

Aus der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

Univ.-Prof. Dr. med. Arno Bücker, M.Sc.

Magnetresonanztomographische Leberbildgebung bei 9,4 Tesla zur Untersuchung der experimentellen Leberfibrose bei der Labormaus

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der theoretischen Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2012

vorgelegt von: Andreas Müller
geb. am: 28.04.1963 in Kaiserslautern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung.....	6
Abstract	7
2. Einleitung	9
2.1. Pathophysiologie	9
2.2. Epidemiologie.....	11
2.3. Diagnostik.....	12
2.4. Probleme der Grundlagenforschung.....	15
3. Material und Methoden	17
3.1. Beschreibung des MRT-Geräts.....	17
3.2. Verwendete Versuchstiere	18
3.3. Tetrachlorkohlenstoffmodell.....	18
3.4. Genetisch bedingte Fibrose	19
3.5. Kontrolltiere	19
3.6. MRT-Untersuchung	20
3.6.1. Narkose	20
3.6.2. Vierkanal-Oberflächenspule	20
3.6.3. Quadratur-Volumenspule	21
3.6.4. MRT-Messungen.....	21
3.6.5. Überwachung während der MRT-Messungen	21
3.7. Etablierung und Optimierung der Bildgebung am Oberbauch	22
3.7.1. Etablierung der MRT des Mausabdomens.....	23
3.7.2. Optimierung der Bildgebung am Oberbauch der Maus.....	26
3.7.3. Etablierung der relaxometrischen Verfahren.....	28
3.8. Untersuchung der Leberfibrose.....	29
3.8.1. Bestimmung der Signalintensitäten und Relaxationszeiten	29
3.9. Histologische und biochemische Untersuchungen.....	31
3.10. Statistische Analyse	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Etablierung der MRT des Mausabdomens mit Ziel der weitgehenden Unterdrückung von Bewegungsartefakten.....	35
4.1.1. GE-Techniken zur T1-gewichteten Bildgebung.....	35
4.1.2. TSE-Techniken für die T2-gewichtete Bildgebung	40
4.2. Optimierung des Bildkontrastes für den Oberbauch der Maus.....	41

4.2.1. Gradientenechosequenz	41
4.2.2. TSE-Techniken für die T2-gewichtete Bildgebung.....	48
4.3. Anwendung der optimierten MRT-Sequenzen unter Einsatz der an die Anatomie der Maus angepasste Volumenspule	49
4.4. Etablierung und Optimierung der relaxometrischen Verfahren	50
4.4.1. Genutzte Sequenzen	50
4.5. Untersuchung der Leberfibrose.....	54
4.5.1. Biochemische und histologische Charakterisierung des Lebergewebes	54
4.5.2. Bestimmung der Leberenzyme aus Serumproben.....	60
4.5.3. Relaxationszeitbestimmungen	68
4.5.4. Zusammenfassung der relaxometrischen Untersuchungen.....	79
4.5.5. Messungen an Bilddaten MR-tomographischer Untersuchungen.....	81
4.5.6. Zusammenfassung für die Messungen auf Basis konventioneller MRT- Untersuchungen	110
5. Diskussion	114
5.1. Etablierung und Optimierung von Bildgebung und Relaxometrie	114
5.2. Histologische und biochemische Charakterisierung der Versuchstiere	115
5.3. Relaxometrische Untersuchung an Leberfibrose erkrankter Versuchstiere.....	118
5.3.1. Veränderungen der T1-Zeit	120
5.3.2. Veränderungen der T2-Relaxationszeit	123
5.3.3. Veränderungen der T2*-Relaxationszeit	124
5.3.4. Eignung der untersuchten relaxometrischen Verfahren zur Durchführung von Longitudinalstudien	125
5.4. Signalintensitätsmessungen des Lebergewebes als Ergänzung zu relaxometrischen Verfahren.....	127
6. Literaturverzeichnis	133
7. Publikationen.....	140
8. Dank.....	141
9. Lebenslauf	142

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abcb4</i>	Gen des Multidrug-Resistance-Proteins 2 der Maus bzw. Multidrug-Resistance-Proteins 3 des Menschen, der Verlust der Genfunktion führt beim Menschen zur progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 3
<i>Abcb4</i> ^{-/-}	Bei Mäusen transgen erzeugte Mutation des <i>Abcb4</i> -Gens mit komplettem Funktionsverlust
AdAUROC	Für das Spektrum der Fibrosegrade standardisierte Fläche unterhalb der Grenzwertoptimierungskurve, wird zur Beurteilung der Aussagekraft von Messwerten für die Diagnostik von Erkrankungsstadien erhoben
ALT	Alanin-Aminotransferase, vor allem im Zytoplasma von Leberzellen vorkommendes Enzym
AP	Alkalische Phosphatase, in großen Mengen im Leberparenchym und in den Gallengangsepithelien vorhandenes Enzym
APRI	„AST to platelet ratio index“, aus Standardparametern der Leberfunktion berechneter gewichtender Index für die Diagnostik
AST	Aspartat-Aminotransferase, vor allem in Mitochondrien von Leberzellen vorkommendes Enzym
AUROC	Fläche unterhalb der Grenzwertoptimierungskurve, wird zur Beurteilung der Aussagekraft von Messwerten für die Diagnostik von Erkrankungen erhoben
BALB/cJ	Für die Experimente verwendeter Versuchstierstamm
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
FA	Anregungswinkel, über die Stärke und Dauer der eingestrahlten Radiowellen bestimmter Auslenkungswinkel der Magnetisierung aus der Longitudinalachse bei der Kernspinresonanz
FSCORE	Fibrosescore, für die Stadieneinteilung der Fibrose verwendetes histopathologisches System, Spannbreite 0 bis 4
FVB/NJ	Für die Experimente verwendeter Versuchstierstamm

GE	Gradientenecho, magnetfeldbasiertes Verfahren zur Spinrefokussierung
MGE	Multigradientenecho, Abwandlung des GE zur Erzeugung mehrerer Einzelmessungen verschiedener TE bei einer einzigen Einstrahlung eines Radioimpulses, wird für die Bestimmung von T2* verwendet
MR	Magnetresonanz
MRR	Magnetresonanz-Relaxometrie
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
NA	Anzahl der Einzelmessungen, die in magnetresonanztomographischen Experimenten zur Erstellung eines Rohdatensatzes verwendet wurden
ROI	„Region of interest“, definierter Messpunkt im MRT-Bild, für den Signalintensitäten gemessen werden
SI	Signalintensität
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis, generelles Qualitätsmaß magnetresonanztomographischer Experimente, berechnet aus Signalintensität und Rauschen
T	Tesla, Maß bzw. Einheit der Magnetfeldstärke
T1	Den zeitlichen Verlauf der Longitudinalmagnetisierung charakterisierende Konstante
T2	Den zeitlichen Verlauf der Transversalmagnetisierung charakterisierende Konstante
T2*	Den zeitlichen Verlauf der Transversalmagnetisierung charakterisierende, zusätzlich von Magnetfeldinhomogenitäten abhängige Konstante
TE	Zeit, nach der im magnetresonanztomographischen Experiment die Messung erfolgt
TR	Zeitlicher Intervall zwischen der Einstrahlung der Radiowellen zur Erzeugung der Kernspinresonanz
TSE	Turbospinecho, messzeitoptimiertes radiowellenbasiertes Verfahren zur Spinrefokussierung
VTR-TSE	Turbospinecho-Technik mit variablen Repetitionszeiten, wird zur Bestimmung der Relaxationszeiten T1 und T2 eingesetzt

1. Zusammenfassung

Einführung: Die Leberfibrose und die aus ihr hervorgehende Zirrhose sind die gemeinsame Endstrecke aller chronischen Leberentzündungen. Zur effizienten Entwicklung neuer kausal in die Pathophysiologie der Fibrosebildung eingreifender Medikamente und zur Erforschung neuartiger Therapiestrategien werden nicht invasive Methoden zur Beurteilung dieser neuen Therapieansätze benötigt. Für die Diagnostik und Differenzierung der Leberfibrose im Versuchstier wurden verschiedene magnetresonanztomographische Verfahren entwickelt. Deren Wertigkeit ist jedoch bis heute nicht gesichert, außerdem ist ihre Verfügbarkeit aufgrund der aufwändigen technischen Voraussetzungen der Kernspintomographie eingeschränkt. Im Rahmen der hier vorgestellten Studie sollte mit Hilfe eines dedizierten Kleintier-Magnetresonanztomographen mit einer statischen Feldstärke von 9,4 Tesla untersucht werden, ob sich die MRT-Bildgebung mit Gradientenecho- und Turbospinecho-Sequenzen allein oder in Kombination mit der Bestimmung der Relaxationszeiten T₁, T₂ und T_{2*} bei hohen Magnetfeldstärken zur Darstellung fibrotischer Veränderungen des Lebergewebes eignet. Hierzu wurden die verschiedenen MRT-Techniken mit histologischen und biochemischen Verfahren verglichen. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse darüber zulassen, ob mit Hilfe der MRT Längsschnittuntersuchungen zur Beurteilung der Effizienz neuer therapeutischer Verfahren erfolgreich durchgeführt werden können.

Material und Methoden: Insgesamt wurden zwei experimentelle Tiermodelle der Leberfibrose angewendet. Diese wiesen unterschiedliche Pathomechanismen und auch Schweregrade für die Ausbildung einer chronischen Leberentzündung auf. Zur Induktion mittelschwerer bis schwerer Leberfibrosen wurden Versuchstieren unterschiedliche Mengen von Tetrachlorkohlenstoff injiziert. Moderate Leberfibrosen wurden mit Hilfe transgener Nullmutanten des *Abcb4*-Gens untersucht. MRT und Relaxometrie dieser verschiedenen Versuchstiergruppen erfolgten nach 6 oder 12 CCl₄-Administrationen mit einer Karenzzeit von 48 Stunden, bzw. 15 bis 17 Wochen nach Geburt der genetisch veränderten Versuchstiere. Anschließend wurde die Schwere der fibrotischen Veränderungen anhand eines Scoringssystems histologisch und durch die Ermittlung des Hydroxyprolingehalts von Gewebeproben biochemisch bestimmt.

Ergebnisse: Sowohl die Relaxationszeiten T1, T2 und T2* als auch die in MRT-Aufnahmen gemessenen Parameter Signalintensität und Signal-zu-Rausch-Verhältnis zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und erkrankten Versuchstieren. Die verschiedenen Ätiologien und Genotypen weisen unterschiedliche Morphologien bzw. Ergebnisse in ihrer MR-tomographischen und -relaxometrischen Darstellung auf. Für die verschiedenen Ätiologien einheitliche Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Versuchstieren konnten nicht festgestellt werden. Signifikant höhere T1-Werte gegenüber den Kontrolltieren wurden für CCl₄-behandelte BALB/cJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere gefunden. T2-Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede. T2*-Werte waren für FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere erhöht und für BALB/cJ Tiere erniedrigt. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den gemessenen Veränderungen der Signalintensitäten und der SNR der Gradientenechosequenzen Tiere, die mit CCl₄ behandelt worden waren, wiesen durchweg eine niedrigere Signalintensität und SNR der Leber auf; beide Parameter waren für die FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Für die MRT-Messwerte wurde die stärkste Korrelation mit dem Hydroxyprolingehalt und dem Fibrosescore für die gemessenen Signalintensitäten und die korrespondierenden SNR für die T2*-gewichtete Bildgebung festgestellt.

Schlussfolgerung: Anzeichen einer Leberfibrose können in Versuchstieren mit Hilfe einfacher MR-tomographischer und -relaxometrischer Verfahren erkannt werden. Die Auswahl der MRT-Techniken zur Charakterisierung der Leberfibrose bei Längsschnittuntersuchungen muss an das jeweils gewählte Tiermodell angepasst werden. Dann kann magnetresonanztomographisch auf minimal invasive Weise eine zur histologischen und biochemischen Quantifizierung korrelierende Aussage über das Ausmaß der Leberfibrose getroffen werden.

Abstract

Introduction: Liver fibrosis and finally cirrhosis are the common final path of chronic liver inflammation. While detailed insights into the molecular pathology of liver inflammation have been gained in the past decade, efficient therapies are available only for chronic destruction of hepatocytes caused by persistent viral infection. Both the development of pharmaceuticals and the identification of new treatment strategies are hampered by the lack of efficient, noninvasive methods for identification and quantification of liver fibrosis. Recently, different research projects have focused on the development of quantitative magnetic resonance experiments. However, these

techniques often require specialized hardware and software, restricting availability both in clinical and research environments. For this reason, a study was performed to investigate the potential of morphologic and parametric MRI for identification and staging of liver fibrosis using a dedicated MRI scanner developed for small animal imaging with a field strength of 9.4 T.

Materials und Methods: MRI was performed with gradient echo and turbo spin echo sequences, on animals harboring different types of experimentally induced liver fibrosis. MRI was performed on BALB/cJ mice treated with carbon tetrachloride, after 6 or 12 injections causing severe fibrosis. Mild liver fibrosis was investigated in *Abcb4* knockout mice generated in mouse strains BALB/cJ and FVB/NJ, 15 to 17 weeks after birth. Both inbred strains differ in sensitivity for liver inflammation, necrosis and fibrosis. From MRI experiments, average signal intensities, signal-to-noise-ratios and relaxation times T1, T2 and T2* were calculated. Following MRI, animals were sacrificed, and histological and biochemical analyses were performed on liver tissue. Results of MRI and histopathology were compared employing statistical analysis methods in order to find the MRI technique best suited for non-invasive estimation of liver changes.

Results: Signal intensities, signal-to-noise-ratios and relaxation times all showed significant differences between the healthy and diseased animals. Different etiologies and genotypes showed different changes in these parameters. Significantly higher T1 values were observed in CCl₄ treated BALB/cJ and FVB-*Abcb4*^{-/-} mice, when compared to control animals. Whereas there were no significant changes found for T2, T2* was also elevated in the latter group of animals, while it was lowered significantly for CCl₄ treated animals. Signal intensities and signal-to-noise-ratios in gradient echo MRI did fit well within the observed changes in T2*. CCl₄ treated animals generally showed lower signal intensities and signal-to-noise-ratios, while these parameters were raised in FVB-*Abcb4*^{-/-} mice, when compared to control animals. Strongest correlations with fibrosis scores and hydroxyprolin levels where detected for signal intensity measurements and corresponding signal-to-noise-ratios, for T2* weighted imaging.

Conclusion: Signs of liver fibrosis can be identified in the different animal models of fibrosis investigated, both by MR imaging and relaxometry. For longitudinal studies applying relaxation times, signal intensities and signal-to-noise-ratios the different behavior of these parameters depending on the respective animal model studied must be taken into account. This allows to minimally invasive judge changes of liver fibrosis by MRI corresponding well to histological and biochemical changes.

2. Einleitung

2.1. Pathophysiologie

Chronische entzündliche Lebererkrankungen können durch viele unterschiedliche Vorgänge verursacht werden. Neben dem Alkoholkonsum können Virusinfektionen, Autoimmunerkrankungen, Störungen der Cholestase, Veränderungen des Metabolismus, falsche Ernährung oder hepatotoxische Substanzen für die Entstehung dieses Krankheitsbildes verantwortlich sein. Letztendlich entsteht eine Hepatitis, wenn der schädigende Auslöser im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion nicht kontrolliert werden kann. Neben der direkten und unter Umständen irreparablen Gewebeschädigung (Tacke und Weiskirchen 2010) ist die Chronifizierung der Entzündung ein wesentliches Problem. So kann ein dauernder Entzündungsreiz bei chronischer Hepatitis Autoimmunreaktionen auslösen, die für die dauerhaft fortschreitende Schädigung der eigentlich sehr regenerationsfähigen Leber verantwortlich sind.

Bei der Entstehung einer akuten Leberentzündung kommt es zunächst zu einem Absterben der Hepatozyten. Der damit verbundene Zellzerfall führt zur Freisetzung von Mediatoren die zur Aktivierung von Kupffer-Zellen und von hepatischen Sternzellen führt. Diese wandeln sich in Myofibroblasten um, die extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren und abgeben. Über die außerdem gesteigerte Synthese und Abgabe einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine und Chemokine erhalten diese transdifferenzierten Zellen für die Dauer der Zellschädigung die Entzündungsreaktion aufrecht und bewirken eine massive Infiltration des Lebergewebes durch Immunzellen aus dem Blut sowie eine Aktivierung von Thrombozyten (Ramadori et al. 2008, Gao und Bataller 2011).

Kann der schädigende Reiz im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion kontrolliert werden, so ist eine vollständige Wiederherstellung von Organaufbau und -funktion möglich. Persistiert hingegen die Gewebeschädigung, so werden kontinuierlich Entzündungszellen rekrutiert, und es resultiert als überschießende „Wundheilungsreaktion“ eine Leberfibrose, bei der es zusätzlich zur Umdifferenzierung von Hepatozyten zu Myofibroblasten kommt. Diese vermehren sich durch Teilung zunächst im Dissé-Raum und den Sinusoiden; nachfolgend vermehren sie sich auch im geschädigten Leberparenchym und bilden durch Ablagerung übermäßig produzierter Proteine der extrazellulären Matrix Bindegewebsstrukturen aus, die sich abhängig vom

auslösenden Prozess in der Histologie unterschiedlich darstellen (Saile und Ramadori 2007).

So manifestieren sich durch chronische Virushepatitiden verursachte Fibrosen primär vorwiegend periportal, mit Schädigung der Gallengänge, der Gefäße des Portalfeldes und der sie umgebenden Hepatozyten. Dagegen ruft eine alkoholbedingte chronische Leberentzündung zunächst hauptsächlich perizentrale Veränderungen hervor, bei denen um Gruppen von Hepatozyten kollagenhaltige Ablagerungen gebildet werden und es durch Defenestrierung und Bildung einer durchgehenden Basalmembran zu einer Kapillarisierung der Sinusoide kommt. Mit fortschreitender Chronizität entwickelt sich eine portale Prädominanz, und durch die Füllung des Dissé-Raums mit Bindegewebe entstehen fibrotische Septen. Aufgrund der Verringerung der Anzahl von Hepatozyten, des behinderten Stoffaustauschs und Plasmaflusses sowie des durch die Veränderungen der Sinusoide beeinträchtigten portozentralen Blutflusses kommt es zur Funktionseinschränkung der Leber. Schreiten die massiven Zerstörungen des Funktionsgewebes und die Bindegewebevermehrung fort, entsteht eine Leberzirrhose. Typisch für eine dann irreversible Schädigung ist eine Verdrängung der normalen Architektur der Leberläppchen durch miteinander vernetzte Septen, die Ansammlungen sich regenerierenden Gewebes vollständig umschließen. Makroskopisch stellen sich fortschreitende massive Zerstörungen von Funktionsgewebe schließlich als Organverhärtung und narbige Schrumpfung der Leber dar. Als Komorbiditäten bedeutsam sind die durch den bindegewebigen Umbau entstehende portale Hypertension mit Bildung von Umgehungskreisläufen, ein erhöhtes Blutungsrisiko durch Mangel an Thrombozyten und humoralen Faktoren der Blutgerinnung, hepatzelluläres Karzinom, hepatische Nephro- und Enzephalopathie.

Die Leberfibre und die aus ihr hervorgehende Zirrhose sind der gemeinsame Endweg aller chronischen Leberentzündungen. Im Gegensatz zur Zirrhose handelt es sich selbst bei fortgeschrittenen Formen der Fibrose um einen reversiblen Zustand, bei dem eine Regression durch Anwendung geeigneter Maßnahmen erreicht werden kann. Die pathophysiologischen Mechanismen der Fibrosebildung wie auch der -regression sind derzeit nur zum Teil bekannt. In erster Linie besteht die Therapie einer Leberfibre daher gegenwärtig in der Eliminierung des ätiologischen Agens, welches die chronische Entzündung bewirkt.

2.2. Epidemiologie

Chronische Lebererkrankungen sind gegenwärtig in Deutschland die fünfhäufigste Todesursache. Für die Bevölkerungsgruppe der 25 bis 45-Jährigen führen sie die Mortalitätsstatistik sogar an. Gegenwärtig wird eine Zunahme dieser Erkrankungen beobachtet. Aktuelle epidemiologische Untersuchungen zur Fettleber zeigen, daß 20% bis 30% der Bevölkerung, zumeist aufgrund von Alkoholkonsum oder Übergewicht, betroffen sind (Cohen et al. 2011).

Für Männer nimmt die alkoholbedingte Lebererkrankung eine geschlechtsspezifische Sonderstellung ein. Diese primär auf einer chemischen Schädigung fußende Ätiologie gehört in Deutschland zu den zehn häufigsten Todesursachen des männlichen Geschlechts (Robert Koch-Institut (ed) 2011). Vor diesem Hintergrund überrascht die Häufigkeit der Leberzirrhose als irreversibler Endpunkt dieses Erkrankungsbildes in Deutschland von 1 pro 240 Einwohner im positiven Sinn, da eine Progression von der Steatohepatose zur persistierenden Steatohepatitis offensichtlich nur selten auftritt und von einer Reihe exogener und endogener Faktoren abhängt (Cohen et al. 2011).

In der Fortsetzung einer Studie zur Häufigkeit der nicht alkoholbedingten Lebererkrankung aus Italien (Bedogni et al. 2005) zeigte sich bei der Nachverfolgung von 144 Patienten mit pathologischen Blutwertveränderungen ohne Fettleber und 336 Patienten mit Ultraschallnachweis einer Steatohepatose für die erste Gruppe eine Neubildungsrate von 15% über einen Median von 8,5 Jahren, während die zweite Gruppe eine Remissionsrate von 46% aufwies und mehr Erholungen als persistierende Erkrankungen auftraten (Bedogni et al. 2007). Als prädiktiv für den Krankheitsverlauf stellten sich in dieser Studie die Menge der täglichen Alkoholaufnahme und die Höhe des γ -GT-Wertes heraus. Der Alkoholkonsum bewirkte ein insgesamt um 10% höheres Risiko, eine Fettleber zu entwickeln. Entsprechend werden die Bedeutung der Alkoholkarenz und der Gewichtskontrolle als präventivmedizinische Maßnahme verdeutlicht. Die sich unterscheidende Krankheitsentwicklung dieser Patienten weist aber auch auf die Vielzahl protektiver und prädisponierender exogener und endogener Faktoren hin, welche den Krankheitsverlauf chronischer entzündlicher Lebererkrankungen beeinflussen.

Sowohl in der Gruppe der nicht erkrankten als auch in der Gruppe der erkrankten Patienten entwickelten sich Zirrhosen und hepatzelluläre Karzinome mit etwa der gleichen Häufigkeit von 1,4% bzw. 0,7% für die ursprünglich gesunde Gruppe und 0,9% und 0,3% für die Gruppe der ursprünglich erkrankten Patienten.

2.3. Diagnostik

Während eine Fettleber relativ einfach zu diagnostizieren ist, lassen sich Häufigkeit und Schweregrad einer begleitenden wie auch durch andere Faktoren verursachten Leberfibrose nicht einfach und verlässlich durch klinische Untersuchungen erfassen. Diagnostischer Goldstandard zur Erkennung einer Leberfibrose ist die Feinnadelbiopsie. Gerade in der Frühphase von Lebererkrankungen erscheint eine Punktion wegen der möglichen Nebenwirkungen aber oft nicht gerechtfertigt. Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse bei der Feinnadelbiopsie von fortgeschrittenen Leberfibrose oder -zirrhose wurden in einer Fallstudie zur Hepatitis C bei 1,1% der Patienten beobachtet (Seeff et al. 2010). Weitere Probleme bestehen in der geringen Übereinstimmung zwischen der Beurteilung des Fibrosegrades durch verschiedene Pathologen und in der histologischen Variabilität der gewonnenen Proben selbst bei Anwendung hoher Qualitätsstandards (Colloredo et al. 2003). Entsprechend werden für die Diagnostik von chronischen Lebererkrankungen neue, unkompliziert durchführbare Verfahren zur Diagnostik und zur Beurteilung des Schweregrades der Leberfibrose benötigt.

Die bisher auf eine Eignung zur Stadienbestimmung der Leberfibrose untersuchten nicht oder gering invasiven Methoden lassen sich in drei verschiedene Gruppen einteilen. So kann der Fibrosegrad mit Blutwerten korreliert werden, die die Leberfunktion abbilden oder direkt an der Fibroseentwicklung beteiligte Genprodukte wiederspiegeln. Ein zweiter Ansatz beruht auf der Messung der durch die Fibrose veränderten elastischen Eigenschaften der Leber. Hier ist derzeit vorrangig die Sonographie als Technik zu nennen. Als drittes diagnostisches Verfahren zur Fibrosecharakterisierung bietet sich die Magnetresonanztomographie. Die klassischerweise genutzten MRT-Bilder mit ihrer hervorragenden Darstellung von Weichteilkontrasten sind jedoch zur initialen Fibrosecharakterisierung bisher nicht akkurat genug. Der Einsatz von Kontrastmitteln und die Bestimmung MR-spezifischer Gewebeparameter bieten weitere Ansätze zur Charakterisierung der Leberfibrose mit der Magnetresonanztomographie.

Die Beurteilung des Fibrosegrades aus Blutwerten wird klinisch vor allem anhand gewichtender Indexwerte der Leberfunktion durchgeführt. Zu diesem Zweck werden Serum- oder Plasmawerten normal in der Leber lokalisierte Enzyme und/oder von der Leber beeinflusster Blutbestandteile bestimmt und miteinander verrechnet. In der klinischen Praxis werden häufig der „AST to platelet ratio index“ (APRI) und das unter

dem Namen Fibrotest vertriebene Testssystem verwendet. Sensitivität und Spezifität beider Verfahren sind allerdings vor allem für die korrekte Einordnung des Schweregrades eine Fibrose (angegeben als Stadium F0 bis F4) relativ gering. In einer Metaanalyse von Poynard et al. wird für die Diagnose einer fibrotischen oder zirrhotischen Lebererkrankung unabhängig von Schweregrad oder Ätiologie ein AUROC von 0,84 (95% Konfidenzintervall 0,83-0,86) und ein auf das Spektrum der Fibrosegrade standardisierter AdAUROC von ebenfalls 0,84 (95% CI, 0.83–0.86) ermittelt (Poynard et al. 2007). Für die Differenzierung der verschiedenen Erkrankungsstadien untereinander ergeben sich deutlich geringere AUROC-Werte von 0,66 (F2 vs. F1, Konfidenzintervall 0,63-0,68), 0,69 (F3 vs. F4, Konfidenzintervall 0,65-0,72) und 0,62 (F1 vs. F0, Konfidenzintervall 0,59-0,65). Daher wurden Versuche unternommen, die im Blut bestimmbaren Parameter der Leberfunktion durch die Quantifizierung direkt am Krankheitsgeschehen beteiligter Proteine, wie z. B. extrazelluläre Matrixproteine, Zytokine, oder Proteinaseinhibitoren, zu ergänzen (Manning und Afdahl 2008, Fontana et al. 2008, Rosenberg et al. 2004). Sensitivität und Spezifität eines Nachweises über Blutwerte können so erhöht werden. Ob bestimmte Kombinationen direkter und indirekter Fibrosemarker zur Diskriminierung bestimmter Pathophysiologien oder Schwergrade besonders geeignet sind, ist bisher für einen standardisierten Einsatz noch nicht genügend erforscht.

Zwei neu etablierte physikalische Techniken zur Identifizierung einer Leberfibrose und zur Bestimmung ihres Schweregrades beruhen auf der Messung der Leberelastizität, die sich durch die Einlagerung bindegewebiger Strukturen in die Leber verändert. Bei der transienten Elastographie wird mit Hilfe unterschiedlicher Ultraschallwellen eine Scherwelle in der Leber erzeugt und anschließend deren Ausbreitungsgeschwindigkeit gemessen. Talwalkar et al. bestimmten in einer Metaanalyse die mittlere Sensitivität für die Diagnose einer hochgradigen Fibrose oder Zirrhose mit 87%, bei einer Spezifität von 91%. (95% Konfidenzintervall: 89%-92%). Für die Diagnose niedrigerer Stadien sinken diese Werte allerdings auf 70% bzw. 84% (Talwalkar et al. 2007).

Bei der MR-Elastographie handelt es sich um ein mit der transienten Elastographie vergleichbares Verfahren, welches ergänzende Informationen über die räumliche Verteilung der Elastizitätswerte liefert. Anders als bei der transienten Ultraschallelastographie werden mechanische, magnetfeldkompatible Anreger benötigt, mit denen niedrigfrequente Schwingungen auf die Leber übertragen werden. Mit Hilfe zur Anregung synchroner, in zwei Richtungen bewegungscodierter MRT-Sequenzen

kann die Geschwindigkeit der sich im Raum ausbreitenden Wellen berechnet und einer Position in der Leber zugeordnet werden. Für Untersuchungen mit Hilfe dieser Technik liegen erste Daten zur diagnostischen Wertigkeit vor. So konnten Wang et al. einen kontinuierlichen Abfall der Elastizität mit dem Fibrosegrad nachweisen und die Sensitivität und Spezifität der MR-Elastographie für die Vorhersage einer Fibrose \geq Grad 2 auf 91% und 97%, \geq Grad 3 auf 92% bzw. 95% und für Grad 4 auf 95% und 87% bestimmen. Diese Methode weist also eine hohe Sensitivität und Spezifität zur Diagnostik auch niedriger Grade der Leberfibrose auf (Wang et al. 2011). Apparate zur Schwingungsanregung, angepasste MRT-Sequenzen und Computersysteme für die Auswertung gehören gegenwärtig nicht zur Standardausrüstung von Magnetresonanztomographen. Entsprechend ist die Verfügbarkeit für die Diagnostik bzw. Stadienkontrolle der Leberfibrose gering.

Weitere zur Diagnose der Leberfibrose bzw. zur Differenzierung verschiedener Schweregrade beim Menschen bei Feldstärken von 1 bis 3 Tesla erprobte, experimentelle MRT-Verfahren sind die diffusionsgewichtete Bildgebung (Wang et al. 2011), die dynamische kontrastmittelunterstützte Messung der Leberperfusion (Chen et al. 2012) sowie die konventionelle MRT-Bildgebung nach Gabe von einem oder zwei Kontrastmitteln (Faria et al. 2009). Keines dieser Verfahren ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der klinischen Routine als Standard zur Stadienbestimmung der Leberfibrose etabliert, da keine ausreichenden Daten zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität vorliegen (Aguirre et al. 2005, Wang et al. 2011).

Die Relaxationszeiten T1, T2 und T2* beschreiben den Verlauf der verschiedenen Magnetisierungen in Longitudinal- und Transversalrichtung bei der Durchführung eines magnetresonanztomographischen (und -spektroskopischen) Experiments und lassen sich unter Verwendung spezifischer MRT-Sequenzen für die verschiedenen Organe eines Organismus bestimmen. Ihre Quantifizierung ermöglicht, allein oder in Kombination mit anderen quantitativen Markern der MRT, eine Differenzierung verschiedenster Arten von Gewebeschädigungen (Mathur et al. 2011) im Vergleich zu umliegendem gesundem Gewebe (Knight et al. 2008, Welsch et al. 2008, Wagnerova et al. 2012) und kann auch als Messgröße für physiologische Veränderungen nach medikamentösen Therapien eingesetzt werden. Bisher hat die parametrische Bildgebung in der klinischen Routine nur einen geringen Stellenwert erlangt. Für die Leberzirrhose ist eine Erhöhung von T1 und T2 bekannt, die sich auch in der Bildgebung als Veränderung der Signalintensität erkennen lässt (z. B. Faria et al. 2009).

Für T1 konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung dieser Relaxationszeitkonstante mit der Schwere der Leberzirrhose korreliert und über sie eine Stadienbestimmung möglich ist (Heye et al. 2012). Für Diagnostik und Stadienbestimmung der Leberfibrose spielt die Bestimmung von Relaxationszeiten im Alltag keine Rolle. Eingesetzt werden diese Verfahren vorwiegend, wenn spezifische bereits bekannte Veränderungen des Leberstoffwechsels quantifiziert werden sollen. So lässt sich zum Beispiel im Fall einer Hämochromatose oder einer Thalassämie durch die Messung der T2- oder T2*-Relaxationszeit eine Veränderungen der in der Leber gespeicherten Menge an Eisen bestimmen (Gandon et al. 1994, Argyropoulou und Astrakas 2007).

2.4. Probleme der Grundlagenforschung

Für die präklinische Forschung an Tiermodellen der Leberfibrose bestehen ähnliche Schwierigkeiten wie für die klinische Diagnostik. Zwar stellt hier die Probenentnahme kein grundsätzliches Problem dar, allerdings erfordert eine histologische, molekularbiologische oder biochemische Charakterisierung der Pathophysiologie zur Bestimmung der etablierten, eine Leberfibrose beschreibenden biochemischen, histologischen und molekularbiologischen Parameter eine Tötung der Versuchstiere. Hierdurch werden Längsschnittuntersuchungen am selben Tier unmöglich. Die Erforschung der unterschiedlichen zeitlichen Erkrankungsverläufe verschiedener Ätiologien und die Bestimmung günstiger Zeitfenster für eine medikamentöse Intervention werden so durch die hohe Menge an benötigten Untersuchungen bzw. Versuchstieren erschwert. Dementsprechend sind Messmethoden möglichst geringer Invasivität wünschenswert, mit deren Hilfe, direkt oder indirekt über Korrelation mit Ergebnissen histologischer und pathobiochemischer Untersuchungen, eine Bestimmung des Schweregrads einer Fibrose am lebenden Versuchstier erfolgen kann. Von besonderem Interesse ist dies für die Maus als Versuchstier, weil mittels bereits verfügbarer oder neu zu generierender transgener Tiere effizient nach der Rolle bestimmter Signaltransduktionswege in der Krankheitsentstehung, nach prädisponierenden genetischen Faktoren oder neuartigen Therapieansätzen gesucht werden kann.

Theoretisch kommen zu diesem Zweck dieselben Methoden in Frage, die gegenwärtig zur Stadienbestimmung beim Menschen untersucht werden. Kombinierte Bluttests direkter oder indirekter Marker haben hier allerdings den Nachteil, dass sie nur begrenzt für Versuchstiere evaluiert sind. Die transiente Elastographie auf Ultraschallbasis ist wie

für den Menschen auch für Versuchstiere nur mit dedizierter Geräteausstattung möglich und bei Kleintieren nur durch Anschaffung dedizierter Geräte möglich. Aufgrund der Größenverhältnisse ist diese Technik nochmals schwieriger durchführbar als beim Menschen.

Zur MRT der Leberfibrose liegen Untersuchungen an Versuchstieren vor. Die MR-Elastographie wurde bisher an der Ratte und an der Maus erprobt. Neben der Programmierung spezifischer Sequenzen stellt vor allem die Schwingungsanregung der Leber ein Problem dar. So konnten Yin et al. 2007 bei Untersuchungen an einem Mausmodell der autosomal rezessiven Zystennierenerkrankung eine Korrelation zwischen der Schwere der Fibrose und der Elastizität der Leber darstellen. Hierbei wurde eine Akupunkturnadel in die Leber eingeführt. Die Invasivität dieser Methode erlaubt wegen der Leberverletzungen keine Longitudinalstudien an einem Tier. Salameh et al. gelang 2009 die Entwicklung einer nicht invasiven Elastographiemethode, mit der Untersuchungen an Ratten mit experimentell induzierter Steatohepatitis durchgeführt werden konnten (Salameh et al. 2009).

Relaxometrische Verfahren zur Bestimmung von T1- und T2-Zeiten wurden ebenfalls an einer Reihe von Tiermodellen, vorwiegend bei niedrigen Feldstärken von 1,5 bis 3 Tesla und an Ratten erprobt. Die Relaxationszeiten T1 und T2 beschreiben Gewebeeigenschaften in einem starken Magnetfeld, wie es ein Magnetresonanztomograph erzeugt. Die Interaktion des Gewebes mit dem Magnetfeld (Interaktion zwischen Spin und Gitter) sowie die Interaktion der Gewebemoleküle untereinander (Spin-Spin) bestimmen wesentlich diese beiden Parameter. Bei den T2-Zeiten kann außerdem noch die T2*-Zeit ermittelt werden, die zusätzlich durch Magnetfeldinhomogenitäten beeinflusst wird. Von Kreft et al. 1999 an explantierten Lebern durchgeführte Relaxometriuntersuchungen zeigten an der Ratte für die orale und subkutane Gabe von CCl₄ sowie für die Induktion der Leberfibrose durch Fütterung mit Thioacetamid eine gute Korrelation von Fibrose und Zirrhose mit den T2-Zeiten in allen drei Tiermodellen. Es konnte zusätzlich ein Zusammenhang zwischen T2-Zeiten und der Infiltration durch Fettzellen sowie der Stärke der entzündlichen Veränderungen hergestellt werden. Für die T1-Zeit zeigte sich dagegen nur für die Administration von CCl₄ eine Verlängerung, die mit der in der Leber vorhandenen Menge an bindegewebigen Veränderungen korrelierte. In diesen Modellen war der Grad der Fibrose zudem mit dem Eisengehalt korreliert. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ergebnissen der Relaxometrie, der MRT-Bildgebung und dem Grad der

Eisenakkumulation konnte nicht hergestellt werden. Aubé et al. konnten diese Beobachtungen 2007 an durch Gallengangsligatur an konsekutiv fibrotisch veränderten Rattenlebern sowohl für T1- als auch für T2-Zeiten bestätigen. Nach dem aktuellen Wissenstand wird in der Literatur eine Abhängigkeit der in der Relaxometrie gemessenen Werte von den verschiedenen verwendeten Tiermodellen vermutet (Aubé et al. 2007, Kreft et al. 1999). Basierend auf den bisher publizierten Ergebnissen könnte die relaxometrische Untersuchung der Leber in Kombination mit Signalintensitätsmessungen bei Wahl geeigneter Tiermodelle eine nichtinvasive Methode zur Bestimmung des Fibrosegrades an der Maus darstellen. Da sich die Relaxationszeiten mit der Erhöhung der Feldstärke verändern und auch die Empfindlichkeit der MRT gegenüber physiologisch bedingten Suszeptibilitätseffekten wächst (Beeinflussung der T2*-Zeit), wird durch eine höhere verfügbare Stärke des statischen Magnetfeldes theoretisch eine Verbesserung der Detektierbarkeit fibrotischer Veränderungen möglich. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen an zwei Mausmodellen für Leberfibrose folgende Fragen beantwortet werden; die Tiere weisen hierbei je nach Modell eine verschiedene genetische Disposition zur Entwicklung einer Leberfibrose auf:

1. Wie sinnvoll ist die Bestimmung von Signalintensitäten zur Charakterisierung der Leberfibrose in verschieden gewichteten MRT-Sequenzen?
2. Wie sind die Standardwerte für T1-, T2- und T2*-Zeiten bei verschiedenen Maustiermodellen der Leberfibrose?
3. Sind nicht invasive Longitudinalstudien zur Bestimmung von T1-, T2- und T2*-Zeiten bei Mausmodellen der Leberfibrose zur Reduktion der Anzahl von Versuchstieren möglich?

3. Material und Methoden

3.1. Beschreibung des MRT-Geräts

Die MRT-Untersuchungen der Mäuse wurden am Institut für experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes/Homburg durchgeführt. Zum Einsatz kam ein für die Untersuchung von Kleintieren entwickeltes MRT-Gerät (Biospec Avance III 9.4/20, Bruker Biospin, Ettlingen) mit einer Feldstärke von 9,4 Tesla (T), einer Gradientenstärke von 675 mT/m und einer Zeit bis zum maximalen Anstieg der Gradientenstärke von 114,8 µs (Gradientenset BGA12S). Zum Betrieb des Systems

sowie zur Auswertung der Versuchsergebnisse wurde die von Bruker bereitgestellte Software Paravision in den Versionen 5.0 bzw. 5.1 verwendet.

Zur Etablierung und Optimierung der Bildgebung des Oberbauchs der Maus und zur Erarbeitung des Untersuchungsprotokolls für Versuchstiere mit experimentell erzeugter Leberfibrose wurde als Sender ein linearer Einkanal-Transmitter mit einem Innendurchmesser von 72 mm eingesetzt. Die Aufnahme der MRT-Signale erfolgte dabei mit einer für die Untersuchung von Rattengehirnen entwickelten sattelförmigen Vierkanal-Oberflächenspule in „Phased array“-Anordnung.

Für die Untersuchung der Unterschiede der Relaxationszeiten und der Signalintensitäten der Leber in verschiedenen Tiermodellen der Leberfibrose wurde für Anregung und Messung eine speziell an die Anatomie der Maus angepasste Quadratur-Volumenspule mit einem Innendurchmesser von 38 mm verwendet.

3.2. Verwendete Versuchstiere

Haltung und Zucht aller benötigten Versuchstiere erfolgten in der Versuchstierzucht der Universität des Saarlandes und wurden von Katrin Hochrath (Tierversuchsleiterin und wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Innere Medizin II) organisiert. Die Tiere wurden dabei mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in individuell ventilierten Käfigen mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden bei einer Außentemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ gehalten.

Im Rahmen genehmigter anzeigenpflichtiger Eingriffe nach §10 Tierschutzgesetz vom 11.05.2009 und 08.12.2009 wurden zur Etablierung und Optimierung der MR-Bildgebung und -Relaxometrie insgesamt 20 gesunde, ca. 16 Wochen alte männliche Mäuse der Stämme C57BL/6N und BALB/cJ verwendet.

Anschließende magnetresonanztomographische Vergleichsuntersuchungen zur Leberfibrose fanden mit Hilfe zweier Erkrankungsmodelle (CCl_4 und $Abcb4^{-/-}$ oder toxisches und Knockout Modell) statt. Diese Tierversuche wurden durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes (08/2010) genehmigt.

3.3. Tetrachlorkohlenstoffmodell

Als Tiermodell einer zentrozentralen Leberfibrose hohen Schweregrades wurde die chronische Intoxikation mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) gewählt. Zur Induktion erhielten

für die Ausbildung von Leberfibrosen empfindliche, sechs bis acht Wochen alte BALB/cJ Mäuse (Hillebrandt et al. 2002) zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion von 0,7 mg CCl₄ pro kg Körpergewicht. Für die toxische Induktion der Leberfibre wurde eine CCl₄/Mineralöl-Mischung (1:1) verwendet. An 11 Tieren (vier Männchen und sieben Weibchen) erfolgte die Injektion über einen Zeitraum von drei Wochen. Weitere 11 Tiere (sechs Männchen und fünf Weibchen) wurden über insgesamt 6 Wochen behandelt. Die anschließenden MRT-Untersuchungen wurden mindestens 48 Stunden nach der letzten CCl₄-Applikation durchgeführt. Nach Beendigung der MRT erfolgten die Tiertötung und die Blut- und Organentnahme für biochemische und histologische Untersuchungen (durchgeführt von K. Hochrath).

3.4. Genetisch bedingte Fibrose

Als Tiermodell einer portoportalen Leberfibre geringeren Schweregrades wurde ein transgenes Tiermodell gewählt. Mäuse mit einem homozygoten Verlust des *Abcb4*-Genlocus entwickeln ein der primär sklerosierenden Cholangitis des Menschen ähnliches Krankheitsbild (Fickert et al. 2004). Dieses wird bedingt durch Fehlen von Phosphatidylcholin in der Gallenflüssigkeit (Smit et al. 1993, Ruetz und Gros 1994). Die resultierende chronische Schädigung der canaliculären Hepatozyten-Zellmembran bzw. der Cholangiocyten durch nicht ausreichend emulgierte Gallensäuren verursacht in diesen Tieren eine chronische Entzündung, die letztlich zu einer biliären Fibrose führt. Dabei ist die Schwere der entstehenden Leberfibre abhängig von der genetischen Disposition des untersuchten Tierstammes (Hillebrandt et al. 2002). Für die Untersuchung im Kleintier-MRT standen *Abcb4*^{-/-} Mäuse mit dem für Fibrose empfindlicheren BALB/cJ Genotyp (n = 12, sechs Männchen und sechs Weibchen) sowie mit dem unempfindlicheren FVB-*Abcb4*^{-/-} Genotyp (n = 12, sechs Männchen und sechs Weibchen, Hillebrand et al. 2002, Hillebrand et al. 2005) zur Verfügung. Die Genotypisierung erfolgte an genomischer DNA aus Schwanzgewebe mittels PCR mit spezifischen Primern für den *Abcb4*- und *neo*-Locus (durchgeführt von K. Hochrath).

3.5. Kontrolltiere

Als Kontrolltiere für CCl₄-induzierte und genetisch bedingten Leberfibrosen standen Mäuse der Stämme BALB/cJ (n = 10, sieben Männchen und drei Weibchen) und FVB/NJ (n = 15, acht Männchen und sieben Weibchen) gleichen Alters zur Verfügung.

3.6. MRT-Untersuchung

3.6.1. Narkose

Zur MRT-Untersuchung der Versuchstiere wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran und reinem medizinischen Sauerstoff angewendet. Die Dosierung des Narkosegases erfolgte mit Hilfe eines selbst gebauten Narkosegerätes, bestehend aus einem Verdampfer (Vapor 19.3, Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck) der über einen Druckminderer mit DIN Entnahmekupplung (Karl Heck GmbH Medizin- und Sauerstofftechnik, 65385 Rüdesheim) und einen Flussregler (Stufenflowmeter, Direktanschluss, Karl Heck GmbH Medizin- und Sauerstofftechnik, Rüdesheim) an eine Druckflasche mit 100% Sauerstoff angeschlossen war. Die Konzentration an Isofluran konnte dabei stufenlos von 0 bis 5% variiert werden, während der Fluss an Narkosegasgemisch in folgenden Stufen einzustellen war: 0,4 l/min - 0,7 l/min - 1,0 l/min - 1,5 l/min - 2,0 l/min - 2,5 l/min - 3,0 l/min - 4,0 l/min und 5,0 l/min.

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem speziellen Plastikgefäß, in das Isofluran in einer Konzentration von 2,5% mit einem Fluss von 1,5 l/min eingeleitet wurde. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere für die MRT vorbereitet. Während der Vorbereitung der Versuchstiere und der anschließenden MRT-Untersuchung wurde die Narkose durch Applikation von 0,8% bis 2% Isofluran in Sauerstoff unter besonderer Berücksichtigung der Atemfrequenz aufrechterhalten. Abhängig von der Körpertemperatur der Versuchstiere wurde zudem die Temperatur des Wärmekissens manuell nachgeregelt.

3.6.2. Vierkanal-Oberflächenspule

Bei Verwendung der Vierkanal-Oberflächenspule wurden die Versuchstiere direkt auf der Spule platziert. Die Narkose wurde über eine spezielle, an die Tieranatomie angepasste Beatmungsmaske aufrechterhalten, die an der Oberfläche des Spulenelementes befestigt wurde. Zur Detektion der Atemsignale wurde ein pneumatischer Drucksensor (Graseby Neonatologie Atemmonitor, Smith Medical Germany, Grasbrunn, Deutschland) seitlich auf dem Rücken der Versuchstiere angebracht. EKG-Signale wurden über an den Vorderpfoten der Versuchstiere befestigte Klebeelektroden (3M Red Dot 2269T vorverkabelte Elektrode für Neugeborene, 3M Deutschland GmbH, Düsseldorf) abgeleitet. Zur Messung der Körperkerntemperatur wurde eine Rektalsonde eingeführt („small rectal temperature probe“, SA Instruments Inc., Stony Brook, New York, USA). Die Tiere wurden mit einem

speziellen, an einen externen Wasserthermostat (Haake C10, Thermo Electron (Karlsruhe) GmbH, Karlsruhe) angeschlossenes Wärmekissen (Bruker Biospin, Ettlingen) bedeckt und im Zentrum des Magneten platziert. Vor jeder MRT-Messung erfolgte die Feinabstimmung der Resonanzfrequenz und Schwingkreisgüte für den zum Senden der RF-Pulse verwendeten linearen Transmitter.

3.6.3. Quadratur-Volumenspule

Wurde eine Quadratur-Volumenspule verwendet, erfolgte die Platzierung auf dem Wärmekissen, welches zuvor auf einer speziellen, die Spule tragenden Tierliege mit integrierter Beatmungsmaske fixiert wurde. Nach Befestigung von Atemsensor und Temperatursonde in identischer Position wurde die Spule am Haltesystem der Tierliege angebracht. Danach erfolgten die Feinabstimmung der Resonanzfrequenz und Schwingkreisgüte außerhalb des MRT-Gerätes, getrennt für beide Kanäle der Spule. Anschließend wurden die Versuchstiere im Zentrum des Magnetfeldes positioniert.

3.6.4. MRT-Messungen

Anhand von Übersichtsaufnahmen in x-, y- und z-Richtung (s. Tabelle 10) wurde überprüft, ob die Versuchstiere korrekt auf bzw. in der Spule und im Zentrum des Magneten gelagert waren. Gegebenenfalls wurde eine Korrektur durchgeführt. Nach endgültiger Positionierung erfolgte eine lineare Homogenisierung des Magnetfeldes mit der Shim-Sequenz, die standardmäßig in der Bedienungssoftware implementiert ist. Dieses Verfahren schließt die Anpassung der Frequenz des eingesendeten Signals an die Resonanzfrequenz und die Einstellung der Amplitude des RF-Pulses ein.

3.6.5. Überwachung während der MRT-Messungen

Für die Aufzeichnung und Darstellung der Vitalparameter sowie die Ansteuerung des MRT-Gerätes wurde ein speziell für Tiere entwickelter Monitor samt Software eingesetzt (Model 1030 Monitoring & Gating System und PC-SAM32, SA Instruments Inc., Stony Brook, New York, USA).

3.7. Etablierung und Optimierung der Bildgebung am Oberbauch

Sowohl für die Bildqualität als auch für die Kontrastierung der erzeugten MRT-Aufnahmen sind bei der Untersuchung des Abdomens die verwendeten Repetitions- und Echozeiten (TR und TE), die gewählte Auflösung, die Richtung des Auslesegradienten (Readout), die Anzahl an durchgeführten Datenakquisitionen pro Bildrekonstruktion (NA) und die geeignete Wahl von Verfahren und Einstellungen zur bewegungsabhängigen Ansteuerung des MRT-Gerätes von großer Bedeutung.

Gradientenecho (GE)-Sequenzen eignen sich für die T1- und T2*-gewichtete Bildgebung sowie für die relaxometrische Bestimmung von T2*-Zeiten, während Turbospinecho (TSE)-Sequenzen für T2-gewichtete Untersuchungen und die relaxometrische Bestimmung von T1- und T2-Zeiten angewendet werden können. Für die Bildgebung des Mausabdomens wurden von Bruker für die Bildgebung des Abdomens der Ratte entwickelte zweidimensionale GE- und TSE-Sequenzen mit folgenden Parametern eingesetzt (Tabelle 1):

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FA ($^{\circ}$)	NA	Auflösung (μm^3)	Readout	Dauer
GE	900 ms	2,5	80	1	234x234x1000	L-R	3:50
TSE	900 ms	26,2	90/180	4	234x234x1000	L-R	1:55

Tabelle 1: Vordefinierte Standardsequenzen zur Untersuchung des Abdomens der **Ratte**

Beide Standardmesstechniken wurden durch die Erhöhung der Auflösung an die Anatomie der Maus angepasst (Tabelle 2).

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FA ($^{\circ}$)	NA	Auflösung (μm^3)	Readout	Dauer
GE	900 ms	2,5	80	2	133x133x700 μm	L-R	7:40
TSE	900 ms	26,2	90/180	4	133x133x700 μm	L-R	1:55

Tabelle 2: Anpassung der vordefinierten Sequenzen für die Untersuchungen an **Mäusen**

Die Echozuglänge (=beschleunigender Faktor) wurde für die TSE-Sequenz auf 8 eingestellt. Anschließend wurden MRT-Messungen des Oberbauchs mit beiden

Protokollen durchgeführt. Im Rahmen dieser Messungen erfolgte die Etablierung der Sequenzen im Hinblick auf die Optimierung des Triggerverfahrens sowie der Bildkontraste, welches im folgenden beschrieben wird.

