvG-Färbung untere Reihe) jeweils zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt.** In-vivo MRT-Daten und ex-vivo Validierungen mittels MALDI-TOF-IMS und EvG-Färbung wurden jeweils von derselben Maus angefertigt. Die linke Reihe zeigt die korrespondierenden Ergebnisse zum 1-Wochen Zeitpunkt und die rechte Reihe die korrespondierenden Ergebnisse zum 6-Wochen Zeitpunkt. Mit Pfeilen ist jeweils der Bereich des Myokardinfarktes markiert. Sowohl zum 1- als auch 6-Wochen Zeitpunkt zeigte sich eine Kongruenz von Lage und Größe des Infarktes in der Gadofluorine P T1-Map verglichen mit den ex-vivo Daten.

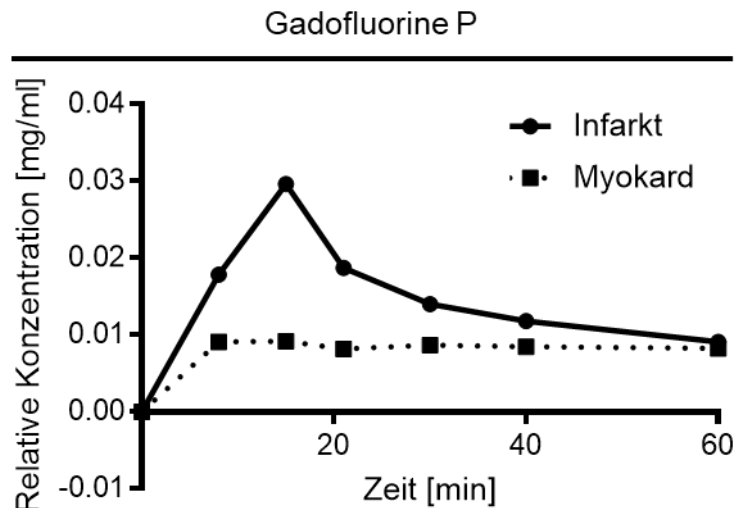
Zur genaueren Evaluation zeigt Abbildung 27 graphisch den Zusammenhang zwischen LGE und T1-Mapping, sowie die Validierung mittels MALDI-TOF-IMS im Sinne einer Kinetik auf. Gadofluorine P zeigte eine Akkumulation im Bereich der Infarkt Narbe. Wie erwartet konnten nur geringe Mengen Gadofluorine P im gesunden Myokard nachgewiesen werden. Der Höchstwert der Gadofluorine P Konzentration im infarzierten Myokard wurde 15 Minuten nach intravenöser Injektion mit 0,0296 mM erreicht. Nach 60 Minuten war die Gadofluorine P Konzentration im Infarkt auf die Ausgangskonzentration vor Kontrastmittelapplikation zurückgefallen (0,0091 mM). Im gesunden Myokard blieb die Gadofluorine P Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant (0,0091 mM 15 min p.i. versus 0,0082 mM 60 min p.i.) (Abb. 27 und 28)



**Abbildung 27: Kinetik von Gadofluorine P mittels MALDI-TOF-IMS und MRT.** Darstellung der Gadofluorine P Anreicherung im Zeitverlauf zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 Minuten nach Injektion. Die linke Reihe zeigt das Late Gadolinium Enhancement, in der mittleren Reihe befinden sich die T1-Maps und ganz rechts die korrespondierenden MALDI-TOF-IMS Bilder fusioniert mit Elastica-van-Gieson Färbungen. Im linken oberen Bild findet sich in klein zusätzlich die Darstellung einer koronaren Schnittführung zur besseren anatomischen Orientierung. In blau ist hier die Schnittführung der MRT-Bildgebung dargestellt. Infarktabgrenzung erfolgte wie im kleinen Bild rechts oben erkennbar mittels EvG-Färbung.

Zusätzlich wurde auch noch mit  $n=1$  pro Zeitpunkt eine MALDI-TOF-IMS Kinetik durchgeführt. Sowohl der Verlauf der Kinetik mit einem Peak zwischen 1-20 Minuten, als auch das Areal des Myokardinfarktes konnten die Ergebnisse der in-vivo MRT-Bildgebung bestätigen.

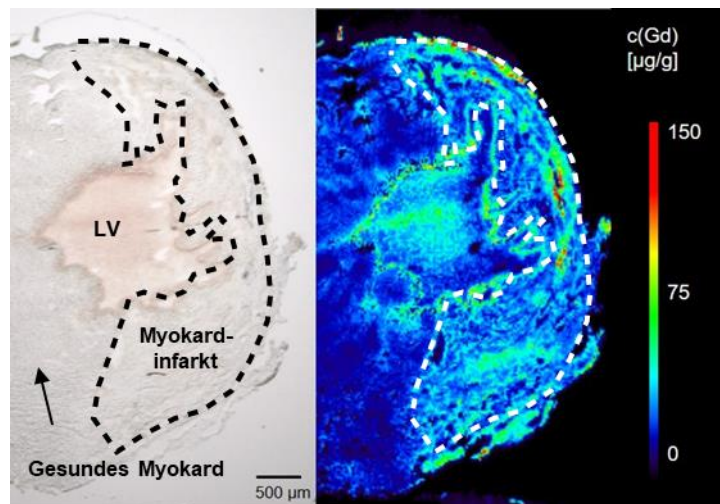




**Abbildung 28: Graphische Darstellung der Gadofluorine P Konzentration in der MALDI-TOF-IMS im Zeitverlauf nach Kontrastmittelinjektion. (n = 1 pro Zeitpunkt).** Darstellung der Gadofluorine P Anreicherung im Zeitverlauf über 60 Minuten nach Injektion des Kontrastmittels. Es war ein deutlicher Anstieg der Kontrastmittelkonzentration im Infarkt zu erkennen mit einem Peak nach 15 min. Darauf folgend ließ sich ein Abklingen der Anreicherung erkennen mit Erreichen des Ausgangsniveaus nach ca. 60 min. Über den gesamten Zeitverlauf verblieben die messbaren Konzentrationen im gesunden Myokard konstant im Bereich der Baseline.

### 3.2.2 Analyse der Gadofluorine P Konzentration mittels elementarer LA-ICP-MS

Zur weiteren Validierung und Quantifizierung der mittels MALDI-TOF-IMS akquirierten Beobachtungen wurde eine zusätzliche Analyse mit LA-ICP-MS durchgeführt. MALDI TOF-IMS ist gut geeignet zur Beurteilung und Quantifizierung von molekularen MRT Kontrastmitteln. MALDI-TOF-IMS hat jedoch nur ein Auflösungsvermögen von bis zu 50  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz dazu liefert LA-ICP-MS eine quantitative Analyse des elementaren Gadoliniums im Gewebe und erreicht zudem eine bessere Ortsauflösung mit bis zu 5  $\mu\text{m}$ . Mit LA-ICP-MS ist in dieser Arbeit eine Quantifizierung des Gadoliniums in Infarkt und gesundem Myokard mit einer Auflösung von bis zu 15  $\mu\text{m}$  gelungen.

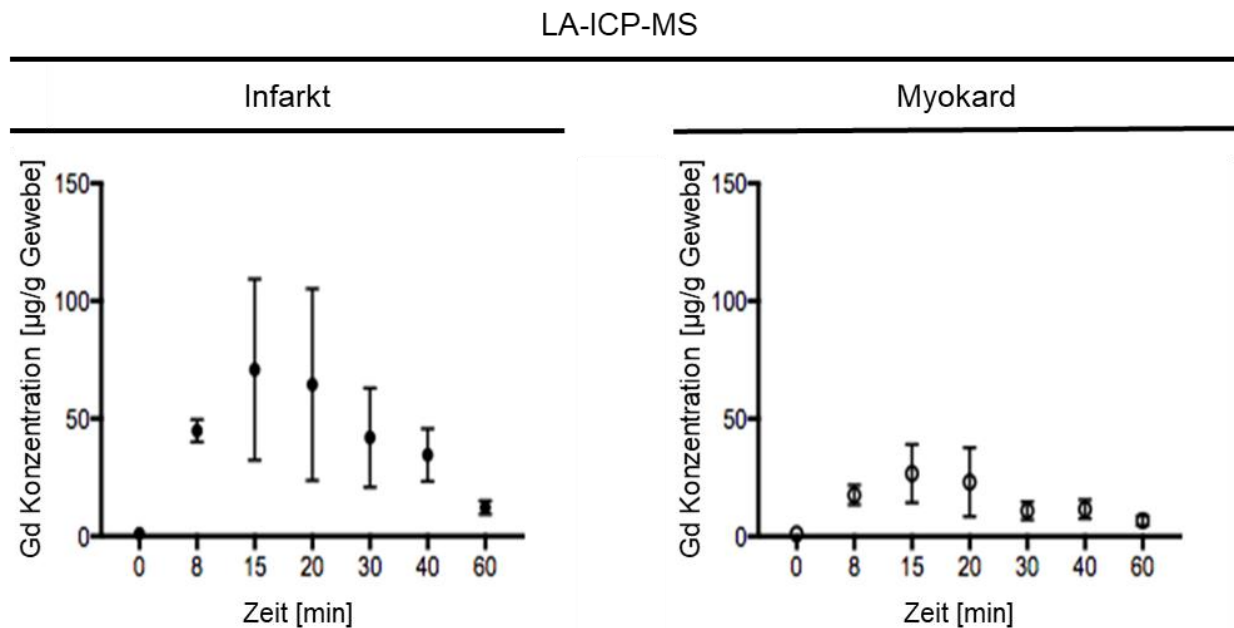


**Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der Gadofluorine P Anreicherung mittels LA-ICP-MS.**

Links im Bild ist ein ungefärbter histologischer Schnitt des Mäuseherzens erkennbar. Dargestellt sind als umrandeter Bereich der Infarkt, sowie zusätzlich das gesunde Myokard und der Innenraum des linken Ventrikels (LV). Rechts im Bild ist korrespondierend dazu von der gleichen Maus eine LA-ICP-MS Darstellung dargestellt. Gezeigt wird die Verteilung des Gadolinium-Isotops <sup>158</sup>Gd im Bereich des infarzierten Myokards 15 Minuten nach Injektion von Gadofluorine P mit einer Ortsauflösung von 15 µm.

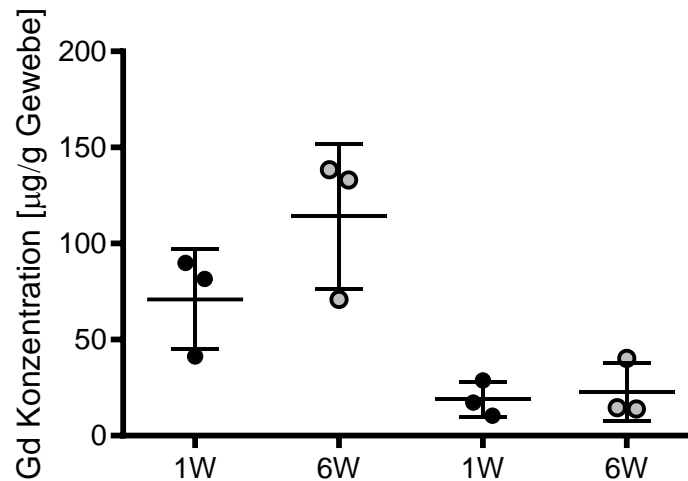
Zuerst wurde mit 3 Mäusen (n=3) pro Zeiteinheit die Konzentration von Gadofluorine P im Infarkt und im gesunden Myokard über einen Zeitraum von 60 Minuten bestimmt. Wie auch in der MRT-Bildgebung als auch der MALDI-TOF-IMS Analyse dienten die erstellten Kinetiken dazu, die Höhe der Konzentration von Gadofluorine P im Gewebe im Zeitverlauf darzustellen. Diese Information war wichtig zur Validierung des geeigneten Messzeitpunktes in der in-vivo MRT-Bildgebung, da der Messzeitpunkt bei einer ausreichenden Konzentration im Gewebe gewählt werden sollte. Im infarzierten Myokard zeigte sich ab Injektion zum Zeitpunkt 0 min ein Anstieg der Konzentration bis zu einem Peak mit der höchsten Konzentration 15 Minuten nach Injektion des Gadofluorine Ps. Danach ließ sich ein kontinuierlicher Abfall der gemessenen Konzentration feststellen, nach 60 Minuten war die Konzentration fast wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen. Auch im gesunden Myokard ließ sich ein Anstieg der Konzentration im Zeitverlauf verzeichnen mit einem Peak bei 15 Minuten und ebenfalls einem Abfall fast auf das Ausgangsniveau nach 60 Minuten. Der Anstieg war jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als im Bereich des Infarktes. Im gesunden Myokard ließ sich im Gegensatz zur MALDI-TOF-IMS Analyse kein konstanter Wert über den gesamten Messzeitraum ermitteln, sondern ein ebenfalls deutlicher Anstieg 15-20 Minuten nach Injektion. Der Zeitverlauf der Konzentration war vergleichbar mit den

Ergebnissen der MRT und MALDI-TOF-IMS Kinetiken, so dass für die nachfolgenden Versuche im Zeitraumen von 1-20 Minuten die relevanten Messungen erfolgten.



**Abbildung 30: Graphische Darstellung der Gadofluorine P Konzentration in der LA-ICP-MS zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt.** Kinetiken wurden für die Gadofluorine P Konzentration im Infarkt (links) und im gesunden Myokard (rechts) angefertigt (n = 3 pro Zeitpunkt). Die höchste Konzentration wurde 15 Minuten nach Injektion im Infarkt gemessen. Damit waren die ermittelten Daten vergleichbar mit den durch MALDI-TOF-IMS ermittelten kinetischen Daten.

