

**Visualisierung inflammatorischer Prozesse und Läsionen
in Ratten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis
(EAE) mit Hilfe verschiedener Verfahren der
Magnetresonanztomographie (MRT),
einschließlich der Phasenbildgebung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologe Marcel Hunger
geb. am 09.12.1977

Gutachter

Prof. Dr. Frank Angenstein	Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Magdeburg
Prof. Dr. Markus Rudin	Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

Eingereicht am: 31.07.2013

Verteidigt am: 12.02.2014

Dipl.-Biologe Marcel Hunger
Tel. 0391-55908703
Helmholtzstr. 31
39112 Magdeburg
e-Mail: Marcel.Hunger@gmx.de

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

„Visualisierung inflammatorischer Prozesse und Läsionen in Ratten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) mit Hilfe verschiedener Verfahren der Magnetresonanztomographie (MRT), einschließlich der Phasenbildgebung“

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 31.07.2013

Marcel Hunger

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Frank Angenstein für die Möglichkeit, am Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg diese Arbeit anfertigen zu können, für das interessante Thema sowie für die fachliche Unterstützung. Insbesondere bin ich ihm für die Betreuung meiner Arbeit und für die Einblicke in die wissenschaftliche Welt während meiner Tätigkeit am Institut dankbar.

Für die Unterstützung bei den histologischen Arbeiten und Analysen danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Eike Budinger (Abteilung für Akustik, Sprache und Lernen am Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg). Darüber hinaus danke ich Dr. Budinger für die geduldige Beantwortung meiner vielen Fragen zur Anatomie und Methodik und somit zur Verbesserung meiner wissenschaftlichen Arbeitsweise. Mein besonderer Dank gilt den Technischen-Assistenten, für die fachliche Weiterbildung, für ihre Kooperationsbereitschaft und vor allen Dingen für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ich danke Dr. Kai Zhong (Abteilung für biomedizinische Magnetresonanz, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg), dessen Projekt die Grundlage für die vorliegende Thematik darstellte. Darüber hinaus danke ich ihm für die fachliche Unterstützung bei der Generierung der Phasenbilder.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Jörg Stadler (Speziallabor Nicht-Invasive Bildgebung, Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg), ohne dessen Hilfe ich das Prinzip der Phasenbildung wohl kaum verstanden hätte. In diesem Zusammenhang danke ich ihm auch für seine hilfreichen Kommentare und Anmerkungen bei der Anfertigung der Arbeit.

Allen meinen Kollegen, oder vielmehr Freunden, aus dem Speziallabor Nicht-Invasive Bildgebung am Leibniz-Institut für Neurobiologie danke ich sowohl für die fachliche Unterstützung als auch das familiäre Kontrastprogramm, was das Arbeiten zu einem Vergnügen machte.

Ich danke meinen Eltern für die Jahre der Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Vor allen Dingen danke ich meiner Freundin Beate die immer an mich geglaubt hat und damit mehr als einmal alle Selbstzweifel zerstören konnte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Die Multiple Sklerose	1
1.2. Ätiologie der MS	2
1.3. Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der MS.....	4
1.4. Allgemeines Modell der Immunpathogenese bei MS und EAE	6
1.5. Histopathologie der Läsionen bei MS und EAE	8
1.6. Magnetresonanztomographie bei der Erforschung der MS.....	10
1.6.1. Physikalische Grundlagen der MRT	10
1.6.2. Visualisierung der MS-Läsionen mit konventionellen MRT-Verfahren	11
1.6.3. Kontrastmittel zur Visualisierung von MS-Läsionen.....	12
1.6.4. Visualisierung der MS-Läsionen mit quantitativen MRT-Verfahren.....	13
1.6.5. Phasenbildgebung	14
1.7. Zielsetzung.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Geräte	18
2.2. Chemikalien	19
2.3. Arzneimittel	20
2.4. Antikörper und Kits	20
2.5. Pufferlösungen.....	21
2.6. Reagenzlösungen.....	21
2.7. Software.....	22
2.8. Tierexperimentelle Methoden	23
2.8.1. Versuchstiere	23
2.8.2. EAE-Induktion und klinische Evaluation	23

2.8.2.1. MBP induzierte akute EAE in Lewis-Ratten	23
2.8.2.2. rrMOG ₁₋₁₂₅ induzierte hyperakute EAE in DA-Ratten	23
2.9. Magnetresonanztomographie (MRT)	24
2.9.1. Superparamagnetische Kontrastmittel: VSOP-C184 und VSOP-C200.....	27
2.9.2. Bildverarbeitung	28
2.9.2.1. Magnetisierungstransfer (MT)-Bildgebung	28
2.9.2.2. Phasenbildgebung.....	28
2.9.3. Bildanalyse	29
2.9.3.1. Qualitative Auswertung	29
2.9.3.2. Quantitative Auswertung.....	29
2.9.4. Statistische Analyse	30
2.10. Histologie und Immunhistochemie	31
2.10.1. Perfusion, Gewebefixierung und Lagerung	31
2.10.2. Histochemische Färbungen	31
2.10.2.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer.....	31
2.10.2.2. Nissl-Färbung	32
2.10.2.3. Gallyas-Silberfärbung.....	32
2.10.3. Immunhistochemische Färbungen.....	32
2.10.3.1. CD31(PECAM1)-Färbung	33
2.10.3.2. CD68-Färbung.....	34
2.10.3.3. Serum Albumin-Färbung.....	34
2.10.3.4. MBP-Färbung	34
2.10.4. Auswertung der histologischen Schnitte.....	34
2.10.4.1. Qualitative Auswertung	34
2.10.4.2. Quantitative Auswertung.....	35
3. Ergebnisse	36
3.1. Ergebnisse zur MBP-induzierten akuten EAE in Lewis-Ratten	36
3.1.1. Klinischer Verlauf der akuten EAE.....	36
3.1.2. Histologische und immunhistochemische Ergebnisse	37
3.1.3. MRT ohne vorherige Applikation von VSOP-C184	43
3.1.4. MRT nach Applikation von VSOP-C184.....	44
3.1.5. Quantitative Ergebnisse MRT nach Applikation von VSOP-C184.....	49
3.1.5.1. T ₂ -gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184	50

3.1.5.2. <i>T₁-gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184</i>	51
3.1.5.3. <i>MT-Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184</i>	51
3.1.5.4. <i>MTR-Karten nach Applikation von VSOP-C184</i>	51
3.1.5.5. <i>T₂*-gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184</i>	52
3.1.5.6. <i>Phasenbildgebung nach Applikation von VSOP-C184</i>	52
3.2. Ergebnisse zur MOG-induzierten hyperakuten EAE in DA-Ratten	55
3.2.1. Klinischer Verlauf der hyperakuten EAE	55
3.2.2. Histologische und immunhistochemische Ergebnisse	56
3.2.3. MRT ohne vorherige Applikation von VSOP-C200	66
3.2.4. MRT nach Applikation von VSOP-C200.....	66
3.2.5. Quantitative Ergebnisse MRT nach Applikation von VSOP-C200.....	70
3.2.5.1. <i>T₂-gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200</i>	71
3.2.5.2. <i>T₁-gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200</i>	71
3.2.5.3. <i>MT - Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200</i>	72
3.2.5.4. <i>MTR-Karten nach Applikation von VSOP-C200</i>	72
3.2.5.5. <i>T₂*-gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200</i>	72
3.2.5.6. <i>Phasenbildgebung nach Applikation von VSOP-C200</i>	73
4. Diskussion	74
4.1. Vergleichende qualitative Auswertungen der MRT-Aufnahmen.....	75
4.2. Interpretationen der klinischen und histopathologischen Befunde.....	77
4.3. Sensitivität und Spezifität der MRT-Verfahren bei der Detektion lokaler Inflammationen	79
4.4. Detektion lokaler Inflammationen in der MRT nach Applikation von VSOP.....	80
4.5. Sensitivität und Spezifität der MRT-Verfahren bei der Detektion lokaler Inflammationen nach Applikation von VSOP	83
4.6. Die Rolle der Phasenbildgebung bei der Forschung am Patienten und am Tier.....	86
5. Zusammenfassung	89
6. Literaturverzeichnis	92
7. Lebenslauf	100
8. Publikation	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Verlaufsformen der MS	1
Abbildung 1.2: Weltweites Erkrankungsrisiko der MS	3
Abbildung 1.3: Klinischer Verlauf verschiedener EAE-Modelle.....	5
Abbildung 1.4: Traditionelles Modell der Pathogenese der MS.. ..	7
Abbildung 1.5: Visualisierung einer MS-Läsion mit Hilfe konventioneller MRT-Verfahren und der Phasenbildgebung	15
Abbildung 2.1: Übersichtsaufnahmen des <i>Cerebrums</i> einer Lewis-Ratte in der MRT	25
Abbildung 2.2: Schichtpositionierung des <i>Cerebrums</i> einer Lewis-Ratte in der MRT	25
Abbildung 2.3: Generierung einer MTR-Karte	28
Abbildung 3.1: Klinischer Verlauf der MBP induzierten akuten EAE in Lewis-Ratten.....	37
Abbildung 3.2: Histopathologische Verifizierung im <i>Cortex</i> , basalen <i>Prosencephalon</i> und ventralen <i>Thalamus</i> von Lewis-Ratten mit akuter EAE	39
Abbildung 3.3: Histopathologische Verifizierung im <i>Thalamus</i> und <i>Mesencephalon</i> von Lewis-Ratten mit akuter EAE	40
Abbildung 3.4: Histopathologische Verifizierung im <i>Cerebellum</i> von Lewis-Ratten mit akuter EAE	41
Abbildung 3.5: Histopathologische Verifizierung im <i>Truncus cerebri</i> von Lewis-Ratten mit akuter EAE	42
Abbildung 3.6: Generierung des Phasenbildes.	43
Abbildung 3.7: Vergleich der MRT-Aufnahmen der Kontroll- und EAE-Tiere in Anwesenheit (mVSOP) und in Abwesenheit von VSOP-C184 (oVSOP)...	46
Abbildung 3.8: MRT-Aufnahmen des ZNS von Lewis-Ratten 24 Stunden nach der Injektion von VSOP-C184.....	47
Abbildung 3.9: Verteilung hypointenser Herde im ZNS von Lewis-Ratten mit akuter EAE....	48
Abbildung 3.10: Auswirkungen von VSOP-C184 auf das SNR im ZNS von Lewis-Ratten mit akuter EAE.	50
Abbildung 3.11: Ergebnisse der quantitativen Analyse der MRT-Aufnahmen.....	54
Abbildung 3.12: Klinischer Verlauf der MOG induzierten hyperakuten EAE in DA-Ratten	56
Abbildung 3.13: Histopathologische Verifizierung im <i>Cortex</i> , basalen <i>Prosencephalon</i> und ventralen <i>Thalamus</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl)	57

Abbildung 3.14: Histopathologische Verifizierung im <i>Thalamus</i> und <i>Mesencephalon</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl).....	58
Abbildung 3.15: Histopathologische Verifizierung im <i>Cerebellum</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl).....	59
Abbildung 3.16: Histopathologische Verifizierung im <i>Truncus cerebri</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl).....	60
Abbildung 3.17: Histopathologische Verifizierung im <i>Cortex</i> , basalen <i>Prosencephalon</i> und ventralen <i>Thalamus</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68)	62
Abbildung 3.18: Histopathologische Verifizierung im <i>Thalamus</i> und <i>Mesencephalon</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68).....	63
Abbildung 3.19: Histopathologische Verifizierung im <i>Cerebellum</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68).....	64
Abbildung 3.20: Histopathologische Verifizierung im <i>Truncus cerebri</i> von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68).....	65
Abbildung 3.21: Vergleich der MRT-Aufnahmen der Kontroll- und EAE-Tiere in Anwesenheit (mVSOP) und in Abwesenheit von VSOP-C200 (oVSOP) .	68
Abbildung 3.22: Verteilung hypointenser Herde im ZNS von DA-Ratten mit hyperakuter EAE	69
Abbildung 3.23: Auswirkungen von VSOP-C200 auf das SNR im ZNS von DA-Ratten mit hyperakuter EAE	70
Abbildung 3.24: Vergleich der Auswirkungen des VSOP-C200 und des VSOP-C184 auf den Kontrast hypointenser Herde.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über das experimentelle Design.	26
Tabelle 2.2: Verwendete Messprotokolle	27
Tabelle 2.3: Dosierung der Kontrastmittel in den EAE Modellen	27
Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Antikörper	33
Tabelle 3.1: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der CD68-Färbung im akuten EAE-Modell	39
Tabelle 3.2: Zusammenfassung der qualitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im akuten EAE-Modell.	44
Tabelle 3.3: Zusammenfassung der quantitativen Analyse hypointenser Herde in T ₂ *-gewichteten MRT-Aufnahmen im akuten EAE-Modell	52
Tabelle 3.4: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im akuten EAE-Modell	53
Tabelle 3.5: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der CD68-Färbung im hyperakuten EAE-Modell	61
Tabelle 3.6: Zusammenfassung der qualitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell.	66
Tabelle 3.7: Zusammenfassung der quantitativen Analyse hypointenser Herde in T ₂ *-gewichteten MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell	73
Tabelle 3.8: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell	73

Abkürzungsverzeichnis

APZ	antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest	destilliertes Wasser
B	"bone marrow" (engl.)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Albumin Fraktion V
CAM	"cell adhesion molecule" (engl.)
Ca	Kalzium
CD	"Cluster of Differentiation" (engl.)
CPS	"Cryoprotection Solution" (engl.)
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CT	Computertomographie
DA	Dark-Agouti
DAB	Diaminobenzidin
dkW	durchschnittlicher klinischer Wert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DWI	Diffusions-gewichtete Bildgebung
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
Gd	Gadolinium
GRE	Gradientenecho
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Hochfrequenz
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM	"intracellular adhesion molecule" (engl.)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
i.v.	intravenös
KFA	komplettes Freundsches Adjuvans
LFA	Leukozyten Funktions-Antigen
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metallproteinase
MOBP	Meylin-assoziiertes Oligodendrozyten Basis Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MPS	Mononukleäres System
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MR	Magnetresonanz

MS	Multiple Sklerose
MT	Magnetisierungstransfer
MTC	Magnetisierungstransferkontrast
MTR	" <i>Magnetisation-Transfer-Ratio</i> " (engl.)
Na	Natrium
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatpuffer-Lösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	" <i>phase image</i> " (engl.)
p.I.	post Immunisierung
PLP	Proteolipid-Protein
PVE	postvakzinale Enzephalomyelitis
RNS	Ribonukleinsäure
rrMOG	rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein von Ratten
ROI	" <i>Region-Of-Interest</i> " (engl.)
SE	Spinecho
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SI	Signalintensität
SPIO	" <i>superparamagnetic iron oxid particle</i> " (engl.)
SSPIO	" <i>standard superparamagnetic iron oxid particle</i> " (engl.)
T	Thymus
TE	Echozeit
TGF	" <i>transforming growth factor</i> " (engl.)
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Repetitionszeit
TZR	T-Zell-Rezeptor
USPIO	" <i>ultrasmall superparamagnetic iron oxid particle</i> " (engl.)
VEP	visuell evozierte Potentiale
VSOP	" <i>very small iron oxide particle</i> " (engl.)
WMA	Wasser-Makromolekül-Austausch
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch als *Enzephalomyelitis disseminata* bezeichnet, ist eine entzündliche (inflammatorische) Entmarkungserkrankung (Demyelinisierung) des zentralen Nervensystems (ZNS), die unterschiedliche Symptome (Charcot, 1868) und Verlaufsformen aufweisen kann (Flachenecker and Zettl, 2002). Nach derzeitigem Wissensstand ist die MS eine durch Thymus (T)-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung, die sich bei genetischer Disposition und verschiedenen Umweltfaktoren manifestiert. Pathologisch kennzeichnend für die Erkrankung ist die Entstehung multifokaler, scharf begrenzter Entmarkungsherde im ZNS, die auch als Läsionen oder Plaques bezeichnet werden (Brück, 2002; Hickey, 1999). Diese Läsionen können theoretisch überall im ZNS auftreten und resultieren in einer Vielzahl typischer, aber unspezifischer Symptome, wie z.B. Seh- und Sensibilitätsstörungen, Störungen der Bewegungskoordination (Ataxie) oder Lähmungen (Paresen).

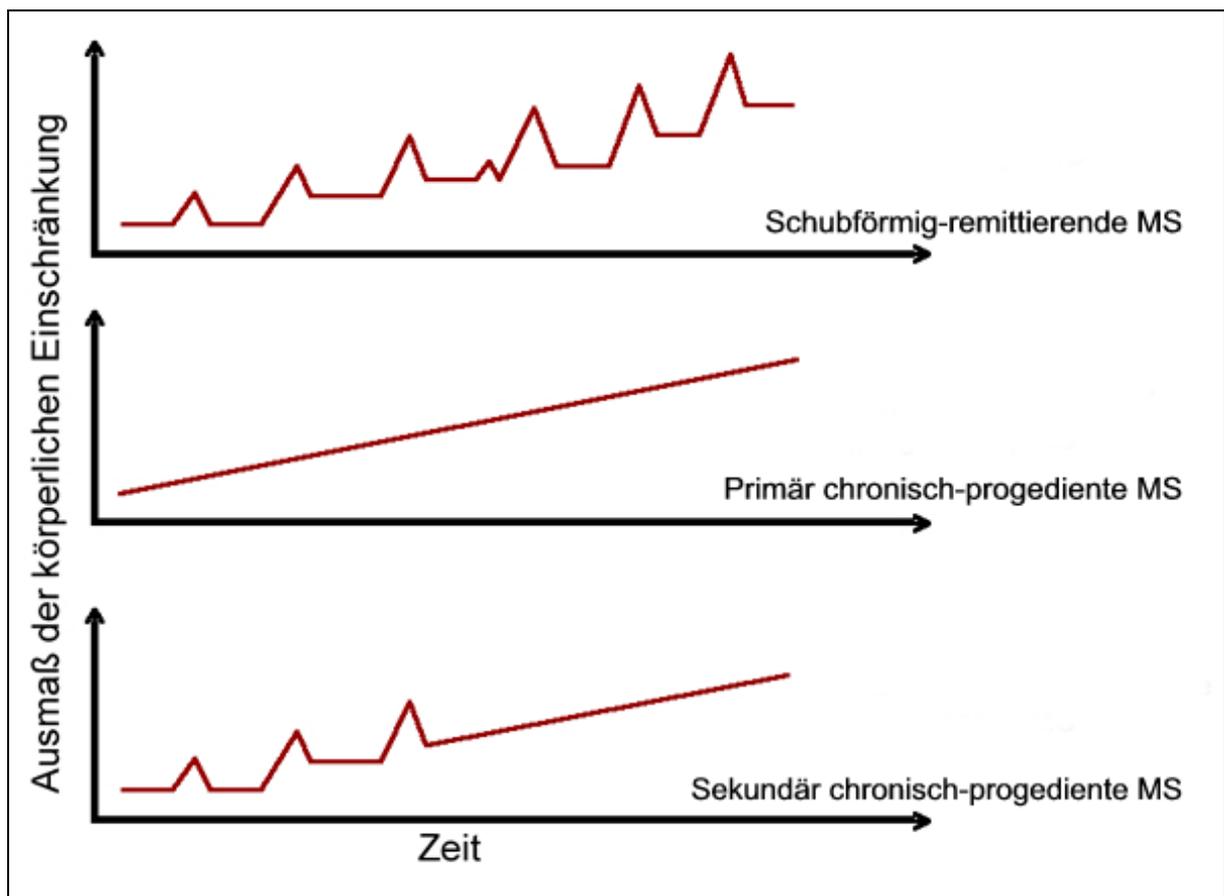


Abbildung 1.1: Verlaufsformen der MS. Etwa 85% der Patienten entwickeln zu Beginn ein schubförmig-remittierende MS. Ein geringer Anteil der Patienten (etwa 15%) entwickelt von Beginn an eine primär chronisch-progrediente MS. Etwa 40% der Patienten mit einer schubförmig-remittierenden MS entwickeln nach durchschnittlich 10-15 Jahren eine primär chronisch-progrediente MS (modifiziert nach http://www.apotheken-umschau.de/Multiple-Sklerose/Multiple-Sklerose-MS-Verlaufsformen-und-Prognose-18894_4.html)

Bei der Mehrzahl der Patienten manifestiert sich die MS im Alter zwischen 20 und 40 Jahren (Rosche et al., 2003). Obwohl der klinische Verlauf der MS sehr variabel ist, entwickeln etwa 85% der Patienten zu Beginn einen schubförmig-remittierenden Verlauf. Der schubförmig-remittierende Verlauf der MS ist definiert durch das Auftreten neuer oder reaktive Symptome, die für mehr als 24 Stunden anhalten (klare Schübe), gefolgt von Phasen mit vollständiger oder partieller Remission. Nach einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von 10-15 Jahren entwickeln etwa 40% der Betroffenen eine sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform. Die sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform ist durch einen initial schubförmigen Verlauf charakterisiert, gefolgt von einer Phase der Progression mit oder ohne gelegentliche Schübe. Ein geringer Anteil der Patienten (etwa 15%) entwickelt von Beginn an eine primär chronisch-progrediente Verlaufsform der MS. In diesen Fällen ist eine kontinuierliche Zunahme des neurologischen Defizits von Beginn an zu beobachten (Flachenecker and Zettl, 2002; Kroner-Milsch et al., 2012) (Abbildung 1.1).

Weltweit leiden etwa 2,5 Millionen Menschen an MS. Somit ist sie neben der Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei jungen Erwachsenen (Yaldizli and Kappos, 2011).

1.2. Ätiologie der MS

Trotz zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen ist die Ursache der MS immer noch unbekannt. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine multifaktorielle Erkrankung hin, an der genetische Faktoren (Martyn and Gale, 1997; Poser, 1994; Rosati, 2001) und bisher unbekannte Umweltfaktoren beteiligt sind (Gilden, 2005; Rosche et al., 2003; Soldan et al., 1997). Erste Hinweise auf eine genetische Disposition lieferten Prävalenzstudien zur Häufigkeit der MS innerhalb ethnischer Gruppen (Martyn and Gale, 1997; Rosati, 2001). Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass ethnische Unterschiede die Empfänglichkeit, die klinische Präsentation und den Verlauf der Erkrankung beeinflussen (Martyn and Gale, 1997; Poser, 1994). Genomweite Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien identifizierten eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Gene (polygenetische Vererbung), die einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko und den Verlauf der MS haben könnten (Dyment et al., 2004; Hardt et al., 2002; Oksenberg et al., 2001). Die bisher stärkste Assoziation wurde für Gene des humanen Leukozytenantigen (HLA)-Systems auf Chromosom 6 nachgewiesen (Ebers and Sadovnick, 1994). Dort sind die Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Gene lokalisiert, die MHC-Proteine der Klasse I oder der Klasse II kodieren. In verschiedenen ethnischen Gruppen finden sich bestimmte HLA-Typen, insbesondere innerhalb der MHC-Klasse-II-Region, die mit einer Suszeptibilität für die MS signifikant assoziiert sind (Lincoln et al., 2005; Rosche et al., 2003).

In Familienstudien wurde gezeigt, dass das Erkrankungsrisiko bei Verwandten 1. Grades 10 bis 20mal (1-2%) höher ist als das durchschnittliche Risiko in der Gesamtbevölkerung (0,1%) (Ebers et al., 1995; Hardt et al., 2002). Bei monozygoten Zwillingen steigt das Risiko auf das 200 bis 250fache (25-30%) an. Die Prävalenz bei angeheirateten oder adoptierten Familienmitgliedern von MS Patienten entspricht die der Gesamtbevölkerung, was darauf hindeutet, dass genetische Faktoren die Manifestation der MS stärker beeinflussen als Umweltfaktoren im Sinne von lokalen oder innerfamiliären Einflüssen (Ebers et al., 1995; Ebers et al., 2000; Sadovnick et al., 1996).

Neben genetischen Faktoren werden auch bakterielle oder virale Infektionen als Auslöser von MS diskutiert (Ascherio and Munger, 2007; Buljevac et al., 2002). Gestützt wird die Infektionstheorie durch den Nachweis bestimmter Viren bei MS-Patienten, wie dem Epstein-Barr-Virus, Herpes-simplex-Virus oder Humanes Herpesvirus 6 (Alotaibi et al., 2004; Martyn et al., 1993; Soldan et al., 1997). Außerdem ist bekannt, dass einzelne Schübe der MS oder sogar der Erkrankungsbeginn durch akute virale Infektionen ausgelöst werden können (Ascherio and Munger, 2007).

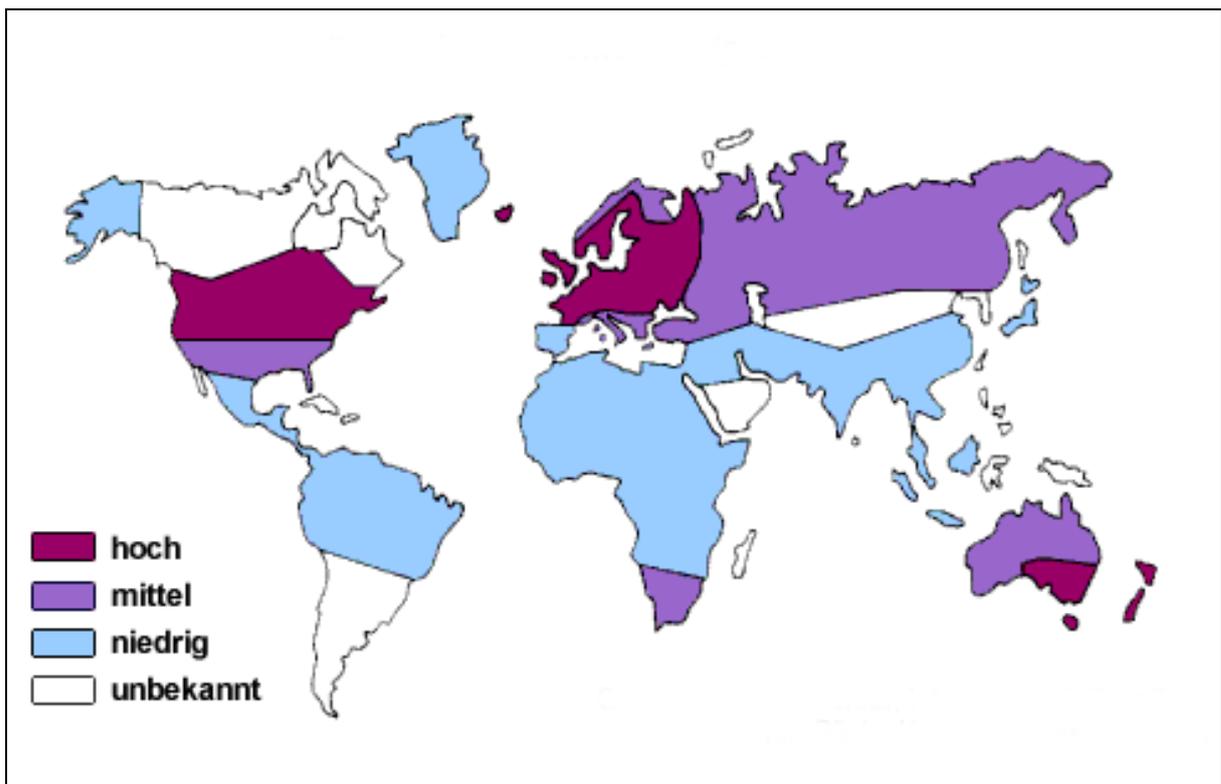


Abbildung 1.2: Weltweites Erkrankungsrisiko der MS. Etwa 500.000 Europäer und 400.000 Nordamerikaner leiden an MS, weltweit sind es etwa 2,5 Millionen Menschen. Insgesamt scheinen Zonen mit gemäßigttem Klima stärker betroffen zu sein als jene in Äquatornähe (Breitengradgradient). Das gilt sowohl für die nördliche als auch südliche Hemisphäre. Darüber hinaus spielen die Lebensumstände und / oder Umwelteinflüsse eine Rolle. So leiden in den Industrieländern deutlich mehr Menschen an MS als in anderen Regionen der Welt (Krämer and Besser, 1988).

Der Einfluss geographischer und sozioökonomischer Faktoren spiegelt sich z.B. in der weltweiten Verteilung der MS wider (Abbildung 1.2). Obwohl deren geographische Verteilung inhomogen erscheint, ist sie nicht zufällig und folgt einem (Breitengrad-) Gradienten. Infolgedessen erscheint die Prävalenz der Erkrankung in Äquatornähe sehr gering (<5 pro 100.000) und nimmt in Richtung der Pole zu (>30 pro 100.000) (Kurtzke, 1993; Kurtzke, 2000) (Abbildung 1.2). Aus Migrationsstudien geht hervor, dass Personen, die nach dem 15. Lebensjahr auswandern, das in der Ursprungsregion vorherrschende Erkrankungsrisiko mitnehmen. Erfolgt die Auswanderung vor dem 15. Lebensjahr, gleicht sich das Risiko dem des neuen Gebietes an (Elián et al., 1990).

1.3. Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose

Einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis von Autoimmunkrankheiten leisten Modelle, mit denen versucht wird, menschliche Erkrankungen im Tier experimentell darzustellen. Eines der meist verwendeten Tiermodelle der MS ist das der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) (Baxter, 2007; Rivers et al., 1933). Die EAE ist eine inflammatorische und demyelinisierende Autoimmunerkrankung, die klinisch und pathohistologisch starke Ähnlichkeit zur MS aufweist (Gold et al., 2006; Martin et al., 1992). Die EAE ist kein „Einzelmodell“, sondern eine Vielzahl von Modellen, die verschiedene Phasen der MS widerspiegeln (Baker and Jackson, 2007).

Die EAE kann in einer Vielzahl verschiedener suszeptibler Tierspezies einschließlich Mäusen und Ratten induziert werden. Zur Induktion können zwei Verfahren eingesetzt werden. Bei der sogenannten „aktiven“ Immunisierung erfolgt eine subkutane (s.c.) Injektion mit Myelinbestandteilen (z.B. Myelin-Basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Proteolipid-Protein (PLP)) in komplettem Freundschens Adjuvans (KFA), angereichert mit Bestandteilen von *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Bei der „passiven“ Immunisierung werden *in vitro* voraktivierte enzephalitogene T-Zellen in die Versuchstiere transferiert. Mit beiden Verfahren wird eine gegen die Myelinscheide gerichtete, T-Zellen vermittelte Entzündung im ZNS verursacht (Baxter, 2007; Gold et al., 2000). In Abhängigkeit von Tierspezies (Tierstamm), Myelinantigen und Induktionsverfahren variiert das EAE-Modell in der Histologie und im klinischen Verlauf. Obwohl die EAE der MS nicht in jeder Hinsicht ähnelt, ermöglichen gezielte Modifizierungen des EAE-Modells die Untersuchungen einzelner Phasen der MS, in denen unterschiedliche Immunprozesse dominieren (Furlan et al., 2009; Hart et al., 2011).

In der Regel wird zwischen akuter, hyperakuter und chronisch-relapsierender EAE unterschieden (Owens, 2006; Pender and McCombe, 1995). Die akute EAE ist durch einen mo-

nophasischen Krankheitsverlauf charakterisiert (Abbildung 1.3 A), dem für gewöhnlich eine spontane Erholung folgt. Auf histologischer Ebene sind, wie in der Frühphase der MS, primär Entzündungsprozesse im gesamten ZNS, aber auch im peripheren Nervensystem (PNS) zu finden. Der Grad und die Lokalisation der Demyelinisierung variiert in Abhängigkeit vom verwendeten Tierstamm, dem Myelinantigen und den genutzten Adjuvanzen (Floris et al., 2002; Pender and McCombe, 1995). Die hyperakute EAE zeichnet sich gegenüber der akuten EAE durch eine kürzere Latenzzeit, einen schnelleren progressiven Verlauf und eine höhere Sterblichkeitsrate aus (Abbildung 1.3 B). Histologisch sind ausgeprägte Läsionen mit starker Demyelinisierung im ZNS und im PNS zu finden. Damit simuliert die hyperakute EAE die Spitze eines möglichen Schubes bei MS (Floris et al., 2002; Pender and McCombe, 1995). Die größte Ähnlichkeit zur MS zeigt die chronisch-relapsierende EAE. Sie ist charakterisiert durch wiederkehrende klinische Anfälle, denen Perioden mit partieller oder kompletter Genesung folgen. Histologisch sind hier sowohl alte als auch neue sowie de- und remyelinisierte Läsionen im gesamten ZNS und PNS zu finden (Jee et al., 2002; Quinn et al., 2011).

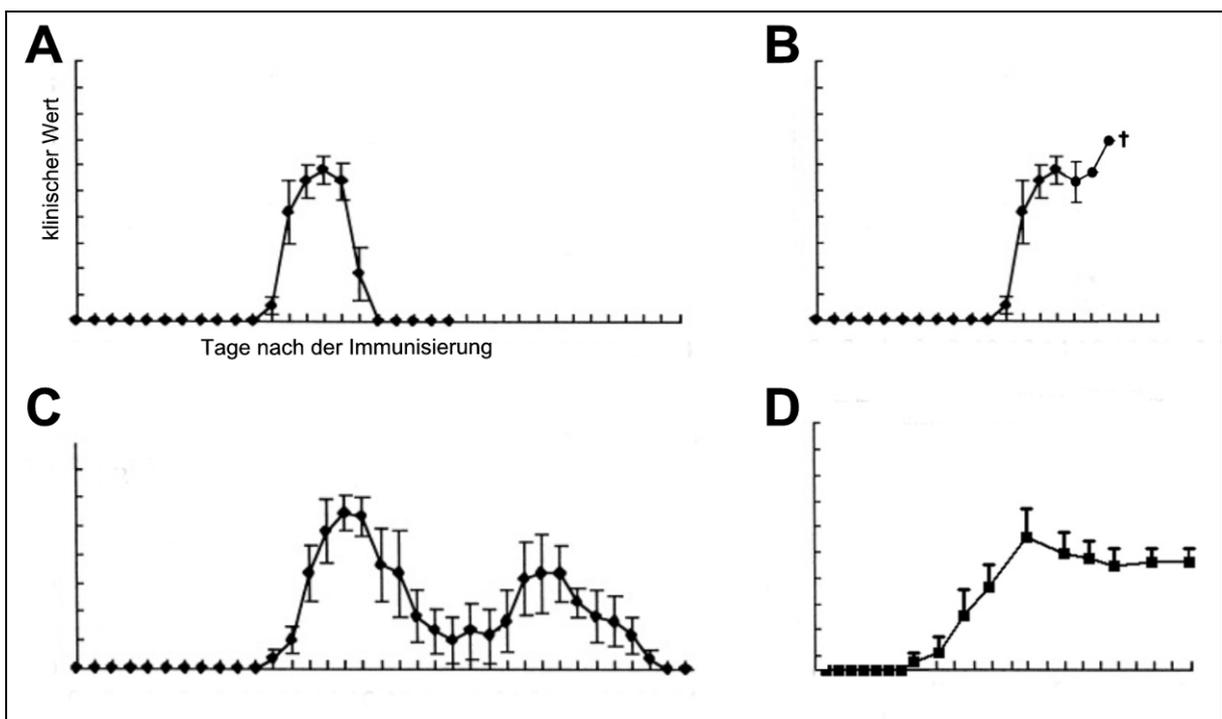


Abbildung 1.3: Klinischer Verlauf verschiedener EAE-Modelle. (A) Die akute EAE ist durch einen monophasischen Verlauf charakterisiert, dem eine spontane Erholung folgt (Jee et al., 2002). (B) Die hyperakute EAE ist durch einen schnellen progressiven Verlauf mit hoher Sterblichkeitsrate (†) charakterisiert (Ahn et al., 2001). (C) Die chronisch-relapsierende EAE ist durch wiederkehrende klinische Anfälle, denen Perioden mit partieller oder kompletter Genesung folgen charakterisiert (Jee et al., 2002). (D) Die chronische EAE ähnelt der hyperakuten EAE, ist aber durch einen schwächeren progressiven Verlauf charakterisiert. Darüber hinaus folgt den klinischen Anfällen keine Genesung (Quinn et al., 2011).

1.4. Allgemeines Modell der Immunpathogenese bei MS und EAE

Obwohl die Immunpathogenese bei MS nicht endgültig geklärt ist, wird weitestgehend akzeptiert, dass die Pathophysiologie in bestimmten Schritten verläuft, zwischen denen es fließende Übergänge und gegenseitige Interaktionen zu geben scheint (Gold et al., 2000; Kroner-Milsch et al., 2012). Während besonders in der Frühphase der MS Autoimmunprozesse zu beobachten sind, spielen im weiteren Verlauf auch neurodegenerative Mechanismen eine wichtige Rolle (Korn, 2008; van Waesberghe et al., 1999). Das derzeitige Wissen über die Immunpathogenese der MS resultiert sowohl aus Untersuchungen am Menschen als auch aus Untersuchungen an verschiedenen EAE-Modellen (Abbildung 1.4).

Im Thymus eines jeden Menschen kommt es aufgrund von Selektionsfehlern zur Bildung naiver autoreaktiver T-Zellen, die im weiteren Verlauf in die Peripherie (Blut, Lymphknoten) gelangen. Bei gesunden Menschen werden die naiven autoreaktiven T-Zellen durch regulatorische Mechanismen (Deletion, Anergie, Suppression) der peripheren Immuntoleranz eliminiert (Haas et al., 2005; Matarese et al., 2005). Bei Menschen mit MS bricht die periphere Immuntoleranz aus noch ungeklärten Gründen zusammen und es kommt zu einer Autoimmunreaktion (Goebels et al., 2000).

Zu Beginn der Autoimmunreaktion werden den naiven autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie körpereigene (Auto-) Antigene (Ag) durch so genannte antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie z.B. Makrophagen, Knochenmarkszellen (B-Zellen) oder dendritische Zellen präsentiert (Gerritse et al., 1996; Lovett-Racke et al., 1998). Im EAE-Modell wird ein ähnlicher Verlauf durch die Injektion der Myelinbestandteile (z.B. MBP, MOG, PLP) hervorgerufen. Die Myelinbestandteile werden in der Peripherie primär von dendritischen Zellen endozytotisch aufgenommen und als Antigen autoreaktiven myelinspezifischen T-Zellen (CD4⁺) präsentiert. Im weiteren Verlauf beider Erkrankungen bindet das spezifische Autoantigen bei gleichzeitigem Vorhandensein kostimulatorischer Mediatoren (B₇, CD₂₈ etc.) nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an den T-Zell-Rezeptor (TZR) (Gerritse et al., 1996; Lovett-Racke et al., 1998). Die Kombination von Antigen und kostimulatorischem Signal veranlasst die naiven autoreaktiven T-Zellen, Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) zu exprimieren. Diese Zytokine induzieren die Proliferation der naiven autoreaktiven T-Zellen sowie die Differenzierung ihrer Nachkommen zu T-Effektorzellen. Während im EAE-Modell die injizierten Myelinbestandteile als initiale Auslöser für die Aktivierung der T-Zellen identifizierbar sind, konnten bei der MS bisher noch keine Auslöser gefunden werden. Dennoch werden u.a. die molekulare Mimikry zwischen Selbst- und Fremdproteinen (z.B. virale Proteine) (Sospedra and Martin, 2006), eine vermehrte Synthese sogenannter Neo-Epitope und chronische Entzündungsprozesse als mögliche Ursache diskutiert (Hardt et al., 2002).

Nach der Differenzierung exprimieren die aktivierten T-Effektorzellen verstärkt zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAMs) und verschiedene Arten von Zytokinen (ILs, Interferone (IFNs) oder

Tumornekrosefaktoren (TNFs)) (Butcher and Picker, 1996; Harris et al., 1991). Im Rahmen der transendothelialen Migration, die durch ein Zusammenspiel zellulärer (CAMs) und interzellulärer (ICAMs) Adhäsionsmoleküle (Harris et al., 1991), Chemokine (Engelhardt and Ransohoff, 2005) und Zytokine sowie Matrix-Metallproteinasen (MMPs) (Cossins et al., 1997) reguliert wird, gelingt es einigen T1-Effektorzellen, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden.

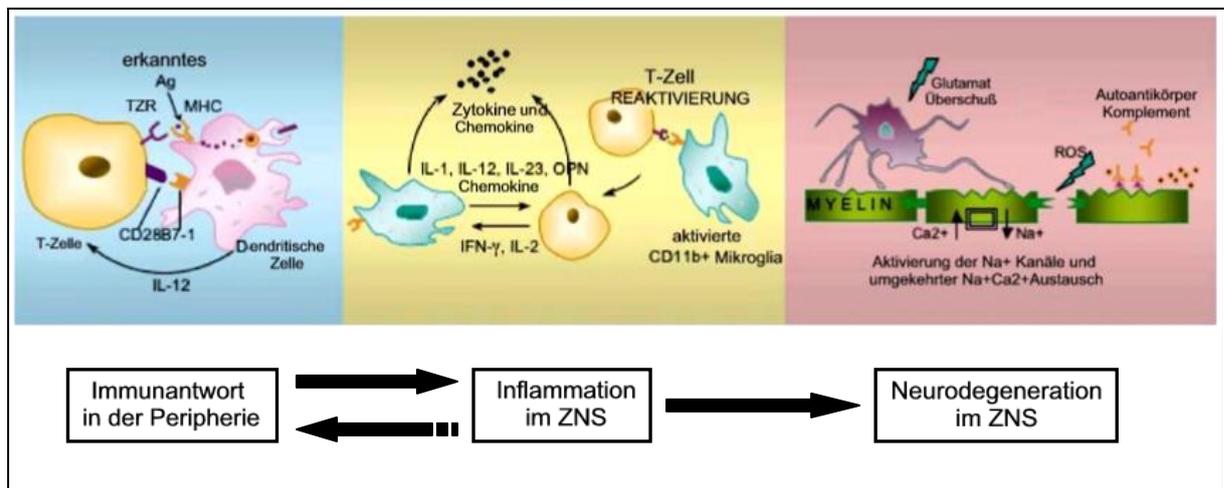


Abbildung 1.4: Traditionelles Modell der Pathogenese der MS. Immunantwort in der Peripherie: Autoreaktive T-Zellen in der Peripherie erkennen ihr spezifisches Antigen (Ag), welches von APZs wie dendritischen Zellen über den MHC angeboten wird. Dies bedarf der Interaktion mit TZR und dem Vorhandensein kostimulatorischer Signale (CD28, B7). Die aktivierten T-Zellen überwinden die BHS und infiltrieren das ZNS. **Inflammation im ZNS:** Im ZNS werden die T-Zellen reaktiviert und stimulieren Mikrogliazellen und Makrophagen. Resultat ist eine gesteigerte Phagozytose und vermehrte Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Die Freisetzung der Zytokine verstärkt die Immunreaktion und führt zur Rekrutierung weiterer Monozyten aus der Peripherie. **Neurodegeneration im ZNS:** Die gesteigerte Phagozytose und Freisetzung von Zytokinen führen letztlich zur Demyelinisierung und zu axonalen Schäden. Von B-Zellen produzierte Autoantikörper tragen ebenfalls zur Gewebeerstörung bei und aktivieren eine Komplementkaskade, was die Bildung des sogenannten Membran-Angriffs-Komplexes zur Folge hat. Die Hochregulation von Na⁺ und Ca²⁺-Kanälen auf Axonen fördern ebenfalls die axonale Degeneration (modifiziert nach Hauser and Oksenberg, 2006).

Innerhalb des ZNS werden die T-Effektorzellen durch ortsständige APZ, wie z.B. Makrophagen, perivaskuläre dendritische Zellen und v.a. Mikrogliazellen (Aloisi et al., 2000), aber auch Neuronen und Oligodendrozyten reaktiviert (Hoftberger et al., 2004). Die Reaktivierung induziert in T-Effektorzellen die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-2, TNF- α , IFN- γ) und Chemokine (Hartung et al., 1988). Die Sekretion dieser proinflammatorischen Mediatoren hat sowohl eine weitere (zytokinvermittelte) Schädigung der BHS als auch einen (chemokinvermittelten) sekundären Einstrom weiterer unspezifischer Effektorzellen (T-, B-Zellen, Makrophagen) zur Folge. Darüber hinaus steigert die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren die phagozytischen Aktivitäten der Effektorzellen und stimuliert sowohl Makrophagen als auch Mikrogliazellen zur Freisetzung proinflammatorischer und gewebesetzender Mediatoren (NO, IFN- γ). Als Folge der Sekretion und Rekrutierung weiterer aktivierter Effektorzel-

len kommt es zu mehr oder weniger ausgeprägten Demyelinisierungen sowie der Zerstörung von Oligodendrozyten und Neuronen (Brück, 2002; Kroner-Milsch et al., 2012).