3.7.1. Etablierung der MRT des Mausabdomens

Die MRT der Organe des Oberbauchs wird durch die Nähe zum Brustkorb und die entsprechend aus Atmung und Herzkontraktion resultierenden Bewegungsartefakte beeinträchtigt. Um diese zu verringern, wurde unter Verwendung der GE-Sequenz zunächst die Anzahl an in die Bildberechnung eingehenden Einzelmessungen (NA) erhöht. Hierzu wurden Untersuchungen mit einer bis 20 Akquisitionen durchgeführt. Anschließend wurden verschiedene Verfahren zur bewegungsabhängigen Ansteuerung des MRT-Gerätes untersucht. MRT-Untersuchungen wurden unter alleiniger Nutzung von Atem- und EKG-Signalen oder unter Kombination beider Techniken durchgeführt. Dabei wurde für die untersuchte GE-Sequenz aufgrund der relativ kurzen TR eine Ansteuerung pro Phasencodierschritt gewählt.

Beim Atem-Gating wird während der Exspirationsphase ein kontinuierliches Signal zur Aktivierung des MRT-Gerätes gesendet. Dabei kann die Dauer bis zur Aktivierung dieses Signals nach Erkennung eines Einatemvorganges (Triggerverzögerung) wie auch die Länge des Zeitfensters selbst (Atem-Gate) so eingestellt werden, dass einzelne Teile der MRT-Untersuchung vor Beginn des nächsten Atemzyklus des Versuchstieres abgeschlossen sind.

Um alle zu einer Schicht gehörenden Phasenkodierschritte in einer Atemperiode messen zu können wurden die Gating-Parameter für $TR < \text{Atemperiode}$ nach folgender Formel gewählt werden:

$$\text{Triggerverzögerung} + \text{Atem-Gate} + TR < \text{Atemperiode}$$

Limitierend wirkte hier die Atemfrequenz der Versuchstiere. Bei 30 Atemzügen pro Minute, entsprechend einer Atemperiode von 2000 ms, ergibt sich mit einer festen Totzeit/Verzögerung von 200 ms und einer TR von 900 ms eine maximale Breite des Atem-Gates von 900 ms.

Beim ausschließlichen EKG-Triggern wurden MR-Signale in Abhängigkeit vom aufgezeichneten QRS-Komplex aufgenommen. Die MRT-Messungen begannen 20 ms nach der R-Zacke (10 ms Verzögerung plus Triggerverzögerung von 10 ms). Auf die

verschiedenen Atemphasen wurde bei der reinen EKG-Triggerung keine Rücksicht genommen.

Untersuchungen mit alleinigem Atem-Gating oder mit alleiniger EKG-Triggerung wurden mit Mittlungen der Datensätze zwischen einer und 15 durchgeführt und verglichen. Die Narkosesteuerung wurde hierbei zur Erhaltung einer kontinuierlichen Atemplateaulänge – also zur Erzielung einer gleichmäßigen Atmung – eingesetzt.

Zusätzlich wurden MRT-Messungen mit gleichzeitigem Atem-Gating und EKG-Triggerung durchgeführt. Auch diese Sequenzen wurden systematisch mit ein bis 15 Mittlungen durchgeführt.

An kombiniert getriggerten Sequenzen wurde der Einfluss der Länge des Atem-Fensters auf die Bildqualität untersucht. Dabei wurde die Sammlung von MR-Daten (Aufnahmefenster) für eine Zeitspanne zwischen 400 ms und 1600 ms variiert.

Einflüsse der TR auf die Bildqualität und Gewebekontrastierung wurden anschließend unter Anwendung einer kombinierten Atem- und EKG-Steuerung untersucht. Dabei wurde die TR sukzessive von 900 ms auf 50 ms reduziert.

Um die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Triggermethoden an MRT-Sequenzen niedriger TR zu überprüfen, wurden entsprechende Messungen ohne Triggerung, nur mit Atem-Gate, nur mit kardialer Triggerung und in Kombination beider Methoden mit jeweils ein bis 15 Akquisitionen wiederholt. Tabelle 3 fasst die verwendeten Einstellungen zusammen.

Wegen der großen Anzahl zu variierender Parameter ist eine streng systematische Vorgehensweise zur Optimierung der einzelnen Sequenzparameter nicht möglich. Dies gilt um so mehr, da eine gewisse Abhängigkeit der verschiedenen Sequenzparameter untereinander besteht. Deshalb wurde auf eine statistische Auswertung der erhobenen Daten verzichtet. Die Bildqualität aller im Rahmen der Sequenztablierung durchgeführten Untersuchungen wurden im Hinblick auf Bewegungsartefakte und nach der Differenzierbarkeit der verschiedenen Gewebeanteile der Leber rein subjektiv von einem erfahrenen Radiologen beurteilt. In Abhängigkeit dieser subjektiven Einschätzung erfolgte die Festlegung der jeweils weiteren zu variierenden Parameter der Sequenzen.

Tabelle 3: varierte Einstellungen der prospektiv getriggerten MRT-Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	Trigger	Atem-Gate (ms)	NA
900	2,5	2,5	Ohne	-	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20
		2,5	Atmung	900	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15
		2,5	EKG	-	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15
		2,5	EKG + Atmung	400	2
		2,5		800	2
	2,5	2,5		900	1, 2, 3, 4, 5
		2,5		1200	2
		2,5		1600	2
		800	EKG + Atmung	900	1, 2
		700	EKG + Atmung	900	1, 2
	600	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
	500	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
	400	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
	300	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
250	2,5	2,5	Ohne	-	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20
		2,5	Atmung	900	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15
		2,5	EKG	-	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15
		2,5	EKG + Atmung	900	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15
	200	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
	150	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
	100	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2
	50	2,5	EKG + Atmung	900	1, 2

Die Etablierung T2-gewichteter MRT-Untersuchungen wurde unter Verwendung der beschriebenen TSE-Sequenz (Tabelle 2) unter Verwendung der in den Untersuchungen der GE-Sequenz erarbeiteten Parameter für das optimale Atem-Gating durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss verschieden langer TR untersucht (Tabelle 4).

Tabelle 4:
varierte
Einstellungen der
TSE-Sequenz mit
prospektiver
Triggerung

TR (ms)	TE (ms)	FA (0)	Readout	Auflösung (μm^3)	NA
700	26,2	90/180	A-P	160x160x700	4
900	26,2	90/180	A-P	133x133x700	4
1000	26,2	90/180	A-P	133x133x700	4
1200	26,2	90/180	A-P	133x133x700	4
1500	26,2	90/180	A-P	133x133x700	4
2500	26,2	90/180	A-P	133x133x700	4

3.7.2. Optimierung der Bildgebung am Oberbauch der Maus

Im Anschluss an die Etablierung des optimalen Triggerverfahrens wurden verschiedene Variationen von MRT-Parametern untersucht, welche die Gewebekontrastierung beeinflussen. Für die verwendete Gradientenecho-Sequenz waren dies nochmals TR sowie TE, Auflösung, der Anregungswinkel (FA) und die Richtung des Auslesegradienten (Tabelle 5).

Als letzter Optimierungsschritt der prospektiv getriggerten GE-Sequenzen wurde die Triggerverzögerung des Atem-Gates variiert. Dabei wurde die Verzögerung des Atem-Gates in 50 ms-Schritten von 50 ms bis 300 ms variiert. Die nicht veränderten Sequenzparameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 5:
Zur Optimierung
des Kontrasts
varierte
Einstellungen

TR	TE (ms)	FA (°)	Readout	Auflösung (μm^3)	NA
250	2,1; 2,5; 5; 7,5; 10	30; 45; 60; 80	A-P	133x133x700 100x100x700	2; 5
	2,5	30	L-R	133x133x700 100x100x700	5
237	2,5; 3,3; 5	30	A-P	133x133x700 100x100x700	5
225	2,5; 3,3; 5	30	A-P	133x133x700 100x100x700	5
212	2,3; 2,5; 3,3; 5	30; 80	A-P	133x133x700 100x100x700	5
200	2,1; 2,5; 5; 7,5; 10	30; 45; 60; 80	A-P	133x133x700 100x100x700	2; 5
	2,5	30	L-R	133x133x700 100x100x700	5
150	2,1; 2,5; 5; 7,5; 10	30	A-P	133x133x700 100x100x700	2; 5
	2,5	30	L-R	133x133x700 100x100x700	5
100	2,1; 2,5; 5; 7,5; 10	30	A-P	133x133x700 100x100x700	2, 5
	2,5	30	L-R	133x133x700 100x100x700	5

Für die Optimierung der T2-gewichteten Bildgebung wurden TE, Readout und Auflösung variiert. Es wurden eine Verzögerung von 250 ms und eine Weite des Atem-Gates von 800 ms fest eingestellt (Tabelle 7).

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FA	NA	Auflösung (μm^3)	Readout	Dauer
GE	212 ms	2,5 ms	30°	5	100x100x700	A-P	1:55

Tabelle 6: Für die Optimierung von Atem-Gating eingesetzte Gradientenechosequenz

Tabelle 7:
varierte Einstellungen
für T2-gewichtete
Untersuchungen

TR (ms)	TE (ms)	FA (°)	Readout	Auflösung (μm^3)	NA
900	26,2	90/180	L-R	133x133x700	4
900	26,2	90/180	A-P	100x100x700	4
900	26,2	90/180	L-R	133x133x700	4
900	26,2	90/180	A-P	100x100x700	4
900	30	90/180	L-R	133x133x700	4
900	30	90/180	A-P	100x100x700	4
900	30	90/180	L-R	133x133x700	4
900	30	90/180	A-P	100x100x700	4
900	35	90/180	L-R	133x133x700	4
900	35	90/180	A-P	100x100x700	4
900	35	90/180	L-R	133x133x700	4
900	35	90/180	A-P	100x100x700	4
900	40	90/180	L-R	133x133x700	4
900	40	90/180	A-P	100x100x700	4
900	40	90/180	L-R	133x133x700	4
900	40	90/180	A-P	100x100x700	4

3.7.3. Etablierung der relaxometrischen Verfahren

Zur Bestimmung der Zeitkonstanten T1, T2 und T2* wurden eine Variable TR TSE (VTR-TSE)-Sequenz für die simultane Bestimmung von T1 und T2 und eine Multigradientenecho (MGE)-Sequenz für die Bestimmung von T2* genutzt, deren an die anatomischen Verhältnisse der Ratte angepassten Voreinstellungen für die relaxometrische Untersuchung der Mausleber abgeändert wurden (Tabelle 8). Für die VTR-TSE-Sequenz betrug die Echozuglänge 2.

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FA (°)	NA	Auflösung (μm^3)	Readout	Dauer
VTR-TSE	400-3000	7,5 - 52,5	90 /180	1	200x200x1000	L-R	27:36
MGE	1000	3,5 – 31,5	30	1	100x100x1000	L-R	9:36

Tabelle 8: Zur MR-Relaxometrie vorgesehene Untersuchungstechniken

3.8. Untersuchung der Leberfibrose

Auf Basis der geschilderten Vorversuche zur Etablierung und Optimierung der MRT-Sequenzen und Relaxometriemessungen des Mausabdomens wurde ein Messprotokoll aufgestellt, das zur standardisierten Untersuchung der Versuchstiere mit Leberfibrose im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren diente (Tabelle 9). Neben einer Bestimmung der Relaxationszeiten T1, T2 und T2* wurden bildmorphologische Untersuchungen mit verschiedenen Wichtungen durchgeführt. Signalintensitätsmessungen sollten Parameter identifiziert, die sich zwischen kranken und gesunden Tieren signifikant unterscheiden.

Zur T1-, intermediär und T2*-gewichteten Untersuchung diente die erprobte GE-Sequenz mit TR/TE-Kombinationen von 150/2,5 ms bis 250/7,5 ms. Zusätzlich wurde für die intermediär gewichtete Sequenz eine fettgesättigte Variante durchgeführt.

Zur T2-gewichteten Untersuchung wurde die erprobte TSE-Sequenz mit einer TR/TE-Kombination von 900/35 ms angewendet. Zusätzlich wurde eine fettgesättigte Variante dieser Sequenz angewendet. Durch den zusätzlichen Fettsättigungspuls erhöhte sich die TR auf 924 ms bzw. die TE auf 35,2 ms.

Insgesamt wurden pro Versuchstier entsprechend dem Protokoll 9 MRT-Sequenzen durchgeführt (Tabelle 9). Abhängig von der Atemfrequenz der Versuchstiere ergab sich so eine Untersuchungszeit von zwei bis zweieinhalb Stunden. Für die Untersuchung der Leberfibrose standen insgesamt 71 Versuchstiere zur Verfügung (s. 3.3. bis 3.5.).

3.8.1. Bestimmung der Signalintensitäten und Relaxationszeiten

Die Bestimmung der Signalintensitäten und der Standardabweichungen dieser Messwerte erfolgte in einer möglichst artefaktfreien Schicht, in der die verschiedenen Organe bzw. Gewebeanteile gut abzugrenzen waren. Zu diesem Zweck wurden fünf kreisförmige, in allen Messungen identisch groß gewählte Regions of Interest (ROI)

Sequenz	TR [ms]	TE [ms]	FA [°]	NA	Auflösung [µm³]	Readout	Zweck bzw. Wichtung
GE	100	2,5	30	4	150 x 150 x 1000	A-P	Übersicht Versuchsplanung
GE	150	2,5	30	4	100 x 100 x 700	A-P	T1
GE	200	5	30	4	100 x 100 x 700	A-P	intermediär
GE	250	7,5	30	4	100 x 100 x 700	A-P	T2*
GE	200	5	30	4	100 x 100 x 700	A-P	Intermediär mit Fettsättigung
TSE	900	35	90/180	4	100 x 100 x 700	A-P	T2
TSE	924	35,3	90/180	4	100 x 100 x 700	A-P	T2 mit Fettsättigung
VTR-TSE	400 - 3000	7,5 - 52,5	90/180	5	200 x 200 x 700	A-P	Bestimmung von T1 und T2
MGE	1000	3,5 - 31,5	30	3	100 x 100x 700	A-P	Bestimmung von T2*

Tabelle 9: Messprotokoll für Kontrolltiere und an Leberfibrose erkrankte Mäuse

(296 Pixel entsprechend einer Fläche von 2,96 mm²) im Leberparenchym unter Aussparung von Gefäßen, Darm, Magen und Gallenblase definiert. Einzelne, kleinere ROI wurden als Kontrollmessungen in Muskel und ZNS angeordnet. Die so gemessenen Signalintensitäten und Standardabweichungen wurden aus der Bildanzeigefunktion von Paravision 5.1 mit Hilfe eines Macros exportiert. Anschließend wurden mit Hilfe der Tabellenkalkulation Excel (Version für MacOS 10.4, Microsoft) Mittelwerte berechnet.

Für die Bestimmung der Relaxationszeiten wurden ROI entsprechend der für die SI-Messungen geschilderten Kriterien definiert. Zur Bestimmung von T1- und T2-Zeiten wurden jeweils 5 ROI à 104 Pixel ausgewählt, entsprechend einer Fläche von 4,16 mm². Für die Bestimmung der T2*-Zeit in der Leber wurden die ROI mit einer Größe von 532 Pixel entsprechend 5.32 mm² gewählt. ROI für die zur Kontrolle

dienenden Muskel- und Nervengewebe waren bei den T1-/T2-Messungen 40 bzw. 12 Pixel und bei den T2*-Messungen 104 bzw. 37 Pixel groß.

Die Relaxationszeiten wurden anschließend mit Hilfe eines in die Bildanzeigefunktion integrierten Analyseprogramms mit Hilfe von „least square nonlinear algorithms“ und „monoexponential recovery fitting“ Pixel für Pixel berechnet und zur Bestimmung eines Mittelwertes für die ROI benutzt (ISA Unterprogramm, Paravision 5.1).

Für die Berechnung von T1 erfolgte die Regression nach $y = A + C * (1 - e^{(-t/T1)})$, während T2 und T2* nach $y = A + C * e^{(-t/T2)}$ bestimmt wurden. Dabei entsprach die in den Pixeln in willkürlichen Einheiten gemessene SI dem y-Wert. Die Variable t war in der T1-Bestimmung die Zeit, die bei der Messung der Rohdaten zur Wiederherstellung der Longitudinalmagnetisierung zugelassen wurde. In der T2 und T2* beschreibenden Gleichung steht t für die verschiedenen TE, mir denen Rohdaten akquiriert wurden. A und C sind die beiden Variablen, mit denen die Regression optimiert wurde.

3.9. Histologische und biochemische Untersuchungen

Nach Abschluss der MRT-Bildgebung wurden die Versuchstiere von Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin II histologisch und biochemisch charakterisiert. Zur histologischen Einteilung des Fibrosegrades und zur quantitativen Bestimmung des Anteils kollagenhaltigen Gewebes wurden Schnittpräparate angefertigt. Als biochemische Marker der Hepatozytenschädigung zur Charakterisierung der pathophysiologischen Vorgänge in den Versuchstieren wurden die Serumaktivitäten der Enzyme alkalische Phosphatase (AP), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt. Außerdem wurde die Menge der in Lebergewebeproben vorliegenden Aminosäure Hydroxyprolin ermittelt.

Nach Punktions der Vena cava inferior wurden zu diesem Zweck 0,5 bis 1 ml Blut entnommen. Anschließend wurde die Leber schonend frei präpariert und in verschiedene Proben aufgeteilt. Für die Hydroxyprolinbestimmung wurde der rechte Leberlappen entnommen. Histologische Präparate wurden vom linken oder medianen Leberlappen hergestellt. Dazu wurden die Gewebeproben für 48 Stunden in 4% Formalin fixiert und anschließend mit Hilfe eines Einbettungsapparates (modulares Einbettssystem Leica EG1150, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) in Paraffin eingebettet.

Bei der an die MRT-Untersuchungen anschließenden biochemischen und histologischen Charakterisierung wurde besonderes Augenmerk auf die

Hydroxyprolinbestimmung gelegt. Als Testverfahren wurde die photometrische Bestimmung angewendet (Jamall et al. 1981, modifiziert nach Hillebrandt et al. 2002). Diese Aminosäure liegt normalerweise fast ausschließlich als Bestandteil des Kollagens der extrazellulären Matrix vor und gilt daher als geeigneter Marker für eine relative Zunahme dieses Proteins im Gewebe. Entsprechend wird eine Erhöhung der Hydroxyprolinkonzentration im Lauf einer fibrotischen Lebererkrankung beschrieben und auch für die beschriebenen Krankheitsmodelle erwartet. Hydroxyprolinwerte konnten für alle 71 Versuchstiere erhoben werden.

Parallel wurden histologische Verfahren angewendet, mit denen auf Basis einer selektiven Färbung kollagenhaltiger Gewebeanteile eine qualitative und quantitative Bestimmung des Fibrosegrades erfolgen kann. Zu diesem Zweck wurden Leberschnitte mit einer Sirius-Rot-Färbetechnik behandelt und anschließend mikroskopisch ausgewertet (Whittaker et al. 1994).

Zur Beurteilung des Schweregrades wurde ein die auf den Publikationen von Batts und Ludwig 1995 bzw. Ishak et al. 1995 basierende Fibrose-Einteilungssystems (FSCORE) mit einer fünffach unterteilten Skala angewendet (durchgeführt von Dr. Kanishka Hiththetiya, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn). Die den Fibosegraden F0 bis F4 entsprechenden (pathologischen) Veränderungen der Histologie sind in Tabelle 10 aufgeführt. Entsprechende Untersuchungen konnten für insgesamt 50 Versuchstiere durchgeführt werden.

FSCORE	Histologischer Befund
F0	Normales Gewebe ohne bindegewebige Veränderung
F1	Beginnende zentrale oder portale Fibrose mit geringer Verbreiterung des Portal- oder Zentralraums
F2	Periportale Fibrose mit vereinzelten dünnen zentrozentralen, zentroportalen oder portoportalen Septen
F3	Septale Fibrose mit zahlreichen zentrozentralen oder portoportalen Septen, vereinzelte Brückenbildung, geringgradige Störung der Leberarchitektur
F4	Ausgeprägte Brückenbildung mit Umschließung von Regeneratknoten durch fibrotisches Gewebe

Tabelle 10: Kriterien der Stadienbestimmung bzw. -einteilung der Leberfibrose

An Sirius-Rot gefärbten Schnitten erfolgte zusätzlich eine Quantifizierung kollagenspezifischer Einfärbungen von Gewebeanteilen über eine spezielle kamera- und computerbasierte Auswertemethode, mit der kollagenhaltige Flächen im Schnitt quantifiziert werden konnten (angegeben als kollagenpositive Fläche in Prozent, durchgeführt durch K. Hochrath). Dazu wurden die Präparate mit einem Mikroskop mit angeschlossener Digitalkamera (Leica DM5000B, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) bei 100x Vergrößerung semiautomatisch ausgewertet (Leica application suite software, Leica Mikrosysteme, Wetzlar). Für diese Methodik liegen Daten von insgesamt 41 Tieren vor. Da keine Werte für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse erhoben werden konnten, wurden die Ergebnisse zum Vergleich mit der Bestimmung des Hydroxyprolingehalts und des Fibroescore genutzt.

Zusätzlich zu biochemischen und histologischen Untersuchungen des Fibroestadiums der Versuchstiere wurden aus Blutserum die Aktivitäten dreier enzymatischer Indikatoren einer Leberschädigung, der alkalischen Phosphatase (AP), der Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie der Aspartat-Aminotransferase (AST) bestimmt. Als zusätzlicher Parameter diente der Quotient aus AST und ALT. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte photometrisch, mit Hilfe eines COBAS 8000-Analysegerätes und nach IFCC-Standards evaluierter Testkits (Hoffmann-La Roche Diagnostica, Grenzach-Wyhlen) durch das Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes.

AP ist in großer Menge im Skelettsystem, im Leberparenchym und in Gallengangsepithelien vorhanden. Eine Erhöhung dieses Blutwertes kann eine Hepatozyten- oder Cholangiozytenschädigung anzeigen. Ein Messwert für die AP konnte für 56 Versuchstiere gewonnen werden.

Die AST findet sich in großer Menge in Skelettmuskulatur, Herzmuskel und Leberparenchym. Erhöhte AST-Werte im Blut sind in der Regel Folge einer Leber- oder Skelettmuskelerkrankung bzw. eines Herzinfarktes. Steigt parallel zur AST auch die ALT an, deutet das immer auf eine Schädigung von Leberzellen hin. Eine starke Erhöhung der AST findet man bei allen Formen von Leberentzündungen.

Die ALT ist ein Enzym, das vor allem im Zytoplasma von Leberzellen vorkommt. Leichte Erhöhungen findet man bei Leberverfettung, Leberzumoren, Lebermetastasen, Leberzellnekrose, Cholangitis sowie durch Medikamente oder Alkohol verursacht. Eine stärkere Erhöhung findet man bei allen chronischen Hepatitiden, Leberzirrhose, Stauungsleber oder bei toxischen Leberschädigungen. Die Bestimmung von AST und ALT konnte für insgesamt 53 Versuchstiere durchgeführt werden.

3.10. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm PRISM 5.0 for MacOS 10.4 (Graphpad Software Inc., La Jolla, California, USA). Sämtliche Daten wurden als nicht verbunden angesehen. Zunächst wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet, um die erhobenen parametrischen Daten auf eine Normalverteilung hin zu testen. Normalverteilte Daten mit zwei parametrischen Gruppen wurden dann mittels des Zweistichproben-t-Tests für unabhängige Stichproben auf Differenz analysiert. Wurden mehr als zwei Gruppen parametrischer Daten miteinander verglichen, erfolgte eine einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Prüfgruppenangleichung nach Bonferroni.

Nicht normal verteilte Datenpaare wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben untersucht. Zum Vergleich mehrerer Stichproben gegeneinander wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis mit Test nach Dunn für unabhängige Stichproben eingesetzt.

Für nicht parametrische Werte wurde entweder der Wilcoxon-Rangsummen-Test (für zwei Gruppen) oder der H-Test nach Kruskal-Wallis mit Test nach Dunn (für mehr als zwei Gruppen) verwendet.

Die Gleichheit von Daten wurde mit Hilfe der Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson bzw. Spearman beschrieben. Eine Korrelation wurde als gering bis nicht vorhanden betrachtet, wenn $r < 0.2$ betrug. Bei einem Betrag von $r > 0.2$ und < 0.5 wurde die Korrelation als schwach bis mäßig beurteilt. Wurde r als > 0.5 und < 0.8 bestimmt wurde dies als mittlere oder mittelstarke Korrelation bezeichnet. Werte von > 0.8 wurden als hohe oder starke Korrelation bezeichnet. Für die Ergebnisse der histologischen und biochemischen Untersuchungen sowie für die MR-Relaxometrie sind sämtliche für den statistischen Vergleich der verschiedenen Versuchstiergruppen wichtigen Kenngrößen im Ergebnisteil aufgeführt. Korrelationen zwischen histologischen oder biochemischen Messgrößen und Relaxationszeiten sind als Punktwolkendiagramm grafisch dargestellt, wenn Signifikanz sowohl bei Tests nach Pearson als auch nach Spearman bestand. Aufgrund der Datenfülle konnten für Signalintensitäten und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der Leber die Ergebnisse der statistischen Vergleiche nur im Text beschrieben bzw. in den grafischen Darstellungen der Messwerte vermerkt werden. Punktwolkendiagramme mit dem Hydroxyprolingehalt und den Fibrosescore wurden nur für Signalintensitätsmessungen und Signal-zu-Rausch-Bestimmungen aus MRT-Untersuchungen dargestellt, für die die Berechnung nach Pearson **und** nach Spearman eine Signifikanz nachgewiesen hatte.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der MRT des Mausabdomens mit Ziel der weitgehenden Unterdrückung von Bewegungsartefakten

4.1.1. GE-Techniken zur T1-gewichteten Bildgebung

Bildbeispiele der initialen Gradientenechosequenz (GE) mit Parametern TR von 900 ms und TE von 2,5 ms sind in Abbildung 1 dargestellt. Die nicht getriggerte Untersuchung zeigen sich eine ausreichende T1-gewichtete Kontrastierung der Leber und relativ wenige Bewegungsartefakte erst bei einer Erhöhung der Anzahl der Mittlungen auf 10.

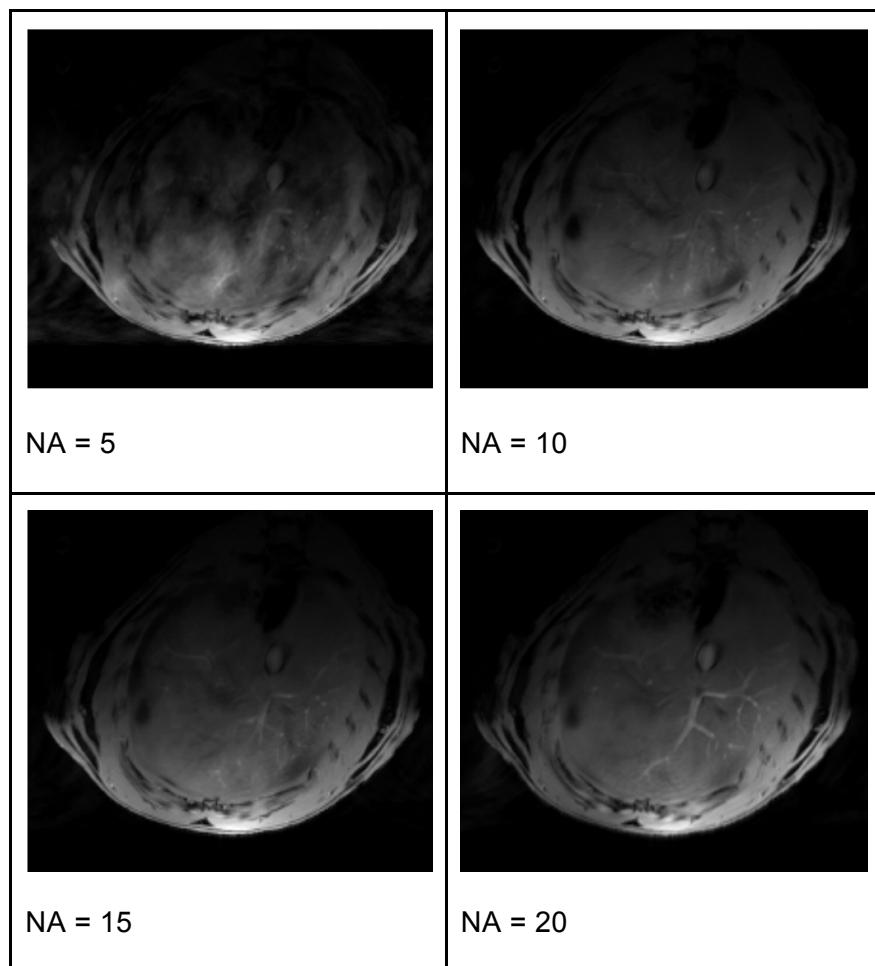


Abbildung 1: T1-gewichtete GE, TR 900 ms, TE 2,5 ms, FA 80°, ohne Triggerung, Variation der Number of Acquisitions / Mittlungen (NA)

Die Anzahl an Mittlungen wurden erhöht, um den bekannten Effekt der Bewegungsartefaktunterdrückung auszunutzen.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der MRT mit identischen Parametern zu Abbildung 1; die Anzahl der Mittlungen war auf 2 bis 15 festgesetzt worden. Zur Unterdrückung von Bewegungsartefakten wurde eine Kombination aus EKG- und Atemtriggerung eingesetzt. Als Ergebnis des Einsatzes der beiden Triggermethoden zeigt sich eine deutliche Reduktion von bewegungsbedingten Artefakten bereits unter der Verwendung von 2 Mittlungen. Die Unterschiede in der Bildqualität waren so eindeutig, dass eine rein subjektive Beurteilung der positiven und negativen Effekte der geänderten Sequenzparameter im Rahmen der ersten Optimierungen erfolgen konnte.

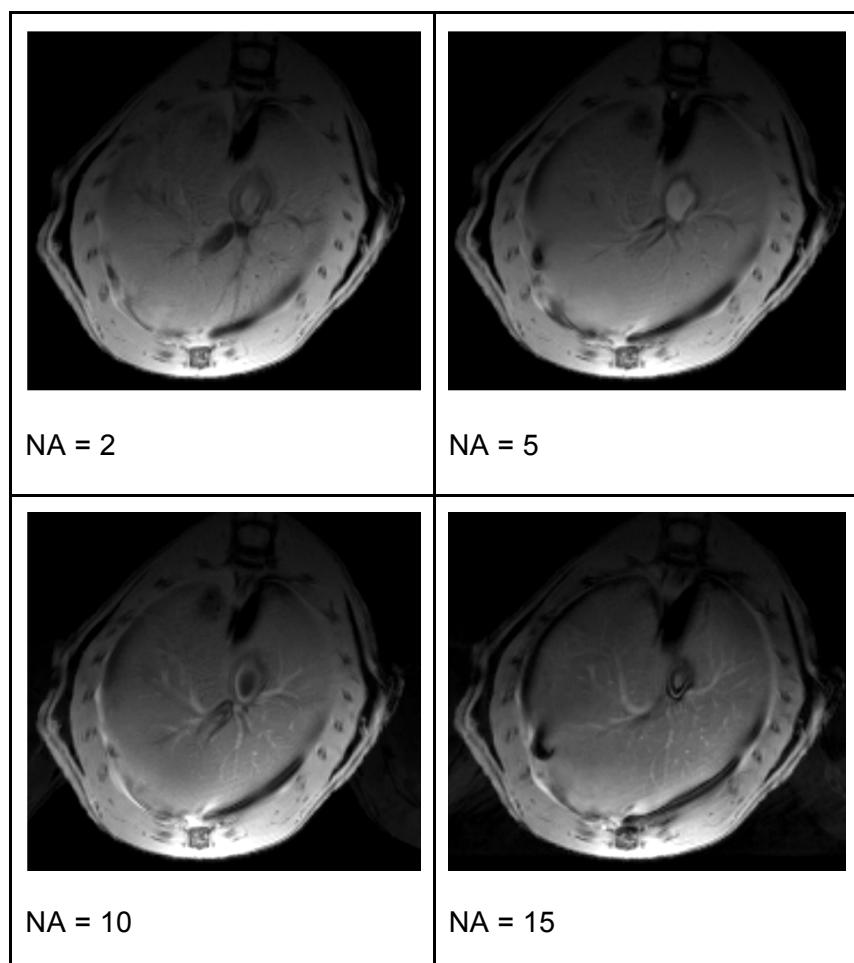


Abbildung 2: Ergebnisse der EKG- und Atem-getriggerten Bildgebung, GE, TR 900 ms, TE 2,5 ms, FA 80°, Variation der Number of Acquisitions / Mittlungen (NA)

Mit einer auf 212 ms reduzierten TR und einer TE von 2,5 ms wurde anschließend die Auswirkung der unterschiedlichen prospektiven Triggermöglichkeiten und ihrer Kombinationen zur Reduktion von Bewegungsartefakten überprüft. Die Repetitionszeit

wurde gekürzt, um so eine Messzeitverkürzung zu erreichen. Erst diese Messzeitverkürzung ermöglichte die Untersuchung der verschiedenen Sequenzparameter im Vergleich bei einem Tier.

Abb. 3 zeigt die Effekte einer ausschließlichen EKG-Triggerung auf die Bildqualität. Zusätzlich wurde die Anzahl an Mittlungen bei dieser EKG-getriggerten Sequenz variiert und miteinander verglichen. Subjektiv ergab bereits die Anwendung von 5 Mittlungen eine ausreichend gute Bildqualität.

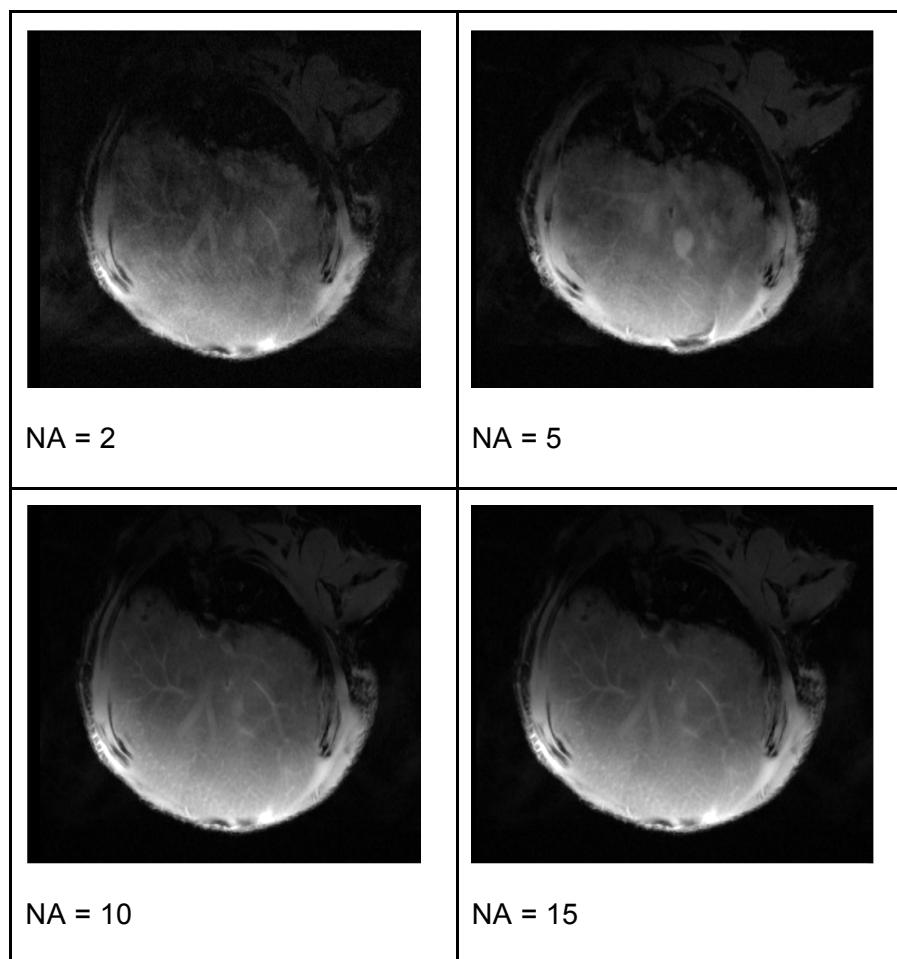


Abbildung 3: Ausschließlich EKG-getriggerte T1-gewichtete GE mit TR 212 ms, TE 2,5 ms, FA 80°, Variation der Number of Acquisitions / Mittlungen (NA)

Abb. 4 stellt entsprechend die Ergebnisse einer ausschließlichen Triggerung über das Atemsignal dar, während Abb. 5 die Resultate der MRT-Bildgebung unter Kombination beider Verfahren wiedergibt.

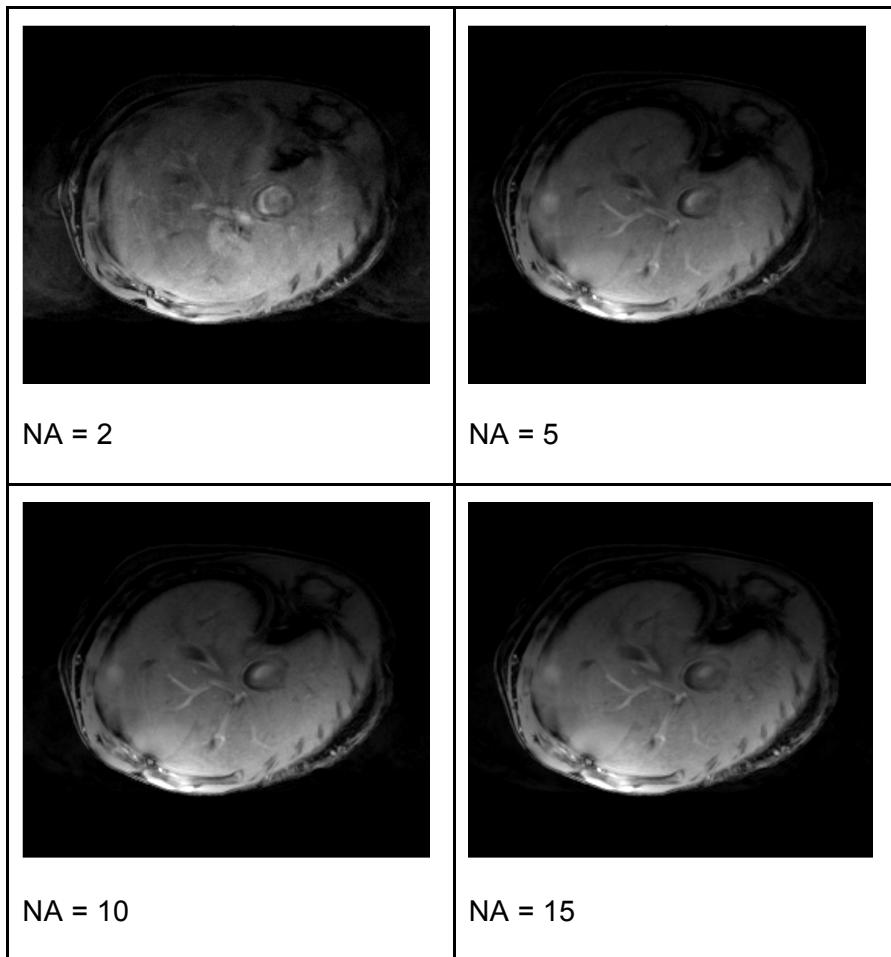


Abbildung 4: Ausschließliches Atemgating, T1-gewichtete GE, TR 212 ms, TE 2,5 ms, FA 80°, Variation der Number of Acquisitions / Mittlungen (NA)

Subjektiv ergab die Anwendung von 5 Mittlungen eine ausreichend gute Bildqualität bei alleiniger Atemtriggerung (Abb. 4). Die Kombination aus Atem- und EKG-Triggerung zeigte unter der Verwendung von 2 Mittlungen eine gute Bildqualität (Abb. 5). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass bei gleichbleibenden übrigen Sequenzparametern die Halbierung der Mittlungen eine Halbierung der Messzeit bedeutet. Andererseits bedingt jede Triggermethode eine Verlängerung der Messzeit, da jeweils nur während des gewählten Fensters auch Bilddaten aufgenommen werden. Bei Verwendung von zwei Triggermethoden wird die Messzeit überproportional lang, da die jeweiligen Messfenster einander überlappen müssen, damit Bilddaten aufgenommen werden.

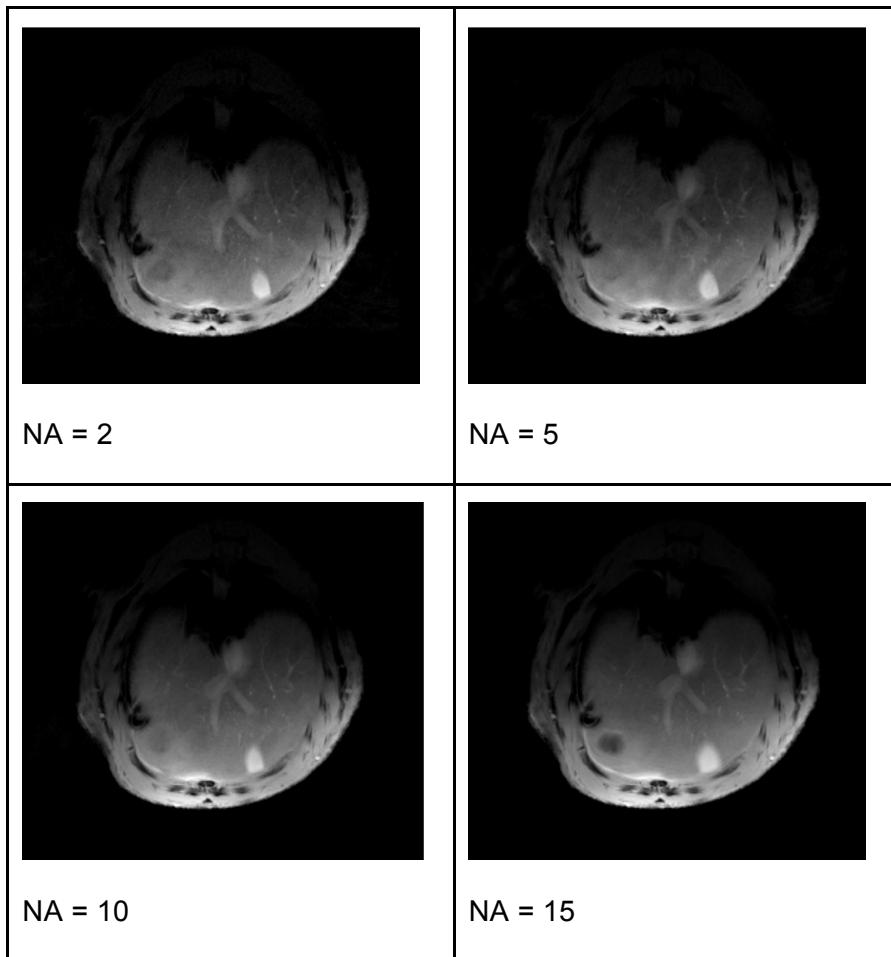


Abbildung. 5: Kombination aus Atemgating und EKG-Triggerung, GE, TR 212 ms, TE 2,5 ms, FA 80°, Variation der Number of Acquisitions / Mittlungen (NA)

Deshalb wurde im Folgenden noch getestet, ob die Variation der Triggerverzögerung bei alleiniger Atemtriggerung einen erkennbaren Einfluss auf die Bildqualität ausübt. Hierzu wurde die Anzahl der Mittlungen entsprechend der Bildergebnisse aus Abb. 4 auf 5 festgelegt.

Abb. 6 zeigt die Effekte verschiedener Atemtriggerverzögerungen bei der getesteten Gradientenechosequenz. Subjektiv zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Bildqualität. Die Triggerverzögerung von 200 - 250 ms wurde subjektiv als gering besser eingeschätzt, weshalb diese bei den weiteren Messungen verwendet wurde.

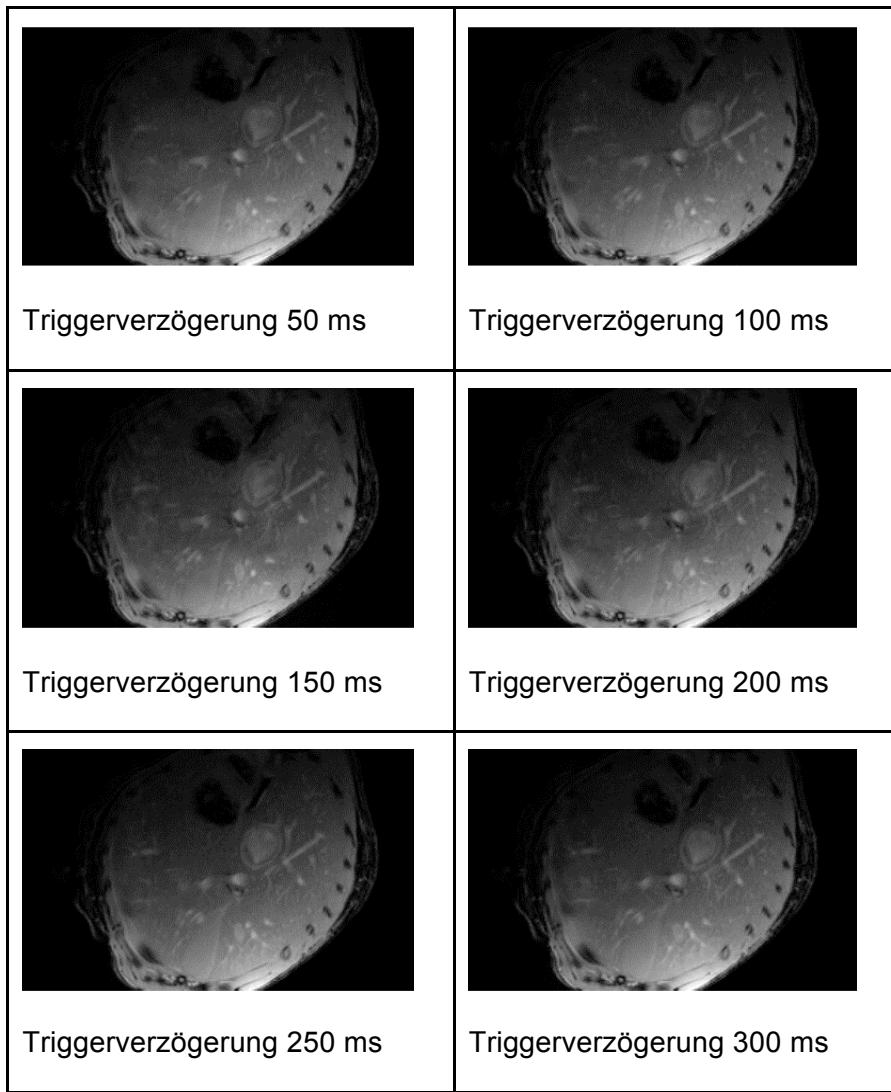


Abbildung 6: Variation der Triggerverzögerung (Abstand zwischen Atemsignal und geöffnetem Triggerfenster) in 50 ms-Schritten bei ausschließlicher Atemtriggerung, GE, NA=5, TR 212 ms, TE 2,5 ms, FA 80°

4.1.2. TSE-Techniken für die T2-gewichtete Bildgebung

Wegen der gravierenden Zunahme der Messzeit unter Verwendung einer kombinierten EKG- und Atemtriggerung wurde die Turbospinechosequenz (TSE) „nur“ auf den Atemzyklus getriggert. Die zuvor mit Hilfe der Gradientenechosequenz ermittelte optimale Triggerverzögerung von 250 ms wurde für die Spinechosequenz nicht erneut getestet. Die Bildqualität unter Variation der Repetitionszeit (TR) wird für die Spinechosequenz in Abb. 7 dargestellt.

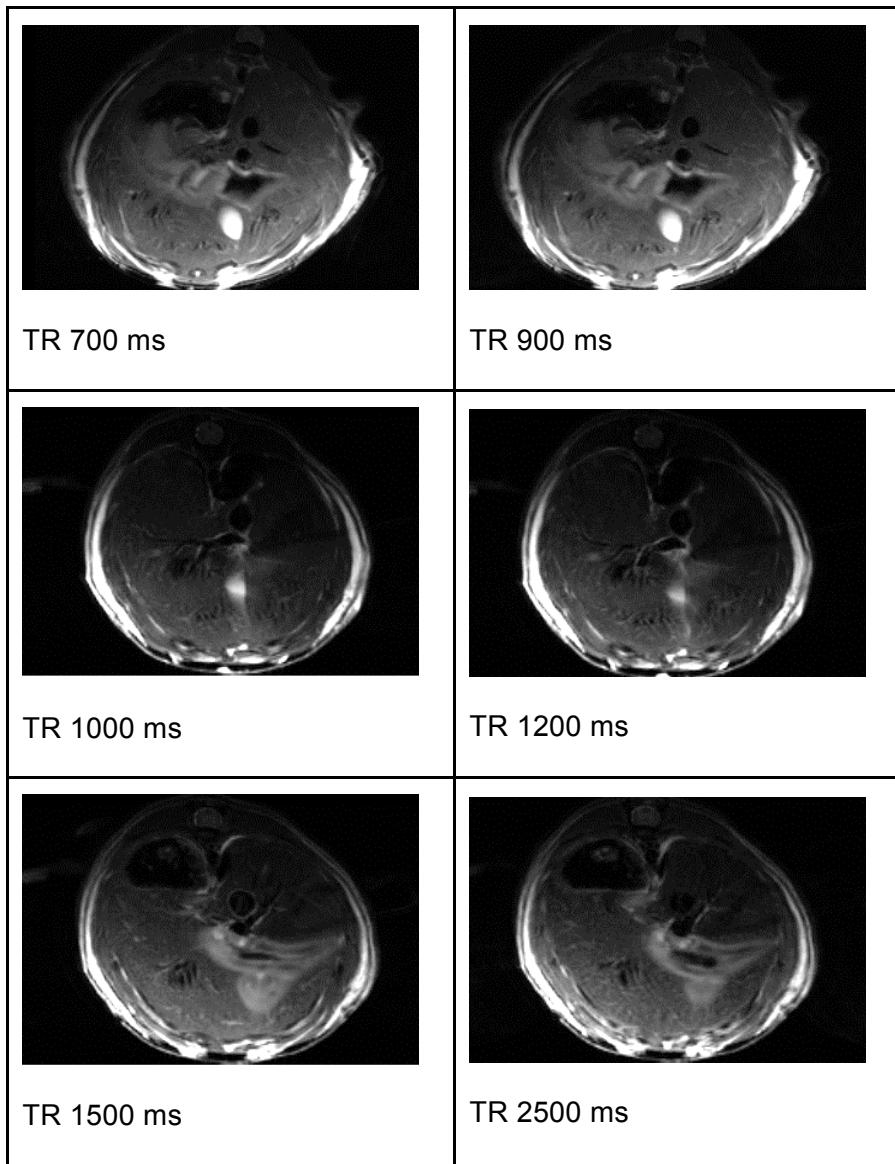


Abbildung 7: TSE mit Variation der TR unter Verwendung der optimierten Atemtriggerung (Triggerverzögerung 250 ms). Folgende Sequenzparameter waren festgelegt: FA 90°; TE 26,2 ms; Echozuglänge 8; Auflösung 133 x 133 x 700 μm^3

Der T2-Kontrast zeigte subjektiv keine relevanten Unterschiede in Abhängigkeit von den getesteten Repetitionszeiten. Abb. 7 zeigt allerdings eine Zunahme der Bewegungsartefakte bei einem Überschreiten der TR von 900 ms (Abb. 7).

4.2. Optimierung des Bildkontrastes für den Oberbauch der Maus

4.2.1. Gradientenechosequenz

Die Abhängigkeit des Kontrastes von TR, TE und dem Anregungswinkel FA in jeweiliger Abhängigkeit der Parameter voneinander macht ein streng systematisches

Testen aller Variationen dieser Sequenzparameter unmöglich. Im Folgenden werden die Bilder für die Variationen dieser drei Parameter dargestellt. Des Weiteren wurden Änderungen an der Anzahl der Mittlungen (NA) sowie an der örtlichen Auflösung vorgenommen und miteinander verglichen (Abb. 8-13).