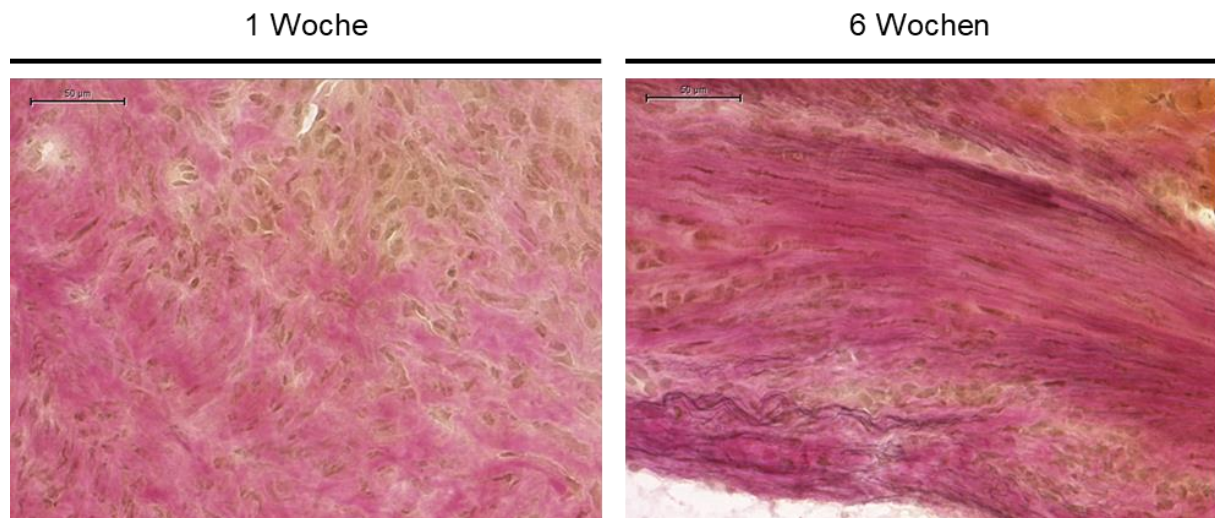
Zur weiteren Validierung der in-vivo gemessenen Signalintensitäten mit Gadofluorine P nach 6 Wochen, sollte durch die LA-ICP-MS der Anstieg der Konzentration vom 1- zum 6-Wochen Zeitpunkt überprüft werden. Die Analyse mit LA-ICP-MS zeigte einen Anstieg der Gadolinium Konzentration im infarzierten Myokard nach 6 Wochen im Vergleich zu Woche 1. Die Gadolinium Konzentration im gesunden Myokard konnten sowohl nach einer Woche als auch nach sechs Wochen nur auf einem sehr niedrigen Niveau nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmten mit den Beobachtungen der in-vivo und MALDI-TOF-IMS Analysen überein. Es konnten somit die dort gemessenen Daten validiert werden.



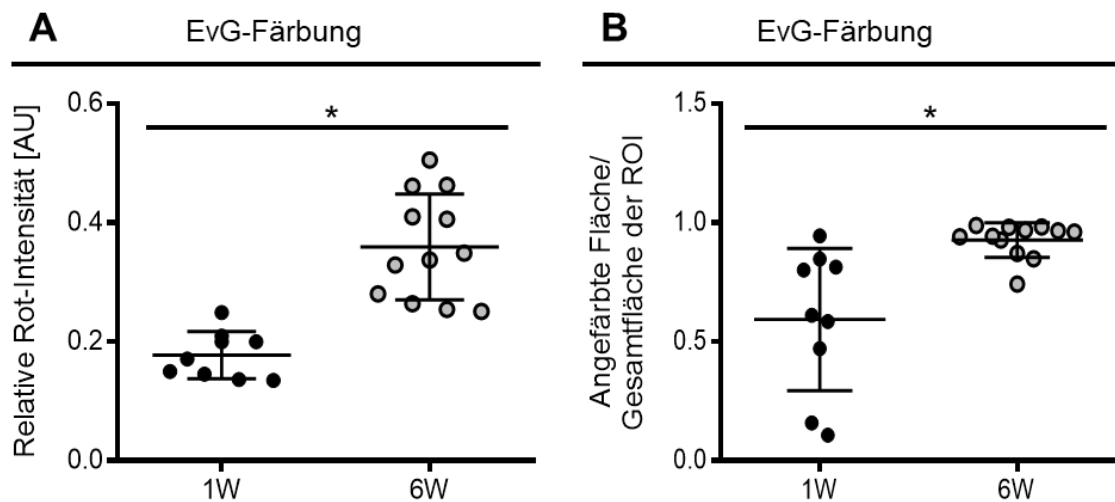
**Abbildung 31: Kontrastmittelanreicherung in Infarkt und gesundem Myokard zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt.** Vergleich der Konzentrationen von Gadofluorine P ex-vivo ermittelt mittels LA-ICP-MS zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt ( $n = 3$  pro Zeitpunkt). Erhöhte Anreicherung von Gadofluorine P im Myokardinfarkt nach 6 Wochen im Vergleich zu Woche 1 erkennbar.

### 3.2.3 Beurteilung der Synthese extrazellulärer Matrix mittels Histologie

Zur weiteren Analyse der in der MRT-Bildgebung beobachteten Zunahme der Gadofluorine P Konzentration nach sechs Wochen im Vergleich zu Woche 1 wurde eine histologische Beurteilung durchgeführt. Diese hatte zum Ziel extrazelluläre Matrix, welche den wichtigsten Bindungspartner für Gadofluorine P darstellt, mit Hilfe einer EvG-Färbung nachzuweisen. Hierbei wurde die mittlere Rot-Intensität, sowie auch das Verhältnis von rot gefärbtem/gesamtem ROI-Bereich beurteilt. Beide Werte sind Surrogat Parameter für die Intensität von Kollagenfasern. Beide Werte zeigten eine statistisch signifikante Zunahme nach 6 Wochen im Vergleich zu Woche 1 ( $p = 0,0014$  und  $p < 0,0001$ ). Auch schon makroskopisch ließ sich eine Veränderung des Arrangements der Fasern, mit einer geordneten Kollagenbildung nach 6 Wochen, feststellen. Diese Ergebnisse passten zu den vorher durchgeführten MRT und massenspektrometrischen Untersuchungen und konnten diese bestätigen.



**Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der Elastica-van-Gieson Färbung zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt.** Bereits rein bildlich ließ sich eine Zunahme der extrazellulären Matrix an der vermehrten Rotfärbung des Gewebes in der EvG-Färbung erkennen. Zudem erschienen die Fasern zum 6-Wochen Zeitpunkt wesentlich geordneter.



**Abbildung 33: Beurteilung der Synthese extrazellulärer Matrix.** \* indiziert einen p-Wert < 0,05

A) Vergleich der mittleren Rot-Intensität in der EvG Färbung des infarzierten Myokards nach 1 (n = 9) und 6 (n = 12) Wochen. Zunahme der mittleren Rot-Intensität nach 6 Wochen im Vergleich zu Woche 1 durch vermehrte extrazelluläre Matrix durch Narbenbildung (p = 0,0014). B) Vergleich des Verhältnisses von rot gefärbtem Bereich/gesamter ROI in der EvG Färbung des infarzierten Myokards nach 1 (n = 9) und 6 (n = 12) Wochen. Es ließ sich eine Zunahme des Anteiles rot gefärbter Bereiche an der gesamten ROI nach 6 Wochen im Vergleich zu Woche 1 erkennen. (p < 0,0001).

## 4 Diskussion

Die MRT-Bildgebung stellt eine gute Möglichkeit dar molekulare Prozesse im Rahmen der Infarktheilung und des kardialen Remodelings zu erfassen und diese mit einer guten Ortsauflösung darzustellen. In dieser Arbeit wurde ein kombiniertes Vorgehen aus in-vivo MRT-Bildgebung und ex-vivo massenspektrometrischen Verfahren gewählt. Vorrangiges Ziel hierbei war, die Rolle des Kontrastmittels Gadofluorine P im Rahmen des kardialen Remodelings nach Myokardinfarktinduktion im Mausmodell genauer zu untersuchen.

Grundlage für diese Arbeit war die Hypothese, dass Gadofluorine P es ermöglicht, Proteine der extrazellulären Matrix, die für das Remodeling nach stattgehabtem Myokardinfarkt essenziell sind, insbesondere Kollagen darzustellen. In dieser Arbeit wurde in diesem Zusammenhang postuliert, dass eine verstärkte Signalintensität nach Gadofluorine P Administration für eine vermehrte Narbenbildung im Bereich des Infarktes durch vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix spricht. Zusätzlich sollte gezeigt werden, dass eine vermehrte Gadofluorine P Aufnahme im Verlauf des myokardialen Remodelings nach Myokardinfarkt mit einer verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion korreliert. Die Ausbildung einer stabilen Narbe durch Synthese extrazellulärer Matrix ist wichtig, um eine Dilatation mit einhergehender Störung der Pumpfunktion und Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu verhindern.

Weiterhin war Grundlage dieser Arbeit die Hypothese, dass MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS gute Möglichkeiten zur Quantifizierung der tatsächlich aufgenommenen Menge an Gadofluorine P im Gewebe darstellen. In der MRT-Bildgebung konnte zwar die Intensität des Signals nach Applikation von Gadofluorine P gemessen werden. Diese korrelierte jedoch nicht zwingend mit der tatsächlich vorhandenen Konzentration an Gadofluorine P im Gewebe, da die gemessene Intensität von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann. Seit kurzem ist es möglich mittels MALDI-TOF-IMS Gadolinium-haltige Kontrastmittel orts aufgelöst nachzuweisen und mittels LA-ICP-MS noch stärker aufgelöst auf elementarer Ebene nachzuweisen. Durch Anwendung dieser beiden Methoden konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die vermehrte Signalintensität in-vivo im MRT gut korrelierte mit den daraufhin ex-vivo

gemessenen Konzentration des Gadofluorine P in der MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS.

#### 4.1 Wahl des Tiermodells

Zur Evaluation des an Kollagen bindenden Kontrastmittels Gadofluorine P, sowie den nachfolgenden ex-vivo Validierungen wurde in dieser Arbeit ein etabliertes Mausmodell verwendet. Die verwendeten Mäuse waren weibliche Mäuse des Typs C57BL/6J. Dieses Model wird aktuell in der kardiovaskulären Forschung am häufigsten verwendet und ist der erste Inzuchtstamm, bei dem eine komplette Sequenzierung des Genoms vorliegt. (The Jackson Laboratory, n.d.) Außerdem verfügen C57BL/6J Mäuse verglichen mit anderen Mauslinien über ein kompetentes Immunsystem und sind somit in Bezug auf Heilungsprozesse wie die Myokardheilung mit dem Menschen vergleichbar. C57BL/6J Mäuse werden insbesondere in der tierexperimentellen Forschung kardiovaskulärer Erkrankungen seit Jahren verwendet. Typischerweise werden weibliche Mäuse aufgrund der einfacheren Käfighaltung, sowie des Einflusses der Östrogen-Rezeptoren auf den Gefäßen verwendet. (Rani S. Sellers, 2017) (R. S. Sellers et al., 2012) (Cavasin et al., 2004) (Otsuki et al., 2003) In verschiedenen Studien wurde sowohl die Anatomie als auch die Methode der LAD-Ligatur zur Infarktinduktion erfolgreich bei C57BL/6J Mäusen charakterisiert und verwendet. (Kumar et al., 2005) Im Rahmen der Myokardinfarktforschung stellt das Mausmodell eine gut reproduzierbare Möglichkeit der Infarktinduktion dar. Die Anatomie und Physiologie des Herzens im Mausmodell ist ähnlich dem des Menschen und bietet daher eine gute Grundlage zur experimentellen Forschung. (Milani-Nejad et al., 2014) Es müssen jedoch auch Unterschiede zum Menschen beachtet werden, so weicht beispielsweise die Blutversorgung v.a. im Bereich des Septums im Mausmodell von der humanen ab. (Salto-Tellez et al., 2004) (Fernandez et al., 2008) (Kumar et al., 2005)

Die Induktion eines Myokardinfarktes in der Maus erfolgt in unserem Modell durch Ligatur der LAD. (Zolotareva et al., 1978) (Michael et al., 1995) Es konnte schon früh gezeigt werden, dass die entstehenden Infarkte reproduzierbar und in ihrer Größe vergleichbar sind. (Salto-Tellez et al., 2004) (Wildgruber et al., 2014)

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Vorgänge des ventrikulären Remodelings im Mausmodell zum Teil mit denen im Menschen vergleichbar sind. So kommt es in beiden Fällen kurz nach dem Myokardinfarkt zu einem inflammatorischen Prozess im Bereich des Infarktes auf den darauffolgend durch Angiogenese, Zellproliferation und Kollageneinlagerung eine Narbenbildung stattfindet. (Gray et al., 2013) (Patten et al., 1998) (Muthuramu et al., 2014) Das Mausmodell stellt daher eine gute Möglichkeit dar das ventrikuläre Remodeling zu erforschen. Es sind jedoch auch Unterschiede zu den Vorgängen im menschlichen Körper zu beachten. So ist ein Hauptunterschied, dass das Remodeling in der Maus um einiges schneller passiert als im menschlichen Myokard. (Cleutjens et al., 1999) (Geelen et al., 2012) Der Infarkt im Mausmodell wird künstlich mittels LAD-Ligatur herbeigeführt, wohingegen im menschlichen Herz ein Myokardinfarkt typischerweise auf Basis langjähriger Atherosklerose entsteht. (Libby, 2013) Das kardiovaskuläre System der Maus ist daher im Gegensatz zum typischen menschlichen Myokardinfarkt-Patienten noch keinen degenerativen Komorbiditäten ausgesetzt. Zusätzlich handelte es sich bei den Versuchstieren um junge Mäuse, wohingegen der Myokardinfarkt typischerweise eine Erkrankung des älteren Menschen darstellt. (Breckenridge, 2010) (Swirski et al., 2013) Der gesamte Prozess von akutem Myokardinfarkt bis zur Ausbildung einer Narbe, erforscht im Mausmodell, geht daher mit circa 2-3 Wochen schneller als beim Menschen. (Gray et al., 2013)

## **4.2 Bildgebungsstrategie**

Im Folgenden Teil soll genauer auf die gewählte Bildgebungsstrategie eingegangen werden um sowohl die Art der Bildgebung als auch die verwendete Feldstärke, Sequenz und Kontrastmittel zu diskutieren.