Die zellulären und molekularen Vorgänge der Entzündungsreaktion werden durch die Verschiebung des Gleichgewichts vom pro- zum antiinflammatorischen Milieu abgeschwächt und terminiert. Bei einer Abschwächung werden von T-Effektorzellen ($CD4^+$) antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-5 etc.) sezerniert (Cannella and Raine, 1995; Ozenci et al., 2000). Das antiinflammatorische Milieu regt B-Zellen an, Gewebeschäden behebende Antikörper zu produzieren und hemmt die Aktivitäten der T-Effektorzellen und Makrophagen (Apoptose). Mit dem Abklingen der Entzündung beginnen gleichzeitig Reparaturvorgänge wie z.B. (partielle) Remyelinisierung, Restitution der BHS und Gliose (Hoftberger et al., 2004; Kroner-Milsch et al., 2012).

1.5. Histopathologie der Läsionen bei MS und EAE

Pathologisch kennzeichnend für die MS ist die Entstehung multifokaler, scharf begrenzter Entmarkungsherde im ZNS, die auch als Läsionen oder Plaques bezeichnet werden (Brück, 2002; Hickey, 1999). Die Läsionen treten meist periventrikulär, im optischen Nerv, im *Truncus cerebri*, im *Cerebellum* und in der *Medulla spinalis* auf (Brück, 2002).

Bei der EAE ist die Verteilung der Läsionen vom induzierten Modell (akut, hyperakut oder chronisch-relapsierend) und der verwendeten Tierspezies abhängig. So sind Läsionen im akuten EAE-Modell der Ratte meist in der *Medulla spinalis* und im *Truncus cerebri* zu finden (Pender and Sears, 1984; Pender and Sears, 1986). Im akuten EAE-Modell des Affen sind die Läsionen dagegen überwiegend im *Cerebrum*, im *Truncus cerebri*, im *Cerebellum* und im optischen Nerv zu finden (Hayreh et al., 1981). Im chronisch-relapsierenden EAE-Modell der Ratte sind zusätzlich auch Läsionen im *Cerebellum* zu finden (Pender, 1989).

Histopathologisch sind sowohl bei MS als auch EAE aktive von inaktiven Läsionen differenzierbar (Lassmann et al., 1997). Chronisch inaktive Läsionen treten häufig bei MS-Patienten mit einer langen Krankheitsdauer auf. Charakteristisch für diese Läsionen sind: (1) Eine scharfe Abgrenzung zur umgebenden *Substantia alba*. (2) Ein meist vollständiger Myelinverlust. (3) Ein variables Ausmaß an Axonverlust und Faser gliose. (4) Nur vereinzelt nachweisbare T-, B- und (inaktive) Mikrogliazellen. (5) Eine ausgeprägte fibrilläre Gliose. (6) Eine stark reduzierte Anzahl an Oligodendrozyten (Brück, 2002; Kroner-Milsch et al., 2012).

Aktive Läsionen sind durch myelinspezifische Abbauprodukte (MBP, MOG, PLP, MAG, CNP) in den zahlreich vorhandenen Makrophagen charakterisiert (Brück, 2002). Neben Makrophagen sind in aktiven Läsionen T-Zellen zahlenmäßig am stärksten vertreten. In geringer Menge sind aktivierte Mikrogliazellen, B-Zellen und nukleophile Granulozyten ebenfalls nachweisbar (Lucchinetti et al., 2000).

Obwohl die Entzündungsreaktion in allen aktiven Läsionen primär durch Makrophagen und T-Zellen geprägt ist, existiert eine Heterogenität in den Mustern der Demyelinisierung. Somit sind vier verschiedenen Muster der Demyelinisierung (Läsionsmuster) voneinander zu unterscheiden: (1) Deutlich abgrenzbare Läsionen, in denen Makrophagen und T-Zellen dominieren und die kleine Venen umgeben. Myelinspezifische Abbauprodukte (MBP, MOG, etc.) liegen nur wenig vor. Die T-Zellen sind in engem Kontakt mit Oligodendrozyten. (2) Deutlich abgrenzbare Läsionen, in denen Makrophagen und T-Zellen dominieren und die kleine Venen umgeben. Die phagozytierten Myelinpartikel weisen Antikörper- und Komplementablagerungen auf. (3) Häufig unscharf begrenzte Läsionen in denen Makrophagen, T-Zellen und aktivierte Mikrogliazellen dominieren. Apoptose von Oligodendrozyten und ein überproportionaler Verlust an MAG im Vergleich zu anderen Myelinproteinen. (4) Häufig unscharf begrenzte Läsionen, in denen Makrophagen und T-Zellen dominieren. In der unauffälligen Region um die Läsion herum ist ein nichtapoptotischer Untergang der Oligodendrozyten nachweisbar. In der aktiven Region kommt es zum Verlust aller Myelinproteine (Lucchinetti et al., 2000).

Im EAE-Modell können ähnliche Läsionsmuster und -typen gezielt induziert werden. Dabei bestimmen die Faktoren: Tierspezies, Neuroantigen und Adjuvans, an welcher EAE die Tiere erkranken und welche Läsionsmuster oder -typen dominant auftreten. Ähnlich den aktiven MS-Läsionen ist in EAE-Läsionen ein prädominanter Anteil an Monozyten, wie Makrophagen und T-Zellen, nachweisbar. Darüber hinaus können in den EAE-Läsionen auch vereinzelt polymorphnukleare Zellen auftreten (Pender, 1986; Pender et al., 1990; Ravkina et al., 1979).

Die verschiedenen Läsionsmuster, die bei MS oft innerhalb eines einzelnen Patienten nachweisbar sind, können mit Hilfe der EAE-Modelle differenziert untersucht werden. Im akuten EAE-Modell von Ratten sind sowohl Läsionen ohne Demyelinisierung (ähnlich Läsionsmuster 1 und 2) als auch Läsionen mit ausgeprägter Demyelinisierung (ähnlich Läsionsmuster 3 und 4) (Pender, 1986; Pender, 1987) vorhanden. Der Grad der Demyelinisierung kann durch die Injektion monoklonaler Antikörper gegen MOG sogar noch gesteigert werden (Schluesener et al., 1988). Im hyperakuten EAE-Modell von Ratten zeichnen sich die stark ausgeprägten Läsionen durch eine fehlende Demyelinisierung aus. Letzteres kann jedoch, wie beim akuten EAE-Modell, durch die Injektion monoklonaler Antikörper gegen MOG induziert werden (Lington et al., 1993). Im chronisch-relapsierenden EAE-Modell von Ratten sind während des ersten Schubes Läsionen mit starker Entmarkung nachweisbar (Pender et al., 1990).

1.6. Magnetresonanztomographie bei der Erforschung der MS

Aufgrund der Heterogenität der Symptome erfolgt die Diagnose der MS heutzutage nach den sogenannten McDonald-Kriterien. Die McDonald-Kriterien berücksichtigen neben klinischen, paraklinischen, elektrophysiologischen (Halliday et al., 1972) und Liquorbefunden (Davidson et al., 1977) insbesondere die bildgebenden Befunde der Magnetresonanztomographie (MRT) (Freitag et al., 2000). Die MRT bietet die Möglichkeit als sensitive Methode ohne Applikation von Röntgenstrahlen verschiedene Gewebe des Körpers darzustellen. Somit ermöglicht sie u.a. den Nachweis einer räumlichen und zeitlichen Streuung von Läsionen im ZNS von MS-Patienten (Heun et al., 1988).

1.6.1. Physikalische Grundlagen der MRT

Die physikalische Grundlage der MRT bildet die sogenannte Kernspinresonanz, die in festen, flüssigen oder gasförmigen Proben in einem statischen Magnetfeld angeregt werden kann. Dieser Effekt basiert darauf, dass Atomkerne mit einer ungeraden Nukleonenzahl einen Drehimpuls, den sogenannten Kernspin, aufweisen. Der Kernspin ist eine rotierende elektrische Ladung, die ein magnetisches Moment erzeugt und somit für die Magnetisierung des Atomkerns verantwortlich ist. Sind die Kernspins einem angelegten Magnetfeld ausgesetzt, richten sie sich in einer Kreiselbewegung (Präzessionsbewegung) entlang dieses Feldes aus (Sailer, 2002; Stichnoth, 1992). Nach Abschaltung des angelegten Magnetfeldes fallen die Kernspins wieder in ihre Ausgangsposition zurück. Dieser Vorgang wird als Relaxation bezeichnet. Die während der Relaxation vorhandenen sehr schwachen elektromagnetischen Signale, können mit Empfängerspulen gemessen werden. Diese elektromagnetischen Signale enthalten Frequenz- und Phaseninformationen, die nach repetitiven Messungen und unter Verwendung einer mathematischen Transformation (Fourier-Transformation) als MRT-Bild visualisiert werden (Sailer, 2002).

Obwohl zwei Drittel der in der Natur vorkommenden Atomkerne einen Kernspin besitzen werden vorrangig Wasserstoffkerne für die Bildgebung mittels MRT genutzt. Wasserstoff ist das häufigste Element im menschlichen Körper und hat aufgrund seines großen magnetischen Momentes für die Magnetresonanz die empfindlichsten Atomkerne. Bei der MRT werden Hochfrequenzpulse (HF-Pulse) verwendet, die auf Wasserstoffkerne ausgerichtet sind und über deren spezifische Resonanzfrequenz (Larmor-Frequenz) entsprechen.

Der Prozess der Relaxation wird durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert, die als Relaxationszeiten bezeichnet werden. Unterschieden wird zwischen der T_1 -Relaxationszeit und der T_2 -Relaxationszeit (Sailer, 2002). Die T_1 -Relaxationszeit beschreibt die Rückkehr der ausgerichteten Kernspins im angelegten Magnetfeld und damit den Aufbau der longitudinalen Magnetisierung nach einem HF-Puls. Aufgrund des dabei stattfindenden Energieaustausches vom angeregten Kernspin an das umliegende Gewebe (Gitter) spricht man auch von der

Spin-Gitter-Relaxation. Die T_2 -Relaxationszeit ist kürzer als die T_1 -Relaxationszeit und beschreibt den Zerfall der transversalen Magnetisierung in Folge einer Interaktion zwischen Magnetfeldern benachbarter Atomkerne. Basierend auf den gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen den abgelenkten Kernspins spricht man auch von einer Spin-Spin-Relaxation (Hendrix and Krempe, 2003). Zusätzlich zur Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxation tritt bei sogenannten Gradientenechos (GREs) ein T_2^* -Relaxationsvorgang auf. Mathematisch wird dieser durch die T_2^* -Relaxationszeit definiert und beschreibt eine zusätzliche Dephasierung durch zeitlich unveränderliche Inhomogenitäten des angelegten Magnetfeldes und des untersuchten Gewebes (Stichnoth, 1992).

1.6.2. Visualisierung der MS-Läsionen mit konventionellen MRT-Verfahren

Je nach eingestrahlter HF-Puls-Sequenz (Pulssequenz) sowie der Zeitspanne zwischen einem HF-Puls und dem auftretenden Echo (Echozeit, TE) resultieren unterschiedlich gewichtete MRT-Aufnahmen mit unterschiedlich kontrastierter Darstellung von Gewebestrukturen. In der Routinediagnostik werden vorwiegend T_1 - und T_2 -gewichtete MRT-Verfahren verwendet, um die Vielzahl der pathologischer Prozesse im Gehirn von MS-Patienten darzustellen (van Waesberghe et al., 1998; van Walderveen et al., 1998).

Bei der T_2 -Wichtung werden lange TE gewählt, da mit steigender TE mehr Spins dephasieren (stärkerer Signalverlust). Flüssigkeiten und entzündetes Gewebe besitzen eine lange T_2 -Relaxationszeit und verlieren bei langer TE langsamer an Signal als Gewebe mit kurzer T_2 -Relaxationszeit. Als Konsequenz erscheinen Flüssigkeiten und entzündetes Gewebe in den MRT-Aufnahmen hell (hyperintens). Um einen möglichen gegenläufigen Einfluss von T_1 zu vermeiden, wird die Zeit zwischen den eingesandten HF-Pulsen (Repetitionszeit, TR) so groß gewählt, dass die Spin-Gitter-Relaxation zum Aufnahmezeitpunkt bereits weitgehend erfolgt ist (Stichnoth, 1992). Eine typische MS-Läsion hat eine ovale bis runde Form und zeigt in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen eine Hyperintensität (Abbildung 1.5). Aufgrund eines relativ homogenen Signalverhaltens der Läsionen ist eine Unterscheidung zwischen akuten oder chronischen Läsionen sehr schwierig. Hyperintense akute Läsionen können von einem weniger hyperintensiven Ring umrandet werden. Pathologisch setzt sich dieser Ring aus eingewanderten Entzündungszellen zusammen und kann somit auf die Entstehung eines Ödems in Folge einer BHS-Schädigung (van Waesberghe et al., 1997), eine Demyelinisierung, Axonverlust und Gliose hindeuten (Katz et al., 1993). Eine genaue Differenzierung dieser pathologischen Prozesse ist mit der T_2 -gewichteten Bildgebung nicht möglich (Katz et al., 1993). Inhomogene Signalintensitäten und unregelmäßige Erscheinungsbilder der Läsionen sind auf Überlappungen mehrerer Läsionen zurückzuführen (Sailer, 2002).

Bei der T_1 -Wichtung wird die TR soweit verkürzt, dass zwischen den HF-Pulsen die Spin-Gitter-Relaxation noch nicht abgeschlossen ist. Dadurch besitzen Gewebe mit einer kurzen T_1 -Relaxationszeit eine höhere Signalintensität und erscheinen im MRT-Bild hyperintens.

Flüssigkeiten oder entzündete Gewebe mit einer langen T_1 -Relaxationszeit erscheinen dunkel (hypointens). Um einen möglichen gegenläufigen Einfluss von T_2 zu vermeiden, wird die TE so kurz wie möglich gewählt (Stichnoth, 1992). Bis zu 30% der in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen hyperintensen Läsionen werden in T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen hypointens dargestellt (Abbildung 1.5). Eine Differenzierung in akute oder chronische Läsion ist auch hier schwierig. Hypointense akute Läsionen haben als pathologisches Substrat ein ausgeprägtes Ödem und können sich zum Teil ohne strukturelle Veränderungen zurückbilden. Hypointense chronische Läsionen, auch bezeichnet als „*black holes*“, haben ein sehr heterogenes pathologisches Substrat, was auf Demyelinisierung, Axonverlust und/oder Gliose hindeutet. Weniger stark hypointens erscheinende chronische Läsionen sind neuropathologisch auf eine Remyelinisierung zurückzuführen und werden als Markschattenherde („*shadow plaques*“) bezeichnet (Lassmann et al., 1997).

1.6.3. Kontrastmittel zur Visualisierung von MS-Läsionen

Obwohl mit der MRT viele anatomische Strukturen und auch Läsionen gut darstellbar sind, ist die Differenzierung und damit die Sensitivität und Spezifität der MRT durch den Einsatz von Kontrastmitteln zu verbessern (Stichnoth, 1992). Als Kontrastmittel werden sowohl paramagnetische als auch superparamagnetische Substanzen verwendet. Beide Substanzgruppen sind in der Lage, die Relaxationszeiten der darzustellenden anatomischen Strukturen zu verändern, woraus eine Kontrastanhebung in der MRT-Aufnahme resultiert (Dousset et al., 1999a).

In der MS-Diagnostik werden vorrangig paramagnetische Gadolinium (Gd)-haltige Kontrastmittel verwendet. Diese unspezifischen Substanzen verteilen sich nach einer intravenösen (i.v.) Injektion nahezu im gesamten Extrazellulärraum und werden nach kurzer Zeit renal ausgeschieden. Bei einer BHS-Schädigung, z.B. während der MS oder EAE treten Gd-haltige Kontrastmittel aus den Gefäßen aus und reichern sich im ZNS u.a. in aktiven Läsionen an (Dousset et al., 1999a; Miller et al., 1988). Die Anreicherung des paramagnetischen Kontrastmittels resultiert in einer Verkürzung der T_1 - und der T_2 -Relaxationszeiten. In T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen sind diese Anreicherungen anschließend als ausgeprägtes hyperintenses Signal zu erkennen. Somit ermöglicht die MRT mit paramagnetischen Kontrastmitteln sowohl den Nachweis einer BHS-Schädigung (Dousset et al., 1999a; Miller et al., 1988) als auch den Alter und neuer Läsionen (Dinger and Niendorf, 1992; Karlik et al., 1993). Neben den paramagnetischen Substanzen werden immer häufiger superparamagnetische Eisenoxidpartikel („*superparamagnetic iron oxid particle*“, SPIO) als Kontrastmittel verwendet. Innerhalb der Substanzgruppe der SPIOs wird hinsichtlich der Größe und Struktur noch einmal zwischen Standard SPIOs (SSPIOs; \varnothing 50-150 nm), ultrakleinen SPIOs (USPIOs; \varnothing etwa 20 nm) und sehr kleinen SPIOs („*very small superparamagnetic iron oxid particle*“, VSOP; \varnothing 4-10 nm) unterschieden (Taupitz et al., 2003). Nach der i.v. Injektion werden die

SPIOs in der Peripherie v.a. durch Zellen des mononukleären Systems (MPS) (z.B. Makrophagen) aufgenommen. Unter inflammatorischen Bedingungen reichern sich diese Zellen und somit das superparamagnetische Kontrastmittel in den Läsionen an (Tysiak et al., 2009). Ähnlich den paramagnetischen Substanzen verkürzen auch superparamagnetische Substanzen nach der i.v. Injektion die T_1 - und die T_2 -Relaxationszeit ihres umgebenden Gewebes. Aufgrund ihres höheren magnetischen Moments ist der verkürzende Effekt superparamagnetischer Substanzen stärker als bei paramagnetischen Substanzen. In T_1 - und T_2 -gewichteten Aufnahmen sind Anreicherungen superparamagnetischer Kontrastmittel dann als hypointenses Signal zu erkennen. Abgebaut werden die VSOPs über das MPS (Schnorr et al., 2006; Tysiak et al., 2009).

1.6.4. Visualisierung der MS-Läsionen mit quantitativen MRT-Verfahren

Obwohl MS-Läsionen mit konventionellen MRT-Verfahren pathologisch-anatomisch differenziert werden können, lässt sich ihr neuropathologisch und immunologisch heterogenes Bild durch diese Verfahren nicht ausreichend beschreiben. Der Einsatz quantitativer Methoden wie der Magnetisierungstransfer (MT)-Bildgebung und der relativ neuen Phasenbildgebung (Phasenkontrast-Bildgebung) zielt darauf ab, *in vivo* Aussagen über strukturelle Gewebeveränderungen oder funktionelle Zustände des Nervengewebes zu machen.

Die MT-Bildgebung ist ein spezielles MRT-Verfahren, mit dem selektiv das Magnetresonanz (MR)-Signal der an Makromoleküle (z.B. Proteine) gebundenen Wasserstoffatome unterdrückt wird (Hahnel et al., 1998; Hahnel et al., 2004). Die Makromolekül-gebundenen Wasserstoffatome sind in ihrer Beweglichkeit sehr stark eingeschränkt und mit konventionellen MRT-Verfahren nicht darzustellen. Bei konventionellen MRT-Verfahren leisten nur frei bewegliche Wasserstoffatome (in Wassermolekülen) einen direkten Beitrag zum MR-Signal. Makromolekül-gebundene Wasserstoffatome leisten keinen direkten Beitrag zum MR-Signal, beeinflussen jedoch das Relaxationsverhalten der frei beweglichen Wasserstoffatome, mit denen sie über Kreuzrelaxation und chemischen Protonenaustausch in Kontakt stehen. Diese Wechselwirkung bewirkt einen Magnetisierungstransfer, der indirekt die Signalamplitude der frei beweglichen Wasserstoffatome und somit den Bildkontrast beeinflussen kann. Durch die Einstrahlung eines vorgeschalteten HF-Pulses außerhalb der Larmor-Frequenz der frei beweglichen Wasserstoffatome (Sättigungspuls) lässt sich das Spinsystem der Makromoleküle selektiv sättigen. Über Wechselwirkungen wird die Sättigung partiell auf die frei beweglichen Wasserstoffatome übertragen und bewirkt dort eine Signalreduktion. Der daraus resultierende Kontrast wird als MT-Kontrast („*Magnetisation-transfer-contrast*“, MTC) bezeichnet (Wolff and Balaban, 1994). Die Quantifizierung des MTC erfolgt in Form des MT-Verhältnisses („*Magnetisation-transfer-ratio*“, MTR) mit $MTR = (SI_0 - SI_{MT}) \times 100\% / SI_0$, wobei SI_0 die Intensität des MR-Signals ohne und SI_{MT} die Intensität des MR-Signals mit vorge-

schaltetem Sättigungspuls ist (Rausch et al., 2003). Die MTR kann grauwertkodiert auf einer MTR-Karte dargestellt werden (Hahnel et al., 2004).

Humanstudien zeigen, dass Läsionen, die auf T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen nicht oder erst zu einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium nachweisbar sind, anhand veränderter MTR nachweisbar sind (Loevner et al., 1995). Darüber hinaus korrelieren sehr niedrige MTR mit histopathologischen Veränderungen wie Myelindestruktion und Axonverlust (Dousset et al., 1999a; Dousset et al., 1992). Aufgrund der individuellen Beschaffenheit oder Entwicklungsstufe jeder einzelnen Läsion existiert hinsichtlich der MTR eine beträchtliche Heterogenität (Hiehle et al., 1995).

1.6.5. Phasenbildgebung

Das Ziel der MRT-Bildgebung ist es, Gewebeaufnahmen mit hohem intrinsisch anatomischen Kontrast zu erstellen (Wolansky et al., 1999). Voraussetzung dafür ist das MR-Signal, das u.a. von der makroskopischen und mikroskopischen Suszeptibilität des Gewebes, der Spindichte sowie den Phasen der Spins und deren Verschiebung (Phaseninformationen) beeinflusst wird (Abduljalil et al., 2003). Obwohl an der Erzeugung des MR-Signals beteiligt, spielen die Phaseninformationen bei der Generierung von konventionellen MRT-Aufnahmen (T_1 , T_2) eine eher untergeordnete Rolle (Schafer et al., 2009; Zhong et al., 2008).

Im Gegensatz dazu werden in der Phasenbildgebung (PI) zur Generierung entsprechender MRT-Aufnahmen ausschließlich Phaseninformationen berücksichtigt. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass die Phasenverschiebung makroskopisch mobiler Spins bei einem konstanten Magnetfeldgradienten linear ansteigt. Die MRT-Aufnahmen der Phasenbildgebung werden auf Basis T_2^* -gewichteter GRE-Sequenzen generiert und anschließend unter Verwendung von Hoch-Pass-Filtern weiterverarbeitet. Der Hoch-Pass-Filter dient dem Entfernen großflächiger Phasenverschiebungen, die breit gefächerten Inhomogenitäten des angelegten Magnetfeldes zugeschrieben werden (He and Yablonskiy, 2009; Marques et al., 2009).

Nach derzeitigem Wissen sind zwei wesentliche Mechanismen an der Entstehung des *in vivo* Phasenkontrast beteiligt: die magnetische Suszeptibilität (Duyn et al., 2007) und der Wasser-Makromolekül-Austausch (WMA) (Zhong et al., 2008). Der Beitrag der magnetischen Suszeptibilität zum Phasenkontrast ist von der Struktur der Gewebe auf zellulärer und subzellulärer Ebene abhängig. Die wichtigsten Struktur-Komponenten stellen dabei Proteine, Lipide, Nonhäm-Eisen und Desoxyhämoglobin dar. Diese Komponenten fungieren als magnetische Suszeptibilitäts-Einlagerungen und erschaffen auf diese Art und Weise mesoskopische, gewebespezifische, inhomogene Magnetfelder, die die MRT-Frequenzen der in ihrer Umgebung befindlichen Wassermoleküle (und/oder andere Atomkerne) beeinflussen. Die Gesamtheit der magnetischen Suszeptibilität eines Gewebes hängt weniger von der Menge der Struktur-Komponenten ab als vielmehr von deren räumlicher Verteilung auf subzellulärer Ebene und deren zelluläre Gesamtverteilung im ZNS. Eine Zerstörung der Gewebe-Struktur

bei Erkrankungen wie MS hat dementsprechend auch Veränderungen der magnetischen Suszeptibilität bzw. dem Phasenkontrast zur Folge (Hammond et al., 2008).

Im Modell des WMA wird angenommen, dass die innerhalb der Zellkompartimente vorliegenden mobilen Makromoleküle einen entscheidenden Beitrag zum Phasenkontrast leisten. Studien zeigen, dass die für den Phasenkontrast verantwortlichen Frequenzverschiebungen u.a. auf sehr schnelle (etwa 10^{-10} s) mikroskopische Austauschprozesse zwischen frei beweglichen und Makromolekül-gebundenen Wasserstoffatomen zurückzuführen sind (Zhong et al., 2008; Zhong et al., 2009). Da die Austauschrate nicht limitiert ist (Koenig and Brown, 1993), hängt die Frequenzverschiebung der frei beweglichen Wasserstoffatome v.a. von der Konzentration der Makromoleküle im Gewebe sowie deren Struktur ab (Zhong et al., 2008; Zhong et al., 2009). Somit könnten Veränderungen in der Makromolekularzusammensetzung, wie sie z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie MS oder Alzheimer auftreten, mit Hilfe der nicht-invasiven Bildgebung untersucht werden. Allerdings stellt die hohe Komplexität der im Gewebe vorkommenden Makromoleküle ein schwieriges Problem dar (Gallier et al., 1987; Zhong et al., 2009).

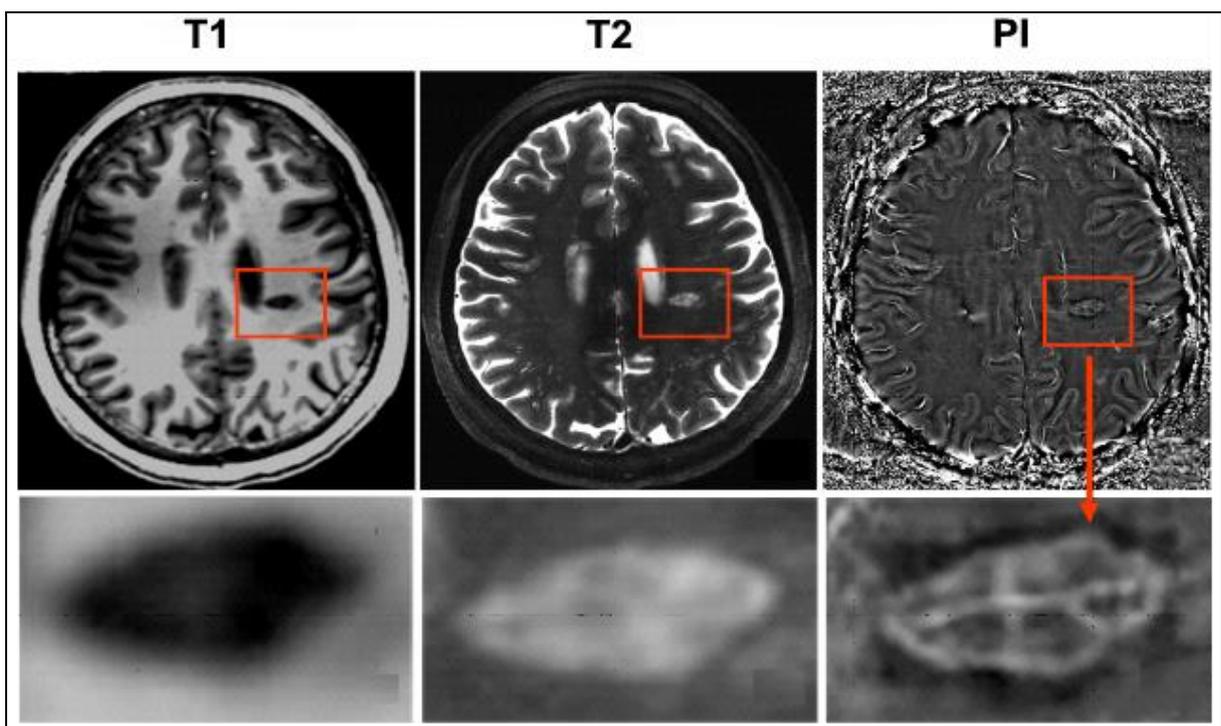


Abbildung 1.5: Visualisierung einer MS-Läsion mit Hilfe konventioneller MRT-Verfahren und der Phasenbildgebung. Die MRT-Aufnahmen entstanden an einem 7 Tesla Humanscanner nach der i.v. Injektion eines Gd-haltigen Kontrastmittels. Die in T_1 - und T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen homogen erscheinende MS-Läsion ist im korrespondierenden Phasenbild (PI) eine heterogen strukturiert. Es wird angenommen, dass die heterogene Struktur ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Läsion widerspiegelt. Beeinflusst wird das Erscheinungsbild u.a. durch die Anzahl der Makromoleküle und / oder den Eisengehalt in der Läsion. Diese beiden Faktoren haben einen wesentlichen Einfluss auf den Phasenkontrast (Matzke et al., 2010).

Obwohl noch nicht alle grundlegenden Mechanismen zur Entstehung des Phasenkontrasts aufgedeckt wurden, stellt die Phasenbildgebung ein viel versprechendes MRT-Verfahren zur Charakterisierung struktureller Veränderungen im ZNS (Zhong et al., 2011; Zhong et al., 2008) sowie neurodegenerativer Erkrankungen wie MS dar (Matzke et al., 2010; Ovtcharov et al., 2011). Tierexperimentelle Hochmagnetfeld-Studien zeigen, dass die Phasenbildgebung im Vergleich zu konventionellen MRT-Verfahren einen deutlicheren Kontrast nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb der *Substantia alba* und *Substantia grisea* liefert. Somit sind Visualisierung und Identifikation einzelner Substrukturen möglich (Marques et al., 2009). In Humanstudien mit MS-Patienten konnten die in T_1 - bzw. T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen homogen erscheinenden Läsionen mit Hilfe der Phasenbildgebung hinsichtlich ihrer Erscheinungsform in vier Typen unterteilt werden: (1) Hyperintense Läsionen mit einer hypointensen Umrandung, (2) Läsionen mit heterogener hyper- und hypointenser Struktur, (3) Hyperintense Läsionen mit deutlichem hypointensen Zentrum, und (4) Hypointense Läsionen. Dabei wird angenommen, dass die verschiedenen Strukturen verschiedene Entwicklungsstadien in der Evolution der Läsionen darstellen (Matzke et al., 2010; Ovtcharov et al., 2011).

1.7. Zielsetzung

Die MRT ist eines der wichtigsten bildgebenden Methoden in der Diagnostik der MS. Neben den konventionellen T_1 -, T_2 - und T_2^* -gewichteten MRT-Verfahren werden quantitative Verfahren wie die MT-Bildgebung eingesetzt, um sowohl anatomische als auch biophysikalische oder biochemische Eigenschaften der für die MS typischen Läsionen unter *in vivo* Bedingungen analysieren zu können. Trotz der Vielzahl an verfügbaren MRT-Verfahren in der Diagnostik, sind zur Zeit weder befriedigende Aussagen über die in der Frühphase der MS ablaufenden inflammatorischen Prozesse, noch über den individuellen Verlauf der MS möglich.

Im Rahmen dieser Promotion sollte die Sensitivität und Spezifität der Phasenbildgebung bei der Detektion akuter inflammatorischer Prozesse im Tiermodell der EAE untersucht, und mit den Ergebnissen ausgewählter etablierter MRT-Verfahren verglichen werden.

Ein Ziel dieser grundlagenorientierten und klinisch relevanten Analysen war es, die während der EAE bzw. MS ablaufenden pathogenen Mechanismen unter *in vivo* Bedingungen detaillierter darstellen zu können. Dabei sollte untersucht werden welche möglichen Vorteile die Phasenbildgebung gegenüber anderen MRT-Verfahren bei der Früherkennung akuter inflammatorischer Prozesse aufweist.

Für die Umsetzung der genannten Ziele wurden zwei verschiedene EAE-Modelle verwendet. Das akute EAE-Modell wurde in Lewis-Ratten mit Hilfe einer s.c. Injektion einer MBP-Emulsion induziert. Das hyperakute EAE-Modell wurde in DA-Ratten mit Hilfe einer s.c. Injektion einer rrMOG₁₋₁₂₅-Emulsion induziert. Während das akute EAE-Modell der frühen Pha-

se der MS ähnlich ist, zeigt das hyperakute EAE-Modell parallelen zur Spitze eines möglichen Schubes bei MS.

Bei den MRT-Untersuchungen wurden neben der Phasenbildgebung die klinisch etablierten Verfahren der T_1 -, T_2 -, T_2^* -gewichteten und der MT-Bildgebung verwendet. Zusätzlich wurden superparamagnetische Kontrastmittel VSOP-C184 und VSOP-C200 verwendet, die in der Tierforschung bereits eingesetzt werden. Die den MRT-Befunden zugrundeliegenden pathologischen Prozesse sollen durch histologische und immunhistologische Untersuchungen charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit werden exemplarisch zwei experimentelle Studien beschrieben. Ein Ziel dieser Studien war die Visualisierung inflammatorischer Prozesse unter der Verwendung ausgesuchter MRT-Verfahren einschließlich der Phasenbildung. Darüber hinaus sollen Sensitivität und Spezifität (und somit die diagnostische Leistungsfähigkeit) der Phasenbildung bei der Früherkennung inflammatorischer Prozesse mit denen der anderen MRT-Verfahren verglichen werden. In der ersten Studie wurde das Modell der akuten EAE in Lewis-Ratten (Janvier, Frankreich) induziert. In der zweiten Studie wurde das Modell der hyperakuten EAE in Dark Agouti (DA)-Ratten (Charles River, Deutschland) induziert. Da in beiden Studien zahlreiche methodische Aspekte identisch sind, werden die mehrfach verwendeten Materialien und Methoden gesammelt dargestellt.

2.1. Geräte

24-Well-Zellkulturplatten	Greiner, Deutschland
Becherglas 10-1000ml	Carl Roth®, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth®, Deutschland
Digitalkamera	Leica DCS 500
Einmal-Feindosierspritze	Braun, Deutschland
Einmal-Feindosierspritze mit integrierter Kanüle	Braun, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanüle G16	Braun, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer	IKAMAG® RET, Deutschland
Katheter mit Zuspritzmöglichkeit (24G i.v.)	Terumo, Belgien
Labor pH-Meter	Weilheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Axioscope 2
Mikrotom	Leica CM 3050 S
MouseOx™ Pulse Oximeter	STARR Life Sciences Corp., USA
MRT-Scanner	4,7 T Bruker Biospec 47/20
Objektträger	Carl Roth®, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth®, Deutschland
Plattformschüttler	GFL mbH, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1µl-1000ml	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfen	Carl Roth®, Deutschland
Präzisionspipetten 0,1µl-1000ml	Eppendorf, Deutschland
Reagenzglasschüttler	IKA®-Labortechnik, Deutschland

Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Deutschland
Thermometer P400	Carl Roth [®] , Deutschland
Lauda M 12 Wasserbad	Lauda, Deutschland

2.2. Chemikalien

Albumin-Fraktion V (BSA)	Sigma Aldrich, Deutschland
Ammoniumnitrat ($H_4N_2O_3$)	Merck, Deutschland
Aqua dest	Carl Roth [®] , Deutschland
Cresyl Violet Acetat	Sigma Aldrich, Deutschland
(3,3') Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Deutschland
Entellan	Merck, Deutschland
Eosin	Merck, Deutschland
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Carl Roth [®] , Deutschland
Ethanol	Carl Roth [®] , Deutschland
Formalin (CH_2O)	Sigma Aldrich, Deutschland
Gelatine	Carl Roth [®] , Deutschland
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Carl Roth [®] , Deutschland
Hämatoxylin-Lösung nach Mayer	Sigma Aldrich, Deutschland
Imidazol ($C_3H_4N_2$)	Sigma Aldrich, Deutschland
Inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA)	Sigma Aldrich, Deutschland
Isofluran ($C_3H_2ClF_5O$)	Baxter, Deutschland
Isopentan (C_5H_{12})	Sigma Aldrich, Deutschland
Isopropanol (IPA)	Carl Roth [®] , Deutschland
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$)	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Braun, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Deutschland
Komplettes Freund-Adjuvans (KFA)	Sigma Aldrich, Deutschland
Merckoglas	Merck, Deutschland
Methanol (MeOH)	Merck, Deutschland
(Mono-) Ethylenglycol (MEG)	Carl Roth [®] , Deutschland
Mycobakterium tuberculosis H37Ra	BD GmbH, Deutschland
Myelin-Basisches Protein (MBP)	Sigma Aldrich, Deutschland
Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) ₁₋₁₂₅	MoBiTec GmbH, Deutschland
Natriumborhydrid ($NaBH_4$)	Sigma Aldrich, Deutschland

Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) anhydrid	Carl Roth [®] , Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth [®] , Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth [®] , Deutschland
Pyridin (C ₅ H ₅ N)	Merck, Deutschland
Roticlear	Carl Roth [®] , Deutschland
Saccharose (99,5%)	Carl Roth [®] , Deutschland
Salzsäure (HCl) 0,1N	Merck, Deutschland
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Deutschland
Stickstoff (flsg.)	Linde AG, Deutschland
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma Aldrich, Deutschland
Triton [®] 100	Sigma Aldrich, Deutschland
VSOP-C184	Ferropharm, Deutschland
VSOP-C200	Ferropharm, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich, Deutschland
Wolframat-Kieselsäure-Hydrat (H ₄ O ₄₀ SiW ₁₂)	Merck, Deutschland

2.3. Arzneimittel

Medetomidinhydrochlorid	Fort Dodge Veterinär GmbH, Deutschland
Rompun 2%	Bayer, Deutschland
Ketamin-Ratiopharm [®] Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Deutschland

2.4. Antikörper und Kits

Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC) Staining Kit	Vector Laboratorien, USA
Donkey anti-Sheep IgG (H+L)	Dianova, Deutschland
Goat anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific	Dianova, Deutschland
Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Dianova, Deutschland
Mouse anti-CD31 monoclonal antibody	Abcam, Großbritannien
Mouse anti-CD68 monoclonal antibody	Abcam, Großbritannien
Rabbit anti-MBP polyclonal antibody	Abcam, Großbritannien
Sheep anti-SA polyclonal antibody	Abcam, Großbritannien

2.5. Pufferlösungen

0,05 M Acetat-Puffer (pH 4,0)

6,8 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$
 1000 ml Aqua dest

0,1 M Phosphat-Puffer (PBS) (pH 7,4)

2 g KCl
 2 g KH_2PO_4
 80 g NaCl
 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 955 ml Aqua dest

0,05 M TRIS-HCl-Puffer (pH 7,6)

500 ml 0,2 M TRIS-Lösung
 775 ml 0,1 N HCl
 725 ml Aqua dest

2.6. Reagenzlösungen

1% Ammoniumsilbernitrat (pH 7,5)

1 g $\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$
 1 g AgNO_3
 1000 ml Aqua dest
 3 ml 1 N NaOH (pH 7,5)

1% BSA/PBS + 0,3% Triton-Lsg.

0.2 g BSA
 60 μl Triton[®] 100
 20 ml 0,1 M PBS

5% BSA/PBS + 0,3% Triton-Lsg.

3 g BSA
 180 μl Triton[®] 100
 60 ml 0,1 M PBS

Cryoprotection Solution

15 ml $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
 15 ml MEG
 20 ml 0,1 M PBS

DAB-Lsg.

30 mg DAB
 60 ml 0,05 M TRIS-HCl-Puffer
 600 μl 1 M Imidazol
 30 μl H_2O_2 (30%)

2% Gelatine

400 mg Gelatine
 20 ml Aqua dest

Ketamin-Xylazin-Narkose

10 mg/100 g Ketamin®
 0,5 mg/100 g Rompun® 2%

MeOH / PBS + 1% H₂O₂ (30%)-Lsg.

30 ml MeOH
 30 ml 0,1M PBS
 1,8 ml H₂O₂ (30%)

1% NaBH₄-Lsg.

0,6 g NaBH₄
 60 ml 0,1 M PBS

4% PFA-Fixierlsg. (pH 7,4)

40 g PFA
 15,5 g NaH₂PO₄ x 2H₂O
 1000 ml Aqua dest

30% Saccharose-Lsg.

90 g Saccharose
 210 g 0,1M PBS

Teillsg. A

50 g Na₂CO₃ anhydrid
 1000 ml Aqua dest.

Teillsg. B

2 g H₄N₂O₃
 2 g AgNO₃
 10 g H₄O₄₀SiW₁₂ x H₂O
 1000 ml Aqua dest.

Teillsg. C

2 g H₄N₂O₃
 2 g AgNO₃
 10 g H₄O₄₀SiW₁₂ x H₂O
 4 ml 37% CH₂O
 100 0ml Aqua dest.

0,2M TRIS-Lsg.

24,2 g TRIS
 1000 ml Aqua dest

2.7. Software

ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
ParaVision®	Bruker Medical, Deutschland
Photoshop CS	Adobe Systems, USA
Picture It	Microsoft, USA
SPSS 20.0	SPSS GmbH, Deutschland
MS Office	Microsoft, USA

2.8. Tierexperimentelle Methoden

2.8.1. Versuchstiere

Die im Verlaufe dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten von der Firma Janvier (Frankreich) und den Charles River Laboratorien. Es wurden 9-11 Wochen alte männliche Lewis-Ratten und weibliche DA-Ratten (Charles River, Deutschland) verwendet. Die Ratten wurden in klimatisierten Räumen mit einer Raumtemperatur von $21 \pm 2^\circ\text{C}$ in mit Sägemehl ausgelegten Makrolonkäfigen gehalten. Die Tiere hatten freien Zugriff auf Futter und Wasser und waren einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus unterworfen.

Sowohl die Tierhaltung als auch die Durchführung der Experimente erfolgten entsprechend den Richtlinien des Komitees für Tierversuche in Sachsen-Anhalt, Deutschland (Nr. 2-1065 IfN).

2.8.2. EAE-Induktion und klinische Evaluation

2.8.2.1. MBP induzierte akute EAE in Lewis-Ratten

Die Lewis-Ratten ($n = 14$) wurden unter Isofluran (Baxter, Deutschland)-Narkose (1-1,5% in 50:50 $\text{N}_2:\text{O}_2$; v/v) s.c. an ihrem rechten Hinterbein mit 100 μl einer Suspension des MBP immunisiert. Diese Suspension enthielt 20 μg MBP von Meerschweinchen (Sigma Aldrich, Deutschland) gelöst in 20 μl einer 0,1 M Phosphatpuffer-Lösung (PBS; pH 7,4) gemischt mit 80 μl KFA (Sigma Aldrich, Deutschland; *M. tuberculosis* H37Ra (BD GmbH, Deutschland) 10 mg / ml_{KFA}). Die Flüssigkeiten wurden solange vermischt, bis eine dicke Emulsion entstanden war (2-3 x 5 min). Neben den mit der MBP-Emulsion immunisierten Tieren der EAE-Gruppe, wurden einige Tiere ($n = 4$) mit 100 μl einer Kontroll-Emulsion immunisiert. Diese enthielt 20 μl PBS gemischt mit 80 μl KFA (*M. tuberculosis* H37Ra 10 mg / ml_{KFA}).