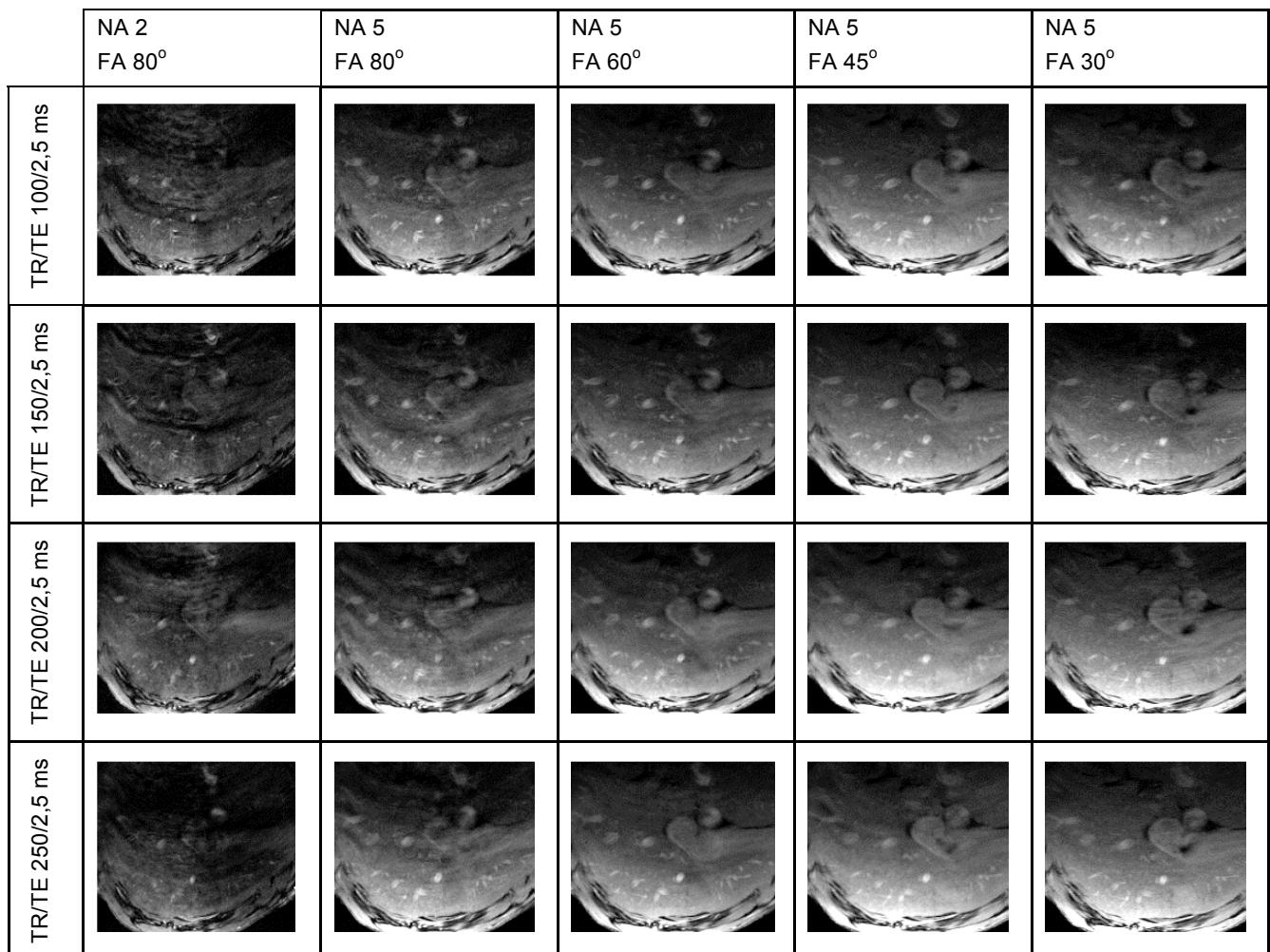


Abbildung 8: Einzelschicht einer GE mit verschiedenen Einstellungen für TR, NA und FA
Atemtriggerung, TE 2,5 ms, Variation wie angegeben

Ein guter Bildkontrast (einschließlich der subjektiven Bewertung eines ausreichenden SNR) wurde mit einer $TR > 150$ ms, 5 Mittlungen und einem Anregungswinkel zwischen 30 und 60° erreicht.

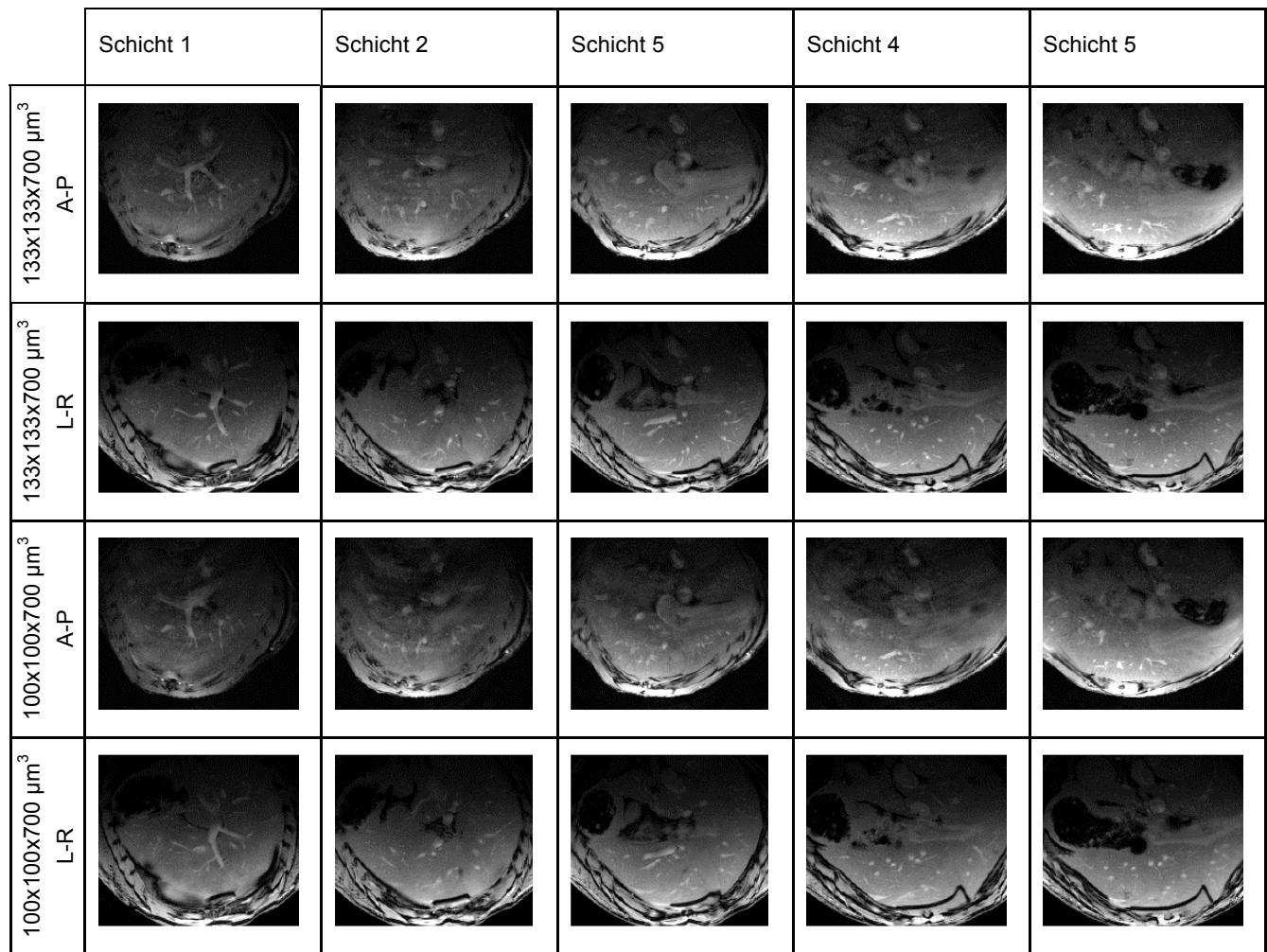


Abbildung 9: Jeweils 5 Schichten einer GE-Sequenz mit Atemtriggerung, Einstellungen der variablen Parameter: TR 100 ms, TE 2,5 ms, NA 5, FA 30°
 Variation von Auflösung und Phasenkodierrichtung wie angegeben

Trotz der kurzen Repetitionszeit wird auch bei einer örtlichen Auflösung von 100 x 100 x 700 μm^3 eine ausreichende Bildqualität erreicht. Die Wahl der Phasenkodierrichtung L-R zeigt eine bessere Bildqualität gegenüber einem um 90° gedrehten Phasenkodierer.

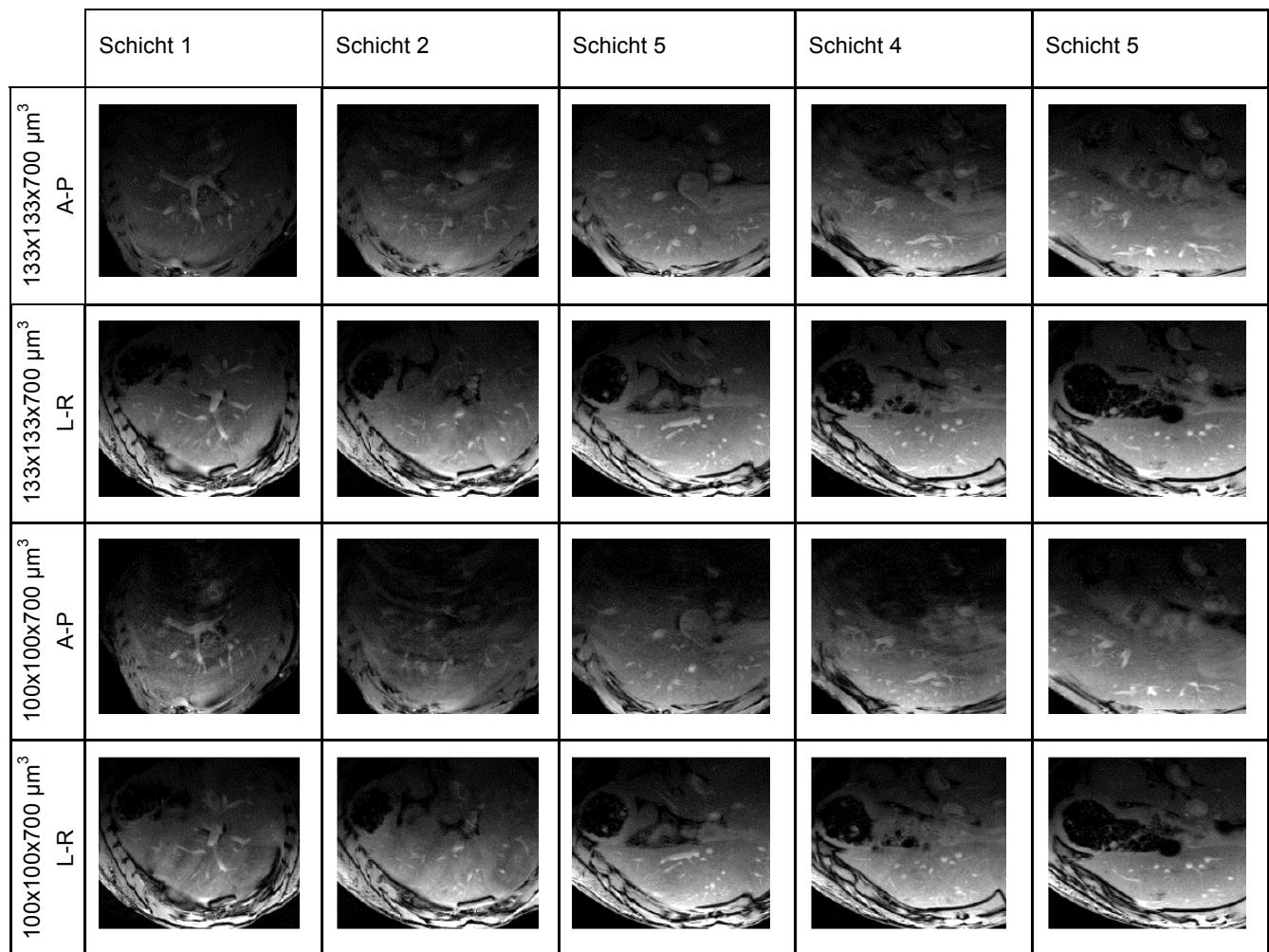


Abbildung 10: Jeweils 5 Schichten einer GE mit Atemtriggerung, Einstellungen der variablen Parameter: TR 150 ms, TE 2,5 ms, NA 5, FA 30°
 Variation von Auflösung und Phasenkodierrichtung wie angegeben

Gegenüber der Abb. 9 zeigt die Abb. 10 mit einer Verlängerung der TR von 100 auf 150 ms eine gering schlechtere Bildqualität. Dies ist auf das Auftreten von besser erkennbaren Bewegungsartefakten zurück zu führen.

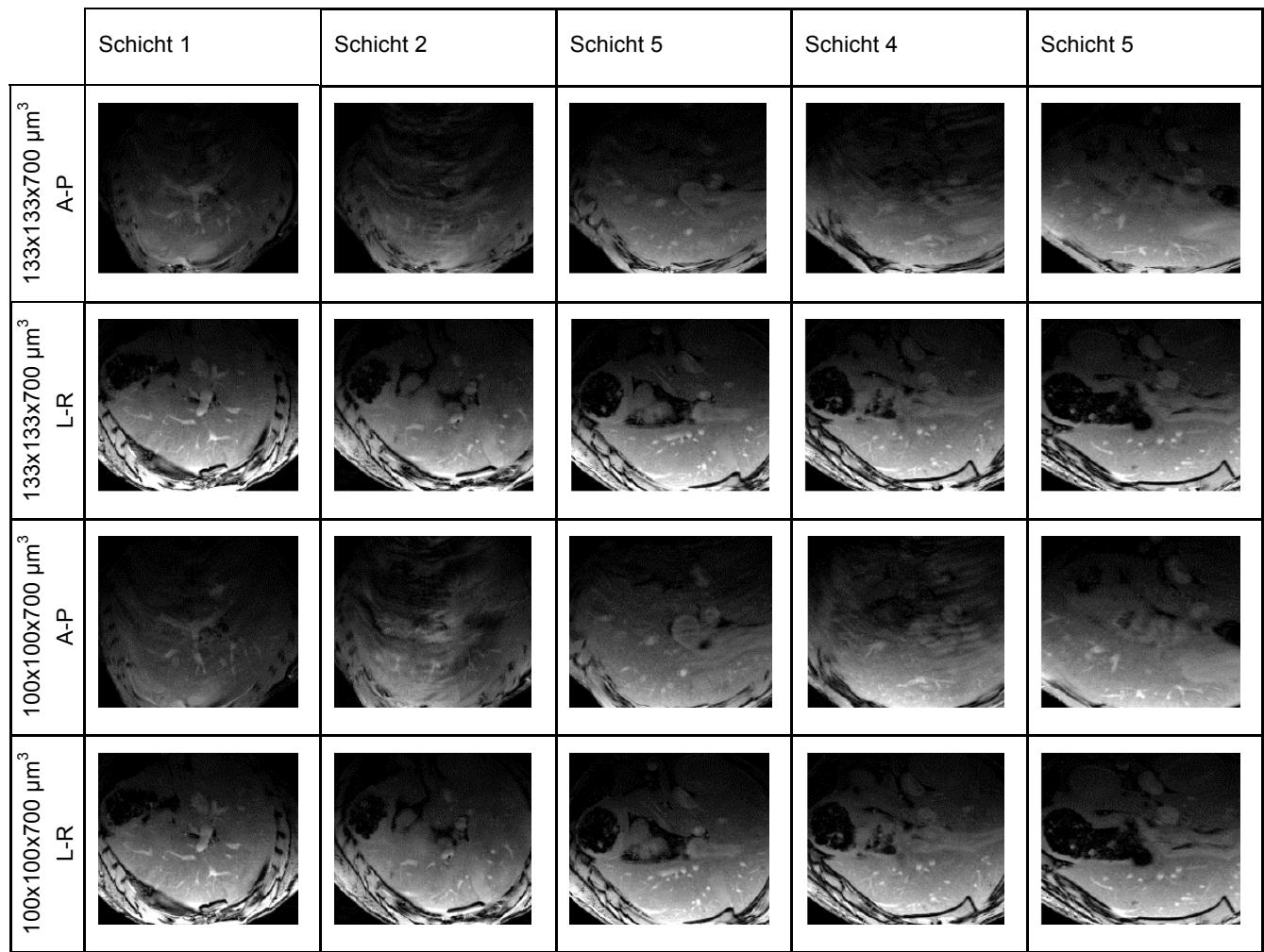


Abbildung 11: Jeweils 5 Schichten einer GE mit Atemtriggerung, Einstellungen der variablen Parameter: TR 200 ms, TE 2,5 ms, NA 5, FA 30°
Variation von Auflösung und Phasenkodierrichtung wie angegeben

Die weitere Verlängerung der Repetitionszeit auf 200 ms (Abb. 11) ergab eine bessere Bildqualität, was in erster Linie auf eine Verbesserung des SNR zurück zu führen ist. Die Bewegungsartefakte haben sich auch gegenüber den Bildern mit TR von 100 ms nicht verschlechtert. Die deutlichen Bewegungsartefakte in der dritten Reihe sind durch Tierbewegung außerhalb des normalen Versuchsaufbaus zu erklären.

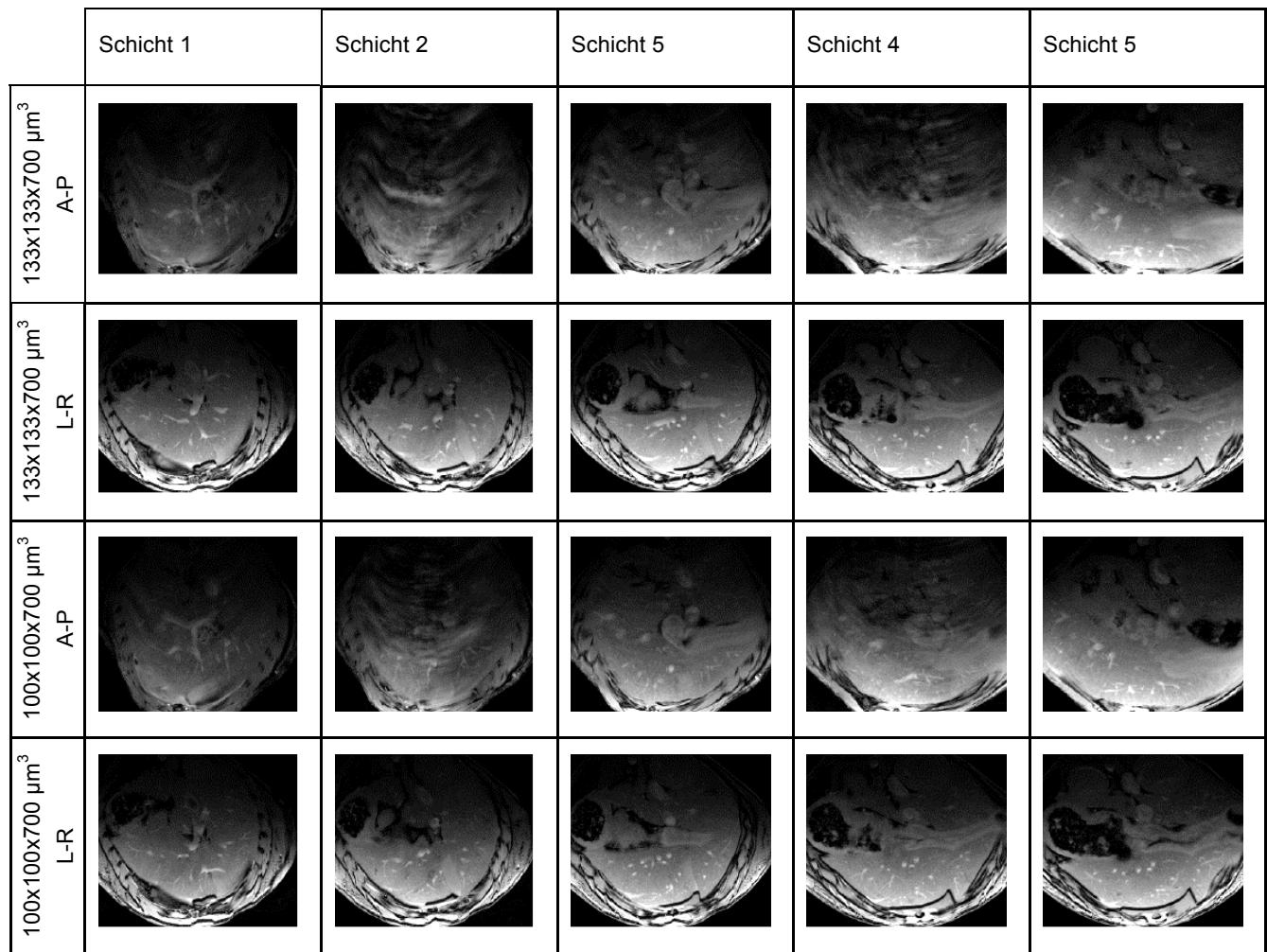


Abbildung 12: Jeweils 5 Schichten einer GE mit Atemtriggerung, Einstellungen der variablen Parameter: TR 250 ms, TE 2,5 ms, NA 5, FA 30° Variation von Auflösung und Phasenkodierrichtung wie angegeben

Gegenüber der Repetitionszeit von 200 ms zeigt sich bei Verwendung einer TR von 250 ms kein relevanter Unterschied in der Bildqualität bzw. dem Bildkontrast.

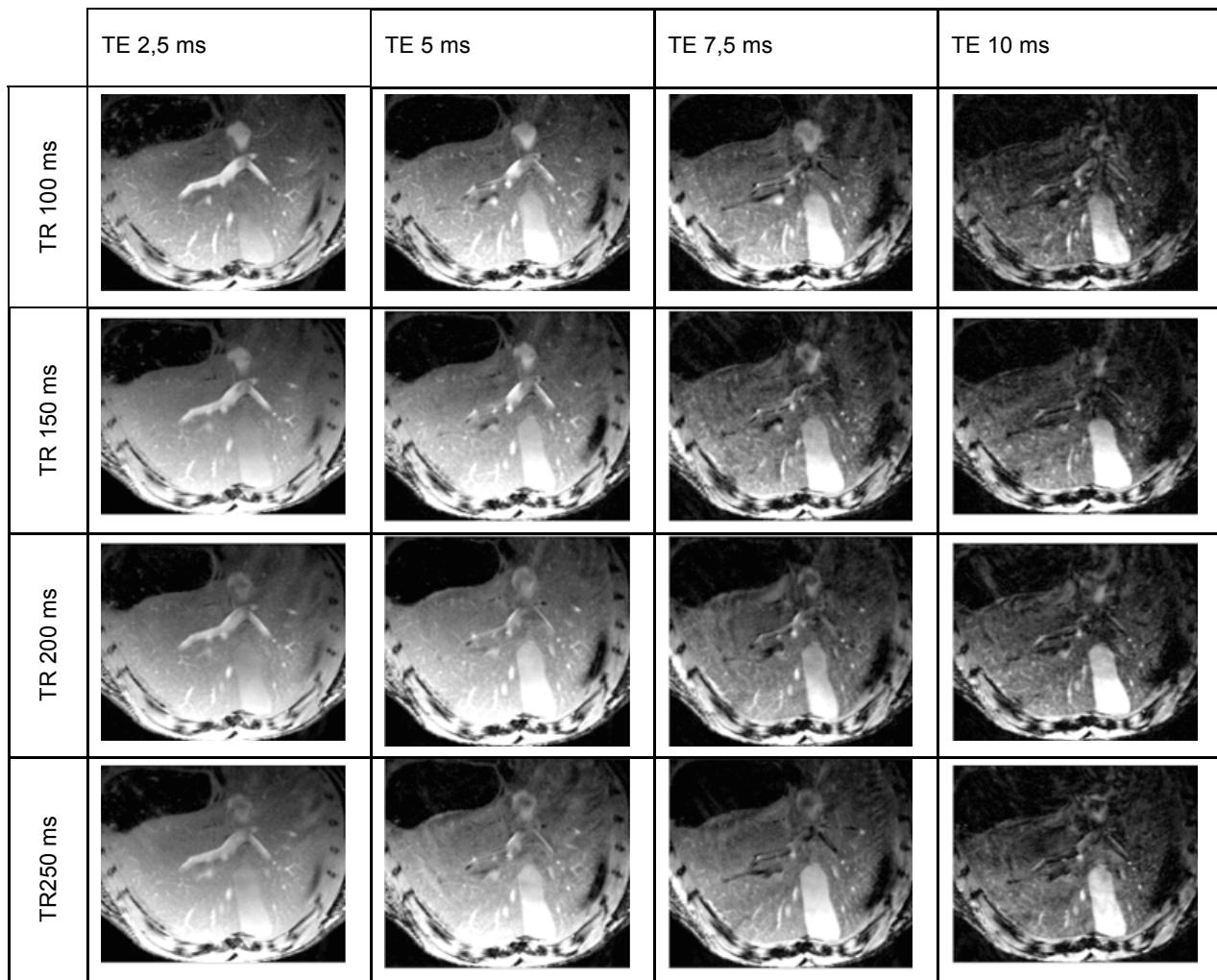


Abbildung 13: Jeweils 1 Schicht einer GE mit Atemtriggerung, Einstellungen der variablen

Parameter: NA 5, FA 30° Phasenkodierrichtung L-R

Variation von TR und TE wie angegeben

Betrachtet man die Echozeit als Variable, so ist die Wahl einer kurzen TE von 2,5 ms gegenüber den getesteten längeren Echozeiten für sämtliche untersuchten

Repetitionszeiten von Vorteil. Insbesondere das SNR und der Kontrast wurden im Rahmen der subjektiven Auswertung für die kürzere Echozeit als besser eingestuft.

Eine T2*-Wichtung erreicht man mit der Gradientenechosequenz allerdings erst bei einem längeren TE. Aufgrund der zunehmenden Einschränkungen der Bildqualität mit zunehmender Echozeit, sollte die TE nicht länger als 7,5 ms gewählt werden.

4.2.2. TSE-Techniken für die T2-gewichtete Bildgebung

Zur Optimierung des T2-Kontrastes der Turbospinechosequenz wurden TE, Auflösung und Phasenkodierrichtung variiert (Abb. 14).

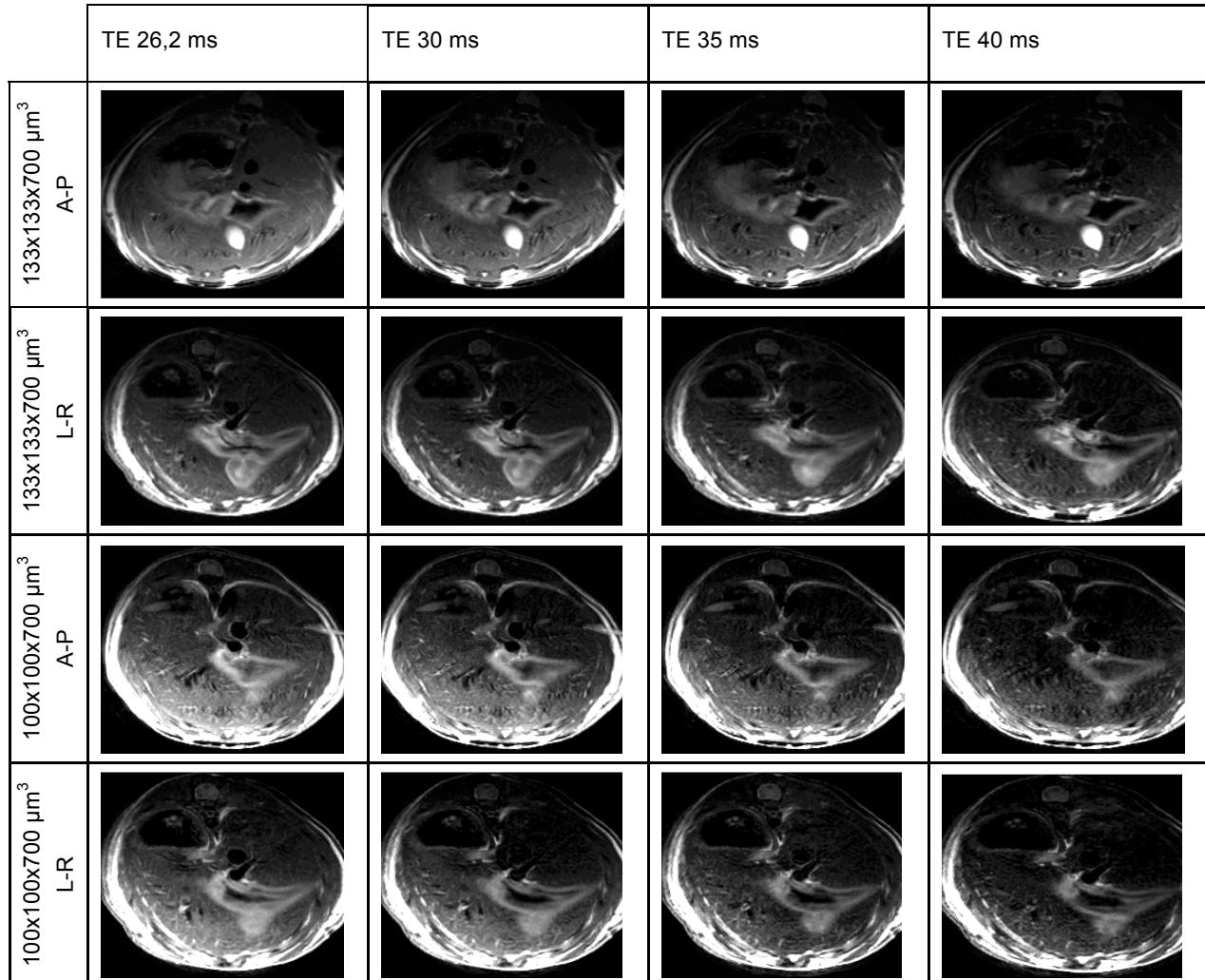


Abbildung 14: Jeweils 1 Schicht einer TSE, Einstellung der variablen Parameter: TR 900 ms, Echozuglänge 8, Atemtriggerverzögerung 250 ms, NA 4
Variation von TE, Auflösung und Phasenkodierrichtung wie angegeben

Die Veränderungen im Bildkontrast waren über die verschiedenen variierten Parameter nicht wesentlich. Der mit einer Verbesserung der örtlichen Auflösung zu erwartende SNR-Abfall war zwar sichtbar, wurde jedoch als nicht relevant eingestuft.

4.3. Anwendung der optimierten MRT-Sequenzen unter Einsatz der an die Anatomie der Maus angepasste Volumenspule

Bei Anwendung der optimierten Sequenzen unter Verwendung einer an die Anatomie der Maus angepassten Volumenspule zeigt sich für die verwendeten GE-Sequenzen (Abb. 15) ein Erhalt bzw. eine Verbesserung der Bildqualität.

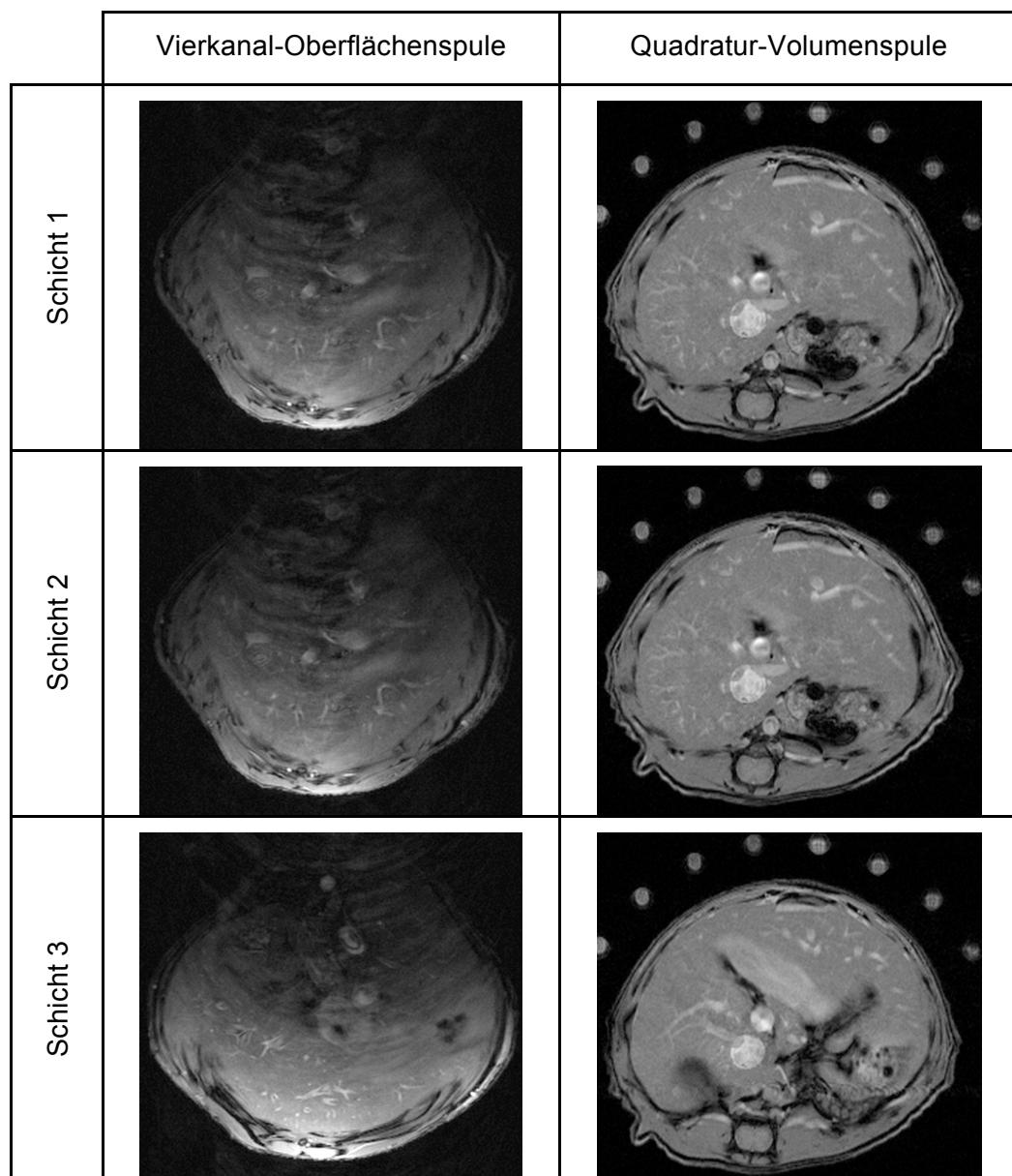


Abbildung 15: GE-Sequenz, TR 150 ms, TE 2,5 ms, NA 5, FA 30° Verbesserung der Bildqualität nach Wechsel des Sende- und Empfangssystems

Dies bestätigt sich für die untersuchten TSE-Sequenzen ebenfalls (Abb. 16).

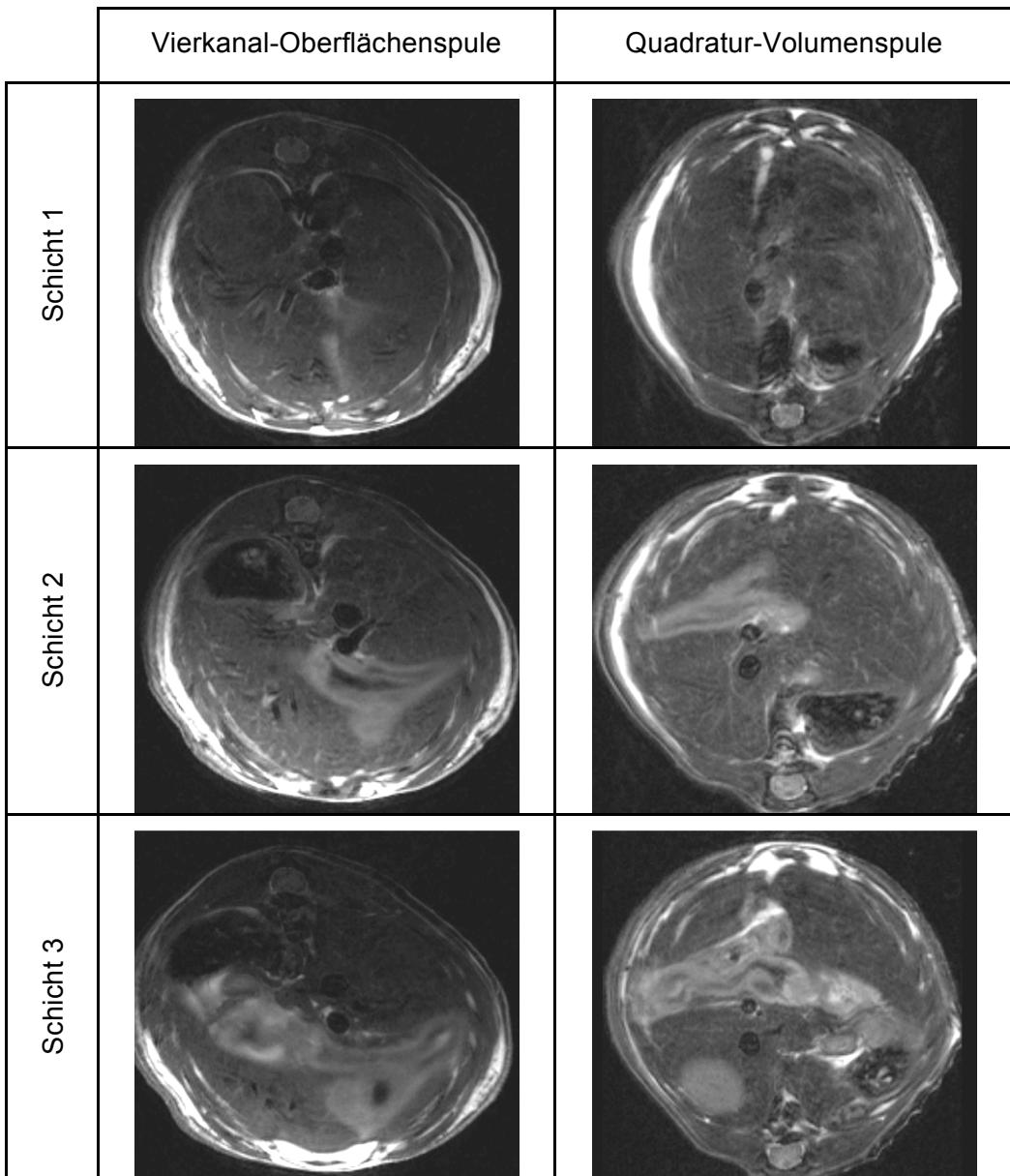


Abbildung 16: TSE-Sequenz, TR 900 ms, TE 26,2 ms, NA 5, Echozuglänge 8, Verbesserung der Bildqualität nach Wechsel des Sende- und Empfangssystems

4.4. Etablierung und Optimierung der relaxometrischen Verfahren

4.4.1. Genutzte Sequenzen

Mit den von Bruker bereit gestellten Sequenzen lassen sich primär bereits Aufnahmen guter Qualität erstellen. Über die Anpassung der Einstellungen an die anatomischen Gegebenheiten der Maus hinaus bestand kein Bedarf zur Optimierung der verwendeten

MRT-Sequenzen. Die Abbildungen 17 - 19 zeigen die Bildqualität nach anatomischer Anpassung der verschiedenen Sequenzen.

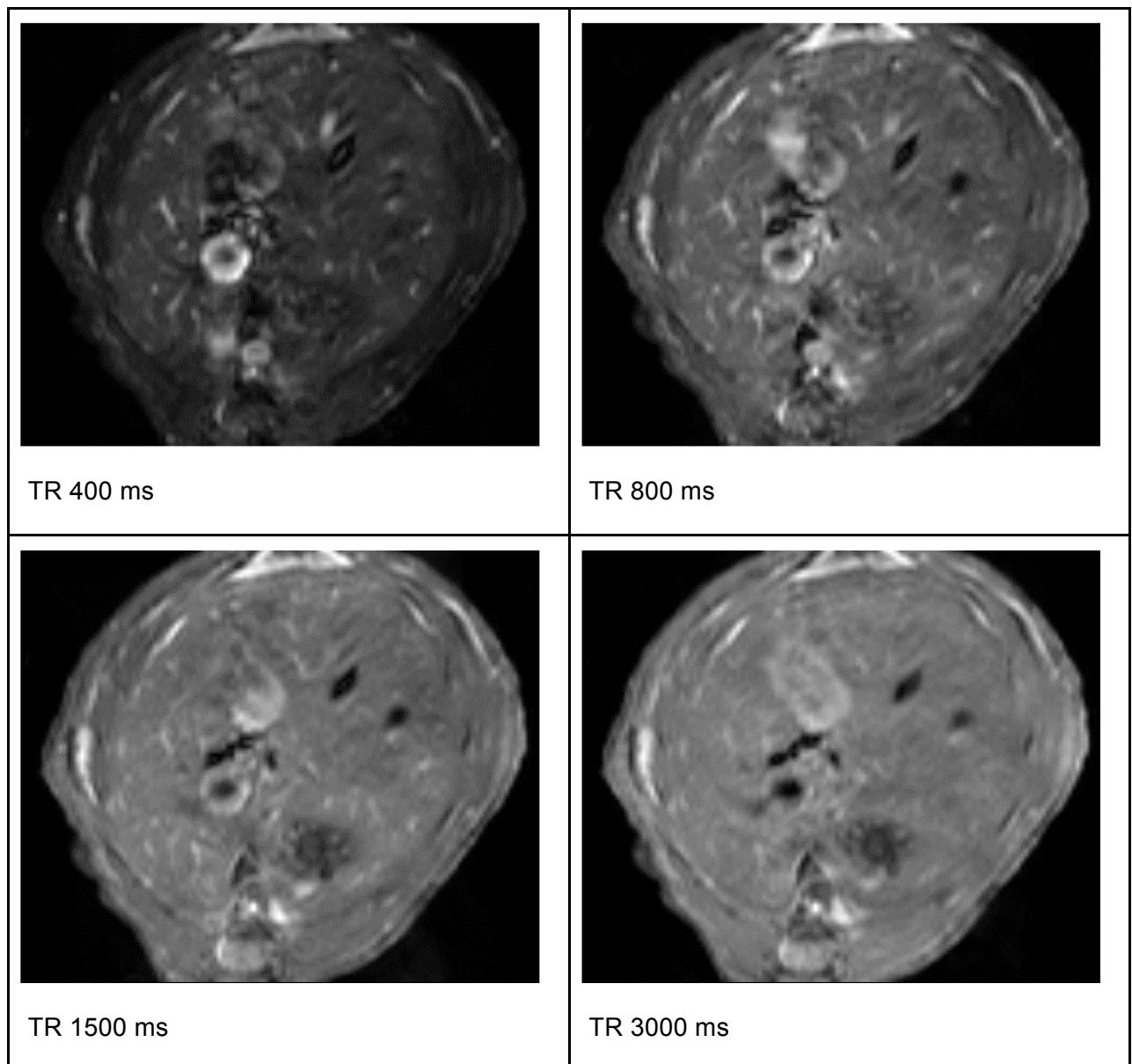


Abbildung 17: TSEVTR-Sequenz zur Bestimmung von T1 bei verschiedenen TR
TE 7,5 ms, NA 4

Die in Abb. 17 gezeigten Bilder wurden zur Messung der T1-Relaxationszeit genutzt. Es zeigen sich keine relevanten Bewegungsartefakte durch Atmung.

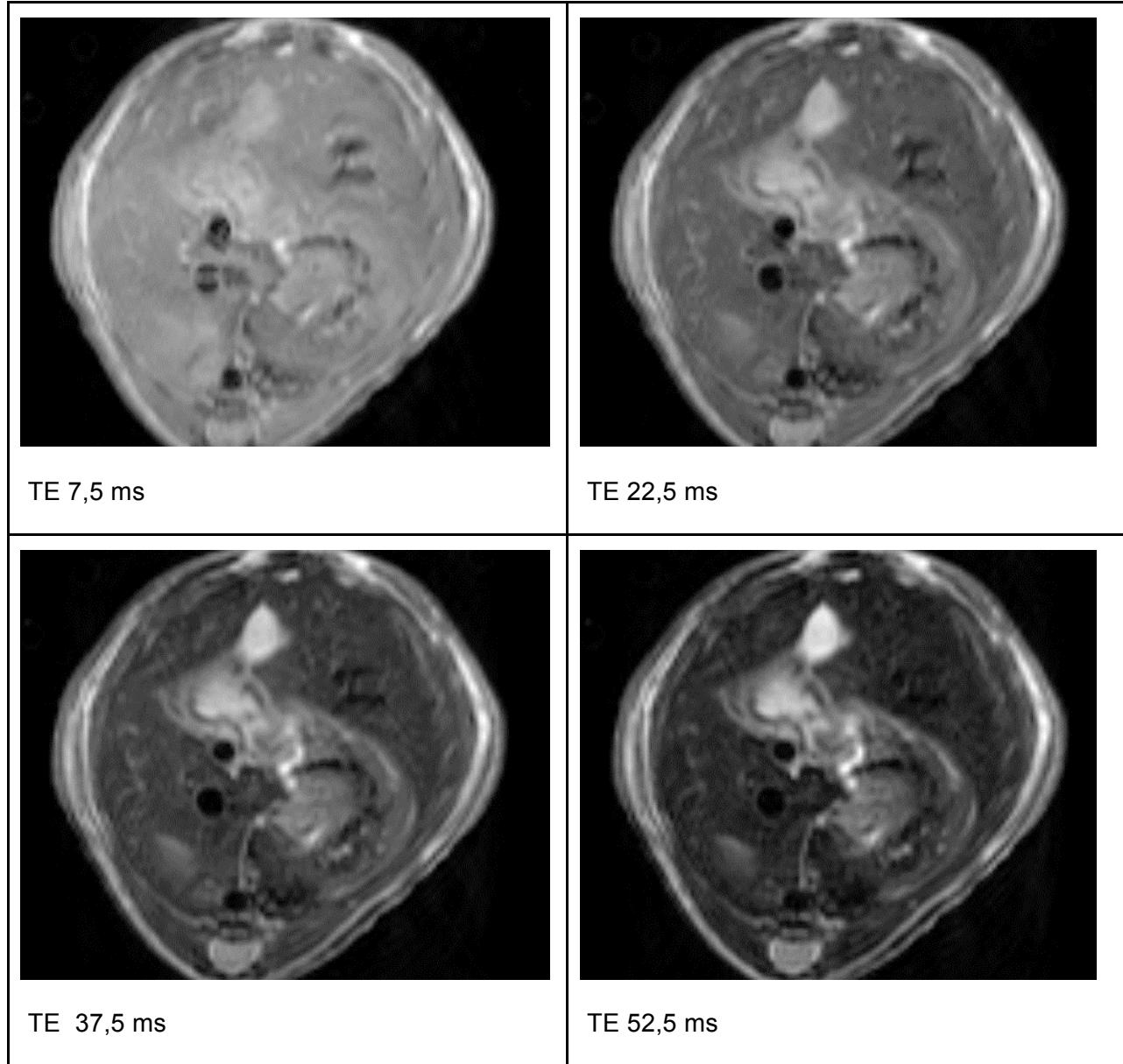


Abbildung 18: TSEVTR-Sequenz bei verschiedenen Echozeiten zur Bestimmung von T2
TR 3000 ms, NA 4

Anhand der Bilder aus Abb. 18 wurden die T2-Zeiten verschiedener Organe bestimmt.
Relevante Fluss- oder Atemartefakte sind nicht zu erkennen.

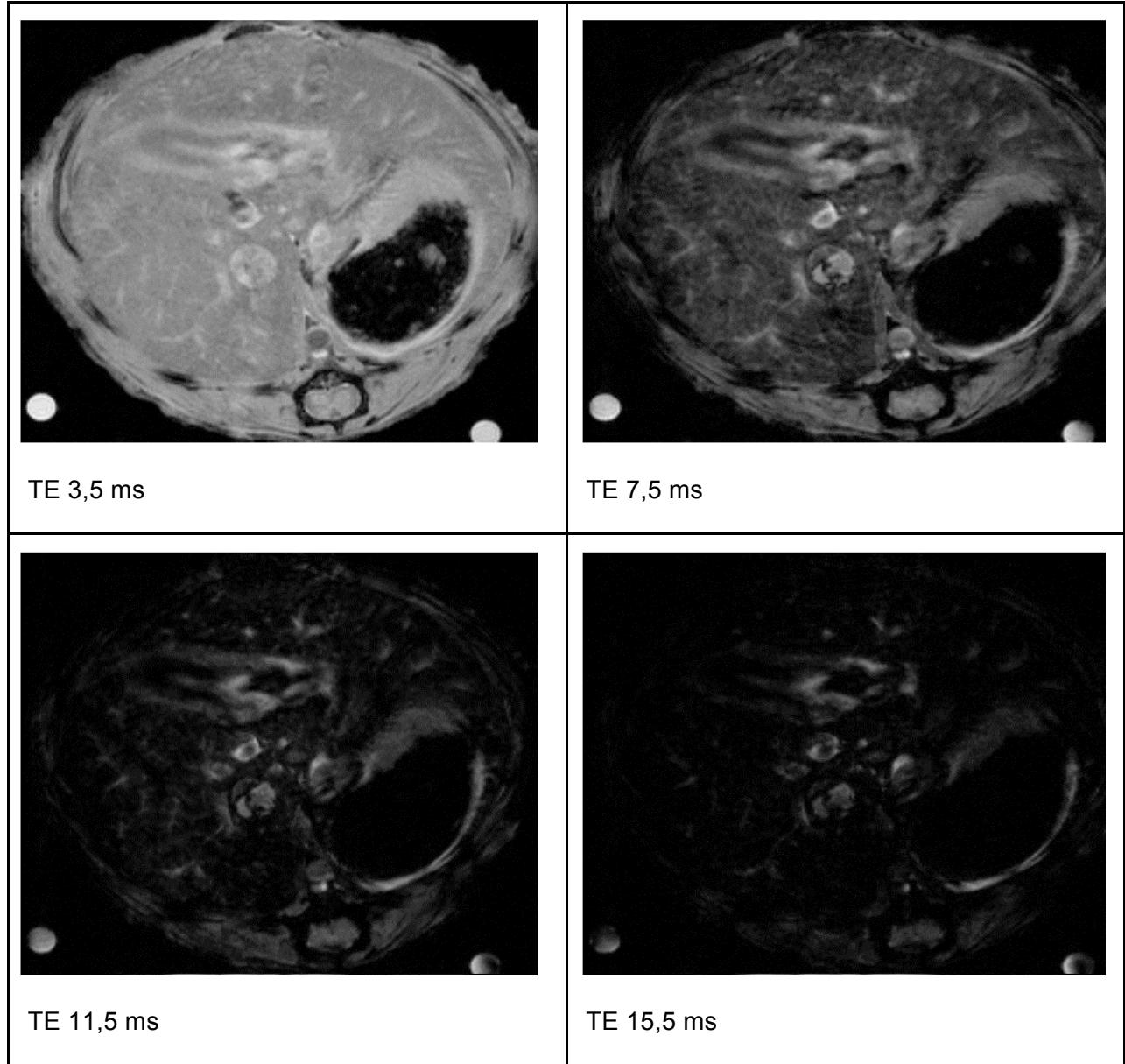


Abbildung 19: MGE-Sequenz zur Bestimmung der T₂^{*}-Zeit, Akquisition unter Atemtriggerung
Variable Parameter: TR 1000 ms, FA 30°, NA 5, TE wie angegeben

Mit Hilfe einer Multigradientenechosequenz (MGE, Abb. 19) wurde die T₂^{*}-Zeit bestimmt. Es sind keine Beeinträchtigungen durch Atemartefakte und relativ geringe Einflüsse von Magnetfeldinhomogenitäten zu erkennen.

4.5. Untersuchung der Leberfibrose

4.5.1. Biochemische und histologische Charakterisierung des Lebergewebes

Die Ergebnisse der Bestimmung des Hydroxyprolingehalts der Leber, des Fibroscores sowie des kollagenpositiven Gewebeanteils sind in den Abbildungen 20, 22 und 24 dargestellt.

Betrachtet man den Hydroxyprolingehalt der Leber, so zeigt sich für gesunde Tiere mit 220,12 µg/g ein deutlich niedrigerer Mittelwert gegenüber an Leberfibrose erkrankten Mäusen, deren Leber-Hydroxyprolingehalt auf 381,23 µg/g bestimmt wurde (Abb. 20 a). Der Shapiro-Wilk-Test belegte eine Normalverteilung für beide Gruppen.