### **4.2.1 Das MRT als gewählte Bildgebungsmodalität zur Beurteilung des Remodelings**

Das MRT kann sowohl für experimentelle als auch für klinische Fragestellungen verwendet werden. (Pennell, 2010) Die MRT-Bildgebung hat wie alle aktuell verfügbaren Bildgebungsmethoden verschiedenste Vor- und Nachteile. Zu den Vorteilen gehören eine hohe Ortsauflösung und ein guter Weiteilkontrast. Für die klinische Verwendung ist ein wichtiger zusätzlicher Faktor die fehlende ionisierende Strahlung und somit weniger Belastung und mögliche Langzeitfolgen für den



Patienten. Es gibt jedoch auch Nachteile, die beachtet werden müssen. So können Arrhythmien während der Messung, oder im Rahmen des Mausmodells der schnelle Herzschlag, zu Qualitätseinbußen führen. Gerade in der klinischen Verwendung gibt es einige Einschränkungen bei der MRT-Bildgebung. So ist nach wie vor Vorsicht bei der Verwendung bei Patienten mit Herzschrittmachern geboten und auch bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz sollte die Verwendung von möglicherweise nephrotoxischen Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln auf das Notwendigste begrenzt werden (Jivraj et al., 2014) (Arrighi et al., 2012) (Flachskampf et al., 2011) (Jaarsma et al., 2013)

Kardiales Remodeling mit Aufbau von extrazellulärer Matrix nach Myokardinfarkt ist wichtig, um eine stabile Herzfunktion zu erhalten und basiert auf einem inflammatorischen Prozess. Dieser ist essenziell, um untergegangene Kardiomyozyten zu entfernen, als auch die Produktion von extrazellulärer Matrix zur Narbenbildung zu stimulieren. (Swirski et al., 2013) Eine Balance der inflammatorischen Reaktion ist wichtig für eine stabile Narbenbildung und sowohl ein vermehrtes als auch vermindertes Remodeling kann zu einer Herzinsuffizienz führen. (Konstam et al., 2011) (Frangogiannis, 2017) (van der Laan et al., 2013) Um Patienten mit inadäquatem Remodeling und hoher Wahrscheinlich für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz früh im Krankheitsverlauf zu erkennen, ist es wichtig Bildgebungsmethoden, die diesen Prozess auf molekularer Ebene früh darstellen, zu entwickeln. (Lavin Plaza et al., 2019) Zur Darstellung des Verlaufs nach Myokardinfarkt ist die MRT-Bildgebung mittels LGE zur Referenzmethode, sowohl in der klinischen als auch der experimentellen Forschung geworden. (R. J. Kim et al., 2000) (Haaf et al., 2016) Bei der LGE MRT-Bildgebung handelt es sich um eine qualitative Methode zur Darstellung des Verlaufs. Eine quantitativere Methode stellt das T1-Mapping dar. (Haaf et al., 2016) Insgesamt stellt die MRT-Bildgebung eine gut etablierte Methode in der kardiovaskulären Bildgebung dar. (Vanhoutte et al., 2016) Zur Darstellung der zugrundeliegenden molekularen Prozesse des Remodelings ist das MRT im Zusammenhang mit der Verwendung von spezifischen Kontrastmitteln die nicht-invasive Methode der Wahl. (Konstam et al., 2011) In den letzten Jahren wurden vermehrt Gadolinium-haltige Kontrastmittel verwendet, um extrazelluläre Matrix nach Myokardinfarkt in der MRT-Bildgebung darzustellen. Die Entwicklung geht nun vermehrt hin zu sehr spezifischen Kontrastmitteln, wie Gadofluorine P, die an bestimmte Teile der extrazellulären Matrix binden. (Curley et al., 2018)

### 4.2.2 Wahl der Feldstärke

Am häufigsten in der Klinik verwendet werden nach wie vor MRT-Geräte mit 1,5 oder 3 T. Für diese Arbeit wurde mit einem speziellen 7 T Kleintier-MRT gearbeitet. Die Wahl einer eher höheren oder niedrigeren Feldstärke hat jeweils verschiedene Vor- und Nachteile. Hochfeld-MRT Geräte wurden in den letzten Jahren vermehrt für Forschungszwecke verwendet und finden auch nach und nach Einzug in einige klinische Anwendungsbereiche. (Snyder et al., 2009) Gerade die Bildgebung im Mausmodell stellt spezielle Anforderungen an die MRT-Bildgebung. So sind die Strukturen des Herzens wesentlich kleiner als beim Menschen und die hohe Herzfrequenz kann zu einer abnehmenden Qualität führen. Ein großer Vorteil bei Verwendung einer höheren Feldstärke ist das sich proportional zur Feldstärke verhaltende Signal-Rausch-Verhältnis. (Snyder et al., 2009) So lassen sich insbesondere kleinere Strukturen, wie das Herz einer Maus, gut aufgelöst darstellen. (Hinton et al., 2003) (Wattjes et al., 2012). Die meisten Bildgebungsstudien an Kleintieren werden heutzutage mit Feldstärken  $\geq 4,7$  T durchgeführt. (Marzola et al., 2003) Ein weiterer Vorteil ist, dass sich chemische Moleküle einfacher voneinander unterscheiden lassen umso höher die magnetische Feldstärke und die somit erzeugte Resonanzfrequenz sind. (Marzola et al., 2003) Trotz der eben genannten Vorteile gibt es einige relevante Nachteile einer hohen Feldstärke. Es kommt bei einer höheren Feldstärke zu einer verlängerten T1-Relaxation und einer verkürzten T2-Relaxation mit höherer Anfälligkeit für Bewegungsartefakte (de Bazelaire et al., 2004) (Schick, 2005) (Springer et al., 2016) Ein weiterer Nachteil ist die abnehmende Relaxivität der Kontrastmittel bei höherer Feldstärke. Diese Beobachtung konnte erneut mit den in dieser Arbeit durchgeführten Relaxivitätsmessungen bestätigt werden. Nach Abwägung der diversen Vor- und Nachteile wurde sich für die Verwendung eines 7 T MRTs entschieden, da die gute Ortsauflösung zur genauen Evaluation des kardialen Remodelings mit Gadofluorine P von vorrangiger Bedeutung war. Zudem erfuhren 7 T MRTs in den letzten Jahren zunehmende Verbreitung im klinischen Alltag, so dass eine potenzielle Translation der Ergebnisse möglich erscheint. Vor allem im Bereich der neurologischen (van der Kolk et al., 2013) (Vargas et al., 2018) und kardiovaskulären (Suttie et al., 2012) (Niendorf et al., 2010) Bildgebung konnten in den letzten Jahren erfolgreich 7 T MRTs angewendet werden.

### 4.2.3 Gadofluorine P als molekulares Kontrastmittel

Mittels der Vorgängersubstanz Gadofluorine M konnten bereits erfolgreich Proteine der extrazellulären Matrix dargestellt werden und eine Bindung spezifisch an Bestandteile der extrazellulären Matrix gezeigt werden. Die meisten Studien wiesen diese Bindeeigenschaften an Tiermodellen atherosklerotisch veränderter Gefäße nach. Sowohl Barkhausen et al. als auch Sirol et al. konnten initial bei Kaninchen zeigen, dass Gadofluorine M vermehrt an atherosklerotische Plaques bindet und eine gute Möglichkeit darstellt auch kleine Plaques darzustellen. Die genauen Bindungseigenschaften wurden in diesen Studien jedoch noch nicht verstanden und untersucht. (Barkhausen, 2003) (Sirol et al., 2004) Koktzoglou et al. konnten nachweisen, dass auch in Schweinen eine selektive Darstellung atherosklerotisch-veränderter Karotiden im Vergleich zu gesunden Gefäßen mittels Gadofluorine M möglich ist. Schweine haben ein dem Menschen sehr ähnliches kardiovaskuläres System. (Koktzoglou et al., 2006) Meding et al. konnten später die Bindungseigenschaften von Gadofluorine M sowohl in-vitro als auch in-vivo an Kaninchen untersuchen. In-vitro konnte nachgewiesen werden, dass Gadofluorine M durch seinen amphiphilen Charakter Mizellen in wässriger Lösung bildet. Sobald Albumin vorhanden ist, spalten sich diese Mizellen auf und binden aufgrund ihres hydrophoben Anteils nahezu komplett an Albumin. Meding et al. konnten damit nachweisen, dass Gadofluorine M sich in den Gefäßen und möglichen Gefäßverletzungen gleichgerichtet mit Albumin verteilt. Dieser Vorgang findet durch einen Gefäßwandschaden des atherosklerotischen Plaques statt. Die hydrophoben Bestandteile der extrazellulären Matrix im Plaque, insbesondere Kollagen, Tenascin und Proteoglykane, binden daraufhin Gadofluorine M. Da Gadofluorine M zusätzlich lipophob ist, bindet es kaum an das im Plaque vorhandene LDL und kann somit spezifisch zum Nachweis extrazellulärer Matrix verwendet werden. (Meding et al., 2007) Zheng et al. konnten diese Beobachtungen in einer Studie zur Evaluierung von Atherosklerose in Femoral-Arterien bei Kaninchen bestätigen. Sie beobachteten, dass Gadofluorine M aufgrund seiner hohen Affinität zu Albumin erst nach einigen Stunden im Plaque nachweisbar ist. (Zheng et al., 2008)

Die oben genannten Bestandteile der extrazellulären Matrix lassen sich auch im Rahmen des kardialen Remodelings und der Narbenbildung nach Myokardinfarkt finden. Mit Gadofluorine M lässt sich der Bereich der kardialen Narbe nach Myokardinfarkt gut vom gesunden Myokard abgrenzen. (Aichler et al., 2015) Der

Fokus in dieser Arbeit lag auf dem neueren Kontrastmittel Gadofluorine P. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung von Gadofluorine M. Gadofluorine M hat einige Nachteile hinsichtlich seines Kinetikprofils im Sinne einer langen Halbwertszeit im Organismus und damit einer erst verzögerten Ausscheidung. (Sheng et al., 2011) Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass insbesondere nach wiederholter Applikation von Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln Ablagerungen entstehen. Besonders kann dies bei makrozyklischen Kontrastmitteln beobachtet werden. Am häufigsten können Ablagerungen im Bereich des Gehirns, insbesondere im Bereich der Nuclei dentati und des Globus pallidum nachgewiesen werden. (Gulani et al., 2017) (Ramalho et al., 2017) (Stojanov et al., 2016) Aktuell sind sowohl Gadofluorine M und P rein experimentelle Kontrastmittel ohne Zulassung beim Menschen und die oben beschriebenen Ablagerungen begrenzt relevant, sollten jedoch bei der weiteren Etablierung des Kontrastmittels beachtet und weiter überprüft werden. Die lange Halbwertszeit von Gadofluorine M konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Konzentration sowohl im Blut als auch im Gewebe war erst nach 24h wieder auf das Ausgangsniveau vor Kontrastmittelgabe abgesunken. Gadofluorine P wies ein deutlich verkürztes Kinetikprofil auf und wurde daher in dieser Arbeit verwendet. In den Versuchen zeigte sich ein Abfall auf den Ausgangswert circa 90 Minuten nach i.v. Injektion. Aktuell liegen keine Studien über die genauen Bindungseigenschaften von Gadofluorine P vor. Als Grundlage für diese Arbeit wurde aufgrund der chemisch-strukturellen Ähnlichkeit zu Gadofluorine M von ähnlichen Bindungseigenschaften ausgegangen.

Zu Beginn wurden Relaxivitätsmessungen mit Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P durchgeführt. Gadofluorine M und P wiesen im Vergleich zu Gd-DTPA eine höhere Abhängigkeit der Relaxivität von der Feldstärke auf. Gadofluorine P wies die größte Abhängigkeit von der Feldstärke auf. In der Literatur wird beschrieben, dass vor allem Kontrastmittel mit einer hohen Proteinbindungsaffinität bei erhöhten Feldstärken verringerte Relaxationswerte aufweisen. (Rohrer et al., 2005) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gadofluorine P verringerte Relaxationswerte bei höherer Feldstärke aufweist.

Die Kontrastmittel Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P wurden in Dosen basierend auf Erfahrungswerten, Studienlage und Herstellerangaben verwendet.

Hierbei wurden für Gd-DTPA und Gadofluorine P 0,2 mmol/kg KG verwendet und für Gadofluorine M 0,3 mmol/kg KG. (Aichler et al., 2015) (invivoContrast GmbH, 2009). Für alle drei Kontrastmittel wurden hohe Dosen verwendet, um eine ausreichende Menge an Kontrastmittel im Körper der Maus zu garantieren. Die Verwendung einer höheren Konzentration des Gadofluorine M kann mit geringer Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf die Signalintensität haben. Jedoch ist hier zu erwähnen, dass eine Erhöhung der Injektionsdosis nicht linear mit einer Erhöhung der Dosis im Zielgewebe einhergeht, da bei allen in dieser Arbeit verwendeten hohen Dosen mit einer Übersättigung des Gewebes zu rechnen ist.

#### **4.2.4 T1-Mapping als semi-quantitative Methode**

Zur genaueren Analyse und Vergleichbarkeit der bildgebenden Daten wäre es wünschenswert eine Quantifizierung des MRT Signals zu erreichen. Mit einer Quantifizierung des Bildgebungssignals wäre es möglich die Infarktteilung und gegebenenfalls auch das therapeutische Ansprechen im Zeitverlauf besser dokumentieren und bewerten zu können. In den letzten Jahren wurden nach und nach Methoden entwickelt, um von der qualitativen hin zur quantitativen MRT-Bildgebung zu gelangen. Eine vollständig quantitative Auswertbarkeit der MRT-Daten ist nach wie vor nicht erreicht. Es kann die T1-Zeit gemessen werden, die aber nicht immer linear mit der Kontrastmittel-Konzentration im Zielgewebe korreliert und die Vergleichbarkeit einschränkt. Ursache hierfür sind verschiedene beeinflussende Faktoren. Zum einen die Anwendung des Gadolinium-haltigen Kontrastmittels an sich. So werden die gemessenen T1-Werte durch Eigenschaften wie Kontrastmittelkonzentration oder -relaxivität beeinflusst. Zweitens der Zeitpunkt der MRT-Bildgebung, die Anreicherung und vor allem das Auswaschen aus dem jeweiligen Gewebe sind individuell unterschiedlich (Mewton et al., 2011) (Pattanayak et al., 2015) Zusätzlich sind beispielsweise chemische Einflüsse, die Oxygenierung oder auch der Verteilung der Gadolinium-Moleküle im Intra- oder Extrazellularraum mögliche Quellen für individuelle Unterschiede der Signalintensität. (Tanimoto et al., 2001) (Terreno et al., 2006) (Aichler et al., 2015) Es sind jedoch Methoden entwickelt worden mit denen zumindest eine semi-quantitative Auswertung möglich ist. Diese beruhen vor allem auf einer Weiterentwicklung der mathematischen Modelle zur Rekonstruktion von T1-Mapping Bildern (Radenkovic et al., 2017) (Coolen et al., 2018)

Um für diese Arbeit eine Quantifizierbarkeit zu erreichen, wurde das semi-quantitative Verfahren des T1-Mappings angewendet. Hierbei wurde mit ROIs im Bereich des Infarktes, des Bluts und des gesunden Myokards gearbeitet, jedoch ohne direkte Abhängigkeit vom Rauschen wie in der qualitativen MRT-Bildgebung. Die Quantifizierbarkeit des T1-Mappings ergab sich daraus, dass pro Pixel der T1-Wert und darauf basierend der R1-Wert berechnet wurde. (Ohlci et al., 2014) (Baxa et al., 2016) (Kellman et al., 2014) Trotz dieser Quantifizierbarkeit handelt es sich nicht um ein vollständig quantitatives Verfahren, sondern lediglich um eine semi-quantitative Methode. Das in-vivo Bildgebungssignal war mittels T1-Mapping vollständig quantifizierbar, dieses Signal ist jedoch abhängig von einer Reihe biologischer Faktoren, wie dem pH-Wert, der Temperatur oder den jeweiligen Kompartimenten im Gewebe. Daher konnte selbst mit T1-Mapping keine perfekte Korrelation des Bildgebungssignals und der tatsächlich vorhandenen Konzentration an Gadofluorine P im Gewebe erreicht werden. Gerade spezifische molekulare Kontrastmittel können nach Bindung an spezifische Biomarker ihre chemischen und strukturellen Eigenschaften verändern. Die genaue Kontrastmittelakkumulation setzt sich dann aus freien und gebundenen Bestandteilen zusammen. Diese Besonderheit stellt eine zusätzliche Schwierigkeit bei der in-vivo Quantifizierung der Kontrastmittelaufnahme dar. (Ekanger et al., 2015) Das Verfahren wird aus den oben genannten Gründen als semi-quantitativ bezeichnet.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass T1-Mapping trotz des semi-quantitativen Charakters in der kardialen MRT-Bildgebung einen deutlichen Zugewinn an Informationen im Vergleich zur LGE-Bildgebung darstellt. Insbesondere dahingehend, die Kontrastmittelakkumulation in-vivo im Zeitverlauf darzustellen und miteinander zu vergleichen. Zudem war in den Ergebnissen auffällig, dass sich die Kinetikprofile mit der Methode des T1-Mappings wesentlich stabiler darstellen ließen als in der gewohnten LGE Bildgebung.