2.8.2.2. rrMOG₁₋₁₂₅ induzierte hyperakute EAE in DA-Ratten

Die DA-Ratten ($n = 5$) wurden unter Isofluran-Narkose (1-1,5% in 50:50 $\text{N}_2:\text{O}_2$; v/v) s.c. an ihrem Schwanzansatz mit 200 μl einer Suspension des rekombinanten MOG von Ratten (rrMOG₁₋₁₂₅, MoBiTec GmbH, Deutschland) immunisiert. Diese Suspension enthielt 100 μg rrMOG₁₋₁₂₅ gelöst in 100 μl Natrium-Acetat-Puffer (pH 4,0) gemischt mit 100 μl KFA (*M. tuberculosis* H37Ra 225 μg / 100 μl_{KFA}). Die Flüssigkeiten wurden solange vermischt, bis eine dicke Emulsion entstanden war (2-3 x 5 min). Neben den mit der rrMOG₁₋₁₂₅ immunisierten Tieren der EAE-Gruppe, wurden einige Tiere ($n = 2$) mit 200 μl einer Kontroll-Emulsion immunisiert. Diese enthielt 100 μl PBS (pH 7,4) gemischt mit 100 μl KFA (*M. tuberculosis* H37Ra 225 μg / 100 μl_{KFA}).

Der Verlauf der Krankheit wurde täglich nach der EAE-Induktion beobachtet. Dabei wurden die Tiere gewogen und die neurologischen Symptome nach folgender Skalierung (inkl. Zwischenschritte) bewertet: 0, *keine neurologischen Abnormitäten*; 1, *komplette Schwanzlähmung*; 2, *Parese der Hinterbeine und Gangataxie*; 3, *Paralyse der Hinterbeine*; 4, *Paralyse des gesamten Unterleib*; 5, *moribund*; 6, *Tot durch EAE*.

Wenn die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen einen Schweregrad von 4 oder mehr aufwiesen, wurden sie getötet. Tiere, die starben oder getötet werden mussten, erhielten für alle nachfolgenden Tage eine klinische Bewertung von 6.

2.9. Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT-Untersuchungen wurden an einem Bruker Biospec 47/20 Kleintierscanner (4.7 Tesla) durchgeführt. Das Gerät hat einen Bohrdurchmesser von 20 cm und ist mit einem BGS 12 (200 mT) Gradientensystem in Kombination mit einem 50 mm Litzcage Kleintier-Bildgebungssystem (DotyScientific Inc., Columbus, SC, USA) ausgestattet. Zur Steuerung diente das Programm ParaVision[®], Version 4.0 (Bruker Medical, Ettlingen, Deutschland). Nach der Induktion der EAE wurden die MRT-Messungen (Tabelle 2.2) an ausgewählten Tagen durchgeführt, gefolgt von histologischen Untersuchungen (Tabelle 2.1).

Die Tiere wurden in allen MRT-Experimenten mit Isofluran (1-1,5% in 50:50 N₂:O₂; v/v) anästhesiert und in Bauchlage positioniert. Um Bewegungsartefakte zu vermeiden, wurden die Tiere mit einer Kopfhalterung mit Beißschiene fixiert. Den Lewis-Ratten wurde zusätzlich 10-15 min nach Beginn der Isofluran-Narkose s.c. Medetomidin (5 µg / 100 g _{KG}; Fort Dodge Veterinär GmbH, Deutschland) injiziert. Um die Körpertemperatur von etwa 38°C aufrechtzuerhalten, wurden die Tiere ventral durch ein Wasserbad (Lauda M12, Lauda, Deutschland) erwärmt. Zusätzlich wurden die Vitalzeichen, Atmungsrate, Herzschlagrate und Blutsauerstoffsättigung während des gesamten MRT-Experiments mit einem Pulsoxymeter (MouseOx[™], STARR Life Sciences Corp., USA) überwacht.

Um eine möglichst genaue Auswertung der MRT-Bilder zu gewährleisten, wurde auf eine reproduzierbare Schichtorientierung bei den MRT-Experimenten geachtet. Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen in den jeweiligen räumlichen Ausrichtungen axial, horizontal und sagittal angefertigt. Die axiale Aufnahme diente als Referenzbild für die Positionierung der mittleren horizontalen und sagittalen Ebenen, und wurde so gewählt, dass sie jeweils durch den größten Gehirndurchmesser verliefen (Abbildung 2.1 A). Anhand der horizontalen Aufnahme (Abbildung 2.1 C) wurden anschließend die axialen und sagittalen Ebenen positioniert. Sowohl die mittlere axiale als auch die sagittale Ebene verliefen durch den größten Gehirndurchmesser und kreuzten sich zentral (Abbildung 2.1 B). Anhand der erhaltenen axialen und sagittalen Aufnahmen erfolgte daraufhin die Schichtpositionierung. In der axialen

Aufnahme lag die erste Schicht an den ventralen Grenzen des Gehirns an (Abbildung 2.2 A). In der sagittalen Aufnahme lag die erste Schicht an den ventralen Grenzen des Gehirns und Teilen des Rückenmarks an (Abbildung 2.2 B). Die Schichtführung aller in dieser Arbeit verwendeten MRT-Sequenzen blieb auf diese Art und Weise für alle Tiere annähernd gleich.

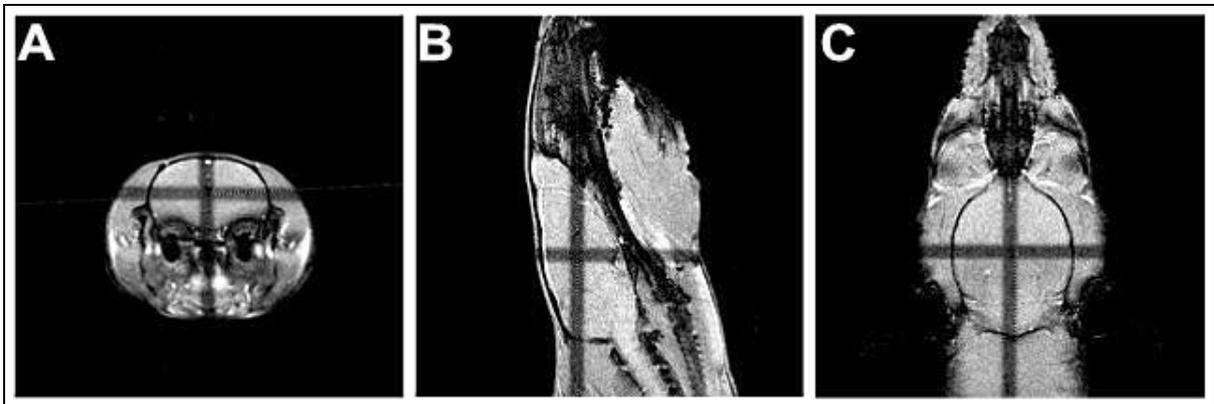


Abbildung 2.1: Übersichtsaufnahmen des Cerebrums einer Lewis-Ratte in der MRT. Visualisierung des Cerebrums in (A) axialer, (B) sagittaler und (C) horizontaler Ausrichtung.

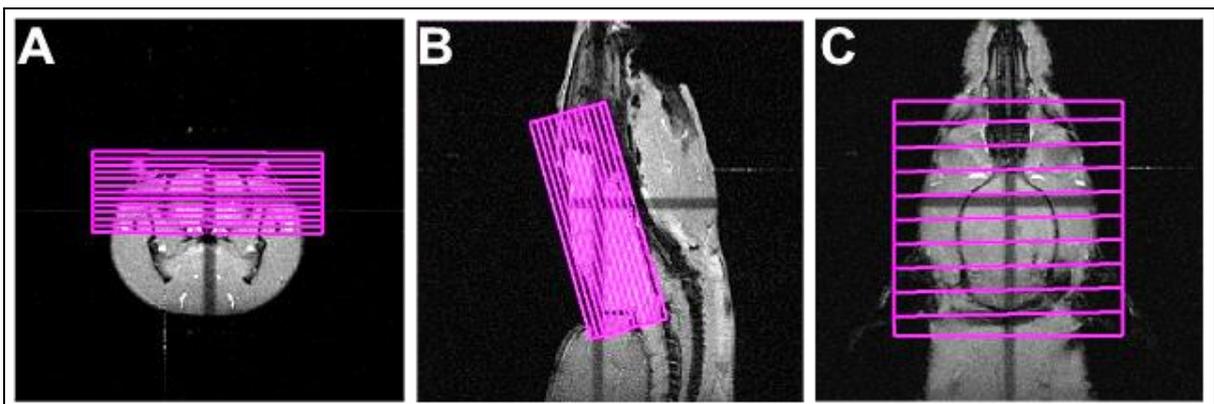


Abbildung 2.2: Schichtpositionierung des Cerebrums einer Lewis-Ratte in der MRT. Schichtpositionierung auf (A) axialer, (B) sagittaler und (C) horizontaler Ebene.

Nach der Schichtpositionierung wurden folgende MRT-Methoden bei allen EAE Modellen verwendet: (1) T_1 -gewichtete *Fast-Low-Angle Shot* (FLASH)-GRE-Sequenz ohne MT-Puls; (2) T_1 -gewichtete FLASH-GRE-Sequenz mit MT-Puls; (3) T_2 -gewichtete *Rapide Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE)-Spinecho (SE)-Sequenz; (4) T_2^* -gewichtete FLASH-GRE-Sequenz. Die genauen Parameter der einzelnen Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersicht über das experimentelle Design.

Gruppe	Tag nach der Immunisierung											
	0	6	7	9	11	13	14	17	20	21	48	49
Studie 1:												
akute EAE ohne VSOP (n=9)	MRT(n=9)	-	MRT(n=8)	MRT(n=5) Histo(n=1)	MRT(n=4) Histo(n=1)	-	MRT(n=7) Histo(n=1)	MRT(n=2)	-	MRT(n=6) Histo(n=1)	MRT(n=1) Histo(n=3)	
akute EAE mit VSOP (n=6)	MRT(n=6)	MRT(n=2)	MRT ^a (n=3)	MRT ^a (n=2)	MRT ^a (n=2)	MRT ^b (n=3)	MRT ^a (n=5)	-	MRT ^b (n=3)	MRT ^a (n=4)	MRT ^b (n=3) Histo(n=1)	MRT ^a (n=3)
Kontrolle (n=2)	MRT(n=1)	MRT(n=1)	MRT ^a (n=1)	-	-	MRT ^b (n=1)	MRT ^a (n=1) Histo(n=1)	-	MRT ^b (n=1)	MRT ^a (n=1)	MRT ^b (n=1)	MRT ^a (n=1)
^a MRT 24 h nach i.v. Injektion von VSOP-C184; ^b MRT nach mehr als 24 h i.v. Injektion von VSOP-C184												
Studie 2:												
Hyperakute EAE (n=5)	MRT(n=5)	MRT(n=4)	MRT ^a (n=2)	MRT(n=2) MRT ^b (n=2)	MRT(n=1) MRT ^a (n=2)	Histo(n=1)	MRT ^a (n=1) Histo(n=1)	MRT(n=2) Histo(n=2)	MRT ^a (n=1)	MRT(n=1) Histo(n=1)	-	-
Kontrolle (n=2)	MRT(n=2)	MRT(n=1)	MRT(n=1)	MRT(n=1)	MRT(n=1)	-	-	MRT(n=2) MRT(n=1)	-	MRT(n=2)	MRT ^a (n=1) Histo(n=2)	-
^a MRT 24 h nach i.v. Injektion von VSOP-C200; ^b MRT nach mehr als 24 h i.v. Injektion von VSOP-C200												

Tabelle 2.2: Verwendete Messprotokolle

	T_2	T_1	MT	T_2^*
Sequenz	RARE	FLASH	FLASH	FLASH
TE	15 ms (Effektiv 60ms)	7.1 ms	7.1 ms	25 ms
TR	4000 ms	360 ms	360 ms	700 ms
RF-Puls Bandbreite	1800 / 1838.7 Hz	6000 Hz	6000 Hz	15555.6 Hz
Echoes (Rare Faktor)	8	1	1	1
FA	90°, 180°	25°	25°	40°
FOV	35 x 35 mm	35 x 35 mm	35 x 35 mm	35 x 35 mm
Schichtanzahl	12	12	12	12
Schichtdicke	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
Schichtabstand	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
Akquisition Matrix	256 x 256 mm	256 x 256 mm	256 x 256 mm	256 x 256 mm
Bildauflösung	137 x 137 μ m	137 x 137 μ m	137 x 137 μ m	137 x 137 μ m
Akkumulation	15	15	15	15
Messzeit	32 min	17 min 16 sec	17 min 16 sec	44 min 48 sec
Auslesung	H-F	H-F	H-F	H-F
Ebene	horizontal	horizontal	horizontal	horizontal
Echo-Time-Mode	Short-TE	Short-TE	Short-TE	Long-TE
Echo Position		30%	30%	50%
RF Power			5 μ T	
Puls-Offset			5 kHz	
RF Puls			Gauss	
Länge			12 ms	
Nullauffüllung Beschleunigung				1
Phasenkodierfolge				centric

2.9.1. Superparamagnetische Kontrastmittel: VSOP-C184 und VSOP-C200

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei superparamagnetische Kontrastmittel mit ähnlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften verwendet, die i.v. in die Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) der Tiere injiziert wurden (Tabelle 2.3). Im akuten EAE-Modell wurde den Tieren VSOP-C184 und im hyperakuten EAE-Modell VSOP-C200 injiziert. Die Tiere erhielten die Injektion 24 Stunden vor der MRT-Untersuchung unter einer Isofluran-Anästhesie (1-1,5% in 50:50 N₂:O₂; v/v).

Tabelle 2.3: Dosierung der Kontrastmittel in den EAE Modellen

EAE-Gruppe	Partikel	Dosierung
MBP	VSOP-C184	300 μ mol Fe / kg
rrMOG ₁₋₁₂₅	VSOP-C200	150 μ mol Fe / kg

Beide Kontrastmittel gehören zur Gruppe der VSOP und bestehen aus einer wässrigen Dispersion von superparamagnetischen Nanopartikeln mit einem Eisengehalt von 0,5 mol Fe / l. Diese Nanopartikel bestehen aus Maghemit und sind von einer elektrostatisch stabilisierenden Zitrat (C)-Schicht umgeben. Mit Kerndurchmessern von 4 nm (VSOP-C184; hydrodynamischer \varnothing 7,0 \pm 0,15 nm) und 5 nm (VSOP-C200; hydrodynamischer \varnothing 9,0 \pm 0,15 nm) eignen sich die Nanopartikel der Kontrastmittel zur Markierung phagozytischer Zellen und zirkulieren bis zu mehreren Stunden im Blut (Tombach et al., 2004). Nach der i.v. Injektion werden die VSOPs über MPS wieder abgebaut (Tysiak et al., 2009).

2.9.2. Bildverarbeitung

2.9.2.1. Magnetisierungstransfer (MT)-Bildgebung

Die Quantifizierung des MTC erfolgte in Form des MTR mit $MTR = (SI_0 - SI_{MT}) \times 100\% / SI_0$, wobei SI_0 die Intensität des MR-Signals ohne und SI_{MT} die Intensität des MR-Signals mit vorgeschaltetem Sättigungspuls ist. Das MTR wurde grauwertkodiert auf einer MTR-Karte dargestellt (Rausch et al., 2003). Die MTR-Karte wurde mit dem Bildverarbeitungs- und Analyseprogramm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) generiert (Abbildung 2.3).

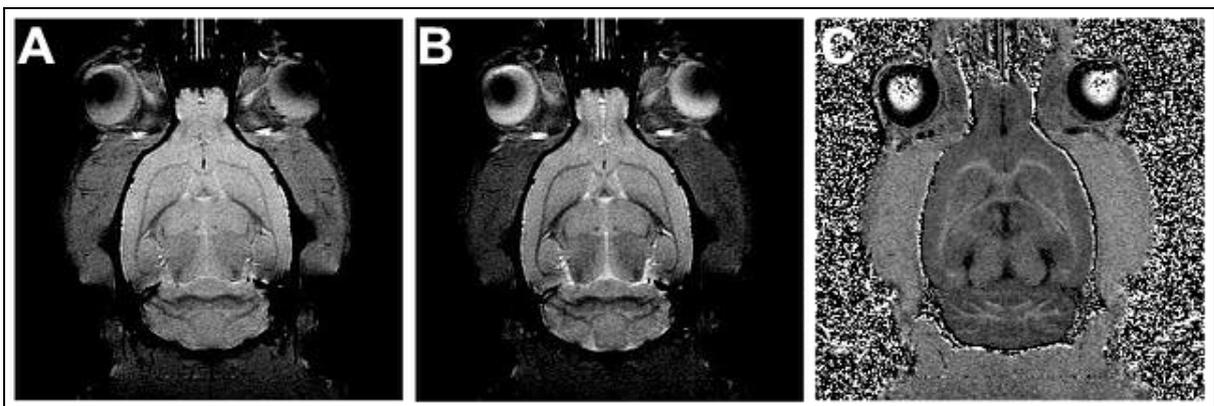


Abbildung 2.3: Generierung einer MTR-Karte. (A) T_1 -gewichtete MRT-Aufnahme des Cerebrums einer Lewis-Ratte. (B) MRT-Aufnahme der gleichen Schicht mit Hilfe der MT-Bildgebung. Im Unterschied zur T_1 -gewichteten Bildgebung ist dem MR-Signal ein Sättigungsimpuls vorgeschaltet. Basierend auf den MRT-Aufnahmen ohne und mit vorgeschaltetem Sättigungsimpuls werden (C) MTR-Karten generiert (Rausch et al., 2003)

2.9.2.2. Phasenbildgebung

Die Generierung der Phasenbilder erfolgte in mehreren Stufen auf Basis der T_2^* -gewichteten Rohdaten. Um „ungefilterte“ Phasenbilder aus dem komplexen Einzelkanal-Datensatz zu rekonstruieren, wurde zunächst ein Verknüpfungsalgorithmus verwendet (Zhong et al., 2008). Anschließend erfolgte ein „*phase unwrapping*“ der Rohdaten mit dem Verarbeitungsprogramm PRELUDE (FSL, Oxford, UK). Abschließend wird ein 2D Gauss-Hoch-Pass-Filter verwendet, um die endgültigen Phasenbilder zu erstellen. Dieser Filter erfüllte bei der Gene-

rierung der Phasenbilder zwei wesentliche Aufgaben: (1) Die Entfernung großflächiger Phasenverschiebungen innerhalb der ungefilterten Phasenbilder. (2) Die Definierung des Bereichs der Graustufen in dem das Phasenbild erstellt wurde. Die Datenverarbeitung erfolgte dabei mit MATLAB (Nautick, USA).

Sowohl der Verknüpfungsalgorithmus als auch der 2D Gauss-Hoch-Pass-Filter zur Generierung der Phasenbilder wurden von Dr. Kai Zhong zur Verfügung gestellt.

2.9.3. Bildanalyse

Sowohl die qualitative als auch die quantitative Auswertung der MRT-Aufnahmen erfolgten mit dem Bildverarbeitungs- und Analyseprogramm ImageJ.

2.9.3.1. Qualitative Auswertung

Die qualitative Auswertung der MRT-Aufnahmen erfolgte subjektiv durch sechs Auswerter unter Berücksichtigung folgender Parameter: (1) *Bewegungsartefakte*: 1, stark; 2, mäßig; 3, minimal; 4, keine. (2) *Konturschärfe der anatomischen Strukturen*: 1, gering; 2, mäßig; 3, gut; 4, sehr gut. In diesem Zusammenhang wurden die korrespondierenden horizontalen Schnitte verglichen, die den größten Gehirndurchmesser zeigten.

Bei der Auswertung der MRT-Aufnahmen unter Kontrastmittelapplikation, wurde der *Kontrast zwischen den anreichernden Herden und dem Gewebe* als dritter Parameter berücksichtigt: 0, kein Kontrast; 1, gering; 2, mäßig; 3, gut; 4, sehr gut. In diesem Zusammenhang wurden alle horizontalen Schichten untersucht.

Die Bewertungen wurden getrennt nach Parameter addiert und tabellarisch dargestellt.

2.9.3.2. Quantitative Auswertung

In der quantitativen Auswertung der MRT-Aufnahmen wurden in den entsprechenden Einzelschichten für alle Zeitpunkte die *Signalintensitäten* (SI) in einer definierten Region („*region-of-interest*“, ROI) bestimmt. Die ROI-Messungen bezogen sich sowohl auf lokale hypointense Herde ($SI_{\text{Läsion}}$), als auch auf das umgebende gesunde Gewebe (SI_{Gewebe}). Innerhalb des ZNS waren für die Analyse besonders der *Cortex*, das *Cerebellum* und der *Truncus cerebri* von Bedeutung. Die *Medulla oblongata* und der *Pons* wurden als Bestandteile des *Truncus cerebri* jedoch als ein ROI definiert, während das *Mesencephalon* ebenfalls als eigenes definiert wurde (Paxinos and Watson, 1998). Zusätzlich wurde mit den ROI-Messungen in diesen Schichten die Signalintensitäten außerhalb des Körpers gemessen, ohne dabei auftauchende Bewegungsartefakte zu erfassen (SI_{Rauschen}). Die ROIs der Gewebe hatten eine Pixelgröße von 50 ± 10 , die des Rauschen von 60 und die (falls vorhanden) der hypointensen Herde von 5 ± 2 . Die gemessenen SI-Werte wurden zur Berechnung des *Signal-zu-Rausch-Verhältnisses* („*signal-to-noise-ratio*“, SNR) der ausgewählten Gewebe: $SNR_{\text{Gewebe}} = SI_{\text{Gewebe}} / SI_{\text{Rauschen}}$ bzw. der hypointensen Herde: $SNR_{\text{Läsion}} = SI_{\text{Läsion}} / SI_{\text{Rauschen}}$, verwendet.

Für den Vergleich der Spezifität und Sensitivität zwischen den unterschiedlichen MRT-Verfahren wurden zwei quantitative Parameter ermittelt: (1) Das *Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis* („contrast-to-noise“, CNR) der hypointensen Herde: $CNR_{Läsion} = SNR_{Gewebe} - SNR_{Läsion}$ und (2) die *Signalintensitätsveränderung* („signal intensity change“, SIC) in hypointensen Herden: $SIC = (CNR_{Läsion} / SNR_{Gewebe}) \times 100$ (Taupitz, 2005). Beide Parameter beschreiben den Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe und sind ein Maß für die Kontrastmittelwirkung. Die Ermittlung der SIC-Werte ist notwendig, da aufgrund der Verarbeitungsschritte bei der Generierung der Phasenbilder kein direkter Vergleich zu den CNR-Werten in anderen MRT-Verfahren möglich ist.

Um den Durchmesser der hypointensen Herde zu ermitteln, wurden T_2^* -gewichtete MRT-Aufnahmen analysiert. In T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen wurde die Erkennung von hypointensen Herden durch folgende Merkmale ermöglicht: (1) Signalintensive Bereiche, wobei die SI maximal 70% der SI_{ROI} erreicht; (2) Typische Lokalisationen, die nicht als Ventrikel oder *Sulci* identifiziert wurden. Der Durchmesser der hypointensen Herde wurde mit Hilfe der ImageJ-Funktion „Messung“ ausgemessen, in Voxel gemessen, in μm umgerechnet und zusammen mit der anatomischen Lage notiert.

2.9.4. Statistische Analyse

Für die qualitative Auswertung wurde für jeden Parameter eine einfaktorielle Varianzanalyse zum Faktor „MRT-Verfahren“ durchgeführt. Um Aussagen über die Unterschiede zwischen den MRT-Verfahren machen zu können, wurde in die Varianzanalyse ein Tukey HSD Test als Post Hoc Analyse integriert.

Bei der Beobachtung der Läsionsentstehung wurde das durchschnittliche SNR_{Gewebe} aller gemessenen Tiere am Tag 0 p.i. als Referenz- / Kontrollwert festgelegt. Um die Läsionsentwicklung vor und nach der Kontrastmittelanreicherung zu untersuchen, wurde beim Vergleich an verschiedenen Zeitpunkten der Wilcoxon- sowie der Mann-Whitney-U (MWU) -Test durchgeführt. Der MWU-Test ist ein nichtparametrischer Test für unabhängige Stichproben und wurde verwendet, um die SNR_{Gewebe} der EAE-Tiere ohne vorherige Kontrastmittelapplikation mit denen der EAE-Tiere nach Kontrastmittelapplikation und den Kontrollwerten zu vergleichen. Der Wilcoxon-Test ist ein nichtparametrischer Test für abhängige Stichproben und wurde verwendet, um das SNR_{Gewebe} mit dem $SNR_{Läsion}$ in den definierten ROIs der EAE-Tiere nach Kontrastmittelapplikation zu vergleichen. Diese Testverfahren wurden gewählt, da bei der geringen Fallzahl eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden kann.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Softwarepakets SPSS Version 20.0. Wenn p Werte $< 0,05$ annahmen, wurden Unterschiede in den Resultaten als statistisch signifikant bewertet.

2.10. Histologie und Immunhistochemie

Ein Großteil der histologischen Arbeiten und Analysen wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Eike Budinger, in der Abteilung Akustik, Sprache und Lernen am Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg durchgeführt.

2.10.1. Perfusion, Gewebefixierung und Lagerung

Für histologische Untersuchungen wurden einzelne Tiere an ausgewählten Tagen (Tabelle 2.1) direkt nach der MRT-Messung durch eine intraperitoneale Injektion einer Ketanest-Xylazin-Mischung ($10 \text{ mg}_{\text{Ketamin}} / 100 \text{ g}_{\text{KG}}$ bzw. $0,5 \text{ mg}_{\text{Xylazin}} / 100 \text{ g}_{\text{KG}}$) in Tiefennarkose versetzt. Anschließend erfolgten die Öffnung des Brustkorbs und die Freilegung des Herzens. Über eine Kanüle, die in die linke Herzkammer der Tiere gestochen wurde, erfolgte die transkardiale Perfusion mit 50 ml einer 0.1 M PBS-Lösung (pH 7.4), gefolgt von 400 ml einer 4%-igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung. Nach dem herauspräparieren wurde das Gehirn (mit Teilen des kranialen Rückenmarks) zunächst für 24 Stunden bei 4°C in einer 4%-igen PFA-Lösung nachfixiert und anschließend zum Schutz vor Gefrierbrand für 48 Stunden in einer 30%-igen Saccharose-Lösung gelagert. Bis zur histologischen Aufarbeitung wurde das Gehirn bei -20°C gelagert.

Für histologische und immunhistologische Analysen wurde das Gehirn an einem Kryostat-Mikrotom (Leica CM 3050 S, Deutschland) horizontal in 50 µm dicke Schichten geschnitten und zunächst in einer 0.1 M PBS-Lösung zwischengelagert. Schnitte die nicht im Rahmen histo- und immunhistochemischer Färbungen weiter verarbeitet werden sollten, wurden in einer Gefrierschutz-Lösung („*Cryoprotection Solution*“, CPS) bei -20°C gelagert.

2.10.2. Histochemische Färbungen

Zur allgemeinen morphologischen Beurteilung der Zyto- bzw. Faserarchitektur der Gewebe wurde alternierend die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer, die Nissl-Färbung sowie die Silberfärbung nach Gallyas (Gallyas, 1979) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst direkt auf mit Gelatine (Carl Roth®, Deutschland) ummantelte Objektträger (Carl Roth®, Deutschland) aufgezogen, für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und entsprechend dem Standardprotokoll der jeweiligen Färbung behandelt.

Sowohl die histochemischen, als auch die immunhistochemischen Verlaufsprotokolle wurden bei Raumtemperatur und unter Verwendung eines Plattformschüttlers (GFL mbH, Deutschland) durchgeführt.

2.10.2.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer

Um eine Färbung der Zellkerne innerhalb der Gewebe hervorzurufen, wurden die getrockneten Schnitte für 5 min in einer Hämatoxylin-Lösung (Sigma Aldrich, Deutschland) angefärbt,

kurz mit destilliertem Wasser (Aqua dest) gespült und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden die Schnitte in einer Eosin (Merck, Deutschland)-Lösung (0,1% in Aqua dest) für 10 min angefärbt, um somit eine Färbung der Gewebe zu gewährleisten. Nach der Eosin-Färbung wurden die Schnitte 10 min in Aqua dest gespült und durchliefen zur Entwässerung eine aufsteigende Ethanolreihe (80%, 2 x 100% jeweils 5 min). Abschließend wurden die entwässerten Schnitte zweimal für jeweils 5 min im organischen Lösungsmittel Roticlear® (Carl Roth, Deutschland) geklärt und mit Merckoglas (Merck, Deutschland) eingedeckelt.

2.10.2.2. *Nissl-Färbung*

Die getrockneten Schnitte wurden zunächst für 5 min in 0.05 M Natriumazetatpuffer (pH 4.0-4.2; Sigma Aldrich, Deutschland) inkubiert und anschließend 1 min in einer 0.5% Kresylviolett-Lösung angefärbt. Kresylviolett bindet als basischer Farbstoff an negativ geladene Strukturen wie Ribonukleinsäure (RNS) und Desoxyribonukleinsäure (DNS), wodurch Zellkerne und Nissl-Schollen violett, Nervenzellen schwach blau und der Rest „farblos“ erscheinen. Nachdem die Schnitte angefärbt waren, durchliefen sie zur Entwässerung eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 96% jeweils 2 min). Anschließend wurden sie zweimal für jeweils 5 min in einer Isopropanol-96%-iger Ethanol- (2:1) Lösung inkubiert, dreimal für jeweils 5 min mit Roticlear® behandelt und zum Schluss mit Merckoglas eingedeckelt.

2.10.2.3. *Gallyas-Silberfärbung*

Die getrockneten Schnitte wurden zunächst über Nacht in eine 4%-ige PFA-Lösung und daraufhin zur Acetylierung für 30 min in eine Pyridin-Essigsäureanhydrid (2:1)-Lösung (Merck, Deutschland) getaucht. Anschließend wurden die Schnitte für 45 min in einer 0,1%-gen Ammoniumsilbernitrat-Lösung (pH 7.5; Merck, Deutschland) inkubiert, infolge dessen sich die Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine in den Geweben anlagern. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal in 0,5%-iger Essigsäure (Carl Roth, Deutschland) für jeweils 10 min gewaschen und etwa 5 min unter ständiger Sichtkontrolle in einem physikalischen Entwickler angefärbt. Der physikalische Entwickler ist ein Gemisch aus den Teillösungen A, B und C (siehe 2.6) die für jeden Färbevorgang in folgender Reihenfolge und Menge frisch auf dem Magnetprüher angesetzt wurde: 250 ml Teillösung A, 125 ml Teillösung B und 125 ml Teillösung C. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in 1%-iger Essigsäure für jeweils 10 min gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Im letzten Arbeitsschritt wurden die getrockneten Schnitte dreimal für jeweils 5 min in Roticlear® (Carl Roth, Deutschland) inkubiert und mit Entellan (Merck, Deutschland) eingedeckelt.

2.10.3. Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Schnitte, die nach dem Schneiden am Kryostat-Mikrotom in einer 0,1 M PBS-Lösung lagerten, zunächst für 20 min in 1 ml einer 1%-gen Natriumborhydrid-Lösung inkubiert und anschließend für 30 min und zweimal 10 min mit einer 0,1 M PBS-Lösung gespült. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 min in 1 ml einer Methanol / PBS / H₂O₂-Lösung inkubiert, zweimal 10 min mit einer 0,1 M PBS-Lösung gespült und dann für 45 min in einer Albumin Fraktion V (BSA) / Triton/PBS-Lösung (Sigma Aldrich, Deutschland) inkubiert. Die genannten Schritte führen generell zu einer Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen und somit zu einer Minimierung der Hintergrundfärbung in den Präparaten. Abschließend wurden die Schnitte im Rahmen der Vorbehandlung 10 min mit einer 0.1 M PBS-Lösung gespült.

In weiteren Arbeitsschritten wurden ausgewählte immunhistologische Techniken eingesetzt, um das MBP, Serum Albumin sowie CD31- und CD68-positive Zellen nachzuweisen. Die verwendeten Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper (Tabelle 2.4) wurden in einer BSA / Triton / PBS-Lösung verdünnt.

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Antikörper

	Spezifität der Antikörper	Isotyp	Spezies	Verdünnung
Primär-Antikörper	anti-MBP	polyklonal	Kaninchen	1:2000
	anti-Serum Albumin	monoklonal	Schaf	1:5000
	anti-CD31 (PECAM)	monoklonal	Maus	1:2000
	anti-CD68	monoklonal	Maus	1:100
Sekundär-Antikörper	anti-Maus (biot.)	IgGFcy	Ziege	1:200
	anti-Schaf (biot.)	IgGH+L	Esel	1:200
	anti-Kaninchen (biot.)	IgGH+L	Ziege	1:200
Tertiär-Antikörper	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	-	-	-

2.10.3.1. CD31(PECAM1)-Färbung

Um die Präsenz von CD31-Antigenen auf der Oberfläche von Monozyten, Neutrophilen und einigen Typen von T-Zellen nachzuweisen, wurden die Schnitte zunächst mit monoklonalen CD31-Antikörpern von Mäusen im Verhältnis 1:2000 in 300 µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in einer 0,1 M PBS-Lösung gewaschen und etwa 2 Stunden mit biotinylierten Ziege-anti-Maus-Antikörpern im Verhältnis 1:200 in 300 µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut 5min in einer 0,1 M PBS-Lösung gewaschen und etwa 2 Stunden mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex gelöst in 500 µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung inkubiert (Herstellung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes mindestens 30 min vor Gebrauch). Im Anschluss

wurden die Schnitte je 5 min in einer 0,1 M PBS- bzw. 0,2 M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Lösung (Sigma Aldrich, Deutschland) gewaschen und etwa 8 min 500 µl einer Diaminobenzidin (DAB)-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte je 5 min zweimal in 0,2 M TRIS-Lösung gespült, einmal in 0,1 M PBS-Lösung gewaschen, aus Leitungswasser auf einen Objektträger gezogen und über Nacht getrocknet. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte dreimal je 5 min in Roticlear® geklärt und mit Merckoglas eingedeckelt.

2.10.3.2. *CD68-Färbung*

Um die Präsenz von CD68-Antigenen auf der Oberfläche eindringender Makrophagen und Monozyten nachzuweisen, wurden die Schnitte zunächst mit monoklonalen CD68-Antikörpern von Mäusen im Verhältnis 1:100 in 300µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung über Nacht inkubiert. Die nachfolgenden Schritte des Verlaufsprotokolls entsprechen denen der CD31-Färbung.

2.10.3.3. *Serum Albumin-Färbung*

Um eine Durchwanderung von Serum Albumin durch eine potentiell geschädigte BHS in das ZNS nachzuweisen, wurden die Schnitte zunächst mit monoklonalen Antikörpern von Schafen gegen Serum Albumin im Verhältnis 1:5000 in 300µl einer BSA / Triton / PBS-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in einer 0.1 M PBS-Lösung gewaschen und etwa 2 Stunden mit biotinylierten Esel-anti-Schaf-Antikörpern im Verhältnis 1:200 in 300 µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung inkubiert. Die nachfolgenden Schritte des Verlaufsprotokolls entsprechen denen der CD31-, bzw. CD68-Färbung.

2.10.3.4. *MBP-Färbung*

Um eine mögliche Demyelinisierung im ZNS nachzuweisen, wurden die Schnitte zunächst mit polyklonalen Antikörpern von Kaninchen gegen MBP im Verhältnis 1:2000 in 300µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in einer 0.1 M PBS-Lösung gewaschen und etwa 2 Stunden mit biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern im Verhältnis 1:200 in 300 µl einer BSA/Triton/PBS-Lösung inkubiert. Die nachfolgenden Schritte des Verlaufsprotokolls entsprechen denen der CD31-, CD68-Färbung bzw. Serum Albumin-Färbung.

2.10.4. Auswertung der histologischen Schnitte

2.10.4.1. Qualitative Auswertung

Die gefärbten Schnitte aller Ratten wurden histopathologisch unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Axioscope 2; Zeiss, Deutschland) untersucht und entsprechende ROIs digital fotografiert (Leica DCS 500; Leica Deutschland). Die Fotografien wurden für die Illustration unter Verwendung von Adobe Photoshop Software arrangiert und beschriftet.

Die gefärbten Schnitte der Tiere wurden insbesondere im Hinblick auf Zerstörungen der Zyto- und Faserstruktur sowie dem Vorhandensein perivaskulärer Monozyten im *Truncus cerebri*, im *Cerebellum* und im *Cortex* untersucht.

2.10.4.2. Quantitative Auswertung

Um den Durchmesser der inflammatorischen Regionen in den EAE-Modellen zu ermitteln, wurden die histologischen Schnitte, die einer CD68-Färbung unterzogen wurden, mit Hilfe von ImageJ analysiert. In den histologischen Schnitten wurde die Erkennung von inflammatorischen Regionen durch folgende Merkmale ermöglicht: (1) Bereiche mit hoher optischer Dichte (braune Färbung); (2) Typische Lokalisationen (perivaskulär). Der Durchmesser der so erkannten inflammatorischen Regionen wurde mit Hilfe der ImageJ-Funktion „Messung“ ausgemessen, in μm umgerechnet und zusammen mit der anatomischen Lage notiert.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse zur MBP-induzierten akuten EAE in Lewis-Ratten

3.1.1. Klinischer Verlauf der akuten EAE

Nachdem den Lewis-Ratten ($n = 14$) am Ausgangstag (Tag 0) 100 μ l einer MBP-Emulsion s.c. injiziert wurde, war über einen Zeitraum von 25 Tagen ein monophasischer Verlauf der auftretenden neurologischen Symptome zu beobachten (Abbildung 3.1). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass es sich bei dieser EAE um die akute Form handelt. Bei der Mehrzahl der Tiere waren die ersten neurologischen Symptome am Tag 9 nach der Immunisierung (p.l.) in Form eines partiellen (7 von 14) oder kompletten Verlusts (3 von 14) des Schwanztonus zu beobachten. Dies entsprach einem durchschnittlichen klinischen Wert (dkW) von $0,5 \pm 0,4$. Im weiteren Verlauf erhöhte sich die Zahl der erkrankten Tiere bis am Tag 11 p.l. alle Tiere Symptome der EAE zeigten (dkW₁₁ $1,0 \pm 0,5$). Der Höhepunkt der Erkrankung lag zwischen Tag 14 und 15 p.l.. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Tiere körperlich deutlich beeinträchtigt, woraus ein dkW₁₄ vom $3,2 \pm 0,8$ resultiert. An den darauffolgenden Tagen war bei allen Tieren eine Besserung der neurologischen Symptome zu beobachten (dkW₁₇ $1,7 \pm 1,1$). Bis auf einige Ausnahmen hatten sich die meisten Tiere (8 von 11) am Tag 21 p.l. (dkW₂₁ $0,4 \pm 0,8$) von der Erkrankung erholt und zeigten keine neurologischen Symptome mehr.

Im Verlauf der Erkrankung konnte bei allen Tieren bis Tag 18 p.l. ein kontinuierlicher Gewichtsverlust beobachtet werden, der durchschnittlich $20,8\% \pm 3,3\%$ betrug. An den darauffolgenden Tagen nahmen die Tiere zwar wieder an Körpergewicht zu, erreichten innerhalb des Beobachtungszeitraums jedoch niemals mehr die Werte der Kontrolltiere (Abbildung 3.1).

Den Kontrolltieren ($n = 4$) wurde 100 μ l einer PBS / KFA-Emulsion s.c. injiziert. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes waren bei keinem dieser Tiere neurologische Symptome einer akuten EAE zu beobachten. Auch ein Gewichtsverlust war nicht zu verzeichnen (Abbildung 3.1).

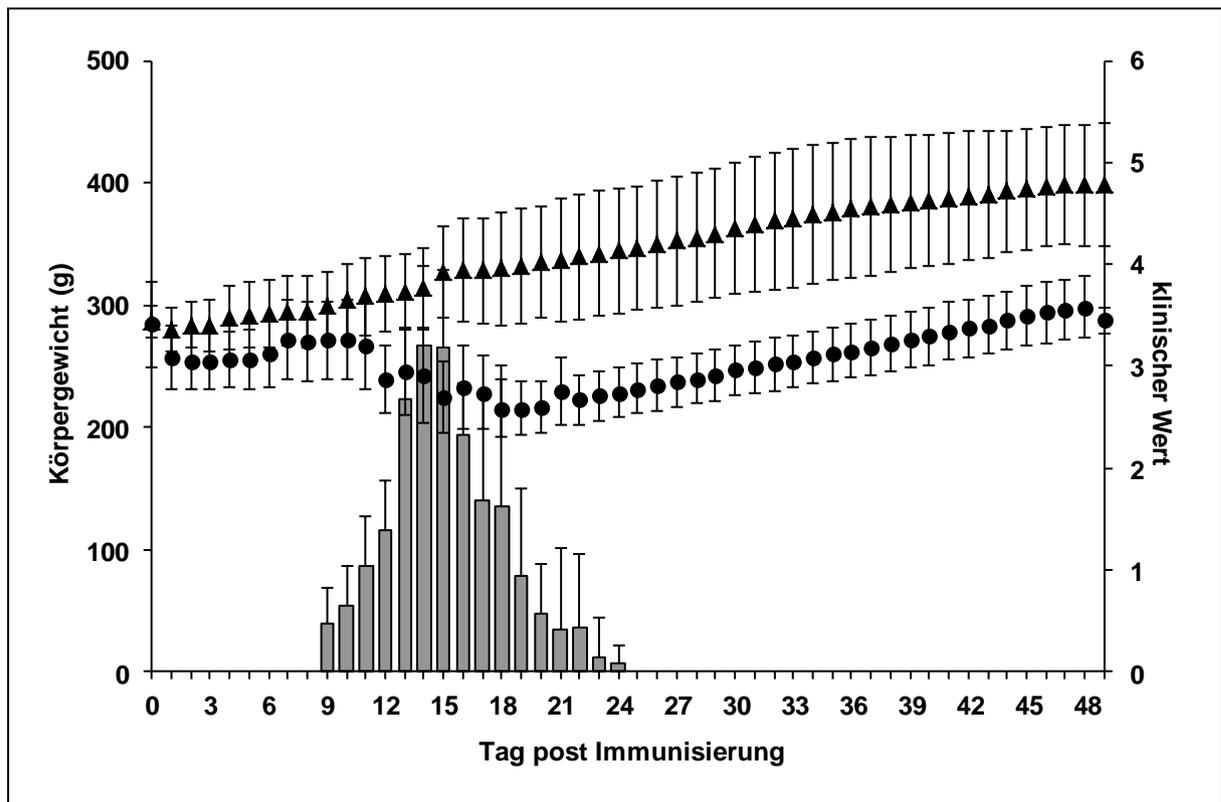


Abbildung 3.1: Klinischer Verlauf der MBP induzierten akuten EAE in Lewis-Ratten. Die akute EAE ist durch einen monophasischen klinischen Verlauf (Balken) charakterisiert. Die ersten klinischen Symptome wurden am Tag 9 p.i. beobachtet (dkW $0,5 \pm 0,4$). Ab Tag 11 p.i. zeigten alle immunisierten Tiere Symptome der EAE (dkW $1,0 \pm 0,5$). Der Höhepunkt der Erkrankung war am Tag 14 p.i. erreicht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle immunisierten Tiere schwere klinische Symptome der EAE (dkW $3,2 \pm 0,8$). Bis auf einige Ausnahmen hatten sich alle immunisierten Tiere bis Tag 21 p.i. erholt und zeigten keine neurologischen Symptome mehr (dkW $0,4 \pm 0,8$). Im Verlauf der Erkrankung konnte bei allen Tieren bis Tag 18 p.i. ein kontinuierlicher Gewichtsverlust von durchschnittlich $20,8\% \pm 3,3\%$ beobachtet werden (Kreise). Bei Kontrolltieren konnten weder klinische Symptome einer EAE noch ein Gewichtsverlauf beobachtet werden (Dreiecke). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) ausgedrückt.

3.1.2. Histologische und immunhistochemische Ergebnisse

Um das Ausmaß der pathologischen Veränderungen zu bestimmten Zeitpunkten überprüfen zu können wurden histologisch Kontrollen durchgeführt. Sowohl die Gallyas-Silberfärbung (Abbildungen 3.2-3.5 A-D), als auch die immunhistochemische MBP-Färbung (Abbildungen 3.2-3.5 A-D, untere linke Ecke) lieferten keine Beweise für eine Demyelinisierung im Verlauf der Erkrankung. Insgesamt ähnelten die eingefärbten Schnitte im Gesamtbild denen der Kontrolltiere.