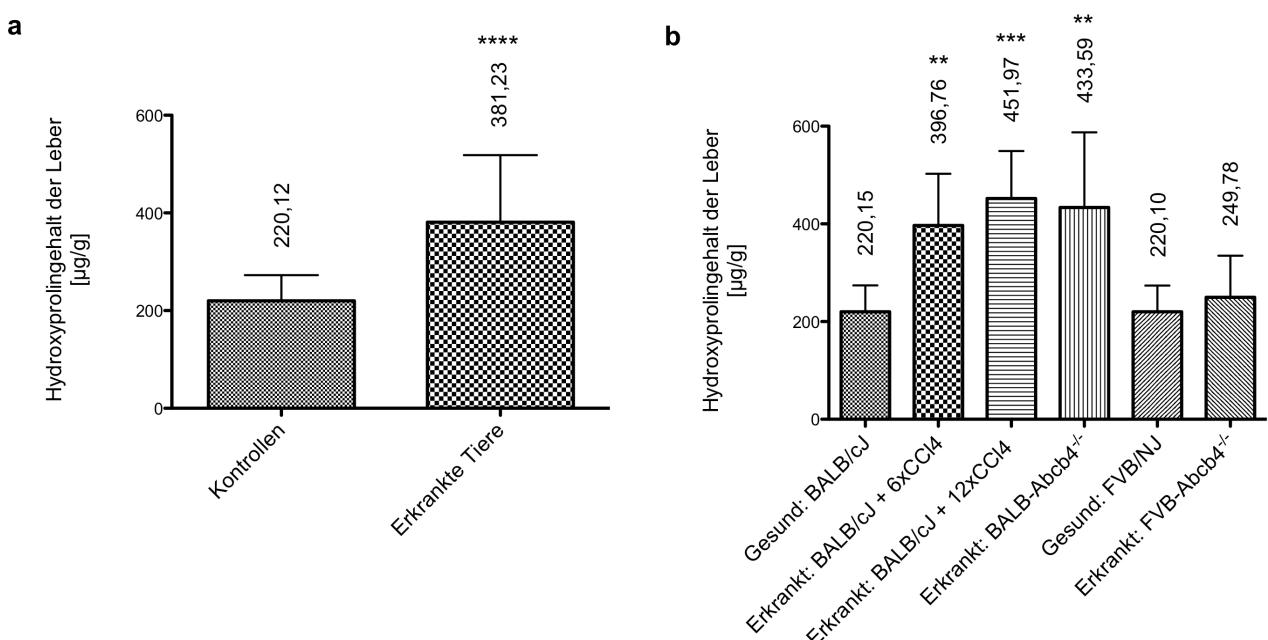


Abbildung 20: Hydroxyprolingehalt der Leber der Versuchstiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
**** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p < 0,0001$
- b Mittelwerte und Standardabweichung der nach Ätiologie aufgeteilten Versuchstiergruppen
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p < 0,01$
*** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p < 0,001$

Im ungepaarten t-Test kann die Nullhypothese für beide Versuchstiergruppen verworfen werden. Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen erkrankten und nicht erkrankten Tieren für den Hydroxyprolingehalt der Leber (Tabelle 11).

Schlüsselt man die Versuchstiere nach ihren zugrunde liegenden Pathophysiologien auf, so bestimmt der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung die Messwerte der 6x mit

CCl_4 behandelten Versuchstiere sowie der BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse als nicht normal verteilt. Die restlichen Gruppen zeigen eine Normalverteilung.

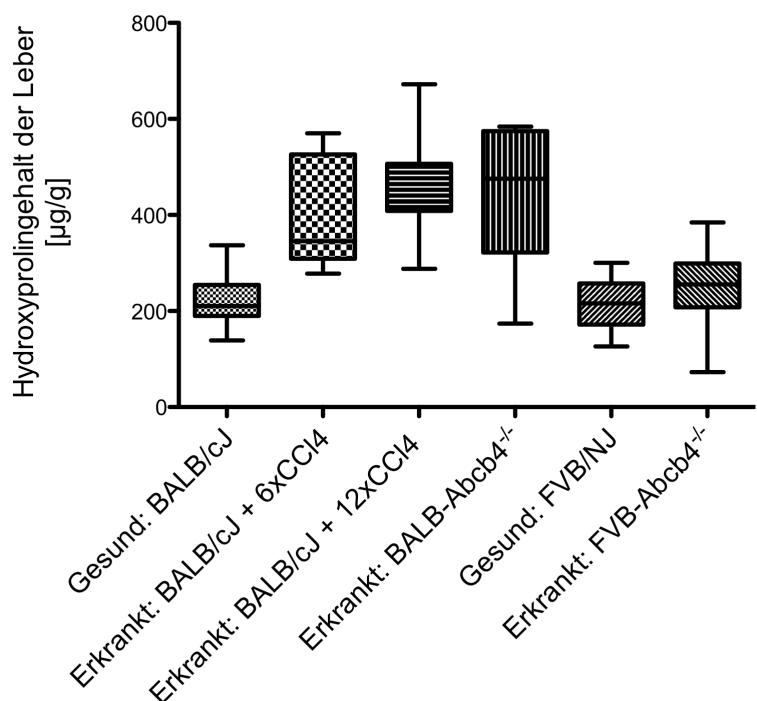
Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Mittelwert	Standardfehler	Differenz der Mittelwerte	t	Freiheitsgrade	Signifikanz	P-Wert	95% Konfidenzintervall
Kontrollen	25	220,12	10,50	-180,2	4,702	69	ja	<0,001	-218,1 - -104,1
Erkrankte Versuchstiere									

Tabelle 11: Hydroxyprolingehalt gesunder Kontrollen und erkrankter Tiere, Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben

12x mit CCl_4 behandelte BALB/cJ Mäuse weisen insgesamt mit 451,97 $\mu\text{g/g}$ Lebergewebe die höchsten Mittelwerte für Hydroxyprolin auf (Abb. 20 b). Allerdings liegen die Werte nur geringfügig höher als für 6x injizierte Tiere, für die 396,76 $\mu\text{g/g}$ gemessen werden. Entsprechend der höheren Empfindlichkeit ihrer Leber zeigen BALB/cJ-*Abcb4*-Knockouts höhere Hydroxyprolinwerte als FVB-*Abcb4*-Knockouts (433,59 $\mu\text{g/g}$ im Vergleich zu 249,78 $\mu\text{g/g}$). Diese liegen auf einem vergleichbaren Niveau zu 12x mit CCl_4 behandelten Tieren. Die Hydroxyprolinkonzentrationen der beiden Kontrolltiergruppen unterscheiden sich nur geringfügig (220,15 $\mu\text{g/g}$ Leber versus 220,10 $\mu\text{g/g}$ Leber).

Abbildung 21:

Box Plot der Hydroxyprolinwerte für die nach Ätiologie aufgeschlüsselten Versuchstiergruppen mit Anzeige von:
 Median (horizontale Linie)
 25%- und 75%-Perzentile (Box)
 Spannbreite der Messwerte (Balken)



Bei Anwendung des Kruskal-Wallis-Test nach Dunn (Abb. 21 und Tabelle 12) wurde kein signifikanter Unterschied zwischen FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäusen berechnet. Alle an Leberfibrose erkrankten BALB/cJ Mäuse unterscheiden sich dagegen signifikant von gesunden BALB/cJ Kontrolltieren.

Die Beurteilung des Schweregrades im Fibrosescore stimmt nur zum Teil mit den Beobachtungen für den Hydroxyprolingehalt überein (Abb. 22). Kontrolltiere wurden nicht falsch positiv beurteilt, allerdings zeigten insgesamt 5 Versuchstiere eines Leberfibrose bedingenden Behandlungs- oder Genotyps keine für eine Einstufung als „erkrankt“ ausreichenden histopathologischen Veränderungen.

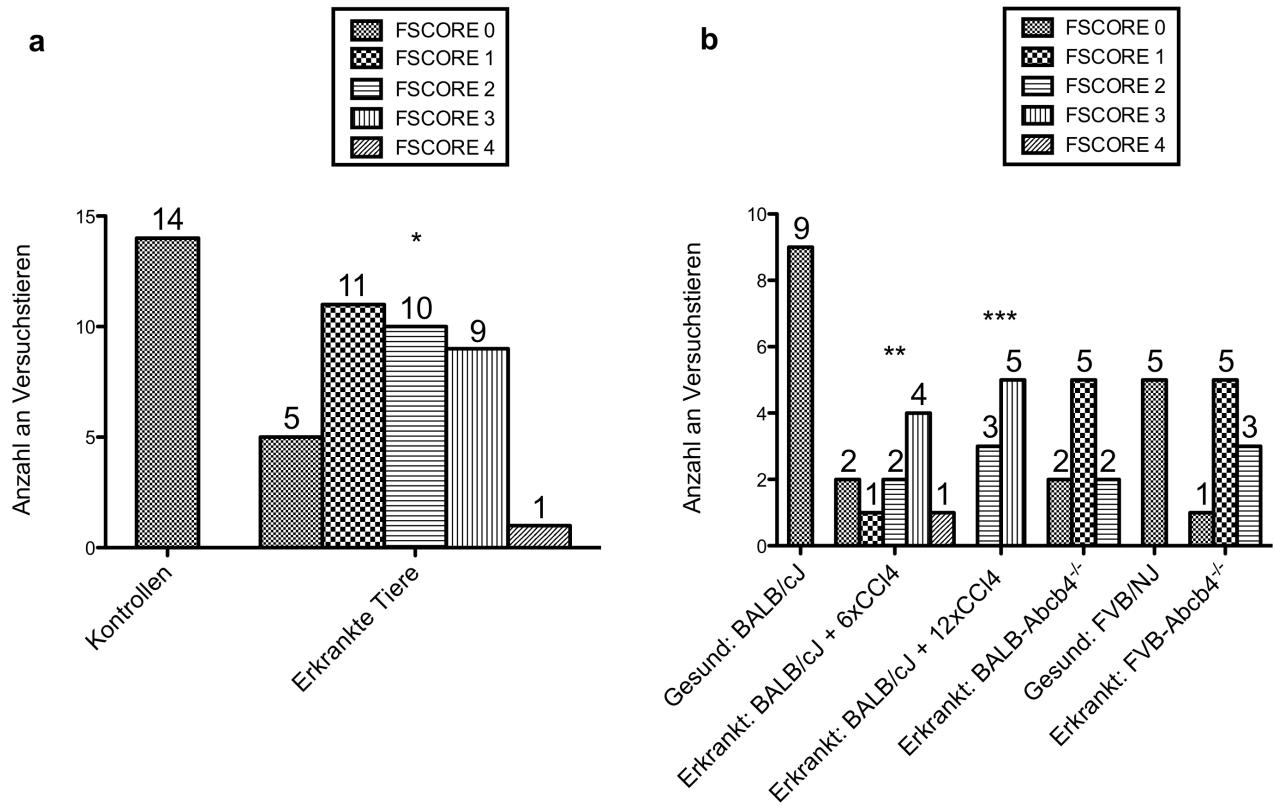
Tiergruppe	Median	„Range“	Differenz der Rangsummen gegen Kontrolle	Signifikanz gegen Kontrolle	P-Wert
BALB/cJ	210,27	138,95 - 336,88	-	-	-
BALB/cJ + 6xCCl ₄	345,51	277,97 - 570,22	-30,57	ja	<0,01
BALB/cJ + 12xCCl ₄	428,02	287,92 - 672,23	-36,85	ja	<0,001
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	475,73	173,67 - 584,27	-31,88	ja	<0,01
FVB/NJ	216,08	141,95 - 300,23	-	-	-
FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	255,65	72,59 - 394,39	-6,650	nein	>0,05

Tabelle 12: H-Test nach Kruskal-Wallis mit Test nach Dunn

Dabei liegt der Median für die Kontrolltiere bei FSCORE 0, während die Gesamtheit der erkrankten Tiere einen Median von FSCORE 2 aufweist (Abb. 22 a). Ein statistischer Vergleich zwischen beiden Gruppen mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests zeigt einen signifikanten Unterschied ($p= 0,0136$, Tabelle 13).

Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Summe positiver und negativer Ränge	Rangsumme W	Signifikanz	P-Wert
Kontrollen	13	0,00	-36,00	Ja	0,0136
Erkrankte Versuchstiere	37	-36,00			

Tabelle 13: Wilcoxon-Rangsummentest des Fibroscores gesunder Kontrollen und erkrankter Versuchstiere



Untersucht man die verschiedenen Tiergruppen aufgeschlüsselt nach ihrer Ätiologie (Abb. 22 b), so unterscheiden sich die Mediane am deutlichsten zwischen Kontrolltieren und CCl₄-behandelten Mäusen. Dabei zeigt sich ein unterschiedlich ausgeprägter Schweregrad der Erkrankung. 6x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere weisen einen medianen FSCORE 2 auf. Dieser Wert erhöht sich für 12x behandelte Tiere auf FSCORE 3. Als am moderatesten erkrankt erscheinen wie für den Hydroxyprolingehalt die Gruppe der FVB-Abcb4^{+/+} Mäuse (FSCORE 1), aber auch zeigen BALB-Abcb4^{+/+} Versuchstiere. Diese weisen im Gegensatz zu ihrem relativ hohen Hydroxyprolingehalt nur einen geringen Fibrosegrad (FSCORE 1) auf.

Eine Überprüfung der Rangwerte auf Normalverteilung ist mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests nicht möglich. Für die statistische Analyse der nach den verschiedenen Ätiologien aufgeteilten Ergebnisse wurde auf den Kruskal-Wallis-Test nach Dunn zurückgegriffen. Dieser berechnet die Unterschiede zwischen gesunden Kontrolltieren und 6x bzw. 12x mit CCl₄ behandelten Versuchstieren als signifikant ($p<0,001$ bzw $p<0,0001$). Die Knockout-Tiermodelle weisen hingegen keinen signifikanten Unterschied zu nicht erkrankten Kontrolltieren auf (Tabelle 14).

Tiergruppe	Median	„Range“	Differenz der Rangsummen gegen Kontrolle	Signifikanz gegen Kontrolle	P-Wert
BALB/cJ	0	-	-	-	-
BALB/cJ + 6xCCl ₄	2	0 - 4	-21,10	ja	<0,01
BALB/cJ + 12xCCl ₄	3	2 - 3	-31,83	ja	<0,001
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	1	0 - 2	-14,00	nein	>0,05
FVB/NJ	0	-	-	-	-
FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	1	0 - 2	-16,83	nein	>0,05

Tabelle 14: Fibrotescore der verschiedenen Versuchstiergruppen
H-Test nach Kruskal-Wallis mit Test nach Dunn

Die Bestimmung der kollagenpositiven Fläche zeigt für die Gruppen gesunder Kontrolltiere einen Mittelwert von 10,84%. Für erkrankte Versuchstiere wird der mittlere kollagenhaltige Gewebeanteil dagegen auf 25,36% bestimmt (Abb. 23 a). Die Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests zeigt für beide Gruppen eine Normalverteilung. Die statistische Analyse mit dem Zweistichproben-t-Test belegt einen signifikanten Unterschied ($p<0,01$) zwischen beiden Gruppen (Tabelle 15).

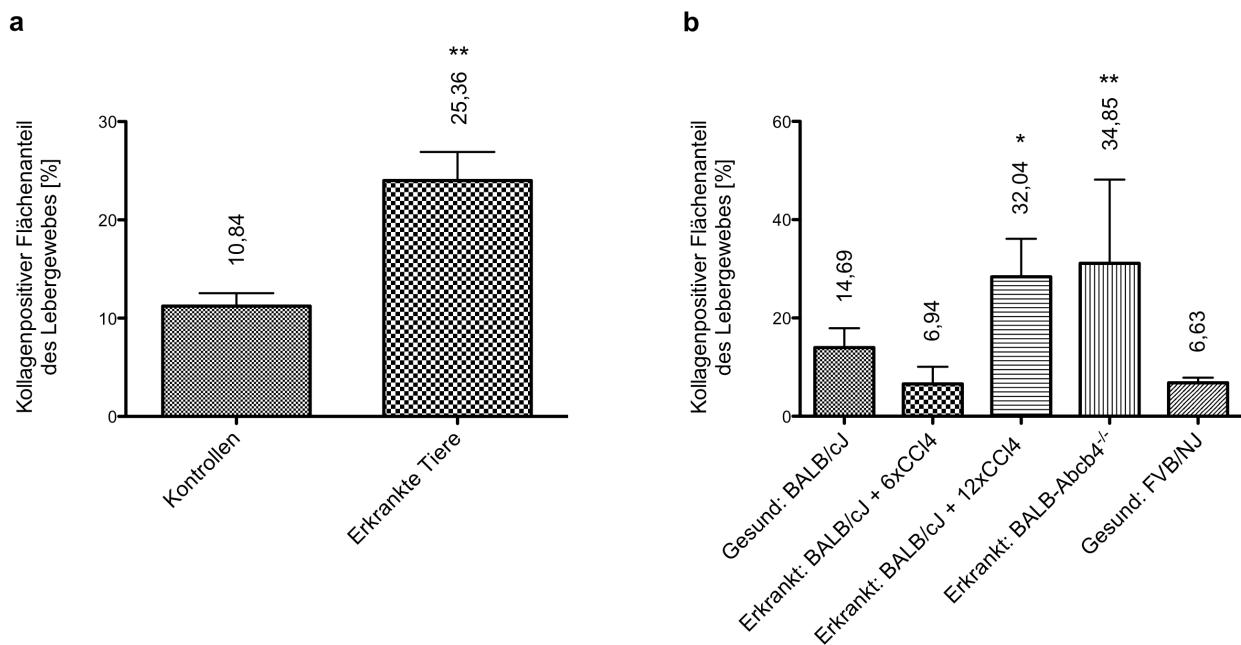


Abbildung 23: Kollagenpositiver Flächenanteil der Leber der Versuchstiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,01$
- b Mittelwerte und Standardabweichung der nach Ätiologie aufgeteilten Versuchstiergruppen
* Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,05$
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,01$

Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Mittelwert	Standardfehler	Differenz der Mittelwerte	t	Freiheitsgrade	Signifikanz	P-Wert	95% Konfidenzintervall
Kontrollen	13	11,22	1,32	-12,79	2,917	39	ja	<0,01	-21,66 - -3,92
Erkrankte Versuchstiere	28	24,01	2,91						

Tabelle 15: Kollagenpositive Fläche der Leber für Kontrollen und erkrankte Tiere
Zweistichproben-t-Test für unverbundene Stichproben

Die Bestimmung der kollagenpositiven Fläche an Schnittpräparaten der Leber konnte für insgesamt 41 Versuchstiere durchgeführt werden. Daten für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse konnten dabei nicht erhoben werden. Entsprechend kann kein Vergleich zu gesunden FVB/NJ Tieren durchgeführt werden. Die korrespondierende Kontrollgruppe der FVB/NJ Tiere ist zum Vergleich aufgeführt. Mit ihren Messwerten ist sie außerdem in der Gruppe der Kontrollen berücksichtigt.

Die Betrachtung der Ergebnisse der Kollagenflächenbestimmung auf Ebene der verschiedenen Ätiologien der Fibroseentwicklung zeigt vor allem für 6x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere eine Abweichung von den für den Hydroxyprolingehalt beobachteten Veränderungen (Abb. 23 b). BALB-*Abcb4*-Mutanten weisen mit 34,85 % den größten Anteil an kollagenhaltigem Gewebe in der Leber auf. 12x mit CCl₄ injizierte BALB/cJ Tiere zeigen einen im Vergleich nur geringfügig reduzierten Mittelwert von 32,04 %. Dagegen befindet sich der Flächenanteil kollagenhaltigen Gewebes von BALB/cJ Mäusen nach 6 CCl₄-Injektionen mit 6,94 % unter dem Niveau un behandelter BALB/cJ Kontrolltiere. Die statistische Untersuchung der nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilten BALB/cJ-Versuchstiergruppen mit dem einfaktoriellen ANOVA identifiziert signifikante Unterschiede zwischen BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäusen (p<0,01) bzw. 12x mit CCl₄ behandelten Versuchstieren (p<0,05) und ihren korrespondierenden Kontrolltieren (Tabelle 16). Zwischen dem Hydroxyprolingehalt und dem Fibrosescore bzw. der kollagenpositiven Fläche im Leberschnitt kann durch parametrische und nichtparametrische Korrelation jeweils ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen den Messwerten dargestellt werden, der für die beiden Erstgenannten am deutlichsten ausfällt. In Abbildung 24 sind diese Korrelationen zusammen mit ihren Korrelationskoeffizienten dargestellt. Teilt man die Hydroxyprolinwerte und Fibroscores nach den zugrundeliegenden Ätiologien und Genotypen auf, erhöhen sich die Korrelationskoeffizienten für CCl₄-behandelte Versuchstiere bzw. BALB/cJ Kontrollen

Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Mittelwert	Standardfehler	Differenz der Mittelwerte	t	Signifikanz	P-Wert	95% Konfidenzintervall
BALB/cJ	8	13,98	1,395	-	-	-	-	-
BALB/cJ + 6x CCl ₄	7	6,61	1,315	7,337	1,339	nein	>0,05	-6,541- 21,30
BALB/cJ + 12x CCl ₄	10	28,37	2,448	-14,40	2,851	ja	<0,05	-27,15 bis -1,639
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	11	31,12	5,139	-17,14	3,465	ja	<0,01	-29,64 - 4,645

Tabelle 16: Kollagenpositive Fläche der Leber, einfaktorieller ANOVA der verschiedenen nach Ätiologie unterteilten Versuchgruppen

und *Abcb4*-Knockouts beträchtlich, während ein signifikanter Zusammenhang für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse und korrespondierende gesunde Tiere nicht mehr gezeigt werden kann.

4.5.2. Bestimmung der Leberenzyme aus Serumproben

Die Bestimmung der Serummarker für Zellschädigung und Entzündung zeigt für alle untersuchten Enzyme und Tiergruppen höhere Mittelwerte der Aktivitäten für Tiere mit Leberfibrosen. Auch hier stellen sich deutliche Unterschiede für die verschiedenen Tiermodelle dar.

Die beiden klassischen Marker einer Leberzellenschädigung, AST und ALT, sind im Vergleich zwischen gesunden Kontrolltieren und erkrankten Mäusen deutlich erhöht. Teilt man die Messwerte nach verschiedenen Ätiologien und Genotypen auf, zeigen alle Krankheitsmodelle höhere Mittelwerte als die verwendeten Kontrolltiere. Besonders hohe Aktivitäten von AST und ALT werden für 12x mit CCl₄ behandelte BALB/cJ Mäuse beobachtet.

Für die AST (Abb. 25) wird der Mittelwert der Serumaktivität gesunder Tiere mit 111,38 U/l bestimmt, während dieser Wert für erkrankte Tiere 508,34 U/l beträgt. Untersucht man die Gesamtheit der gesunden bzw. erkrankten Versuchstiere mit dem Shapiro-Wilk-Test, stellen sich die Messwerte als nicht normalverteilt dar. Der Mann-Whitney-U-Test berechnet für beide Gruppen einen signifikanten Unterschied ($p<0,0001$).

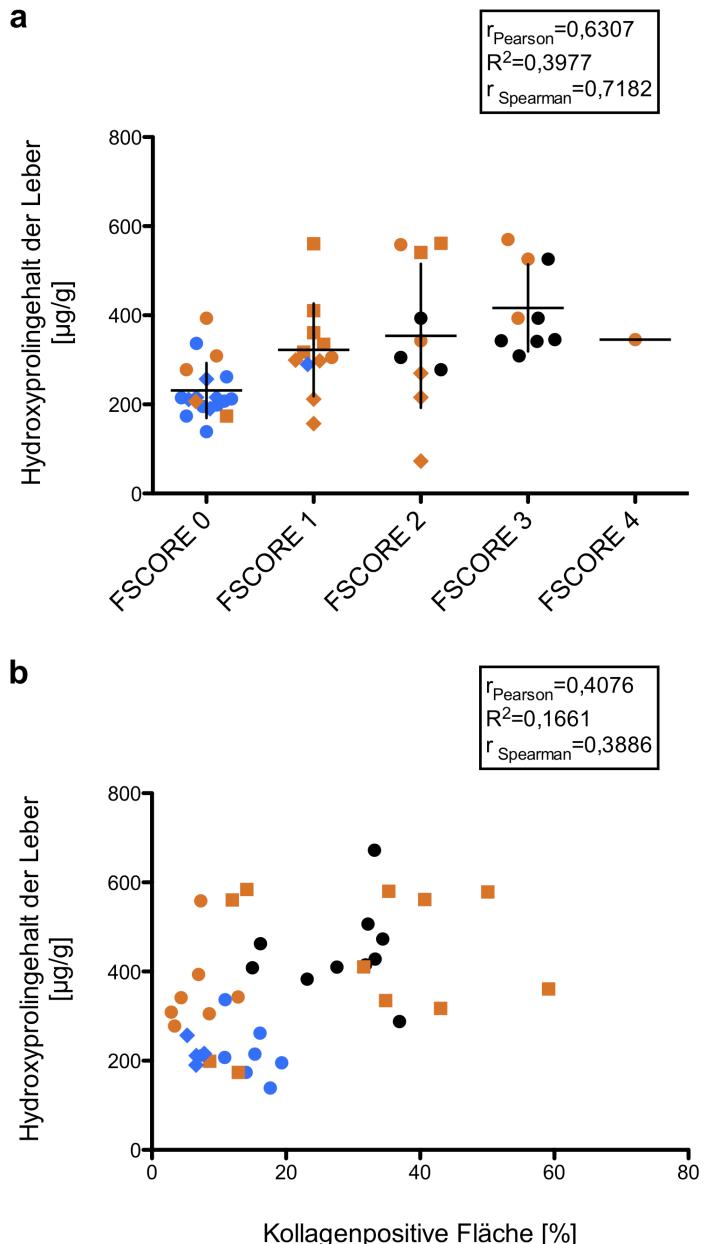
Nach Aufteilung der Messwerte nach Ätiologie der Erkrankung und Genotyp wird für unbehandelte BALB/cJ-Tiere eine mittlere Enzymaktivität von 79,06 U/l und für FVB/NJ

Abbildung 24: Punktwolkendiagramme und Korrelationskoeffizienten für den Hydroxyprolingehalt der Leber aller Versuchstiere und den Fibrofcores

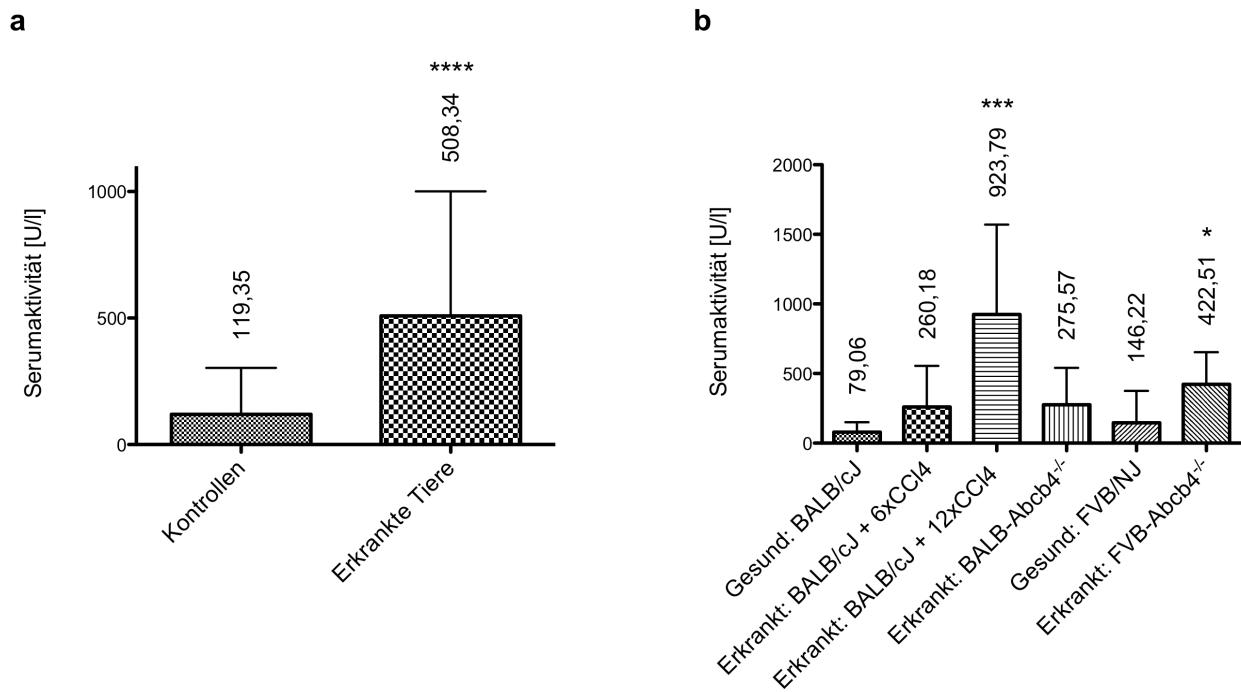
a
b
die kollagenpositive Fläche im Schnitt

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}



Mäuse ein Mittelwert von 146,22 U/l gemessen. Demgegenüber zeigen 6x mit CCl₄ behandelte Mäuse eine mittlere Serumaktivität von 260,18 U/l. Für 12x CCl₄-behandelte Mäuse wird dieser Wert auf 923,79 U/l bestimmt. Der Mittelwert der Serumaktivität der AST liegt für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse mit 275,57 U/l auf einem Niveau mit 6x CCl₄-injizierten Tieren, während für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mutanten ein Wert von 422,51 U/l bestimmt wird. Die Überprüfung der verschiedenen Versuchstiergruppen mit dem Shapiro-Wilk-Test zeigt das Fehlen einer Normalverteilung für die Messwerte gesunder FVB/NJ Mäuse. Für die Gruppe der BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse liegen für eine Beurteilung der Verteilung nicht genügend Messwerte vor.



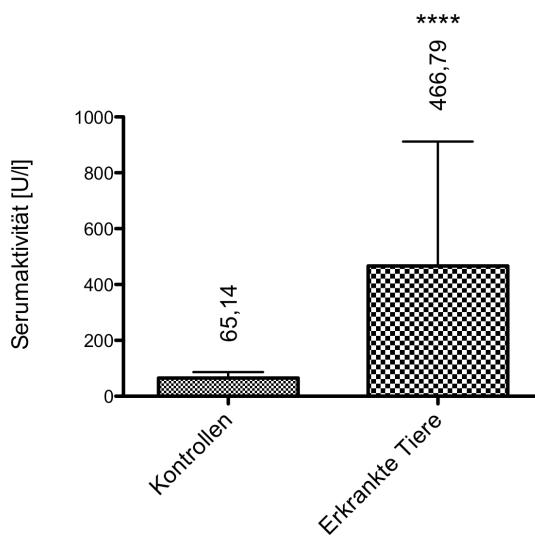
Die statistische Analyse mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test berechnet signifikante Unterschiede zwischen BALB/cJ Kontrolltiere und 12x CCl₄-behandelte Mäusen ($p < 0,001$) sowie für gesunde FVB/NJ Tiere und FVB-Abcb4-Knockouts ($p < 0,01$).

Die Bestimmung der mittleren Serumaktivität der ALT liefert ein im Profil sehr ähnliches Ergebnis wie für die AST beschrieben (Abb. 26). Für die Gesamtheit gesunder Tiere wird ein Mittelwert von 65,14 U/l gemessen, während dieser Wert für erkrankte Tiere 466,79 U/l beträgt. Die Untersuchung beider Gruppen mit dem Shapiro-Wilk-Test, zeigt, dass die Messwerte für gesunde Kontrolltiere normalverteilt sind. Für erkrankte Tiere gilt dies nicht. Im Mann-Whitney-U-Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0,0001$).

Teilt man die Messwerte nach den verschiedenen Genotypen und Ätiologien auf, ergeben sich für gesunde Kontrolltiere der Stämme BALB/cJ und FVB/NJ Mittelwerte der Serumaktivität von 55,53 U/l bzw. 76,04 U/l. 6x mit CCl₄ behandelte Mäuse weisen gegenüber Kontrollen eine deutlich höhere mittlere Serumaktivität von 289,53 U/l auf. Für 12x CCl₄-behandelte Mäuse ergibt sich ein Mittelwert von 897,84 U/l. Die Mittelwerte für BALB- und FVB-Abcb4^{-/-} Mäuse unterscheiden sich erneut deutlich.

Während für erstere 224,83 U/l gemessen werden, wird die Serumaktivität der ALT für letztere auf 306,70 U/l bestimmt.

a



b

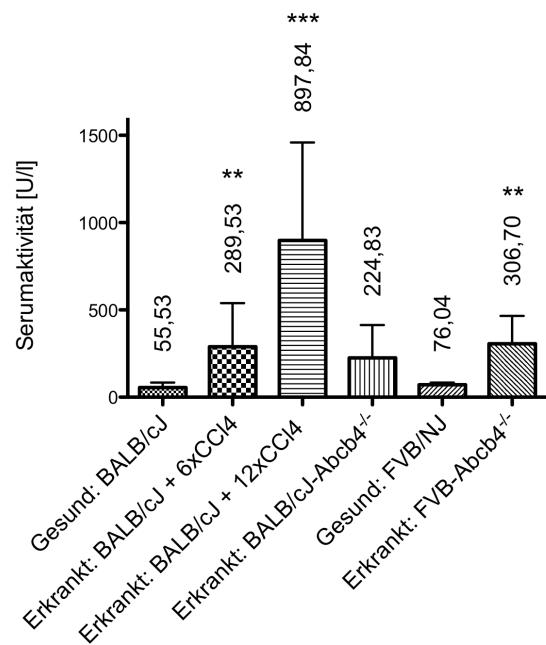


Abbildung 26: Serumaktivität der ALT

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
**** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, p<0,0001
- b Mittelwerte und Standardabweichung der nach Ätiologie aufgeteilten Versuchstiergruppen
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, p<0,01
*** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, p<0,001

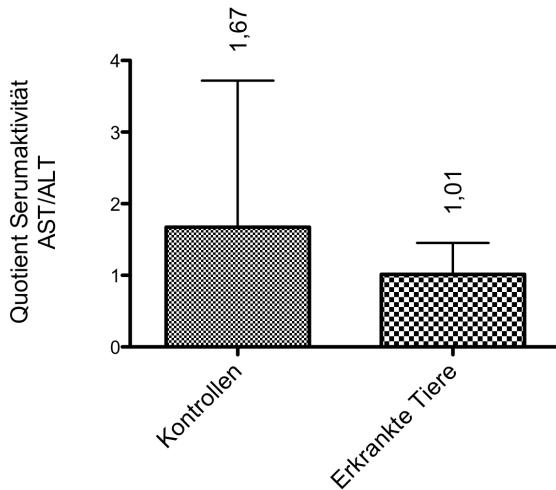
Im Shapiro-Wilk-Test zeigt sich, dass die Messwerte für 6x CCl₄-behandelte Versuchstiere nicht normalverteilt vorliegen. Für eine Beurteilung der Verteilung liegen zudem für BALB-Abcb4^{-/-} Mäuse nicht genügend Messwerte vor.

Wendet man den Kruskal-Wallis-Test mit Test nach Dunn auf die verschiedenen Versuchstiergruppen an, können signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten BALB/cJ und 6x (p<0,01) bzw. 12x CCl₄-behandelten Versuchstieren (p< 0,001) sowie zwischen FVB/NJ und FVB-Abcb4^{-/-} Mäusen (p< 0,01) belegt werden.

Betrachtet man den Quotienten der Serumaktivitäten von AST und ALT (Abb. 27), zeigen sich geringere Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen, als für die nicht verrechneten Serumwerte. Die Gruppe der gesunden Kontrolltiere weist dabei mit 1,67 einen höheren Wert auf als die Gruppe der erkrankten Tiere, für die der Quotient der Mittelwerte von AST und ALT auf 1,01 bestimmt wird. Im Shapiro-Wilk-Test zeigt sich, dass die Messwerte für beide Gruppen nicht normalverteilt vorliegen.

Die statistische Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test kann keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen.

a



b

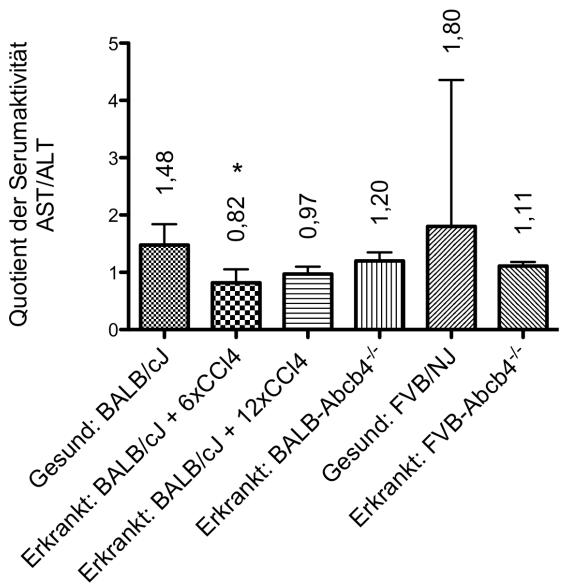


Abbildung 27: Quotient der Serumaktivitäten von AST und ALT

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- b Mittelwerte und Standardabweichung der nach Ätiologie aufgeteilten Versuchstiergruppen

* Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p < 0,05$

Bestimmt man den Quotienten aus AST und ALT für die verschiedenen Untergruppen an Versuchstieren, so zeigt sich generell ein höherer Wert für gesunde Kontrolltiere. Für unbehandelte BALB/cJ-Mäuse beträgt er 1,48. Für FVB/NJ Versuchstiere wird der Quotient aus AST und ALT auf 1,80 berechnet.

Die erkrankten Versuchstiere stellen sich je nach Modell unterschiedlich dar. Für 6x CCl₄-behandelte wird der Quotient auf 0,82 bestimmt, für 12x injizierte Versuchstiere Mäuse auf 0,97 berechnet. Tiere mit nicht funktionstüchtigem Abcb4-Gen dagegen weisen Werte größer 1, aber kleiner als die der Kontrolltiergruppen auf. Für BALB-Abcb4^{−/−} Mutanten wird ein mittlerer Quotient von 1,20 gemessen. FVB-Abcb4^{−/−} Versuchstiere weisen dagegen einen Wert von 1,11 auf.

Im Shapiro-Wilk-Test zeigen die verschiedenen Versuchstiergruppen ein uneinheitliches Bild. Während für BALB-Abcb4^{−/−} Tiere die Menge an Messwerten für eine Überprüfung der Verteilung zu gering ist, weisen die Werte der 12x mit CCl₄ behandelten Versuchstiere und der FVB-Abcb4^{−/−} Mäuse eine Normalverteilung auf. Für die anderen Versuchstiergruppen ist dies nicht der Fall. Die Analyse auf signifikante

Unterschiede zwischen den verschiedenen Ätiologien und Genotypen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit Test nach Dunn stellt einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) zwischen BALB/cJ Kontrolltieren und 6x CCl₄-behandelten Mäusen fest.

Auch für die AP zeigen sich für erkrankte und gesunde Versuchstiere relativ deutliche Unterschiede in der Enzymaktivität (Abb. 28). Für die Gesamtheit gesunder Mäuse wird ein Mittelwert von 111,38 U/l gemessen, während die Gruppe der erkrankten Tiere eine mittlere Serumaktivität von 191,30 U/l aufweist. Nach dem Shapiro-Wilk-Test liegt für beide Gruppen keine Normalverteilung der Messwerte vor. Die statistische Analyse mit den Mann-Whitney-U-Test berechnet einen signifikanten Unterschied ($p<0,01$) zwischen beiden Gruppen.

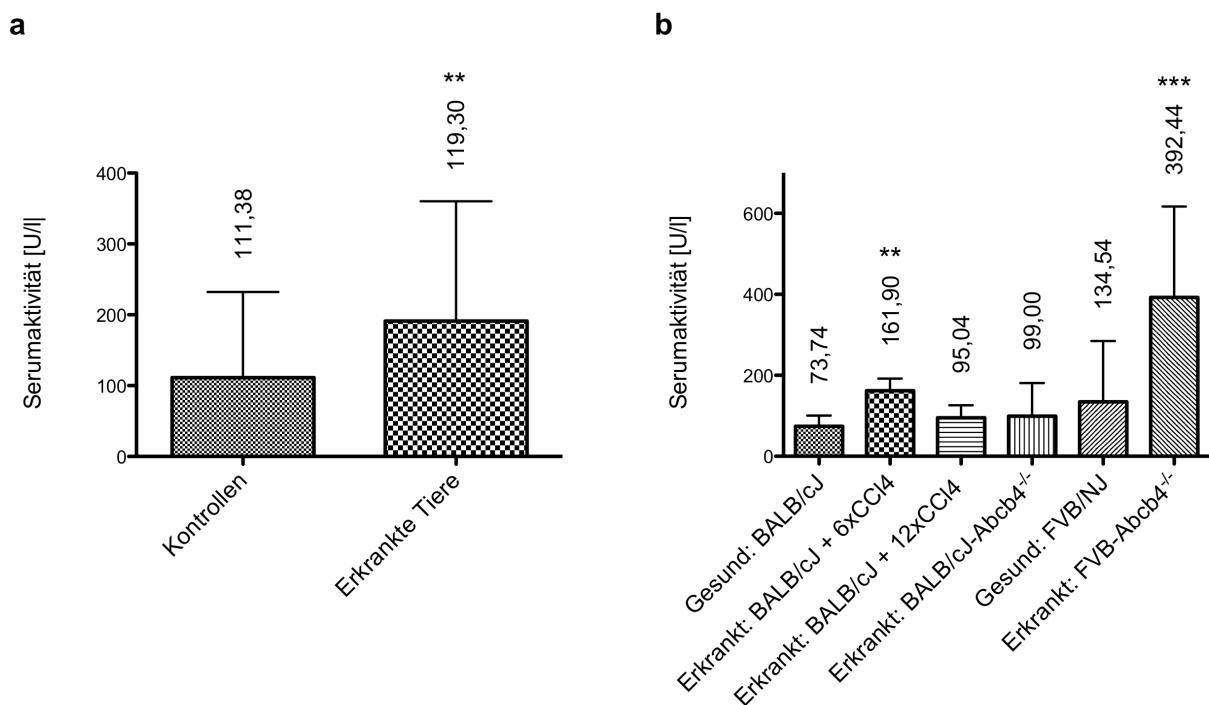


Abbildung 28 Serumaktivität der AP

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,01$
- b Mittelwerte und Standardabweichung der nach Ätiologie aufgeteilten Versuchstiergruppen
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,01$
*** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,001$

Vergleicht man die verschiedenen Mittelwerte der Enzymaktivität für die verschiedenen Krankheitsmodelle bzw. Tierstämme, zeigt sich eine heterogene Verteilung. Dabei unterscheiden sich die Kontrolltiere deutlicher voneinander. Für BALB/cJ Mäuse ohne Behandlung wird die Serumaktivität der AP auf 73,74 U/l bestimmt, während der mittlere Messwert für FVB/NJ Tiere 134,54 U/l beträgt. 6x mit CCl₄ behandelte

Versuchstiere weisen eine mittlere Enzymaktivität von 161,90 U/l auf, während für 12x mit CCl₄ injizierte Mäuse ein Mittelwert von 95,04 U/l gemessen wird.

Die Mittelwerte der Serumaktivität der AP liegen für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse mit 99,00 U/l in etwa auf diesem Niveau, während FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere eine deutliche höhere Enzymaktivität von 392,44 U/l aufweisen. Im Shapiro-Wilk-Test zeigen sich alle Versuchstiergruppen bis auf BALB-*Abcb4*^{-/-} Tiere und FVB/NJ Mäuse normalverteilt. Für erstere liegt für eine Prüfung der Verteilung eine zu geringe Anzahl an Messwerten vor. Für weitere Versuchstiere weist der Test nach, dass die Messwerte nicht normalverteilt vorliegen. Die statistische Überprüfung der beschriebenen Unterschiede mit dem Kruskal-Wallis-Test mit Test nach Dunn weist signifikante Unterschiede zwischen BALB/cJ Mäusen und 6xCCl₄-behandelten Versuchstieren ($p < 0,01$) sowie zwischen FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Tieren nach ($p < 0,001$).

Untersucht man die Aktivitäten der Serummarker AST, ALT und AP auf das Vorliegen linearer Korrelationen untereinander und mit histologischen und biochemischen Markern, so fällt zuerst eine hohe Korrelation zwischen den in Serum gemessenen AST- und ALT-Aktivitäten auf (Abb. 29). Beide Enzymaktivitäten korrelieren mäßig bis mittelstark mit dem FibroScore und mit dem Hydroxyprolingehalt (Abb. 30 und 31). Dabei findet sich ein stärker linearer Zusammenhang für den FibroScore. Von beiden Enzymwerten korreliert die Serumaktivität der ALT stärker mit beiden histologischen und biochemischen Parametern. Ein signifikanter Zusammenhang mit der kollagenpositiven Fläche im Schnitt konnte dagegen für beide Serummarker nicht gefunden werden. Dieser Parameter zeigt allein eine signifikante und negative Korrelation mit der Serumaktivität der AP (Abb. 32).

Abbildung 29:

Punktwoldendiagramm und Korrelationskoeffizienten für die Serumaktivitäten von ALT und AST aller Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

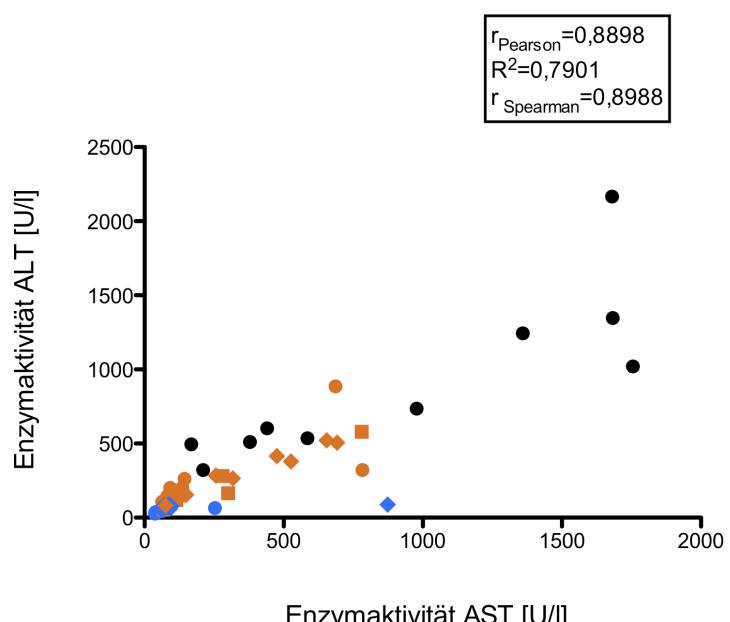


Abbildung 30: Punktwolkendiagramme und Korrelationen zwischen histologischen und biochemischen Parametern

- a Serumaktivität der AST vs. Hydroxyprolingehalt
- b Serumaktivität der AST vs. FibroScore

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

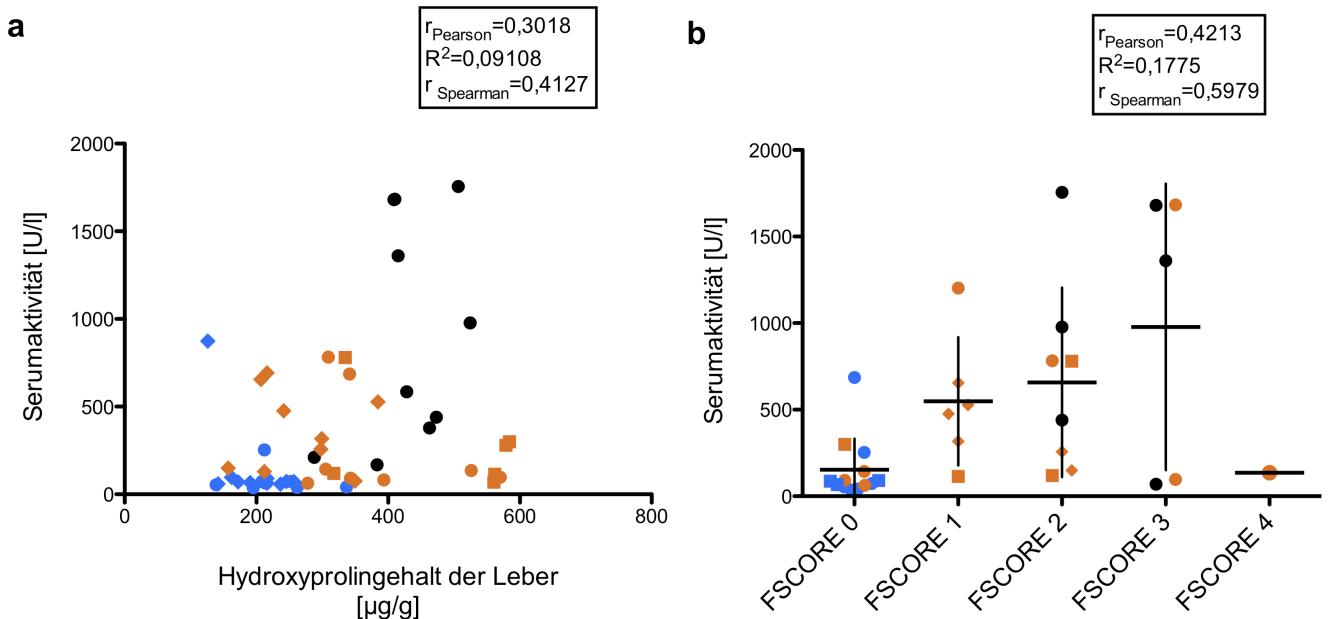


Abbildung 31: Punktwolkendiagramme und Korrelationen zwischen histologischen und biochemischen Parametern

- a Serumaktivität der ALT vs. Hydroxyprolingehalt
- b Serumaktivität der ALT vs. FibroScore

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

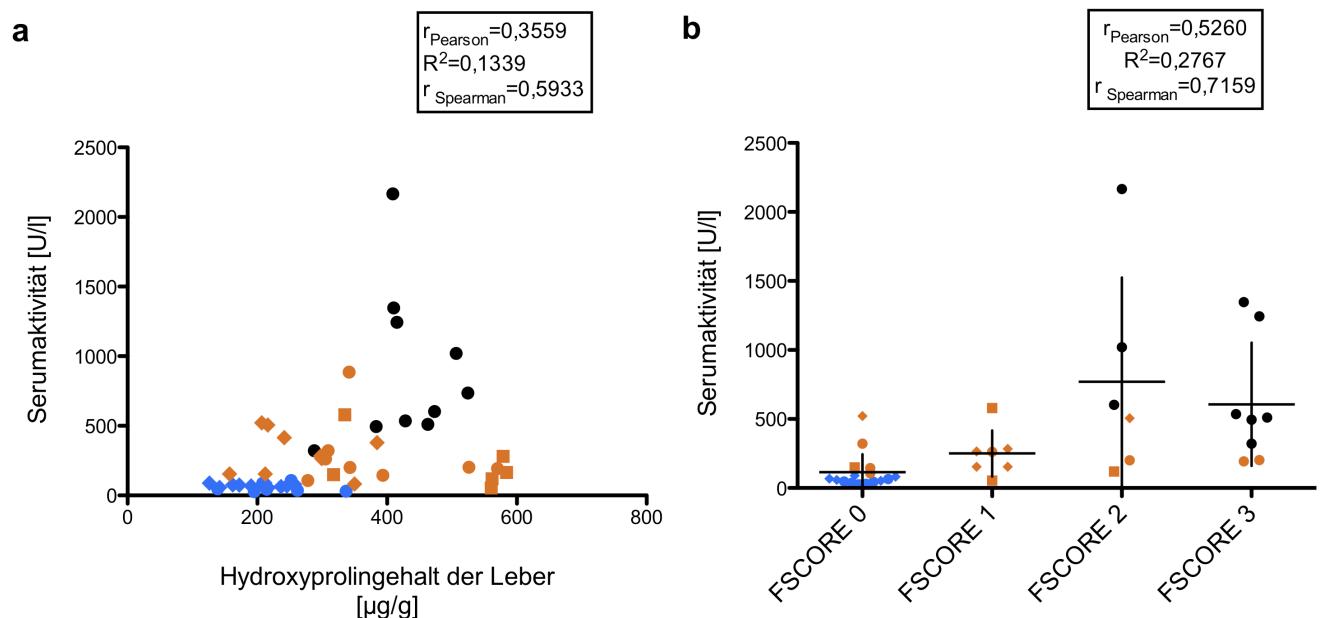
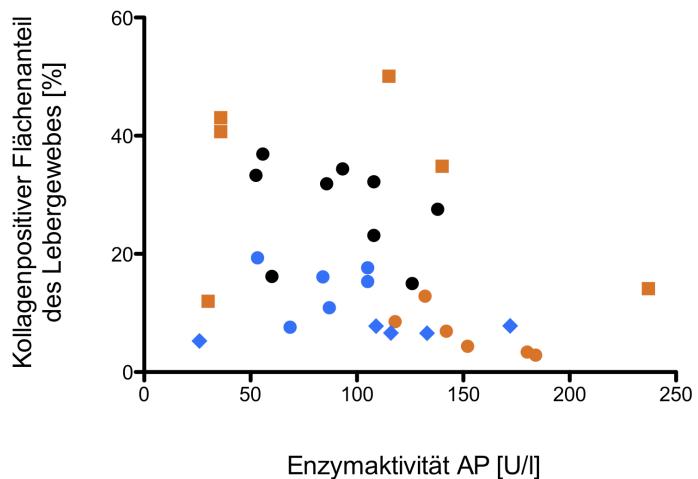


Abbildung 32:

Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für die Serumaktivität der AP im Vergleich zur kollagenpositiven Fläche im Schnittpräparat

$r_{Pearson} = -0,3687$
 $R^2 = 0,136006$
 $r_{Spearman} = -0,4336$



4.5.3. Relaxationszeitbestimmungen

4.5.3.1. Relaxationszeit T1

Die Messwerte für die Longitudinal-Relaxationszeiten sind sowohl für Versuchstiere mit Leberfibrose als auch für Kontrolltiere normalverteilt. Die statistische Untersuchung mit dem Zweistichproben-t-Test (Tabelle 17) zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 33 a, $p < 0,0001$).