### **4.3 Gadofluorine P zur Beurteilung der myokardialen Heilung und des Remodelings nach Myokardinfarkt**

Die myokardiale Heilung und das damit zusammenhängende Remodeling nach Myokardinfarkt finden in verschiedenen Phasen und im Mausmodell über einen Zeitverlauf von mindestens 2-3 Wochen statt. (Nahrendorf et al., 2007) (van der Laan

et al., 2013) (Curley et al., 2018) (Gray et al., 2013) In dieser Arbeit wurden daher zur Beurteilung der Aussagekraft von Gadofluorine P im Prozess der myokardialen Heilung Bildgebungen zum 1- und 6- Wochen Zeitpunkt gewählt. Zum 1-Wochen Zeitpunkt waren Heilung und Remodeling des Herzens noch in der Anfangsphase. Nach 6 Wochen war die Struktur des infarzierten Bereiches und damit möglicherweise Großteile des linken Ventrikels deutlich verändert. In der Zwischenzeit kam es zur Synthese extrazellulärer Matrix und Narbenbildung. (Wildgruber et al., 2014) (Protti et al., 2015) (Curley et al., 2018) (Civitaese et al., 2017) Der gewählte 6-Wochen Zeitpunkt wurde auch schon in vorherigen Studien als sinnvoller Messzeitpunkt zur Darstellung ventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt im Kleintiermodell evaluiert. (Schieffer et al., 1994) (Patten et al., 1998)

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Akkumulation von Gadofluorine P im Bereich des Infarktes im Zeitverlauf der Infarktheilung zunimmt. Bei Gd-DTPA und Gadofluorine M war dies nicht der Fall. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass Gadofluorine P eine hohe Affinität an Proteine zur extrazellulären Matrix aufweist und im Rahmen der Infarktheilung vermehrt anreichert. Auch Cho et al. und Akai et al. konnten in ihren Studien mit Gadofluorine P Hinweise für eine verstärkte Affinität zu Proteinen der extrazellulären Matrix feststellen. (Cho et al., 2015) (Akai et al., 2018) Die zusätzlich hohen Werte der Kontrastmittel im Blut ließen sich durch ihre hohe Albuminbindungskapazität erklären. (Cho et al., 2015) In geringem Ausmaß ließ sich Gadofluorine P auch im gesunden Myokard nachweisen was sich am wahrscheinlichsten durch Gadofluorine P in den vaskulären Versorgungsstrukturen des gesunden Myokards erklären lässt.

Das gemessene Gadofluorine P Signal, sowie auch die ex-vivo vorhandene Konzentration im Gewebe zeigten eine starke Korrelation mit der gemessenen Ejektionsfraktion nach 6 Wochen. Zum 1-Wochen Zeitpunkt, sowie bei den anderen beiden Kontrastmitteln ließ sich keine Korrelation nachweisen. Es wurde davon ausgegangen, dass Gadofluorine P vor allem an extrazelluläre Proteine bindet und nach 6 Wochen eine vermehrte Synthese dieser im Rahmen der Narbenbildung stattgefunden hat. Es wurde zudem davon ausgegangen, dass eine ausreichend ausgebildete Narbe nach 6 Wochen mit einer verbesserten Erhaltung der linksventrikulären Ejektionsfraktion einherging. In der ex-vivo Bestimmung der

Konzentration konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Es zeigte sich ebenfalls eine Korrelation aus gemessener Konzentration und Ejektionsfraktion. Das semi-quantitative T1-Mapping stellte daher eine vielversprechende Möglichkeit dar, um die EZM-Bildung mit der linksventrikulären Funktion zu korrelieren.

Auffällig im Rahmen der Messungen war eine deutliche Varianz der R1-Werte nach 6 Wochen, sowohl bei Gadofluorine P als auch bei Gadofluorine M und Gd-DTPA. Erklärt werden konnte dies durch eine physiologische Variabilität im Heilungsprozess der einzelnen Versuchstiere. Zusätzlich kann sich die Heterogenität des Heilungsverlauf innerhalb der Narbe einer Maus ergeben, so heilen auch dort nicht alle Bereiche in gleicher Ausprägung und Geschwindigkeit. (Frantz et al., 2009) Zusätzlich konnten durch die verwendeten ROIs nicht alle Bereiche eines Infarktes bei der Auswertung betrachtet werden.

Eine akkurate Validierung und Ermittlung der Kontrastmittel-Konzentration im Gewebe nach Bildgebung wäre sehr hilfreich um die in-vivo gemessenen Daten zu verifizieren und möglicherweise die Bildgebungsmodalitäten zu verbessern. Auf mögliche ex-vivo Verfahren und deren Zusammenhang mit der in-vivo Bildgebung soll im Folgenden Abschnitt eingegangen werden.

#### **4.4 MALDI-TOF-IMS, LA-ICP-MS und Histologie zur ex-vivo Validierung der Bildgebung**

Es stellt nach wie vor eine Herausforderung dar, MRT-Kontrastmittel nach in-vivo Applikation und Bildgebung ex-vivo ausreichend genau und quantitativ im Gewebe nachzuweisen. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich Gadofluorine P ex-vivo im Bereich der Narbe nach Myokardinfarkt nachweisen und quantifizieren ließ. Dies war möglich mittels MALDI-TOF-IMS. Die Daten in dieser Arbeit wurden zusätzlich mit LA-ICP-MS verifiziert. Das MALDI-TOF-IMS Verfahren ist ein Matrix-basiertes Verfahren mit einem Auflösungsvermögen von bis zu 50  $\mu\text{m}$ . Es ermöglichte eine Quantifizierung der Kontrastmittelkonzentration direkt im Gewebe. LA-ICP-MS wurde zusätzlich zur Validierung verwendet, da es zur Analyse einzelner Gadolinium-Element geeignet ist und mit einem Auflösungsvermögen von bis zu 5  $\mu\text{m}$  eine höhere Ortsauflösung als MALDI-TOF-IMS hat. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die in-vivo gemessene Gadofluorine P Signalintensität als



auch die mittels MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS gemessene Gadofluorine P Konzentration ex-vivo im Zeitverlauf der Infarktheilung erhöht.

Überraschenderweise zeigte sich in der direkten Korrelation von  $R_1$ -Werten und Gewebekonzentration von Gadofluorine P, sowohl im infarzierten Myokard als auch im gesunden Myokard, nur ein schwacher Zusammenhang. Es gibt verschiedene Erklärungen für diesen Sachverhalt. Eine erste Erklärung ist, dass die vorliegenden Vergleiche nicht auf Pixelebene stattgefunden haben. Es ist rein technisch nicht möglich für die MALDI-TOF-IMS Analyse genau dieselbe Schicht zu untersuchen, die auch in-vivo mittels der gelegten ROI erfasst wurde. Zusätzlich unterscheidet sich die erreichte Schichtdicke. So sind in der in-vivo MRT-Bildgebung Schichtdicken von ca. 1 mm möglich, wohingegen in der MALDI-TOF-IMS Analyse Schichtdicken von ca. 12  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Eine direkte Korrelation von  $R_1$ -Werten und Gewebekonzentrationen wird damit durch unterschiedliche Untersuchungsvolumina beeinträchtigt. Zudem sind trotz gewebeschonender Vorgehensweise Verzerrungen im Gewebe bei der Vorbereitung zur MALDI-TOF-IMS Analyse nicht zu verhindern. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es generell machbar ist die tatsächlich im Gewebe vorhandene Menge an Gadofluorine P mittels MALDI-TOF-IMS nachzuweisen. Aufgrund der oben genannten Gründe und der damit einhergehenden nicht vollkommenen Vergleichbarkeit sollte danach gestrebt werden die Methodik noch weiter voranzutreiben und zu verbessern. Zuvor ist es schon gelungen die Vorgängersubstanz Gadofluorine M im Bereich des Infarktareals mittels MALDI-TOF-IMS nachzuweisen. (Aichler et al., 2015) Auch Acquadro et al. und Trog et al. konnten zeigen, dass MALDI-TOF-IMS erfolgreich zur Quantifizierung von Gadolinium im Gewebe geeignet ist. (Acquadro et al., 2009) (Trog et al., 2019)

Die mangelnde Korrelation der in- und ex-vivo gemessenen Gadofluorine P Menge zeigt erneut die in dieser Arbeit thematisierten Schwächen der MRT-Bildgebung auf. Trotz semi-quantitativem T1-Mapping handelt es sich bei der in-vivo MRT-Bildgebung nicht um ein quantitatives Verfahren. Die ermittelte Signalintensität ist bei jeder Messung stark abhängig von der biologischen und chemischen Umgebung im Versuchstier. Dies führt zu einer mangelnden Vergleichbarkeit von in-vivo Signalintensität und ex-vivo gemessener Kontrastmittel Konzentration. Die MALDI-

TOF-IMS Analyse bietet eine gute Möglichkeit, das in-vivo gemessene Signal ex-vivo zu validieren und örtlich aufgelöst zu quantifizieren.

In der Literatur sind viele Bestrebungen nach einer guten Quantifizierungsmethode zu erkennen. So schlagen beispielsweise Niehoff et al. vor eine Umrechnungsfunktion von in-vivo gemessenen  $R_1$ -Werten und ex-vivo gemessenen Gewebekonzentrationen zu erstellen. Aus daraufhin erstellten T1-Maps soll über diese Umrechnungsfunktion eine zweite Map errechnet werden, welche dann die tatsächliche in-vivo vorhandene Kontrastmittelmenge aufzeigt. (Niehoff et al., 2016)

Eine weitere Methode zur ex-vivo Validierung der gemessenen Kontrastmittelkonzentrationen ist die LA-ICP-MS. Schon MALDI-TOF-IMS hat mit bis zu 50  $\mu\text{m}$  eine höhere Auflösung als das MRT. Die LA-ICP-MS schafft jedoch mit einer Auflösung von bis zu 15  $\mu\text{m}$  eine noch genauere Darstellung und Verteilung von Gadofluorine P. (Schmidt et al., 2014) (Reifschneider et al., 2015) Durch die höhere Ortsauflösung können Strukturen auf zellulärer Ebene dargestellt werden und es ist möglich einzelne Gadolinium-Elemente im Gewebe nachzuweisen. Diese Auflösung macht das Verfahren damit noch präziser im Nachweis von Gadofluorine P im Gewebe. In dieser Arbeit konnten mit der LA-ICP-MS Analyse die Ergebnisse aus der in-vivo MRT-Bildgebung und der ex-vivo MALDI-TOF-IMS Analyse bestätigt und validiert werden. Mit den durch LA-ICP-MS ermittelten Daten konnte ein vergleichbarer kinetischer Verlauf der Kontrastmittelkonzentration wie mittels MALDI-TOF-IMS nachgewiesen werden. Zusätzlich war auch hier nach 6 Wochen im Vergleich zum 1-Wochen Zeitpunkt ein Anstieg der Gadolinium Konzentration im Gewebe nachweisbar.

LA-ICP-MS wurde bereits zur Analyse der Gadolinium-Konzentration im Gewebe eingesetzt. Kamaly et al. konnten damit die Gadolinium-Konzentration ex-vivo in Ovarialtumoren bei Mäusen nachweisen. (Kamaly et al., 2010) Clases et al. konnte eine gute Darstellung von Gadolinium in fibrotischer Haut, sowie Gehirntumoren zeigen. (Clases et al., 2019) Zusätzlich konnten Pugh et al. zeigen, dass LA-ICP-MS eine gute Methode darstellt um mittels MRT-Bildgebung ermittelte Ergebnisse zu bestätigen. (Pugh et al., 2012) Trog et al. hatten in ihrer Arbeit auch sowohl MALDI-TOF-IMS als auch LA-ICP-MS zur Detektion von Gadolinium im Gewebe der Maus verwendet. Sie konnten zeigen, dass beide Methoden geeignet sind, um Gadolinium

im Gewebe zu quantifizieren. Es wurde postuliert, dass beide Verfahren ihre Vor- und Nachteile haben und die besten Ergebnisse in einer Kombination aus in-vivo MRT-Bildgebung und ex-vivo Validierung mit sowohl MALDI-TOF-IMS als auch LA-ICP-MS erreicht werden können. Ein Vorteil der MALDI-TOF-IMS ist die Analyse auf Molekülebene, somit kann die Struktur von Molekülen besser analysiert werden. LA-ICP-MS hat jedoch den großen Vorteil der höheren Ortsauflösung und das bereits kleinere Mengen an Gadolinium dargestellt werden können (Trog et al., 2019)

Als weitere Validierungsmethode wurde zusätzlich zur MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS eine klassische Histologie mit EvG-Färbung zur Darstellung kollagener Fasern durchgeführt. Es konnte auch hier eine Zunahme der Intensität der Färbung und damit eine verstärkte Synthese extrazellulärer Matrix im Rahmen der myokardialen Narbenbildung nach 6 Wochen gezeigt werden. Durch diese Beobachtungen ließ sich die Hypothese, dass das verstärkte MRT-Signal für Gadofluorine P nach 6 Wochen durch eine Zunahme an extrazellulärer Matrix zustande kam, stützen.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Verfahren die Verteilung von Kontrastmitteln im Gewebe präzise und quantitativ dargestellt werden. Es lässt sich sagen, dass sich durch Korrelation der in-vivo MRT-Bildgebung und massenspektrometrisch gewonnenen Daten die MRT-Bildgebung kalibrieren lässt und insbesondere hochauflösende Verfahren wie MALDI-TOF-IMS und LA-ICP-MS dazu beitragen werden MRT-Bildgebung quantifizierbarer und vergleichbarer zu machen.