Die immunhistochemische Albumin-Färbung zeigte, dass am Tag 9 p.i., innerhalb aller Haupthirnstrukturen einschließlich dem Kortex, dem basalen *Prosencephalon*, dem *Thalamus*, dem gesamten *Truncus cerebri*, dem *Cerebellum* und dem zervikalen Teil des Rückenmarks, eine Anreicherung von Albumin um vereinzelte Blutgefäße herum (Abbildungen 3.2-3.5 E-H). Im weiteren Verlauf der Erkrankung nahm die Menge an extravasalem Albumin zu und erreichte am Tag 14 p.i. das Maximum (Abbildungen 3.2-3.5 F). Am Tag 21 p.i. wa-

ren nur noch in der Nähe der großen Blutgefäße Ansammlungen extravasalen Albumins nachweisbar (Abbildungen 3.2-3.5 G), die am Tag 49 p.I. auch fast vollständig verschwunden waren (Abbildungen 3.2-3.5 H). Die Ergebnisse der Albumin-Färbung zeigten in Übereinstimmung mit den klinischen Werten, einen monophasischen Verlauf und deuteten auf eine entsprechend zu- sowie abnehmende Permeabilität der BHS hin.

Die zunehmende Permeabilität der BHS wurde durch eine zunehmende fokale Akkumulation von Mikrogliazellen (Abbildungen 3.2-3.5 M-P, untere linke Ecke) und CD31-positiven Zellen (Abbildungen 3.2-3.5 I-L) bestätigt. Sowohl, die im Rahmen der HE-Färbung detektierten Mikrogliazellen, als auch die Ansammlungen CD31-positiver Zellen, die sich in der Regel aus neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen zusammensetzten, waren erstmals am Tag 9 p.I. im ZNS erkrankter Tiere beobachtet wurden. Im weiteren Verlauf der Erkrankung nahm die Last fokaler Akkumulationen von Mikrogliazellen (Abbildungen 3.2-3.5 M-P, untere linke Ecke) sowie CD31-positiven Zellen (Abbildungen 3.2-3.5 I-L) zu und erreichte am Tag 14 p.I. ihren Höhepunkt. Entsprechend dem monophasischen Verlauf der akuten EAE und der fokalen Akkumulation extravasalen Albumins, nahm die Belastung durch inflammatorische Prozesse infolge der Akkumulation der Mikrogliazellen und CD31-positiven Zellen kontinuierlich ab. Am Tag 49 p.I. wurden in den histologischen Schnitten nur noch vereinzelt extravasale Albuminakkumulationen gefunden. Darüber hinaus waren sie deutlich schwächer ausgeprägt als an den Tagen zuvor.

Zusätzlich zu diesen histologischen Befunden, konnten innerhalb des ZNS erkrankter Tiere auch perivaskuläre Akkumulationen CD68-positiver Zellen detektiert werden. Die Mehrzahl der CD68-positiven Zellen waren Makrophagen und Monozyten, die sehr wichtige Marker für inflammatorische Prozesse sind. In Übereinstimmung mit den anderen histopathologischen Befunden, nahm die Zahl CD68-positiver Zellen bis Tag 14 p.I. kontinuierlich zu und fiel an den darauffolgenden Tagen wieder ab (Abbildungen 3.2-3.5 M-P). Einige Akkumulationen CD68-positiver Zellen waren noch am Tag 49 p.I. insbesondere im *Pons / Medulla oblongata*-Komplex in der Nähe großer Blutgefäße zu finden.

Der mittlere Durchmesser einer inflammatorischen Region betrug für alle immunisierten Lewis-Ratten $208.0 \pm 104.6 \mu\text{m}$. In Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden waren die inflammatorischen Regionen am Tag 14 p.I. am größten und wurden im weiteren Verlauf der Erkrankung kleiner (Tabelle 3.1). Die hohen Zahlen der Standardabweichungen spiegeln die zum Teil stark variierende Größe der inflammatorischen Regionen in den Geweben und an den Untersuchungstagen wider.

Zusammenfassend ergeben die histopathologischen Untersuchungen folgenden Befund: (1) Innerhalb des ZNS erkrankter Tiere waren zu keinem Zeitpunkt Hinweise für eine Demyelinisierung oder für eine massive Zerstörung von Gewebe zu finden. (2) Ab dem Tag 9 p.I. waren Störungen in der BHS und lokale Entzündungen im ZNS zu finden.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der CD68-Färbung im akuten EAE-Modell. Ermittelt wurde der mittlere Durchmesser (\pm SD; μm) der inflammatorischen Regionen in verschiedenen zerebralen Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE.

Tag p.l.	Prosencephalon	Mesencephalon	Cerebellum	Pons / Medulla oblongata	Mittelwerte
9	176.1 \pm 48.2	-	-	116.9 \pm 67.8	146.5 \pm 61.8
14	204.7 \pm 31.3	332.2 \pm 141.9	228.7 \pm 173.9	242.9 \pm 88.4	254.2 \pm 120.5
21	170.8 \pm 57.9	186.8 \pm 98.6	110.5 \pm 37.1	279.3 \pm 65.13	185.4 \pm 93.3
49	112.1 \pm 79.3	-	163.7 \pm 154.3	115.4 \pm 50.4	139.5 \pm 97.8

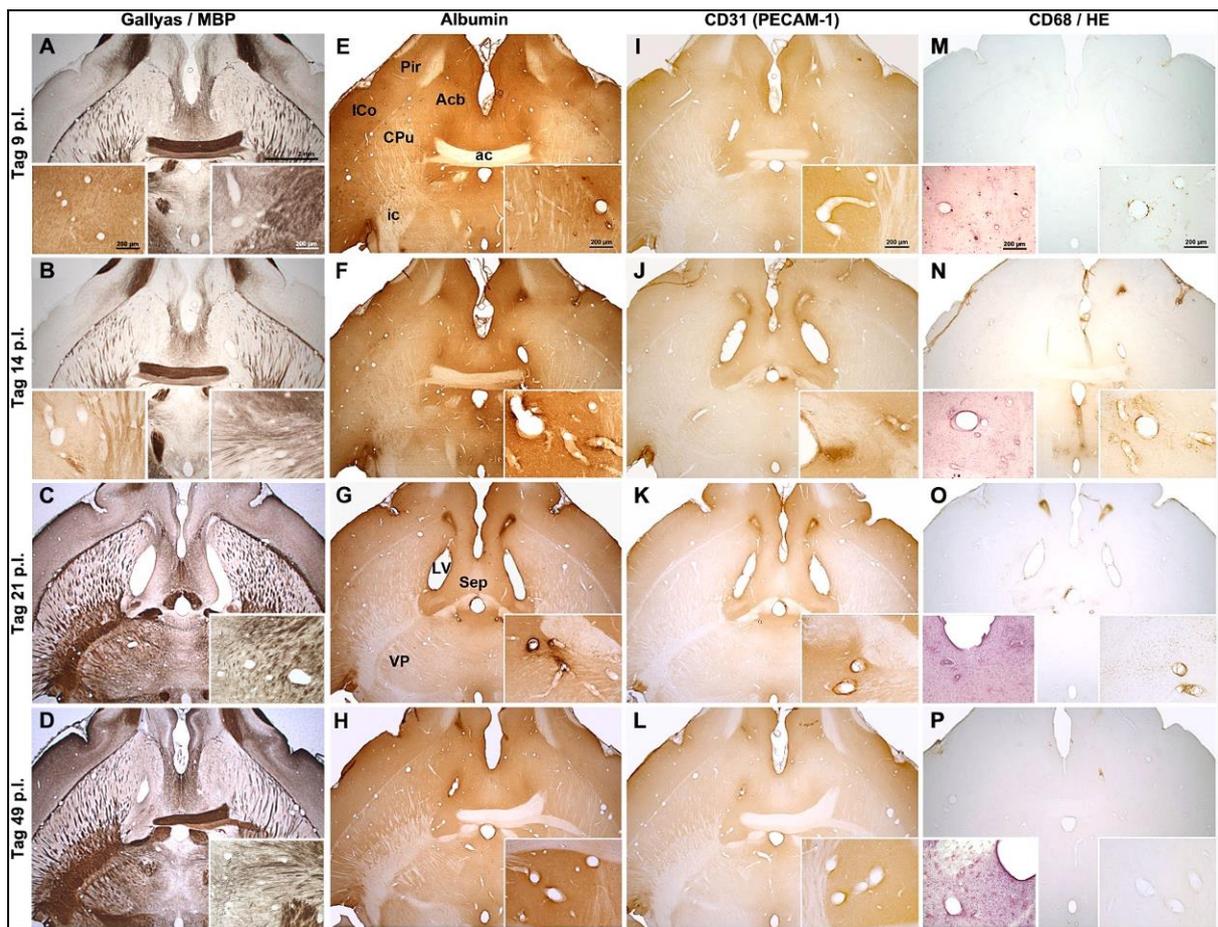


Abbildung 3.2: Histopathologische Verifizierung im Cortex, basalen Prosencephalon und ventralen Thalamus von Lewis-Ratten mit akuter EAE. Im Verlauf der akuten EAE konnten weder mit Hilfe der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (A-B x10 untere linke Ecke) Beweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich des ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Eine Albumin-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) der Schnitte zeigt, dass die Anreicherung extravasalen Albumins von Tag 9 p.l. bis Tag 14 p.l. zunimmt und an den darauffolgenden Tagen wieder abnimmt. Ähnliche Ergebnisse liefern die CD31-Färbung bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (I-L, x10 untere rechte Ecke), die CD68-Färbung bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (M-P, x10 untere rechte Ecke) und die HE-Färbung bezüglich der Anreicherung von Mikrogliazellen (M-P, x10 untere linke Ecke). Primär sind Anreicherungen extravasalen Albumins und verifizierter Zellen um die Blutgefäße herum zu finden (siehe Vergrößerungen E-P, untere linke und rechte Ecke). Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 μm . Abk.: ac - *commissura anterior*; Acb - *nucleus accumbens*; CPu - *caudate putamen*; ic - *capsula interna*; ICo - *cortex insularis*; LV - *lateraler Ventrikel*; Pir - *cortex piriformis*; Sep - *septum pellucidum*; VP - *ventral posterior nucleus thalamus*. Diese histologischen Abbildungen wurden von Dr. Eike Buidinger angefertigt.

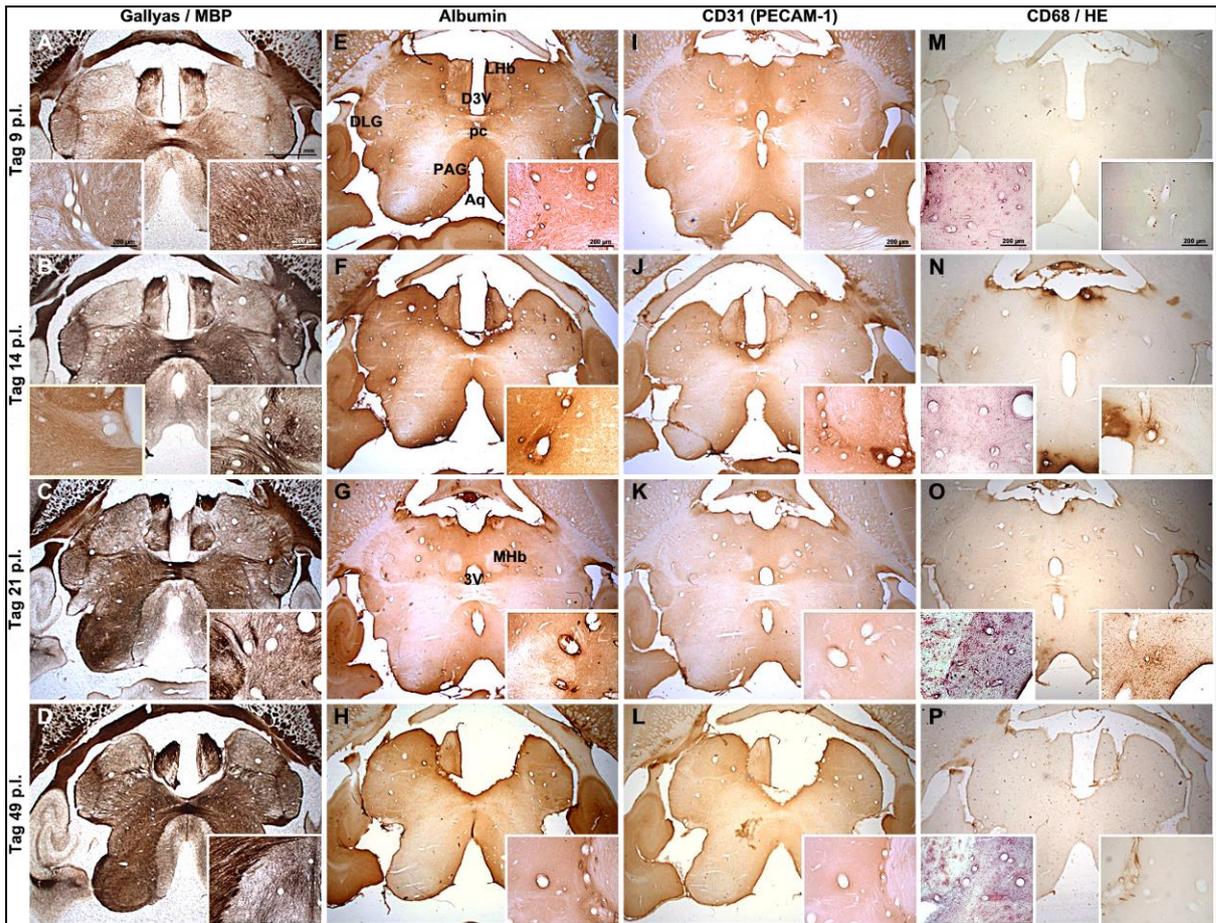


Abbildung 3.3: Histopathologische Verifizierung im *Thalamus* und *Mesencephalon* von Lewis-Ratten mit akuter EAE. Im Verlauf der akuten EAE konnten weder mit Hilfe der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (A-B x10 untere linke Ecke) Beweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich des ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Eine Albumin-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) der Schnitte zeigt, dass die Anreicherung extravasalen Albumins von Tag 9 p.l. bis Tag 14 p.l. zunimmt und an den darauffolgenden Tagen wieder abnimmt. Ähnliche Ergebnisse liefern die CD31-Färbung bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (I-L, x10 untere rechte Ecke), die CD68-Färbung bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (M-P, x10 untere rechte Ecke) und die HE-Färbung bezüglich der Anreicherung von Mikrogliazellen (M-P, x10 untere linke Ecke). Primär sind Anreicherungen extravasalen Albumins und verifizierter Zellen um die Blutgefäße herum zu finden (siehe Vergrößerungen E-P, untere linke und rechte Ecke). Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 μm . Abk.: Aq - *aquaeductus mesencephali*; 3V - Dritter Ventrikel; D3V - dorsaler dritter Ventrikel; DLG - Dorsal lateraler *nucleus geniculatus*; LHb - Laterale *nuclei habenulares*; MHb - Mittlere *nuclei habenulares*; PAG - Periaquäduktales Grau; pc - *commissura posterior*.



Abbildung 3.4: Histopathologische Verifizierung im *Cerebellum* von Lewis-Ratten mit akuter EAE. Im Verlauf der akuten EAE konnten weder mit Hilfe der Gallyas-Silberfärbung (**A-D, x10 untere rechte Ecke**) noch der MBP-Färbung (**A-B x10 untere linke Ecke**) Beweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich des ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Eine Albumin-Färbung (**E-H, x10 untere rechte Ecke**) der Schnitte zeigt, dass die Anreicherung extravasalen Albumins von Tag 9 p.l. bis Tag 14 p.l. zunimmt und an den darauffolgenden Tagen wieder abnimmt. Ähnliche Ergebnisse liefern die CD31-Färbung bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (**I-L, x10 untere rechte Ecke**), die CD68-Färbung bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (**M-P, x10 untere rechte Ecke**) und die HE-Färbung bezüglich der Anreicherung von Mikrogliazellen (**M-P, x10 untere linke Ecke**). Primär sind Anreicherungen extravasalen Albumins und verifizierter Zellen um die Blutgefäße herum zu finden (siehe Vergrößerungen **E-P, untere linke und rechte Ecke**). Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 μm . Die römischen Ziffern kennzeichnen einige der zerebellaren *Lobuli*.

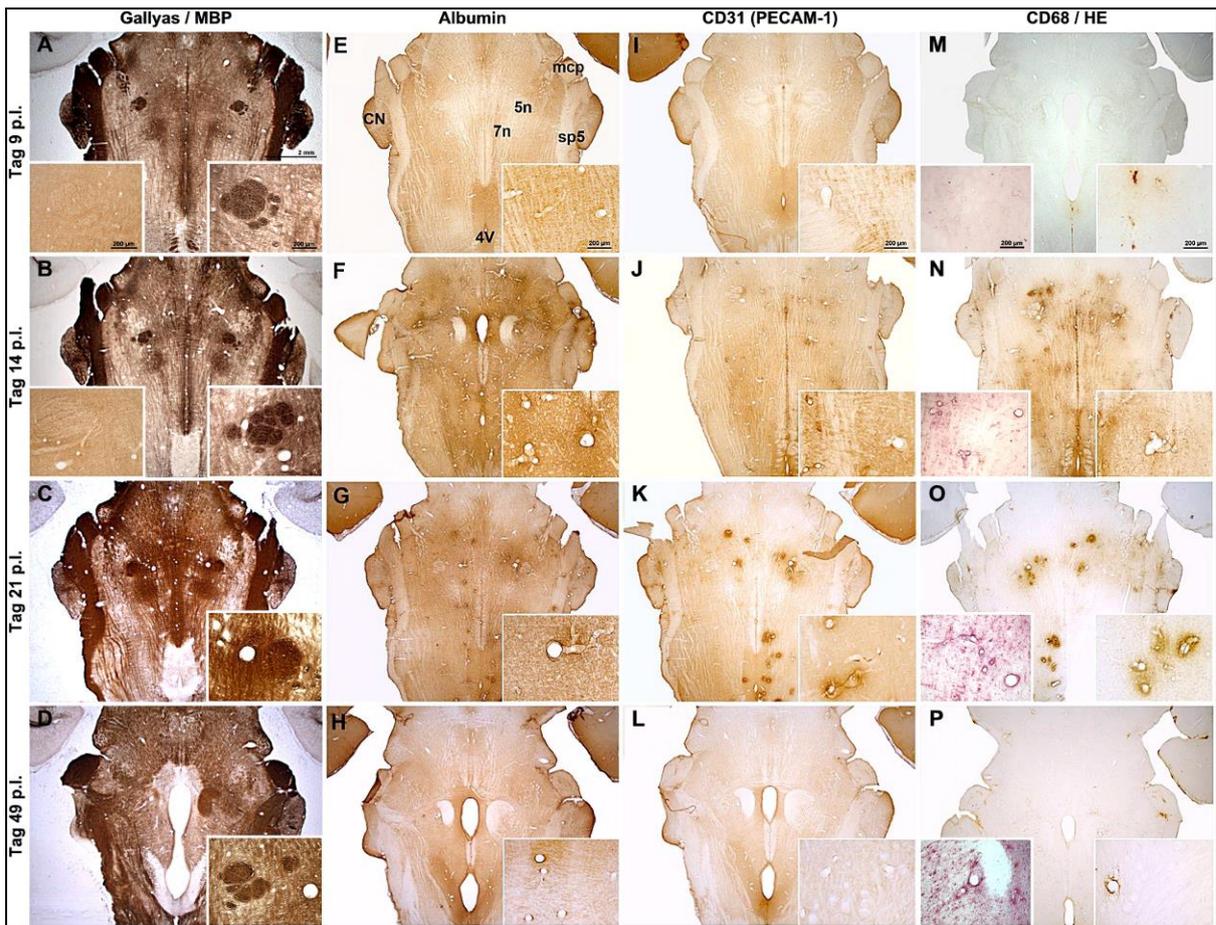


Abbildung 3.5: Histopathologische Verifizierung im *Truncus cerebri* von Lewis-Ratten mit akuter EAE. Im Verlauf der akuten EAE konnten weder mit Hilfe der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (A-B x10 untere linke Ecke) Beweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich des ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Eine Albumin-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) der Schnitte zeigt, dass die Anreicherung extravasalen Albumins von Tag 9 p.l. bis Tag 14 p.l. zunimmt und an den darauffolgenden Tagen wieder abnimmt. Ähnliche Ergebnisse liefern die CD31-Färbung bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (I-L, x10 untere rechte Ecke), die CD68-Färbung bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (M-P, x10 untere rechte Ecke) und die HE-Färbung bezüglich der Anreicherung von Mikrogliazellen (M-P, x10 untere linke Ecke). Primär sind Anreicherungen extravasalen Albumins und verifizierter Zellen um die Blutgefäße herum zu finden (siehe Vergrößerungen E-P, untere linke und rechte Ecke). Im Vergleich zu anderen Bereichen des ZNS (siehe Abbildungen 3.2-3.4) waren die Anreicherungen im *Truncus cerebri* häufiger und über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 µm. Abk.: 4V – Vierter Ventrikel; 5n – *nervus trigeminus*; 7n – *nervus facialis*; CN – *nucleus cochlearis*; mcp – *pedunculus cerebellaris medius*; sp5 – *spinaler nervus trigeminus*. Diese histologischen Abbildungen wurden von Dr. Eike Budinger angefertigt.

3.1.3. MRT ohne vorherige Applikation von VSOP-C184

Mit dem Ziel die Sensitivität und Spezifität der Phasenbildgebung im Vergleich zu klinisch etablierten MRT-Verfahren bei der Detektion inflammatorischer Prozesse im Tiermodell der EAE zu untersuchen, wurden zunächst T_2^* -gewichtete Datensätze erstellt. Die T_2^* -gewichteten Datensätze waren auch Grundlage für die Generierung der Phasenbilder (Abbildung 3.6). Zusätzlich zum T_2^* -gewichteten MRT-Verfahren, wurden vergleichend die klinisch etablierten Verfahren der T_1 - und T_2 -gewichteten sowie der MT-Bildgebung untersucht. Es zeigte sich, dass die Phasenbildgebung im Vergleich zu den anderen MRT-Verfahren einen neuartigen charakteristischen Kontrast liefert (Abbildungen 3.6, 3.7).

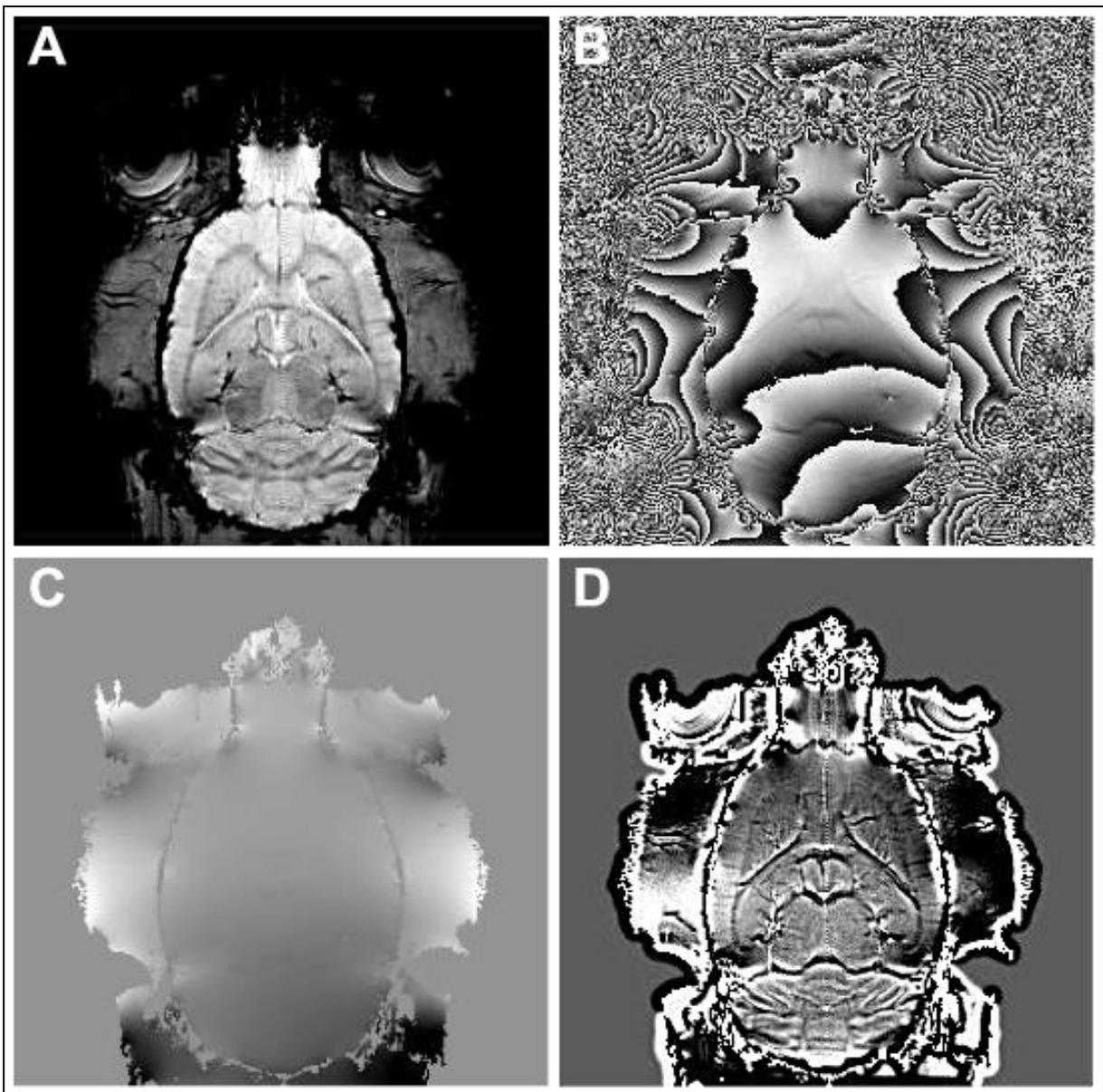


Abbildung 3.6: Generierung des Phasenbildes. (A) T_2^* -gewichtete MRT-Aufnahme des *Cerebrums* einer Lewis-Ratte. (B) Rekonstruktion eines „ungefilterten“ Phasenbildes auf Basis der Phaseninformationen des T_2^* -Datensatzes. (C) „*Phase unwrapping*“ des „ungefilterten“ Phasenbildes. (D) Generierung eines Phasenbildes nach Verwendung des Hoch-Pass-Filters.

Eine erste Analyse der Daten bezüglich des Parameters *Bewegungsartefakte* ergab, dass zwischen den verschiedenen MRT-Verfahren keine signifikanten Unterschiede bestehen. Jedoch zeigt eine weiterführende Post Hoc Analyse, dass zwischen dem T₁- und dem T₂-gewichteten MRT-Verfahren durchaus ein signifikanter Unterschied besteht.

Den Parameter *Konturschärfe der anatomischen Strukturen* bewerteten die Auswerter für die T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen signifikant höher als für die MRT-Aufnahmen der anderen Verfahren. Ein signifikanter Unterschied bestand auch zwischen den MRT-Aufnahmen der MT-Bildgebung und den MRT-Aufnahmen der T₁-, T₂*-gewichteten und der Phasenbildgebung. Zwischen den MRT-Aufnahmen der T₂*-gewichteten Bildgebung und den MRT-Aufnahmen der T₁-gewichteten und der Phasenbildgebung bestand auch ein signifikanter Unterschied. Lediglich in T₁-gewichteten MRT-Aufnahmen und Phasenbildern wurde bezüglich dem Parameter kein signifikanter Unterschied von den Auswertern gemessen. Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der qualitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im akuten EAE-Modell. Insgesamt wurden die MRT-Aufnahmen von 10 Tieren analysiert. 5 Tiere bekamen 24 Stunden vor der MRT VSOP-C184 i.v. injiziert. Mittelwerte \pm SD.

	T2	T1	MT	T2*	PI
Bewegungsartefakte	3.7 \pm 0.3	3.4 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5	3.6 \pm 0.5	3.6 \pm 0.5
Konturschärfe	3.6 \pm 0.4*	2.4 \pm 0.5	3.3 \pm 0.5*	2.8 \pm 0.3*	2.5 \pm 0.4
Kontrast Läsion/Gewebe	0.9 \pm 0.4	1.1 \pm 0.6	1.1 \pm 0.4	2.5 \pm 0.5**	2.0 \pm 0.6**

*p < 0,05, signifikanter Unterschied im Vergleich zu den korrespondierenden Phasenbildern (PI);

**p < 0,05 signifikanter Unterschied im Vergleich zu den korrespondierenden MRT-Aufnahmen der T₁- und T₂-gewichteten und MT-Bildgebung

Ohne vorherige Applikation von VSOP-C184 waren in den MRT-Aufnahmen der EAE-Tiere zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zu den MRT-Aufnahmen der Kontrolltiere zu finden, obwohl klinische Symptome und histologisch nachweisbare lokale Entzündungen und Störungen der BHS vorlagen (Abbildung 3.7). Das bedeutet, dass die im ZNS der Tiere ablaufenden inflammatorischen Prozesse durch alle genutzten MRT-Verfahren nicht nachweisbar waren. Aus diesem Grund wurden vergleichende Untersuchungen nach Applikation von VSOP-C184 durchgeführt

3.1.4. MRT nach Applikation von VSOP-C184

Das Kontrastmittel VSOP-C184 besteht in seiner Zusammensetzung aus sehr kleinen eisenoxidhaltigen Partikeln, deren Anreicherung im Gewebe zu einer Signalreduktion führt und somit in MRT-Aufnahmen als hypointense Regionen detektiert wird. In MRT-Aufnahmen des ZNS gesunder Kontrolltiere waren zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung hypointense Herde zu detektieren, d.h. das Kontrastmittel reichert sich in gesunden Tieren nicht extravasal im

ZNS an (Abbildung 3.7). In MRT-Aufnahmen von EAE-Tieren nach Applikation von VSOP-C184 wurden erstmals auf dem Höhepunkt der Erkrankung fokale hypointense Herde detektiert (Abbildung 3.8). Die MRT-Aufnahmen an den Tagen zuvor (Tage 7, 9 und 11 p.l.) waren trotz eindeutiger klinischer Symptome unauffällig und ähnelten den MRT-Aufnahmen der Kontrolltiere und der EAE-Tiere ohne Kontrastmittelapplikation (Abbildung 3.7).

Die detektierten hypointensen Herde waren am Tag 14 p.l. prädominant in der *Medulla oblongata*, im *Pons* sowie im *Mesencephalon* lokalisiert. Während einige hypointensen Herde darüber hinaus auch im *Cerebellum* zu finden waren, gab es im *Cortex* keine Anreicherungen des Kontrastmittels (Abbildung 3.9). Die Analyse der Aufnahmeserien der darauf folgenden Tage (Tage 17, 21 und 49 p.l.), deutete auf einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der hypointensen Herde im ZNS und dem klinischen Wert der neurologischen Symptome hin. Dementsprechend war die maximale Belastung an hypointensen Herden auf dem Höhepunkt der Erkrankung zu beobachten. Im weiteren Verlauf der Erkrankung nahm die Last an hypointensen Herden weiter kontinuierlich ab. In ihrer Verteilung waren die hypointensen Herde am Tag 21 und 49 p.l. ausschließlich im *Pons* und in der *Medulla oblongata* zu detektieren. In den meisten Fällen waren die hypointensen Herde am Tag 49 p.l. sogar völlig verschwunden.

Eine Gegenüberstellung der Befunde der histopathologischen Untersuchungen und der MRT zeigt, dass das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster der Akkumulationen phagozytischer Monozyten mit dem Verteilungsmuster der hypointensen Herde übereinstimmt.

Die qualitative Auswertung bezüglich des Parameters *Kontrast zwischen den anreichernden Herden und dem Gewebe* ergab, dass zwischen den MRT-Verfahren ein signifikanter Unterschied besteht. Im Vergleich zu den MRT-Aufnahmen der T_{1-} , T_{2-} -gewichteten und MT-Bildgebung wurden sowohl die MRT-Aufnahmen der T_{2^*} -gewichteten Bildgebung als auch der Phasenbildgebung signifikant höher bewertet. Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung dieses Parameters ebenfalls in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Weiterführende Analysen der MRT-Aufnahmen zeigen, dass der Einsatz von VSOP-C184 sich leicht negativ auf die Bildqualität der Phasenbilder auswirkt. Während in den T_{1-} , T_{2-} - und T_{2^*} -gewichteten und MT-Aufnahmen ausschließlich hypointense Herde detektiert wurden, hatten einige Herde in korrespondierenden Phasenbildern ein heterogenes Erscheinungsbild (hyper- und hypointens) (Abbildung 3.9). Als Konsequenz waren einige Herde vom umgebenden Gewebe etwas schlechter zu unterscheiden als in T_{2^*} -gewichteten MRT-Aufnahmen.

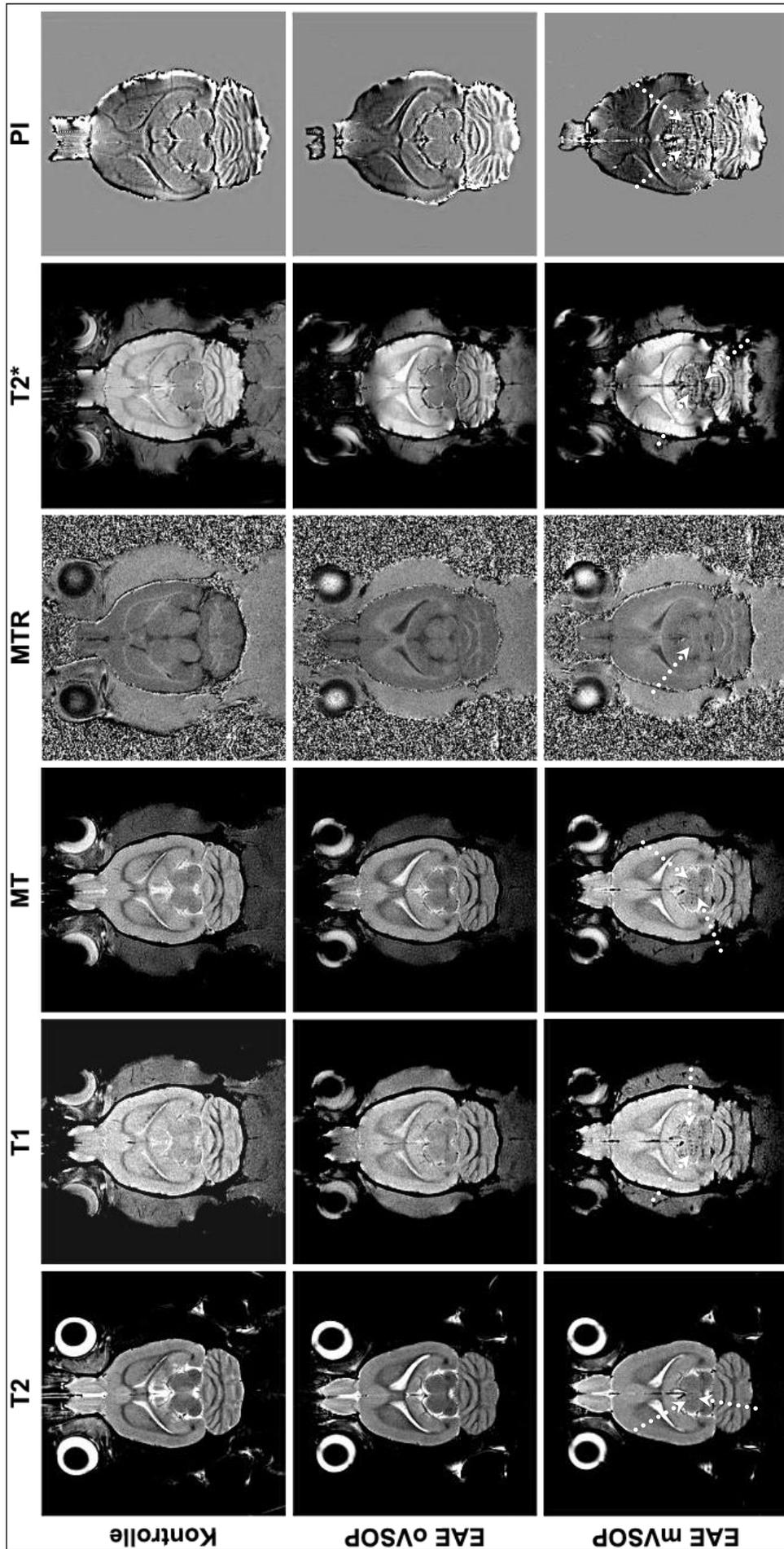


Abbildung 3.7: Vergleich der MRT-Aufnahmen der Kontroll- und EAE-Tiere in Anwesenheit (mVSOP) und in Abwesenheit von VSOP-C184 (oVSOP). Die MRT-Aufnahmen wurden mit verschiedenen MRT-Sequenzen am Tag 14 p.l. erstellt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle immunisierten Tiere Symptome einer akuten EAE. Dennoch sind ohne Injektion von VSOP-C184 keine Signalabnormitäten zu beobachten. 24 Stunden nach der i.v. Injektion von VSOP-C184 waren in allen MRT-Aufnahmen immunisierter Tiere hypointense Herde (weiße Pfeile) zu beobachten. Die räumliche Lokalisierung und Ausdehnung der hypointensen Herde ist in allen MRT-Aufnahmen sehr ähnlich. Dennoch variiert der Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe in Abhängigkeit vom MRT-Verfahren.

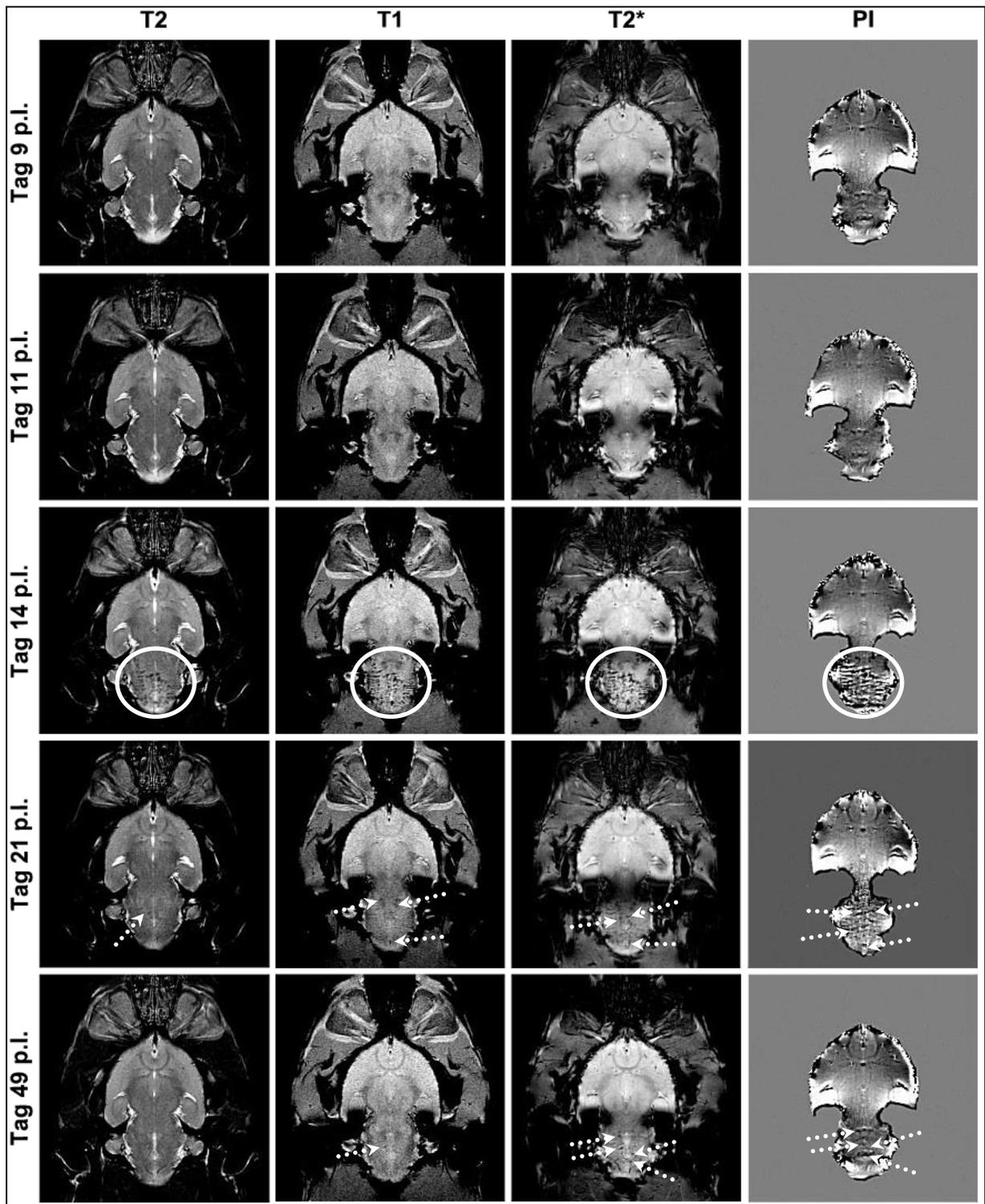


Abbildung 3.8: MRT-Aufnahmen des ZNS von Lewis-Ratten 24 Stunden nach der Injektion von VSOP-C184. Trotz klinischer Symptome und histologischer Befunde sind erstmals am Tag 14.p.i. hypointense Herde (Kreis), als Marker für inflammatorische Prozesse und BHS-Schäden, in MRT-Aufnahmen erkrankter Tiere zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die meisten hypointensen Herde detektiert, was mit den histologischen Befunden korreliert. An den darauffolgenden Tagen (Tag 21 und Tag 49 p.i.) waren in Abhängigkeit vom MRT-Verfahren nur noch vereinzelt hypointense Herde zu detektieren (weiße Pfeile). Während in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen bereits am Tag 21 p.i. kaum noch hypointense Herde zu detektieren waren, konnten sie in T_1 - und T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen sowie in Phasenbildern (PIs) bis Tag 49 p.i. detektiert werden. Das Verteilungsmuster der hypointensen Herde ähnelte sehr stark dem der Anreicherungen von Makrophagen, Lymphozyten und Mikrogliazellen.