Untersucht man die Tiere aufgeteilt in Subgruppen nach ihrer Ätiologie, so stellt man mit dem Shapiro-Wilk-Test eine fehlende Normalverteilung fest. Dementsprechend wurden diese Subgruppen untereinander mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit Test nach Dunn analysiert (Tabelle 18). Hierbei zeigten sich für die verschiedenen Gruppen statistisch signifikante Unterschiede zwischen gesunden BALB/cJ und 6x mit CCl_4 behandelten Tieren ($p < 0,01$) sowie zwischen FVB/NJ Kontrollen und korrespondierenden Knockouts ($p < 0,001$) (Abb. 33 b). CCl_4 -behandelte Versuchstiere zeigen, abhängig von der Anzahl der Applikationen des Agens, unterschiedliche Longitudinal-Relaxationszeiten. Während der Mittelwert der T1-Zeit für 6x mit CCl_4 injizierte Versuchstiere auf 1218 ms ansteigt, weisen 12x mit CCl_4 behandelte Versuchstiere einen Wert von 1070 ms auf.

Für die Versuchstiere mit homozygotem Defekt des Phosphatidylcholin-Transporter-Gens *Abcb4* werden im Vergleich zu nicht mutierten Versuchstieren mit identischem genetischen Hintergrund ebenfalls höhere Mittelwerte von T1 gemessen.

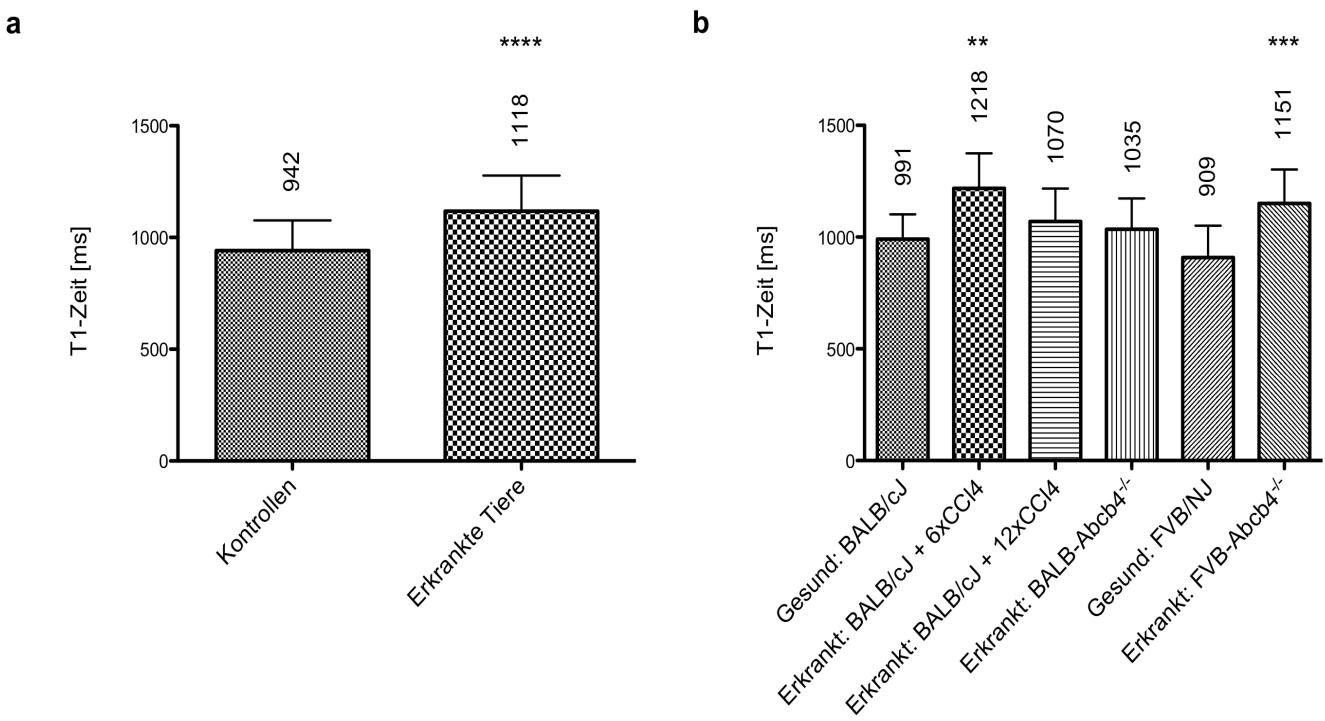


Abbildung 33: Graphische Darstellung von T1

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
**** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,0001$
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,01$
*** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,001$

Die Gruppe der BALB-*Abcb4*-Verlustmutanten zeigt dabei den insgesamt geringsten mittleren Unterschied von 44 ms (bei einer mittleren T1-Zeit von 1035 ms) zu Kontrolltieren.

Die T1-Zeit nicht von Leberfibrose betroffener FVB/NJ Mäusen beträgt 888 ms, während für FVB-*Abcb4*-Knockouts eine mittlere T1-Zeit von 1135 ms gemessen wird.

Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Mittelwert	Standardfehler	Differenz der Mittelwerte	t	Freiheitsgrade	Signifikanz	P-Wert	95% Konfidenzintervall
Kontrollen	25	941,8	26,93	-180,2	4,661	69	ja	<0,0001	-251,0 -
Erkrankte Versuchstiere	46	1118,0	23,60						

Tabelle 17: Relaxationszeit T1 der Leber für Kontrollen und erkrankte Tiere, Zweistichproben-t-Test für unverbundene Stichproben

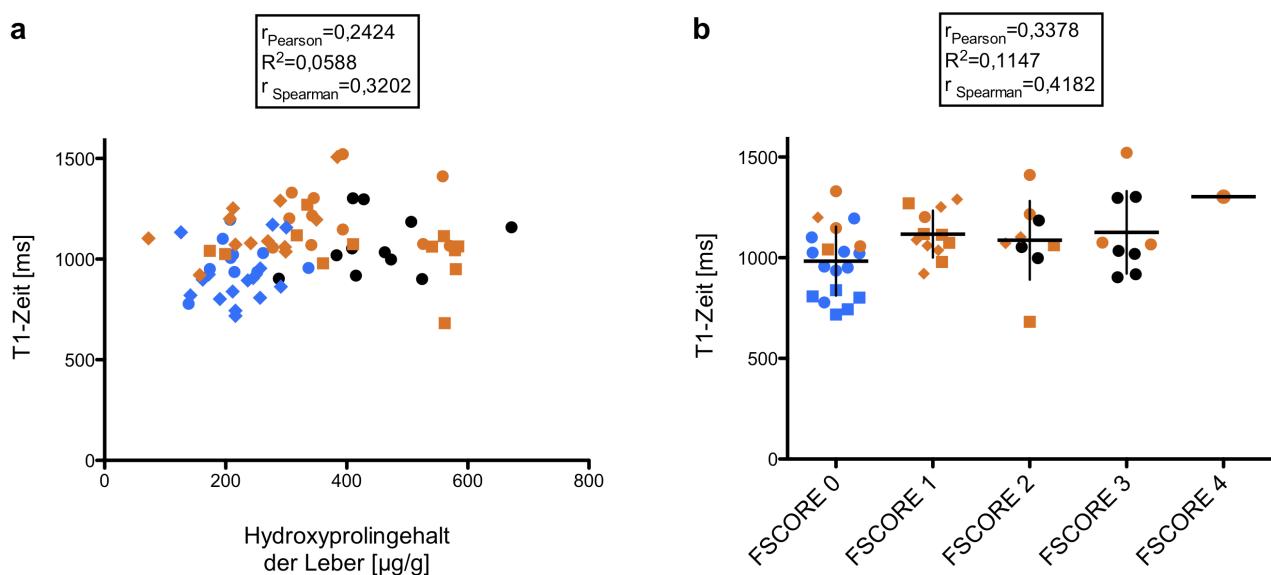
Tiergruppe	Median	„Range“	Differenz der Rangsummen gegen Kontrolle	Signifikanz gegen Kontrolle	P-Wert
BALB/cJ	981	778 - 1195	-	-	-
BALB/cJ + 6xCCl ₄	1203	1057 - 1521	-17,47	ja	<0,01
BALB/cJ + 12xCCl ₄	1034	901 - 1303	-51,65	nein	>0,05
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	1053	681 - 1270	-15,70	nein	>0,05
FVB/NJ	894	718 - 1171	-	-	-
FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	1096	921 - 1508	-16,83	ja	<0,001

Tabelle 18: Nichtparametrischer statistischer Vergleich von T1 zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen, H-Test nach Kruskal-Wallis mit Test nach Dunn

Abbildung 34: Punktwolkendiagramme und Korrelationen zwischen T1-Zeit, Hydroxyprolingehalt und Fibrofcorescore für alle Versuchstiere
a T1-Zeit vs. Hydroxyprolingehalt der Leber
b T1-Zeit vs. Fibrofcorescore

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}



Statistische Untersuchungen der Gesamtheit der Versuchstiere auf eine lineare Korrelation von T1 mit den verschiedenen erhobenen histobiochemischen Markern der

Leberfibrose, mit dem parametrischen Verfahren nach Pearson sowie dem nichtparametrischen Verfahren nach Spearman zeigen signifikante moderate positive Korrelationen der Longitudinal-Relaxationszeit mit dem Hydroxyprolingehalt und dem Fibrofcorescore (Abb. 34) sowie mit der Serumaktivität der Leberenzyme AST ($r_{Pearson}=0,3774$, $r_{Spearman}=0,4667$) und ALT ($r_{Pearson}=0,2822$, $r_{Spearman}=0,4561$).

Führt man die Untersuchung der Korrelation zwischen der Longitudinal-Relaxationszeit und histobiochemischen Markern für die unterschiedlichen Behandlungsgruppen fort, zeigen sich für beide verwendeten Testverfahren signifikante mittelstarke lineare Zusammenhänge zwischen Hydroxyprolingehalt und Fibrofcorescore für die 6x CCl₄-behandelten BALB/cJ-Tiere (Abb. 35) und zugehörige Kontrollen sowie für die FVB/NJ Tiere und FVB-Abcb4-Knockouts (Abb. 36).

Zudem zeigen sich Korrelationen der T1-Zeiten mit den Serumwerten der AP und der Transaminasen. Für die AP wird für die Gesamtheit der CCl₄-behandelten Versuchstiere und korrespondierende Kontrollen eine mittelstarke, signifikante Korrelation mit der T1-Zeit nachgewiesen ($r_{Pearson}=0,5572$, $r_{Spearman}=0,5313$). Teilt man die Messwerte nach der Anzahl der CCl₄-Injektionen auf, zeigt sich eine stärkere

Abbildung 35: Punktwolkendiagramme und Korrelationskoefizienten für T1-Zeit, Hydroxyprolingehalt und Fibrofcorescore für 6x CCl₄-behandelte Versuchstiere und Kontrollen

Legende: ● Gesund: BALB/cJ
● Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄

- a T1-Zeit vs. Hydroxyprolingehalt der Leber
b T1-Zeit vs. Fibrofcorescore

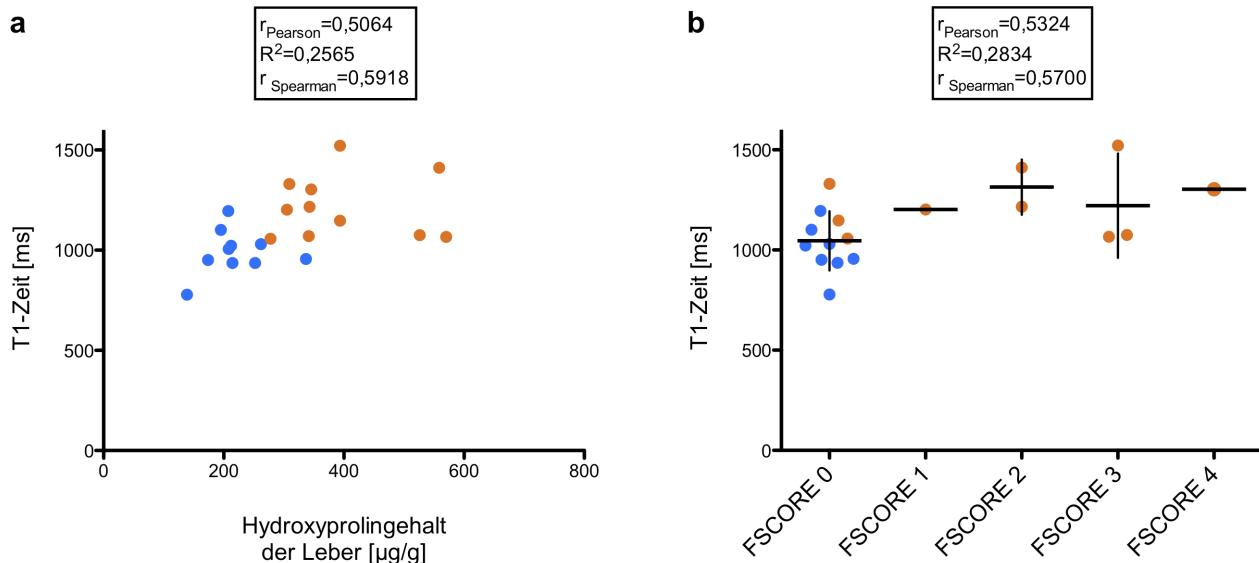
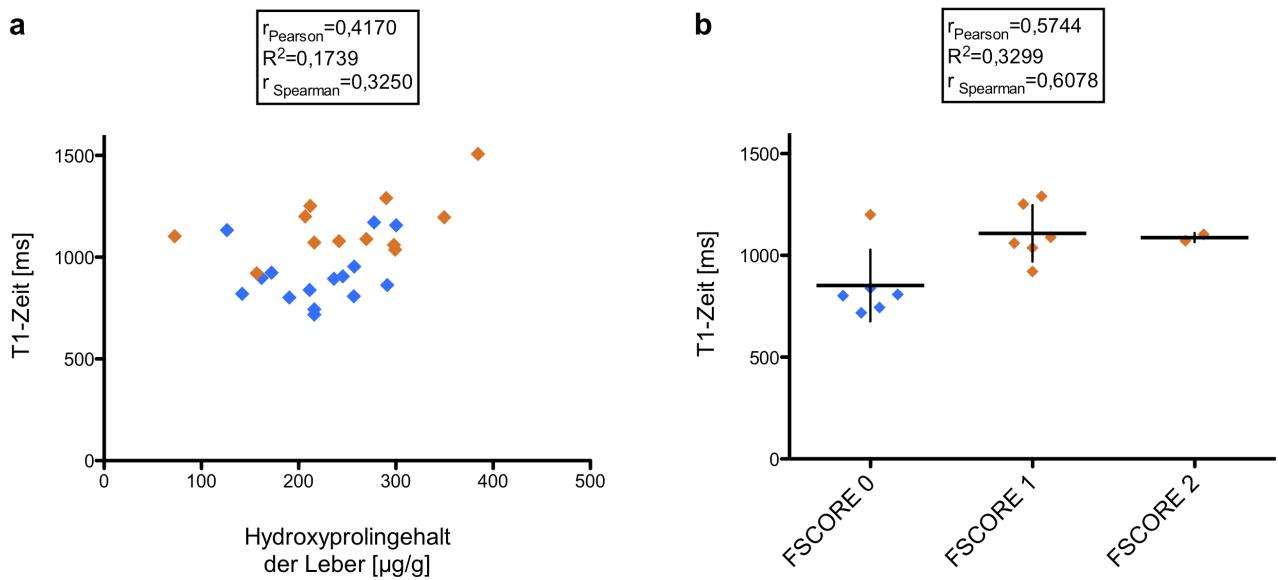


Abbildung 36: Punktwolkendiagramme und Korrelationskoeffizienten für die T1-Zeit und histologische und biochemische Parameter für FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse

- a T1-Zeit vs. Hydroxyprolingehalt
- b T1-Zeit vs. Fibrosetscore

Legende: ◆ Gesund: FVB/NJ
◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}



Korrelation für 6x behandelte Versuchstiere und Kontrollen ($r_{Pearson} = 0,6799$, $r_{Spearman} = 0,6443$), aber keine für 12x behandelte Versuchstiere. Für die Gruppen der FVB/NJ- und FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere lässt sich eine schwache bis mittelstarke Korrelation von T1 mit den Serumaktivitäten der AP ($r_{Pearson} = 0,4474$, $r_{Spearman} = 0,5154$), AST ($r_{Pearson} = 0,6064$, $r_{Spearman} = 0,6961$) und ALT nachweisen ($r_{Pearson} = 0,6149$, $r_{Spearman} = 0,7623$).

4.5.3.2. Relaxationszeit T2

Für die Transversalrelaxationszeit T2 zeigt sich ein heterogeneres Bild als für T1. Während T2 für Kontrolltiere im Mittel auf 17,34 ms bestimmt wird, ergibt sich für Fibrosetiere eine Transversalrelaxationszeit von 19,11 ms. Beide Gruppen weisen nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilte Messwerte auf. Die statistische Untersuchung der zusammengefassten Versuchstiere (Abb. 37 a) ergibt im Zweistichproben-t-Test einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen beiden Gruppen (Tabelle 19).

Bei Analyse der verschiedenen in Abb. 37 b zusammengefassten Tiergruppen zeigen sich geringe Unterschiede der Mittelwerte zwischen den einzelnen Kohorten. Dabei weisen 6x mit CCl₄ behandelte Tiere einen Mittelwert für T2 von 18,37 ms auf.

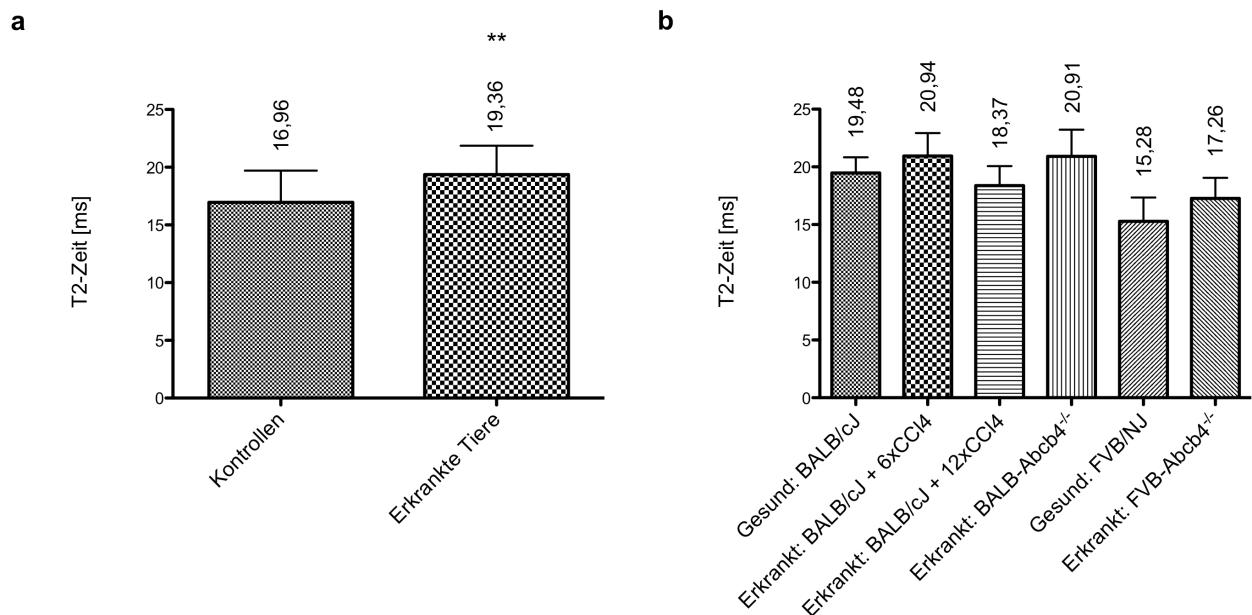


Abbildung 37: Graphische Darstellung von T2

a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren

** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, p<0,01

b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

Für unbehandelte, genetisch identische Kontrolltiere wird die mittlere T2-Zeit dagegen auf 19,61 ms bestimmt. 12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere weisen einen Mittelwert von 20,51 ms für die Transversalrelaxationszeit auf.

BALB-*Abcb4*-Knockouts zeigen von allen Tieren den höchsten T2-Mittelwert von 20,91 ms. Für die FVB-*Abcb4*-Mutanten werden im Vergleich zu FVB/NJ Mäusen ebenfalls höhere Mittelwerte von T2 gemessen (17,01 ms gegenüber 15,25 ms).

Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Mittelwert	Standardfehler	Differenz der Mittelwerte	t	Freiheitsgrade	Signifikanz	P-Wert	95% Konfidenzintervall
Kontrollen	25	16,96	0,5513						
Erkrankte Versuchstiere	46	19,36	0,3690	-2,403	3,728	69	ja	<0,01	-3,691 -1,116

Tabelle 19: Relaxationszeit T2 der Leber für Kontrollen und erkrankte Tiere, Zweistichproben-t-Test für unverbundene Stichproben

Die Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests auf die nach Ätiologie und Genotyp aufgeteilten Versuchstiergruppen zeigt eine Normalverteilung der Messwerte für alle Gruppen, mit Ausnahme der BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse.

Tiergruppe	Median	„Range“	Differenz der Rangsummen gegen Kontrolle	Signifikanz gegen Kontrolle	P-Wert
BALB/cJ	19,44	16,96 – 21,67	-	-	-
BALB/cJ + 6xCCl ₄	20,45	18,46 – 25,10	-9,600	nein	>0,05
BALB/cJ + 12xCCl ₄	18,07	15,30 – 20,76	8,945	nein	>0,05
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	20,92	15,01 – 23,65	-11,52	nein	>0,05
FVB/NJ	15,10	12,11 – 18,98	-	-	-
FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	16,86	14,84 – 21,45	-11,75	nein	>0,05

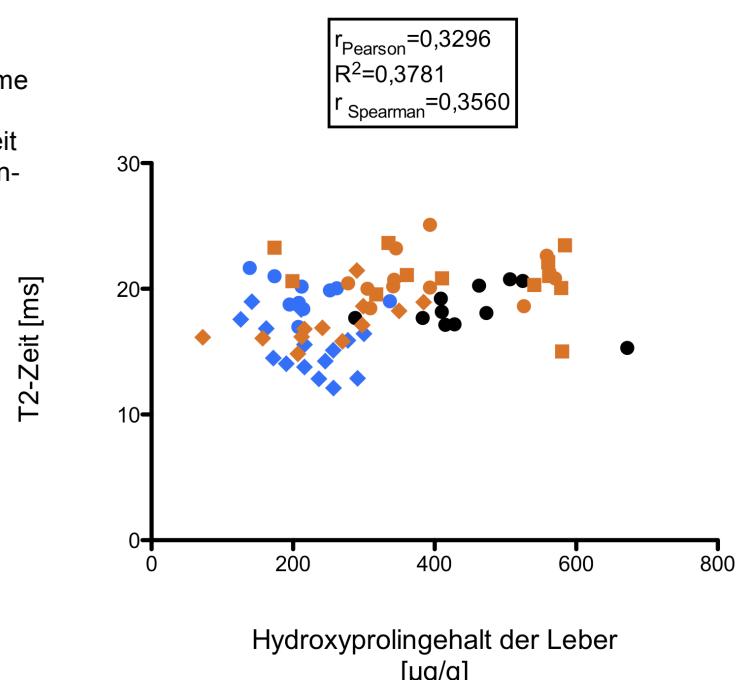
Tabelle 20: Nichtparametrischer statistischer Vergleich der T2-Zeit zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen, H-Test nach Kruskal-Wallis mit Test nach Dunn

Die Analyse der Gesamtheit der Versuchstiere auf eine lineare Korrelation zwischen der T2-Zeit und den verschiedenen histologischen und biochemischen Markern der Leberfibrose, mit dem parametrischen Verfahren nach Pearson sowie dem nichtparametrischen Verfahren nach Spearman zeigen eine geringe, gerade noch signifikant positive Korrelation der Transversal-Relaxationszeit mit dem Hydroxyprolingehalt der Leber (Abb. 38).

Abbildung 38: Punktwolkendiagramme und Korrelationskoeffizienten für die T2-Zeit und den Hydroxyprolingehalt für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}



Führt man die Untersuchung der Korrelationen zwischen T2 und histologischen und biochemischen Markern für die verschiedenen Versuchstiergruppen getrennt durch, lässt sich eine signifikante, schwache bis mittelstarke lineare Korrelation zwischen dem Fibrotescore und T2 für 6x CCl₄-behandelte Mäuse darstellen (Abb. 39).

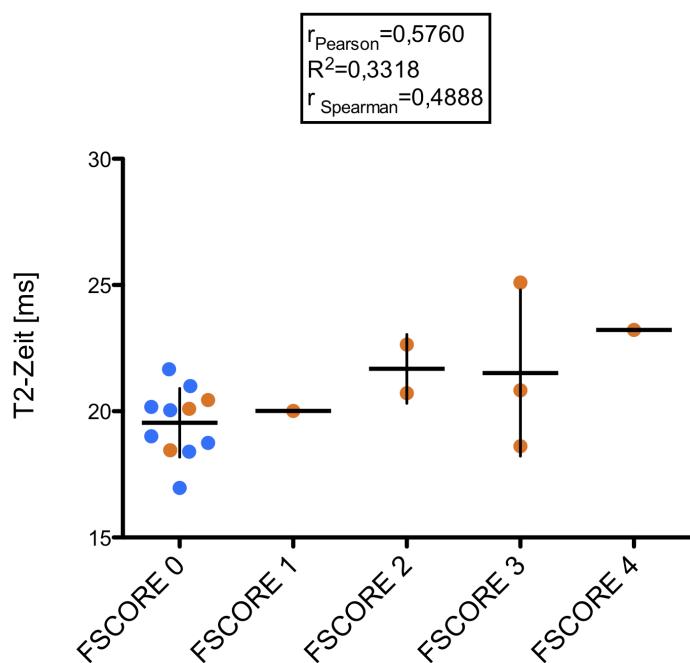
Für CCl₄-behandelte Mäuse zeigt sich eine schwache bis mittelstarke positive Korrelation von T2 mit der Serumaktivität der AP sowohl für parametrische wie auch für nicht parametrische Tests ($r_{Pearson}=0,5358$, $r_{Spearman}=0,4391$). Teilt man die Messwerte nach der Anzahl der CCl₄-Injektionen auf, lässt sich eine signifikante Korrelation für 6x und 12x behandelte Versuchstiere nach Pearson **und** Spearman nicht berechnen.

Für die Gruppe der BALB-*Abcb4*-Knockouts zeigen sich dagegen signifikante Zusammenhänge zwischen T2 und den Serumaktivitäten von AST ($r_{Pearson}=0,6570$, $r_{Spearman}=0,5736$) und ALT ($r_{Pearson}=0,5780$, $r_{Spearman}=0,5560$).

Abbildung 39: Punktwolkendiagramme und Korrelationskoeffizienten für die T2-Zeit und den Hydroxyprolingehalt für BALB/cJ und BALB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄



4.5.3.3. Relaxationszeit T2*

Neben der Longitudinal-Relaxationszeit T1 und der Transversal-Relaxationszeit T2 wurde zusätzlich zu Spin-Spin-Wechselwirkungen durch Magnetfeldinhomogenitäten beeinflusste T2*-Zeit gemessen. Die relaxometrische Bestimmung von T2* ergab für erkrankte Mäuse mit 7,97 ms einen im Vergleich zu gesunden Tieren (7,26 ms) geringfügig erhöhten Messwert (Abb 40). Die statistische Analyse mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab für gesunde Kontrolltiere eine Normalverteilung der Messwerte,

während für die Gruppe der erkrankten Tiere keine Normalverteilung vorliegt. Für die statistische Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde daher der Mann-Whitney-U-Test (Tabelle 21) ausgewählt. Dabei kann die Nullhypothese nicht verworfen werden, es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchstiergruppen.

Beurteilt man die verschiedenen Tiermodelle der Leberfibrose getrennt nach ihren Ätiologien und Genotypen, lässt sich $T2^*$ für unbehandelte BALB/cJ Mäuse auf 8,99 ms bestimmen. 6x CCl₄-behandelte Mäuse zeigen mit 7,52 ms dagegen einen deutlich geringeren Mittelwert für $T2^*$. Für 12x CCl₄ -behandelte versuchstiere wird dagegen eine zwischen beiden Werten liegende $T2^*$ -Zeit von 8,11 ms gemessen.

Für beide Tiermodelle mit Defekt des Abcb4-Gens zeigen sich im Vergleich zu Kontrolltieren höhere Werte für die $T2^*$ -Zeit. Für BALB/cJ Mäuse ist der Unterschied allerdings relativ gering ausgeprägt.

Tiergruppe	Median	„Range“	Rangsumme	Mann-Whitney-U-Wert	Signifikanz gegen Kontrolle	P-Wert
Kontrollen	6,89	4,96 - 9,59	747	422,0	nein	>0,05
Erkrankte Versuchstiere	7,79	5,60 -11,35	1809			

Tabelle 21: Relaxationszeit $T2^*$ der Leber für Kontrollen und erkrankte Tiere, Mann-Whitney-U-Test

Diese Tiergruppe weist eine $T2^*$ -Zeit von 9,21 ms auf. Für FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere fällt dieser Unterschied mit $T2^*$ -Zeiten von 6,11 ms gegenüber 7,01 ms deutlicher aus. Die Analyse der nach den verschiedenen Krankheitsbildern und Mausstämmen aufgeteilten Messwerte mit dem Shapiro-Wilk-Test zeigt eine Normalverteilung für alle sechs Gruppen.

Untersucht man weiter mit dem einfaktoriellen ANOVA auf signifikante Unterschiede (Tabelle 22), lassen sich diese zwischen unbehandelten BALB/cJ Mäusen und sowohl 6x als auch 12x mit CCl₄ behandelten Versuchstieren des gleichen Stamms nachweisen ($p<0,001$ bzw. $p<0,05$). Ebenso gelingt dies für FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse ($p<0,05$). Untersucht man die Korrelationen zwischen den gemessenen $T2^*$ -Zeiten und den bestimmten histologischen und biochemischen Parametern durch Anwendung parametrischer und nichtparametrischer Verfahren zur Bestimmung des Korrelationskoeffizienten, so zeigen sich für die Gesamtheit aller Versuchstiere

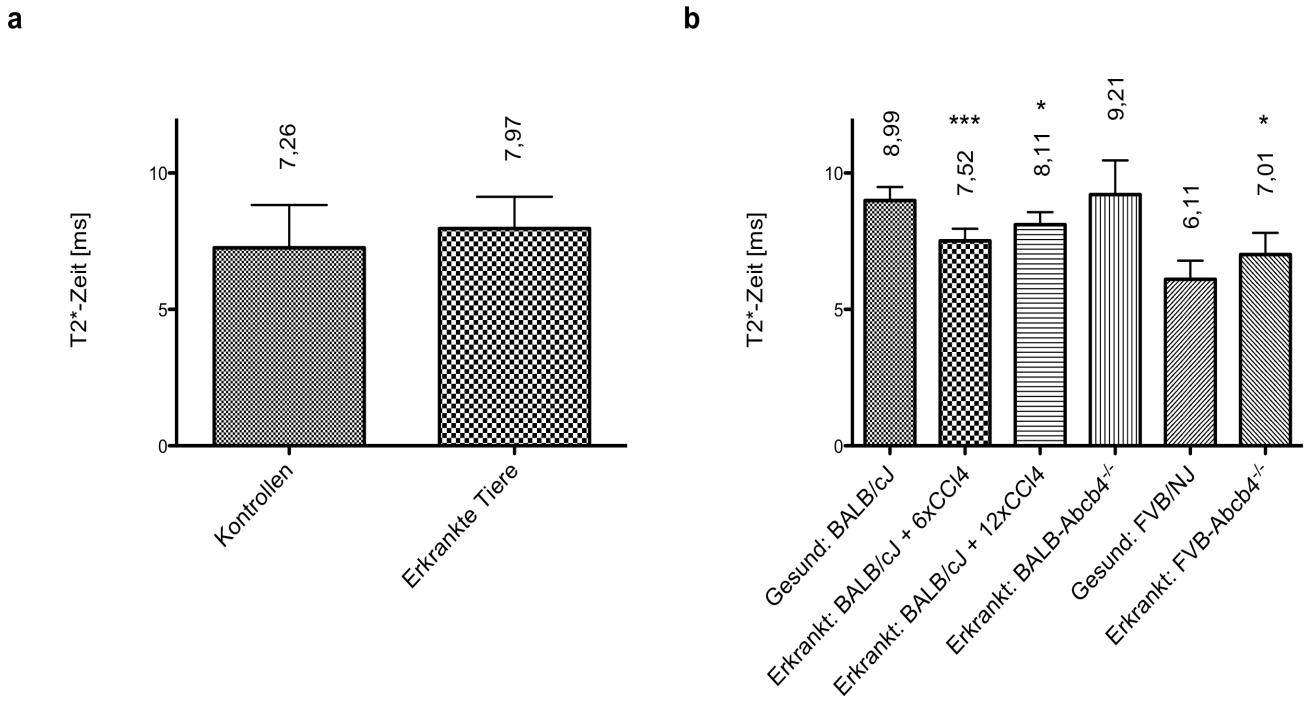


Abbildung 40: Graphische Darstellung von $T2^*$

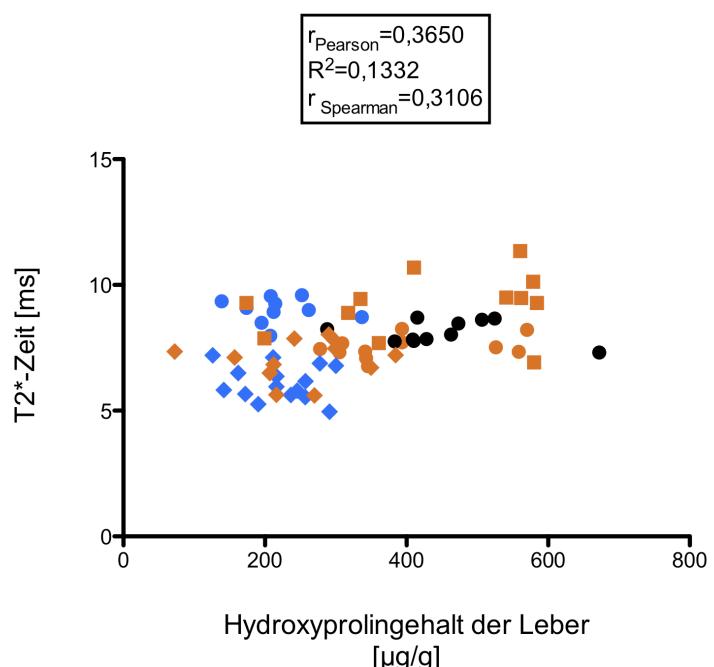
- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollen im Vergleich zu allen Fibrosetieren ($p>0,05$)
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
 - * Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,05$
 - *** Signifikanter Unterschied zu Kontrollen, $p<0,001$

Führt man diese Untersuchungen nach den verschiedenen Ätiologien und Genotypen aufgeteilt durch, kann für Versuchstiere ohne funktionierendes *Abcb4*-Gen und ihre Kontrollen keine signifikante Korrelation gezeigt werden. Für CCl_4 -behandelte Versuchstiere kehrt sich die Korrelation mit dem Hydroxyprolingehalt in eine negative mäßige um (Abb. 42). Zusätzlich werden signifikante negative Korrelationen mit dem Fibrotescore beobachtet.

Abbildung 41: Positive Korrelation zwischen $T2^*$ und dem Hydroxyprolingehalt für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6x CCl_4
- Erkrankt: BALB/cJ + 12x CCl_4
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}



Tiergruppe	Anzahl an Werten n	Mittelwert	Standardfehler	Differenz der Mittelwerte	t	Signifikanz	P-Wert	95% Konfidenzintervall
BALB/cJ	10	8,99	0,1573	-	-	-	-	-
BALB/cJ + 6x CCl ₄	11	7,52	0,1329	1,476	4,473	ja	<0,001	0,6284 - 2,324
BALB/cJ + 12x CCl ₄	11	8,11	0,1379	0,8821	2,673	ja	<0,05	0,03435 - 1,730
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	12	9,21	0,3691	-0,2170	0,6712	nein	>0,05	-1,048 - 0,6137
FVB/NJ	15	6,11	0,1758	-	-	-		-1,653 - -0,1498
FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	12	7,01	0,2308	-0,9013	3,081	ja	<0,5	0,6284 - 2,324

Tabelle 22: Relaxationszeit T2* der Leber, einfaktorieller ANOVA der verschiedenen nach Ätiologie unterteilten Versuchgruppen

Für 12x CCl₄-behandelte Versuchstiere und Kontrollen werden dabei stärkere Korrelationen beobachtet als für 6x injizierte Mäuse. Für die Serumwerte der Enzyme AP, AST und ALT lassen sich signifikante Korrelationen mit der T2*-Zeit feststellen. Für die Gesamtheit der CCl₄-behandelten Tiere und Kontrollen wird eine signifikant negative Korrelation mit der Serumaktivität der AP bestimmt ($r_{Pearson}=-0,5844$, $r_{Spearman}=-0,6403$). Teilt man die Messwerte nach der Anzahl der CCl₄-Injektionen auf, verstärkt sich diese Korrelation für 6x CCl₄-behandelter Tiere und Kontrollen ($r_{Pearson}=-0,7010$, $r_{Spearman}=-0,6732$), während für die T2*-Zeit 12x injizierter Mäuse und unbehandelter Mäuse keine signifikante Korrelation beobachtet wird.

Abbildung 42: Negative Korrelationen zwischen T2* und dem Hydroxyprolingehalt unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
$r_{Pearson}$	-0,4591	-0,5635	-0,6447
R^2	0,2107	0,3175	0,4156
$r_{Spearman}$	-0,4460	-0,6268	-0,5558

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

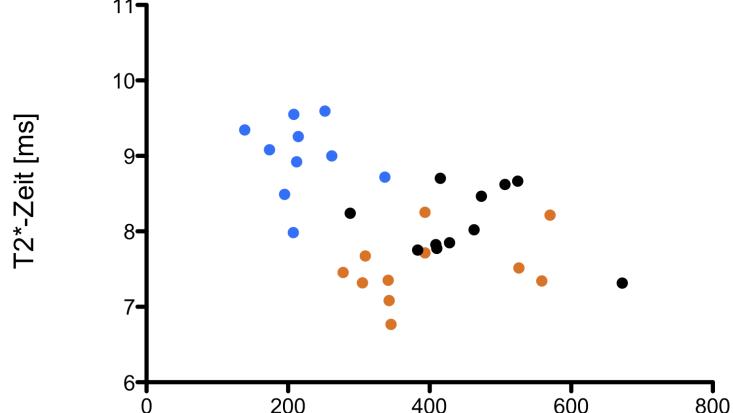
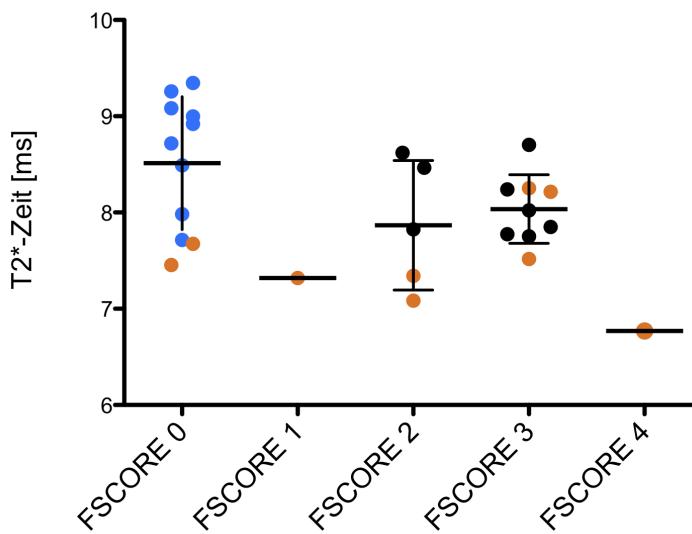


Abbildung 43: Negative Korrelationen zwischen T2* und dem Fibroescore un behandelter und CCl₄- behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

Parameter	Alle CCl ₄ - behandelten Tiere	6x CCl ₄ - behandelte Tiere	12x CCl ₄ - behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,4443	-0,5658	-0,6955
R ²	0,1974	0,3201	0,4837
r _{Spearman}	-0,3688	-0,5971	-0,6995



4.5.4. Zusammenfassung der relaxometrischen Untersuchungen

Tabelle 23 stellt die Ergebnisse der Relaxationszeitmessungen zusammenfassend dar.

Tabelle 23:
Relaxationszeiten der verschiedenen Versuchstiergruppen in Millisekunden

Tiergruppe	T1	T2	T2*
Kontrollen gesamt	942	16,96	7,26
BALB/cJ-Kontrollen	991	19,48	8,99
FVB/NJ-Kontrollen	909	15,28	6,11
Erkrankte Tiere gesamt	1118	19,36	7,97
6x CCl ₄ -behandelte BALB/cJ-Tiere	1218	20,94	7,52
12x CCl ₄ -behandelte BALB/cJ-Tiere	1070	18,37	8,11
BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-} -Tiere	1035	20,91	9,21
FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-} -Tiere	1151	17,26	7,01

Tabelle 24 faßt die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen der Relaxationszeitmessungen zur Übersicht zusammen.

Tiergruppe	Kontrollen vs.erkrankte Tiere	BALB/cJ vs. CCl ₄ gesamt	BALB/cJ vs. 6x CCl ₄	BALB/cJ vs. 12x CCl ₄	BALB/cJ vs. BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	FVB/NJ vs. FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}
T1	<0,0001	<0,05	<0,01	>0,05	>0,05	<0,001
T2	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T2*	>0,05	<0,0001	<0,001	<0,05	>0,05	<0,05

Tabelle 24: Signifikanz der Unterschiede der Relaxationszeiten zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen

Blau: Signifikant höherer Wert für erkrankte Tiere

Rot: Signifikant niedrigerer Wert für erkrankte Tiere

Die nach Pearson berechneten Korrelationskoeffizienten für die Relaxationszeiten und Hydroxyprolingehalt und Fibroescore sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tiergruppe	Histologie	Kontrollen und erkrankte Tiere	BALB/cJ und alle CCl ₄ - Tiere	BALB/cJ und 6x CCl ₄	BALB/cJ und 12x CCl ₄	BALB/cJ und BALB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}	FVB/NJ und FVB- <i>Abcb4</i> ^{-/-}
T1	Hydroxy- prolingehalt	0,2424	0,3153	0,5064	0,3655	-0,0172	0,4170
		0,3202	0,3045	0,5918	0,2312	0,1135	0,3250
	Fibroescore	0,3378	0,2940	0,5324	0,2943	-0,0829	0,5744
		0,4182	0,2304	0,5700	0,1676	0,2134	0,6078
T2	Hydroxy- prolingehalt	0,3296	-0,0817	0,3034	-0,3763	0,0437	0,1576
		0,3560	-0,0156	0,3183	-0,2346	0,0920	0,1216
	Fibroescore	0,1760	0,0773	0,5760	-0,4323	0,2791	0,3025
		0,1238	-0,0395	0,4888	-0,4322	0,3752	0,4947
T2*	Hydroxy- prolingehalt	0,3650	-0,4591	-0,5635	-0,6447	0,2328	0,1071
		0,3106	-0,4460	-0,6268	-0,5558	0,2490	0,1155
	Fibroescore	-0,0101	-0,4443	-0,5658	-0,6955	0,3770	0,1793
		-0,0020	-0,3688	-0,5971	-0,6995	0,5049	0,2780

Tabelle 25: Korrelationskoeffizienten nach Pearson (obere Reihe) und Spearman (untere Reihe) für Relaxationszeiten und Hydroxyprolingehalt und Fibroescore der verschiedenen Versuchstiergruppen

Blau: Signifikante positive Korrelation

Rot: Signifikante negative Korelation

4.5.5. Messungen an Bilddaten MR-tomographischer Untersuchungen

4.5.5.1. T1-gewichtete Bildgebung

4.5.5.1.1. Signalintensitäten

Für gesunde Tiere wird in T1-gewichteten MRT-Aufnahmen der Leber eine mittlere Signalintensität von 120,22 willkürlichen Einheiten gemessen. Bei erkrankten Versuchstieren wird die mittlere Signalintensität der Leber auf 126,23 willkürliche Einheiten bestimmt. Die Testung beider Tiergruppen mit dem Shapiro-Wilk-Test ergibt eine Normalverteilung von Messwerten der Gruppe der gesunden Kontrolltiere, während die für die Gruppe der erkrankten Tiere bestimmten Signalintensitäten nicht normal verteilt sind. Die statistische Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Signalintensitäten der T1-gewichteten Bildgebung erfolgte daher mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dabei ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 44). Teilt man die Messwerte nach den verschiedenen Krankheitsmodellen und Tierstämmen auf, zeigen sich für die bestimmten Signalintensitäten Unterschiede.

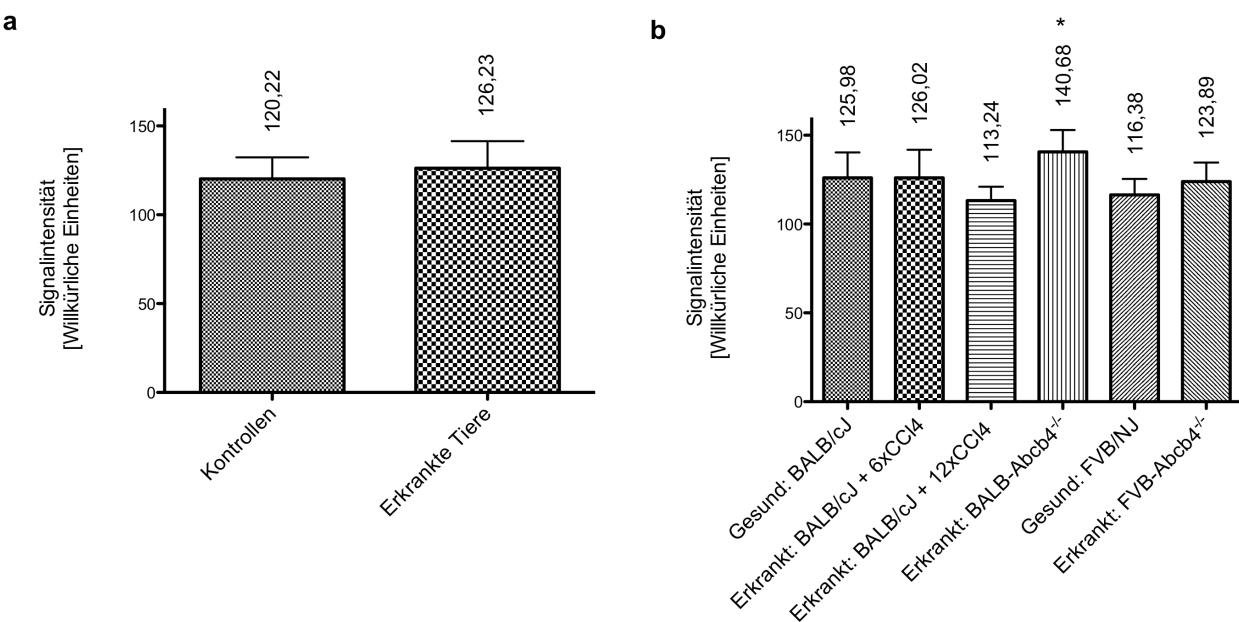


Abbildung 44: Vergleich der Signalintensitäten (T1-Bilder) für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere
a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
* Nur für BALB-Abcb4^{-/-} Versuchstiere besteht ein signifikanter Unterschied der Signalintensitäten zu gesunden BALB/cJ-Tieren ($p < 0,05$)

Während sich die mittlere Signalintensität für 6xCCl₄-behandelte Tiere kaum von unbehandelten BALB/cJ Mäusen unterscheidet (125,98 im Vergleich zu 126,02 willkürliche Einheiten), weisen 12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere einen niedrigeren Mittelwert von 113,24 willkürlichen Einheiten auf. Für Versuchstiere ohne

funktionierendes *Abcb4*-Gen liegen die Messwerte dagegen höher als für Kontrolltiere. Für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse wird eine mittlere Signalintensität der Leber von 140,68 willkürlichen Einheiten gemessen. Für FVB/NJ-Tiere wird dieser Wert auf 116,38 willkürliche Einheiten bestimmt, während er für FVB-*Abcb4*^{-/-} Genotypen 123,89 willkürliche Einheiten beträgt.

Bei Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests auf die verschiedenen Untergruppen zeigt sich für die Signalintensitäten eine Normalverteilung für jede der getrennt untersuchten Kohorten. Die Überprüfung der verschiedenen Mittelwerte der Signalintensitäten zwischen den einzelnen Tiermodellen mit dem einfaktoriellen ANOVA zeigte für BALB/cJ Kontrollen und BALB-*Abcb4*^{-/-} Mutanten einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$); für alle anderen untersuchten Paare konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden.

4.5.5.1.2.Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Aus den Messungen der Signalintensitäten und des Rauschens lässt sich für die T1-gewichtete Bildgebung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) berechnen. Für die Gesamtheit gesunder Kontrollen beträgt dieser Wert 32,47. Für die Zusammenfassung der erkrankten Versuchstiere wird ein Wert von 31,40 relativen Einheiten bestimmt (Abb. 45). Im Shapiro-Wilk-Test kann für beide Gruppen eine Normalverteilung nachgewiesen werden. Wendet man den Zweistichproben-t-Test zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede auf beide Gruppen an, kann die Nullhypothese nicht widerlegt werden. Es liegt also kein signifikanter Unterschied vor.

Bei der nach Ätiologie und Genotyp getrennten Betrachtung der verschiedenen Versuchstiergruppen zeigen sich deutlichere Unterschiede. Höchste Werte für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis liefern die Berechnungen für BALB/cJ und FVB/NJ Kontrolltiere mit 34,57 bzw. 31,11. Für die erkrankten Tiere werden geringere Werte berechnet. Für Versuchstiere ohne funktionierendes *Abcb4*-Gen sind die Unterschiede zu den Kontrolltieren am geringsten. Für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse wird ein SNR von 34,27 berechnet, während dieser Wert für FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere 30,92 beträgt. Für 6x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere wird ein SNR von 33,24 bestimmt, während 12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere mit 26,95 den geringsten Wert aufweisen. Die Analyse mit dem Shapiro-Wilk-Test zeigt, dass für alle Untergruppen eine Normalverteilung der Werte vorliegt. Wendet man den einfaktoriellen ANOVA an, kann für das SNR für T1-gewichtete MRT-Aufnahmen ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten

BALB/cJ Mäusen und 12x mit CCl₄ behandelten Tieren des gleichen Tierstammes nachgewiesen werden ($p<0,01$).