## 4.5 Limitationen

Diese Arbeit wies wie jedes experimentelle Vorgehen verschiedene Limitationen des Versuchsaufbaus auf.

Es wurden verschiedene Sequenztechniken – LGE und T1-Mapping – in derselben Maus verglichen. Aufgrund technischer Limitationen und leichter Bewegungsartefakte durch Herzschlag und Atmung der Maus war es nicht möglich die genau gleichen Schnitte zu erhalten. Dadurch war die Vergleichbarkeit geringfügig eingeschränkt.

Es wurden drei Kontrastmittel im Zeitverlauf in die gleiche Maus injiziert. Es wurde angepasst an die Halbwertszeiten auf ausreichende Zeitabstände geachtet. Das

wurde zudem mit Abfall der SNR und T1-Werte auf das Ausgangsniveau überprüft. Nichtsdestotrotz bestand eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass die Kontrastmittel bis zur nächsten Messung nicht vollständig aus Blut und Gewebe ausgewaschen wurden.

Das verwendete Gadofluorine P zeigte höhere  $R_1$ -Werte im Blut als im Bereich des infarzierten Myokards. Diese Tatsache stellte keine optimale Voraussetzung für die molekulare Bildgebung des Herzens dar.

Eine exakte Gegenüberstellung von T1-Mapping Daten und Gadolinium-Verteilung in der massenspektrometrischen Bestimmung war nicht möglich. Ursächlich hierfür war zum einen eine unterschiedliche Schichtdicke, zum anderen war es technisch nicht möglich genau die gleiche Stelle als Vergleichspunkt für in-vivo und ex-vivo Methoden zu identifizieren.

MALDI-TOF-IMS wies zum einen eine Abhängigkeit des Signals von der verwendeten Matrix auf. Zum anderen erreichte es keine Auflösung auf zellulärem Level. Daher wurde ergänzend die LA-ICP-MS verwendet. Diese war Matrix-unabhängig und verfügte über ein höheres Auflösungsvermögen auf zellulärer Ebene.

Für die ex-vivo Untersuchungen wurde das Gewebe für MALDI-TOF-IMS in eine Matrix eingebettet und für die Histologie verschiedenen Färbeschritten unterzogen. Diese Schritte konnten zu Veränderungen des Gewebes, im Sinne von Schrumpfung oder Aufquellen führen. Das machte eine exakte Zuordnung von ex-vivo Schnitten zu MRT-Schnitten deutlich schwieriger.

Die in diesem experimentellen Setting verwendete geringe Anzahl an Versuchstieren erlaubt keine finalen Rückschlüsse, sondern nur erste vielversprechende Hinweise. Die hier erhobenen Ergebnisse sollten daher in einer größeren Kohorte verifiziert werden.

## 5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die verschiedenen Phasen der Heilung und des Remodelings nach Myokardinfarkt .....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	18
Abbildung 3: Eröffneter Thorax der Maus nach erfolgter permanenter Ligatur der LAD .....	21
Abbildung 4: Strukturformel Gd-DTPA.....	22
Abbildung 5: Strukturformal Gadofluorine M.....	23
Abbildung 6: Strukturformel Gadofluorine P .....	24
Abbildung 7: Darstellung der Localizer-Sequenzen (A: 3 Plane koronar, B: axial, C: koronar, D: sagittal) .....	25
Abbildung 8: Maus in Narkose mit liegendem Schwanzvenenkatheter (schwarzer Pfeil) und Natrium-Chlorid-Spritze .....	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchstieres mit benötigtem Equipment im MRT.....	28
Abbildung 10: Veranschaulichung der Relaxivitätsberechnung .....	33
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Auswertung der Cine-Sequenzen in der kurzen Achse (A: enddiastolisch und B: endsystolisch) .....	35
Abbildung 12: Exemplarischer Darstellung der Auswertung der LGE-Sequenzen, ROIs erkennbar in Blut, gesundem Myokard, infarziertem Myokard und Rauschen...	37
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Auswertung der verschiedenen Kontrastmittel im LGE, A: Gd-DTPA, B: Gadofluorine M, C: Gadofluorine P.....	38
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der T1-Map unter Verwendung von Look-Locker Daten .....	39
Abbildung 15: Exemplarischer Darstellung der Auswertung der T1-Map, ROIs erkennbar in Blut, gesundem Myokard und infarziertem Myokard.....	40
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der Auswertung der verschiedenen Kontrastmittel im T1-Mapping, , A: Gd-DTPA, B: Gadofluorine M, C: Gadofluorine P .....	41
Abbildung 17: Darstellung der Relaxivität ( $r_1$ ) der drei Kontrastmittel (Gd-DTPA, Gadofluorine M und Gadofluorine P) in Serum und Natrium-Chlorid-Lösung bei jeweils 1T, 3T und 7T .....	45

---

Abbildung 18: Darstellung der Kontrastmittelanreicherung im Zeitverlauf nach Injektion des Kontrastmittels zum Zeitpunkt 0 min mittels Late Gadolinium Enhancement .....	46
Abbildung 19: Darstellung der Kontrastmittelanreicherung im Zeitverlauf nach Injektion des Kontrastmittels zum Zeitpunkt 0 min mittels T1-Mappings.....	48
Abbildung 20: Kontrastmittelanreicherung in Infarkt und gesundem Myokard zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt .....	50
Abbildung 21: Korrelation der R1-Werte mit den ex-vivo gemessenen Gadofluorine P Konzentrationen mittels MALDI-TOF-IMS (n = 5 pro Zeitpunkt) im Infarkt (obere Reihe) und gesundem Myokard (untere Reihe).....	51
Abbildung 22: Korrelation der Gd-DTPA Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt .....	52
Abbildung 23: Korrelation der Gadofluorine M Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt .....	53
Abbildung 24: Korrelation der Gadofluorine P Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt .....	54
Abbildung 25: Korrelation der Gadofluorine P Anreicherung mit der linksventrikulären Herzfunktion zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt .....	55
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der Gadofluorine P Anreicherung in-vivo (T1-Maps obere Reihe) und ex-vivo (MALDI-TOF-IMS fusioniert mit EvG-Färbung untere Reihe) jeweils zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt. ....	56
Abbildung 27: Kinetik von Gadofluorine P mittels MALDI-TOF-IMS und MRT.....	57
Abbildung 28: Graphische Darstellung der Gadofluorine P Konzentration in der MALDI-TOF-IMS im Zeitverlauf nach Kontrastmittelinjektion. (n = 1 pro Zeitpunkt) .....	58
Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der Gadofluorine P Anreicherung mittels LA-ICP-MS.....	59
Abbildung 30: Graphische Darstellung der Gadofluorine P Konzentration in der LA-ICP-MS zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt.....	60
Abbildung 31: Kontrastmittelanreicherung in Infarkt und gesundem Myokard zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt .....	61
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der Elastica-van-Gieson Färbung zum 1- und 6-Wochen Zeitpunkt .....	62
Abbildung 33: Beurteilung der Synthese extrazellulärer Matrix. * indiziert einen p-Wert < 0,05 .....	62

---

## 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Medikamente zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose während der experimentellen Infarktinduktion.....	19
Tabelle 2: Chemische Eigenschaften Gd-DTPA.....	22
Tabelle 3: Chemische Eigenschaften Gadofluorine M.....	23
Tabelle 4: Chemische Eigenschaften Gadofluorine P .....	24
Tabelle 5: Übersicht der für die Relaxivitätsmessungen verwendeten Sequenzen ..	24
Tabelle 6: Konzentration der injizierten Kontrastmittel.....	29

## 7 Literaturverzeichnis

- Abubakar, I., Tillmann, T., & Banerjee, A. (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, *385*(9963), 117-171. doi:10.1016/s0140-6736(14)61682-2
- Acquadro, E., Cabella, C., Ghiani, S., Miragoli, L., Bucci, E. M., & Corpillo, D. (2009). Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry detection of a magnetic resonance imaging contrast agent in mouse liver. *Anal Chem*, *81*(7), 2779-2784. doi:10.1021/ac900038y
- Aichler, M., Huber, K., Schilling, F., Lohofer, F., Kosanke, K., Meier, R., Rummeny, E. J., Walch, A., & Wildgruber, M. (2015). Spatially Resolved Quantification of Gadolinium(III)-Based Magnetic Resonance Agents in Tissue by MALDI Imaging Mass Spectrometry after In Vivo MRI. *Angew Chem Int Ed Engl*. doi:10.1002/anie.201410555
- Akai, H., Shiraishi, K., Yokoyama, M., Yasaka, K., Nojima, M., Inoue, Y., Abe, O., Ohtomo, K., & Kiryu, S. (2018). PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agent: Feasibility study of a Gd-micelle contrast agent for MR lymphography. *J Magn Reson Imaging*, *47*(1), 238-245. doi:10.1002/jmri.25740
- Andreini, D., Pontone, G., Mushtaq, S., Bertella, E., Conte, E., Segurini, C., Giovannardi, M., Baggiano, A., Annoni, A., Formenti, A., Petulla, M., Beltrama, V., Volpato, V., Bartorelli, A. L., Trabattoni, D., Fiorentini, C., & Pepi, M. (2015). Diagnostic Accuracy of Rapid Kilovolt Peak-Switching Dual-Energy CT Coronary Angiography in Patients With a High Calcium Score. *JACC Cardiovasc Imaging*, *8*(6), 746-748. doi:10.1016/j.jcmg.2014.10.013
- Arrighi, J. A., & Dilsizian, V. (2012). Multimodality imaging for assessment of myocardial viability: nuclear, echocardiography, MR, and CT. *Curr Cardiol Rep*, *14*(2), 234-243. doi:10.1007/s11886-011-0242-x



- 
- Avkiran, M. (2003). Basic biology and pharmacology of the cardiac sarcolemmal sodium/hydrogen exchanger. *J Card Surg, 18 Suppl 1*, 3-12.
- Barkhausen, J. (2003). Detection of Atherosclerotic Plaque With Gadofluorine-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Circulation, 108*(5), 605–609. doi:10.1161/01.CIR.0000079099.36306.10
- Baxa, J., Ferda, J., & Hromadka, M. (2016). T1 mapping of the ischemic myocardium: Review of potential clinical use. *Eur J Radiol, 85*(10), 1922-1928. doi:10.1016/j.ejrad.2016.04.010
- Baxter, G. F. (2002). The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol, 97*(4), 268-275. doi:10.1007/s00395-002-0366-7
- Becker, K. M., Schulz-Menger, J., Schaeffter, T., & Kolbitsch, C. (2018). Simultaneous high-resolution cardiac T1 mapping and cine imaging using model-based iterative image reconstruction. *Magn Reson Med*. doi:10.1002/mrm.27474
- Bellenger, N. G., Burgess, M. I., Ray, S. G., Lahiri, A., Coats, A. J., Cleland, J. G., & Pennell, D. J. (2000). Comparison of left ventricular ejection fraction and volumes in heart failure by echocardiography, radionuclide ventriculography and cardiovascular magnetic resonance; are they interchangeable? *Eur Heart J, 21*(16), 1387-1396. doi:10.1053/euhj.2000.2011
- Bhusal, N., Dey, J., Xu, J., Kalluri, K., Konik, A., Mukherjee, J. M., & Pretorius, P. H. (2018). Performance Analysis of a High-Sensitivity Multi-Pinhole Cardiac SPECT System with Hemi-Ellipsoid Detectors. *Med Phys*. doi:10.1002/mp.13277
- Birka, M., Wentker, K. S., Lusmoller, E., Arheilger, B., Wehe, C. A., Sperling, M., Stadler, R., & Karst, U. (2015). Diagnosis of nephrogenic systemic fibrosis by means of elemental bioimaging and speciation analysis. *Anal Chem, 87*(6), 3321-3328. doi:10.1021/ac504488k

- Botnar, R. M., Wiethoff, A. J., Ebersberger, U., Lacerda, S., Blume, U., Warley, A., Jansen, C. H., Onthank, D. C., Cesati, R. R., Razavi, R., Marber, M. S., Hamm, B., Schaeffter, T., Robinson, S. P., & Makowski, M. R. (2014). In vivo assessment of aortic aneurysm wall integrity using elastin-specific molecular magnetic resonance imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*, 7(4), 679-689. doi:10.1161/circimaging.113.001131
- Breckenridge, R. (2010). Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech*, 3(3-4), 138-143. doi:10.1242/dmm.005017
- Cannon, B. (2013). Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. *Nature*, 493, S2. doi:10.1038/493S2a
- Caravan, P., Das, B., Dumas, S., Epstein, F. H., Helm, P. A., Jacques, V., Koerner, S., Kolodziej, A., Shen, L., Sun, W. C., & Zhang, Z. (2007). Collagen-targeted MRI contrast agent for molecular imaging of fibrosis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(43), 8171-8173. doi:10.1002/anie.200700700
- Cavasin, M. A., Tao, Z., Menon, S., & Yang, X. P. (2004). Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci*, 75(18), 2181-2192. doi:10.1016/j.lfs.2004.04.024
- Chahal, N. S., & Senior, R. (2010). Clinical applications of left ventricular opacification. *JACC Cardiovasc Imaging*, 3(2), 188-196. doi:10.1016/j.jcmg.2009.09.022
- Chan, W., Ellims, A. H., Duffy, S. J., Kaye, D. M., & Taylor, A. J. (2012). Principles, current status and clinical implications of ischaemic heart disease assessment by cardiac magnetic resonance imaging. *Intern Med J*, 42(1), 7-17. doi:10.1111/j.1445-5994.2011.02606.x
- Cho, H. R., Lee, Y., Doble, P., Bishop, D., Hare, D., Kim, Y. J., Kim, K. G., Jung, H. S., Park, K. S., Choi, S. H., & Moon, W. K. (2015). Magnetic resonance imaging of the pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats: Gadofluorine P and Gd-DOTA. *World J Gastroenterol*, 21(19), 5831-5842. doi:10.3748/wjg.v21.i19.5831