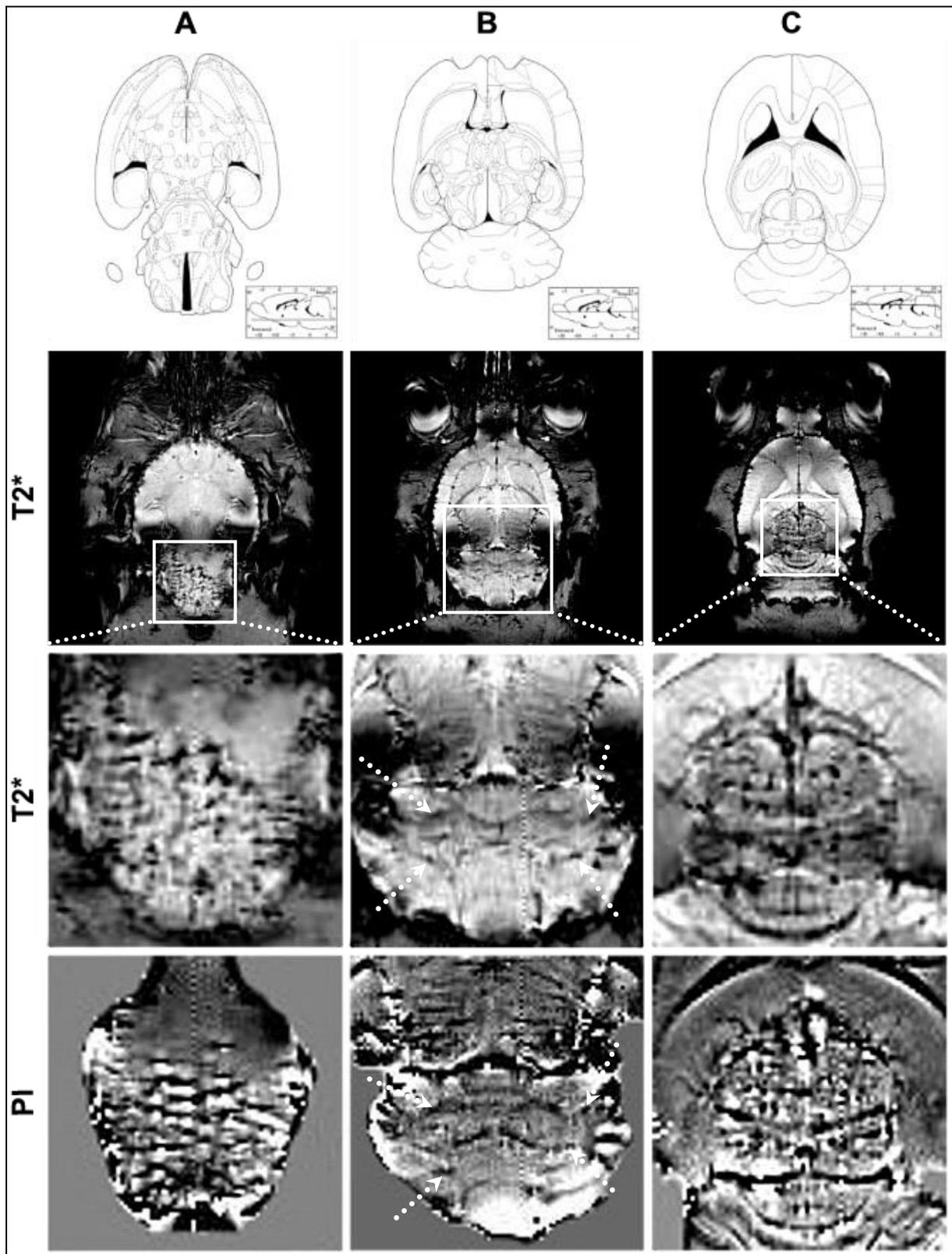


Abbildung 3.9: Verteilung hypointensiver Herde im ZNS von Lewis-Ratten mit akuter EAE. Die T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen und Phasenbilder (PIs) wurden am Tag 14 p.i. generiert, 24 Stunden nach einer i.v. Injektion von VSOP-C184. Zu diesem Zeitpunkt waren die meisten hypointensiven Herde im ZNS zu detektieren. Prädominant wurden hypointense Herde **(A)** im *Pons / Medulla oblongata*-Komplex des *Truncus cerebri*, **(B)** im *Cerebellum* (Pfeile) und **(C)** im *Mesencephalon* des *Truncus cerebri* lokalisiert. Im Vergleich zu T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen erscheinen einige Herde in PIs nicht (homogen) hypointens sondern (heterogen) hypointens / hyperintens.

3.1.5. Quantitative Ergebnisse MRT nach Applikation von VSOP-C184

Für einen Vergleich der Sensitivität und Spezifität zwischen den unterschiedlichen MRT-Verfahren wurden folgende Parameter bestimmt: (1) Das $CNR_{Läsion}$ und (2) das $SIC_{Läsion}$. Beide Parameter beschreiben den Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe.

Aufgrund der anatomischen Besonderheiten des *Cerebellums* und des *Mesencephalon* war eine quantitative Auswertung der MRT-Daten nach Kontrastmittelapplikation nicht möglich. Das *Cerebellum* ist in regelmäßigen Abständen von feinen *Folia cerebelli* und zarten, aber tiefen *Fissurae cerebelli* geprägt. Sie dienen der Oberflächenvergrößerung und sind mit *Liquor spinalis* (Cerebrospinalflüssigkeit, CSF) gefüllt. Als Folge waren bereits in EAE-Tieren ohne vorherige Kontrastmittelapplikation und in Kontrolltieren innerhalb der zerebellaren Strukturen starke Signalschwankungen vorhanden. Obwohl nach Applikation von VSOP-C184 eindeutig hypointense Herde detektiert werden konnten, war die Aussagekraft der berechneten CNR und SIC-Werte aufgrund dieser normalerweise schon vorhandenen starken Signalschwankungen eingeschränkt.

Das *Mesencephalon* stellt den obersten Abschnitt des *Truncus cerebri* dar. Darüber hinaus waren bei MRT-Messungen ohne vorherige Applikation von VSOP-C184 keine Signalschwankungen messbar, die das Ergebnis hätten negativ beeinflussen können. Jedoch waren in MRT-Untersuchungen nach Applikation von VSOP-C184 am Tag 14 oftmals p.l. so viele hypointense Herde im *Mesencephalon* zu detektieren, dass die hypointensen Herde nicht mehr eindeutig von dem umgebenden Gewebe getrennt werden konnten. Als Konsequenz bildeten die MRT-Daten des *Pons / Medulla oblongata*-Komplex des *Truncus cerebri* die Basis der quantitativen Analysen.

Die quantitative Analyse der MRT-Aufnahmen zeigte (Abbildung 3.10), dass 24 Stunden nach i.v. Applikation von VSOP-C184 das SNR_{ROI} innerhalb des ZNS unverändert blieb. Die SNR-Werte der EAE-Tiere nach Applikation von VSOP-C184 ähnelten daher denen der Kontrolltiere und denen der EAE-Tiere ohne vorherige Applikation von VSOP-C184. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass sich VSOP-C184 nicht gleichmäßig im gesamten Gewebe verteilt, sondern sich nach Störung der BHS nur fokal anreichert.

Wie bereits unter 3.1.4 erwähnt waren in der MRT nach der Applikation von VSOP-C184 am Tag 14 p.l. erstmals Signalabnormitäten in Form hypointensurer Herde zu beobachten. Diese Herde deuteten auf multiple inflammatorische Regionen hin, in denen es zur Akkumulation des VSOP-C184 kommt. Als Folge dieser Akkumulation wurden das SNR dieser inflammatorischen Regionen herab- und der Kontrast in Form des CNR und des SIC zum umgebenden Gewebe heraufgesetzt. Die Auswirkungen des VSOP-C184 auf die Kontrastwerte der inflammatorischen Regionen hing sowohl vom verwendeten MRT-Verfahren als auch von dem Zeitpunkt der Messung p.l. ab. Mit Ausnahme der MTR-Karten wurde in allen MRT-

Aufnahmen nach Kontrastmittelapplikation maximale Kontrastwerte am Tag 14 p.I. gemessen (Tabelle 3.4). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen nahmen der Kontrastwerte der hypointensen Herde kontinuierlich ab, bis keine Unterschiede mehr zum gesunden Gewebe nachweisbar waren.

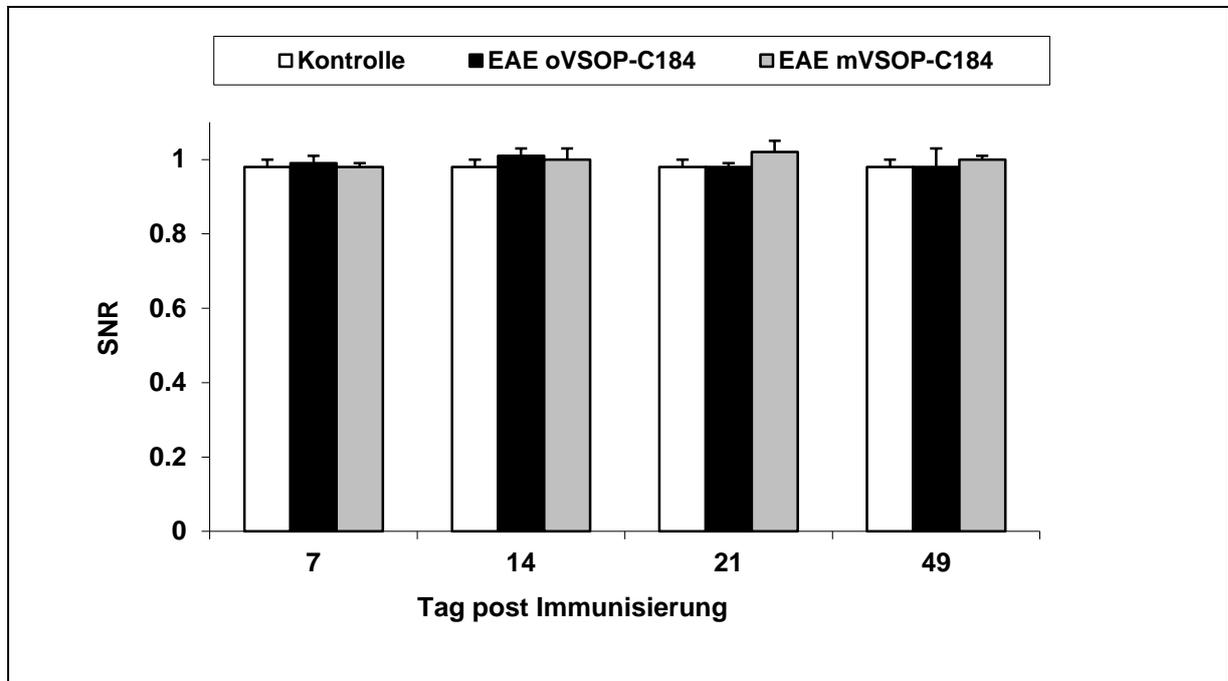


Abbildung 3.10: Auswirkungen von VSOP-C184 auf das SNR im ZNS von Lewis-Ratten mit akuter EAE. Die quantitative Auswertung zeigt, dass auch 24 Stunden nach der Applikation von VSOP-C184 das SNR der Gewebe unverändert blieb. Die SNR-Werte ähnelten daher denen der EAE-Tiere ohne vorherige Applikation von VSOP-C184 und denen der Kontrolltiere. Daraus resultiert die Annahme einer fokalen Anreicherung des VSOP-C184 in hypointensen Herden. Die Ergebnisse spiegeln die SNR-Werte des *Pons / Medulla oblongata*-Komplex im *Truncus cerebri* in Phasenbildern wider und sind als Mittelwerte \pm SD ausgedrückt.

3.1.5.1. T_2 -gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184

Ein Vergleich aller MRT-Aufnahmen nach Kontrastmittelapplikation zeigte, dass mit Ausnahme der MTR-Kartierungen der Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen am schwächsten ausgeprägt war (Tabelle 3.4, Abbildung 3.11 B). Als Konsequenz erschienen die inflammatorischen Regionen in den untersuchten ROIs auch am Tag ihrer stärksten Ausprägung (Tag 14 p.I.) nur als unscharfe hypointense Herde (Abbildungen 3.7, 3.8). Trotz des verschwommenen Erscheinungsbildes war der Unterschied zwischen dem SNR des Gewebes (SNR_{ROI}) und dem SNR der hypointensen Herden ($SNR_{Läsion}$) statistisch signifikant. An den darauffolgenden Tagen nahmen die Kontrastwerte der hypointensen Herde kontinuierlich ab, bis am Tag 49 p.I. keine mehr zu detektieren waren. Das SNR der hypointensen Herde, die am Tag 21 p.I. detektiert wurden, zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zum SNR des umgebenden Gewebes (Tabelle 3.4).

3.1.5.2. *T₁-gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184*

Im Vergleich zu den T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen nach Kontrastmittelapplikation, waren die hypointensen Herde in entsprechenden T₁-gewichteten MRT-Aufnahmen besser vom umgebenden Gewebe abgrenzbar. Darüber hinaus wurden an den jeweiligen Tagen der Untersuchung mehr Herde detektiert, die teilweise bis Tag 49 p.l. lokalisierbar waren. Die quantitative Analyse der entsprechenden MRT-Daten zeigte, dass die Kontrastwerte bis zu zwei Mal höher sind als in vergleichbaren MRT-Aufnahmen der T₂-gewichteten Bildgebung (durchschnittliche Steigerung CNR um 151,86% und SIC um 47,25%). Wie in T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen wurden die höchsten Kontrastwerte für die hypointensen Herde am Tag 14 p.l. ermittelt. Im weiteren Verlauf nahm auch hier der Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe weiter kontinuierlich ab. Am Tag 49 p.l. waren nur noch vereinzelt hypointense Herde im *Pons / Medulla oblongata*-Komplex des *Truncus cerebri* zu detektieren. Die statistische Analyse zeigt, dass sowohl am Tag 14, als auch Tag 21 p.l. ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem SNR_{ROI} und dem SNR_{Läsion} besteht. Am Tag 49 p.l. ist dieser Unterschied nicht mehr statistisch signifikant (Tabelle 3.4).

3.1.5.3. *MT-Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184*

Wie die MRT-Aufnahmen der T₁-gewichteten Bildgebung, basieren die MT-Aufnahmen auch auf einer FLASH-Sequenz. Die Analyse der entsprechenden MRT-Aufnahmen zeigte eine zeitliche und räumliche Verteilung der hypointensen Herde mit großer Ähnlichkeit zu den korrespondierenden T₁-gewichteten MRT-Aufnahmen. Dennoch zeigte ein Vergleich der entsprechenden Kontrastwerte, dass deren durchschnittliche Steigerung gegenüber der T₂-gewichteten in der MT-Aufnahmen weniger stark ausgeprägt war (durchschnittliche Steigerung CNR um 43,88% und SIC um 3,34%) als in der T₁-gewichteten Bildgebung (Tabelle 3.4). Die maximalen Kontrastwerte für die hypointensen Herde wurden auf dem Höhepunkt der Erkrankung gemessen. Wie bei den anderen MRT-Verfahren nahm der Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe weiter kontinuierlich ab. Ähnlich der T₂-gewichteten Bildgebung war nur am Tag 14 p.l. ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem SNR_{ROI} und dem SNR_{Läsion} in MT-Aufnahmen vorhanden.

3.1.5.4. *MTR-Karten nach Applikation von VSOP-C184*

Die histopathologischen Untersuchungen zeigten, dass es innerhalb der zerebralen Strukturen der Lewis-Ratten mit akuter EAE zu lokalen Entzündungsprozessen aber nicht zu lokalen Demyelinisierungen kommt. Die MTR-Karten zeigten zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung lokale Veränderungen innerhalb des *Cerebrums* was mit dem unveränderten Myelinisierungsgrad übereinstimmt. Das bedeutet auch, dass die histologisch nachgewiesenen inflammatorischen Prozesse in MTR-Karten nicht abgebildet werden.

3.1.5.5. T_2^* -gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C184

Der stärkste Kontrast zwischen den hypointensen Herden und dem umgebenden Gewebe wurde mit einer T_2^* -gewichteten Bildgebung gemessen. Die Kontrastwerte der hypointensen Herde waren bis zu sechs Mal höher als in der T_2 -gewichteten Bildgebung (durchschnittliche Steigerung CNR um 536,98% und SIC um 232,26%). Entsprechend den anderen MRT-Verfahren wurden am Tag 14 p.l. die höchsten Kontrastwerte für die hypointensen Herde ermittelt. Obwohl die Kontrastwerte auch hier im weiteren Verlauf kontinuierlich abnahmen, waren auch am Tag 21 und am Tag 49 p.l. deutlich ausgeprägte hypointense Herde zu detektieren. Darüber hinaus war es möglich einzelne hypointense Herde besser voneinander, als auch vom umgebenden Gewebe zu differenzieren. Die statistische Analyse zeigte, dass der Unterschied zwischen dem SNR_{ROI} und dem $SNR_{Läsion}$ an den Tagen 14 und 21 p.l. statistisch signifikant ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die T_2^* -gewichtete Bildgebung bei Anwesenheit von VSOP-C184, das sensitivste MRT-Verfahren bei der Detektion inflammatorischer Prozesse ist.

Der mittlere Durchmesser einer hypointensen Herde betrug für alle immunisierten Lewis-Ratten $259.7 \pm 63.8 \mu\text{m}$. Die größten hypointensen Herde wurden am Tag 14 p.l. im *Mesencephalon* des *Cerebrums* immunisierter Tiere detektiert (Tabelle 3.3). Die Mehrzahl hypointensere Herde war jedoch im *Pons / Medulla Oblongata*-Komplex des *Truncus cerebri* zu finden. Obwohl im *Prosencephalon* des *Truncus cerebri* und im *Cerebellum* auch hypointense Herde detektiert wurden, waren sie dort weniger häufig zu finden.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der quantitativen Analyse hypointensere Herde in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen im akuten EAE-Modell. Ermittelt wurde der mittlere Durchmesser (\pm SD; μm) der hypointensere Herde in verschiedenen zerebralen Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE.

Tag p.l.	<i>Prosencephalon</i>	<i>Mesencephalon</i>	<i>Cerebellum</i>	<i>Pons/ Medulla oblongata</i>	Mittelwerte
14	276.8 ± 58.8	277.0 ± 113.8	259.8 ± 70.8	254.7 ± 52.4	262.3 ± 69.9
21	261.8 ± 21.2	237.3	272.0 ± 68.4	259.3 ± 48.0	263.2 ± 53.9
49	-	-	235.6 ± 32.8	238.3 ± 59.1	237.8 ± 53.8

3.1.5.6. Phasenbildgebung nach Applikation von VSOP-C184

Neben der Erstellung entsprechender MRT-Aufnahmen wurden die Rohdatensätze der T_2^* -gewichteten Bildgebung zur Generierung von Phasenbildern verwendet. Das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster der in Phasenbildern auftretenden hypointensere Herde ähnelte daher sehr stark dem Verteilungsmuster der korrespondierenden T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Dementsprechend wurden die maximalen Kontrastwerte für hypointensere Herde am Tag 14 p.l. ermittelt. Die Spezifizierung der hypointensere Herde war mit der T_2^* -

gewichteter MRT-Aufnahmen vergleichbar und ermöglichte eine langfristige Beobachtung bis mindestens Tag 49 p.l. (Abbildung 3.8). Trotz der Ähnlichkeiten sind die absoluten Kontrastwerte hypointenser Herde in Phasenbildern deutlich kleiner (Tabelle 3.4). Dennoch zeigt die statistische Analyse, dass der Unterschied zwischen dem SNR_{ROI} und dem $SNR_{Läsion}$ am Tag 14 und Tag 21 p.l. auch hier statistisch signifikant ist.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im akuten EAE-Modell. Die ermittelten Werte resultieren aus der Bemessung des SNR hypointenser Herde ($SNR_{Läsion}$) und des SNR im *Pons / Medulla oblongata*-Komplex (SNR_{ROI}). Tag p.l. / (n) Tiere (14 / 5; 21 / 4; 49 / 3). Mittelwerte \pm SD.

	Tag p.l.	T2	T1	MT	T2*	PI
CNR	14	3.3 \pm 1.4*	7.3 \pm 2.9*	4.9 \pm 2.1*	21.2 \pm 4.3*	
	21	2.4 \pm 0.5	4.5 \pm 1.4*	3.8 \pm 1.7	13.5 \pm 4.9*	
	49	0.9 \pm 0.9	3.1 \pm 1.7	1.1 \pm 0.4	6.3 \pm 2.0	
SIC	14	14.4 \pm 6.2*	20.2 \pm 7.5*	16.30 \pm 6.6*	47.8 \pm 11.1*	15.2 \pm 7.8*
	21	12.0 \pm 3.1	12.7 \pm 3.9*	12.40 \pm 5.0	34.8 \pm 11.8*	9.9 \pm 7.8*
	49	4.6 \pm 4.4	9.0 \pm 4.7	4.30 \pm 0.8	16.0 \pm 3.1	5.3 \pm 1.1

*p < 0,05 signifikanter Unterschied zwischen SNR_{ROI} und $SNR_{Läsion}$, Wilcoxon-Test

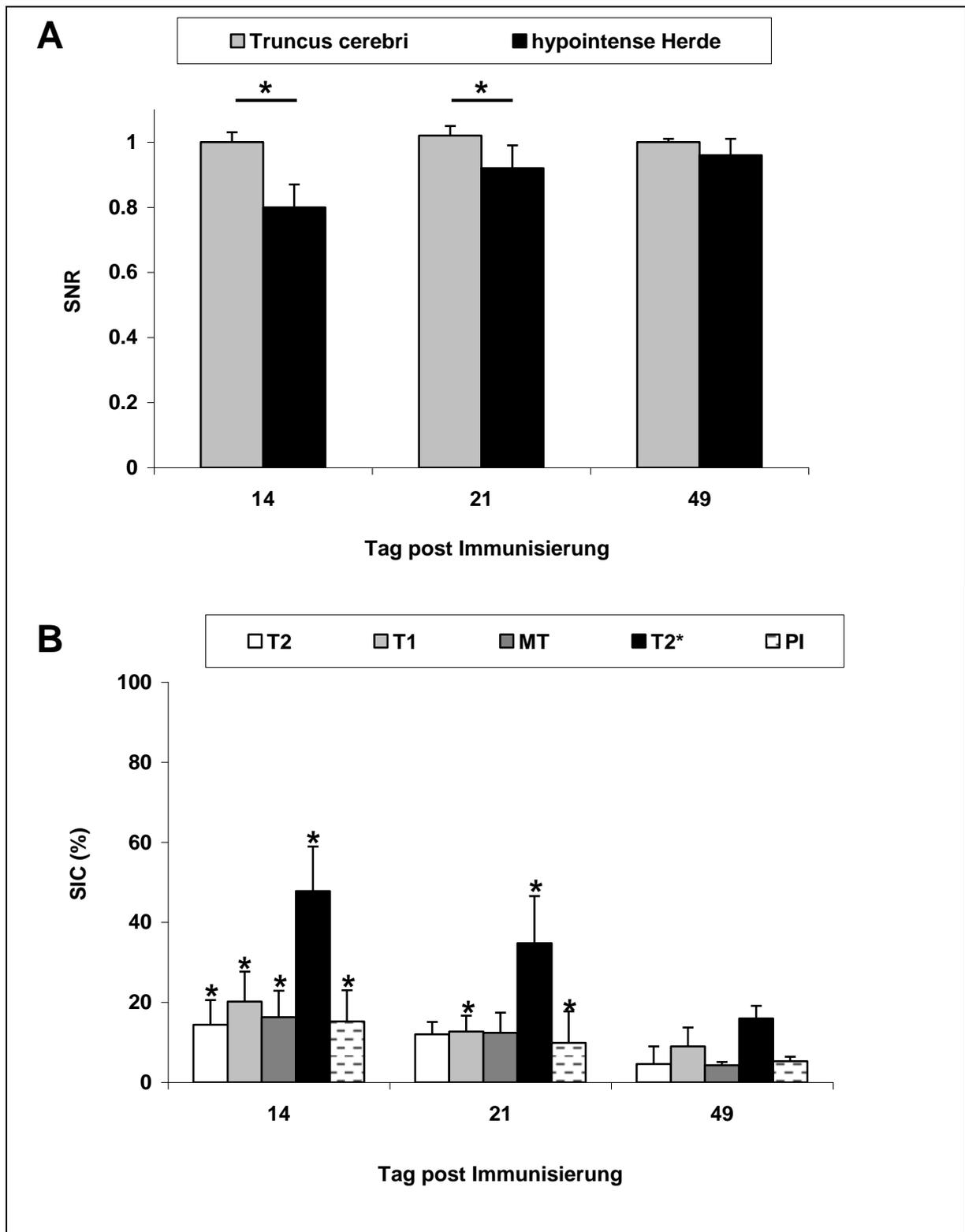


Abbildung 3.11: Ergebnisse der quantitativen Analyse der MRT-Aufnahmen. (A) Auswirkungen des VSOP-C184 auf das SNR hypointensurer Herde ($SNR_{Läsion}$) und das SNR des *Pons / Medulla oblongata*-Komplex (SNR_{ROI}) in Phasenbildern (PIs). **(B)** Signaländerung (SIC) durch VSOP-C184 in Abhängigkeit vom angewandten MRT-Verfahren und dem Zeitpunkt p.l.. Sowohl in PIs als auch in den MRT-Aufnahmen der T_1 -, T_2 -, T_2^* - und MT-Bildgebung ist am Tag 14 p.l. ein signifikanter Unterschied zwischen $SNR_{Läsion}$ und SNR_{ROI} nachzuweisen. Am Tag 21 p.l. sind nur in T_1 - und T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen und in PIs signifikante Unterschiede zwischen $SNR_{Läsion}$ und SNR_{Gewebe} nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem SNR_{ROI} und dem $SNR_{Läsion}$ wird bei $*p < 0.05$ angenommen. Mittelwerte \pm SD.

3.2. Ergebnisse zur MOG-induzierten hyperakuten EAE in DA-Ratten

3.2.1. Klinischer Verlauf der hyperakuten EAE

In einem zweiten Tiermodell wurde die EAE in DA-Ratten ($n = 5$) durch eine s.c. Injektion einer *rrMOG*₁₋₁₂₅-Emulsion (200 μ l) am Ausgangstag induziert. Kontrolltiere erhielten 200 μ l einer PBS / KFA-Emulsion s.c. injiziert und zeigten keine neurologischen Symptome einer EAE. Im Vergleich zum akuten EAE-Modell, war in einem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen ein rapid ansteigender Verlauf der Erkrankung zu beobachten, der in der Regel zum Tod führte (Abbildung 3.12). Sowohl der progrediente Verlauf als auch die hohe Sterblichkeitsrate sind charakteristisch für die hyperakute EAE. Bei der Mehrzahl der Tiere waren die ersten neurologischen Symptome einer hyperakuten EAE am Tag 11 p.l. zu beobachten. Die Symptome reichten von einem kompletten Verlust des Schwanztonuses (2 von 5) bis hin zur Paralyse der Hinterbeine (1 von 5), was einem dkW_{11} von $1,1 \pm 1,2$ entsprach. Bereits 24 Stunden später (Tag 12 p.l.) zeigten alle immunisierten Tiere eine deutlich verschlechterte Symptomatik, woraus ein Anstieg des dkW_{12} auf $3,2 \pm 1,6$ resultierte. Im weiteren Verlauf nahmen die Symptome der EAE noch weiter zu oder hielten über mehrere Tage an. Der maximale dkW_{16} mit $5,3 \pm 1,5$ wurde am Tag 16 p.l. erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war die Mehrzahl der erkrankten Tiere (4 von 5) bereits gestorben oder erfüllten die Abbruchkriterien (siehe 2.8.2). Im Verlauf der EAE konnte bei allen immunisierten Tieren ein kontinuierlicher Gewichtsverlust nachgewiesen werden, der insgesamt $18,8\% \pm 2,5\%$ betrug (Abbildung 3.12).

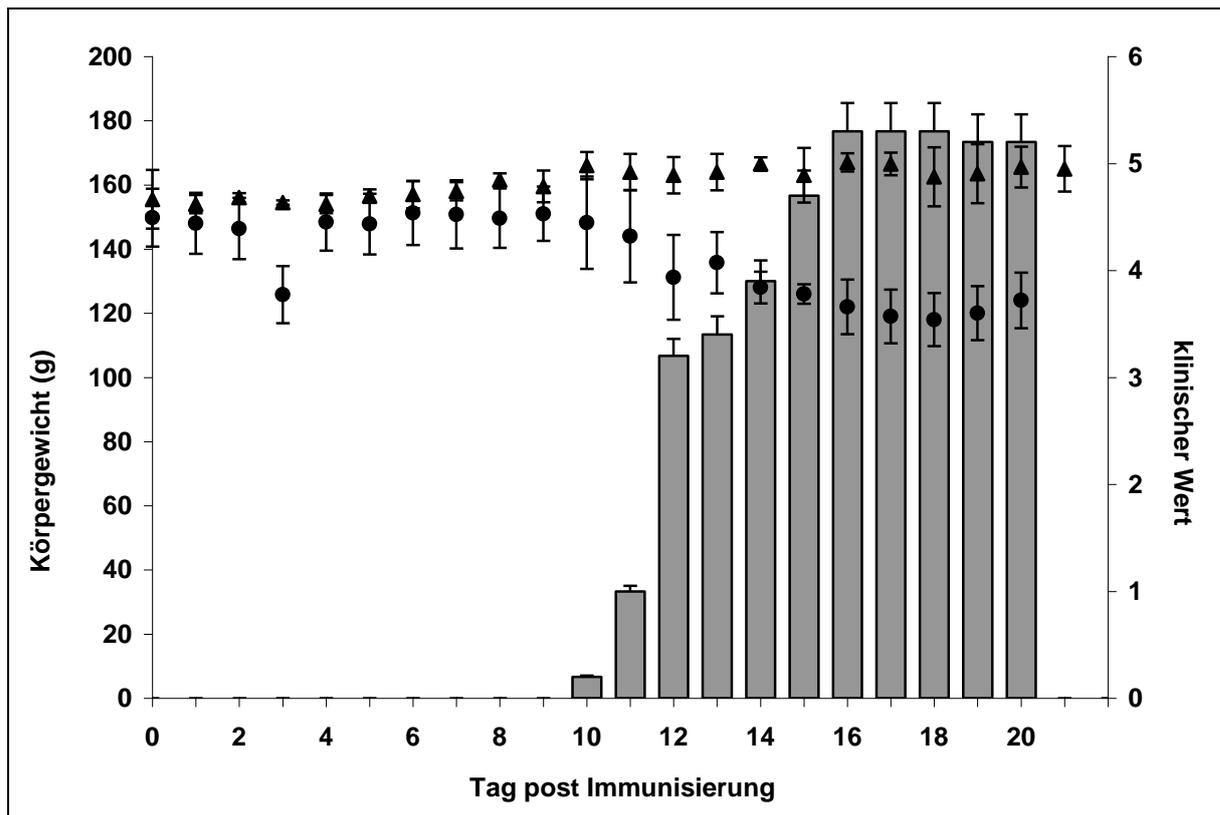


Abbildung 3.12: Klinischer Verlauf der MOG induzierten hyperakuten EAE in DA-Ratten. Die hyperakute EAE ist durch einen progredienten Verlauf (Balken) und eine hohe Sterblichkeitsrate charakterisiert. Die Mehrzahl immunisierter Tiere zeigten am Tag 11 p.i. erste neurologische Symptome (dkW_{11} von $1,1 \pm 1,2$). Bereits nach 24 Stunden zeigten diese Tiere eine deutlich verschlechterte Symptomatik (dkW_{12} $3,2 \pm 1,6$). Im weiteren Verlauf stieg der klinische Wert noch weiter an oder hielt mehrere Tage an. Der maximale klinische Wert war am Tag 16 p.i. (dkW_{16} $5,3 \pm 1,5$) erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war die Mehrzahl der immunisierten Tiere bereits gestorben oder erfüllten die Abbruchkriterien. Im Verlauf der Erkrankung konnte bei allen Tieren bis Tag 18 p.i. ein kontinuierlicher Gewichtsverlust von durchschnittlich $18,8 \pm 2,5\%$ beobachtet werden (Kreise). Bei Kontrolltieren konnten weder klinische Symptome einer EAE noch ein Gewichtsverlust beobachtet werden (Dreiecke). Die klinischen Werte sind als Mittelwerte mit einer festen SD von 5% ausgedrückt. Die Werte für das Körpergewicht sind als Mittelwerte \pm SD ausgedrückt.

3.2.2. Histologische und immunhistochemische Ergebnisse

Um die Auswirkungen der hyperakuten EAE im ZNS zu charakterisieren, wurden wiederum histochemische Analysen durchgeführt. Weder die Gallyas-Silberfärbung (Abbildungen 3.13-3.16 A-D) noch eine immunhistochemische MBP-Färbung lieferten Hinweise für lokale Demyelinisierungen im ZNS.

Im Vergleich zum akuten EAE-Modell konnten bei der hyperakuten EAE bereits durch HE- (Abbildungen 3.13-3.16 J-L) bzw. Nissl-Färbungen (Abbildungen 3.13-3.16 N-P) Gewebeschäden und auffällige Zellansammlungen in der Nähe kleiner und größerer Gefäße beobachtet werden. Sowohl das Ausmaß der Schädigung als auch das der Zellansammlungen nahm mit dem Schweregrad der Erkrankung zu. Fokale Akkumulationen von Mikrogliazellen, die durch eine HE-Färbung detektiert wurden, deuten auf eine gestörte Permeabilität der BHS hin.

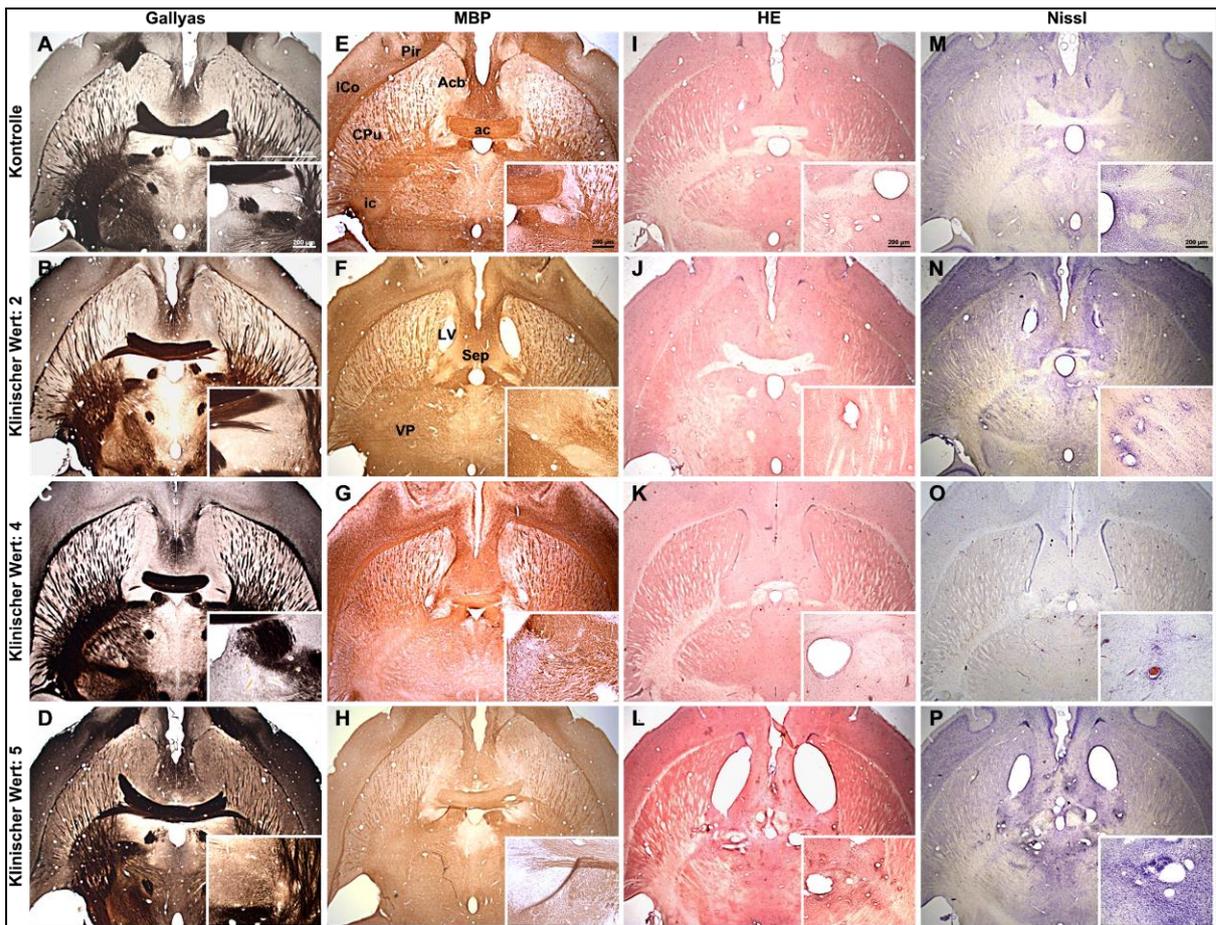


Abbildung 3.13: Histopathologische Verifizierung im Cortex, basalen Prosencephalon und ventralen Thalamus von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl). Im gesamten Verlauf der hyperakuten EAE konnten weder mit der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) Hinweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich der ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Allerdings sind mit Hilfe der HE-Färbung (I-L, x10 untere rechte Ecke) und der Nissl-Färbung (M-P, x10 untere rechte Ecke) Gewebeschäden und auffällige Zellansammlungen zu beobachten. Die Ausdehnung der Gewebeschäden und der Zellansammlungen hängt dabei vom klinischen Wert und somit dem Grad der Erkrankung ab. Ähnlich dem akuten EAE-Modell sind die Gewebeschäden und Zellansammlungen um Blutgefäße herum zu beobachten. Allerdings sind die Ausdehnungen der Gewebeschäden und Zellansammlungen größer als im akuten EAE-Modell. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 µm. Abk.: ac - *commissura anterior*; Acb - *nucleus accumbens*; CPU - *caudate putamen*; ic - *capsula interna*; ICo - *cortex insularis*; LV - *lateraler Ventrikel*; Pir - *cortex piriformis*; Sep - *septum pelucidum*; VP - *Ventraler posterior nucleus thalamus*.

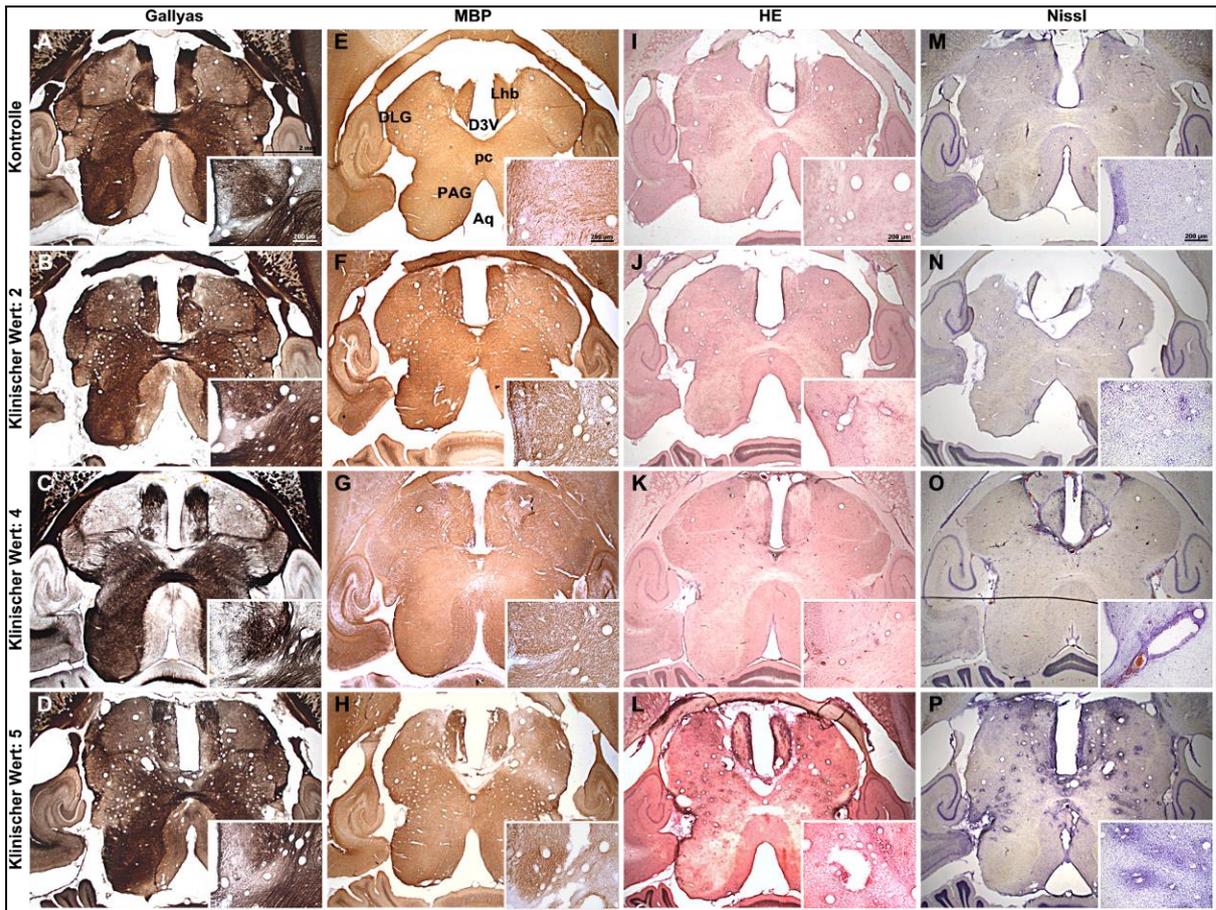


Abbildung 3.14: Histopathologische Verifizierung im Thalamus und Mesencephalon von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl). Im gesamten Verlauf der hyperakuten EAE konnten weder mit der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) Hinweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich der ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Allerdings sind mit Hilfe der HE-Färbung (I-L, x10 untere rechte Ecke) und der Nissl-Färbung (M-P, x10 untere rechte Ecke) Gewebeschäden und auffällige Zellansammlungen zu beobachten. Die Ausdehnung der Gewebeschäden und der Zellansammlungen hängt dabei vom klinischen Wert und somit dem Grad der Erkrankung ab. Ähnlich dem akuten EAE-Modell sind die Gewebeschäden und Zellansammlungen um Blutgefäße herum zu beobachten. Allerdings sind die Ausdehnungen der Gewebeschäden und Zellansammlungen größer als im akuten EAE-Modell. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 µm. Abk.: Aq - aquaeductus mesencephali; 3V - Dritter Ventrikel; D3V - Dorsaler dritter Ventrikel; DLG - Dorsal lateraler *nucleus geniculatus*; LHb - Laterale *nuclei habenulares*; MHb - Mittlere *nuclei habenulares*; PAG - Periaquäduktales Grau; pc - *commissura posterior*.

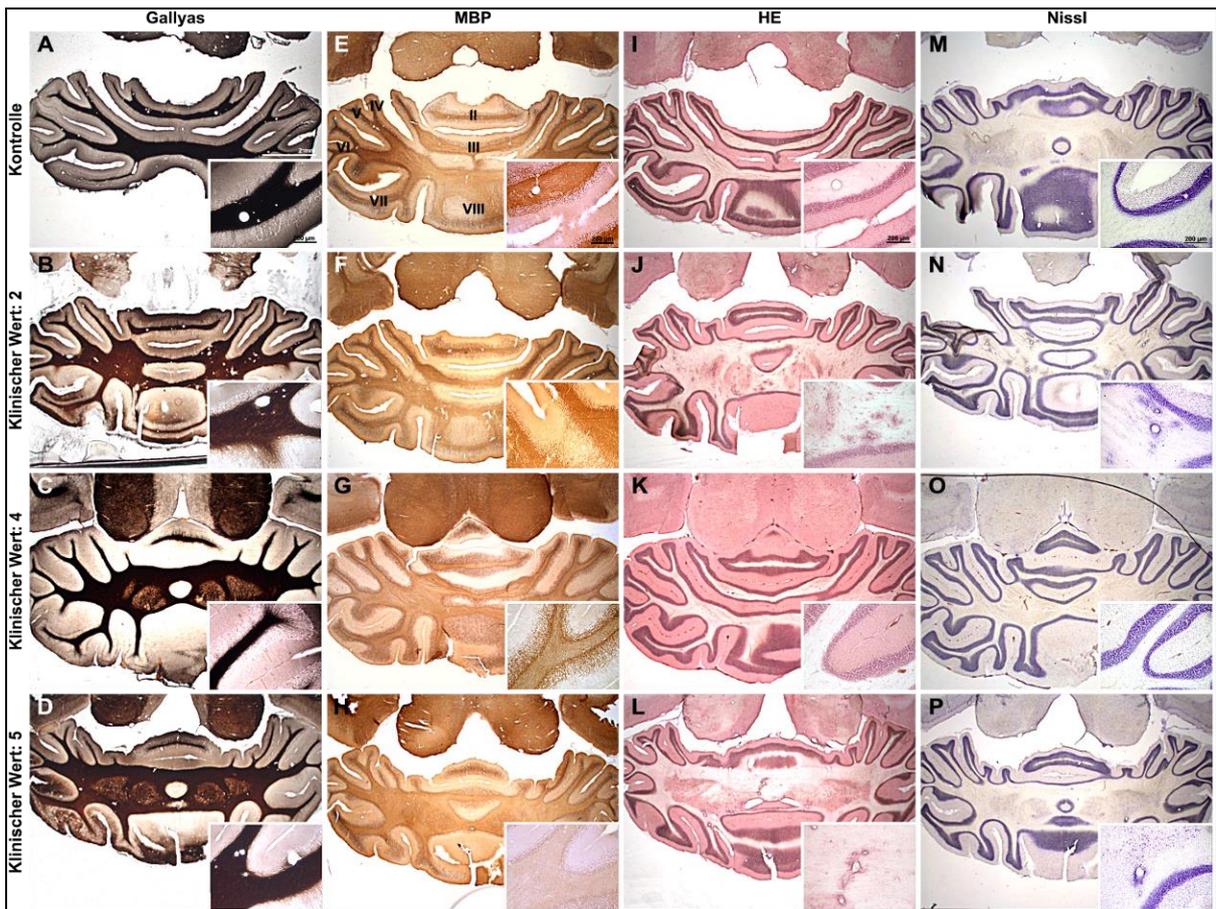


Abbildung 3.15: Histopathologische Verifizierung im *Cerebellum* von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl). Im gesamten Verlauf der hyperakuten EAE konnten weder mit der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) Hinweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich der ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Allerdings sind mit Hilfe der HE-Färbung (I-L, x10 untere rechte Ecke) und der Nissl-Färbung (M-P, x10 untere rechte Ecke) Gewebeschäden und auffällige Zellansammlungen zu beobachten. Die Ausdehnung der Gewebeschäden und der Zellansammlungen hängt dabei vom klinischen Wert und somit dem Grad der Erkrankung ab. Ähnlich dem akuten EAE-Modell sind die Gewebeschäden und Zellansammlungen um Blutgefäße herum zu beobachten. Im Vergleich zu anderen Bereichen des ZNS (Abbildungen 3.13, 3.14) waren die Hinweise auf inflammatorische Prozesse schwächer ausgeprägt. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 µm. Die römischen Ziffern kennzeichnen einige der zerebellaren *Lobuli*.