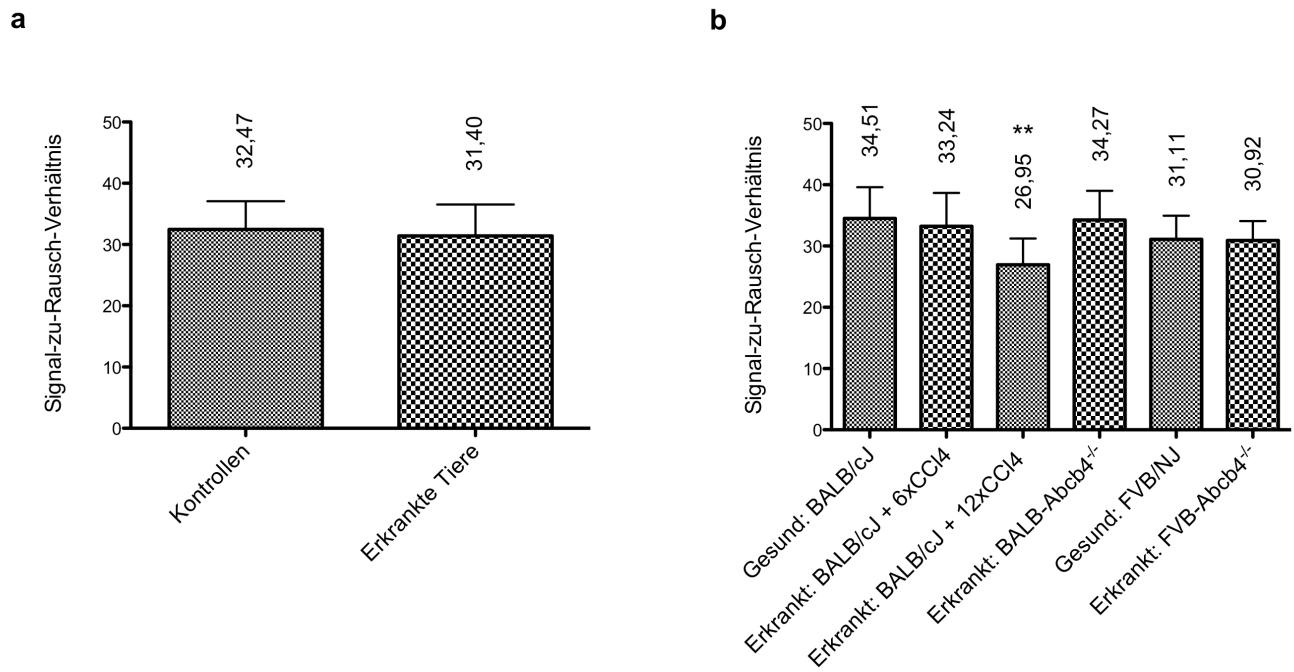


Abbildung 45: Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnisses für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

** Signifikanter Unterschied zwischen gesunden BALB/cJ-Mäusen und 12x mit CCl₄ behandelten Versuchstieren des gleichen Stamms

4.5.5.1.3. Korrelationen zwischen Histologie und Biochemie und Messgrößen aus der MRT-Untersuchung

Mit Hilfe parametrischer und nichtparametrischer Verfahren wurden Korrelationskoeffizienten für die Signalintensität (SI) und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) der T1-gewichteten MRT und die Ergebnissen der histologischen und biochemischen Charakterisierung der Versuchstiere berechnet.

Untersucht man die Gesamtheit der Versuchstiere, so lässt sich für die Signalintensität (SI) keinerlei Korrelation nachweisen. Für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis kann dagegen für die Gesamtheit der Versuchstiere eine schwache, positive Korrelation mit dem Fibrosescore identifiziert (Abb. 46) werden. Untersucht man die verschiedenen Untergruppen auf eine Korrelation zwischen SI, Hydroxyprolingehalt und Fibrosescore, kann allein für BALB-Abcb4^{-/-} Tiere und nichterkrankte Kontrollen ein signifikanter positiver linearer Zusammenhang erkannt werden (Abb. 47). Beim Vergleich des SNR mit diesen beiden Fibrosemakern kann weder für BALB- noch für FVB-Abcb4-Knockouts eine signifikante Korrelation festgestellt werden.

Abbildung 46: Schwache positive Korrelation des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit dem Fibrotescore für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

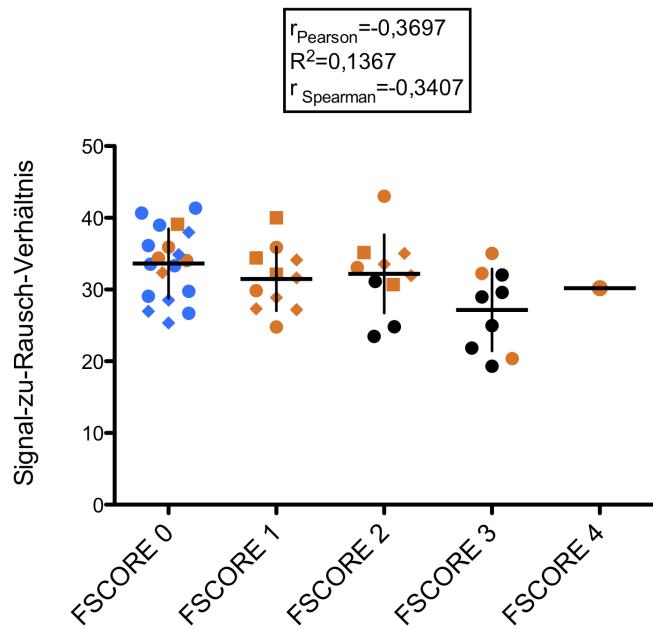
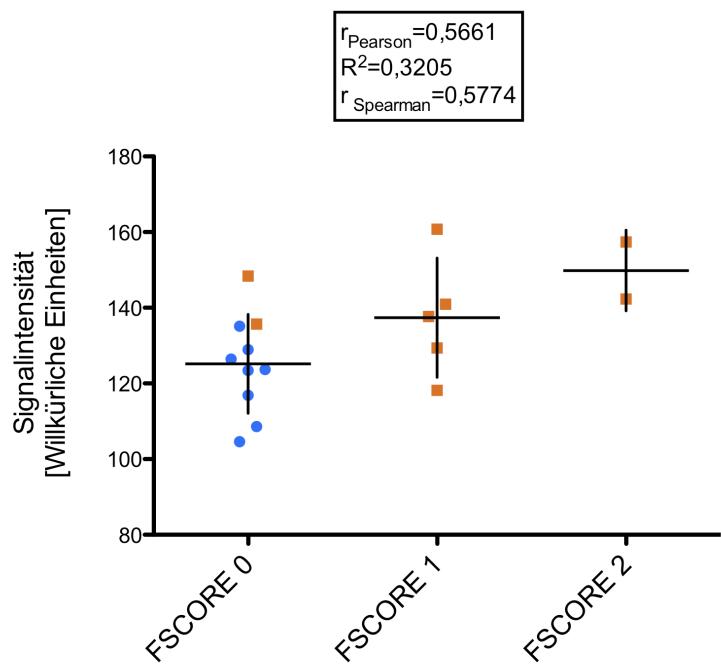


Abbildung 47: Mittlere positive Korrelation der Signalintensität für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse und Kontrollen mit dem Fibrotescore

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}



Führt man die Untersuchungen nach Versuchsgruppen und Krankheitsmodellen getrennt weiter, finden sich für Hydroxyprolingehalt und Fibrotescore nur bei CCl₄-behandelten Tieren und Kontrollen signifikante negative schwache bis mittlere Korrelationen (Abb. 47 und 48). Für die Serumwerte der Enzyme AP, AST und ALT lassen sich signifikante Korrelationen mit der Signalintensität für *Abcb4*-Knockouts

Abbildung 48: Moderate bis mittelstarke Korrelationen des SNR für CCl₄-behandelte Mäuse und Kontrollen mit dem

- a Fibroflescore
- b Hydroxyprolingehalt

Legende:

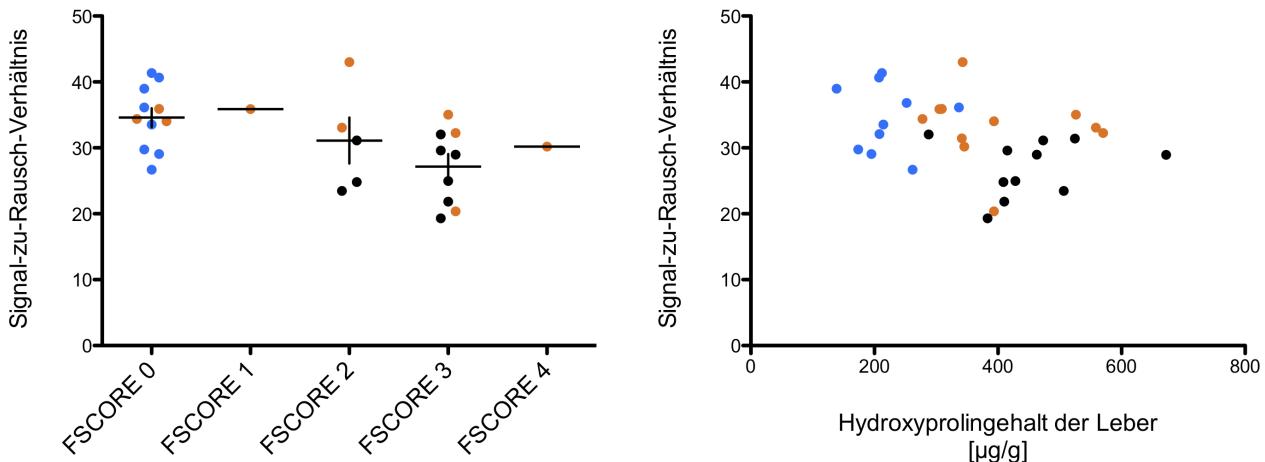
- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

a

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,4989	-0,2904	-0,6439
R ²	0,3331	0,0843	0,4146
r _{Spearman}	-0,5127	-0,2332	-0,6104

b

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,3541	-0,1692	-0,5135
R ²	0,2888	0,0264	0,2636
r _{Spearman}	-0,3963	-0,1364	-0,5416



feststellen. Für BALB/cJ-*Abcb4*^{-/-} Mäuse und Kontrollen wird für die ALT eine mittlere positive Korrelation mit der SI berechnet ($r_{Pearson}=0,5474$, $r_{Spearman}=0,6923$). Für FVB/NJ und FVB- *Abcb4*^{-/-} Tiere kann eine etwas schwächerer linearer Zusammenhang zwischen der SI und der Aktivität der AP nachgewiesen werden ($r_{Pearson}=0,4982$, $r_{Spearman}=0,4689$). Für alle CCl₄-behandelten Tiere und Kontrollen werden dagegen signifikante schwache bis mittelstarke negative Korrelationen mit den Serumaktivitäten von AST ($r_{Pearson}=-0,5374$, $r_{Spearman}=-0,4544$) und ALT ($r_{Pearson}=-0,5771$, $r_{Spearman}=-0,5583$) bestimmt. Teilt man die Messwerte nach der Anzahl der CCl₄-Injektionen auf, werden für 12x CCl₄-behandelte Tiere und Kontrollen vergleichbare Koeffizienten berechnet. Für 6x injizierte Mäuse und unbehandelte Tiere wird keine signifikante Korrelation mehr bestimmt.

4.5.5.2. Intermediär gewichtete Bildgebung

4.5.5.2.1. Signalintensitäten

Für die Gruppe der gesunden Kontrollen wird in der intermediär gewichteten MRT eine mittlere Signalintensität der Leber von 100,05 willkürlichen Einheiten gemessen, während für erkrankte Tiere ein Mittelwert von 106,8 willkürlichen Einheiten bestimmt wird. Im Shapiro-Wilk-Test zeigen die Messwerte beider Versuchstiergruppen eine Normalverteilung. Bei statistischer Analyse der Signalintensitäten mit dem Zweistichproben-t-Test zeigt sich zwischen der Gesamtheit gesunder Kontrolltiere und den in einer Gruppe zusammengefassten Versuchstieren mit Leberfibrose verschiedener Genese ein nur geringer, nicht signifikanter Unterschied (Abb. 49 a).

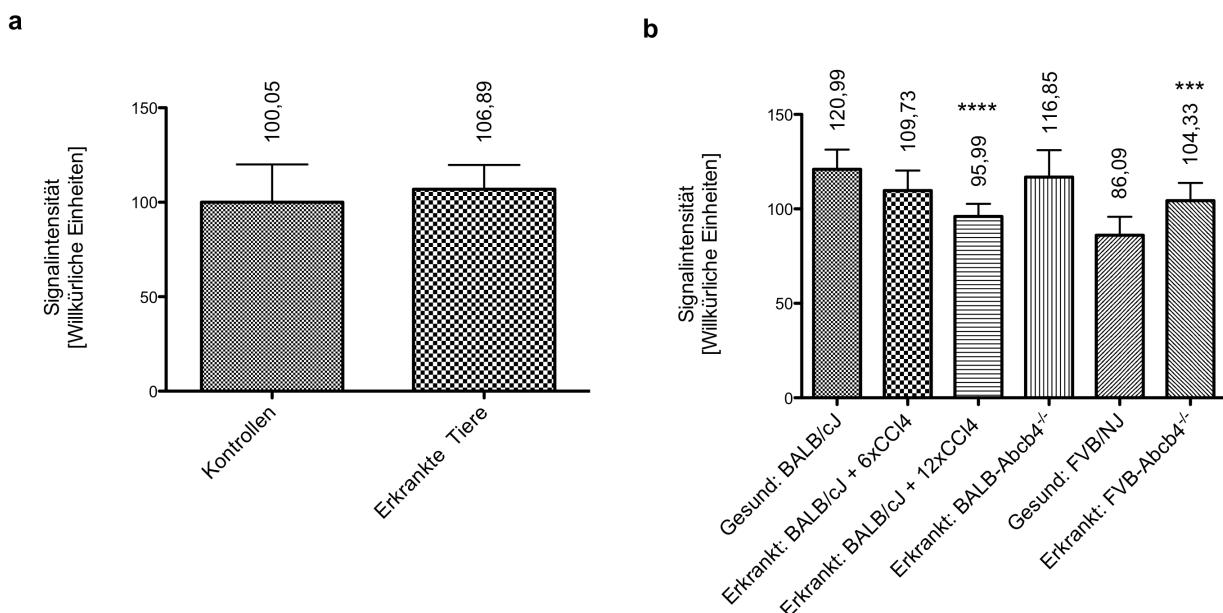


Abbildung 49: Vergleich der Signalintensitäten für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
 - b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
- **** Signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen unbehandelten und 12x mit CCl₄ injizierten BALB/cJ-Mäusen, p<0,0001
- *** Signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen FVB/NJ- und FVB-Abcb4^{-/-} Mäusen, p<0,001

Trennt man die Versuchstiere nach ihrem genetischen Hintergrund bzw. der Ätiologie ihrer Lebererkrankung auf (Abb. 49 b), zeigen sich zum Teil sehr unterschiedliche Werte für die mittlere Signalintensität der Leber. Für gesunde BALB/cJ Mäuse wird ein Wert von 120,99 willkürlichen Einheiten bestimmt. 6x CCl₄-behandelte Versuchstiere weisen dagegen mit 109,73 willkürlichen Einheiten eine deutlich niedrigere Signalintensität auf, die sich für 12x mit Tetrachlorkohlenstoff behandelte Versuchstiere

auf 95,99 willkürliche Einheiten verringert. BALB/cJ Tiere mit inaktivierten *Abcb4*-Genen zeigen eine im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren des gleichen Genotyps fast identische Signalintensität von 116,85 willkürlichen Einheiten. Messungen an FVB/NJ Tieren bestimmen dagegen mit 86,09 willkürlichen Einheiten einen sehr niedrigen Signalintensitätswert. Die mittleren Messwerte der Signalintensität der Leber für FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere liegen mit 104,33 willkürlichen Einheiten deutlich höher. Führt man mit den nach Krankheitsmodell und Genotyp aufgetrennten Versuchstiergruppen den Shapiro-Wilk-Test durch, zeigt sich für alle Kohorten eine Normalverteilung der Messwerte. Die statistische Analyse mit dem einfaktoriellen ANOVA identifiziert für die mittleren Signalintensitäten einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten BALB/cJ Mäusen und 12x mit CCl₄ injizierten Versuchstieren des gleichen Stamms ($p<0,0001$). Auch für FVB/NJ- und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse wird ein signifikanter Unterschied berechnet ($p<0,001$).

4.5.5.2.2.Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Aus den Messwerten der intermediär gewichteten MRT für die Signalintensität in der Leber und für das Hintergrundrauschen wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechnet. Für die Gesamtheit der gesunden Kontrolltieren wurde ein Wert von 27,30 bestimmt (Abb. 50 a). Für die Gruppe aller erkrankten Mäuse wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf 26,18 berechnet. Prüft man beide Gruppen von Messungen mit dem Shapiro-Wilk-Test, werden die Werte der Kontrollen als normalverteilt erkannt, die der erkrankten Tiere dagegen nicht. Durch die Anwendung des Mann-Whitney-Tests kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Prüfgruppen festgestellt werden.

Ordnet man die für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechneten Werte den entsprechenden Ätiologien und Genotypen zu und bestimmt deren Mittelwerte, ergibt sich ein der reinen Signalintensitätsmessung sehr ähnliches Bild (Abb. 50 b). BALB/cJ Kontrolltiere weisen dabei mit 34,71 den höchsten Wert für das SNR auf. Für 6x bzw. 12x mit CCl₄-behandelte Versuchstiere werden deutlich niedrigere Werte von 27,48 bzw. 22,69 berechnet, während BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 29,14 aufweisen. Das SNR für FVB/NJ Mäuse und FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere liegt dagegen mit 22,61 bzw. 25,23 ungefähr auf dem Niveau der mit CCl₄ injizierten Mäuse.

Wendet man den Shapiro-Wilk-Test auf die verschiedenen Untergruppen der Versuchstiere an, zeigt sich für alle, bis auf die gesunden FVB/NJ Mäuse, eine Normalverteilung der Messwerte. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test mit

Prüfgruppenangleichung nach Dunn lässt sich ein signifikanter Unterschied im Signal-zu-Rausch-Verhältnis zwischen gesunden BALB/cJ Mäuse und 12x mit CCI4 behandelte Versuchstieren nachweisen.

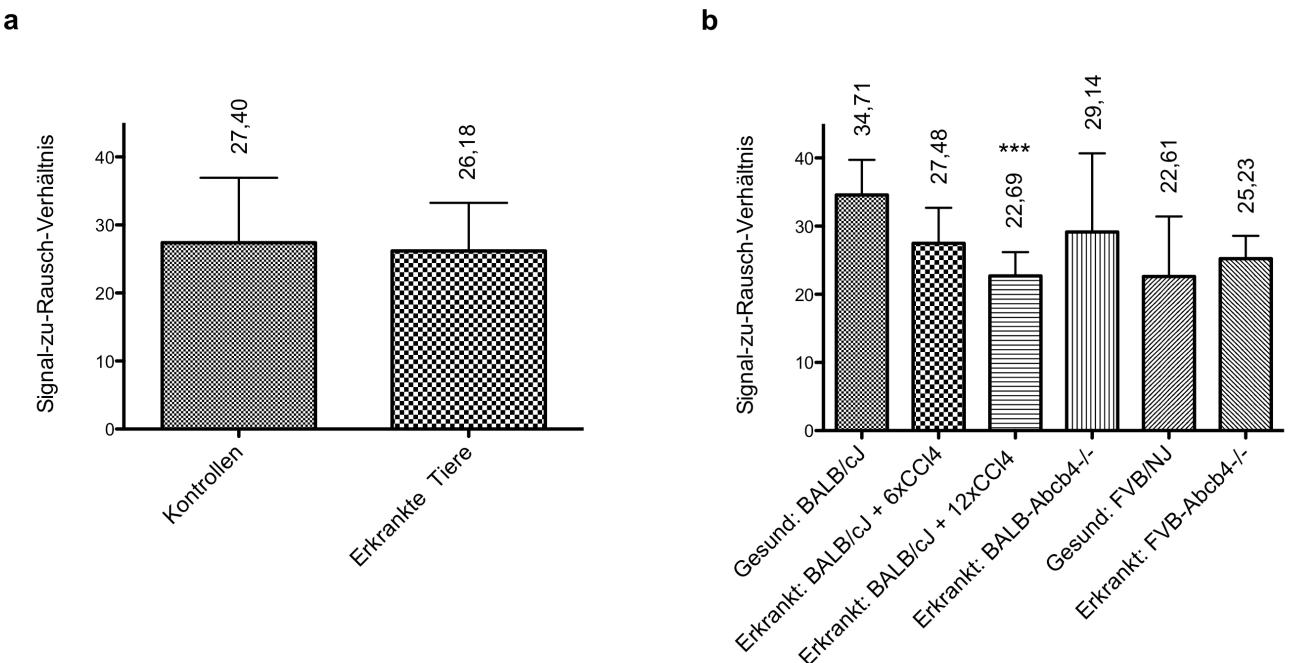


Abbildung 50: Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnisses für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

*** Signifikanter Unterschied zu unbehandelten BALB/cJ-Mäusen, $p < 0,001$

4.5.5.2.3. Korrelationen zwischen histologischen und biochemischen Parametern, Signalintensität und Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Untersucht man die Zusammenhänge zwischen der Signalintensität (SI) oder dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR), den Serumaktivitäten von AST, ALT und AP, dem Fibrotescore und dem Hydroxyprolingehalt der Leber unabhängig vom zugrunde liegenden Genotyp oder Krankheitsmodell mit Hilfe parametrischer und nicht parametrischer Tests auf Zusammenhänge, lassen sich keine signifikanten linearen Korrelationen feststellen. Eine Analyse auf Ebene der verschiedenen Versuchstiergruppen zeigt dagegen für CCl₄-behandelte Tiere mittlere Korrelationen mit der Signalintensität (Abb. 51 und 52) und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Abb.

Abbildung 51: Negative Korrelationen zwischen der Signalintensität und dem Hydroxyprolingehalt der Leber unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,5056	-0,3970	-0,6747
R ²	0,2557	0,1572	0,4552
r _{Spearman}	-0,5532	-0,4852	-0,6286

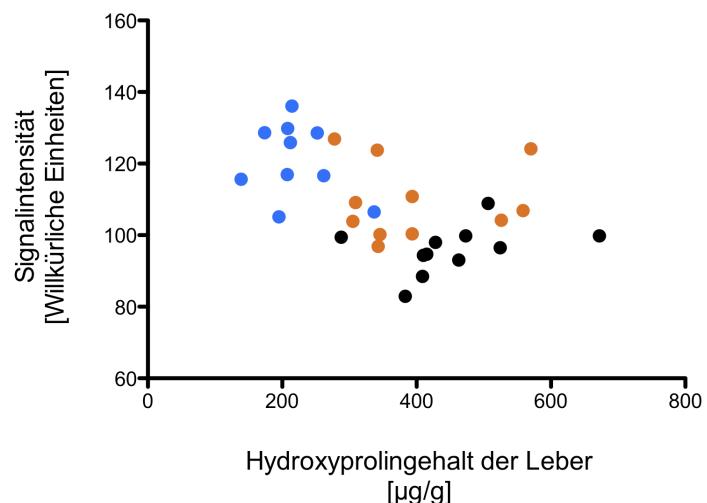


Abbildung 52: Negative Korrelationen zwischen der Signalintensität und dem FibroScore unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,5990	-0,3840	-0,8134
R ²	0,3588	0,1475	0,6616
r _{Spearman}	-0,6238	-0,4546	-0,8325

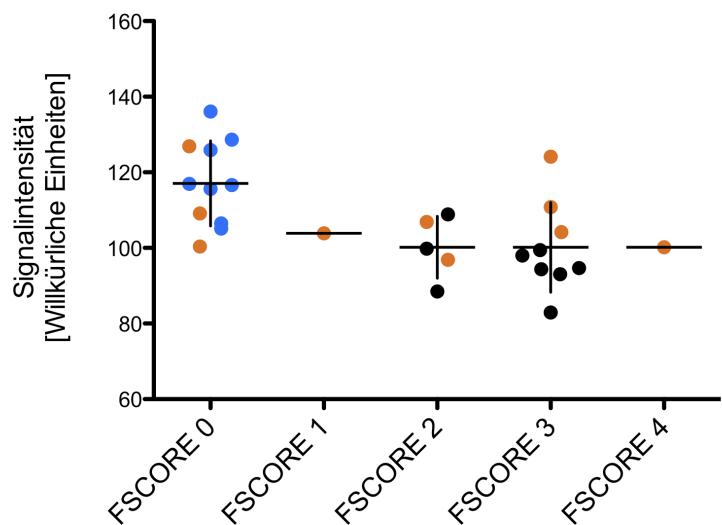


Abbildung 53: Negative Korrelationen zwischen dem SNR und dem Hydroxyprolingehalt der Leber unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,6186	-0,5884	-0,6335
R ²	0,3827	0,3462	0,4014
r _{Spearman}	-0,6887	-0,4982	-0,7039

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

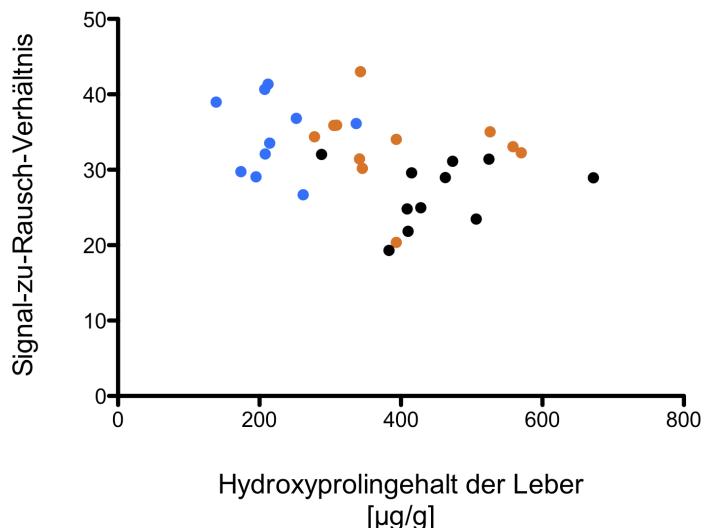
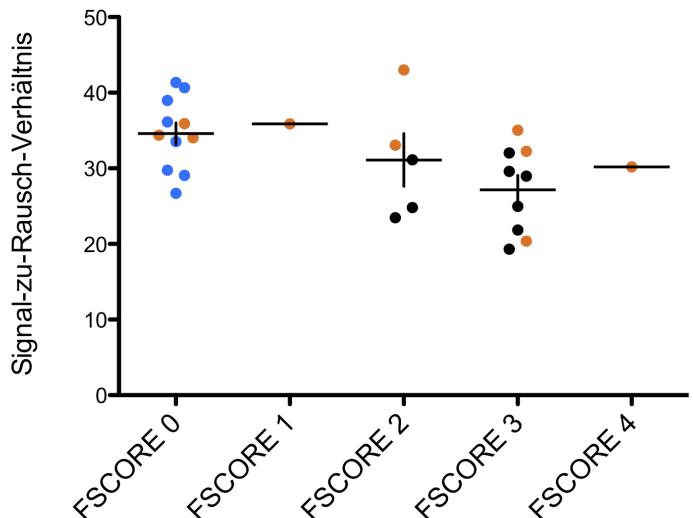


Abbildung 54: Negative Korrelationen zwischen dem SNR und dem FibroScore unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,6289	-0,4770	-0,8008
R ²	0,3955	0,2369	0,6413
r _{Spearman}	-0,6283	-0,4867	-0,8138

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄



53 und 54) mit dem Hydroxyprolingehalt und dem Fibrosescore. Für die Serumaktivitäten der Enzyme AP, AST und ALT kann für die Gesamtheit der Versuchstiere keine signifikante Korrelation mit der SI bestimmt werden. Untersucht man getrennt nach Genotyp und Ätiologie, zeigen sich auch hier signifikante lineare Zusammenhänge für verschiedene Versuchstiergruppen. Die Art der Korrelation unterscheidet sich dabei zwischen den Leberfibrosemodellen. Für FVB-*Abcb4*-Nullmutanten und korrespondierende Kontrolltiere zeigen sich signifikante positive, größtenteils mittelstarke Korrelationen für AP ($r_{Pearson}=0,4630$, $r_{Spearman}=0,5394$), AST ($r_{Pearson}=0,5579$, $r_{Spearman}=0,6156$) und ALT ($r_{Pearson}=0,5756$, $r_{Spearman}=0,6104$). CCl₄-injizierte Versuchstiere zeigen in ihrer Gesamtheit dagegen signifikante negative Korrelationen nur mit AST ($r_{Pearson}=-0,4098$, $r_{Spearman}=-0,5259$) und ALT ($r_{Pearson}=-0,5197$, $r_{Spearman}=-0,6472$). Für 6x injizierte Versuchstiere lassen sich keine signifikanten Korrelationen nachweisen. Für 12x injizierte Mäuse erhöhen sich dagegen die Beträge der Korrelationskoeffizienten für SNR und AST leicht ($r_{Pearson}=-0,4845$, $r_{Spearman}=-0,5377$) bzw. ALT ($r_{Pearson}=-0,6287$, $r_{Spearman}=-0,6450$).

Für die SNR wird dagegen eine signifikante Korrelation mit der Aktivität von AST und ALT nur für die Gesamtheit der CCl₄-behandelten Versuchstiere ($r_{Pearson}=-0,4141$, $r_{Spearman}=-0,5030$) bzw. 12x injizierte Mäuse ($r_{Pearson}=-0,5056$, $r_{Spearman}=-0,6008$) und Kontrollen bestimmt.

4.5.5.3. Intermediär gewichtete Bildgebung mit Fettsättigung

4.5.5.3.1. Signalintensitäten

Für die intermediär gewichtete MRT-Bildgebung mit Fettsättigung wird die mittlere Signalintensität der Leber für gesunde Kontrolltiere auf 89,96 willkürliche Einheiten bestimmt. Für die Gesamtheit erkrankter Tiere wird dagegen ein Mittelwert von 94,72 willkürlichen Einheiten berechnet (Abb. 55 a). Der Shapiro-Wilk-Test bestimmt die Messwerte dieser Gruppe als normalverteilt. Für die Signalintensitätsmessungen der gesunden Tiere ergibt sich keine Normalverteilung. Die statistische Analyse der Messwerte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests identifiziert keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchstiergruppen.

Verteilt man die gemessenen Signalintensitäten nach den verschiedenen Krankheitsmodellen und Genotypen der verwendeten Labormäuse und berechnet

anschließend die Mittelwerte, zeigen sich erneut deutliche Unterschied zwischen den verschiedenen Untergruppen (Abb. 55 b). Für BALB/cJ Kontrolltiere wird für die Leber eine mittlere Signalintensität von 104,01 willkürlichen Einheiten bestimmt. Für 6x CCl₄-behandelte Tiere werden 100,65 willkürliche Einheiten gemessen, während 12x mit CCl₄ injizierte Versuchstiere einen Mittelwert der Signalintensität von 82,93 willkürlichen Einheiten aufweisen. BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse zeigen einen sich nur gering von Kontrolltieren unterscheidenden Mittelwert von 101,18 willkürlichen Einheiten. Für Versuchstiere des Stammes FVB/NJ und korrespondierende Knockout-Mäuse werden mittlere Signalintensitäten von 80,59 bzw. 93,64 willkürlichen Einheiten bestimmt. Die Untersuchung der Messwerte mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests innerhalb ihrer genotyp- oder pathogenespezifischen Einteilung, stellt das Fehlen einer Normalverteilung für Messwerte von 6x mit CCl₄ behandelten BALBcJ Mäusen und FVB-*Abcb4*^{-/-} Tieren fest. Die statistische Analyse der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test mit Test nach Dunn berechnet einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalintensitäten gesunder BALB/cJ Mäuse und 12x mit CCl₄ behandelter Versuchstiere ($p<0,001$).

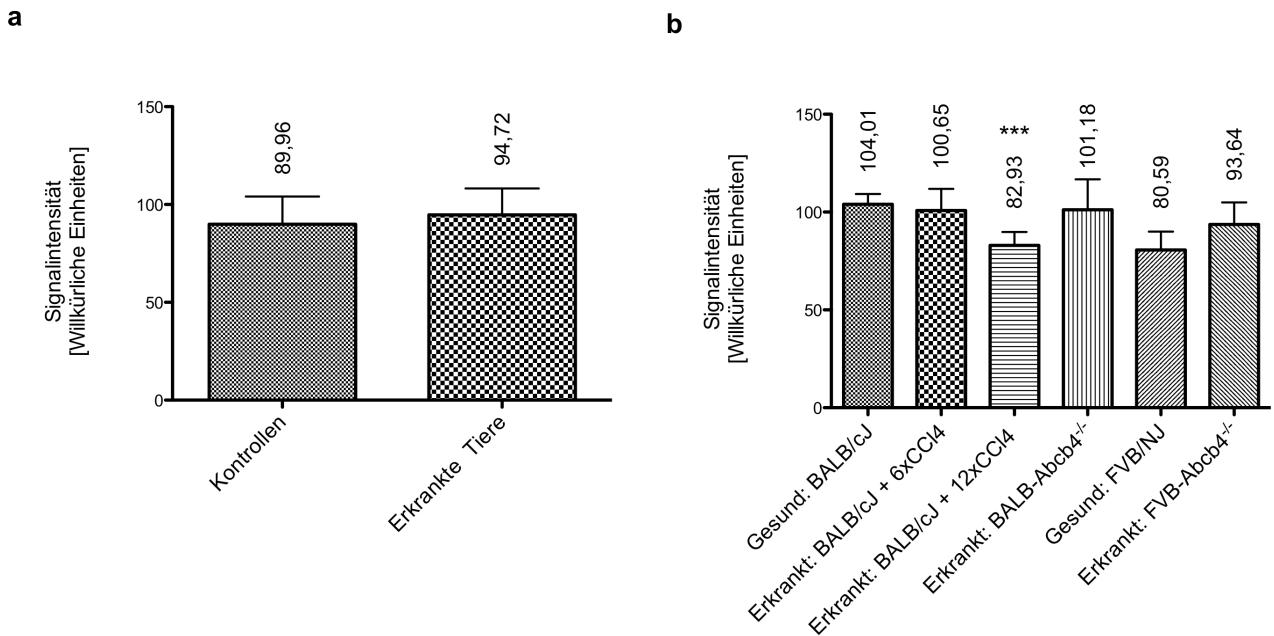


Abbildung 55: Vergleich der Signalintensitäten für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
 - b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
- *** Signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen unbehandelten und 12x mit CCl₄ injizierten BALB/cJ-Mäusen, $p<0,001$

4.5.5.3.2.Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Die Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR) ergibt für gesunde Kontrolltiere und erkrankte Mäuse nur geringfügig voneinander abweichende Mittelwerte von 19,24 und 20,19 (Abb. 56 a). Im Shapiro-Wilk-Test erweisen sich die Messwerte beider Gruppen als normal verteilt. Die statistische Analyse mit dem Zwei-Stichproben-t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied beider Gruppen.

Bei Untersuchung des SNR auf Ebene der verschiedenen Krankheitsmodelle und Tierstämme zeigen sich deutliche Unterschiede (Abb. 56 b). Besonders niedrige Werte werden mit 17,08 für 12x CCl₄-behandelte BALB/cJ Mäuse und 16,79 für gesunde FVB/NJ Kontrolltiere gemessen. BALB/cJ Kontrollen, 6x mit CCl₄ injizierte Versuchstiere und BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse weisen dagegen vergleichbare Werte von 22,92 bis 22,09 auf, während FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse mit 19,21 ein geringeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen.

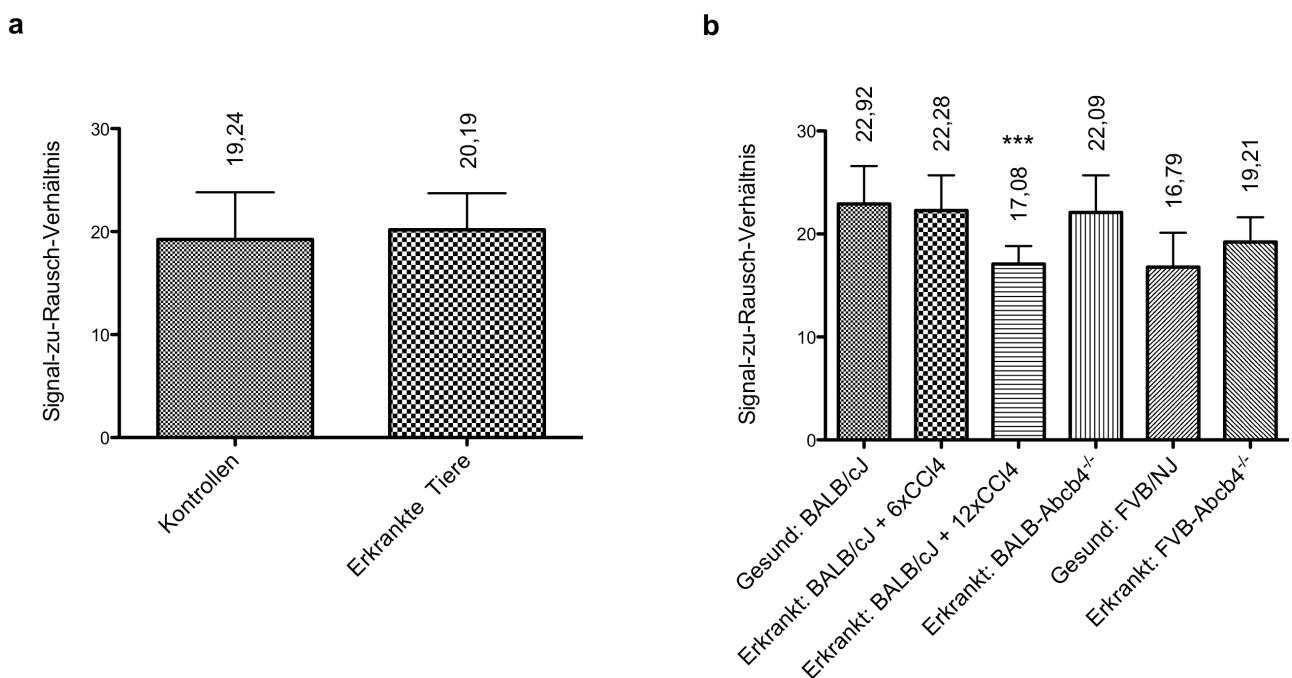


Abbildung 56: Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisse für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
 - b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
- *** Signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und 12x CCl₄-behandelten BALB/cJ-Mäusen

Der Shapiro-Wilk-Test zeigt für alle Gruppen an Messwerten eine Normalverteilung. Die statistische Analyse des SNR aller Versuchstiergruppen mit dem einfaktoriellen ANOVA weist einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten BALB/cJ Mäusen und 12x CCl₄-behandelten Versuchstieren nach ($p<0,001$).

4.5.5.3.3. Korrelationen zwischen histologischen und biochemischen Parametern und Messwerten der Magnetresonanztomographie

Untersucht man die Zusammenhänge zwischen den MRT-Parametern Signalintensität (SI) und Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) und den histologischen und biochemischen Parametern, unabhängig vom zugrunde liegenden Genotyp oder Krankheitsmodell, lassen sich keine signifikanten und mindestens mittelstarken Korrelationen feststellen.

Auf Ebene der verschiedenen Versuchstiergruppen lassen sich dagegen mittlere Korrelationen von SI bzw. SNR mit histologischen und biochemischen Parametern der Fibroseentwicklung identifizieren. Für CCl₄-behandelte Tiere ergeben sich signifikante, negative Zusammenhänge der SI (Abb. 57 und 58) und der SNR (Abb. 59 und 60) mit dem Hydroxyprolingehalt und dem Fibrosescore. Darüber hinaus lassen sich signifikante negative Korrelationen der SI der Leber mit der Serumaktivität von AST ($r_{Pearson}=-0,4836$, $r_{Spearman}=-0,5479$) und ALT ($r_{Pearson}=-0,4336$, $r_{Spearman}=-0,5911$) bestimmen. Untersucht man diese Zusammenhänge getrennt für 6x und 12x CCl₄-injizierte Mäuse behandelte Versuch, zeigt sich nur für 12x behandelte Versuchstiere ein Korrelation ($r_{Pearson}=-0,6197$, $r_{Spearman}=-0,7008$).

Für BALB-*Abcb4*^{+/+} Mäuse und korrespondierende Kontrolltiere kann eine signifikante positive Korrelation mit der Serumaktivität von AST ($r_{Pearson}=0,7554$, $r_{Spearman}=0,7319$) und ALT ($r_{Pearson}=0,7680$, $r_{Spearman}=0,6747$) nachgewiesen werden, während die in der Leber gemessene Signalintensität für FVB/NJ Mäuse und *Abcb4*^{+/+} Mutanten mit der Höhe der Serumaktivität der AP ($r_{Pearson}=0,5265$, $r_{Spearman}=0,5705$) und der ALT ($r_{Pearson}=0,5163$, $r_{Spearman}=0,5987$) linear zusammenhängt.

Für die SNR lässt sich allein für CCl₄-behandelte Versuchstiere eine signifikante Korrelation mit der Serumaktivität der ALT darstellen ($r_{Pearson}=-0,4498$, $r_{Spearman}=-0,4810$). Vergleicht man SNR und ALT für die verschieden oft injizierten Mäuse, so kann eine signifikante Korrelation nur für 12x CCl₄-behandelte Versuchstiere und unbehandelte Kontrollen gezeigt werden ($r_{Pearson}=-0,5189$, $r_{Spearman}=-0,5686$).

Abbildung 57: Negative Korrelationen zwischen der Signalintensität und dem Hydroxyprolingehalt der Leber unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,3995	-0,0721	-0,7674
R ²	0,1596	0,000	0,5889
r _{Spearman}	-0,4133	0,2191	-0,7247

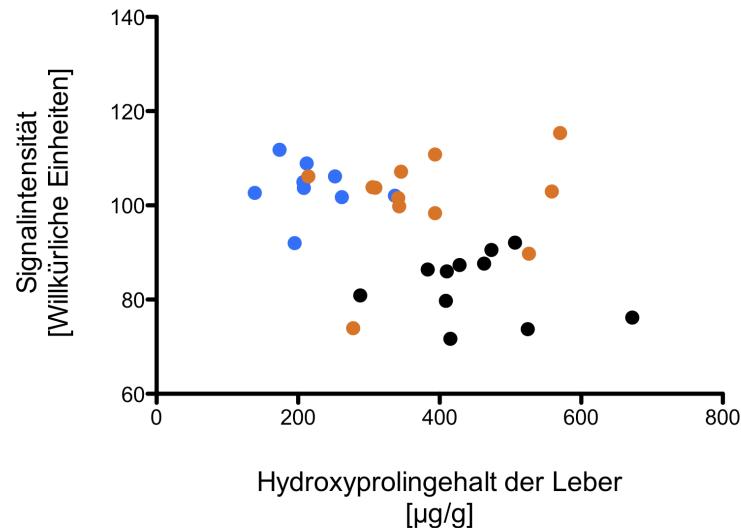


Abbildung 58: Negative Korrelationen zwischen der Signalintensität und dem Fibrotescore unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

Parameter	Alle CCl ₄ -behandelten Tiere	6x CCl ₄ -behandelte Tiere	12x CCl ₄ -behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,4084	-0,1543	-0,6558
R ²	0,0904	0,0480	0,7411
r _{Spearman}	-0,4331	-0,1215	-0,6328

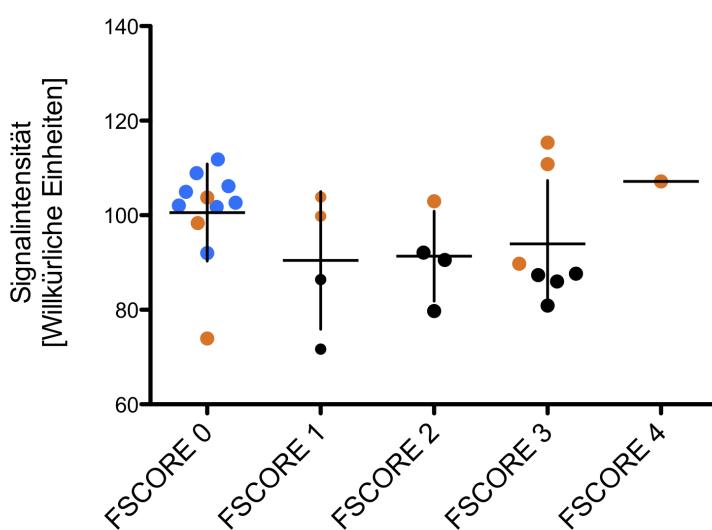


Abbildung 59: Negative Korrelationen zwischen dem SNR und dem Hydroxyprolingehalt der Leber un behandelter und CCl₄- behandelter BALB/cJ Mäuse

Parameter	Alle CCl ₄ - behandelten Tiere	6x CCl ₄ - behandelte Tiere	12x CCl ₄ - behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,4084	-0,1543	-0,6328
R ²	0,1668	0,0238	0,4005
r _{Spearman}	-0,4331	-0,1215	-0,6558

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

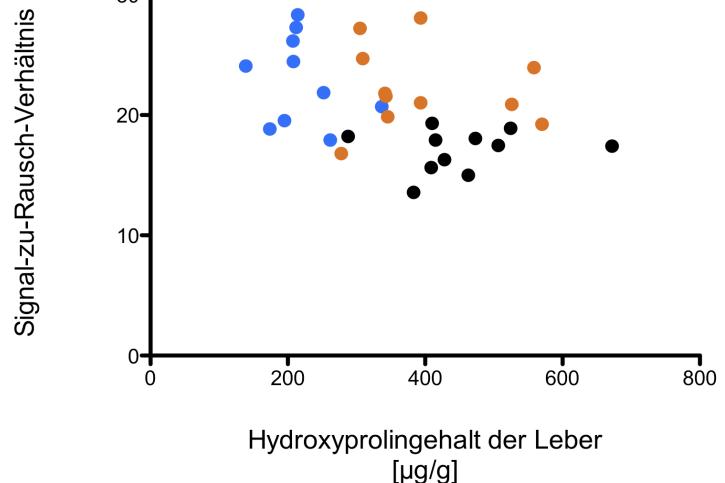
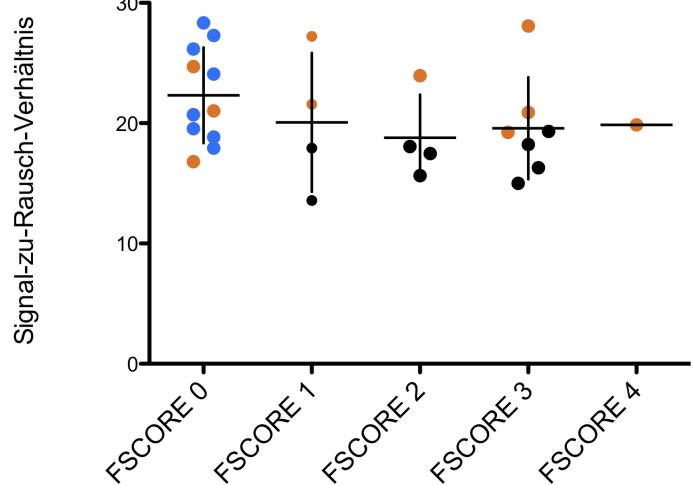


Abbildung 60: Negative Korrelationen zwischen dem SNR und dem Fibrosescore un behandelter und CCl₄- behandelter BALB/cJ Mäuse

Parameter	Alle CCl ₄ - behandelten Tiere	6x CCl ₄ - behandelte Tiere	12x CCl ₄ - behandelte Tiere
r _{Pearson}	-0,3982	-0,0441	-0,7014
R ²	0,1585	0,0020	0,4919
r _{Spearman}	-0,3753	0,0259	-0,7194

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄



4.5.5.4. T2*-gewichtete Bildgebung

4.5.5.4.1. Signalintensitätsmessung

In der T2*-gewichteten Bildgebung werden für gesunde Kontrollen und erkrankte Versuchstiere ebenfalls deutlich unterschiedliche Werte für die Signalintensität der Leber gemessen. Für gesunde Mäuse wird ein Mittelwert von 76,47 willkürlichen Einheiten gemessen, während die mittlere Signalintensität für Tiere mit Leberfibrose 85,67 willkürliche Einheiten beträgt (Abb. 61 a). Der Shapiro-Wilk-Test zeigt für die Messwerte der Kontrollen das Fehlen einer Normalverteilung, dagegen besteht diese für die Signalintensitäten erkrankter Versuchstiere. Die Anwendung des Mann-Whitney-Tests berechnet keine Signifikanz für die Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Teilt man die Messwerte für die Signalintensitäten nach Ätiologie und Genotyp auf und bestimmt die mittleren Signalintensitäten, zeigen sich zum einen deutliche Unterschiede innerhalb der Gruppe der BALB/cJ-Tiere. Zum anderen fällt ein ausgeprägter Unterschied zwischen den beiden Versuchstierstämmen auf (Abb. 61 b).

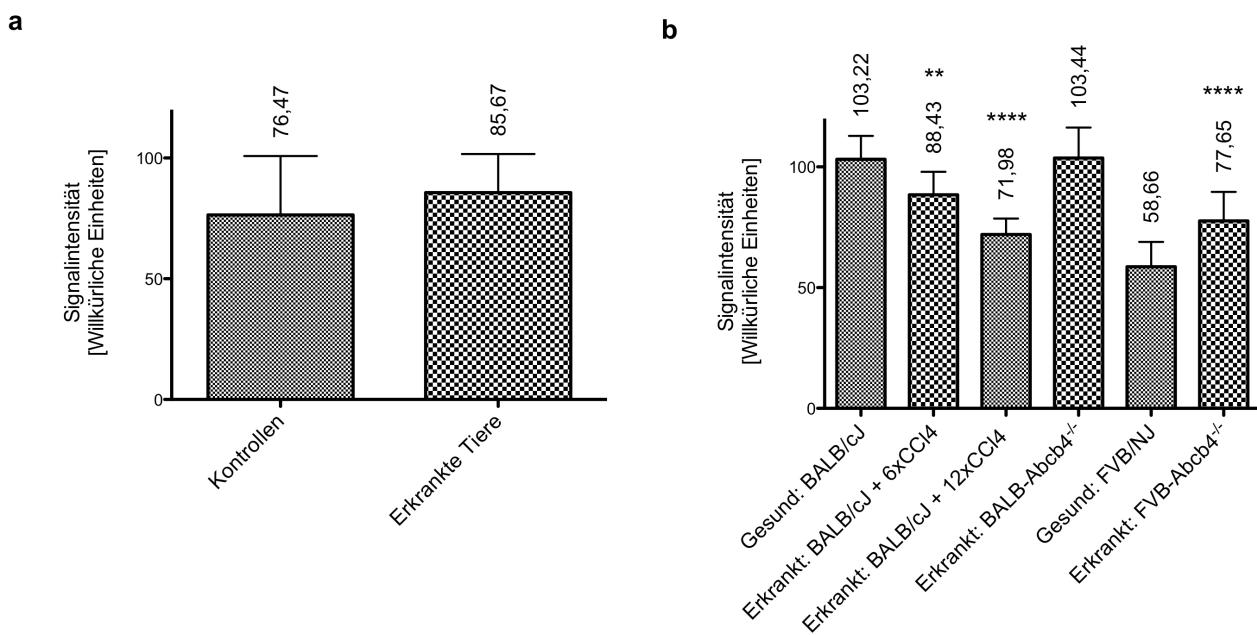


Abbildung 61: Vergleich der in der T2*-gewichteten MRT gemessenen Signalintensitäten für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

** Signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen unbehandelten und 6x mit CCl4 injizierten BALB/cJ-Mäusen, $p<0,01$

**** Signifikanter Unterschied der Signalintensität ($p<0,001$) zwischen unbehandelten und 12x mit CCl4 injizierten BALB/cJ-Mäusen sowie unbehandelten FVB/NJ-Mäusen und FVB/NJ-Tieren mit Verlust der Abcb4-Genaktivität

Mit 103,22 willkürlichen Einheiten weisen unbehandelte BALB/cJ-Kontrolltiere den höchsten Mittelwert auf. Für 6x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere wird ein geringerer Wert von 88,43 willkürlichen Einheiten bestimmt, während 12x mit CCl₄ injizierte Versuchstiere mit 71,98 willkürlichen Einheiten die geringste mittlere Signalintensität aller BALB/cJ-Tiere aufweisen. BALB-*Abcb4*^{-/-}-Versuchstiere weisen einen mit gesunden Kontrolltieren des gleichen Stammes fast übereinstimmenden Wert für die Signalintensität der Leber von 103,44 willkürlichen Einheiten auf. FVB/NJ-Kontrolltiere zeigen dagegen einen deutlich niedrigeren Wert. Für diese Gruppe werden 58,66 willkürliche Einheiten gemessen, während die mittlere Signalintensität der Leber für die korrespondierenden FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere auf 77,65 willkürliche Einheiten bestimmt wird. Die Untersuchung der verschiedenen Tiergruppen mit dem Shapiro-Wilk-Test weist eine Normalverteilung für alle Messwerte nach. Die statistische Analyse mit dem einfaktoriellen ANOVA (s. Abb. 61 b) weist signifikante Unterschiede der Signalintensitäten zwischen 6x bzw. 12x CCl₄-behandelten Versuchstieren und unbehandelten BALB/cJ-Versuchstieren ($p<0,01$ bzw. $<0,0001$) sowie zwischen FVB/NJ-Mäusen und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mutanten nach ($p<0,0001$).