- Choi, K. M., Kim, R. J., Gubernikoff, G., Vargas, J. D., Parker, M., & Judd, R. M. (2001). Transmural extent of acute myocardial infarction predicts long-term improvement in contractile function. *Circulation*, *104*(10), 1101-1107.
- Civitarese, R. A., Kapus, A., McCulloch, C. A., & Connelly, K. A. (2017). Role of integrins in mediating cardiac fibroblast-cardiomyocyte cross talk: a dynamic relationship in cardiac biology and pathophysiology. *Basic Res Cardiol*, *112*(1), 6. doi:10.1007/s00395-016-0598-6
- Clases, D., Fingerhut, S., Jeibmann, A., Sperling, M., Doble, P., & Karst, U. (2019). LA-ICP-MS/MS improves limits of detection in elemental bioimaging of gadolinium deposition originating from MRI contrast agents in skin and brain tissues. *J Trace Elem Med Biol*, *51*, 212-218. doi:10.1016/j.jtemb.2018.10.021
- Cleutjens, J. P., Blankesteyn, W. M., Daemen, M. J., & Smits, J. F. (1999). The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res*, *44*(2), 232-241.
- Coolen, B. F., Calcagno, C., van Ooij, P., Fayad, Z. A., Strijkers, G. J., & Nederveen, A. J. (2018). Vessel wall characterization using quantitative MRI: what's in a number? *MAGMA*, *31*(1), 201-222. doi:10.1007/s10334-017-0644-x
- Curley, D., Lavin Plaza, B., Shah, A. M., & Botnar, R. M. (2018). Molecular imaging of cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, *113*(2), 10. doi:10.1007/s00395-018-0668-z
- Dastidar, A. G., Rodrigues, J. C., Baritussio, A., & Bucciarelli-Ducci, C. J. H. (2016). MRI in the assessment of ischaemic heart disease. *102*(3), 239-252.
- de Bazelaire, C. M., Duhamel, G. D., Rofsky, N. M., & Alsop, D. C. (2004). MR imaging relaxation times of abdominal and pelvic tissues measured in vivo at 3.0 T: preliminary results. *Radiology*, *230*(3), 652-659. doi:10.1148/radiol.2303021331

- Deichmann, R., Hahn, D., & Haase, A. (1999). Fast T1 mapping on a whole-body scanner. *Magn Reson Med*, 42(1), 206-209. doi:10.1002/(sici)1522-2594(199907)42:1<206::aid-mrm28>3.0.co;2-q
- DeWood, M. A., Spores, J., Notske, R., Mouser, L. T., Burroughs, R., Golden, M. S., & Lang, H. T. (1980). Prevalence of Total Coronary Occlusion during the Early Hours of Transmural Myocardial Infarction. 303(16), 897-902. doi:10.1056/nejm198010163031601
- Eitel, I., Desch, S., Fuernau, G., Hildebrand, L., Gutberlet, M., Schuler, G., & Thiele, H. (2010). Prognostic significance and determinants of myocardial salvage assessed by cardiovascular magnetic resonance in acute reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 55(22), 2470-2479. doi:10.1016/j.jacc.2010.01.049
- Ekanger, L. A., & Allen, M. J. (2015). Overcoming the concentration-dependence of responsive probes for magnetic resonance imaging. *Metallomics*, 7(3), 405-421. doi:10.1039/c4mt00289j
- Fernandez, B., Duran, A. C., Fernandez, M. C., Fernandez-Gallego, T., Icardo, J. M., & Sans-Coma, V. (2008). The coronary arteries of the C57BL/6 mouse strains: implications for comparison with mutant models. *J Anat*, 212(1), 12-18. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00838.x
- Fingerhut, S., Niehoff, A. C., Sperling, M., Jeibmann, A., Paulus, W., Niederstadt, T., Allkemper, T., Heindel, W., Holling, M., & Karst, U. (2018). Spatially resolved quantification of gadolinium deposited in the brain of a patient treated with gadolinium-based contrast agents. *J Trace Elem Med Biol*, 45, 125-130. doi:10.1016/j.jtemb.2017.10.004
- Flachskampf, F. A., Schmid, M., Rost, C., Achenbach, S., DeMaria, A. N., & Daniel, W. G. (2011). Cardiac imaging after myocardial infarction. *Eur Heart J*, 32(3), 272-283. doi:10.1093/eurheartj/ehq446

- 
- Frangogiannis, N. G. (2006). The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8(11-12), 1907-1939. doi:10.1089/ars.2006.8.1907
- Frangogiannis, N. G. (2017). The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*, 127(5), 1600-1612. doi:10.1172/JCI87491
- Frantz, S., Bauersachs, J., & Ertl, G. (2009). Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*, 81(3), 474-481. doi:10.1093/cvr/cvn292
- Gaibazzi, N., Bianconcini, M., Marziliano, N., Parrini, I., Conte, M. R., Siniscalchi, C., Faden, G., Faggiano, P., Pigazzani, F., Grassi, F., & Albertini, L. (2016). Scar Detection by Pulse-Cancellation Echocardiography: Validation by CMR in Patients With Recent STEMI. *JACC Cardiovasc Imaging*, 9(11), 1239-1251. doi:10.1016/j.jcmg.2016.01.021
- Gannon, M. P., Schaub, E., Grines, C. L., & Saba, S. G. (2019). State of the art: Evaluation and prognostication of myocarditis using cardiac MRI. *J Magn Reson Imaging*. doi:10.1002/jmri.26611
- Geelen, T., Paulis, L. E., Coolen, B. F., Nicolay, K., & Strijkers, G. J. (2012). Contrast-enhanced MRI of murine myocardial infarction - part I. *NMR Biomed*, 25(8), 953-968. doi:10.1002/nbm.2768
- Gessel, M. M., Norris, J. L., & Caprioli, R. M. (2014). MALDI imaging mass spectrometry: spatial molecular analysis to enable a new age of discovery. *J Proteomics*, 107, 71-82. doi:10.1016/j.jprot.2014.03.021
- Gray, G. A., White, C. I., Thomson, A., Kozak, A., Moran, C., & Jansen, M. A. (2013). Imaging the healing murine myocardial infarct in vivo: ultrasound, magnetic resonance imaging and fluorescence molecular tomography. *Exp Physiol*, 98(3), 606-613. doi:10.1113/expphysiol.2012.064741
- Greenwood, J. P., Maredia, N., Younger, J. F., Brown, J. M., Nixon, J., Everett, C. C., Bijsterveld, P., Ridgway, J. P., Radjenovic, A., Dickinson, C. J., Ball, S. G., &

- Plein, S. (2012). Cardiovascular magnetic resonance and single-photon emission computed tomography for diagnosis of coronary heart disease (CE-MARC): a prospective trial. *Lancet*, *379*(9814), 453-460. doi:10.1016/s0140-6736(11)61335-4
- Guidry, U. C., Evans, J. C., Larson, M. G., Wilson, P. W., Murabito, J. M., & Levy, D. (1999). Temporal trends in event rates after Q-wave myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*, *100*(20), 2054-2059.
- Gulani, V., Calamante, F., Shellock, F. G., Kanal, E., & Reeder, S. B. (2017). Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations. *Lancet Neurol*, *16*(7), 564-570. doi:10.1016/s1474-4422(17)30158-8
- Haaf, P., Garg, P., Messroghli, D. R., Broadbent, D. A., Greenwood, J. P., & Plein, S. (2016). Cardiac T1 Mapping and Extracellular Volume (ECV) in clinical practice: a comprehensive review. *J Cardiovasc Magn Reson*, *18*(1), 89. doi:10.1186/s12968-016-0308-4
- Hachmoller, O., Zibert, A., Zischka, H., Sperling, M., Groba, S. R., Grunewald, I., Wardelmann, E., Schmidt, H. H., & Karst, U. (2017). Spatial investigation of the elemental distribution in Wilson's disease liver after d-penicillamine treatment by LA-ICP-MS. *J Trace Elem Med Biol*, *44*, 26-31. doi:10.1016/j.jtemb.2017.05.008
- Han, J., Zou, C., Mei, L., Zhang, Y., Qian, Y., You, S., Pan, Y., Xu, Z., Bai, B., Huang, W., & Liang, G. (2017). MD2 mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling via directly binding to Ang II and activating TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Basic Res Cardiol*, *112*(1), 9. doi:10.1007/s00395-016-0599-5
- Helm, P. A., Caravan, P., French, B. A., Jacques, V., Shen, L., Xu, Y., Beyers, R. J., Roy, R. J., Kramer, C. M., & Epstein, F. H. (2008). Postinfarction myocardial scarring in mice: molecular MR imaging with use of a collagen-targeting contrast agent. *Radiology*, *247*(3), 788-796. doi:10.1148/radiol.2473070975

- Hinton, D. P., Wald, L. L., Pitts, J., & Schmitt, F. (2003). Comparison of cardiac MRI on 1.5 and 3.0 Tesla clinical whole body systems. *Invest Radiol*, 38(7), 436-442. doi:10.1097/01.Rli.0000067489.31556.70
- Hundley, W. G., Bluemke, D. A., Finn, J. P., Flamm, S. D., Fogel, M. A., Friedrich, M. G., Ho, V. B., Jerosch-Herold, M., Kramer, C. M., Manning, W. J., Patel, M., Pohost, G. M., Stillman, A. E., White, R. D., & Woodard, P. K. (2010). ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 expert consensus document on cardiovascular magnetic resonance: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol*, 55(23), 2614-2662. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.011
- Ibanez, B., Heusch, G., Ovize, M., & Van de Werf, F. (2015). Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*, 65(14), 1454-1471. doi:10.1016/j.jacc.2015.02.032
- invivoContrast GmbH. (2009). Retrieved from [http://www.invivocontrast.com/gadofluorine\\_p](http://www.invivocontrast.com/gadofluorine_p)
- Jaarsma, C., Nagel, E., & Schalla, S. J. C. C. I. R. (2013). A Critical Review of Different Imaging Methods for the Assessment of Myocardial Ischemia. 6(2), 117-127. doi:10.1007/s12410-012-9185-x
- James, M. L., & Gambhir, S. S. (2012). A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*, 92(2), 897-965. doi:10.1152/physrev.00049.2010
- Jivraj, N., Phinikaridou, A., Shah, A. M., & Botnar, R. M. (2014). Molecular imaging of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 109(1), 397. doi:10.1007/s00395-013-0397-2
- Jugdutt, B. I. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*, 108(11), 1395-1403. doi:10.1161/01.Cir.0000085658.98621.49

- Jung, M., Ma, Y., Iyer, R. P., DeLeon-Pennell, K. Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M. R., & Lindsey, M. L. (2017). IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*, *112*(3), 33. doi:10.1007/s00395-017-0622-5
- Kamaly, N., Pugh, J. A., Kalber, T. L., Bunch, J., Miller, A. D., McLeod, C. W., & Bell, J. D. (2010). Imaging of gadolinium spatial distribution in tumor tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Mol Imaging Biol*, *12*(4), 361-366. doi:10.1007/s11307-009-0282-4
- Kammerlander, A. A., Marzluf, B. A., Zotter-Tufaro, C., Aschauer, S., Duca, F., Bachmann, A., Knechtelsdorfer, K., Wiesinger, M., Pfaffenberger, S., Greiser, A., Lang, I. M., Bonderman, D., & Mascherbauer, J. (2016). T1 Mapping by CMR Imaging: From Histological Validation to Clinical Implication. *JACC Cardiovasc Imaging*, *9*(1), 14-23. doi:10.1016/j.jcmg.2015.11.002
- Kaya, I., Brinet, D., Michno, W., Baskurt, M., Zetterberg, H., Blenow, K., & Hanrieder, J. (2017). Novel Trimodal MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS3) at 10  $\mu\text{m}$  Reveals Spatial Lipid and Peptide Correlates Implicated in Abeta Plaque Pathology in Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*, *8*(12), 2778-2790. doi:10.1021/acscchemneuro.7b00314
- Kellman, P., & Hansen, M. S. (2014). T1-mapping in the heart: accuracy and precision. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, *16*(1), 2. doi:10.1186/1532-429X-16-2
- Kim, P., Weiskirchen, S., Uerlings, R., Kueppers, A., Stellmacher, F., Viveiros, A., Zoller, H., & Weiskirchen, R. (2018). Quantification of liver iron overload disease with laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *BMC Med Imaging*, *18*(1), 51. doi:10.1186/s12880-018-0291-3
- Kim, R. J., Wu, E., Rafael, A., Chen, E. L., Parker, M. A., Simonetti, O., Klocke, F. J., Bonow, R. O., & Judd, R. M. (2000). The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med*, *343*(20), 1445-1453. doi:10.1056/nejm200011163432003



- Klein, C., Nekolla, S. G., Bengel, F. M., Momose, M., Sammer, A., Haas, F., Schnackenburg, B., Delius, W., Mudra, H., Wolfram, D., & Schwaiger, M. (2002). Assessment of myocardial viability with contrast-enhanced magnetic resonance imaging: comparison with positron emission tomography. *Circulation, 105*(2), 162-167.
- Kochebina, O., Halty, A., Taleb, J., Kryza, D., Janier, M., Sadr, A. B., Baudier, T., Rit, S., & Sarrut, D. (2019). In vivo gadolinium nanoparticle quantification with SPECT/CT. *EJNMMI Phys, 6*(1), 9. doi:10.1186/s40658-019-0246-y
- Koktzoglou, I., Harris, K. R., Tang, R., Kane, B. J., Misselwitz, B., Weinmann, H. J., Lu, B., Nagaraj, A., Roth, S. I., Carroll, T. J., McPherson, D. D., & Li, D. (2006). Gadofluorine-enhanced magnetic resonance imaging of carotid atherosclerosis in Yucatan miniswine. *Invest Radiol, 41*(3), 299-304. doi:10.1097/01.rli.0000188362.12555.62
- Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S., & Udelson, J. E. (2011). Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging, 4*(1), 98-108. doi:10.1016/j.jcmg.2010.10.008
- Kumar, D., Hacker, T. A., Buck, J., Whitesell, L. F., Kaji, E. H., Douglas, P. S., & Kamp, T. J. (2005). Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis, 16*(1), 41-44. doi:10.1097/00019501-200502000-00008
- Lavin Plaza, B., Theodoulou, I., Rashid, I., Hajhosseiny, R., Phinikaridou, A., & Botnar, R. M. (2019). Molecular Imaging in Ischemic Heart Disease. *Curr Cardiovasc Imaging Rep, 12*(7), 31. doi:10.1007/s12410-019-9500-x
- Lewis, E. F., Moye, L. A., Rouleau, J. L., Sacks, F. M., Arnold, J. M., Warnica, J. W., Flaker, G. C., Braunwald, E., & Pfeffer, M. A. (2003). Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol, 42*(8), 1446-1453.