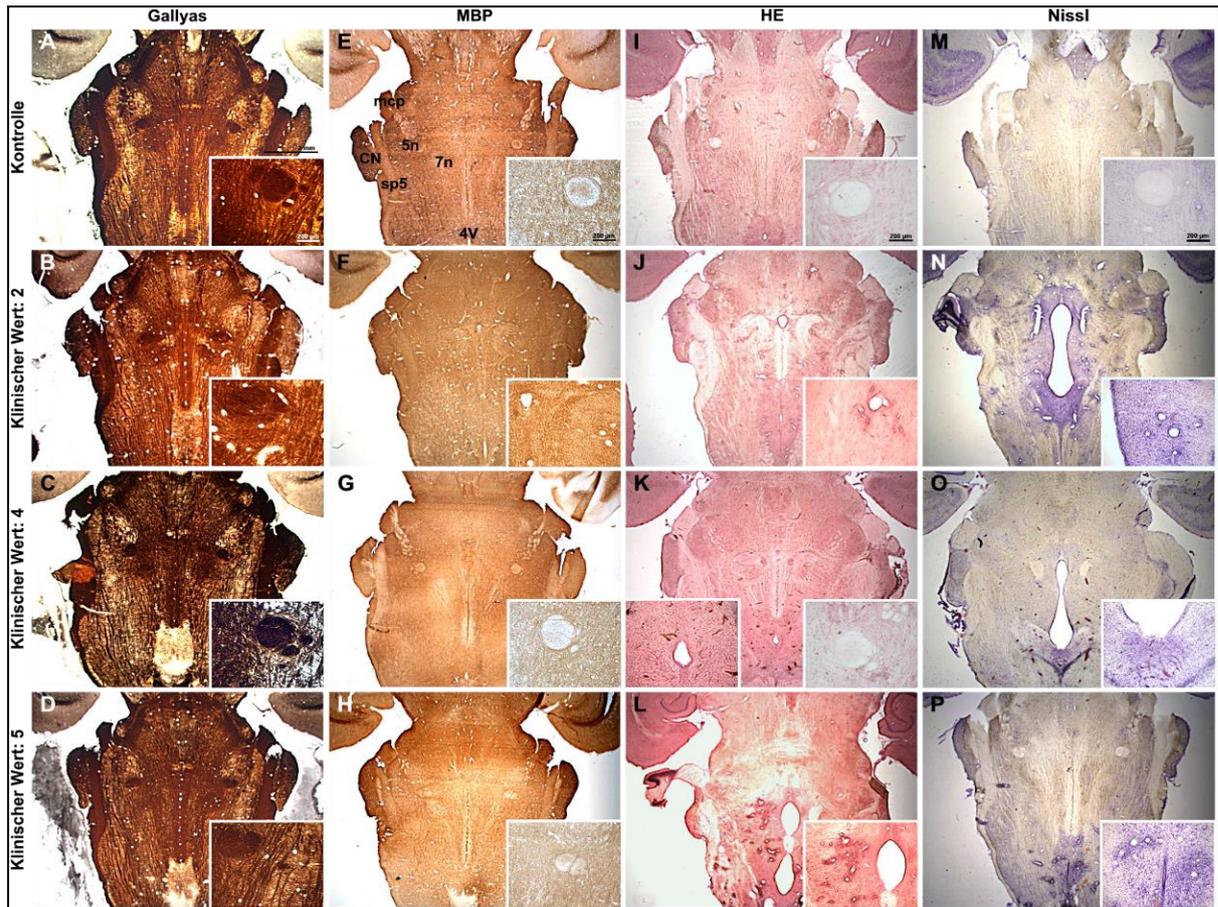


Abbildung 3.16: Histopathologische Verifizierung im *Truncus cerebri* von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Gallyas, MBP, HE, Nissl). Im gesamten Verlauf der hyperakuten EAE konnten weder mit der Gallyas-Silberfärbung (A-D, x10 untere rechte Ecke) noch der MBP-Färbung (E-H, x10 untere rechte Ecke) Hinweise für Demyelinisierungen in diesem Bereich der ZNS erkrankter Tiere verifiziert werden. Allerdings sind mit Hilfe der HE-Färbung (I-L, x10 untere rechte Ecke) und der Nissl-Färbung (M-P, x10 untere rechte Ecke) Gewebeschäden und auffällige Zellansammlungen zu beobachten. Die Ausdehnung der Gewebeschäden und der Zellansammlungen hängt dabei vom klinischen Wert und somit dem Grad der Erkrankung ab. Ähnlich dem akuten EAE-Modell sind die Gewebeschäden und Zellansammlungen um Blutgefäße herum zu beobachten. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 µm. Abk.: 4V – Vierter Ventrikel; 5n – nervus trigeminus; 7n – nervus facialis; CN – nucleus cochlearis; mcp – pedunculus cerebellaris medius; sp5 – spinaler nervus trigeminus.

Die immunhistochemische Albumin-Färbung zeigt innerhalb aller untersuchten Hirnstrukturen Ansammlungen von extravasalem Albumin (Abbildungen 3.17-3.20 B-D). Unabhängig vom klinischen Wert wurde extravasales Albumin sowohl in der Nähe großer (Abbildung 3.17 C) als auch kleiner Blutgefäße (Abbildungen 3.17 B, D) nachgewiesen. Ein Vergleich der histologischen Schnitte zeigte, dass die Akkumulation extravasalen Albumins mit dem Schweregrad der EAE zunimmt. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf eine zunehmende Permeabilität der BHS hin und unterstützen die Ergebnisse der HE-Färbung.

Einen weiteren Beweis für die Störung der BHS lieferte der Nachweis fokaler Akkumulationen CD31-positiver Zellen (Abbildungen 3.17-3.20 F-H). Ähnlich den oben erwähnten Befunden nahm die Ausprägung der Akkumulationen der CD31-positiven Zellen im Verlauf der

EAE zu. Dementsprechend waren die fokalen Akkumulationen CD31-positiver Zellen bei einem klinischen Wert von 5 am stärksten ausgeprägt. Eine massive Einwanderung konnte dabei über die große Blutgefäße, dem dritten Ventrikel, den lateralen Ventrikeln auf Höhe des *Thalamus / Mesencephalon* (Abbildungen 3.18 F-H) sowie dem vierten Ventrikel im *Truncus cerebri* auf Höhe der *Medulla oblongata* (Abbildungen 3.20 F-H), beobachtet werden. Darüber hinaus sind, in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung, zunehmende Einwanderungen über kleinere Blutgefäße zu erkennen (Abbildungen 3.17-3.20 E-H).

Zusätzlich zu diesen histologischen und immunhistologischen Befunden konnten innerhalb des ZNS erkrankter Tiere wiederum perivaskulär Akkumulationen CD68-positiver Zellen detektiert werden. In Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden waren die Akkumulationen CD68-positiver Zellen bei einem klinischen Wert von 5 am stärksten ausgeprägt. In ihrer räumlichen Verteilung waren fokale Akkumulationen in der Nähe kleiner und großer Blutgefäße zu lokalisieren.

Der mittlere Durchmesser einer inflammatorischen Region betrug für alle immunisierten DA-Ratten $303.9 \pm 152.7 \mu\text{m}$.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der CD68-Färbung im hyperakuten EAE-Modell. Ermittelt wurde der mittlere Durchmesser (\pm SD; μm) der inflammatorischen Regionen in verschiedenen zerebralen Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE.

dkW	Tag p.l.	Prosencephalon	Mesencephalon	Cerebellum	Pons / Medulla oblongata	Mittelwerte
2	20	289.8 \pm 76.9	307.8 \pm 146.1	289.9 \pm 103.7	305.7 \pm 86.9	296.9 \pm 100.3
4	15	228.7 \pm 88.5	241.3 \pm 49.2	229.3 \pm 56.5	240.4 \pm 67.3	236.1 \pm 62.0
4	14	285.8 \pm 76.8	263.2 \pm 142.2	-	225.6 \pm 45.0	250.1 \pm 80.1
5	15	249.9 \pm 73.7	329.2 \pm 78.4	782.1 \pm 501.2	189.4 \pm 43.0	290.2 \pm 163.1
5	11	748.6 \pm 164.1	491.9 \pm 264.1	484.7 \pm 253.2	349.9 \pm 160.8	545.9 \pm 240.0

Zusammenfassend ergeben die histopathologischen Untersuchungen folgenden Befund: (1) Die lokalen inflammatorischen Prozesse beginnen zwischen Tag 10/11 p.l. und zeigen eine starke Progredienz bis zum Tag 15 p.l.. (2) Die Permeabilität der BHS ist ab Tag 10/11 p.l. gestört und verstärkt sich bis zum Tag 15 p.l.. (3) Im Vergleich zum akuten EAE-Modell gibt es bei der hyperakuten EAE lokal massive Gewebeschäden. (4) Trotz massiver lokaler inflammatorischer Prozesse gibt es keine Anzeichen einer Demyelinisierung.

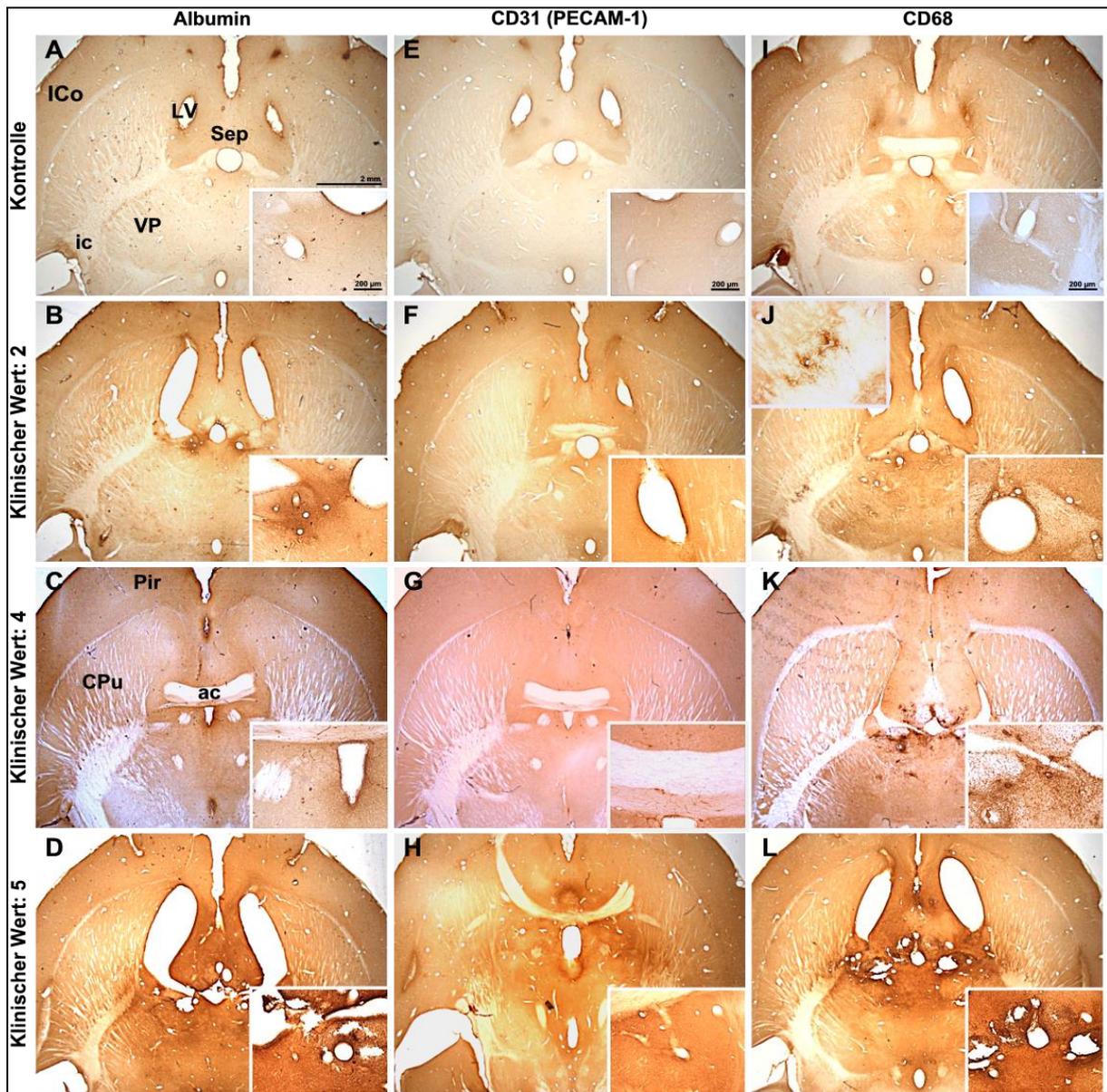


Abbildung 3.17: Histopathologische Verifizierung im Cortex, basalen Prosencephalon und ventralen Thalamus von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68). Im Verlauf der hyperakuten EAE konnten in immunisierten Tieren Anreicherungen extravasalen Albumins nachgewiesen werden (**A-D, x10 untere rechte Ecke**). Unabhängig vom klinischen Wert waren die Anreicherungen in der Nähe kleiner und großer Blutgefäße zu beobachten. Dennoch nimmt die Akkumulation extravasalen Albumins mit steigendem klinischen Wert zu. Ähnliche Befunde lieferten CD31-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (**E-H, x10 untere rechte Ecke**) sowie CD68-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (**I-L, x10 untere rechte bzw. obere linke Ecke**). Dementsprechend waren fokale Akkumulationen dieser Zellen bei einem klinischen Wert von fünf am stärksten ausgeprägt. In ihrer räumlichen Verteilung waren auch diese Anreicherungen in der Nähe von Blutgefäßen zu lokalisieren. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 μm . Abk.: ac - *commissura anterior*; Acb - *nucleus accumbens*; CPu - *caudate putamen*; ic - *capsula interna*; ICo - *cortex insularis*; LV - *lateraler Ventrikel*; Pir - *cortex piriformis*; Sep - *septum pelucidum*; VP - *Ventral posterior nucleus thalamus*.

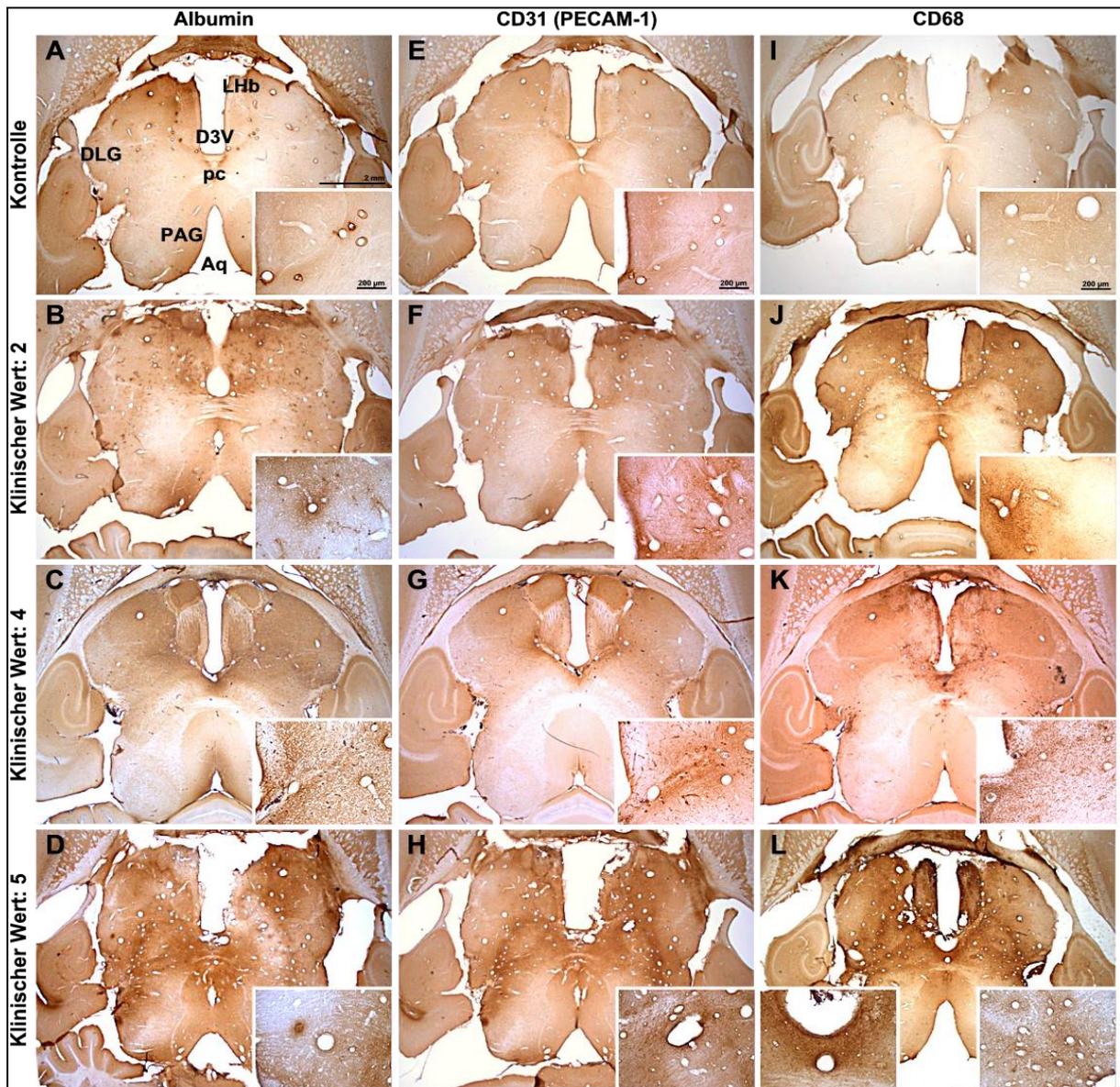


Abbildung 3.18: Histopathologische Verifizierung im *Thalamus* und *Mesencephalon* von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68). Im Verlauf der hyperakuten EAE konnten in immunisierten Tieren Anreicherungen extravasalen Albumins nachgewiesen werden (A-D, x10 untere rechte Ecke). Unabhängig vom klinischen Wert waren die Anreicherungen in der Nähe kleiner und großer Blutgefäße zu beobachten. Dennoch nimmt die Akkumulation extravasalen Albumins mit steigendem klinischen Wert zu. Ähnliche Befunde lieferten CD31-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (E-H, x10 untere rechte Ecke) sowie CD68-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (I-L, x10 untere rechte bzw. linke Ecke). Dementsprechend waren fokale Akkumulationen dieser Zellen bei einem klinischen Wert von fünf am stärksten ausgeprägt. In ihrer räumlichen Verteilung waren auch diese Anreicherungen in der Nähe von Blutgefäßen zu lokalisieren. Eine massive Anreicherung konnte über große Blutgefäße, wie dem dorsalen dritten Ventrikel (D3V) und den lateralen Ventrikeln beobachtet werden. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 μm . Abk.: Aq - aquaeductus mesencephali; 3V - Dritter Ventrikel; DLG - Dorsal lateraler nucleus geniculatus; Lhb - Laterale nuclei habenulares; MHb - Mittlere nuclei habenulares; PAG - Periaquäduktales Grau; pc - commissura posterior.

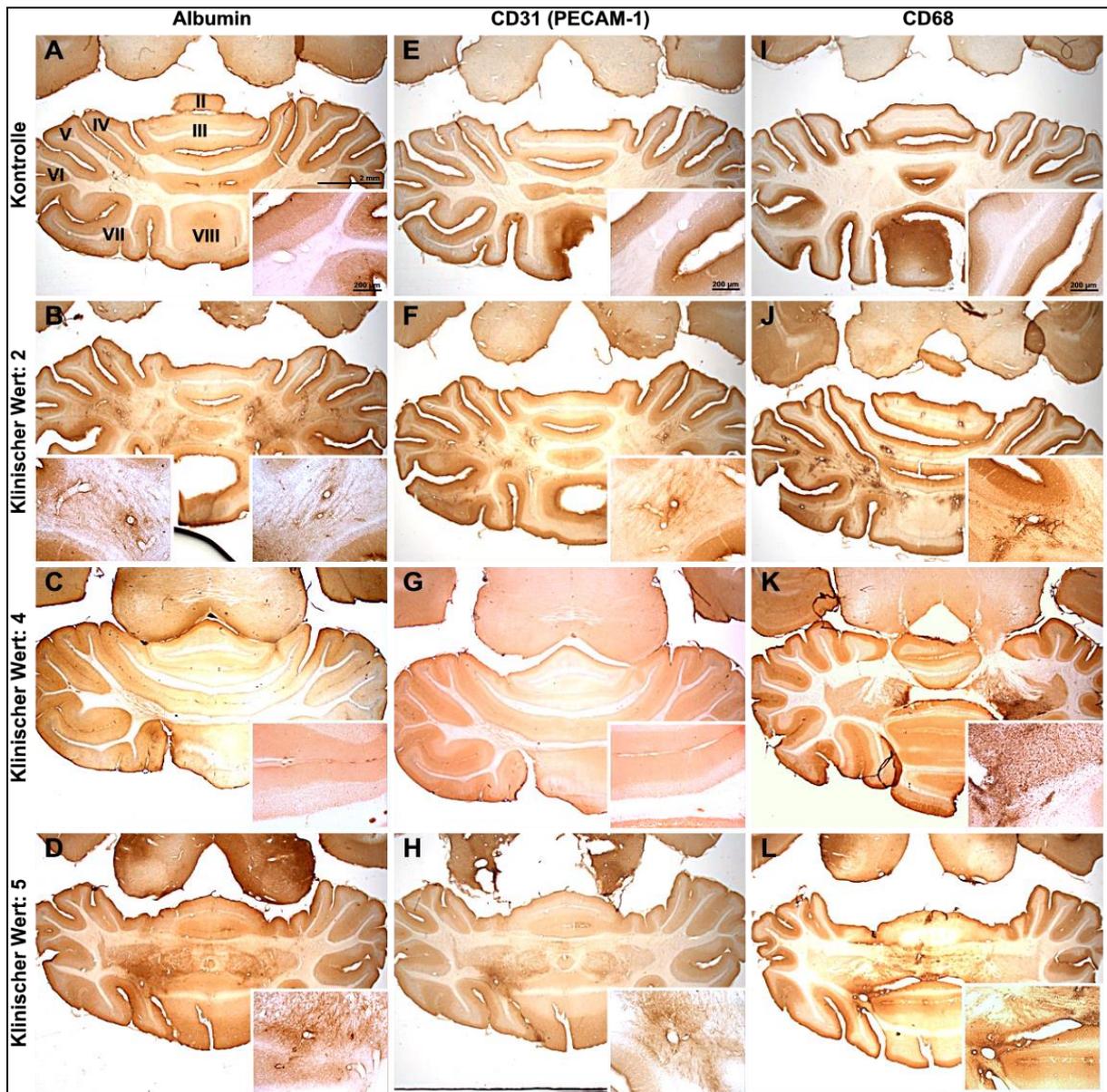


Abbildung 3.19: Histopathologische Verifizierung im Cerebellum von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68). Im Verlauf der hyperakuten EAE konnten in immunisierten Tieren Anreicherungen extravasalen Albumins nachgewiesen werden (A-D, x10 untere rechte Ecke). Unabhängig vom klinischen Wert waren die Anreicherungen in der Nähe kleiner und großer Blutgefäße zu beobachten. Dennoch nimmt die Akkumulation extravasalen Albumins mit steigendem klinischen Wert zu. Ähnliche Befunde lieferten CD31-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (E-H, x10 untere rechte Ecke) sowie CD68-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (I-L, x10 untere rechte). Dementsprechend waren fokale Akkumulationen dieser Zellen bei einem klinischen Wert von fünf am stärksten ausgeprägt. In ihrer räumlichen Verteilung waren auch diese Anreicherungen in der Nähe von Blutgefäßen zu lokalisieren. Im Vergleich zu den anderen Regionen des ZNS erkrankter Tiere erschienen die Akkumulationen extravasalen Albumins sowie phagozytischer Zellen schwächer ausgeprägt. Die horizontalen Schnitte hatten eine Schichtdicke von 50 μm . Die römischen Ziffern kennzeichnen einige der zerebellaren Lobuli.

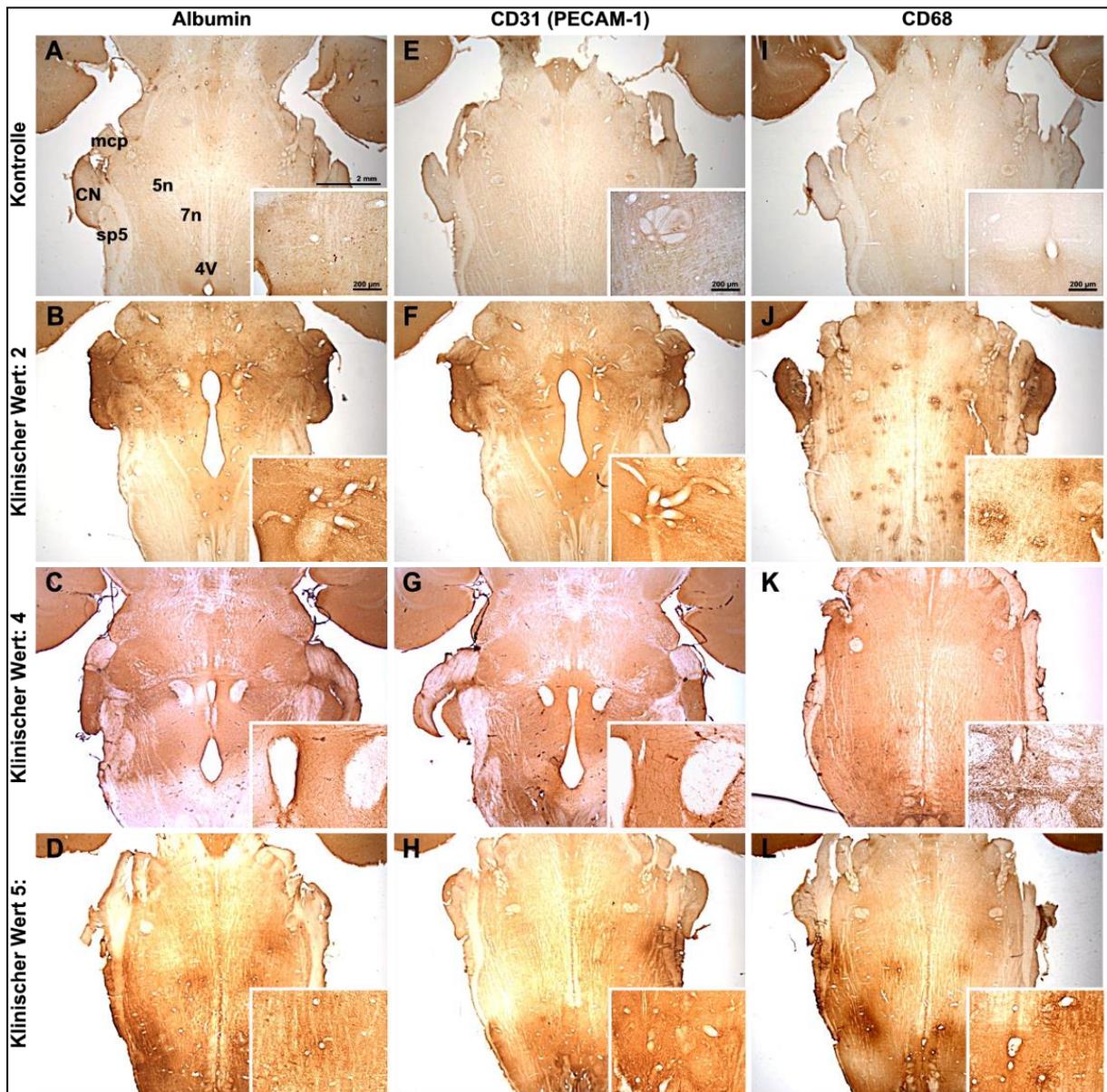


Abbildung 3.20: Histopathologische Verifizierung im *Truncus cerebri* von DA-Ratten mit hyperakuter EAE (Albumin, CD31, CD68). Im Verlauf der hyperakuten EAE konnten in immunisierten Tieren Anreicherungen extravasalen Albumins nachgewiesen werden (**A-D, x10 untere rechte Ecke**). Unabhängig vom klinischen Wert waren die Anreicherungen in der Nähe kleiner und großer Blutgefäße zu beobachten. Dennoch nimmt die Akkumulation extravasalen Albumins mit steigendem klinischen Wert zu. Ähnliche Befunde lieferten CD31-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Lymphozyten und Thrombozyten (**E-H, x10 untere rechte Ecke**) sowie CD68-Färbungen bezüglich der Anreicherung von Makrophagen (**I-L, x10 untere rechte**). Dementsprechend waren fokale Akkumulationen dieser Zellen bei einem klinischen Wert von fünf am stärksten ausgeprägt. In ihrer räumlichen Verteilung waren auch diese Anreicherungen in der Nähe von Blutgefäßen zu lokalisieren. Massive Anreicherungen phagozytischer Zellen waren in der Nähe des vierten Ventrikel (4V) zu beobachten. Abk.: 5n – *nervus trigeminus*; 7n – *nervus facialis*; CN – *nucleus cochlearis*; mcp – *pedunculus cerebellaris medius*; sp5 – *spinaler nervus trigeminus*.

3.2.3. MRT ohne vorherige Applikation von VSOP-C200

Die qualitative Auswertung des Parameters *Bewegungsartefakte* zeigte signifikante Unterschiede zwischen den MRT-Verfahren. Eine weiterführende Post Hoc Analyse zeigt, dass wie im akuten EAE-Modell nur zwischen dem T₁- und dem T₂-gewichteten MRT-Verfahren ein signifikanter Unterschied besteht.

Den Parameter *Konturschärfe der anatomischen Strukturen* bewerteten die Auswerter für die T₂-gewichtete Bildgebung signifikant höher als für alle anderen MRT-Verfahren. Wie im akuten EAE-Modell wurden auch die MRT-Aufnahmen der MT-Bildgebung signifikant höher bewertet als die MRT-Aufnahmen der T₁-, T₂*-gewichteten und der Phasenbildgebung. Entgegen den Ergebnissen im akuten EAE-Modell wurden auch die MRT-Aufnahmen der T₁- und der T₂*-gewichteten Bildgebung signifikant höher bewertet als die der Phasenbildgebung. Somit war die Konturschärfe der anatomischen Strukturen in Phasenbildern am schwächsten ausgeprägt. Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung sind in Tabelle 3.6 wiedergegeben.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der qualitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell. Insgesamt wurden die MRT-Aufnahmen von 5 Tieren analysiert. 3 Tiere bekamen 24 Stunden vor der MRT VSOP-C200 i.v. injiziert. Mittelwerte \pm SD.

	T2	T1	MT	T2*	PI
Bewegungsartefakte	3.8 \pm 0.3	3.4 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5	3.4 \pm 0.6
Konturschärfe	3.5 \pm 0.5*	2.3 \pm 0.4*	3.1 \pm 0.5*	2.4 \pm 0.5*	1.9 \pm 0.4
Kontrast Läsion/Gewebe	2.1 \pm 1.4	1.8 \pm 1.4	1.9 \pm 1.4	2.9 \pm 0.9	2.2 \pm 1.1

*p < 0,05, signifikanter Unterschied im Vergleich zu den korrespondierenden Phasenbildern (PIs);

Insgesamt lieferte die qualitative Analyse der MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell ähnliche Ergebnisse wie im akuten EAE-Modell. In allen MRT-Aufnahmen ohne vorherige Applikation von VSOP-C200 waren zu keinem Zeitpunkt lokale Signalveränderungen im ZNS von DA-Ratten mit hyperakuter EAE zu beobachten, obwohl wiederum eindeutige klinische Symptome und histologisch nachweisbare lokale Entzündungen vorhanden waren. Selbst in Tieren mit einem klinischen Wert von 5 und nachgewiesenermaßen massiven Zellschädigungen und Entzündungsprozessen, gab es keine Auffälligkeiten im MRT. Aus diesem Grund wurden vergleichende Untersuchungen nach Applikation von VSOP-C200 durchgeführt.

3.2.4. MRT nach Applikation von VSOP-C200

24 Stunden vor den MRT-Messungen wurde 3 immunisierten DA-Ratten und einem Kontrolltier das superparamagnetische Kontrastmittel VSOP-C200 i.v. injiziert. VSOP-C200 zeigt abgesehen von der Größe der Eisenpartikel, die gleichen physikalischen Eigenschaften wie

VSOP-C184. Am Tag 8 p.l. konnten in den behandelten Tieren keine signalintensiven Signalabnormitäten in MRT-Aufnahmen beobachtet werden. Damit ähnelten die MRT-Aufnahmen der behandelten Tiere denen der Kontrolltiere. Die ersten Signalabnormitäten in Form von hypointensen Herden waren bereits am Tag 11 p.l. zu detektieren. Somit ist die Zeitspanne zwischen dem Auftreten erster klinischer Symptome und den ersten auffälligen MRT-Befunden im hyperakuten EAE-Modell kürzer als im akuten EAE-Modell. Darüber hinaus waren neben einzelnen hypointensen Herden großflächige hypointense Regionen zu erkennen, die auf eine massive Akkumulation des VSOP-C200 hindeuten.

Die hypointensen Herde waren primär in der Nähe großer Blutgefäße lokalisiert. Dementsprechend waren großflächige hypointense Regionen nahe der lateralen Ventrikel auf Höhe des *Mesencephalon* (Abbildung 3.21, untere Reihe), dem dritten Ventrikel auf Höhe des *Thalamus* (Abbildung 3.22 B) und dem vierten Ventrikel innerhalb des *Pons / Medulla oblongata*-Komplex des *Truncus cerebri* (Abbildung 3.22 A) zu finden. Innerhalb des *Cortex* und des *Cerebellums* konnten keine hypointensen Herde detektiert werden.

Eine qualitative Auswertung des *Kontrastes zwischen den anreichernden Herden und dem Gewebe* ergab, dass zwischen den MRT-Verfahren kein signifikanter Unterschied besteht. Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung dieses Parameters sind ebenfalls in Tabelle 3.6 wiedergegeben.

Weiterführende Analysen der MRT-Aufnahmen zeigen, dass sich der Einsatz von VSOP-C200 negativ auf die Bildqualität der Phasenbilder auswirkt. Ähnlich dem akuten EAE-Modell ist die Erscheinungsform einiger einzelner Herde heterogen und etwas schlechter vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden als in den T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen, in denen sie hypointens erscheinen (Abbildung 3.22 A). Darüber hinaus treten in den MRT-Aufnahmen des hyperakuten EAE-Modells auch großflächige hypointense Regionen auf, die in Phasenbildern heterogen erscheinen und eine Unterscheidung zum Gewebe teilweise unmöglich machen (Abbildungen 3.21, 3.22 B).

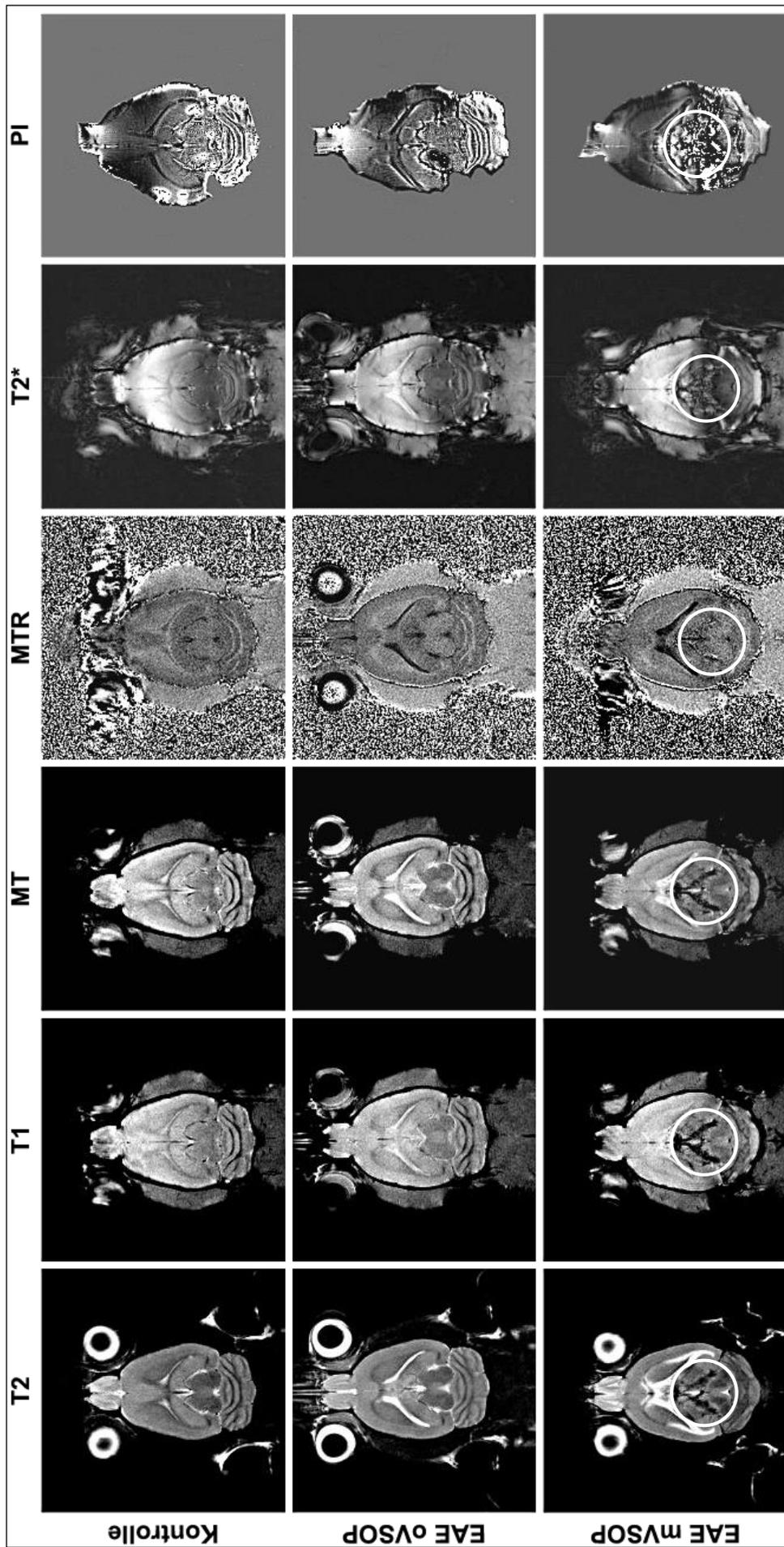


Abbildung 3.21: Vergleich der MRT-Aufnahmen der Kontroll- und EAE-Tiere in Anwesenheit (mVSOP) und in Abwesenheit von VSOP-C200 (oVSOP). Die MRT-Aufnahmen wurden mit verschiedenen MRT-Sequenzen am Tag 11 p.i. erstellt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle immunisierten Tiere erste Symptome einer hyperakuten EAE. Ohne Injektion von VSOP-C200 waren keine Signalabnormitäten zu beobachten. 24 Stunden nach der Injektion von VSOP-C200 waren in allen MRT-Aufnahmen immunisierter Tiere hypointense Herde (weiße Kreise) zu beobachten. Ihre räumliche Lokalisierung war in allen MRT-Aufnahmen sehr ähnlich. Neben kleineren fokalen hypointensen Herden waren sehr große hypointense Herde zu beobachten sind. Letztere waren primär in der Nähe großer Blutgefäße zu finden. Der Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe hängt vom MRT-Verfahren ab.

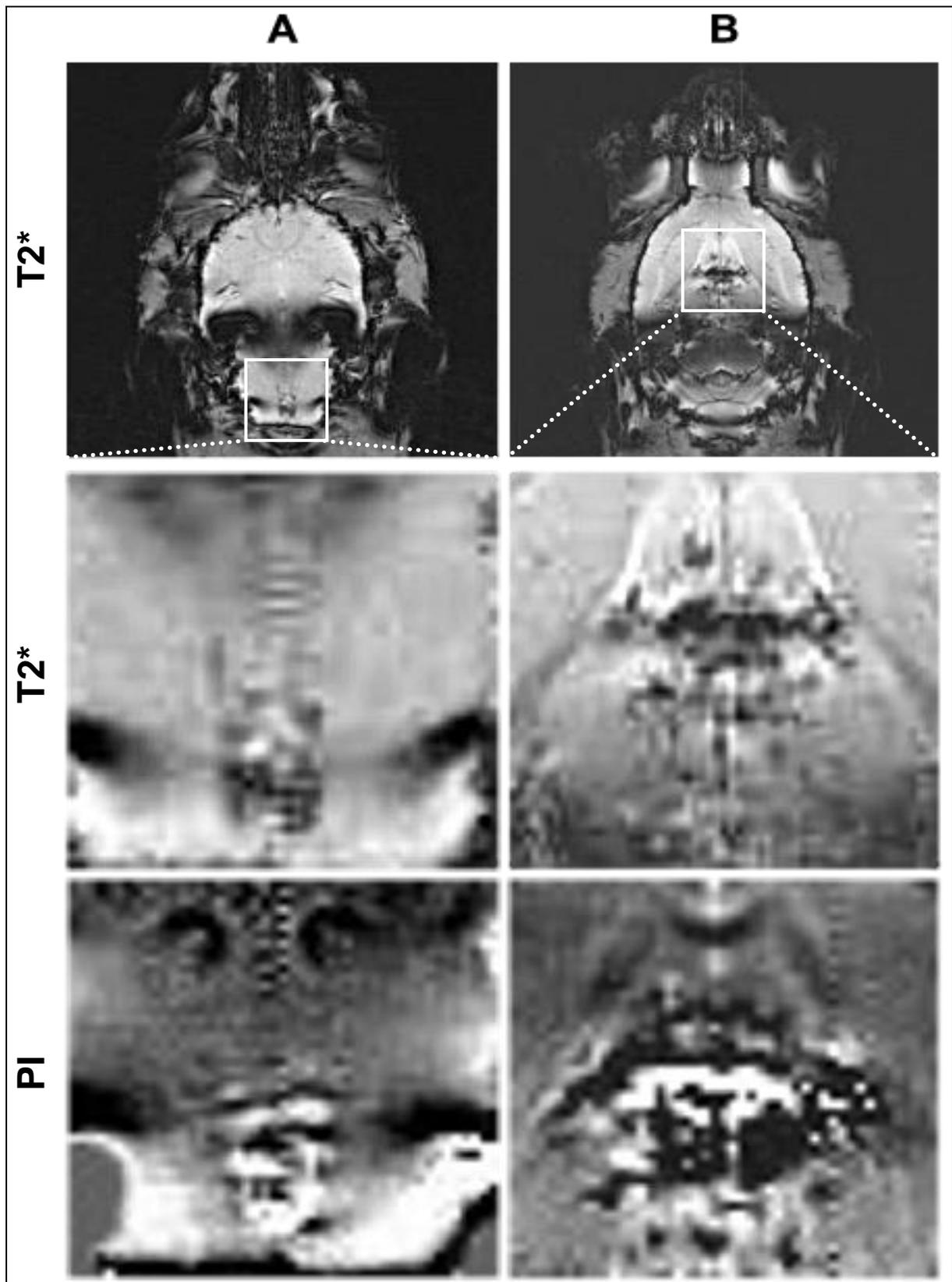


Abbildung 3.22: Verteilung hypointensiver Herde im ZNS von DA-Ratten mit hyperakuter EAE. Die T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen und Phasenbilder (PIs) wurden am Tag 11 p.l. generiert, 24 h nach der Injektion von VSOP-C200. Die hypointensen Herde waren prädominant **(A)** im *Pons / Medulla oblongata*-Komplex entlang des vierten Ventrikels und **(B)** im *Thalamus* entlang der lateralen sowie dem dritten Ventrikel lokalisiert. In T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen ist der Kontrast zwischen hypointensen Herden und dem umgebenden Gewebe stärker ausgeprägt als in PI. Daraus resultierte eine bessere Differenzierung.