4.5.5.4.2.Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Aus den Messwerten für die Signalintensität in der Leber und für das Hintergrundrauschen wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechnet. Für gesunde Kontrolltiere wird ein Wert von 18,16 bestimmt (Abb. 62 a). Für die Gruppe aller erkrankten Mäuse wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf 19,62 berechnet. Prüft man beide Gruppen von Messwerten mit dem Shapiro-Wilk-Test, werden die Messwerte der Kontrollen als normalverteilt erkannt, die der erkrankten Tiere dagegen nicht. Durch die Anwendung des Mann-Whitney-Tests kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Prüfgruppen festgestellt werden.

Ordnet man die für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechneten Werte den entsprechenden Erkrankungsmodellen und Tierstämmen zu und bestimmt die Mittelwerte erneut, ergibt sich ein der reinen Signalintensitätsmessung sehr ähnliches Bild (Abb. 62 b). BALB/cJ-Kontrolltiere weisen dabei mit 25,97 den höchsten Wert auf. Für 6x bzw. 12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere werden deutlich niedrigere Werte von 21,17 bzw. 15,49 berechnet, während BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 24,12 aufweisen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für FVB/NJ-Mäuse

und FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere liegt dagegen mit 12,95 bzw. 17,50 deutlich unter dem Niveau der mit CCl₄ injizierten Mäuse.

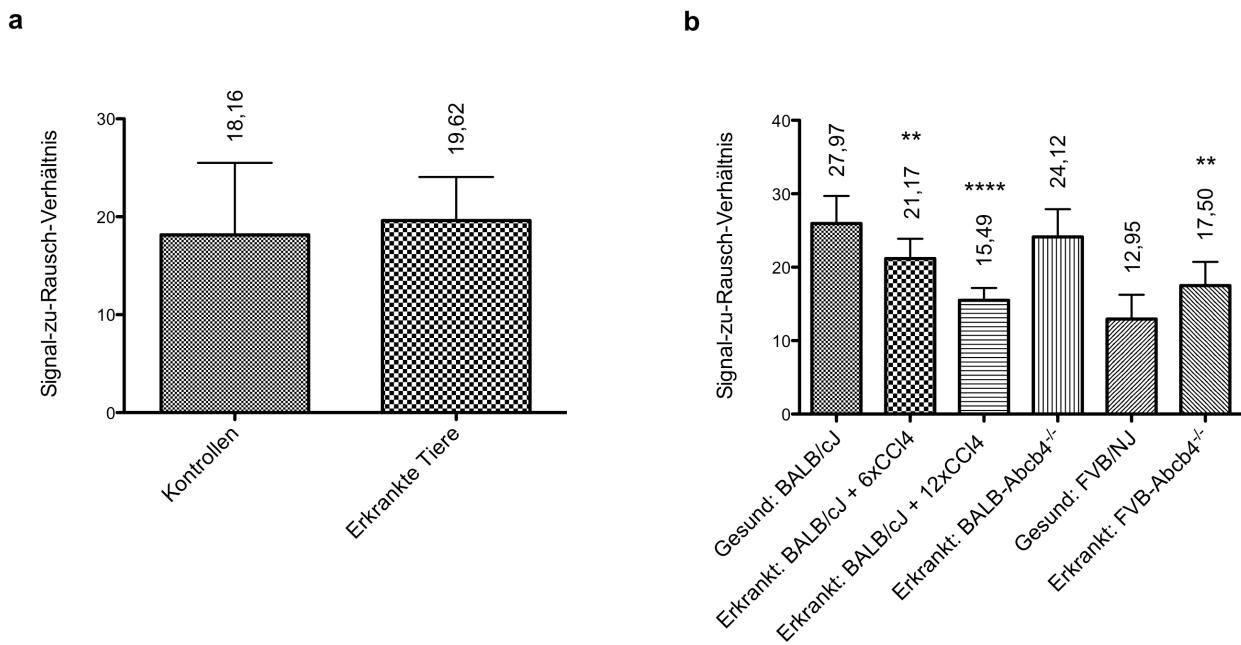


Abbildung 62: Vergleich des für die T2*-gewichtete MRT berechneten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses für gesunde Kontrolltiere und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
 - b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen
- ** Signifikanter Unterschied des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zwischen unbehandelten und 6x mit CCl₄ injizierten BALB/cJ-Mäusen, p<0,01
- **** Signifikanter Unterschied des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (p<0,0001) zwischen unbehandelten und 12x mit CCl₄ injizierten BALB/cJ-Mäusen sowie unbehandelten FVB/NJ-Mäusen und FVB/NJ-Tieren mit Verlust der Abcb4-Genaktivität (p<0,01)

Wendet man den Shapiro-Wilk-Test auf die verschiedenen Untergruppen der Versuchstiere an, zeigt sich für alle eine Normalverteilung der Messwerte. Die Anwendung des einfaktoriellen ANOVA weist signifikante Unterschiede im Signal-zu-Rausch-Verhältnis zwischen gesunden BALB/cJ-Mäusen und 6x CCl₄-behandelte Versuchstieren (p<0,01) sowie 12x CCl₄-behandelten Versuchstieren (p<0,0001) nach. Auch zwischen gesunden FVB/NJ-Kontrolltieren und FVB-*Abcb4*-Knockouts besteht ein signifikanter Unterschied (p<0,01).

4.5.5.4.3. Korrelationen zwischen histobiochemischen Parametern und MRT-Messwerten

Mit Hilfe parametrischer und nicht parametrischer Tests lässt sich unabhängig vom zugrunde liegenden Genotyp oder Krankheitsmodell keine mittelschwere oder stärkere Korrelation der Leber-Signalintensitäten (SI) der T2*-gewichteten MRT mit

Abbildung 63: Negative Korrelationen zwischen der Signalintensität und dem Hydroxyprolingehalt der Leber unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

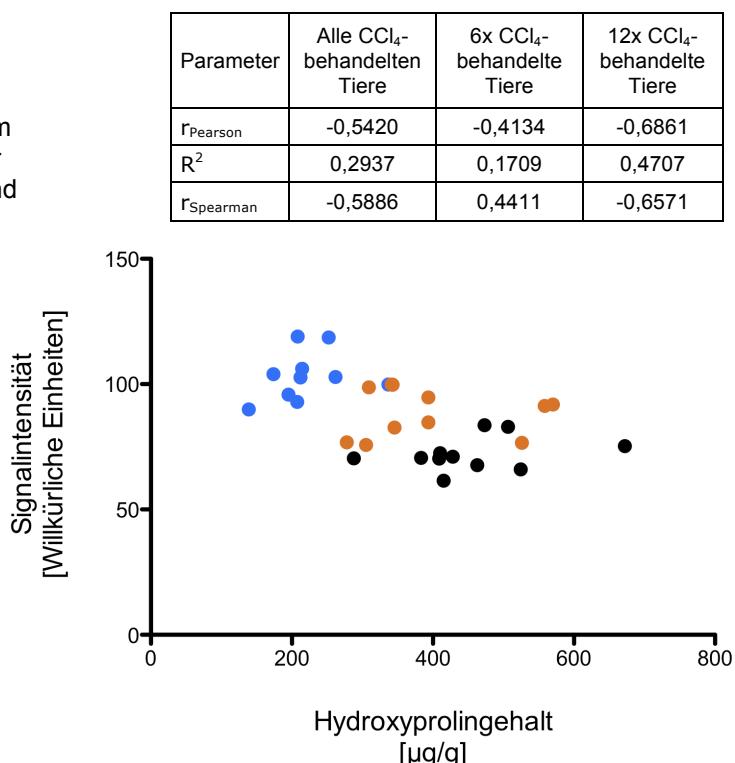


Abbildung 64: Negative Korrelationen zwischen der Signalintensität und dem Fibrosescore unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

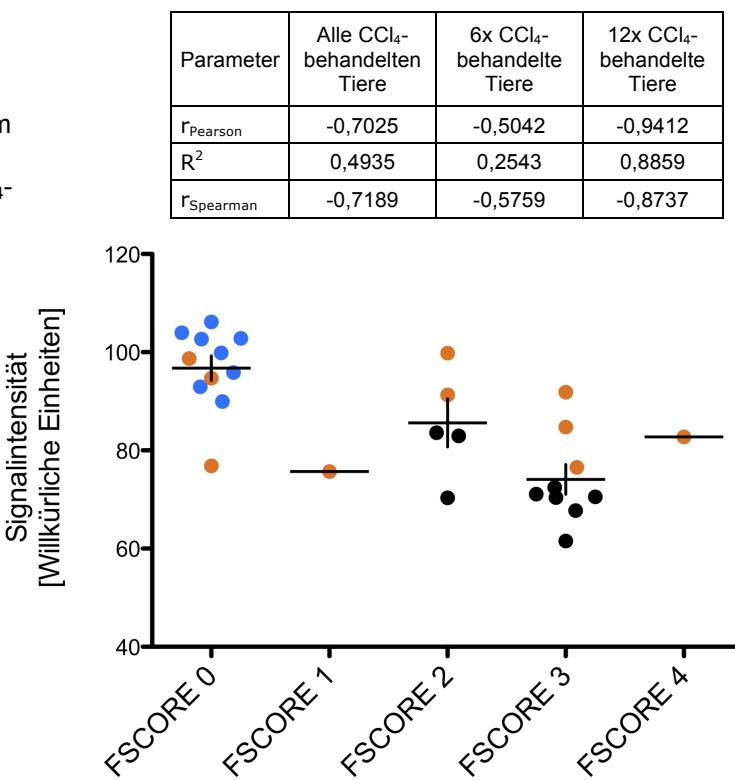


Abbildung 65: Negative Korrelationen zwischen dem SNR Signalintensität und dem Hydroxyprolingehalt der Leber unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄

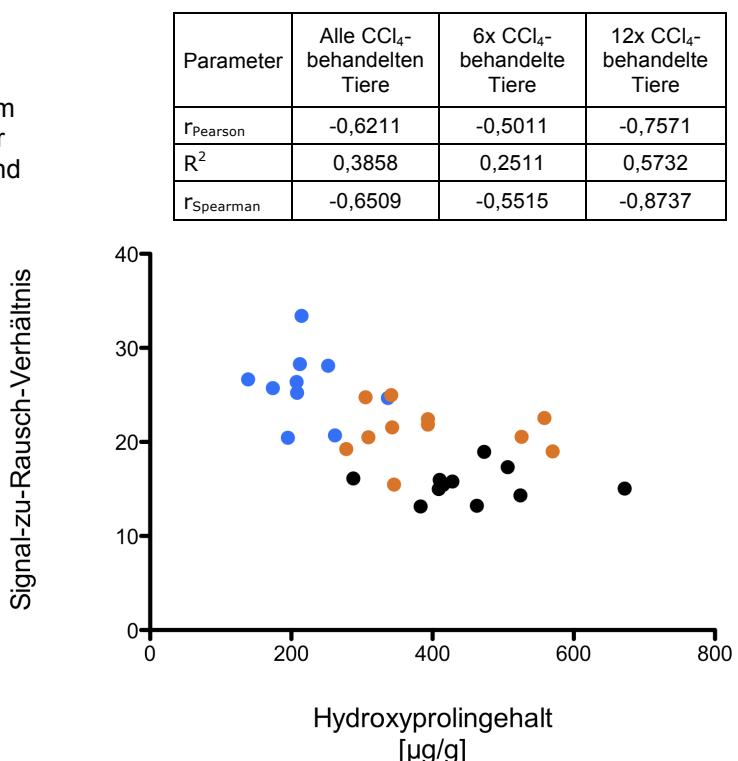
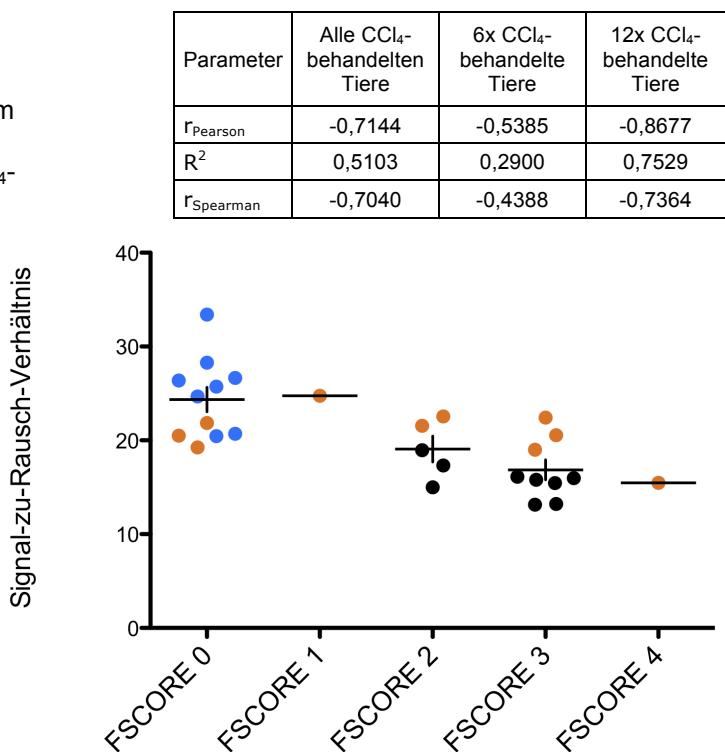


Abbildung 66: Negative Korrelationen zwischen dem SNR Signalintensität und dem Fibrosescore unbehandelter und CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäuse

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄



histologischen oder biochemischen Messgrößen des Fibrosegrades feststellen. Eine Analyse für die verschiedenen Ätiologien und Genotypen zeigt dagegen für CCl₄-behandelte Tiere (Abb. 63 und 64) signifikante negative mittlere Korrelationen zwischen der Signalintensität, dem Hydroxyprolingehalt der Leber und dem Fibrotescore. Untersucht man das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, den Hydroxyprolingehalt und den Fibrotescore auf lineare Zusammenhänge, stellen sich Signifikanzen ebenfalls nur für CCl₄-Tiere dar. Dabei werden für den Hydroxyprolingehalt höhere Beträge der Korrelationskoeffizienten berechnet, während diese Werte für den Fibrotescore etwas absinken. Insgesamt zeigen sich für SI- und SNR-Messungen der T2*-gewichteten MRT die meisten signifikanten Korrelationen mit dem Hxdroxyprolingehalt der Leber und dem Fibrotescore (Tabelle 27)

Vergleicht man die Signalintensitäten mit den Serumwerten der AP und der Transaminasen, werden signifikante negative Korrelationen der SI mit AST- ($r_{Pearson}=-0,4823$, $r_{Spearman}=-0,5909$) und ALT-Werten ($r_{Pearson}=-0,5583$, $r_{Spearman}=-0,6998$) für CCl₄-behandelte Versuchstiere berechnet. Trennt man die Ergebnisse nach der Anzahl der CCl₄-Behandlungen auf, zeigen Messwerte für 6x injizierte Versuchstiere eine signifikante Korrelation mit der AP-Aktivität ($r_{Pearson}=-0,6711$, $r_{Spearman}=-0,6577$). Für 12x CCl₄-behandelte Mäuse lassen sich dagegen signifikante Korrelationen der Transaminasen mit der SI nachweisen. Für die AST-Werte werden Korrelationskoeffizienten von -0,5906 (nach Pearson) bzw. -0,6409 (nach Spearman) berechnet. Für die ALT liegen diese Werte vom Betrag etwas höher ($r_{Pearson}=-0,6586$, $r_{Spearman}=-0,6966$). Während für BALB/cJ Kontrolltiere und BALB-Abcb4^{-/-} Versuchstiere keine Korrelation zu Serum-Markern der Leberschädigung bestimmt werden kann, können für Leber-Signalintensitäten der FVB/NJ und FVB- Abcb4^{-/-} Mäuse signifikante positive Korrelationen mit der AP ($r_{Pearson}=0,5051$, $r_{Spearman}=0,4575$), der AST ($r_{Pearson}=0,6094$, $r_{Spearman}=0,7026$) und der ALT ($r_{Pearson}=0,6216$, $r_{Spearman}=0,7519$) nachgewiesen werden.

Untersucht man die Werte des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, wandelt sich dieses Bild leicht. Für FVB/NJ und FVB-Abcb4^{-/-} Mäuse kann keine Korrelation mit der AST bestimmt werden. Signifikante lineare Zusammenhänge werden für das SNR und die Aktivitäten der AP ($r_{Pearson}=0,4577$, $r_{Spearman}=0,4773$) und der ALT ($r_{Pearson}=0,5142$, $r_{Spearman}=0,6610$) berechnet. Für das SNR CCl₄-behandelter Versuchstiere zeigen sich dagegen signifikante negative Korrelationen mit AST ($r_{Pearson}=-0,4976$, $r_{Spearman}=-0,5531$) und ALT ($r_{Pearson}=-0,5707$, $r_{Spearman}=-0,6759$), die nur für 12x behandelte Mäuse

(AST: $r_{Pearson}=-0,5424$, $r_{Spearman}=-0,5024$ bzw. ALT: ($r_{Pearson}=-0,6208$, $r_{Spearman}=-0,6656$) erhalten bleiben. Auch für die SNR zeigt sich bei 6x injizierten Mäusen und korrespondierenden Kontrollen ein Korrelation mit der Serumaktivität der AP ($r_{Pearson}=-0,5213$, $r_{Spearman}=-0,5472$).

4.5.5.5. T2-gewichtete Bildgebung

4.5.5.5.1. Signalintensitäten

Für die intermediär gewichtete MRT-Bildgebung mit Fettsättigung wird die mittlere Signalintensität (SI) der Leber für gesunde Kontrolltiere auf 16,36 willkürliche Einheiten bestimmt. Für die Gesamtheit erkrankter Tiere wird dagegen ein Mittelwert der SI von 22,72 willkürlichen Einheiten berechnet (Abb. 67 a). Der Shapiro-Wilk-Test bestimmt die Messwerte beider Gruppen als nicht normalverteilt. Die statistische Analyse der Messwerte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests berechnet einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchstiergruppen ($p=0,0021$).

Teilt man die Messergebnisse nach den verschiedenen Krankheitsmodellen und Genotypen der verwendeten Labormäuse und berechnet die Mittelwerte, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen (Abb. 67 b).

Für BALB/cJ-Kontrolltiere wird für die Leber eine mittlere Signalintensität von 24,57 willkürlichen Einheiten bestimmt. Für 6x CCl₄-behandelte Tiere werden als Mittelwert 24,11 willkürliche Einheiten berechnet, während 12x mit CCl₄ injizierte Versuchstiere einen Mittelwert der Signalintensität von 20,20 willkürlichen Einheiten aufweisen. BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse zeigen einen Messwert von 31,94 willkürlichen Einheiten, der sich deutlich von Kontrolltieren unterscheidet. Für Versuchstiere des Stammes FVB/NJ und korrespondierende Knockout-Mäuse werden mittlere Signalintensitäten von 10,89 bzw. 14,55 willkürlichen Einheiten bestimmt.

Untersucht man die Verteilung der Messwerte mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests innerhalb ihrer genotyp- oder pathogenespezifischen Einteilung, stellt man das Fehlen einer Normalverteilung für Messwerte von 6x mit CCl₄ behandelten BALBcJ-Mäuse fest. Die Messwerte für alle anderen Untergruppen sind dagegen normalverteilt.

Die statistische Analyse der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit Test nach Dunn kann keine signifikanten Unterschiede zwischen den Signalintensitäten der verschiedenen erkrankten und gesunden Tiergruppen nachweisen.

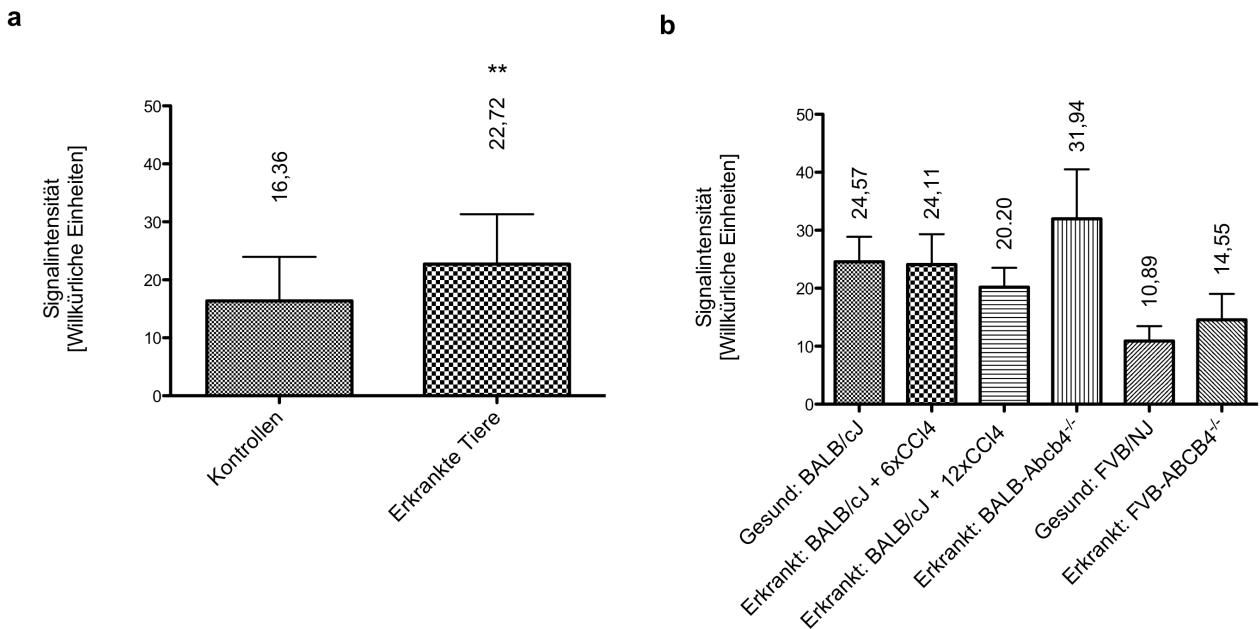


Abbildung 67: Vergleich der in der T2-gewichteten MRT gemessenen Signalintensitäten für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
** Signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen unbehandelten Kontrollen und erkrankten Tieren
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

4.5.5.5.2. Signal-zu-Rausch-Verhältnis der T2-gewichteten MRT

Die Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR), ergibt für gesunde Kontrolltiere und erkrankte Mäuse deutlich voneinander abweichende Mittelwerte von 8,23 und 10,91 (Abb. 68 a). Im Shapiro-Wilk-Test erweisen sich die Messwerte beider Gruppen als nicht normal verteilt. Die statistische Analyse mit dem Mann-Whitney-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,0233$).

Bei Verteilung der Messwerte nach Krankheitsmodell und verwendetem Tierstamm und neuer Berechnung des mittleren SNR zeigen sich zum Teil ebenfalls deutliche Unterschiede (Abb. 68 b).

Besonders niedrige Werte des SNR werden mit 10,13 für 12x CCl₄-behandelte BALB/cJ Mäuse bzw. 4,89 für gesunde FVB/NJ Kontrolltiere und 6,35 für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse gemessen. BALB/cJ Kontrollen, 6x mit CCl₄ injizierte Versuchstiere und BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse weisen dagegen jeweils vergleichbare Werte von 13,10 bis 14,17 für das Signal-Rausch-Verhältnis auf. Die Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests zeigt, dass die Messwerte für 6x mit CCl₄ behandelte BALB/cJ sowie für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse nicht normal verteilt vorliegen. Die statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test mit Test

nach Dunn kann keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen erkrankter und gesunder Versuchstiere feststellen.

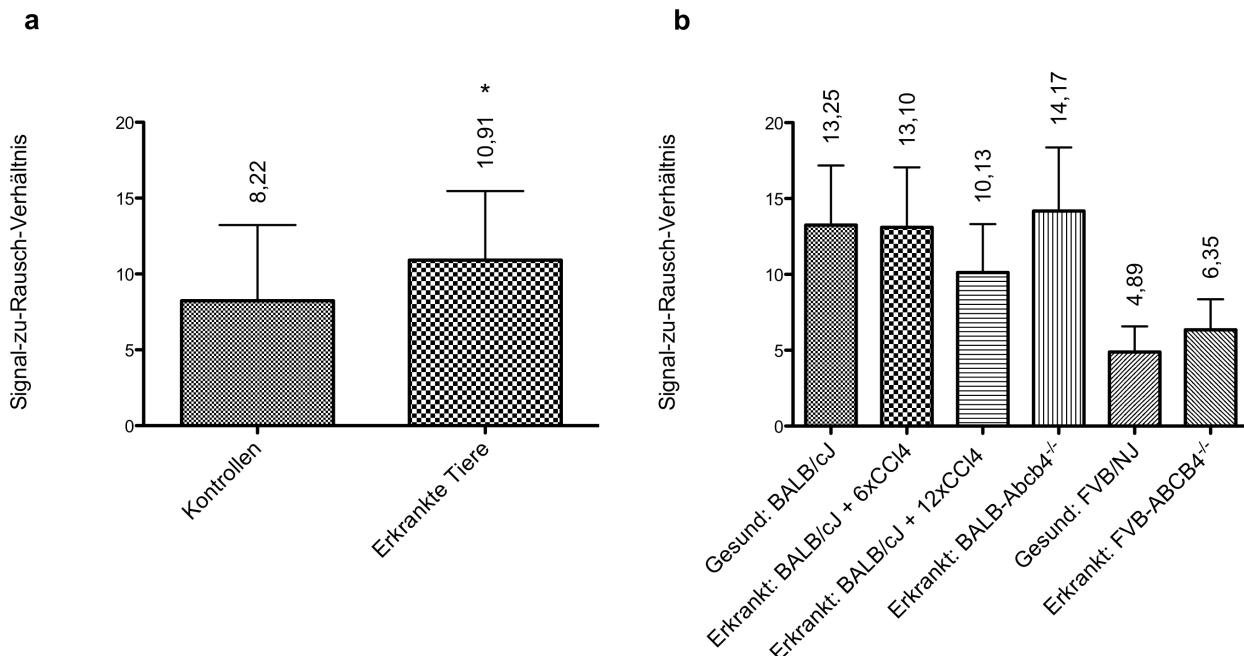


Abbildung 68: Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisse für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- * Signifikanter Unterschied, p=0,023
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchstiergruppen

4.5.5.3. Korrelationen zwischen histobiochemischen Parametern und MRT-Messwerten der T2-gewichteten Sequenz

Für die Gesamtheit der SI- und SNR-Messwerte der T2-gewichteten TSE-Sequenz lassen sich im Gegensatz zu den Gradientenecho-basierten MRT-Verfahren mit Hilfe parametrischer und nicht parametrischer Tests signifikante positive Korrelationen zwischen der Signalintensität (SI) und dem Hydroxyprolingehalt der Leber (Abb. 69) sowie dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) und dem Hydroxyprolingehalt der Leber (Abb. 69) nachweisen. Untersucht man mögliche lineare Zusammenhänge auf Ebene der verschiedenen verwendeten Tiermodelle, kann für BALB-Abcb4^{-/-} und unbehandelte BALB/cJ Mäuse eine Korrelation der SI mit dem Hydroxyprolingehalt (Abb. 70) und dem Fibrotescore (Abb. 71) berechnet werden. Für das SNR gelingt dies nicht. Hier ergibt sich allein eine signifikante negative Korrelation mit dem Hydroxyprolingehalt für 12x CCl₄-behandelte Versuchstiere und Kontrollen (Abb. 72). Für die Serumaktivitäten der AP und der Transaminasen können keinerlei signifikante Korrelationen festgestellt werden.

Abbildung 69: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalintensität und Hydroxyprolingehalt der Leber für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

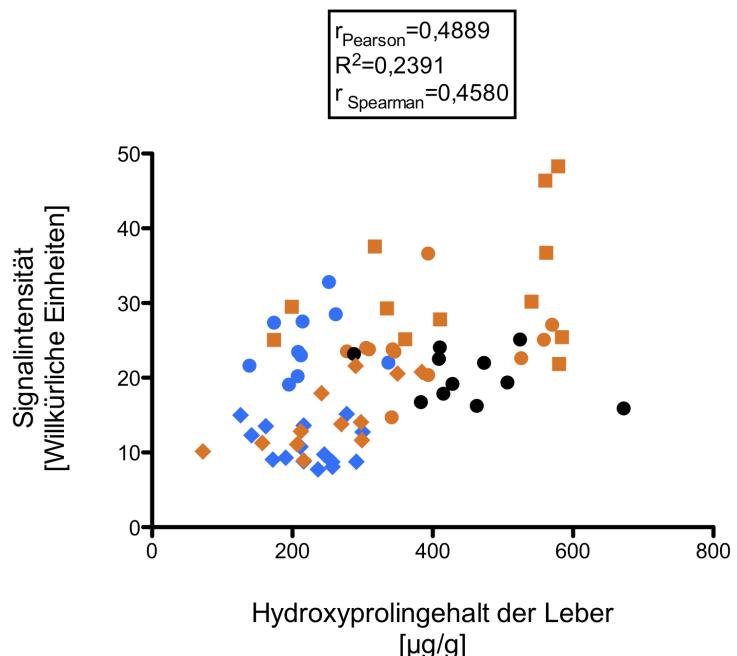


Abbildung 70: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalzu-Rausch-Verhältnis und Hydroxyprolingehalt der Leber für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

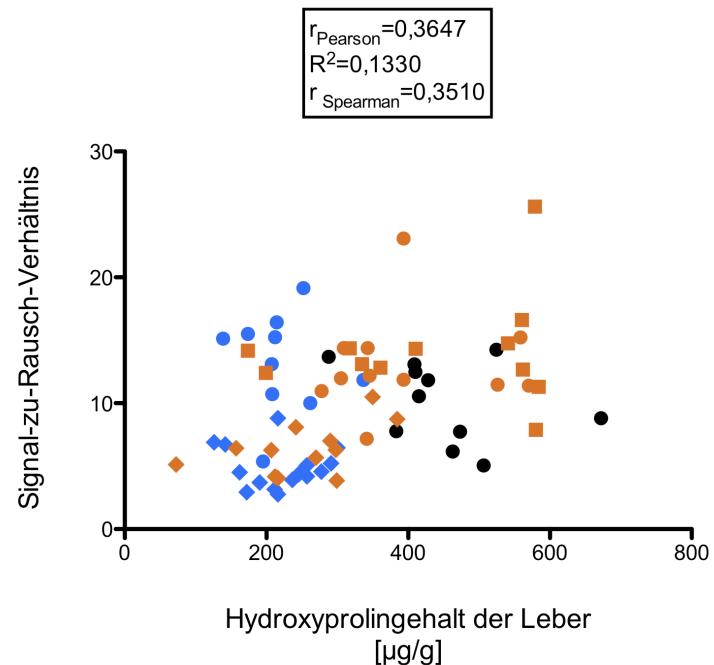


Abbildung 71: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalintensität und Hydroxyprolingehalt der Leber für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse und Kontrollen

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}

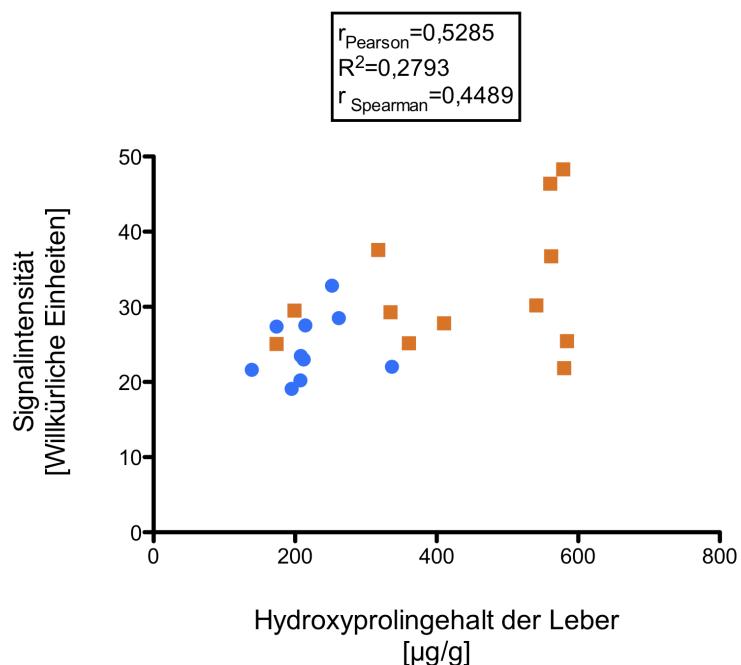


Abbildung 72: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalintensität und Fibrosescore für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse und Kontrollen

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}

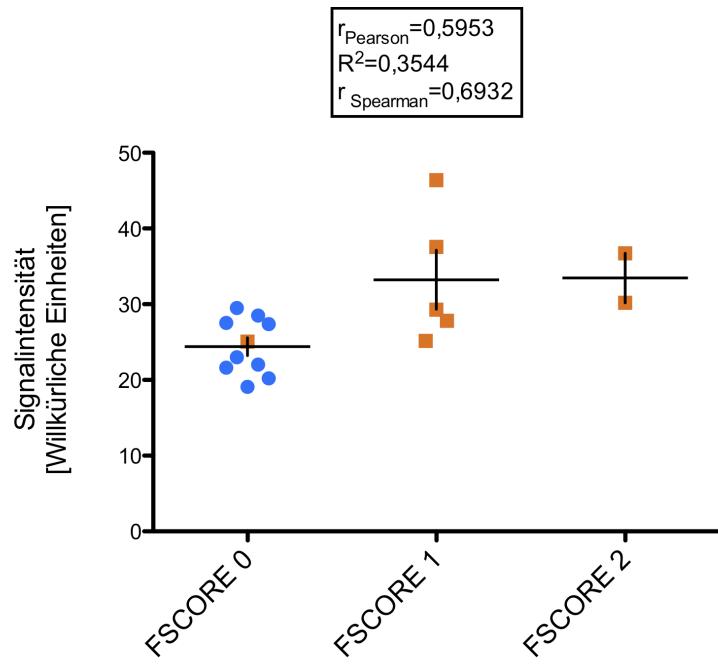
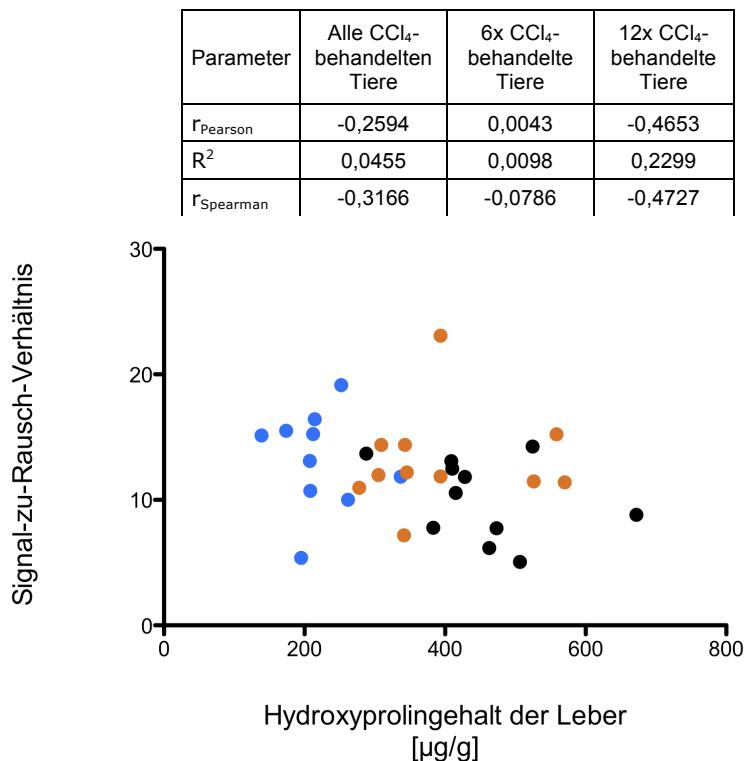


Abbildung 73: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalzu-Rausch-Verhältnis und Hydroxyprolingehalt für CCl₄-behandelte Mäuse und Kontrollen

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄



4.5.5.6. T2-gewichtete Bildgebung mit Fettsättigung

4.5.5.6.1. Signalintensität

Für gesunde Tiere wird in der Leber in den T2-gewichteten Bildern mit Fettsättigung eine mittlere Signalintensität von 20,31 willkürlichen Einheiten gemessen, während für erkrankte Versuchstiere die mittlere Signalintensität der Leber mit 31,12 willkürlichen Einheiten bestimmt wird (Abb. 74 a). Die Testung beider Tiergruppen mit dem Shapiro-Wilk-Test ergibt eine Normalverteilung von Messwerten der Gruppe der erkrankten

Tiere, während die für die Gruppe der gesunden Kontrolltiere bestimmten Signalintensitäten nicht normal verteilt sind. Die statistische Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Signalintensitäten mit dem Mann-Whitney-Test zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,0002$) zwischen beiden Gruppen.

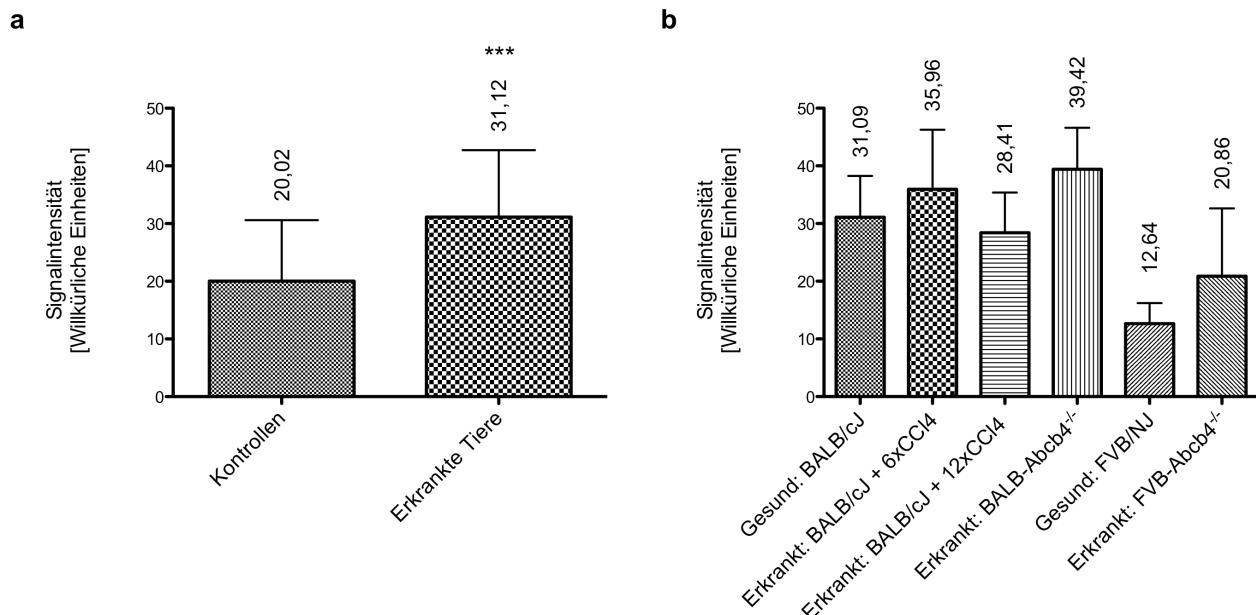


Abbildung 74: Vergleich der in der T2-gewichteten MRT mit Fettsättigung gemessenen Signalintensitäten für gesunde Kontrolltiere und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- *** Signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen unbehandelten und 6x mit CCl₄ injizierten BALB/cJ-Mäusen, $p=0,0002$
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

Teilt man die Messwerte nach den verschiedenen Krankheitsmodellen und Tierstämmen auf, zeigen sich für die Signalintensitäten Unterschiede vor allem zwischen den verschiedenen Tierstämmen. Die mittlere Signalintensität wird für gesunde BALBcJ-Kontrolltiere mit 31,09 willkürlichen Einheiten bestimmt. Für 6x CCl₄-behandelte Tiere 35,96 werden willkürliche Einheiten gemessen. 12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere weisen einen niedrigeren Mittelwert von 28,41 willkürlichen Einheiten auf. Für BALB-Abcb4^{-/-} Mäuse wird eine mittlere Signalintensität der Leber von 39,42 willkürlichen Einheiten gemessen. FVB/NJ-Tiere mit und ohne funktionsfähigem Abcb4-Gen weisen dagegen deutlich geringere mittlere Signalintensitäten von 12,46 willkürlichen Einheiten (FVB/NJ) bzw. 20,86 willkürlichen Einheiten (FVB-Abcb4^{-/-}) auf (Abb. 74 b). Wendet man den Shapiro-Wilk-Test auf die verschiedenen Versuchstiergruppen an, zeigt sich für Tiere des BALB/cJ-Genotyps und zugehörige Knockouts eine Normalverteilung der Messwerte.

Die Signalintensitätswerte für FVB/NJ Mäuse und FVB-*Abcb4* Knockouts sind dagegen nicht normal verteilt. Die statistische Analyse mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit Test nach Dunn berechnet keine Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen.

4.5.5.6.2.Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Für die Gesamtheit gesunder Kontrollen ergibt sich ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) von 7,54. Für die Zusammenfassung der erkrankten Versuchstiere wird ein Wert von 10,39 bestimmt (Abb. 75 a). Die Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests zeigt, dass für beide Gruppen keine Normalverteilung der Messwerte vorliegt. Analysiert man die Messergebnisse mit dem Mann-Whitney-Test, wird ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen berechnet ($p=0,0079$).

Bei Betrachtung der verschiedenen nach Ätiologie und Genotyp getrennten Versuchstiergruppen zeigen sich deutlichere Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierstämmen (Abb. 75 b).

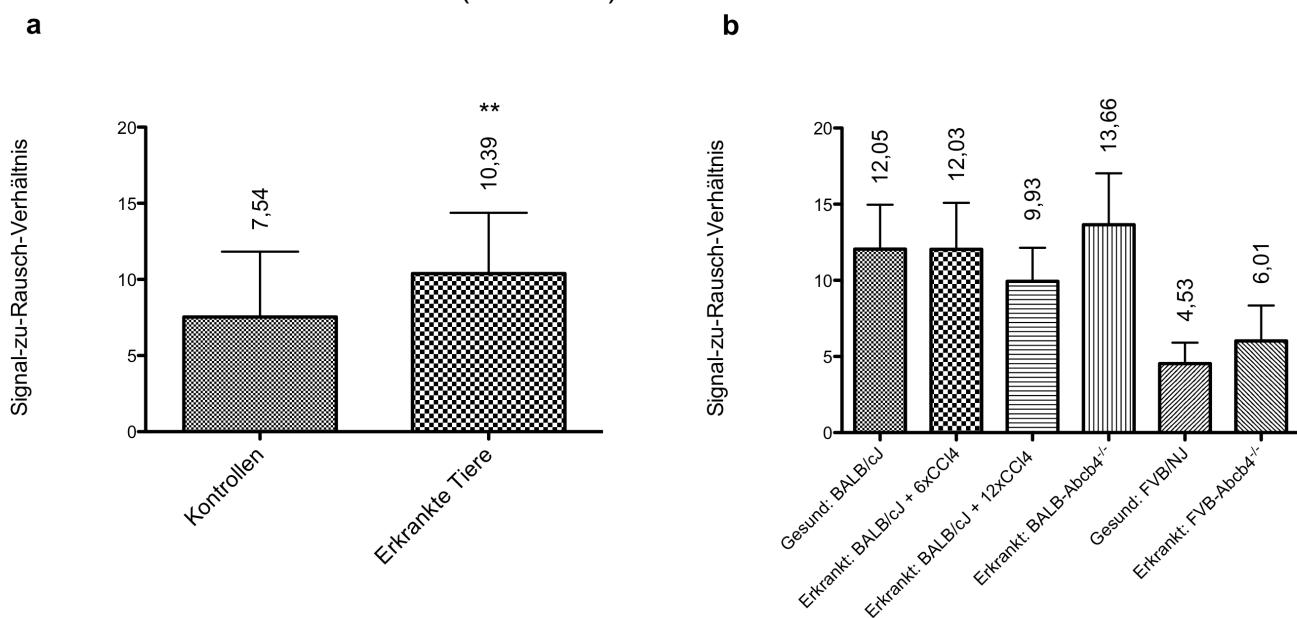


Abbildung 75: Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der T2-gewichteten MRT mit Fettsättigung für gesunde Kontrollen und erkrankte Tiere

- a Mittelwerte und Standardabweichung aller Kontrolltiere im Vergleich zu allen Fibrosetieren
- ** Signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und erkrankten Tieren ($p=0,0079$)
- b Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen

Innerhalb der miteinander zu vergleichenden Tiergruppen bleiben die Unterschiede des SNR gering. Für BALB/cJ Kontrolltiere wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf 12,05 bestimmt. Für 6x bzw. 12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere wird ein SNR von 12,03

bzw. 9,932 berechnet. BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse zeigen mit 13,66 den höchsten Wert. Für FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere werden mit 4,53 bzw. 6,02 deutlich geringere Werte ermittelt. Die Analyse mit dem Shapiro-Wilk-Test zeigt, dass nur für die Messwerte gesunder bzw. 12x mit CCl₄ behandelter BALB/cJ Tiere eine Normalverteilung vorliegt. Wendet man den Kruskal-Wallis-Test mit Test nach Dunn an, kann für das SNR kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Kontrolltieren und zugehörigen Krankheitsmodellen nachgewiesen werden.

4.5.5.6.3. Korrelationen zwischen Histologie und Biochemie und Messgrößen aus der MRT-Untersuchung

Auch für die T2-gewichtete TSE-Sequenz lassen sich für die Gesamtheit der SI- und SNR-Messwerte signifikante positive Korrelationen mit dem Hydroxyprolingehalt der Leber (Abb. 76 und 77) nachweisen. Untersucht man mögliche lineare Zusammenhänge auf Ebene der verschiedenen verwendeten Tiermodelle, kann für BALB-*Abcb4*^{-/-} und unbehandelte BALB/cJ Mäuse eine signifikante positive Korrelation der SI mit dem Fibrotescore (Abb. 78) berechnet werden. Für die Serumaktivitäten der AP kann ein positiver signifikanter Zusammenhang mit der Leber-Signalintensität der Gesamtheit CCl₄-behandelter Versuchstiere dargestellt werden ($r_{Pearson}=0,5441$, $r_{Spearman}=0,4597$). Untersucht man nach der Anzahl der CCl₄-Injektionen getrennt, lassen sich keine signifikanten linearen Zusammenhänge feststellen. Für die Serumaktivität der AST gelingt dagegen ein Nachweis der signifikanten positiven Korrelation mit der Leber-Signalintensität von FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäusen ($r_{Pearson}=0,4725$, $r_{Spearman}=0,5377$).

4.5.6. Zusammenfassung für die Messungen auf Basis konventioneller MRT-Untersuchungen

In den Tabellen 26 und 27 werden die Ergebnisse der statistischen Untersuchung für die Signalintensitäten und die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der verschiedenen Versuchstiergruppen zur Übersicht zusammengefasst.