- 
- Libby, P. (2013). Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*, *368*(21), 2004-2013. doi:10.1056/NEJMra1216063
- Lorenz, C. H., Walker, E. S., Morgan, V. L., Klein, S. S., & Graham, T. P., Jr. (1999). Normal human right and left ventricular mass, systolic function, and gender differences by cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson*, *1*(1), 7-21.
- Ma, Y., Halade, G. V., & Lindsey, M. L. (2012). Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*, *5*(6), 848-857. doi:10.1007/s12265-012-9398-z
- Ma, Y., Yabluchanskiy, A., & Lindsey, M. L. (2013). Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*, *6*(1), 11. doi:10.1186/1755-1536-6-11
- Makowski, M. R., Preissel, A., von Bary, C., Warley, A., Schachoff, S., Keithan, A., Cesati, R. R., Onthank, D. C., Schwaiger, M., Robinson, S. P., & Botnar, R. M. (2012). Three-dimensional imaging of the aortic vessel wall using an elastin-specific magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol*, *47*(7), 438-444. doi:10.1097/RLI.0b013e3182588263
- Managh, A. J., Edwards, S. L., Bushell, A., Wood, K. J., Geissler, E. K., Hutchinson, J. A., Hutchinson, R. W., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2013). Single cell tracking of gadolinium labeled CD4+ T cells by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*, *85*(22), 10627-10634. doi:10.1021/ac4022715
- Marzola, P., Osculati, F., & Sbarbati, A. (2003). High field MRI in preclinical research. *Eur J Radiol*, *48*(2), 165-170. doi:10.1016/j.ejrad.2003.08.007
- Massoud, T. F., & Gambhir, S. S. (2003). Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, *17*(5), 545-580. doi:10.1101/gad.1047403

- 
- Matsui, Y., Morimoto, J., & Uede, T. (2010). Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World J Biol Chem*, 1(5), 69-80. doi:10.4331/wjbc.v1.i5.69
- Mavrogeni, S., Apostolou, D., Argyriou, P., Velitsista, S., Papa, L., Efentakis, S., Vernardos, E., Kanoupaki, M., Kanoupakis, G., & Manginas, A. (2017). T1 and T2 Mapping in Cardiology: "Mapping the Obscure Object of Desire". *Cardiology*, 138(4), 207-217. doi:10.1159/000478901
- Meding, J., Urich, M., Licha, K., Reinhardt, M., Misselwitz, B., Fayad, Z. A., & Weinmann, H. J. (2007). Magnetic resonance imaging of atherosclerosis by targeting extracellular matrix deposition with Gadofluorine M. *Contrast Media Mol Imaging*, 2(3), 120-129. doi:10.1002/cmimi.137
- Messroghli, D. R., Radjenovic, A., Kozerke, S., Higgins, D. M., Sivananthan, M. U., & Ridgway, J. P. (2004). Modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) for high-resolution T1 mapping of the heart. *Magn Reson Med*, 52(1), 141-146. doi:10.1002/mrm.20110
- Messroghli, D. R., Rudolph, A., Abdel-Aty, H., Wassmuth, R., Kuhne, T., Dietz, R., & Schulz-Menger, J. (2010). An open-source software tool for the generation of relaxation time maps in magnetic resonance imaging. *BMC Med Imaging*, 10, 16. doi:10.1186/1471-2342-10-16
- Mewton, N., Liu, C. Y., Croisille, P., Bluemke, D., & Lima, J. A. (2011). Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*, 57(8), 891-903. doi:10.1016/j.jacc.2010.11.013
- Michael, L. H., Entman, M. L., Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., Hawkins, H. K., Berens, K., & Ballantyne, C. M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 2), H2147-2154. doi:10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2147

- Milani-Nejad, N., & Janssen, P. M. (2014). Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther*, *141*(3), 235-249. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.007
- Misselwitz, B. (2006). MR contrast agents in lymph node imaging. *Eur J Radiol*, *58*(3), 375-382. doi:10.1016/j.ejrad.2005.12.044
- Misselwitz, B., Platzek, J., Raduchel, B., Oellinger, J. J., & Weinmann, H. J. (1999). Gadofluorine 8: initial experience with a new contrast medium for interstitial MR lymphography. *Magma*, *8*(3), 190-195.
- Misselwitz, B., Platzek, J., & Weinmann, H. J. (2004). Early MR lymphography with gadofluorine M in rabbits. *Radiology*, *231*(3), 682-688. doi:10.1148/radiol.2313021000
- Moon, J. C., Messroghli, D. R., Kellman, P., Piechnik, S. K., Robson, M. D., Ugander, M., Gatehouse, P. D., Arai, A. E., Friedrich, M. G., Neubauer, S., Schulz-Menger, J., & Schelbert, E. B. (2013). Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, *15*(1), 92. doi:10.1186/1532-429X-15-92
- Muser, D., Castro, S. A., Santangeli, P., & Nucifora, G. (2018). Clinical applications of feature-tracking cardiac magnetic resonance imaging. *World J Cardiol*, *10*(11), 210-221. doi:10.4330/wjc.v10.i11.210
- Muthuramu, I., Lox, M., Jacobs, F., & De Geest, B. (2014). Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure. *J Vis Exp*(94). doi:10.3791/52206
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and

- complementary functions. *J Exp Med*, 204(12), 3037-3047. doi:10.1084/jem.20070885
- Niehoff, A. C., Wachsmuth, L., Schmid, F., Sperling, M., Faber, C., & Karst, U. (2016). Quantification of Manganese Enhanced Magnetic Resonance Imaging based on Spatially Resolved Elemental Mass Spectrometry. *ChemistrySelect*, 1(2), 264-266.
- Niendorf, T., Sodickson, D. K., Krombach, G. A., & Schulz-Menger, J. (2010). Toward cardiovascular MRI at 7 T: clinical needs, technical solutions and research promises. *Eur Radiol*, 20(12), 2806-2816. doi:10.1007/s00330-010-1902-8
- Norris, J. L., & Caprioli, R. M. (2013). Imaging mass spectrometry: a new tool for pathology in a molecular age. *Proteomics Clin Appl*, 7(11-12), 733-738. doi:10.1002/prca.201300055
- O h-Ici, D., Jeuthe, S., Al-Wakeel, N., Berger, F., Kuehne, T., Kozerke, S., & Messroghli, D. R. (2014). T1 mapping in ischaemic heart disease. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*. doi:10.1093/ehjci/jeu024
- Okamura, H., Pisani, L. J., Dalal, A. R., Emrich, F., Dake, B. A., Arakawa, M., Onthank, D. C., Cesati, R. R., Robinson, S. P., Milanese, M., Kotek, G., Smit, H., Connolly, A. J., Adachi, H., McConnell, M. V., & Fischbein, M. P. (2014). Assessment of elastin deficit in a Marfan mouse aneurysm model using an elastin-specific magnetic resonance imaging contrast agent. *Circ Cardiovasc Imaging*, 7(4), 690-696. doi:10.1161/circimaging.114.001658
- Otsuki, M., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J.-A. (2003). Cardiovascular roles of estrogen receptors: insights gained from knockout models. *Nuclear receptor signaling*, 1, e003-e003. doi:10.1621/nrs.01003
- Pattanayak, P., & Bleumke, D. A. (2015). Tissue characterization of the myocardium: state of the art characterization by magnetic resonance and computed tomography imaging. *Radiol Clin North Am*, 53(2), 413-423. doi:10.1016/j.rcl.2014.11.005

- 
- Patten, R. D., Aronovitz, M. J., Deras-Mejia, L., Pandian, N. G., Hanak, G. G., Smith, J. J., Mendelsohn, M. E., & Konstam, M. A. (1998). Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *274*(5), H1812-H1820. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1812
- Pennell, D. J. (2010). Cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*, *121*(5), 692-705. doi:10.1161/circulationaha.108.811547
- Phelps, M. E. (2000). PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med*, *41*(4), 661-681.
- Phinikaridou, A., Andia, M. E., Lacerda, S., Lorrio, S., Makowski, M. R., & Botnar, R. M. (2013). Molecular MRI of atherosclerosis. *Molecules*, *18*(11), 14042-14069. doi:10.3390/molecules181114042
- Piechnik, S. K., Ferreira, V. M., Dall'Armellina, E., Cochlin, L. E., Greiser, A., Neubauer, S., & Robson, M. D. (2010). Shortened Modified Look-Locker Inversion recovery (ShMOLLI) for clinical myocardial T1-mapping at 1.5 and 3 T within a 9 heartbeat breathhold. *J Cardiovasc Magn Reson*, *12*, 69. doi:10.1186/1532-429X-12-69
- Pontone, G., Andreini, D., Baggiano, A., Bertella, E., Mushtaq, S., Conte, E., Beltrama, V., Guaricci, A. I., & Pepi, M. (2015). Functional relevance of coronary artery disease by cardiac magnetic resonance and cardiac computed tomography: myocardial perfusion and fractional flow reserve. *Biomed Res Int*, *2015*, 297696. doi:10.1155/2015/297696
- Pontone, G., Guaricci, A. I., Neglia, D., & Andreini, D. (2017). State of the art: non-invasive imaging in ischaemic heart disease. *EuroIntervention*, *13*(6), 654-665. doi:10.4244/eij-d-17-00466
- Protti, A., Lavin, B., Dong, X., Lorrio, S., Robinson, S., Onthank, D., Shah, A. M., & Botnar, R. M. (2015). Assessment of Myocardial Remodeling Using an Elastin/Tropoelastin Specific Agent with High Field Magnetic Resonance

- Imaging (MRI). *J Am Heart Assoc*, 4(8), e001851. doi:10.1161/JAHA.115.001851
- Pugh, J. A., Cox, A. G., McLeod, C. W., Bunch, J., Writer, M. J., Hart, S. L., Bienemann, A., White, E., & Bell, J. (2012). Elemental imaging of MRI contrast agents: benchmarking of LA-ICP-MS to MRI. *Anal Bioanal Chem*, 403(6), 1641-1649. doi:10.1007/s00216-012-5973-z
- Puntmann, V. O., Peker, E., Chandrashekar, Y., & Nagel, E. (2016). T1 Mapping in Characterizing Myocardial Disease: A Comprehensive Review. *Circ Res*, 119(2), 277-299. doi:10.1161/circresaha.116.307974
- Radenkovic, D., Weingartner, S., Ricketts, L., Moon, J. C., & Captur, G. (2017). T1 mapping in cardiac MRI. *Heart Fail Rev*, 22(4), 415-430. doi:10.1007/s10741-017-9627-2
- Rai, V., Sharma, P., Agrawal, S., & Agrawal, D. K. (2017). Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem*, 424(1-2), 123-145. doi:10.1007/s11010-016-2849-0
- Ramalho, J., & Ramalho, M. (2017). Gadolinium Deposition and Chronic Toxicity. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 25(4), 765-778. doi:10.1016/j.mric.2017.06.007
- Ramalho, J., Ramalho, M., AlObaidy, M., & Semelka, R. C. (2016). Technical aspects of MRI signal change quantification after gadolinium-based contrast agents' administration. *Magn Reson Imaging*, 34(10), 1355-1358. doi:10.1016/j.mri.2016.09.004
- Ramos, I. T., Henningson, M., Nezafat, M., Lavin, B., Lorrio, S., Gebhardt, P., Protti, A., Eykyn, T. R., Andia, M. E., Fogel, U., Phinikaridou, A., Shah, A. M., & Botnar, R. M. (2018). Simultaneous Assessment of Cardiac Inflammation and Extracellular Matrix Remodeling after Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Imaging*, 11(11). doi:10.1161/circimaging.117.007453

- 
- Reifschneider, O., Wentker, K. S., Strobel, K., Schmidt, R., Masthoff, M., Sperling, M., Faber, C., & Karst, U. (2015). Elemental bioimaging of thulium in mouse tissues by laser ablation-ICPMS as a complementary method to heteronuclear proton magnetic resonance imaging for cell tracking experiments. *Anal Chem*, *87*(8), 4225-4230. doi:10.1021/ac504363q
- Reimann, C., Brangsch, J., Kaufmann, J. O., Adams, L. C., Onthank, D. C., Robinson, S. P., Botnar, R. M., Colletini, F., & Makowski, M. R. (2018). Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Angiography Using a Novel Elastin-Specific Molecular Probe in an Experimental Animal Model. *Contrast Media Mol Imaging*, *2018*, 9217456. doi:10.1155/2018/9217456
- Reimer, K. A., & Jennings, R. B. (1979). The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, *40*(6), 633-644.
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, *56*(5), 786-794.
- Ridgway, J. P. (2010). Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: part I. *J Cardiovasc Magn Reson*, *12*, 71. doi:10.1186/1532-429x-12-71
- Riede, U.-N., & Werner, M. (2017). *Allgemeine und spezielle Pathologie*: Springer-Verlag.
- Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M., & Weinmann, H. J. (2005). Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol*, *40*(11), 715-724.
- Romero, J., Xue, X., Gonzalez, W., & Garcia, M. J. J. C. I. (2012). CMR imaging assessing viability in patients with chronic ventricular dysfunction due to coronary artery disease: a meta-analysis of prospective trials. *5*(5), 494-508.