3.2.5. Quantitative Ergebnisse MRT nach Applikation von VSOP-C200

Die quantitative Analyse der MRT-Aufnahmen zeigte (Abbildung 3.23), dass die Applikation von VSOP-C200 keinen signifikanten Einfluss auf das SNR_{ROI} hat. Die Analyse der Auswirkungen von VSOP-C200 auf das zerebrale Gewebe zeigte ähnliche Ergebnisse wie die von VSOP-C184 im akuten EAE-Modell. Dementsprechend waren die SNR_{ROI} der EAE-Tiere nach Kontrastmittelapplikation denen ohne vorherige Kontrastmittelapplikation und denen der Kontrollen sehr ähnlich.

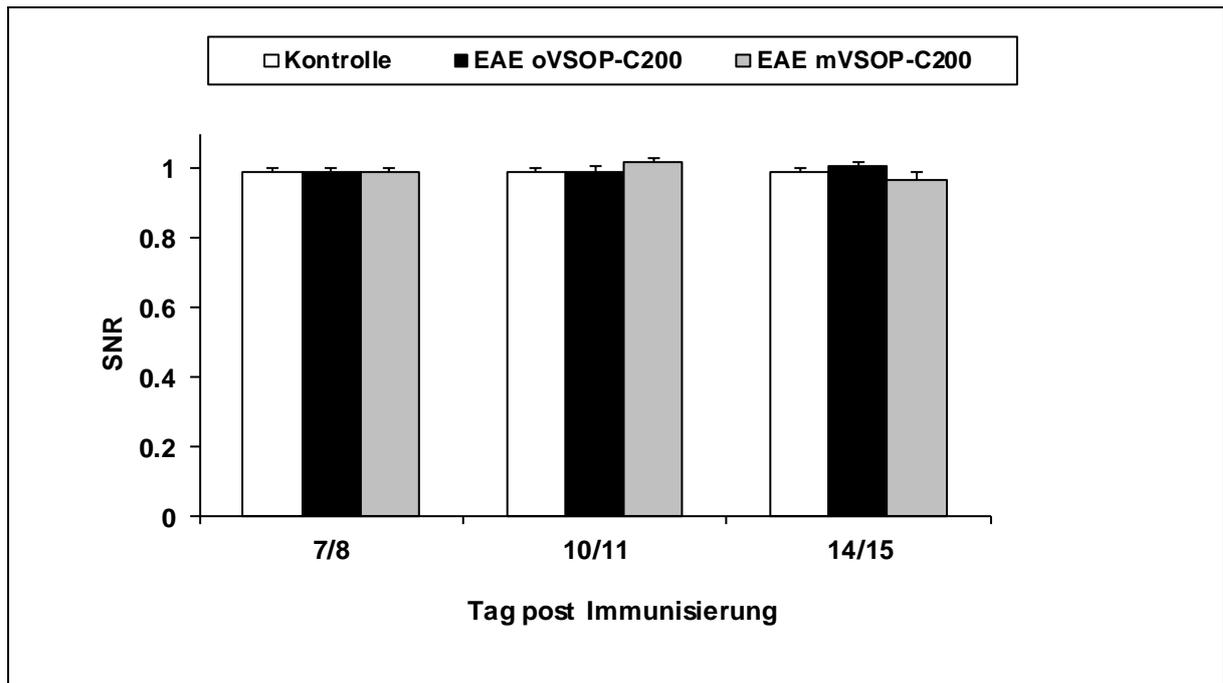


Abbildung 3.23: Auswirkungen von VSOP-C200 auf das SNR im ZNS von DA-Ratten mit hyperakuter EAE. Die quantitative Auswertung zeigt, dass auch 24 Stunden nach der Applikation von VSOP-C200 das SNR der Gewebe unverändert bleibt. Die SNR-Werte ähnelten daher denen der EAE-Tiere ohne vorherige Applikation von VSOP-C200 und denen der Kontrolltiere. Die Ergebnisse spiegeln die SNR-Werte des *Pons / Medulla oblongata*-Komplex im *Truncus cerebri* in Phasenbildern wider und sind als Mittelwerte \pm SD ausgedrückt.

Ähnlich dem akuten EAE-Modell waren auch in der MRT des hyperakuten EAE-Modells ohne vorherige Kontrastmittelapplikation keine Signalabnormitäten in Form hyper- oder hypointenser Herde im ZNS erkrankter Tiere zu beobachten. Erstmals wurden Signalabnormitäten in Form hypointenser Herde am Tag 11 p.I. 24 Stunden nach der i.v. Applikation von VSOP-C200 detektiert. Das deutete darauf hin, dass sich auch VSOP-C200 in diesen inflammatorischen Regionen anreicherte und damit dem VSOP-C184 ähnelt. Außerdem waren die Auswirkungen des VSOP-C200 auf den Kontrast ebenfalls vom verwendeten MRT-Verfahren abhängig (Abbildung 3.11 B). Die Analyseverfahren der MRT-Daten des hyperakuten EAE-Modells entsprechen dem oben beschriebenen akuten EAE-Modell, sind aber aufgrund der geringen Stichprobenmenge statistisch nicht aussagekräftig und sind somit nur als deskriptiv zu betrachten.

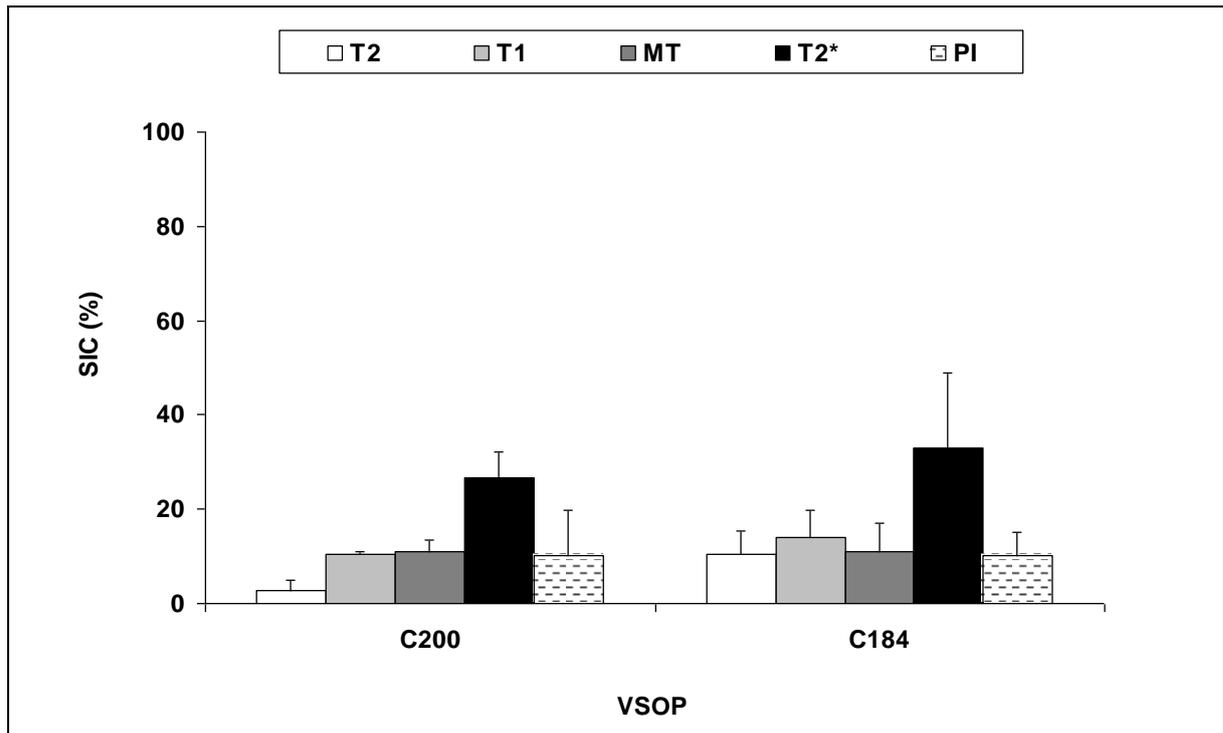


Abbildung 3.24: Vergleich der Auswirkungen des VSOP-C200 und des VSOP-C184 auf den Kontrast hypointenser Herde. Aufgrund ähnlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften, ähneln sich beide Kontrastmittel in ihrer Auswirkung auf die Signalintensität. Die stärkste Sensitivität gegenüber VSOPs zeigt die T_2^* -gewichtete Bildgebung (Tysiak et al., 2009). Die ermittelten SIC-Werte der hypointensen Herde in Phasenbildern (PIs) ähneln denen in MT- und T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen. Allerdings ähnelt das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster der hypointensen Herde PIs sehr stark dem in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Daher ist eine ähnlich hohe Sensitivität der Phasenbildgebung gegenüber VSOPs anzunehmen wie es bei der T_2^* -gewichteten Bildgebung der Fall ist. Die schwächste Sensitivität gegenüber VSOPs zeigt die T_2 -gewichtete Bildgebung. Dargestellt sind Werte der Tabellen 3.4 (Tag 14 p.l.) und 3.8.

3.2.5.1. T_2 -gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200

Ein Vergleich aller mit den verwendeten MRT-Verfahren generierten MRT-Aufnahmen zeigte, dass, ähnlich dem akuten Tiermodell nach Applikation von VSOP-C184, der Kontrast der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe in der T_2 -gewichteten Bildgebung am schwächsten ausgeprägt war. Obwohl großflächige hypointense Gebiete erkennbar waren (Abbildung 3.21), erschienen kleinere hypointense Herde unscharf und waren schwer voneinander zu unterscheiden.

3.2.5.2. T_1 -gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200

In Übereinstimmung mit den T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen waren die inflammatorischen Regionen in den entsprechenden T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen ebenfalls als hypointense Herde/Regionen erstmals am Tag 11 p.l. zu erkennen. Im Unterschied zu den T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen waren die hypointensen Herde / Regionen in der T_1 -gewichteten Bildgebung besser vom umgebenden Gewebe abgrenzbar (Abbildung 3.21). Zurückzuführen waren die Ergebnisse auf einen Kontrast der hypointensen Herde innerhalb

der T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen, der bis zu acht Mal stärker war als in vergleichbaren T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen (Tabelle 3.4).

3.2.5.3. *MT - Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200*

Ähnlich der T_2 - und T_1 -gewichteten Bildgebung waren potentiell inflammatorische Regionen auch im Rahmen der MT-Bildgebung als hypointense Herde / Regionen zu detektieren. Die räumliche und zeitliche Verteilung der Herde ähnelte dabei sehr stark den korrespondierenden T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen. Wie im akuten EAE-Modell war auch im hyperakuten Modell nach Applikation des VSOP-C200 ein Anstieg des Kontrasts der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe zu quantifizieren, der etwa sieben Mal stärker war als in vergleichbaren T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen. Somit lag er wie im akuten Modell unter dem in der T_1 -gewichteten Bildgebung ermittelten Wert. In ihrer Gesamtheit deuteten die Ergebnisse auf eine Sensitivität gegenüber dem VSOP-C200 hin, die zwar höher ist als die der T_2 -gewichteten Bildgebung, aber geringer als die der T_1 -gewichteten Bildgebung.

3.2.5.4. *MTR-Karten nach Applikation von VSOP-C200*

Die Analyse der MTR-Karten zeigte sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zu den Ergebnissen im akuten EAE-Modell. So war in beiden Tiermodellen die Mehrheit der kleinen hypointensen Herde, die in den T_1 -gewichteten und MT-Aufnahmen noch deutlich zu erkennen waren, nach der Generierung der MTR-Karten nicht mehr vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden. Demgegenüber waren die in T_1 -gewichteten und MT-Aufnahmen nachweisbaren großflächigen hypointensen Regionen, z.B. in der Nähe der lateralen und des dritten Ventrikel, auch noch in den MTR-Karten erkennbar. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Fläche, über die sich diese hypointensen Regionen in T_1 -gewichteten und MT-Aufnahmen ausdehnten, in den MTR-Karten deutlich kleiner war. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass in diesen Regionen, in denen wahrscheinlich eine massive Schädigung des ZNS vorliegt, eine massive Akkumulation von VSOP-C200 zu finden ist. Innerhalb dieser Regionen gab es jedoch histologisch keine Hinweise auf eine Demyelinisierung.

3.2.5.5. *T_2^* -gewichtete Bildgebung nach Applikation von VSOP-C200*

Ähnlich den Ergebnissen im akuten EAE-Modell war der Kontrast der hypointensen Herde / Regionen zum umgebenden Gewebe in den T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen am deutlichsten ausgeprägt. Die Kontrastwerte waren vier Mal höher als in der T_1 -gewichteten Bildgebung und ermöglichten eine detaillierte Abgrenzung der Herde und Regionen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die T_2^* -gewichtete Bildgebung auch in Anwesenheit von VSOP-C200 das sensitivste MRT-Verfahren darstellt.

Der mittlere Durchmesser einer hypointensen Region betrug für die DA-Ratten ($n = 2$) $613.3 \pm 425.0 \mu\text{m}$. Die Größe der hypointensen Herde variierte dabei sehr stark. Neben einzelnen

hypointensen Herden waren vor allem in Nähe der Hirnventrikel hypointense Flächen zu detektieren. In diesen Fällen waren die hypointensen Regionen nicht eindeutig von den Hirnventrikeln abgrenzbar. In Bezug auf das Messergebnis ist die tatsächliche Größe der hypointensen Regionen daher als geringer anzunehmen.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der quantitativen Analyse hypointenser Herde in T₂*-gewichteten MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell. Ermittelt wurde der mittlere Durchmesser (\pm SD; μ m) der hypointensen Herde in verschiedenen zerebralen Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE.

dkW	Proencephalon	Mesencephalon	Cerebellum	Pons/ Medulla oblongata	Mittelwerte
2	-	-	-	590.1 \pm 517.5	-
5	538.1 \pm 284.4	*	-	1759.8	613.3 \pm 425.0

*nicht messbar, da keine Unterscheidung zwischen Herd und Ventrikel möglich

3.2.5.6. Phasenbildgebung nach Applikation von VSOP-C200

Auf Basis der Rohdatensätze der T₂*-gewichteten Bildgebung wurden wiederum Phasenbilder generiert und analysiert. Wie beim akuten EAE-Modell ähnelte das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster auftretenden hypointensen Herde der in den Phasenbildern dem der korrespondierenden T₂*-gewichteten MRT-Aufnahmen. Die in Phasenbildern ermittelten Kontrastwerte (SIC) für hypointense Herde waren nahe den Werten, die im Rahmen der T₁-gewichteten und MT-Bildgebung ermittelt wurden. Die Spezifizierung der hypointensen Herde / Regionen war mit der in T₂*-gewichteten MRT-Aufnahmen vergleichbar.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der quantitativen Analyse der MRT-Aufnahmen im hyperakuten EAE-Modell. Die ermittelten Werte resultieren aus der Bemessung des SNR hypointenser Herde (SNR_{Läsion}) und des SNR im Pons / Medulla oblongata-Komplex (SNR_{ROI}). Tiere (n = 3). Mittelwerte \pm SD.

	Tag p.l.	T2	T1	MT	T2*	PI
CNR	11/14	0.5 \pm 0.3	4.1 \pm 0.1	3.6 \pm 0.9	16.0 \pm 3.9	
SIC	11/14	2.8 \pm 2.3	10.6 \pm 0.5	11.0 \pm 2.4	26.7 \pm 5.52	10.2 \pm 9.6

4. Diskussion

Seit ihrer Einführung 1981 in den klinischen Alltag etablierte sich die MRT zum wichtigsten bildgebenden Verfahren in der MS-Diagnostik. Sie ermöglicht die Darstellung der für MS typischen inflammatorisch-entmarkenden Herde im Gehirn und im Rückenmark, die auch als Läsionen oder Plaques bezeichnet werden. Einen entscheidenden Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese der MS leisten verschiedene Tiermodelle, wie das der EAE. Die EAE umfasst eine Vielzahl von Modellen, die verschiedene Phasen der MS widerspiegeln (Baker and Jackson, 2007). Histologische Untersuchungen an verschiedenen EAE-Modellen zeigen pathologische Prozesse, wie sie für die zur Entwicklung verschiedener Läsionen bei MS charakteristisch sind (Furlan et al., 2009; Gold et al., 2000; Hart et al., 2011; Yaldizli and Kappos, 2011). Mittlerweile können mit der MRT alte und neue sowie aktive und inaktive Läsionen erkannt werden (Freitag et al., 2000). Trotz dieser hohen Sensitivität gegenüber bereits bestehenden Läsionen sind frühzeitige pathologische Veränderungen im Gewebe bisher nur histologisch nachweisbar und bleiben damit in der konventionellen MRT auch meist verborgen. Aus diesem Grund werden neben geeigneten Kontrastmitteln (Dousset et al., 1999a; Tysiak et al., 2009) verstärkt quantitative MRT-Verfahren wie die MT- (Rausch et al., 2003) und die Phasenbildgebung (Matzke et al., 2010; Ovtcharov et al., 2011) in der MS Forschung eingesetzt. Die Phasenbildgebung stellt ein relativ junges MRT-Verfahren dar (Zhong et al., 2008).

In der vorliegenden Studie wurde die Sensitivität und Spezifität der Phasenbildgebung gegenüber frühzeitig auftretenden inflammatorischen Prozessen sowie Veränderungen der Permeabilität der BHS in zwei Tiermodellen der EAE untersucht. Das erste Tiermodell, die akute EAE in Lewis-Ratten, hat histopathologisch Ähnlichkeiten zur Frühphase der MS und weist primär inflammatorische Prozesse im ZNS auf (Baker and Jackson, 2007; Lassmann et al., 1997). Das zweite Tiermodell, die hyperakute EAE in DA-Ratten, zeichnet sich histopathologisch durch ausgeprägte Läsionen im ZNS aus und ähnelt somit der Spitze eines möglichen Schubes bei MS-Patienten (Pender and McCombe, 1995). Um die diagnostische Leistungsfähigkeit der Phasenbildgebung bei der Detektion inflammatorischer Prozesse einschätzen zu können, wurden als Referenz T_1 -, T_2 - und T_2^* -gewichtete sowie MT-Bildgebung untersucht.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde die Phasenbildgebung nur in wenigen Tiermodellen angewendet. Marques et al. (Marques et al., 2009) untersuchten das *Cerebrum* adulter Sprague-Dawley Ratten an einem 14,1 Tesla MRT-Gerät. Diese Studie zeigt, dass kleinere anatomische Strukturen innerhalb des Hippocampus und dem Striatum in der Phasenbildgebung deutlicher zu erkennen sind als in korrespondierenden T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Die Phasenbildgebung ermöglichte somit die Darstellung der Anatomie eines Rattengehirns

auf fast mikroskopischer Ebene unter *in vivo* Bedingungen (Marques et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Phasenbildung erstmalig im Tiermodell der EAE unter Verwendung eines 4,7 Tesla MRT-Gerätes verwendet.

4.1. Vergleichende qualitative Auswertungen der MRT-Aufnahmen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Phasenbildung in einem magnetischen Feld von 4,7 Tesla bei der Darstellung der Anatomie des *Cerebrums* von Ratten einen charakteristischen Kontrast liefert (Abbildung 3.6). Marques et al. (Marques et al., 2009) zeigten, dass bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 Tesla die Konturschärfe anatomischer Strukturen in Phasenbildern im Vergleich zu T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen sehr viel ausgeprägter ist. Daraus resultierend konnten z.B. Substrukturen der *Substantia alba* innerhalb des *Striatums* nur in Phasenbildern detektiert werden. Studien in der Humanforschung bei einer Magnetfeldstärke von 7 Tesla zeigten (Duyn et al., 2007; Zhong et al., 2008), dass der Kontrast zwischen *Substantia alba* und *Substantia grisea* in Phasenbildern bis zu zehn Mal ausgeprägter ist als in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Daher ist anzunehmen, dass die Sensitivität der Phasenbildung mit steigender Magnetfeldstärke zunimmt (Duyn et al., 2007; Zhong et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla in den Phasenbildern keine signifikant erhöhte Konturschärfe anatomischer Strukturen im Vergleich zu den T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen ermittelt werden (Tabellen 3.2, 3.6). Vielmehr wurde die Konturschärfe der anatomischen Strukturen in Phasenbildern sogar als signifikant schlechter bewertet (Tabellen 3.2, 3.6) und somit ähnelte die subjektive Bewertung der Phasenbilder denen der T_1 -gewichteten Bildgebung. Im hyperakuten EAE-Modell wurde die Konturschärfe der anatomischen Strukturen in Phasenbildern sogar niedriger bewertet. Das bedeutet, dass die Phasenbildung bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla weder zusätzliche Informationen über anatomische Strukturen noch über mögliche inflammatorische Prozesse im ZNS von Ratten mit akuter oder hyperakuter EAE liefert. Jedoch konnten mit den anderen MRT-Verfahren auch keine inflammatorischen Prozesse detektiert werden.

Um die Sensitivität der MRT-Verfahren bei der Detektion inflammatorischer Prozesse in Patienten mit MS oder in Tieren mit EAE zu erhöhen, werden häufig paramagnetische (Doussset et al., 1999b; Namer et al., 1994) oder superparamagnetische Kontrastmittel (Taupitz et al., 2003; Tysiak et al., 2009) genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die superparamagnetischen Kontrastmittel VSOP-C184 (akutes EAE-Modell) und VSOP-C200 (hyperakutes EAE-Modell) verwendet. Diese Kontrastmittel bestehen in ihrer Zusammensetzung aus sehr kleinen eisenoxidhaltigen Partikeln, die aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften einen Einfluss auf die Signalintensität und somit den Bildkontrast haben. Frühere Studien (Stroh et al.,

2004; Tysiak et al., 2009) wiesen nach, dass eine Anreicherung dieser Partikel im Gewebe zu einer Signalreduktion führt, die in MRT-Aufnahmen als signalintensive hypointense Regionen sichtbar wird. Da VSOP-C184 (Taupitz et al., 2003) und VSOP-C200 (Stroh et al., 2004) die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften aufweisen (Abbildung 3.24) und sich nur in der Partikelgröße unterscheiden, wird im Folgenden nur noch von VSOP gesprochen.

Die Auswertung der MRT-Aufnahmen nach Applikation von VSOP zeigte, dass die hypointensen Herde im akuten EAE-Modell klein und stark gestreut sind (Abbildungen 3.8, 3.9), während sie im hyperakuten EAE-Modell flächenartig (Abbildungen 3.21, 3.22) erscheinen. Die qualitative Auswertung der MRT-Aufnahmen des akuten EAE-Modells zeigte, dass der Kontrast zwischen den hypointensen Herden und dem umgebenden Gewebe sowohl in der T_2^* gewichteten Bildgebung als auch der Phasenbildgebung stärker ausgeprägt ist als in der T_1 - und der T_2 -gewichteten sowie der MT-Bildgebung (Tabelle 3.2). Allerdings ist dieser Kontrast in Phasenbildern etwas schwächer ausgeprägt als in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Eine mögliche Ursache ist, dass einige in den anderen MRT-Aufnahmen ausschließlich hypointens erscheinenden Herde, in Phasenbildern ein heterogenes Erscheinungsbild aufweisen. Als Konsequenz sind sie schwieriger vom umgebenden Gewebe und von anderen Herden zu unterscheiden. Falls die hypointensen Herde auf Akkumulationen von VSOP zurückzuführen sind, wie tierexperimentelle Studien belegen (Stroh et al., 2004; Tysiak et al., 2009), ist auch anzunehmen, dass die räumliche Verteilung der Partikel im angelegten Magnetfeld den Phasenkontrast (Marques et al., 2009) und somit auch das Erscheinungsbild der Herde beeinflusst. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der qualitativen Auswertung ist weiterhin anzunehmen, dass sowohl die T_2^* -gewichtete Bildgebung als auch die Phasenbildgebung eine höhere Sensitivität gegenüber Akkumulationen von VSOP zeigen als die T_1 -, die T_2 -gewichtete oder die MT-Bildgebung. Frühere Studien von Tysiak et al. (Tysiak et al., 2009) bestätigen diese Annahme insofern, dass die T_2^* -gewichteten Bildgebung gegenüber Akkumulationen von VSOP-C184 im EAE-Modell von SJL / L-Mäusen sensitiver ist als die T_1 - und die T_2 -gewichtete Bildgebung.

Die qualitative Auswertung der VSOP verstärkten MRT-Aufnahmen des hyperakuten EAE-Modells zeigt, dass flächenartige hypointense Herde in Phasenbildern ebenfalls stark heterogen erscheinen. Somit erscheinen die konfluierenden einzelnen hypointensen Herde als ein heterogener großflächiger Herd. Als Konsequenz sind die in T_1 -, T_2 - und T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen eindeutig abgrenzbaren flächenartigen hypointensen Herde, in Phasenbildern zum Teil nicht mehr vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden (Abbildung 3.21). Tierexperimentelle Studien von Tysiak et al. (Tysiak et al., 2009) zeigten im EAE-Modell von SJL / L-Mäusen, dass es innerhalb der inflammatorischen Regionen zu Akkumulationen der VSOP kommt. Basierend auf den Ergebnissen von Tysiak et al. (Tysiak et al., 2009) und den

hier vorgestellten Ergebnissen der qualitativen Auswertung des hyperakuten Modells, wird deutlich, dass die Phasenbildung gegenüber Akkumulationen von VSOP sensitiver ist als die T_1 - und T_2 -gewichtete sowie die MT-Bildgebung. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass diese erhöhte Sensitivität gegenüber Akkumulationen von VSOP sich in Abhängigkeit von deren räumlicher Verteilung stark negativ auf die Qualität der Phasenbilder auswirken kann.

Das bedeutet, dass die Phasenbildung auch nach Applikation von VSOP bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla keine zusätzlichen Informationen liefert, die nicht in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen visualisierbar sind.

4.2. Interpretationen der klinischen und histopathologischen Befunde

Ein vergleichsweise einfaches Instrument zur Beurteilung der Krankheitsausprägung stellt die klinische Bewertung der Symptome dar. Der Vergleich der maximalen klinischen Werte in beiden EAE-Modellen zeigt, dass Lewis-Ratten mit akuter EAE weniger schwer erkrankten ($dkW_{14} 3,2 \pm 0,8$) als DA-Ratten mit hyperakuter EAE ($dkW_{16} 5,3 \pm 1,57$). Darüber hinaus lag die Sterblichkeitsrate bei den DA-Ratten mit hyperakuter EAE bei etwa 80% (4 von 5), während sich alle Lewis-Ratten mit akuter EAE von der Erkrankung wieder erholten (Floris et al., 2004). Frühere Studien zeigen, dass die in die klinische Bewertung einfließenden neurologischen Symptome sowohl im akuten als auch im hyperakuten EAE-Modell auf demyelinisierende inflammatorische Läsionen in der *Medulla spinalis* zurückzuführen sind (Gold et al., 2006). Dabei sind besonders die Eingangszonen der Dorsalwurzeln und die Ausgangszonen der Ventralwurzeln betroffen (Pender, 1989). In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die spinalen demyelinisierenden Läsionen in der vorliegenden Arbeit nicht quantifiziert werden konnten, da deren Anteile aus aufnahmetechnischen Gründen in der MRT nicht erfasst wurden. Neben den spinalen Läsionen wurden in früheren Studien und in der vorliegenden Arbeit auch Läsionen im *Cerebrum* nachgewiesen (Lucchinetti et al., 2000; Pender, 1989; Zamaroczy et al., 1991). Diese Läsionen werden als stille Läsionen bezeichnet (Zamaroczy et al., 1991) da sie weder Demyelinisierungen aufweisen, noch zu motorischen oder sonstigen messbaren Defiziten führen (Lucchinetti et al., 2000; Pender, 1989). In ihrer Zusammensetzung bestanden sie vorwiegend aus infiltrierten Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten sowie residenten Mikrogliazellen und waren in beiden EAE-Modellen in der Nähe großer und kleiner Blutgefäße lokalisiert. Die Akkumulationen der verschiedenen phagozytischen Monozyten lieferten einen Beweis für die Präsenz inflammatorischer Prozesse innerhalb der zerebralen Strukturen. Einen anderen lieferte die Präsenz perivaskulärer Akkumulationen extravasalen Albumins, die auf eine Schädigung der BHS hindeuten (Morrissey et al., 1996). In Übereinstimmung mit früheren Studien (Lucchinetti et

al., 2000; Pender, 1989; Zamaroczy et al., 1991) zeigen die histopathologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass im *Cerebrum* sowohl von Lewis-Ratten mit akuter EAE als auch in DA-Ratten mit hyperakuter EAE inflammatorische Prozesse in Form stiller Läsionen und BHS-Schäden zu lokalisieren sind.

Die histopathologischen Untersuchungen am akuten EAE-Modell zeigten, dass sich im Verlauf der Erkrankung sowohl die Erscheinungsform als auch die Verteilung der inflammatorischen Regionen ändern. Die ersten Akkumulationen extravasalen Albumins sowie phagozytischer Monozyten wurden mit dem Auftreten der ersten neurologischen Symptome (Tag 9 p.l.) im *Cerebrum* lokalisiert. Zu diesem Zeitpunkt waren sie nur schwach ausgeprägt und vereinzelt in der Nähe großer Blutgefäße nachweisbar (Abbildungen 3.2-3.5 E, I, M). Im weiteren Verlauf wurden Akkumulationen auch in der Nähe kleiner Blutgefäße lokalisiert (Abbildungen 3.2-3.5 F, J, N). Darüber hinaus dehnten sich bereits vorhandene Akkumulationen weiter aus (Abbildungen 3.2-3.5 F, J, N). Auf dem Höhepunkt der Erkrankung (Tag 14 p.l.) wurden in allen Haupthirnstrukturen ausgeprägte inflammatorische Regionen lokalisiert. An den darauffolgenden Tagen p.l. nahm die Belastung durch inflammatorische Regionen wieder ab (Abbildungen 3.2-3.5 G, K, O), bis sie am Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 49 p.l.) nicht mehr lokalisierbar waren (Abbildungen 3.2-3.5 H, L, P). Diese Befunde bestätigen, dass die inflammatorischen Regionen (Läsionen) dynamischen Prozessen wie der zunehmenden Permeabilität oder Infiltration phagozytischer Monozyten unterworfen sind, die sich auf deren Entstehung, Verteilung und Entwicklung auswirken (Floris et al., 2004; Morrissey et al., 1996).

Die histopathologischen Untersuchungen in DA-Ratten mit hyperakuter EAE wurden ausschließlich auf dem Höhepunkt der Erkrankung durchgeführt, d.h. zwischen den Tagen 12 und Tag 15 p.l.. Während die Mehrzahl der Tiere einen klinischen Wert von 4 bis 5 erreichten, zeigte ein Tier als maximal ausgeprägtes Symptom der hyperakuten EAE eine Parese der Hinterbeine (kW = 2). Ein Vergleich der histologischen Schnitte zeigte, dass die Entwicklung und Verteilung zerebraler inflammatorischer Regionen dennoch ähnliche Muster zeigen. Das bestätigt Studien von Lorentzen et al. (Lorentzen et al., 1995), in denen nachgewiesen wurde, dass die neurologischen Defizite auf demyelinisierende inflammatorische Läsionen in der *Medulla spinalis* zurückzuführen sind. Ein Vergleich der histologischen Schnitte des akuten und des hyperakuten EAE-Modells zeigt, dass die inflammatorischen Prozesse auf dem Höhepunkt der Erkrankung im hyperakuten EAE-Modell deutlich stärker ausgeprägt sind. Dementsprechend wurden zu diesem Zeitpunkt perivaskuläre Akkumulationen extravasalen Albumins und phagozytischer Monozyten lokalisiert (Abbildungen 3.13-3.16 L; Abbildungen 3.17-3.20 D, H, L) die in ihrer Erscheinungsform größer sind als vergleichbare Akkumulationen im akuten EAE-Modell (Abbildungen 3.2-3.5 F, J, N). Im akuten EAE-Modell waren viele kleine Läsionen nachweisbar (Abbildung 3.9 C), dagegen dominierten im hyper-

akuten EAE-Modell nur einige wenige, dafür aber große fokale Läsionen (Abbildungen 3.21, 3.22 B). Darüber hinaus wurden vereinzelt Gewebeschäden lokalisiert (Abbildungen 3.14 H, L, P), die im akuten EAE-Modell nicht zu beobachten waren.

Unabhängig vom Tiermodell der EAE konnten in der vorliegenden Arbeit vorwiegend Schädigungen der BHS und Akkumulationen phagozytischer Monozyten als inflammatorische Prozesse im *Cerebrum* von Lewis- und DA-Ratten lokalisiert werden (Floris et al., 2004; Gold et al., 2006; Lorentzen et al., 1995; Pender, 1989).

4.3. Sensitivität und Spezifität der MRT-Verfahren bei der Detektion lokaler Inflammationen

Nach der histopathologischen Verifizierung von lokal begrenzten inflammatorischen Prozessen, erfolgte ein Vergleich zwischen korrespondierenden MRT-Aufnahmen und histologischen Schnitten. Während in histologischen Schnitten die Entwicklung inflammatorischer Prozesse im *Cerebrum* immunisierter Tiere nachgewiesen werden konnten, waren in korrespondierenden MRT-Aufnahmen zu keinem Zeitpunkt Signalabnormalitäten zu lokalisieren, die auf eine Schädigung der BHS oder die Präsenz stillen Läsionen hindeuten. Dementsprechend gab es auch keine Unterschiede zwischen den Phasenbildern der EAE-Tiere und der Kontrollen (Abbildungen 3.7, 3.21).

Frühere Studien von Jordan et al. (Jordan et al., 1999) wiesen nach, dass die Korrelation zwischen inflammatorischen Regionen in der MRT und in histopathologischen Untersuchungen neben der Kontrastmittelanreicherung im Wesentlichen von der gewählten Schichtdicke und dem Durchmesser der inflammatorischen Region abhängt. Somit könnten die unauffälligen MRT-Aufnahmen auf einen zu geringen Durchmesser der inflammatorischen Regionen in beiden EAE-Modellen zurückzuführen sein. Histopathologische Untersuchungen auf dem Höhepunkt der Erkrankungen zeigen, dass die inflammatorischen Regionen einen maximalen Durchmesser von 300 μm erreichen (akute EAE: $254.2 \pm 120.5 \mu\text{m}$; hyperakute EAE: $303.9 \pm 152.7 \mu\text{m}$). Da die Schichtdicke der MRT-Aufnahmen 1 mm betrug (Tabelle 2.2) ist anzunehmen, dass Volumeneffekte die Sensitivität vermindern. Das würde erklären, dass in der vorliegenden Arbeit weder mit konventionellen MRT-Verfahren noch mit der Phasenbildung inflammatorische Regionen in den ausgesuchten EAE-Modellen detektiert werden konnten. Um eine eindeutige Aussage über die Sensitivität der einzelnen MRT-Modalitäten treffen zu können, müssen die Messungen mit einer Schichtdicke von maximal 300 μm durchgeführt werden. Dies ist allerdings bei einer Feldstärke von 4,7 Tesla nur mit sehr langen Messzeiten möglich, die eine *in vivo* Untersuchung von erkrankten Tieren nicht erlauben. Somit zeigen die Ergebnisse, dass keines der verwendeten MRT-Verfahren bei 4,7 Tes-

la sensitiv genug war, um lokale zerebrale inflammatorische Prozesse im Tiermodell der akuten oder hyperakuten EAE zu detektieren.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen festzuhalten: (1) Die Phasenbildgebung liefert bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla einen unverwechselbaren Kontrast bei der Darstellung der zerebralen Anatomie von Lewis- und DA-Ratten unter *in vivo* Bedingungen. (2) Weder die Phasenbildgebung noch eines der anderen MRT-Verfahren ist sensitiv genug, um histologisch nachweisbare inflammatorische Prozesse in EAE-Modellen zu detektieren.

4.4. Detektion lokaler Inflammationen in der MRT nach Applikation von VSOP

Um in der vorliegenden Arbeit die Sensitivität der MRT-Verfahren bei der Detektion inflammatorischer Prozesse zu steigern, wurden (siehe 4.1) VSOPs als Kontrastmittel verwendet. Unabhängig vom EAE-Modell wurden nach Applikation von VSOP hypointense Herde in verschiedenen Regionen des *Cerebrums* erkrankter Tiere detektiert. Im akuten EAE-Modell waren die hypointensen Herde erstmalig auf dem Höhepunkt der Erkrankung (Tag 14 p.l.) zu lokalisieren. Auch an den darauffolgenden Tagen waren die hypointensen Herde in MRT-Aufnahmen des *Cerebrums* zu lokalisieren. Darüber hinaus war eine zeitabhängige Veränderung der Anzahl hypointenser Herde nachzuweisen, die ab Tag 14 p.l. entsprechend der nachlassenden Symptomatik der Erkrankung kontinuierlich abnahm.

Im hyperakuten EAE-Modell waren hypointense Herde bereits mit dem Auftreten erster neurologischer Symptome (Tag 10/11 p.l.) zu detektieren. Während im akuten EAE-Modell viele kleine hypointense Herde (maximale durchschnittliche Größe $263.2 \pm 53.9 \mu\text{m}$; Tabelle 3.3) im *Cerebrum* verstreut vorlagen, wurde im hyperakuten EAE-Modell eine begrenzte Anzahl hypointenser Herde detektiert. Jedoch variierte die Größe der hypointensen Herde im hyperakuten EAE-Modell sehr stark. So waren einige hypointensen Herde mit denen im akuten EAE-Modell vergleichbar (Durchmesser etwa $274 - 306 \mu\text{m}$), während andere einen Durchmesser von etwa $1500 \mu\text{m}$ besaßen. In einigen Fällen waren ausschließlich einzelne große fokale hypointense Herde im *Cerebrum* detektierbar. Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $613.3 \pm 425 \mu\text{m}$ (Tabelle 3.7) waren die hypointensen Herde im hyperakuten EAE-Modell mehr als doppelt so groß wie die hypointensen Herde im akuten EAE-Modell. Studien von Storch et al. (Storch et al., 1998) bestätigen die Befunde der vorliegenden Arbeit und zeigten, dass im MOG induzierten EAE-Modell primär große fokale Läsionen im ZNS nachweisbar sind.

Die hypointensen Herde in den MRT-Aufnahmen bildeten die Grundlage der quantitativen Auswertung. Tysiak et al. (Tysiak et al., 2009) wiesen mit Hilfe der Berliner Blaufärbung die Anreicherung von VSOP in inflammatorischen Regionen von weiblichen SJL / J-Mäusen mit

EAE nach. Auf Basis dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, dass die hypointensen Herde in den MRT-Aufnahmen den lokalen Inflammationen entsprechen. Für eine Akkumulation eisenhaltiger Kontrastmittel im ZNS werden zwei mögliche Wege diskutiert. Erstens: Das Kontrastmittel wird im Blutkreislauf von phagozytischen Monozyten aufgenommen und gelangt im Rahmen der Zellinfiltration über die BHS in das ZNS erkrankter Tiere (Dousset et al., 1999a; Floris et al., 2004; Tysiak et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Vermutung, da innerhalb der inflammatorischen Regionen neben Makrophagen und Lymphozyten auch phagozytische Monozyten nachgewiesen wurden. Die zweite Möglichkeit für eine Akkumulation des Kontrastmittels im ZNS ist eine Diffusion (Muldoo et al., 1999) oder Transzytose (Weissleder et al., 1990) durch die BHS, woraufhin das Kontrastmittel von residenten phagozytischen Monozyten aufgenommen wird (Floris et al., 2004).

Obwohl die hypointensen Herde in der MRT auf lokale inflammatorische Prozesse hindeuten, sind nicht alle lokal inflammatorischen Regionen erkennbar. So belegen immunhistochemische Färbungen erste inflammatorische Prozesse im akuten EAE-Modell bereits mit dem Auftreten erster neurologischer Symptome (Tag 9 p.I.), wogegen die ersten hypointensen Herde in der MRT erst auf dem Höhepunkt der Erkrankung (Tag 14 p.I.) detektiert werden konnten. Floris et al. (Floris et al., 2004) konnten im selben EAE-Modell mit T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen und einem superparamagnetischen Kontrastmittel (USPIO 7228) bereits drei Tage vor dem Höhepunkt der Erkrankung (Tag 11 p.I.) hypointense Herde im anterioren Bereich der *Medulla spinalis* nachweisen, eine Region, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Es ist durchaus möglich, dass die Entwicklung und Ausprägung spinaler und zerebraler Läsionen unterschiedlich verläuft. So zeigen sowohl frühere Studien (Gold et al., 2006; Pender, 1989; Zamaroczy et al., 1991) als auch die hier vorgestellten histopathologischen Untersuchungen, dass bereits mit dem Auftreten erster neurologischer Symptome inflammatorische Prozesse im *Cerebrum* der Tiere ablaufen. Jedoch sind die neurologischen Symptome auf inflammatorische demyelinisierende Prozesse in der *Medulla spinalis* zurückzuführen (Gold et al., 2006; Lorentzen et al., 1995; Pender, 1989). Schnell et al. (Schnell et al., 1999) wiesen in C57BL / 6J-Mäusen nach, dass akute inflammatorische Reaktionen (z.B. Zellinfiltration) auf traumatische Verletzungen in der *Medulla spinalis* stärker ausgeprägt sind als im *Cerebrum*.

Im Unterschied zum akuten EAE-Modell sind im hyperakuten EAE-Modell erste hypointense Herde bereits mit dem Auftreten erster neurologische Symptome (Tag 10/11 p.I.) detektierbar. Die histopathologischen Befunde der beiden EAE-Modelle auf dem Höhepunkt der Erkrankung zeigen, dass Akkumulationen extravasalen Albumins und phagozytischer Monozyten im hyperakuten EAE-Modell deutlich größer sind als im akuten EAE-Modell. Das bedeutet, dass die zerebralen Inflammationen in DA-Ratten mit hyperakuter EAE deutlich progre-

dienter sind als in Lewis-Ratten mit akuter EAE. Trotz der deutlichen Progredienz sind auch diese zerebralen Inflammationen nicht mit einer Demyelinisierung gekoppelt. Frühere Studien (Storch et al., 1998) bestätigen diesen Befund der vorliegenden Arbeit und zeigen zusätzlich, dass die höchste Dichte an Läsionen in der *Medulla spinalis* lokalisiert ist. Somit ist anzunehmen, dass demyelinisierende Läsionen, die für die klinische Symptomatik der EAE verantwortlich sind, primär in der *Medulla spinalis* zu lokalisieren sind (Linington et al., 1993; Schnell et al., 1999).

Basierend auf den Befunden früherer Studien (Linington et al., 1993; Schnell et al., 1999; Floris et al., 2004) und den Befunden der vorliegenden Arbeit können folgende Annahmen getroffen werden: (1) Unabhängig vom EAE-Modell kommt es nach einer Latenzzeit p.l. analog in der *Medulla spinalis* und im *Cerebrum* erkrankter Tiere zur Entstehung inflammatorischer Prozesse, infolge dessen u.a. verstärkt aktivierte phagozytische Monozyten rekrutiert werden. (2) Spinale und zerebrale inflammatorische Prozesse durchlaufen in ihrer Entwicklung nicht notwendigerweise die gleichen Schritte. So sind spinale Inflammationen mit Demyelinisierungen gekoppelt, während zerebrale Inflammationen das nicht sind (Storch et al., 1998). (3) Im Verlauf der EAE nimmt die Intensität der inflammatorischen Prozesse zu, woraus u.a. eine zunehmende Akkumulation extravasalen Albumins und phagozytischer Monozyten im ZNS resultiert (Pender, 1989).

Im Zusammenhang mit Akkumulationen von VSOP in inflammatorischen Regionen (und deren Detektion als hypointense Herde in der MRT) ist vorstellbar, dass in der Frühphase der EAE aktivierte VSOP beladene phagozytische Monozyten in inflammatorischen Regionen des ZNS angereichert werden (Floris et al., 2004; Tysiak et al., 2009). Im akuten EAE-Modell sind mit dem Auftreten erster neurologischer Symptome analog histologisch inflammatorische Prozesse (Abb. 10-13 M) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $146.5 \pm 61.8 \mu\text{m}$ (Tabelle 3.1) nachweisbar. Jedoch sind diese inflammatorischen Prozesse in korrespondierenden MRT-Aufnahmen nicht detektierbar. Im hyperakuten EAE-Modell sind mit dem Auftreten erster neurologischer Symptome ebenfalls histologisch inflammatorische Prozesse nachweisbar (Abb. 25-28 J, L). Diese Inflammationen waren progredienter und variierten im Durchmesser von etwa $300 \mu\text{m}$ bis zu etwa $780 \mu\text{m}$ (Tabelle 3.5). In korrespondierenden MRT-Aufnahmen waren diese Inflammationen als hypointense Herde zu detektieren. Insgesamt ist daher anzunehmen, dass die Korrelation zwischen inflammatorischen Regionen in der MRT und in histopathologischen Untersuchungen neben der Kontrastmittelanreicherung im Wesentlichen vom Durchmesser der inflammatorischen Region abhängt (Jordan et al., 1999). Die Detektion der hypointensen Herde im MRT des akuten EAE-Modells am Tag 14 p.l. bestätigt diese Annahme. Zu diesem Zeitpunkt wurden im *Cerebrum* hypointense Herde mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $262.3 \pm 69.9 \mu\text{m}$ (Tabelle 3.3) detektiert. Eine ähnliche Ausdehnung wurde für Akkumulationen CD68-positiver Zellen (254.2 ± 120.5 ; Ta-

belle 3.1) ermittelt. Obwohl am Tag 9 p.l. keine hypointensen Herde in den MRT-Aufnahmen detektierbar waren, zeigt ein Vergleich der Akkumulationen CD68-positiver Zellen, dass ihr Durchmesser vom Tag 9 p.l. bis zum Tag 14 p.l. um durchschnittlich 57% anstieg (Tabelle 3.1). Ein Vergleich der beiden EAE-Modelle zeigt, dass im hyperakuten EAE-Modell die Inflammationen schon viel früher Ausdehnungen erreichen, wie sie im akuten EAE-Modell erst auf dem Höhepunkt der Erkrankung entstehen. Außerdem ist vorstellbar, dass die Progredienz der Inflammationen im hyperakuten EAE-Modell mit einer verstärkten Anreicherung VSOP beladener phagozytischer Monozyten gekoppelt ist (Abbildungen 26 L, 28 L) (Tysiak et al., 2009).

Insgesamt zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass eine Visualisierung inflammatorischer Prozesse in den EAE-Modellen durch MRT erst durch die i.v. Applikation von VSOP ermöglicht wird (Dousset et al., 1999a; Tysiak et al., 2009). Darüber hinaus wird gezeigt, dass die Detektion der inflammatorischen Prozesse in Form hypointenser Herde in MRT-Aufnahmen erst ab einer bestimmten Stärke / Größe möglich ist. Ob die Inflammationen im MRT früher oder später nachgewiesen werden, hängt davon ab, wie progredient sie sind. Somit wird deutlich, dass die Sensitivität der MRT-Messung bei der Detektion inflammatorischer Prozesse im ZNS erkrankter Tiere schlechter ist als die Sensitivität der histologischen Färbungen. Dennoch ermöglicht die MRT nach Applikation von VSOP sowohl eine Abschätzung der Anzahl als auch der Größe der inflammatorischen Prozesse und liefert somit einen Hinweis auf den klinischen Verlauf der EAE.

4.5. Sensitivität und Spezifität der MRT-Verfahren bei der Detektion lokaler Inflammationen nach Applikation von VSOP

Wie die qualitativen Vergleiche der MRT-Aufnahmen zeigen, besitzt die Phasenbildgebung einen charakteristischen Kontrast (Duyn et al., 2007; Zhong et al., 2008). Allerdings zeigt sich, dass auch bei der Phasenbildgebung eine Detektion akuter inflammatorischer Regionen im *Cerebrum* von EAE-Ratten nur mit Applikation eines superparamagnetischen Kontrastmittels wie VSOP bei 4,7 Tesla möglich ist.

Mit Ausnahme der MTR-Kartierung waren zerebrale Akkumulationen von VSOP in den MRT-Aufnahmen als hypointense Herde zu detektieren (Tysiak et al., 2009). Wie die histopathologischen Untersuchungen zeigten, stellen die hypointensen Herde Krankheitsäquivalente dar, die als Läsionen bezeichnet werden. Weiterhin war in der MRT eine zeitabhängige Veränderung der Läsionslast zu beobachten. Während auf dem Höhepunkt der Erkrankung die Läsionslast am stärksten war, nahm sie an den darauffolgenden Tagen kontinuierlich weiter ab. Ein Vergleich der MRT-Aufnahmen zeigte, dass sich das Erscheinungsbild der hypointensen Herde in Abhängigkeit vom MRT-Verfahren verändert. Dementsprechend erschien die Läsio-

onslast in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen auf dem Höhepunkt der Erkrankung weniger stark ausgeprägt als in korrespondierenden T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen desselben Tieres mit akuter oder hyperakuter EAE. Darüber hinaus waren die Kontrastwerte der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe vergleichsweise schwach ausgeprägt, woraus ein unscharfes Erscheinungsbild der Spots in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen resultierte. Sowohl in korrespondierenden MRT-Aufnahmen der MT- als auch der T_1 -gewichteten Bildgebung stiegen die Kontrastwerte der hypointensen Herde zum umgebenden Gewebe etwa um den Faktor 1,5 bzw. 2 an. Als Konsequenz waren die bereits in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen detektierten hypointensen Herde schärfer vom umgebenden Gewebe und von anderen Herden abgegrenzt. Darüber hinaus wurden hypointense Herde detektiert, die in T_2 -gewichteten MRT-Aufnahmen nicht zu lokalisieren waren (Abbildung 3.7, untere Reihe). Die quantitativ höchsten Kontrastwerte für hypointense Herde wurden nicht in Phasenbildern, sondern in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen ermittelt. Während die Kontrastwerte der Herde in der Phasenbildgebung etwa denen in MT- und T_1 -gewichteten MRT-Aufnahmen entsprechen, waren sie in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen zwei bis drei Mal höher (Tabellen 3.4, 3.8). In Übereinstimmung mit Tysiak et al. (Tysiak et al., 2009) zeigen diese Ergebnisse, dass die T_2^* -gewichtete Bildgebung bei der Detektion von Akkumulationen des VSOP am sensitivsten reagiert. Trotz der Unterschiede in den Kontrastwerten war die räumliche und zeitliche Verteilung der hypointensen Herde in Phasenbildern und T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen nahezu identisch. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass die Phasenbilder aus T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen generiert werden. Wie bereits erwähnt wird der Bildkontrast in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen durch unterschiedliche Relaxationen der Spins generiert. Die T_2^* -gewichteten Grauwertbilder wurden im 16 Bit „signed integer“ Format generiert, infolge dessen sich ein möglicher messbarer Wertebereich von 0 bis 32767 ergibt. Dabei steht der Wert „0“ für „Schwarz“ und der Wert „32767“ für den größtmöglichen Grauwert (G), also „Weiß“ ($G = 2^n - 1$, wobei $n = 15$). In der vorliegenden Arbeit lag der tatsächlich messbare Wertebereich (Grauwert) der T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen zwischen 46 und 32766 und wurde im Rahmen der quantitativen Auswertung ermittelt.

Der Bildkontrast in Phasenbildern wird dagegen durch Phaseninformationen der Spins generiert. Der messbare Wertebereich der Phaseninformationen liegt aufgrund der Methodik der Phasenbildgebung zwischen 0 und 2π . Die Definition der Grauwerte hängt dabei u.a. von der TE und den magnetischen Eigenschaften (z.B. der Eisenkonzentration) der Gewebe ab. Darüber hinaus verändert sich der definierte Wertebereich in Abhängigkeit vom Verarbeitungsschritt. Der messbare Wertebereich „ungefilterter“ Phasenbilder (16 Bit „signed integer“; Abbildung 3.6 B) lag zwischen 0 und 2π , wobei 2π für einen Grauwert von 6,28 steht. Die Nachkommastellen der Grauwerte ergeben sich aus der Rekonstruktion der „ungefilterten“ Phasenbilder. Durch das „phase unwrapping“ (Abbildung 3.6 C) und somit dem Hinzufügen

von ganzzahligen Vielfachen eines Phasenzklus lag der messbare Wertebereich der Referenzgrauwertbilder (32 Bit) des hyperakuten EAE-Modells anschließend zwischen 0 und durchschnittlich $179,083 \pm 32,516$. Durch die Verwendung des Hoch-Pass-Filters wurde der messbare Wertebereich in den Phasenbildern (32 Bit Format) neu definiert und lag zwischen 0 bis 2π erhöht um den Faktor 100. Dementsprechend steht 2π für einen Grauwert von 628,318. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Funktionalität des Filters insofern, dass der messbare Wertebereich der einzelnen ROIs (einschließlich hypointense Herde) im akuten EAE-Modell zwischen $263,246 \pm 35,072$ und $321,133 \pm 4,919$ und im hyperakuten EAE-Modell zwischen $240,153 \pm 48,761$ und $320,779 \pm 4,158$ lag. Allerdings wurden unabhängig vom EAE-Modell in den Phasenbildern auch Grauwerte gemessen die den definierten Bereich deutlich über- (akutes EAE: $8790,874 \pm 1479,924$; hyperakute EAE: $7316,128 \pm 1484,711$) und sogar unterschritten (akute EAE: $-7149,175 \pm 935,594$; hyperakute EAE: $-6665,685 \pm 1466,296$). Die entsprechenden Regionen waren sehr häufig an der Grenze des ZNS zum umgebenden Schädel und innerhalb sehr großer fokaler Läsionen im hyperakuten EAE-Modell zu finden (Abbildung 3.12). Es ist anzunehmen, dass diese extremen Abweichungen auf ein nicht funktionieren des Hoch-Pass-Filters zurückzuführen ist. Insgesamt wird deutlich, dass der Wertebereich in den Phasenbildern deutlich kleiner ist als der Wertebereich in korrespondierenden T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Als Konsequenz sind die messbaren Kontrastwerte der hypointensen Herde in Phasenbildern kleiner als in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen. Dennoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass beide MRT-Verfahren die gleiche Selektivität zur Detektion inflammatorischer Prozesse in beiden EAE-Modellen haben.

Wie die histopathologischen Untersuchungen im akuten EAE-Modell zeigten, ist der klinische Verlauf der Erkrankung durch eine zeitabhängige Veränderung der zerebralen Läsionslast charakterisiert. Diese zeitabhängige Veränderung war in Form hypointenser Herde in den MRT nach Applikation von VSOP nachzuvollziehen. Ein Vergleich der Kontrastwerte der hypointensen Herde zu verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchung zeigte, dass die Signalintensität der hypointensen Herde im Verlauf der akuten EAE kontinuierlich abnimmt. In Übereinstimmung mit früheren Studien (Jordan et al., 1999) zeigen die Ergebnisse, dass die Entwicklung inflammatorischer Regionen dynamischen Prozessen wie der Akkumulation aktivierter Makrophagen unterliegt.

Frühere Studien (Duyn et al., 2007; He and Yablonskiy, 2009) wiesen nach, dass der Kontrast in Phasenbildern sowohl auf die magnetische Suszeptibilität als auch die strukturelle Anordnung zellulärer und subzellulärer Bestandteile im Gewebe zurückzuführen ist. Einen wesentlichen Einfluss auf den Phasenkontrast hat auch der Eisengehalt des Gewebes. Innerhalb des ZNS liegt das Eisen entweder gebunden an Hämoglobin und an Enzymen vor (Häm-Eisen), oder es ist im Parenchym in Zellen eingelagert (Non-Häm-Eisen). Histopatho-

logische Untersuchungen in MS-Patienten zeigen, dass es unter inflammatorischen Bedingungen in den Läsionen zu fokalen Anreicherungen von Eisen kommt, das infiltrierte Makrophagen enthalten (LeVine, 1997). Hammond et al. (Hammond et al., 2008) bestätigten die früheren Ergebnisse und wiesen mit Hilfe der Phasenbildgebung bei 7 Tesla Anreicherungen eisenhaltiger Makrophagen in MS-Läsionen nach. Obwohl in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Akkumulationen von Makrophagen in histologischen Schnitten nachgewiesen wurden, konnte eine daraus resultierende Anreicherung von Eisen in der Phasenbildgebung bei 4,7 Tesla nicht nachgewiesen werden.

Ursache dafür könnte, wie schon bereits erwähnt, die Diskrepanz zwischen Schichtdicke (1 mm) und Größe der inflammatorischen Herde (300 μm) sein, aber auch, dass die Sensitivität der Phasenbildgebung und somit der Kontrast in Phasenbildern mit zunehmender Magnetfeldstärke weiter steigt (He and Yablonskiy, 2009; Marques et al., 2009; Zhong et al., 2008). Ein weiterer Grund für die Diskrepanz in den Ergebnissen könnte sein, dass die Läsionen bei den MS-Patienten wesentlich größer sind als die Läsionen im Tiermodell der akuten oder der hyperakuten EAE. Darüber hinaus werden die meisten zerebralen MS-Läsionen erst detektiert, nachdem es zu Demyelinisierungen, zum Verlust von Axonen oder zur Gliose gekommen ist. Daher ist anzunehmen, dass die zerebralen Läsionen in MS-Patienten in ihrer Entwicklung sowie ihrer Ausdehnung im Vergleich zu denen in den EAE-Modellen weiter fortgeschritten sind. Als Konsequenz ist die lokale Veränderung des Magnetfeldes wesentlich stärker und wird als Kontrast in Phasenbildern erkennbar (Hammond et al., 2008).

Zusammenfassend lassen sich folgenden Aussagen treffen: (1) Die Detektion zerebraler inflammatorischer Prozesse in den EAE-Modellen ist in der MRT nur nach Applikation eines eisenhaltigen Kontrastmittels möglich. (2) Obwohl die Phasenbildgebung leicht in klinische Untersuchungen integriert werden kann, liefert sie bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla bisher noch keine Zusatzinformationen bei der Detektion inflammatorischer Prozesse in den EAE-Modellen.

4.6. Die Rolle der Phasenbildgebung bei der Forschung am Patienten und am Tier

Bei MS-Patienten lassen sich histopathologisch aktive von inaktiven Läsionen unterscheiden. Chronisch inaktive Läsionen sind unter anderem durch einen fast vollständigen Myelinverlust, vereinzelt nachweisbare Lymphozyten (z.B. T-Zellen) sowie inaktive Mikrogliazellen charakterisiert. Die Entzündungsprozesse in aktiven Läsionen sind im Wesentlichen durch T-Zellen und Makrophagen geprägt, die heterogene Demyelinisierungsmuster verursachen. Darüber hinaus werden aktive Läsionen in akut und chronisch eingeteilt. Akute Läsionen beinhalten massenhaft infiltrierte aktivierte Makrophagen, die sämtliche Hauptbestandteile

des Myelins (z.B. MBP, MOG, MAG etc.) phagozytieren. Chronische Läsionen zeigen dagegen fortgeschrittene Stadien von Myelinabbau ohne den Nachweis der Myelinbestandteile MAG, MOG und CNP (Brück, 2002; Kroner-Milsch et al., 2012).

In der MS-Diagnostik ermöglichen konventionelle MRT-Verfahren nach Applikation paramagnetischer Kontrastmittel (z.B. Gd-DTPA) die Darstellung aktiver und inaktiver Läsionen. Das relativ homogene Signalverhalten der Läsionen in der MRT macht eine Differenzierung in akut, chronisch aktiv und chronisch inaktiv schwierig (Lee et al., 1999; Sailer, 2002; van Waesberghe et al., 1997). Daher wird neben konventionellen MRT-Verfahren unter anderem die MT-Bildgebung, als quantitatives MRT-Verfahren, verwendet. Durch die Generierung von MTR-Karten wird das Ausmaß der Demyelinisierung und dem axonalen Verlaust in den Läsionen messbar. Die Betrachtung der MTR-Werte akuter Läsionen über einen längeren Zeitraum zeigte eine initiale Reduktion mit anschließender Rückkehr zum Ausgangsniveau (Remyelinisierung) (van Waesberghe et al., 1998). Ein neueres quantitatives MRT-Verfahren, welches im Rahmen der MS-Forschung untersucht wird, ist die Phasenbildung. In Humanstudien von Matzke et al. (Matzke et al., 2010) wurden die MS-Läsionen zunächst in T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen als hyperintense Herde detektiert und in akut, chronisch aktiv und chronisch inaktiv unterteilt. In anschließend generierten Phasenbildern konnte die Mehrheit dieser Läsionen kaum dargestellt werden. Einige wenige Läsionen zeigten vorwiegend am Läsionsrand eine Signalanhebung, von denen angenommen wird, dass sie aus Remyelinisierungsprozessen resultieren (Matzke et al., 2010). Studien von Ovtcharov et al. (Ovtcharov et al., 2011) bestätigten die Ergebnisse insofern, dass in Phasenbildern weniger Läsionen (etwa 88%) zu detektieren waren als in T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen. Während die Läsionen in T₂-gewichteten MRT-Aufnahmen jedoch ein homogenes Erscheinungsbild (hyperintens) hatten, waren die gleichen Läsionen in Phasenbildern aufgrund struktureller Unterschiede differenzierbar. Es wird angenommen, dass diese Strukturunterschiede verschiedenen Entwicklungsstadien von Läsionen darstellen. Diese Annahme beruht darauf, dass der Phasenkontrast unter anderem vom Eisengehalt der Gewebe (Duyn et al., 2007; Zhong et al., 2008) und somit auch von De- und Remyelinisierungsprozessen beeinflusst wird (Ovtcharov et al., 2011). Ob es sich dabei um Entwicklungsstadien während der Demyelinisierung oder während der Remyelinisierung (Matzke et al., 2010) handelt, ist weiterhin ungeklärt.

Basierend auf den Befunden aus der Humanforschung wurde in der vorliegenden Arbeit die Sensitivität und Spezifität der Phasenbildung bei der Detektion akuter inflammatorischer Prozesse (BHS-Schädigung, Zellinfiltration) untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Phasenbildung bei 4,7 Tesla ohne Kontrastmittel nicht sensitiv genug ist, um akute inflammatorische Prozesse im EAE-Modell zu detektieren. Die Detektion war erst nach der Applikation eisenhaltiger Kontrastmittel möglich. Aus diesen Ergebnissen

ergeben sich weitere Hinweise, dass weder axonale Schäden (Matzke et al., 2010) noch akute inflammatorische Prozesse in Phasenbildern dargestellt werden können, zumindest nicht bei einer Feldstärke von 4,7 Tesla. Darüber hinaus stützen sie die Annahme, dass die in der Phasenbildgebung dargestellten Strukturunterschiede der MS-Läsionen auf De- und/oder Remyelinisierungsprozesse zurückzuführen sind (Ovtcharov et al., 2011). Um diese Vermutung jedoch belegen zu können, sind entsprechende Untersuchungen am chronisch-relapsierenden EAE-Modell notwendig. Bei einem positiven Befund könnte die Phasenbildgebung die MT-Bildgebung als quantitatives MRT-Verfahren in der MS-Diagnostik verdrängen.

Zusammenfassend lassen sich für die Phasenbildgebung folgende Aussagen treffen: (1) Die Phasenbildgebung ist ein MRT-Verfahren, das ohne zusätzlichen Zeitaufwand in die MRT-Untersuchung integriert werden kann. (2) Die Phasenbildgebung ist bei einer Feldstärke von 4,7 Tesla nicht sensitiv genug, um axonale Schäden oder akute inflammatorische Prozesse darzustellen. (3) Nach Applikation eisenhaltiger Kontrastmittel liefert die Phasenbildgebung keine Informationen, die konventionelle MRT-Verfahren nicht auch liefern. (4) Die Phasenbildgebung ist sensitiv genug, um verschiedene Entwicklungsstadien de- und / oder remyelinisierender Läsionen darzustellen (Ovtcharov et al., 2011).

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist neben der Epilepsie, eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei jungen Erwachsenen. Um die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen der Erkrankung besser verstehen zu können werden in der MS-Forschung verschiedene Tiermodelle verwendet. Ein Tiermodell ist das der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Ähnlich der MS verursacht die EAE lokale Läsionen im zentralen Nervensystem (ZNS), die unter anderem in der Magnetresonanztomographie (MRT) detektiert werden können. Die MRT stellt eines der wichtigsten bildgebenden Methoden in der MS-Forschung dar. Sie ermöglicht nicht nur die Darstellung anatomischer Strukturen (konventionelle MRT) mit einer hohen räumlichen Auflösung, sondern auch die Darstellung lokaler Veränderungen in den strukturellen Eigenschaften (quantitative MRT). Unter den Methoden die besonders sensitiv strukturelle Veränderungen darstellen ist die Phasenbildung eine neue Modalität. Besonders in der MS-Forschung am Menschen sind mit dieser Methode neuartige Kontraste in Läsionen zu beobachten. Allerdings sind die für die Kontrastgebung zugrundeliegenden molekularen und strukturellen Parameter bisher kaum erforscht.

In der vorliegenden Arbeit, wurden zwei Tiermodelle der EAE genutzt, um die Sensitivität und Spezifität der Phasenbildung bei der Detektion lokaler inflammatorischer Prozesse im Vergleich zu anderen MRT-Verfahren zu untersuchen. Das akute EAE-Modell wurde durch eine subkutane (s.c.) Injektion einer Suspension des Myelin-Basischen Proteins (MBP) von Meerschweinchen in Lewis-Ratten induziert. Das hyperakute EAE-Modell wurde durch eine s.c. Injektion einer Suspension des rekombinanten Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins von Ratten (rrMOG₁₋₁₂₅) in Dark-Agouti (DA)-Ratten induziert. Der Krankheitsverlauf wurde symptomatisch und durch MRT-Messungen an einem 4,7 Tesla Kleintierscanner überwacht. Die MRT umfasste konventionelle Verfahren, wie die T₁-, T₂- und T₂*-gewichtete Bildgebung, sowie quantitative Verfahren wie die Magnetisierungstransfer (MT)- und die Phasenbildung. Im akuten EAE-Modell wurden alle MRT-Aufnahmen mit oder ohne vorherige Applikation des superparamagnetischen Kontrastmittels VSOP (very small iron oxid particles)-C (Zitrat) 184 durchgeführt. Im hyperakuten EAE-Modell wurde VSOP-C200 verwendet. Parallel zu den MRT-Untersuchungen wurden histochemische (HE, Nissl, Gallyas) und immunhistochemische (CD31, CD68, Albumin, MBP) Untersuchungen durchgeführt.

Der Vergleich der unterschiedlichen MRT-Aufnahmen zeigte, dass die Phasenbildung einen neuartigen charakteristischen Kontrast bei Darstellung der zerebralen Anatomie von Lewis- und DA-Ratten liefert. Trotz dieses Kontrasts konnten auch in der Phasenbildung zu keinem Zeitpunkt akute inflammatorische Prozesse im *Cerebrum* erkrankter Tiere detektiert werden. Parallel dazu durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen zeigten,

dass mit dem Auftreten der ersten neurologischen Symptome sowohl Schäden an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) als auch lokale inflammatorische Regionen im *Cerebrum* vorhanden sind. Parallel zum weiteren klinischen Verlauf der EAE-Modelle wurden perivaskuläre Akkumulationen von Albumin und CD31 positiven Zellen (als Marker für Schäden in der BHS) sowie phagozytischer Monozyten (als Marker für inflammatorische Prozesse) nachgewiesen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla weder eines der etablierten MRT-Verfahren noch die Phasenbildgebung ausreichend sensitiv ist, um lokal begrenzte akute inflammatorische Prozesse im akuten oder hyperakuten EAE-Modell darzustellen.

In weiterführenden MRT-Untersuchungen nach Applikation eines superparamagnetischen Kontrastmittels (VSOP), war es möglich die akuten inflammatorischen Prozesse im *Cerebrum* erkrankter Lewis- und DA-Ratten zu visualisieren. Innerhalb der Regionen die in MRT-Aufnahmen hypointens erschienen, wurden Akkumulationen phagozytischer Monozyten (Makrophagen, Lymphozyten) nachgewiesen. Die aktivierten Monozyten hatten das Kontrastmittel bereits im Blutkreislauf über Phagozytose aufgenommen. Die Akkumulation der Kontrastmittel beladenen Monozyten führte zu einer lokal begrenzten Veränderung der Signalintensität in der MRT. Immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Belastung durch akute inflammatorische Prozesse im Verlauf der EAE zu- und später wieder abnehmen. Dementsprechend waren hypointense Herde in der MRT auf dem Höhepunkt der Erkrankung am häufigsten zu lokalisieren. Darüber hinaus wurde zu diesem Zeitpunkt der maximale Signalintensitätsunterschied zwischen hypointensen Herden und dem umgebenden Gewebe gemessen, der im weiteren Verlauf auf einen nicht messbaren Wert sank. In den verwendeten Tiermodellen der EAE war die Phasenbildgebung bei der Detektion der Akkumulationen des VSOP ähnlich spezifisch wie die T_2^* -gewichtete Bildgebung und ermöglichte im Vergleich zu den anderen MRT-Verfahren eine ähnlich detaillierte Lokalisierung wie die T_2^* -gewichtete Bildgebung. Obwohl die Kontrastwerte der hypointensen Herde in Phasenbildern aufgrund der Verarbeitungsschritte kleiner als in T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen waren, eignen sich beide Verfahren in gleichem Maße zur Detektion der Akkumulationen von VSOP.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Phasenbildgebung bei einer Magnetfeldstärke von 4,7 Tesla einen neuartigen Kontrast bei der Darstellung der zerebralen Anatomie von Ratten unter *in vivo* Bedingungen liefert. Darüber hinaus war sie mühelos in den Versuchsaufbau einzufügen, da entsprechende Phasenbilder auf Basis der T_2^* -gewichteten MRT-Datensätze generiert werden und somit keine zusätzlichen Messungen erforderlich waren. Allerdings war die Sensitivität der Phasenbildgebung nicht ausreichend, um akute inflammatorische Prozesse darstellen zu können. Eine Visualisierung der inflammatorischen Prozesse in der MRT war nur nach Applikation von VSOP möglich unterstützt. Die Phasenbildgebung

war ähnlich der T_2^* -gewichteten Bildgebung besonders sensitiv im Nachweis von lokalen VSOP Akkumulationen und daher gut geeignet, den Verlauf lokaler inflammatorischer Prozesse über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Für die Anwendung der Phasenbildung ohne vorherige Applikation von VSOP in den Tiermodellen der akuten und hyperakuten EAE, sollten Magnetfeldstärken größer als 4,7 Tesla verwendet werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abduljalil, A. M., et al., 2003. Enhanced gray and white matter contrast of phase susceptibility-weighted images in ultra-high-field magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging*. 18, 284-90.
- Ahn, M., et al., 2001. Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett*. 308, 41-4.
- Aloisi, F., et al., 2000. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*. 21, 141-7.
- Alotaibi, S., et al., 2004. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *Jama*. 291, 1875-9.
- Apotheken Umschau o. J. Multiple Sklerose (MS) Verlaufsformen und Prognose. unter: http://www.apotheken-umschau.de/Multiple-Sklerose/Multiple-Sklerose-MS-Verlaufsformen-und-Prognose-18894_4.html [Stand: 30.07.2013]
- Ascherio, A., Munger, K. L., 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 61, 288-99.
- Baker, D., Jackson, S. J., 2007. Models of Multiple Sclerosis. *ACNR*. 6, 10-12.
- Baxter, A. G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*. 7, 904-12.
- Brück, W., Pathologie und Pathophysiologie. In: R. M. Schmidt, F. Hoffmann, Eds., *Multiple Sklerose*. vol. Urban & Fischer Verlag, München, 2002, pp. 26-34.
- Buljevac, D., et al., 2002. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain*. 125, 952-60.
- Butcher, E. C., Picker, L. J., 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 272, 60-6.
- Cannella, B., Raine, C. S., 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 37, 424-435.
- Charcot, J. M., 1868. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des Hopitaux civils et militaires* 140, 554-555.
- Cossins, J. A., et al., 1997. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 94, 590-8.
- Davidson, D., et al., 1977. Monoamine metabolites in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 40, 741-5.
- Dinger, J. C., Niendorf, H. P., Kontrastmitteluntersuchungen. In: F. A. Stichnoth, Ed., *Handbuch der Magnetresonanztomographie*. vol. Blackwell-Wiss.-Verl., 1992, pp. 115-125.

- Dousset, V., et al., 1999a. Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted, conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 20, 223-7.
- Dousset, V., et al., 1999b. In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magn Reson Med.* 41, 329-33.
- Dousset, V., et al., 1992. Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: Läsion characterization with magnetization transfer imaging. *Radiology.* 182, 483-91.
- Duyn, J. H., et al., 2007. High-field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 11796-801.
- Dyment, D. A., et al., 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 3, 104-10.
- Ebers, G. C., Sadovnick, A. D., 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol.* 54, 1-17.
- Ebers, G. C., et al., 1995. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature.* 377, 150-1.
- Ebers, G. C., et al., 2000. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol.* 48, 927-31.
- Elian, M., et al., 1990. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 53, 906-11.
- Engelhardt, B., Ransohoff, R. M., 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26, 485-95.
- Flachenecker, P., Zettl, U. K., Krankheitsverlauf und Prognose. In: R. M. Schmidt, F. Hoffmann, Eds., *Multiple Sklerose.* vol. Urban & Fischer Verlag, 2002, pp. 50-60.
- Floris, S., et al., 2004. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain.* 127, 616-27.
- Floris, S., et al., 2002. Interferon-beta directly influences monocyte infiltration into the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 127, 69-79.
- Freitag, P., et al., 2000. Magnetic resonance imaging in diagnosis and disease monitoring of multiple sclerosis. *Suisse Arch Neurol Psychiatr.* 151, 47-56.
- Furlan, R., et al., 2009. Animal models of multiple sclerosis. *Methods Mol Biol.* 549, 157-73.
- Gallier, J., et al., 1987. 1H- and 2H-NMR study of bovine serum albumin solutions. *Biochim Biophys Acta.* 915, 1-18.
- Gerritse, K., et al., 1996. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 2499-504.
- Gilden, D. H., 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 4, 195-202.

- Goebels, N., et al., 2000. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain*. 123 Pt 3, 508-18.
- Gold, R., et al., 2000. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*. 6, 88-91.
- Gold, R., et al., 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 129, 1953-71.
- Haas, J., et al., 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 35, 3343-52.
- Hahnel, S., et al., 1998. [Magnetization transfer contrast: experimental sequence optimization for study of the cerebral substantia alba]. *Rofo*. 168, 185-90.
- Hahnel, S., et al., 2004. [Current use and possible future applications of the magnetization transfer technique in neuroradiology]. *Rofo*. 176, 175-82.
- Halliday, A. M., et al., 1972. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet*. 1, 982-5.
- Hammond, K. E., et al., 2008. Development of a robust method for generating 7.0 T multi-channel phase images of the brain with application to normal volunteers and patients with neurological diseases. *Neuroimage*. 39, 1682-92.
- Hardt, C., et al., Genetik und Umweltfaktoren. In: R. M. Schmidt, F. Hoffmann, Eds., *Multiple Sklerose*. vol. Urban & Fischer-Verlag, 2002, pp. 12-25.
- Harris, J. O., et al., 1991. Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for clinical trials and natural history. *Ann Neurol*. 29, 548-55.
- Hartung, H. P., et al., 1988. Immune mechanisms in inflammatory polyneuropathy. *Ann N Y Acad Sci*. 540, 122-61.
- Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 52, 61-76.
- Hayreh, S. S., et al., 1981. Experimental allergic encephalomyelitis. I. Optic nerve and central nervous system manifestations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 21, 256-69.
- He, X., Yablonskiy, D. A., 2009. Biophysical mechanisms of phase contrast in gradient echo MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 13558-63.
- Hendrix, A., Krempe, J., *Magnete, Spins und Resonanzen: Eine Einführung in die Grundlagen der Magnetresonanztomographie*. In: S. AG, (Ed.). Siemens AG, 2003.
- Heun, R., et al., 1988. Magnetic resonance imaging and early diagnosis of multiple sclerosis. *Lancet*. 2, 1202-3.
- Hickey, W. F., 1999. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol*. 98, 37-44.

- Hiehle, J. F., Jr., et al., 1995. Magnetization transfer effects in MR-detected multiple sclerosis Läsions: comparison with gadolinium-enhanced spin-echo images and nonenhanced T1-weighted images. *AJNR Am J Neuroradiol.* 16, 69-77.
- Hoftberger, R., et al., 2004. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis Läsions. *Brain Pathol.* 14, 43-50.
- Jee, Y., et al., 2002. Upregulation of monocyte chemotactic protein-1 and CC chemokine receptor 2 in the central nervous system is closely associated with relapse of autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 128, 49-57.
- Jordan, E. K., et al., 1999. Serial MR imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by human white matter or by chimeric myelin-basic and proteolipid protein in the common marmoset. *AJNR Am J Neuroradiol.* 20, 965-76.
- Karlik, S. J., et al., 1993. Gadolinium enhancement in acute and chronic-progressive experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig. *Magn Reson Med.* 30, 326-31.
- Katz, D., et al., 1993. Correlation between magnetic resonance imaging findings and Läsion development in chronic, active multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 34, 661-9.
- Koenig, S. H., Brown, R. D., 3rd, 1993. A molecular theory of relaxation and magnetization transfer: application to cross-linked BSA, a model for tissue. *Magn Reson Med.* 30, 685-95.
- Korn, T., 2008. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol.* 255 Suppl 6, 2-6.
- Krämer, G., Besser, R., 1988. Multiple Sklerose: Informationen für Betroffene, vol. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kroner-Milsch, A., et al., Multiple Sklerose und andere autoimmune ZNS-Erkrankungen. In: M. Stangel, M. Mäurer, Eds.), *Autoimmunerkrankungen in der Neurologie.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.
- Kurtzke, J. F., 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev.* 6, 382-427.
- Kurtzke, J. F., 2000. Multiple sclerosis in time and space-geographic clues to cause. *Journal of NeuroVirology.* 6, 134-140.
- Lassmann, H., et al., 1997. Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 3, 133-6.
- Lee, M. A., et al., 1999. Spatial mapping of T2 and gadolinium-enhancing T1 Läsion volumes in multiple sclerosis: evidence for distinct mechanisms of Läsion genesis? *Brain.* 122 (Pt 7), 1261-70.
- LeVine, S. M., 1997. Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. *Brain Res.* 760, 298-303.
- Lincoln, M. R., et al., 2005. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 37, 1108-12.
- Linington, C., et al., 1993. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol.* 23, 1364-72.

- Loevner, L. A., et al., 1995. Characterization of multiple sclerosis plaques with T1-weighted MR and quantitative magnetization transfer. *AJNR Am J Neuroradiol.* 16, 1473-9.
- Lorentzen, J. C., et al., 1995. Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. *J Neuroimmunol.* 63, 193-205.
- Lovett-Racke, A. E., et al., 1998. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest.* 101, 725-30.
- Lucchinetti, C., et al., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis Läsions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 47, 707-17.
- Marques, J. P., et al., 2009. On the origin of the MR image phase contrast: an in vivo MR microscopy study of the rat brain at 14.1 T. *Neuroimage.* 46, 345-52.
- Martin, R., et al., 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol.* 10, 153-87.
- Martyn, C. N., et al., 1993. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 56, 167-8.
- Martyn, C. N., Gale, C. R., 1997. The epidemiology of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl.* 169, 3-7.
- Matarese, G., et al., 2005. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 5150-5.
- Matzke, M., et al., Differentiation of Läsions using high-field phase contrast imaging in multiple sclerosis. 26th European Committee For Treatment And Research In Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Gothenburg, Sweden, 2010.
- Miller, D. H., et al., 1988. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain.* 111 (Pt 4), 927-39.
- Morrissey, S. P., et al., 1996. In vivo MRI and its histological correlates in acute adoptive transfer experimental allergic encephalomyelitis. Quantification of inflammation and oedema. *Brain.* 119 (Pt 1), 239-48.
- Muldoon, L. L., et al., 1999. A physiological barrier distal to the anatomic blood-brain barrier in a model of transvascular delivery. *AJNR Am J Neuroradiol.* 20, 217-22.
- Namer, I. J., et al., 1994. Magnetic resonance imaging of antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 54, 41-50.
- Oksenberg, J. R., et al., 2001. Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol.* 113, 171-84.
- Ovtcharov, V., et al., High-field phase contrast imaging in multiple sclerosis. 84. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), Wiesbaden, Germany, 2011.
- Owens, T., 2006. Animal models for multiple sclerosis. *Adv Neurol.* 98, 77-89.

- Ozenci, V., et al., 2000. Multiple sclerosis: pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN-beta. *J Neuroimmunol.* 108, 236-43.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, vol. Academic Press San Diego.
- Pender, M. P., 1986. Conduction block due to demyelination at the ventral root exit zone in experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res.* 367, 398-401.
- Pender, M. P., 1987. Demyelination and neurological signs in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 15, 11-24.
- Pender, M. P., 1989. Recovery from acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. Early restoration of nerve conduction and repair by Schwann cells and oligodendrocytes. *Brain.* 112 (Pt 2), 393-416.
- Pender, M. P., McCombe, P. A., Autoimmune neurological disease. In: M. P. Pender, P. A. McCombe, Eds.). Press Syndicate of the University of Cambridge, 1995.
- Pender, M. P., Sears, T. A., 1984. The pathophysiology of acute experimental allergic encephalomyelitis in the rabbit. *Brain.* 107 (Pt 3), 699-726.
- Pender, M. P., Sears, T. A., 1986. Involvement of the dorsal root ganglion in acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. A histological and electrophysiological study. *J Neurol Sci.* 72, 231-42.
- Pender, M. P., et al., 1990. The neuropathology of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced in the Lewis rat by inoculation with whole spinal cord and treatment with cyclosporin A. *Acta Neuropathol.* 80, 172-83.
- Poser, C. M., 1994. The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol.* 36 Suppl 2, S180-93.
- Quinn, T. A., et al., 2011. Optic neuritis and retinal ganglion cell loss in a chronic murine model of multiple sclerosis. *Front Neurol.* 2, 50.
- Rausch, M., et al., 2003. MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn Reson Med.* 50, 309-14.
- Ravkina, L., et al., 1979. Hyperacute experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys as a model of acute necrotizing hemorrhagic encephalomyelitis. *J Neurol.* 221, 113-25.
- Rivers, T. M., et al., 1933. Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med.* 58, 39-53.
- Rosati, G., 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* 22, 117-39.
- Rosche, B., et al., 2003. [New understanding of the immunopathogenesis of multiple sclerosis]. *Nervenarzt.* 74, 654-63.
- Sadovnick, A. D., et al., 1996. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet.* 347, 1728-30.

- Sailer, M., Magnetresonanztomographie. In: R. M. Schmidt, F. Hoffman, Eds., Multiple Sklerose. vol. Urban & Fischer Verlag, 2002, pp. 128-160.
- Schafer, A., et al., 2009. Using magnetic field simulation to study susceptibility-related phase contrast in gradient echo MRI. *Neuroimage*. 48, 126-37.
- Schluesener, H. J., et al., 1988. Demyelinating experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the rat: treatment with a monoclonal antibody against activated T cells. *J Neuroimmunol*. 18, 341-51.
- Schnell, L., et al., 1999. Acute inflammatory responses to mechanical Lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*. 11, 3648-58.
- Schnorr, J., et al., 2006. Focal liver Läsions: SPIO-, gadolinium-, and ferucarbotran-enhanced dynamic T1-weighted and delayed T2-weighted MR imaging in rabbits. *Radiology*. 240, 90-100.
- Soldan, S. S., et al., 1997. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med*. 3, 1394-7.
- Sospedra, M., Martin, R., 2006. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity*. 39, 3-8.
- Stichnoth, F. A., 1992. Handbuch der Magnetresonanztomographie, vol. Blackwell Wissenschaft-Verlag GmbH Berlin.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Lington, C., Lassmann, H., 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol*. 8, 681-94.
- Stroh, A., et al., 2004. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med*. 36, 976-84.
- t Hart, B. A., et al., 2011. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med*. 17, 119-25.
- Taupitz, M., Ein neues Kontrastmittel für die MRT auf der Basis Citrat-stabilisierter magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel: Wirkstofffindung, präklinische Entwicklung und klinische Prüfung. Freie Universität Berlin, 2005, pp. 188.
- Taupitz, M., et al., 2003. [Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development]. *Rofo*. 175, 752-65.
- Tombach, B., et al., 2004. First-pass and equilibrium-MRA of the aortoiliac region with a superparamagnetic iron oxide blood pool MR contrast agent (SH U 555 C): results of a human pilot study. *NMR Biomed*. 17, 500-6.
- Tysiak, E., et al., 2009. Beyond blood brain barrier breakdown - in vivo detection of occult neuroinflammatory foci by magnetic nanoparticles in high field MRI. *J Neuroinflammation*. 6, 20.
- van Waesberghe, J. H., et al., 1997. Single-dose gadolinium with magnetization transfer versus triple-dose gadolinium in the MR detection of multiple sclerosis Läsions. *AJNR Am J Neuroradiol*. 18, 1279-85.

- van Waesberghe, J. H., et al., 1999. Axonal loss in multiple sclerosis Läsions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol.* 46, 747-54.
- van Waesberghe, J. H., et al., 1998. Patterns of Läsion development in multiple sclerosis: longitudinal observations with T1-weighted spin-echo and magnetization transfer MR. *AJNR Am J Neuroradiol.* 19, 675-83.
- van Walderveen, M. A., et al., 1998. Histopathologic correlate of hypointense Läsions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology.* 50, 1282-8.
- Weissleder, R., et al., 1990. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology.* 175, 494-8.
- Wolansky, L. J., et al., 1999. Optimization of gray/white matter contrast with fast inversion recovery for myelin suppression: a comparison of fast spin-echo and echo-planar MR imaging sequences. *AJNR Am J Neuroradiol.* 20, 1653-7.
- Wolff, S. D., Balaban, R. S., 1994. Magnetization transfer imaging: practical aspects and clinical applications. *Radiology.* 192, 593-9.
- Yaldizli, Ö., Kappos, L., *Klinische Grundlagen der Multiplen Sklerose.* In: R. S. Egli, (Ed.), *Multiple Sklerose verstehen und behandeln.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- Zamaroczy, D., et al., 1991. Differentiation of experimental white matter Läsions using multiparametric magnetic resonance measurements. *Invest Radiol.* 26, 317-24.
- Zhong, K., et al., 2011. Phase contrast imaging in neonates. *Neuroimage.* 55, 1068-72.
- Zhong, K., et al., 2008. The molecular basis for gray and white matter contrast in phase imaging. *Neuroimage.* 40, 1561-6.
- Zhong, K., et al., Molecular size dependency of water macromoleculare exchange induced frequency shift. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 2009.

7. Lebenslauf

Name: Hunger

Vorname: Marcel

Geburt: 09.12.1977 in Wernigerode

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1984-1986 Diesterweg Oberschule, Wernigerode

1986-1991 Polytechnische Oberschule Hermann Matern, Wernigerode

1991-1996 Stadtfeld-Gymnasium, Wernigerode (Abitur)

Studium: 1999-2003 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Hochschule Harz, Wernigerode (Vordiplom)

2003-2008 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen (Diplom)

Berufliche Tätigkeit: 2009-2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Speziallabor Nicht-invasive Bildgebung am Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg

8. Publikation

M. Hunger, E. Budinger, K. Zhong, F. Angenstein. Visualization of acute focal lesions in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis by magnetic nanoparticles comparing different magnetic resonance imaging sequences including phase imaging. JMRI, USA, 2013. in press