- 
- Ronald, J. A., Chen, Y., Belisle, A. J., Hamilton, A. M., Rogers, K. A., Hegele, R. A., Misselwitz, B., & Rutt, B. K. (2009). Comparison of gadofluorine-M and Gd-DTPA for noninvasive staging of atherosclerotic plaque stability using MRI. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2(3), 226-234. doi:10.1161/circimaging.108.826826
- Salto-Tellez, M., Yung Lim, S., El-Oakley, R. M., Tang, T. P., ZA, A. L., & Lim, S. K. (2004). Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol*, 13(2), 91-97. doi:10.1016/s1054-8807(03)00129-7
- Sammet, S. (2016). Magnetic resonance safety. *Abdom Radiol (NY)*, 41(3), 444-451. doi:10.1007/s00261-016-0680-4
- Schick, F. (2005). Whole-body MRI at high field: technical limits and clinical potential. *Eur Radiol*, 15(5), 946-959. doi:10.1007/s00330-005-2678-0
- Schieffer, B., Wirger, A., Meybrunn, M., Seitz, S., Holtz, J., Riede, U. N., & Drexler, H. (1994). Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 89(5), 2273-2282.
- Schmidt, R., Nippe, N., Strobel, K., Masthoff, M., Reifschneider, O., Castelli, D. D., Holtke, C., Aime, S., Karst, U., Sunderkotter, C., Bremer, C., & Faber, C. (2014). Highly shifted proton MR imaging: cell tracking by using direct detection of paramagnetic compounds. *Radiology*, 272(3), 785-795. doi:10.1148/radiol.14132056
- Sellers, R. S. (2017). Translating Mouse Models: Immune Variation and Efficacy Testing. *Toxicologic Pathology*, 45(1), 134-145. doi:10.1177/0192623316675767
- Sellers, R. S., Clifford, C. B., Treuting, P. M., & Brayton, C. (2012). Immunological Variation Between Inbred Laboratory Mouse Strains: Points to Consider in Phenotyping Genetically Immunomodified Mice. *Veterinary Pathology*, 49(1), 32-43. doi:10.1177/0300985811429314

- Sheng, F., Inoue, Y., Kiryu, S., Watanabe, M., & Ohtomo, K. (2011). Long-term assessment of contrast effects of gadofluorine M and gadofluorine P in magnetic resonance imaging of mice. *Japanese Journal of Radiology*, *30*(1), 86-91. doi:10.1007/s11604-011-0009-8
- Sirol, M., Itskovich, V. V., Mani, V., Aguinaldo, J. G., Fallon, J. T., Misselwitz, B., Weinmann, H. J., Fuster, V., Toussaint, J. F., & Fayad, Z. A. (2004). Lipid-rich atherosclerotic plaques detected by gadofluorine-enhanced in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*, *109*(23), 2890-2896. doi:10.1161/01.CIR.0000129310.17277.E7
- Sirol, M., Moreno, P. R., Purushothaman, K. R., Vucic, E., Amirbekian, V., Weinmann, H. J., Muntner, P., Fuster, V., & Fayad, Z. A. (2009). Increased neovascularization in advanced lipid-rich atherosclerotic lesions detected by gadofluorine-M-enhanced MRI: implications for plaque vulnerability. *Circ Cardiovasc Imaging*, *2*(5), 391-396. doi:10.1161/CIRCIMAGING.108.801712
- Snyder, C. J., DelaBarre, L., Metzger, G. J., van de Moortele, P. F., Akgun, C., Ugurbil, K., & Vaughan, J. T. (2009). Initial results of cardiac imaging at 7 Tesla. *Magn Reson Med*, *61*(3), 517-524. doi:10.1002/mrm.21895
- Sosnovik, D. E., & Weissleder, R. (2007). Emerging concepts in molecular MRI. *Curr Opin Biotechnol*, *18*(1), 4-10. doi:10.1016/j.copbio.2006.11.001
- Souders, C. A., Bowers, S. L., & Baudino, T. A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*, *105*(12), 1164-1176. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209809
- Spraggins, J. M., Rizzo, D. G., Moore, J. L., Noto, M. J., Skaar, E. P., & Caprioli, R. M. (2016). Next-generation technologies for spatial proteomics: Integrating ultra-high speed MALDI-TOF and high mass resolution MALDI FTICR imaging mass spectrometry for protein analysis. *Proteomics*, *16*(11-12), 1678-1689. doi:10.1002/pmic.201600003

- Springer, E., Dymerska, B., Cardoso, P. L., Robinson, S. D., Weisstanner, C., Wiest, R., Schmitt, B., & Trattinig, S. (2016). Comparison of Routine Brain Imaging at 3 T and 7 T. *Invest Radiol*, 51(8), 469-482. doi:10.1097/rli.0000000000000256
- Statistisches Bundesamt. (2015). Retrieved from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>
- Stojanov, D., Aracki-Trenkic, A., & Benedeto-Stojanov, D. (2016). Gadolinium deposition within the dentate nucleus and globus pallidus after repeated administrations of gadolinium-based contrast agents-current status. *Neuroradiology*, 58(5), 433-441. doi:10.1007/s00234-016-1658-1
- Suttie, J. J., Delabarre, L., Pitcher, A., van de Moortele, P. F., Dass, S., Snyder, C. J., Francis, J. M., Metzger, G. J., Weale, P., Ugurbil, K., Neubauer, S., Robson, M., & Vaughan, T. (2012). 7 Tesla (T) human cardiovascular magnetic resonance imaging using FLASH and SSFP to assess cardiac function: validation against 1.5 T and 3 T. *NMR Biomed*, 25(1), 27-34. doi:10.1002/nbm.1708
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*, 339(6116), 161-166. doi:10.1126/science.1230719
- Tanimoto, A., Oshio, K., Suematsu, M., Pouliquen, D., & Stark, D. D. (2001). Relaxation effects of clustered particles. *J Magn Reson Imaging*, 14(1), 72-77. doi:10.1002/jmri.1153
- Taylor, A. J., Salerno, M., Dharmakumar, R., & Jerosch-Herold, M. (2016). T1 Mapping: Basic Techniques and Clinical Applications. *JACC Cardiovasc Imaging*, 9(1), 67-81. doi:10.1016/j.jcmg.2015.11.005
- Terreno, E., Geninatti Crich, S., Belfiore, S., Biancone, L., Cabella, C., Esposito, G., Manazza, A. D., & Aime, S. (2006). Effect of the intracellular localization of a Gd-based imaging probe on the relaxation enhancement of water protons. *Magn Reson Med*, 55(3), 491-497. doi:10.1002/mrm.20793

The Jackson Laboratory. (n.d.). Retrieved from <https://www.jax.org/strain/000664>

Trog, S., El-Khatib, A. H., Beck, S., Makowski, M. R., Jakubowski, N., & Linscheid, M. W. (2019). Complementarity of molecular and elemental mass spectrometric imaging of Gadovist() in mouse tissues. *Anal Bioanal Chem*, *411*(3), 629-637. doi:10.1007/s00216-018-1477-9

van den Borne, S. W., Diez, J., Blankesteyn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., & Narula, J. (2010). Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol*, *7*(1), 30-37. doi:10.1038/nrcardio.2009.199

van der Kolk, A. G., Hendrikse, J., Zwanenburg, J. J., Visser, F., & Luijten, P. R. (2013). Clinical applications of 7 T MRI in the brain. *Eur J Radiol*, *82*(5), 708-718. doi:10.1016/j.ejrad.2011.07.007

van der Laan, A. M., Nahrendorf, M., & Piek, J. J. (2013). Republished: healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Postgrad Med J*, *89*(1047), 52-58. doi:10.1136/postgradmedj-2012-301623rep

Vanhoutte, L., Gerber, B. L., Gallez, B., Po, C., Magat, J., Jean-Luc, B., Feron, O., & Moniotte, S. (2016). High field magnetic resonance imaging of rodents in cardiovascular research. *Basic Res Cardiol*, *111*(4), 46. doi:10.1007/s00395-016-0565-2

Vargas, M. I., Martelli, P., Xin, L., Ipek, O., Grouiller, F., Pittau, F., Trampel, R., Gruetter, R., Vulliemoz, S., & Lazeyras, F. (2018). Clinical Neuroimaging Using 7 T MRI: Challenges and Prospects. *J Neuroimaging*, *28*(1), 5-13. doi:10.1111/jon.12481

Vassiliou, V. S., Cameron, D., Prasad, S. K., & Gatehouse, P. D. (2018). Magnetic resonance imaging: Physics basics for the cardiologist. *JRSM Cardiovasc Dis*, *7*, 2048004018772237. doi:10.1177/2048004018772237

- von Bary, C., Makowski, M., Preissel, A., Keithahn, A., Warley, A., Spuentrup, E., Buecker, A., Lazewatsky, J., Cesati, R., Onthank, D., Schickl, N., Schachoff, S., Hausleiter, J., Schomig, A., Schwaiger, M., Robinson, S., & Botnar, R. (2011). MRI of coronary wall remodeling in a swine model of coronary injury using an elastin-binding contrast agent. *Circ Cardiovasc Imaging*, *4*(2), 147-155. doi:10.1161/circimaging.109.895607
- Wagner, A., Mahrholdt, H., Holly, T. A., Elliott, M. D., Regenfus, M., Parker, M., Klocke, F. J., Bonow, R. O., Kim, R. J., & Judd, R. M. (2003). Contrast-enhanced MRI and routine single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: an imaging study. *Lancet*, *361*(9355), 374-379. doi:10.1016/s0140-6736(03)12389-6
- Walls, M. C., Verhaert, D., Min, J. K., & Raman, S. V. (2011). Myocardial edema imaging in acute coronary syndromes. *J Magn Reson Imaging*, *34*(6), 1243-1250. doi:10.1002/jmri.22737
- Wattjes, M. P., & Barkhof, F. (2012). Diagnostic relevance of high field MRI in clinical neuroradiology: the advantages and challenges of driving a sports car. *Eur Radiol*, *22*(11), 2304-2306. doi:10.1007/s00330-012-2552-9
- Wildgruber, M., Bielicki, I., Aichler, M., Kosanke, K., Feuchtinger, A., Settles, M., Onthank, D. C., Cesati, R. R., Robinson, S. P., Huber, A. M., Rummeny, E. J., Walch, A. K., & Botnar, R. M. (2014). Assessment of myocardial infarction and postinfarction scar remodeling with an elastin-specific magnetic resonance agent. *Circ Cardiovasc Imaging*, *7*(2), 321-329. doi:10.1161/CIRCIMAGING.113.001270
- Wisenberg, G., Prato, F. S., Carroll, S. E., Turner, K. L., & Marshall, T. (1988). Serial nuclear magnetic resonance imaging of acute myocardial infarction with and without reperfusion. *American heart journal*, *115*(3), 510–518.
- World Health Organization. (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). Retrieved from [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

- 
- Zheng, J., Ochoa, E., Misselwitz, B., Yang, D., El Naqa, I., Woodard, P. K., & Abendschein, D. (2008). Targeted contrast agent helps to monitor advanced plaque during progression: a magnetic resonance imaging study in rabbits. *Investigative radiology*, 43(1), 49–55. doi:10.1097/RLI.0b013e318155aa5a
- Zolotareva, A. G., & Kogan, M. E. (1978). Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa*, 20(4), 308-314.

---

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken:

Bei Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny, Direktor des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Technischen Universität München, für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können.

Bei Moritz Wildgruber für die interessante Themenstellung, die von Anfang bis Ende hervorragende Betreuung, die konstruktiven Kommentare und Ratschläge und die weitreichende Expertise auf dem Gebiet der molekularen Bildgebung.

Bei Fabian Lohöfer für die intensive Betreuung über den gesamten Zeitraum meiner Promotion, all die hilfreichen Ratschläge und Kommentare und die detaillierte Durchsicht meiner Arbeit.

Bei Katja Kosanke und Almut Glinzer für die fortwährende Unterstützung meines Promotionsprojektes.

Bei meinen Kollaborationspartnern Axel Walch, Katharina Huber und Michaela Aichler des Instituts für Pathologie am Helmholtz-Zentrum München für die tolle Unterstützung bei den MALDI-TOF-IMS Analysen, sowie bei Uwe Karst und Rebecca Buchholz des Instituts für Analytische Chemie der Wilhelms-Universität Münster für die tolle Unterstützung bei den LA-ICP-MS Analysen

Nicht zuletzt, bei meinen Eltern, meinen Freunden und meinem Partner, die mich über den gesamten Zeitraum hinweg unterstützt haben und immer für mich da waren.

## 9 Veröffentlichungen

### Publikationen:

#### **Molecular imaging of myocardial infarction with Gadofluorine P – A combined magnetic resonance and mass spectrometry imaging approach**

Lohoefer F, **Hoffmann L**, Buchholz R, Huber K, Glinzer A, Kosanke K, Feuchtinger A, Aichler M, Feuerecker B, Kaissis G, Rummeny EJ, Hoeltke C, Faber C, Schilling F, Botnar R, Walch AK, Karst U, Wildgruber M  
Heliyon. 2018 Apr 16; Volume 4, Issue 4, e00606

### Vorträge und Posterpräsentationen:

#### **Assessment and precise quantification of post-infarction scar remodeling using a collagen-targeted magnetic resonance contrast agent and T1 mapping techniques**

Fabian Lohoefer, **Laura Hoffmann**, Almut Glinzer, Katja Kosanke, Franz Schilling, Ernst J. Rummeny, Moritz Wildgruber  
Vortrag  
World Molecular Imaging Congress 2015, Honolulu, USA  
2–5. September 2015

#### **Molecular imaging of atherosclerosis using the novel magnetic resonance contrast agent Gadofluorine P and T1 mapping techniques**

Glinzer A, Lohoefer F, **Hoffmann L**, Kosanke K, Rummeny EJ, Zerneck A, Schilling F, Wildgruber M  
Posterpräsentation  
World Molecular Imaging Congress 2015, Honolulu, USA  
2.–5. September 2015

#### **Assessment and precise quantification of post-infarction scar remodeling using the contrast agent Gadofluorine P and T1 mapping techniques**

Lohöfer, F., **Hoffmann, L.**, Glinzer, A., Kosanke, K., Schilling, F., Rummeny, E., Wildgruber, M.  
Vortrag  
10<sup>th</sup> Winter Conference of the European Society for Molecular Imaging - ESMI, TOPIIM 2016, Les Houches, Frankreich  
31. Januar – 5. Februar 2016



---

**Mokardiale MRT-Infarktbildgebung im Mausmodell mittels T1-Mapping bei 7 Tesla mit dem Kontrastmittel Gadofluorine P sowie ex-vivo-Validierung mittels MALDI-IMS**

Lohöfer F, **Hoffmann L**, Glinzer A, Kosanke K, Schilling F, Huber K, Aichler M, Walch A, Rummeny E, Wildgruber M

Vortrag

97. Deutscher Röntgenkongress, Leipzig, Deutschland

4. – 7. Mai 2016

**Molekulare Bildgebung der Atherosklerose mit dem MRT-Kontrastmittel Gadofluorine P und T1-Mapping**

Lohöfer F, Glinzer A, **Hoffmann L**, Kosanke K, Schilling F, Huber K, Aichler M, Walch A, Rummeny E, Wildgruber M

Vortrag

97. Deutscher Röntgenkongress, Leipzig, Deutschland

4. – 7. Mai 2016

**Molecular Imaging of Atherosclerosis using A Combined Magnetic Resonance and MALDI-Imaging Approach**

Fabian Lohoefer MD, Almut Glinzer, **Laura Hoffmann**, Franz Schilling, Ernst J. Rummeny MD, Moritz Wildgruber MD, PHD

Vortrag

Radiological Society of North America – Annual Meeting 2016, Chicago, USA

27. November – 2. Dezember 2016

**Assessment and Precise Quantification of Post-Infarction Scar Remodeling using a Combined Molecular Magnetic Resonance and MALDI Imaging Approach**

Fabian Lohoefer MD, **Laura Hoffmann**, Almut Glinzer, Katja Kosanke, Franz Schilling, Ernst J. Rummeny MD, Moritz Wildgruber MD, PHD

Vortrag

Radiological Society of North America – Annual Meeting 2016, Chicago, USA

27. November – 2. Dezember 2016