Abbildung 76: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalintensität und Hydroxyprolingehalt der Leber für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

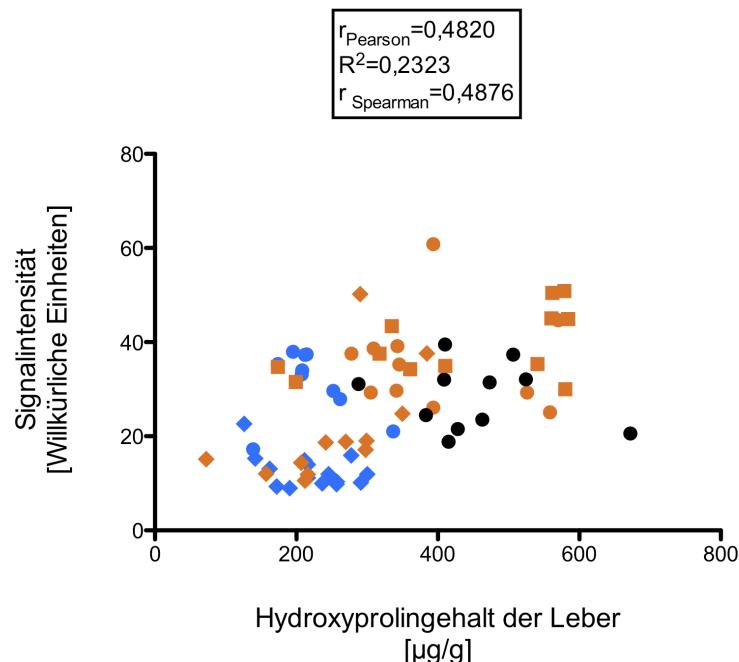


Abbildung 77: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalzu-Rausch-Verhältnis und Hydroxyprolingehalt der Leber für alle Versuchstiere

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB/cJ + 6xCCl₄
- Erkrankt: BALB/cJ + 12xCCl₄
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}
- ◆ Gesund: FVB/NJ
- ◆ Erkrankt: FVB-*Abcb4*^{-/-}

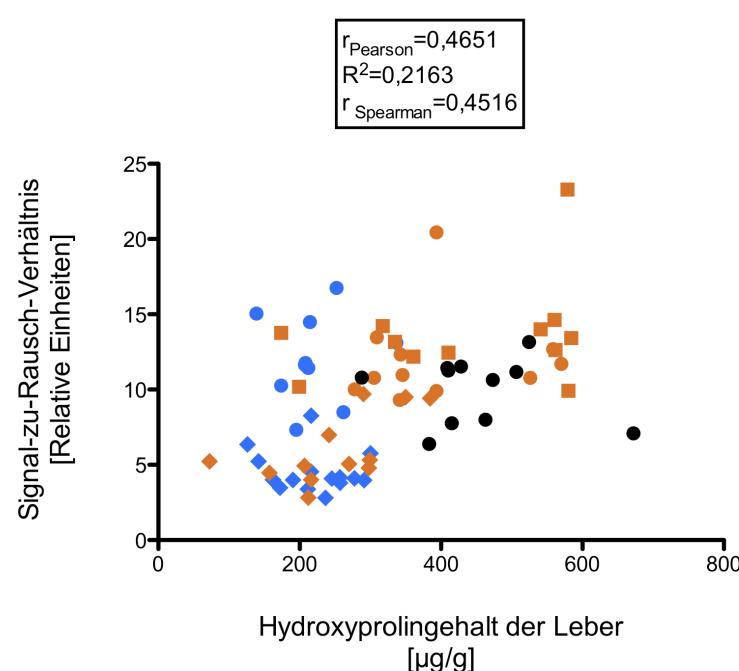


Abbildung 78: Punktwolkendiagramm und Korrelationskoeffizienten für Signalintensität und FibroScore für BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse und Kontrollen

Legende:

- Gesund: BALB/cJ
- Erkrankt: BALB-*Abcb4*^{-/-}

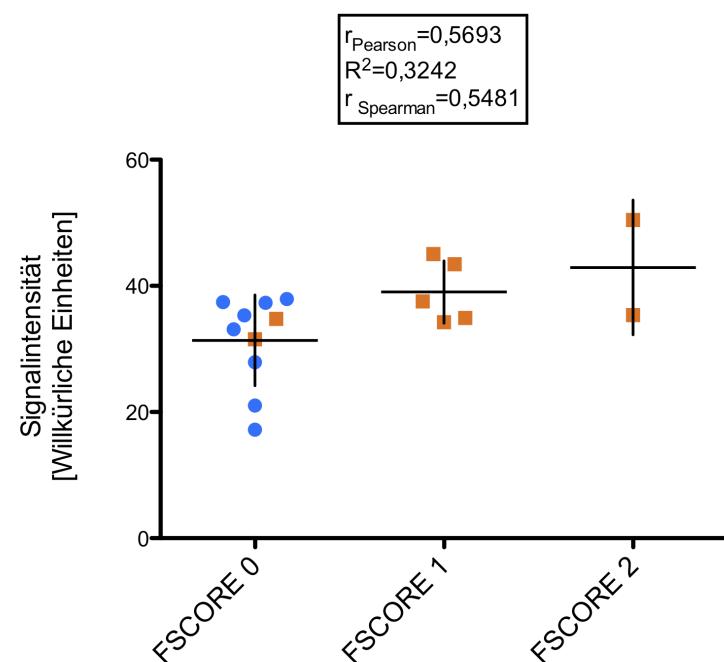


Tabelle 26: Signifikanz der Unterschiede der mittleren Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen

Blau: Signifikant höherer Wert

Rot: Signifikant niedrigerer Wert

Tiergruppe	T1-gewichtet		Intermediär		Intermediär fettgesättigt		T2*-gewichtet		T2-gewichtet		T2-gewichtet fettgesättigt	
	SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR
Kontrollen vs. erkrankte Tiere	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,0021	0,023	0,0002	0,0062
BALB/cJ vs. 6x CCl ₄	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
BALB/cJ vs. 12x CCl ₄	>0,05	<0,01	<0,0001	<0,001	<0,001	<0,0001	<0,0001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
BALB/cJ vs. BALB-Abcb4 /-	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
FVB/NJ vs. FVB-Abcb4 - /-	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	<0,0001	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Tabelle 27: Korrelationen der mittleren Signalintensitäten mit Hydroxyprolingehalt und FibroScore für die verschiedenen Versuchstiergruppen nach Pearson (obere Reihe) und Spearman (untere Reihe)

Blau: Signifikante positive Korrelation

Rot: Signifikante negative Korrelation

Tiergruppe	Histologie	T1-gewichtet		Intermediär		Intermediär fettgesättigt		T2*-gewichtet		T2-gewichtet fettgesättigt	
		SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR	SI	SNR
Kontrollen vs. erkrankte Tiere	Hydroxy- prolingehalt	0,1830	-0,0376	0,1499	-0,2153	0,1518	0,0551	0,2656	0,1913	0,4889	0,3647
	Fibrose- score	-0,2003	-0,3697	-0,1763	-0,2661	-0,0369	-0,1112	-0,1678	-0,2381	0,1198	0,1081
	-0,2240	-0,3407	-0,2590	-0,2732	-0,0778	-0,1269	-0,2288	-0,2640	0,1062	0,0254	0,1827
BALB/cJ vs. CCl ₄ gesamt	Hydroxy- prolingehalt	-0,1926	-0,3541	-0,5056	-0,6186	-0,3995	-0,4084	-0,5420	-0,6211	-0,2133	-0,2594
	-0,2055	-0,3963	-0,5532	-0,6887	-0,4133	-0,4331	-0,5886	-0,6509	-0,1703	-0,3166	-0,1584
	-0,3082	-0,4989	-0,5990	-0,6289	-0,3007	-0,3982	-0,7025	-0,7144	-0,0751	-0,0937	0,0704
BALB/cJ vs. 6x CCl ₄	Fibrose- score	-0,3507	-0,5157	-0,6238	-0,6283	-0,2821	-0,3753	-0,7189	-0,7040	-0,1239	-0,2094
	Hydroxy- prolingehalt	-0,0287	-0,1692	-0,3970	-0,5884	0,0183	-0,1543	-0,4134	-0,5011	0,0990	0,0043
	-0,1098	-0,1364	-0,4852	-0,4982	-0,0721	-0,1215	-0,4411	-0,5515	0,1637	-0,0786	0,0617
BALB/cJ vs. 12x CCl ₄	Fibrose- score	-0,0287	-0,1692	-0,3840	-0,4770	0,2191	-0,0441	-0,5042	-0,5385	0,3164	0,2121
	-0,2120	-0,2332	-0,4546	-0,4867	0,2371	0,0259	-0,5759	-0,4388	0,2964	0,0442	0,2498
	-0,3433	-0,5135	-0,6747	-0,6335	-0,7674	-0,6328	-0,6861	-0,7571	-0,4794	-0,4653	-0,2626
BALB/cJ vs. BALB- Abcb4 -/-	Hydroxy- prolingehalt	-0,2675	-0,5416	-0,6286	-0,7039	-0,7247	-0,6558	-0,6571	-0,7364	-0,3558	-0,4727
	-0,4020	-0,6439	-0,8134	-0,8008	-0,8609	-0,7014	-0,9412	-0,8677	-0,5271	-0,3655	-0,2216
	-0,3271	-0,6104	-0,8325	-0,8138	-0,8471	-0,7194	-0,8737	-0,8737	-0,4402	-0,3737	-0,2314
BALB/cJ vs. BALB- Abcb4 -/-	Fibrose- score	-0,3564	-0,0201	-0,1965	-0,2321	0,0060	-0,2190	0,1486	-0,0211	0,5285	0,1263
	Hydroxy- prolingehalt	0,2998	-0,1863	-0,2298	-0,2526	-0,0254	0,1824	0,1372	-0,0909	0,4489	-0,0402
	0,5661	-0,1947	-0,1973	-0,2089	-0,0795	-0,1942	0,3424	0,0030	0,5953	-0,0303	0,5693
FVB/NJ vs. FVB-Abcb4 -/-	Fibrose- score	0,5774	-0,1562	-0,2943	-0,1732	-0,2391	0,0739	0,2538	-0,0990	0,6932	-0,0680
	Hydroxy- prolingehalt	0,3348	0,2814	0,3075	0,1988	0,2991	0,1990	0,3565	0,3587	0,4477	0,3352
	0,3730	0,3651	0,3525	0,2331	0,3488	0,2303	0,3806	0,4447	0,2706	0,2480	0,2810
Fibrose- score	0,1838	0,1736	0,4718	0,4547	0,3087	0,4544	0,3992	0,2932	0,1787	0,0314	0,2010
	0,1955	0,1602	0,4806	0,3392	0,4052	0,3392	0,4099	0,2898	0,3157	0,1979	0,4476
											0,2026

5. Diskussion

5.1. Etablierung und Optimierung von Bildgebung und Relaxometrie

Morphologische und quantitative MRT-Verfahren zur Darstellung des Oberbauchs lassen sich unter Anwendung unterschiedlicher Strategien zur Artefaktunterdrückung erfolgreich anwenden. Für Gradientenecho-Sequenzen ist dabei die Atemtriggerung mit geeigneter Wahl von Position und Größe des Triggerfensters essentieller Bestandteil der zeitsparenden und möglichst artefaktfreien Versuchsdurchführung.

Für Turbospinecho-Sequenzen kann die Beeinträchtigung der Bildqualität durch Bewegungsartefakte zusätzlich durch die Wahl der Repetitionszeit, der Anzahl an Einzelschichten und die gewählte Echozuglänge beeinflusst werden. Gegebenenfalls kann bei geschickter Auswahl der Parameter auch auf eine Atemtriggerung verzichtet werden.

Für eine qualitativ hochwertige Bildgebung sollte für GE-Sequenzen eine $TR > 1000$ ms bzw eine $TE > 7,5$ ms vermieden werden. T1-gewichtete Untersuchungen sollten mit der niedrigsten möglichen Kombination aus TR und TE durchgeführt werden, bei der eine adäquate Abdeckung des Zielorgans und eine für die Darstellung der Anatomie der Maus ausreichende Auflösung gewährleistet ist. Im Rahmen der dargestellten Untersuchungen konnten eine TR von 150 ms und eine TE von 2,5 ms nicht unterschritten werden. Durch den Einsatz einer an die Anatomie der Maus angepassten Volumenspule ließ sich die Bildqualität für diese Rahmenbedingungen deutlich verbessern. Entsprechend gute Ergebnisse wurden bei Einsatz einer nicht fettgesättigten TSE-Sequenz zur T2-gewichteten MRT-Bildgebung des Mausabdomens erzielt. Dass die Verwendung einer möglichst dedizierten Spule zu einer Verbesserung der Bildqualität führt, ist nicht überraschend.

Einschränkend muss zu dem oben Festgestellten gesagt werden, dass lediglich eine subjektive Einschätzung der Bildqualität erfolgte. Berücksichtigt man die Vielzahl an veränderbaren Parametern und deren Abhängigkeiten untereinander, ist eine streng systematische Prüfung und Optimierung der MR-Sequenzen mit vertretbarem Aufwand jedoch nicht möglich.

5.2. Histologische und biochemische Charakterisierung der Versuchstiere

Zur Charakterisierung der Leberfibrose wurden zwei Tiermodelle mit unterschiedlicher genetischer Grundausstattung eingesetzt. Sowohl die Tiermodelle an sich als auch die verwendeten Tierstämme beeinflussen den Schweregrad der beobachteten Leberfibrose. Kommt es bei der vollständigen Inaktivierung des *Abcb4*-Gens in der Maus zur Ausbildung einer moderaten Leberfibrose (Fickert et al. 2004), so erzeugen CCl₄-Injektionen eher schwerere Erkrankungsformen. Untersucht man die beiden verwendeten Tierstämme auf ihre Fibroseempfindlichkeit, so zeigt sich, daß BALB/cJ Mäuse empfindlicher sind als FVB/NJ Versuchstiere (Hillebrandt et al. 2002).

Entsprechend wurde ein zunehmender Schweregrad der sich in den Versuchstieren entwickelnden Leberfibrose von FVB-*Abcb4*^{−/−} über BALB-*Abcb4*^{−/−} und 6x mit CCl₄ behandelten Versuchstieren zu 12x CCl₄-injizierten BALB/cJ Mäusen erwartet.

Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs wurde der Schweregrad der Fibrose durch einen erfahrenen Pathologen bestimmt. Zusätzlich wurden der Hydroxyprolingehalt im Lebergewebe, die kollagenpositive Fläche im histologischen Schnitt sowie die Serumaktivitäten der Enzyme AP, AST und ALT bestimmt.

Für die Beurteilung des Schweregrades einer Leberfibrose sind der Hydroxyprolingehalt, der Fibrosescor und die kollagenpositive Fläche im histologischen Schnitt von besonderem Interesse, weil sie die direkt für die Entstehung einer Leberfibrose verantwortliche Kollagensynthese und -deposition qualitativ und quantitativ beschreiben.

Bei der Hydroxyprolinbestimmung handelt es sich um ein etabliertes und an einer Vielzahl von Erkrankungsmodellen erprobtes Kollagen-Quantifizierungsverfahren (Jamall et al. 1981, modifiziert nach Hillebrandt et al. 2002). Wie erwartet zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Kontrolltieren und der Gesamtheit der erkrankten Versuchstiere. Ein signifikanter Unterschied kann ebenfalls zwischen BALB/cJ Kontrolltieren und CCl₄-behandelten bzw. BALB-*Abcb4*^{−/−} Mäusen gezeigt werden. Dabei wird bei BALB/cJ Knockout-Tieren ein sehr hoher Mittelwert für Hydroxyprolin gemessen, der nicht dem erwarteten Niveau zwischen CCl₄-behandelten BALB/cJ Versuchstieren und FVB-*Abcb4*^{−/−} Mäusen entspricht. In einer von Roderfeld et al. 2009 publizierten Studie wurden für Vehikel-behandelte, etwa gleichalte BALB-*Abcb4*^{−/−} Versuchstiere nahezu identische Werte gemessen (Roderfeld

et al. 2009). Entsprechend werden die in dieser Untersuchung bestimmten Werte als realistisch betrachtet.

Im Gegensatz dazu wird für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse der mittlere Hydroxyprolingehalt des Lebergewebes nur geringfügig höher bestimmt als für FVB/NJ Kontrolltiere. Dies ist konsistent mit dem niedrigen Fibosescore dieser Versuchstiergruppe (siehe unten). Eine zur Verifizierung hilfreiche Bestimmung der kollagenpositiven Fläche im histologischen Schnitt konnte bei FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäusen nicht durchgeführt werden. Allerdings wurden von Barikbin et al. 2012 in einer Studie zur Rolle der Hämoxigenase-1 bei der Entstehung einer Leberfibrose vergleichbare Werte für 12 Wochen alte FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere gemessen, die mit Vehikel behandelt worden waren (Barikbin et al. 2012). Entsprechend wird die im Vergleich zu BALB-*Abcb4*^{-/-} Mäusen niedrigere Kollagenmenge als Folge der geringeren Fibroseempfindlichkeit der FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere interpretiert.

Für die Bestimmung des Fibroscores werden neben der Menge und Art der bindegewebigen Veränderungen des Lebergewebes zusätzlich der Grad der Gewebeschädigung, eine etwaige Infiltration durch Zellen des Immunsystems sowie das Vorliegen bzw. die Schwere einer Schädigung der Gallengänge berücksichtigt.

Die Bestimmung des Fibroscores zeigt wie erwartet erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen. Mit CCl₄ behandelte Versuchstiere zeigen dosisabhängig die höchsten Werte (Median von 2 entsprechend einer zentroportalen Fibrose mit Ausbildung dünner zentro-zentraler oder zentro-portaler Septen für 6x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere, Median von 3 entsprechend einer septalen Fibrose mit zahlreichen zentro- oder porto-portale Septen, vereinzelter Brückenbildung und geringgradiger Störung der Leberarchitektur für 12x injizierte Mäuse), die sich signifikant von Kontrolltieren unterscheiden. Die fibrotischen Veränderungen der *Abcb4*^{-/-} Tiere zeigen wie erwartet ein geringeres Niveau. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem robusteren FVB/NJ- und dem empfindlicheren BALB/cJ-Grundtyp sowohl untereinander als auch zu entsprechenden Kontrollen (jeweils Median 0 vs. 1, arithmetisches Mittel 0 vs. 1,22 für FVB-*Abcb4*^{-/-} bzw. 1,0 für BALB-*Abcb4*^{-/-}, entsprechend einer beginnenden zentralen oder portalen Fibrose mit geringer Verbreiterung des Portal- oder Zentralraums) kann aufgrund der zu geringen Anzahl an Versuchstieren nicht gezeigt werden.

Die Bestimmung des Anteils kollagenpositiver Areale an der Gesamtfläche der Leber schließlich stellt ein zwischen der histopathologischen Begutachtung und der

biochemischen Quantifizierung stehendes Verfahren dar. Es beruht auf einer selektiven Kollagenfärbetechnik, nutzt aber histologische Methoden zur Messung.

Auch mit diesem Verfahren können erneut signifikante Unterschiede zwischen der Gesamtheit der gesunden und der erkrankten Tiere nachgewiesen werden.

Für die nach den verschiedenen Ätiologien und Genotypen aufgeteilten Daten ergibt sich ein zur Bestimmung des Fibroscores und des Hydroxyprolingehalts unterschiedliches Bild.

So bestätigt sich einerseits der relativ hohe Hydroxyprolingehalt der BALB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere. Andererseits kann für 6x CCl₄-behandelte Versuchstiere keine vergrößerte Fläche der Proteinablagerung im Gewebe nachgewiesen werden.

Grundsätzlich wird vermutet, dass sich unterschiedliche Mechanismen der Zellschädigung, die sich auch in unterschiedlichen Typen einer Fibroseausbildung manifestieren (CCl₄-Behandlung: primär zentro-zentrale Fibrose nach initialer Fettstoffwechselstörung bzw. Zerstörung von Hepatozyten, *Abcb4*^{-/-} Mutanten: primär porto-portale Fibrose nach Schädigung von Cholangiozyten und Hepatozyten), auch unterschiedliche Geschwindigkeiten in der Ausbildung spezifischer Symptome zeigen. Zudem kann sich auch das lokale Volumen des Extrazellularraums der portalen Trias bzw. um die Zentralvenen auswirken. Ein weiterer variierender Faktor ist der Grad der initialen Zellschädigung. Sind größere Bereiche zunächst durch nekrotische Gewebezerstörung verändert, lässt sich eine zunächst verzögerte Narbenbildung vermuten.

Neben diesen durch die Tiermodelle bzw. durch die unterschiedlichen Pathophysiologien selbst bedingten Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen der Versuchstiere kommen weitere Gründe für die beobachteten Abweichungen von den erwarteten Veränderungen des Hydroxyprolingehalts, des Fibroscores und der kollagenhaltigen Fläche im Schnittpräparat in Frage.

Ein grundsätzliches Problem stellt die selbst für genetisch identische Versuchstiere bestehende, biologisch bedingte Variabilität der Gewebeproben dar.

Auch die Gewinnung des Untersuchungsmaterials kann in diesem Zusammenhang ein Problem darstellen, da die Lebern der Versuchstiere aus Standardisierungsgründen nach einem festen Schema für die Versuche eingesetzt wurden, die Leber aber eine Zonierung aufweist, so dass die unterschiedlichen Leberlappen in der Regel unterschiedlich stark von fibrotischen Veränderungen betroffen sind.

Schließlich können auch im Rahmen der Beurteilung des Probenmaterials durch den Pathologen Fehler auftreten. Zwischen den Beurteilungen von Biopsiematerial fibrotischer Lebern zeigte sich für erfahrene Untersucher ein Unterschied von bis zu 20%, entsprechend einer Stufe des angewendeten Fibroscores (Bravo et al. 2001).

Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass für die mikroskopische Analyse der Gewebeveränderungen in der Regel nur ein kleiner Teil der Leber untersucht wird.

Da das Ziel der MRT-Untersuchungen in der Identifizierung quantitativer Marker zur Stadienbestimmung der Leberfibrose bestand, wurde besonderes Augenmerk auf Korrelationen der MR-Messwerte mit dem Hydroxyprolingehalt der Leber gelegt. Als zusätzlicher Kontrollwert wurde der Fibroscore genutzt, denn beide Parameter - Hydroxyprolingehalt und Fibroscore - weisen signifikante Unterschiede zwischen gesunden und kranken Tieren auf.

5.3. Relaxometrische Untersuchung an Leberfibrose erkrankter Versuchstiere

Die Tabellen 23 bis 25 fassen alle statistisch signifikanten Unterschiede in den Versuchsergebnissen der MR-Relaxometrie zusammen. Für die Relaxationszeiten T1 und T2 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gesamtheiten gesunder Kontrolltiere und erkrankter Versuchstiere gezeigt werden. Dabei wurden für erkrankte Tiere höhere Werte für T1 und T2 gemessen, während die Relaxationszeit T2* für diese beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied zeigte (Tab. 24).

Eine Untersuchung der Unterschiede auf Ebene der verschiedenen Ätiologien und Genotypen zeigt ebenfalls signifikant höhere Werte von T1 für 6x mit CCl₄ behandelte BALB/cJ-Mäuse als für die jeweiligen Kontrolltiere, während für 12x CCl₄-behandelte Versuchstiere und *Abcb4*-Verlustmutanten auf Basis des Genotyps BALB/cJ zwar leicht erhöhte, aber im Vergleich zu Kontrolltieren nicht signifikant unterschiedliche T1-Zeiten gemessen wurden.

Dabei werden signifikante Korrelationen zwischen Hydroxyprolingehalt und Fibroscore und Signalintensität und Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Ätiologien bzw. Genotypen beobachtet, für die (mit wenigen Ausnahmen) auch in den Relaxationszeitmessungen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen berechnet werden konnten (Tab. 25).

Chow et al. konnten 2011 in MRT-Messungen einer Längsschnittstudie bei 7 Tesla für Mäuse einen stabilen Anstieg für T1 und T2 nach 4 bis 16 CCl₄-Gaben über einen Zeitraum von bis zu 8 Wochen zeigen. Insgesamt wurden 12 Mäuse untersucht, von denen zu jedem Messzeitpunkt zwei Tiere zur histologischen Untersuchung getötet wurden. Die Ergebnisse dieser Studie sind mit den hier vorgestellten Ergebnissen nicht vergleichbar.

So wurde in dieser Untersuchung mit C57/BL6J ein für die Ausbildung von Leberfibrosen im Vergleich zu BALB/cJ weniger empfindlicher Tierstamm genutzt (Hillebrandt et al. 2005, Shih et al. 1997). Unterschiede in der Empfindlichkeit für die Ausbildung von Leberfibrosen wurden auch für die vier in dieser Untersuchung verwendeten Genotypen der Maus beschrieben. Diese Unterschiede in der Pathophysiologie manifestieren sich auch in MRT-Untersuchungen der Leber, wie in unserem Fall aus dem unterschiedlichen Verhalten von BALB/cJ- und FVB-*Abcb4*-Knockouts ersichtlich wird.

Des Weiteren wurden die von Chow et al. erhobenen Daten nicht mit Kontrollgruppen gleichaltriger Tiere verglichen. Die Referenzwerte für T1 und T2 wurden vor Beginn der CCl₄-Administration an später mit dem hepatotoxischen Agens behandelten Tieren bestimmt, so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch altersbedingte Veränderungen der Leber der Versuchstiere nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem wurden keine Daten über die Korrelation der T1- und T2-Zeiten mit histologischen und biochemischen Parametern der Leberfibre dargestellt.

Zusätzlich sollte daraufhin gewiesen werden, daß in einem Tiermodell der subakuten alkoholbedingten Leberschädigung nach 28 Tagen einer kombinierten fettreichen und alkoholhaltigen Diät, deutliche Unterschiede in der Bildung einer Steatohepatose, einer Leberentzündung sowie einer Leberzellnekrose zwischen den Stämmen C57/BL6J, BALB/cJ und FVB/NJ gezeigt werden konnten (Tsuchiya et al. 2012). Dabei stellten sich C57/BL6J-Mäuse als insgesamt am empfindlichsten heraus, während sich FVB/NJ-Tiere im Vergleich als am unempfindlichsten erwiesen. BALB/cJ-Mäuse nahmen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer fettreichen, um Ethanol ergänzten Diät eine Zwischenstellung ein.

Leberzellnekrose, -entzündung und -steatitis werden auch nach Injektion oder oraler Gabe von CCl₄ beobachtet. Bei einer quantitativen Ausbildung sowohl von Leberzellnekrosen als auch einer Leberentzündung wird eine Erhöhung von T1 und T2 als Folge einer Wasserretention bzw. Ödembildung im Lebergewebe erwartet (z. B.

Chalumeau et al. 2005). Während die Entwicklung einer Lebersteatose ohne begleitende Hepatitis im Versuchstier zu einer Verringerung von T1 und einer Erhöhung von T2 führt, zeigt sich für das Vorliegen einer Leberentzündung auch bei gleichzeitiger Fettdeposition im Tierexperiment ein Anstieg von T1 und T2 (Kreft et al. 1992). Eine Kollagendeposition sollte dagegen zu einer Verringerung von T1 und T2 im Vergleich zu Kontrolltieren führen (Stark et al. 1983, Stark et al. 1984, Kreft et al. 1999, Aubé et al. 2007).

Das Auftreten von Leberzellnekrosen als akute Folge einer CCl₄-Administration kann für die durchgeführten magnetresonanztomographischen Experimente aufgrund des gewählten Untersuchungszeitpunktes 48 Stunden nach der letzten CCl₄-Administration ausgeschlossen werden. Für die Untersuchungen von Chen et al. gilt dies dagegen nicht, da eine Karenzzeit zwischen der Administration der finalen CCl₄-Dosis und der relaxometrischen Untersuchung von den Autoren nicht angegeben wird.

5.3.1. Veränderungen der T1-Zeit

Die anscheinend transiente Erhöhung der Relaxationszeit T1 im Modell der tetrachlorkohlenstoffinduzierten Leberfibrose bei BALB/cJ-Mäusen wird von einem in diesem Zusammenhang relevanten, unerwarteten histopathologischen Befund begleitet. Für diese Versuchstiere zeigt sich eine Diskrepanz zwischen der im Lebergewebe bestimmten Menge an Hydroxyprolin und der kollagenpositiven Fläche im Schnitt. Für 6x CCl₄-behandelte Versuchstiere erhöhen sich (wie unter 5.3 diskutiert) die Hydroxyprolinwerte signifikant im Verhältnis zu Kontrolltieren, eine Vergrößerung der kollagenpositiven Fläche im histologischen Schnitt lässt sich dagegen nicht nachweisen.

Eine entsprechende quantitative, am Schnittbild geplante und für eine konstante Voxelzahl durchgeführte Messung wird entsprechend gering durch die erhöhte Biosynthese des Kollagens beeinflusst. Stattdessen werden die für T1 gemessenen Werte vorwiegend durch den Grad der Leberentzündung und -verfettung bzw. der Wasserretention im Lebergewebe beeinflusst.

12x mit CCl₄ behandelte Versuchstiere zeigen dagegen sowohl eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren als auch zu 6x mit CCl₄ injizierten Versuchstieren einen deutlich erhöhten mittleren Hydroxyprolinwert sowie einen deutlich erhöhten kollagenpositiven Gewebeanteil. Die deutlich höhere Kollagendeposition führt dabei,

zusammen mit einer wahrscheinlich deutlich verringerten Steatohepatitis zu einer Verringerung der T1-Werte bei 12x CCl₄-behandelte BALB/cJ-Mäusen.

Der transiente Charakter der sich nach der Gabe von Tetrachlorkohlenstoff ausbildenden Steatohepatitis ist zumindest für die Laborratte histologisch und magnetresonanztomographisch gut charakterisiert (Geerts et al. 1990, Kim et al. 2008). In einer multimodalen MRT-Studie zur Leberfibrose an 2 bis 16 Wochen mit CCl₄ behandelten Ratten bestimmten Kim et al. 2008 die relativen Anteile von Fett und Wasser (IDEAL-Algorithmus nach Reeder et al. 2005) sowie als Charakteristika der Gewebeperfusion die mittlere Transitzeit und das Verteilungsvolumen mit Hilfe der dynamischen kontrastverstärkten MRT (Materne et al. 2002, Van Beers et al. 2003). Die histologische Untersuchung zeigte einen monotonen Anstieg des Fibroscores in Abhängigkeit von der applizierten CCl₄-Dosis, während 6 bis 8 Wochen nach Beginn der Tetrachlorkohlenstoffinjektionen für den Anteil fetthaltiger Hepatozyten ein Maximum erreicht wurde. Elf bis 16 Wochen nach CCl₄-Gabe hatte sich die Anzahl vakuolisierter, mit Lipiden gefüllter Hepatozyten deutlich verringert. Der Fett-Wasser-Quotient zeigt einen sehr ähnlichen, von der Dauer bzw. der Dosis der CCl₄-Injektionen abhängigen Verlauf. Veränderungen der Gewebeperfusion wurden aufgrund der zeitlichen Zusammenhänge mit dem Fett-Wasser-Quotienten und der Anzahl fetspeichernder Hepatozyten als direkt durch die Steatohepatitis verursacht angesehen.

Auch für Versuchstiere mit Knockout des *Abcb4*-Genlocus kann ein signifikanter Unterschied der Relaxationszeit T1 zwischen Kontrolltieren und an Leberfibrose erkrankten Mäusen dargestellt werden. Allerdings betrifft dies nur die Gruppe der Versuchstiere auf Basis des Genotyps FVB/NJ. Die zur Leberfibrose führende Pathophysiologie ist für diese Versuchstiere sehr gut charakterisiert (Fickert et al. 2004, Popov et al. 2005, Lammert et al. 2004) und unterscheidet sich deutlich vom pathophysiologischen Geschehen nach Induktion von Leberfibrosen durch CCl₄-Injektion, bei der es nach einer akuten zentrolobulären Nekrose zu einer Wundheilungsreaktion mit Aktivierung von Zellen des Immunsystems kommt (Starkel et al. 2011). Bei der Geweberegeneration proliferieren parenchymale und nicht parenchymale Zellen, die z. T. nach Transdifferenzierung in Myofibroblasten extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren und deponieren. Die chronische Administration verhindert auf Grund des permanenten Schädigungsprozesses ohne

vorherige Ausheilung ein vollständige Restitution des Lebergewebes und verursacht so die Entwicklung einer Leberfibrose.

Die genetische Inaktivierung des *Abcb4*-Gens führt bei diesen Versuchstieren zu einer relativ definierten und umschriebenen Entzündung im Bereich der kleinen Gallengänge, die auf der ungenügenden Emulgation von Gallensäuren beruht. Durch diese freien Gallensäuren werden die Cholangiozyten der kleinen Gallengänge angegriffen und es kommt zu einer Zerstörung der Basallaminae und eine Unterbrechung der „tight junctions“ des Gallengangepithels. Bereits innerhalb der ersten Lebenswochen der Versuchstiere kommt es zu einer Aktivierung umschriebener entzündlicher Prozesse in deren Abfolge die aktive Rolle von Kuppfer-Zellen und neutrophilen Granulozyten bereits nach wenigen Wochen auf CD4- und CD8-positive Lymphozyten übergeht, deren Zahl im Gewebe weitestgehend konstant bleibt und die nur einen geringen Anteil an der entstehenden Zellschädigung besitzen. Eine Leberverfettung wird nicht beobachtet.

Stattdessen zeigen sich eine Erweiterung der Gallengänge, ein Austritt freier Gallensäuren bis in das Lebergewebe und eine periductale Zunahme kollagenhaltiger Strukturen und Vermehrung von Myofibroblasten. Gleichzeitig erhöht sich die Sekretion wässriger Chlorid- und hydrogencarbonathaltiger Gallenflüssigkeit (Smit et al. 1993) wahrscheinlich durch die großen Cholangiozyten der großen Gallengänge (s. Glaser et al. 2006), durch die der extrazelluläre Wassergehalt der Leber ansteigt.

Entsprechend lässt sich aufgrund der Retention der im Vergleich zu gesunden FVB/NJ wässrig vergrößerten Gallenflüssigkeitsmenge eine Zunahme der T1-Zeit für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse in unserem Modell beobachten.

Für die BALB/cJ-*Abcb4*^{-/-} Tiere wird dieser Prozess eventuell durch die Synthese und Ablagerung großer Kollagenmengen in der Leber überlagert. Die im Vergleich zu FVB/NJ und FBV-*Abcb4*^{-/-} Mäusen beobachtete stärkere Suszeptibilität für die Ausbildung von Leberfibrosen beruht bei diesem Tierstamm auf einer Variante des Gens für den Komplementfaktor C5 (Hillebrandt et al. 2005), dessen Spaltprodukt C5a über direkte Effekte auf makrophagenartige, den C5a-Rezeptor exprimierende Immunzellen in der Leber und durch die chemotaktische Beeinflussung peripherer Zellen des Immunsystems eine Aktivierung entzündlicher Prozesse herbeiführt (Walport 2001). Die Aktivierung des Komplementsystems wird wahrscheinlich bewirkt durch die akute Zellschädigung, durch die Phospholipide und mitochondriale Proteine in den Extrazellularraum übertreten. Da nekrotisch veränderten Zellen regulatorische Proteine

fehlen, die eine Komplementbindung verhindern, kann zudem über die Aktivierung des Komplementsystems eine irreversible Schädigung von Hepatozyten verstärkt werden (Walport 2001). Bei der cholestaticisch bedingten Lebererkrankung (Oshio et al. 1986, Gardinali et al. 1998, Hirai et al. 2001) wie auch im Tiermodell der durch Gallengangligatur verursachten Leberfibrose (Schmitt et al. 2005) scheint die Komplementaktivierung eine Schlüsselrolle zu spielen. Entsprechend moderat stellt sich der Krankheitsverlauf für die von uns untersuchten C5-defizienten FVB-*Abcb4*^{-/-} Mutanten dar (Hillebrandt et al. 2005).

Als Ursache der transienten Erhöhung der T1-Zeit käme für 6x CCl₄-behandelte Versuchstiere ebenfalls eine solche Aufstauung wässrig veränderter Gallenflüssigkeit in der Leber in Betracht. Die für die CCl₄-Schädigung typische Auswirkung betrifft jedoch die großen Gallengänge, deren Anzahl im Lebergewebe deutlich reduziert wird (Glaser et al. 2006). Für die kleinen Gallengänge ist in diesem Zusammenhang eine reaktive Proliferation bekannt.

5.3.2. Veränderungen der T2-Relaxationszeit

Für die Bestimmung der T2-Zeit lässt sich eine Signifikanz beim Vergleich der Gesamtheit der gesunden Kontrollen mit erkrankten Versuchstieren nachweisen. Die statistische Analyse der nach den zugrunde liegenden Ätiologien und Genotypen aufgeteilten Messwerte zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen. Allerdings ergibt sich ein den T1-Zeiten ähnliches Profil der Veränderungen. So weisen 6x CCl₄ behandelte BALB/cJ-Tiere eine höhere T2-Zeit als unbehandelte Kontrollen und 12x mit CCl₄ injizierte Versuchstiere auf. Auch FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse weisen höhere Werte für T2 auf als die zugehörigen FVB/NJ-Kontrollen. Bei Anwendung eines parametrischen Tests ist dieser Unterschied signifikant. Einzig die Gruppe der BALB/cJ-*Abcb4*^{-/-} Tiere zeigt einen vom T1-Wert abweichenden Verlauf. Die zugehörige Gruppe an Messwerten ist allerdings nicht normalverteilt. Dies deutet auf mögliche Fehlerquellen in der Messung hin, weshalb in diesem Zusammenhang nicht weiter über mögliche Korrelationen spekuliert werden soll; hierfür würden Versuchsreihen mit einer größeren Anzahl an Tieren benötigt. Wenn auch keine Signifikanz der Unterschiede zwischen T2-Werten verschiedener Kontrolltiergruppen und verschiedener Kohorten erkrankter Tiere besteht, deuten die beschriebenen Veränderungen doch ebenfalls auf eine zumindest vorrübergehende deutliche Vergrößerung des Extrazellularraums hin.

5.3.3. Veränderungen der T2*-Relaxationszeit

Für die Bestimmung der T2*-Relaxationszeit ändert sich das bisher beobachtete Bild. Zwischen gesunden und erkrankten Versuchstieren findet sich kein signifikanter Unterschied für den Mittelwert von T2*. Vergleicht man dagegen die CCl₄-behandelten Versuchstiere mit unbehandelten BALB/cJ Mäusen, zeigen sich signifikant niedrigere Werte für beide Gruppen Tetrachlorkohlenstoff-behandelter Mäuse. Dabei steigt der für 12x CCl₄-behandelte Versuchstiere gemessende Wert für T2* im Vergleich zu 6x CCl₄-injizierten BALB/cJ Versuchstieren an. Für Knockouts auf Basis dieses Genotyps lässt sich dagegen kein signifikanter Unterschied zu gesunden Kontrolltieren feststellen.

Bedeutendster Faktor für die Veränderung von T2* nach Einwirkung schädigender Substanzen ist die Speicherung (durch die Zerstörung von Zellen) freigesetzter zwei- oder dreiwertigen Eisenionen in der Leber. Dies geschieht in der Regel in der Form von Ferritin oder Hämosiderin. Hauptort der Speicherung vor allem von Hämosiderin sind die normalerweise an der Innenwand der Lebersinusoide lokalisierten Kuppfer-Zellen. Die Ermittlung der Relaxationszeit T2* wird klinisch zur Bestimmung des Eisengehalts der Leber angewendet (Gandon et al. 1994, Argyropoulou und Astrakas 2007, Hankins et al. 2009). Eine Eisenakkumulation tritt dabei in der Leber oft gemeinsam mit einer Steatose auf (Bydder et al. 2010). In einem Modell der diffusen nicht alkoholbedingten Steatohepatitis wurden dementsprechend niedrigere Werte für T2* gemessen als in Kontrolltieren (Okada et al. 2011). Auch durch Veränderungen der Gewebeperfusion, insbesondere des venösen Blutflusses, kann es zu einem Absinken oder Ansteigen von T2* kommen. Entsprechend werden die im Vergleich zu 6x CCl₄-injizierten Mäusen höheren T2*-Werte 12x CCl₄-behandelter Versuchstiere auf eine Veränderung des Verteilungsvolumens und des portalvenösen Flusses infolge einer reduzierten Steatohepatitis zurückgeführt (s. Kim et al. 2008). Allerdings kann es sich durchaus auch um durch die individuellen Unterschiede der Versuchstiere bedingte Schwankungen dieses Messwertes handeln, da die Differenz von T2* zwischen 6x und 12x CCl₄-behandelten Versuchstieren nur 0,59 ms beträgt und keine Signifikanz besitzt.

Für FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere wird im Gegensatz zu CCl₄-behandelten Versuchstieren ein signifikant höherer Wert für T2* als für FVB/NJ Mäuse gemessen. Ausgehend von den Betrachtungen zu T1 kommt als mögliche Ursache der signifikanten T2*-Zeiterhöhung von FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäusen ebenfalls eine Retention von wäßriger Gallenflüssigkeit in der Leber in Betracht.

5.3.4. Eignung der untersuchten relaxometrischen Verfahren zur Durchführung von Longitudinalstudien

Der sehr umschriebene und wenig durch die Einwanderung von Immunzellen gekennzeichnete Prozeß der Ausbildung einer milden Leberfibrose lässt für FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse bei einer Besserung der Gesamtsituation im Bereich der kleinen Gallengänge, z. B. nach erfolgreicher pharmakologischer Intervention, eine schnelle Verringerung der T1- und T2-Zeiten erwarten. Entsprechend ist die in dieser Untersuchung genutzte Methode zur simultanen Bestimmung von T1 und T2, ergänzt um die Bestimmung der Relaxationszeit T2*, gut für die Durchführung von Longitudinalstudien geeignet. Hierbei liegt der Vorteil der MRT eindeutig in der geringen Invasivität der Methode, die wiederholte Untersuchungen an identischen Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten erlaubt. So können nicht nur Messwerte im Verlauf bei identischen Individuen erhoben werden, sondern auch die Anzahl an Tieren für derartige Versuche reduziert werden.

Dabei erscheint ein Einsatz von Versuchstieren des Genotyps FVB-*Abcb4*^{-/-}, die für biochemische und histologische Parameter einer Leberfibrose signifikante Unterschiede zu gesunden FVB/NJ-Versuchstieren aufweisen, wünschenswert. Dies könnte z. B. dadurch gewährleistet werden, dass Experimente mit älteren FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstieren durchgeführt werden, bei denen sich eine fortgeschrittenere Leberfibrose entwickelt hat (s. z. B. Philips et al. 2011). Alternativ könnte eine zusätzliche Schädigung durch die Gabe von CCl₄ oder andere hepatotoxische Substanzen wie Thioacatamid oder Diethylnitrosamin, durch die orale Gabe von Ethanol und/oder eine cholinfreien Diät hervorgerufen werden.

Auch für bis zu 6x mit CCl₄ behandelte BALB/cJ-Mäuse eignet sich die Messung der Relaxationszeiten T1, T2 und T2* zur Durchführung von Longitudinalstudien, weil auch hier simultane Veränderungen von T1 und T2* zur Beurteilung der Leberzirrhose herangezogen werden können. Der primär resultierenden Beobachtungszeitraum von ca. drei Wochen, gefolgt von einem von der Erholung der Versuchstiere abhängigen Zeitraum kann für die Untersuchung frühzeitiger pathophysiologischer Veränderungen mit und ohne pharmakologische Eingriffe genutzt werden. Gerade auch die Aktivierung der für das Krankheitsgeschehen eine Schlüsselrolle einnehmenden hepatischen Stern-Zellen (Suh und Jeong 2011) findet im CCl₄-Modell zu einem sehr frühen Zeitpunkt statt. Wang et al. konnten 2011 mit Hilfe eines für aktivierte hepatische Sternzellen spezifischen Kontrastmittels zeigen, dass bei der Ratte eine massive Aktivierung bereits

nach 6 CCl₄-Injektionen erfolgt ist. Für die Labormaus wird, entsprechend der geringeren Körpergröße und Lebensspanne, ein deutlich vorverlegtes Geschehen erwartet. Die bereits in den ersten Stadien der Krankheitsentstehung mit der Aktivierung der hepatischen Sternzellen einhergehende Transdifferenzierung zu Myofibroblasten ist ein für die Kollagensynthese und -deposition sehr wichtiger Schritt (Nieto 2011).

Untersucht man die Korrelation zwischen histologischen und biochemischen Parametern der Leberfibrose und den gemessenen Relaxationszeiten, lassen sich signifikante, moderate bis mittelschwere Korrelationen berechnen. Für Folgestudien wäre in dieser Hinsicht eine Verbesserung, d. h. eine Erhöhung der Korrelationskoeffizienten zwischen Parametern der histologischen, biochemischen und magnetresonanztomographischen Untersuchungen wünschenswert.

Die Rahmenbedingungen der verwendeten MRT-Techniken sicherten eine möglichst genaue Untersuchung und ermöglichen gleichzeitig die Durchführung zusätzlicher, für die Tiergesundheit unbedenklicher MRT-Untersuchungen. Die Dauer der Einzelmessung musste deshalb soweit reduziert werden, dass die Narkosen keine übermäßige Belastung für die Tiere darstellten. Hier musste also ein Kompromiss hinsichtlich der Genauigkeit der MRT-Einzelmessung eingegangen werden. Für die Optimierung der Messverfahren für bzw. in Folgestudien kommen verschiedene Veränderungen in Betracht. Bei der Bestimmung der T1-Zeit könnten Messungen mit mehreren zusätzlichen TR <400 ms und >3000 ms eine Verbesserung bringen, da das verwendete Regressionsverfahren qualitativ besonders profitiert von einer hohen Anzahl an Messpunkten mit niedriger Repetitionszeit (TR) und der Erreichung einer möglichst vollständigen Relaxation, also von der Verwendung einer möglichst hohen TR. Eine durch die veränderte TR resultierende Auflösungsverringerung kann unter Umständen in Kauf genommen werden, so lange eine Differenzierung zwischen Lebergewebe, großen Blutgefäßen, Magen, Dünndarm und Gallenblase möglich bleibt. Am bisher gewonnenen Datenmaterial könnten zudem retrospektiv alternative Regressionsverfahren sowie variierende Vorgehensweisen bei der Definition der zur Messung verwendeten ROI auf eine Verbesserung der Messgenauigkeit, respektive der Korrelation zwischen ermittelter Relaxationszeit und histologischen oder biochemischen Messgrößen überprüft werden.

5.4. Signalintensitätsmessungen des Lebergewebes als Ergänzung zu relaxometrischen Verfahren

Vergleicht man die Ergebnisse der Relaxationszeitbestimmungen mit den Signalintensitätssmessungen, zeigen sich die erwarteten Zusammenhänge nur zum Teil.

Für eine Erhöhung von T1 wird mit einer Erniedrigung der Signalintensität gerechnet. Dieser Zusammenhang zeigt sich in unseren Untersuchungen nicht. Stattdessen wird für die T1-gewichtete Gradientenecho-Untersuchung (GE) von BALB/cJ-Mäusen eine monotone Verringerung der Signalintensität in Abhängigkeit von der Anzahl an CCl₄-Applikationen beobachtet. Für Knockout-Tiere wird dagegen ein Anstieg der Signalintensitäten im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet.

Veränderungen von T2 und T2* gehen dagegen in den korrespondierenden bildgebenden Verfahren (intermediär und T2*-gewichtete GE-Sequenzen bzw. T2 gewichtete TSE-Sequenzen) mit den erwarteten Veränderungen der Signalintensitäten einher (höhere T2 bzw. T2* entsprechen höheren Signalintensitäten, niedrigere T2 oder T2* bewirken geringere Signalintensitäten).

Im Rahmen der MRT-Bildgebung konnte kein universeller Marker der Leberfibrose identifiziert werden. Es zeigten sich jedoch signifikante Korrelationen zwischen den MRT-Messgrößen und histobiochemischen Markern der Leberfibrose. Dabei unterschied sich das Verhalten der verschiedenen Tierstämme und Ätiologien, was aufgrund der unterschiedlichen dominierenden pathophysiologischer Mechanismen auch zu erwarten war. Signalintensitätssmessungen (SI) und Bestimmungen der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SNR) in der Gradientenecho- und der Turbospinecho-MRT zeigen dabei große Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen und Ätiologien. Dabei gilt wie für die Relaxationszeitmessungen, dass sich in der Regel signifikante Korrelationen zwischen der SI bzw. dem SNR und dem Hydroxyprolingehalt bzw. dem Fibroescore dann zeigen, wenn für die entsprechenden Versuchsgruppen auch signifikante Unterschiede zu korrespondierenden Kontrollen dargestellt werden können.

Für CCl₄-behandelte Versuchstiere wurden für nahezu alle angewendeten Sequenzen niedrigere Signalintensitäten und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse bestimmt als für BALB/cJ Kontrolltiere. Signifikante negative Korrelationen von SI und SNR mit histobiochemischen Parametern konnten für GE- und TSE-Sequenzen identifiziert werden. Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Tieren und Korrelationen

zwischen MRT und Histopathologie treten in T2*-gewichteten GE-Sequenz am deutlichsten zu Tage. Insbesondere für 12x behandelte Versuchstiere liegen diese Werte auf einem sehr hohen Niveau (vgl. Aube et al. 2007). Für diese Tiergruppe und zugehörige Kontrolltiere können für die Werte der SNR, des Hydroxyprolingehalts und des Fibroscores Korrelationskoeffizienten von -0,7247 bis -0,8609 berechnet werden.

Für FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere zeigen sich dagegen im Vergleich zu FVB/NJ Kontrollen MRT-Sequenzen fast durchgängig höhere Signalintensitäten und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse. Besonders stark ausgeprägt sind die Unterschiede auch für diese Versuchstiergruppe in der T2*-gewichteten MRT (vgl. Tabelle 26). Zwischen SI und SNR und Parametern der histopathologischen Charakterisierung können für FVB/NJ und FVB-*Abcb4*^{-/-} Mäuse nur selten signifikante schwache positive Korrelationen nachgewiesen werden. Dies liegt wahrscheinlich in der relativ geringen Ausprägung eines fibrotischen Phänotyps durch die FVB-*Abcb4*^{-/-} Tiere begründet (Tabelle 27).

Knockouts auf Basis des Genotyps BALB/cJ zeigen dagegen im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Gendefekt in der Gradientenecho-MRT nur geringfügig unterschiedliche, meist niedrigere SI- und SNR-Werte. In T2-gewichteten MRT-Untersuchungen zeigen sich dagegen im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich höhere Signalintensitäten. Aufgrund höheren Rauschens fallen die Unterschiede in den SNR weniger deutlich aus. Entsprechend lassen sich signifikante Korrelationen zwischen histobiochemischen Parametern und SI-Werten nachweisen, die für korrespondierende SNR-Werte dagegen nicht beobachtet werden.

Für die Magnetresonanztomographie wurden in den letzten Jahren neue, nicht invasive Verfahren entwickelt, die die Kollagendeposition im Lebergewebe aufgrund physikalischer und chemischer Eigenschaften direkt und quantitativ bestimmen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind diese Vefahren nicht in der Lage, indirekte Nachweismethoden, wie die Messung von Relaxationszeiten oder Signalintensitäten in ihrer Korrelation mit histologischen oder biochemischen Parametern des Fibrosegrades zu übertreffen, selbst wenn Untersuchungen an der erheblich größeren Laborratte durchgeführt wurden.

So gelang Salameh et al. 2007 in einer Studie zur MR-Elastographie mit einem nicht invasiven pneumatischen Aktor und einem MRT-Gerät einer Feldstärke von 1,5 Tesla die Darstellung signifikanter Unterschiede der Elastizität und Viskosität des Lebergewebes zwischen 12x bis 17x CCl₄-behandelten Ratten und unbehandelten

Kontrolltieren. Für beide Parameter zeigte sich zudem eine signifikante Korrelation mit dem Hydroxyprolingehalt ($r_{Spearman}=0,6$ bzw. 0,5). Ein FibroScore wurde in dieser Untersuchung nicht erhoben (Salameh et al. 2007). Eine weiterführende Vergleichsstudie derselben Arbeitsgruppe zur Steatose, Steatohepatitis und akuten Leberschädigung durch CCl_4 wurde mit Hilfe eines dedizierten Kleintier-MRT-Geräts mit einer statischen Feldstärke von 7 Tesla durchgeführt (Salameh et al. 2009). Die histologische Charakterisierung erfolgte mit Hilfe einer quantitativen Mikroskopie-Methode nach Siriusrot-Färbung. Eine signifikante positive Korrelation zwischen der Elastizität der Leber und der kollagenpositiven Fläche ($r_{Spearman}=0,6$) ergab sich dabei für die Gesamtheit der Versuchstiere. Bei einer multivariaten Analyse ließen sich keine signifikanten Korrelationen für die einzelnen Versuchstiergruppen feststellen.

Polasek et al. verwendeten dagegen ein Gadolinium-dotiertes zyklisches Polypeptid aus 10 Aminosäuren, für das eine Affinität zu Kollagen Typ I bekannt ist, zur Charakterisierung von Versuchstieren mit Leberfibrose. Dabei wurde die Erkankung mit zwei unterschiedlichen Verfahren induziert. Ratten wurden zu diesem Zweck mit Diethylnitrosamin behandelt, während Mäuse über eine Magensonde für 20 Wochen jeweils 0,1 ml einer 40% CCl_4 -Lösung appliziert bekamen. Dabei zeigten sich insgesamt große inter-individuelle Unterschiede in der Sensitivität gegenüber beiden toxischen Substanzen, respektive in der Ausbildung fibrotischer Leberveränderungen. Zudem ist gerade bei der Gabe von Kontrastmitteln zur Quantifizierung eine sehr genaue Standardisierung der Prozeduren zur Dosisabmessung und -applikation nötig. Nichtsdestotrotz bleibt eine Anfälligkeit gegenüber Fehlern sowohl bei der Abmessung der Kontrastmittel als auch bei der Applikation gerade bei Versuchstieren bestehen (Polasek et al. 2012).

Für das verwendete kollagenspezifische Kontrastmittel konnten deutliche Unterschiede zur Kinetik von Gd-DTPA gezeigt werden. Aufgrund eines verzögerten Auswaschens ergab sich 120 Minuten nach Kontrastmittelgabe für Ratten mit Leberfibrose eine um 70% höhere Signalintensität als für gesunde Kontrolltiere. Für Mäuse betrug der Unterschied im Mittel etwa 50%. In dieser Studie wurden allerdings keine Korrelationen zwischen Ergebnissen der *in vivo*-Untersuchung und Parametern der histobiochemischen Charakterisierung untersucht. *Ex vivo* durchgeführte Untersuchungen zeigten signifikant positive Korrelationen zwischen der in Leberproben gemessenen Gd-Konzentration und dem Hydroxyprolingehalt bzw. dem FibroScore.

Dabei wurden für Mäuse Korrelationskoeffizienten r von 0,77 bzw. 0,79 berechnet. Für Ratten betrugen diese Werte 0,84 bzw. 0,74.

Da die mit Hilfe T1-, intermediär und T2*-gewichteter GE-Sequenzen gemessenen Signalintensitätswerte und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse auch im Vergleich zu Verfahren, die die direkte Quantifizierung von Gewebekollagen anstreben, relativ starke Korrelationen zu Hydroxyprolingehalt und FibroScore aufweisen, erscheint die Ergänzung der relaxometrischen Längsschnittuntersuchungen mit konventionellen MRT-Untersuchungen sinnvoll.

Besonders geeignet zum künftigen Einsatz in Longitudinalstudien der Fibroseentwicklung erscheint die verwendete T2*-gewichtete, GE-basierte Untersuchungstechnik, bei der eine TR von 250 ms mit einer TE von 7,5 ms kombiniert wurde. Die SNR-Bestimmung mit dieser Sequenz liefert einen robusten Messwert, mit dem die Schwere einer Leberfibrose CCl₄-behandelter BALB/cJ Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren eingeschätzt und mit der relaxometrischen Bestimmung von T1, T2 und T2* verglichen werden kann.

Für FVB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere kann für zukünftige Längsschnittuntersuchungen wahrscheinlich eine identische Vorgehensweise gewählt werden. Auch für dieses Erkrankungsmodell wurden signifikante Veränderungen der T1- und der T2*-Relaxationszeit, der Signalintensität und des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses für die T2*-gewichtete MRT gezeigt. Signifikante Unterschiede für T2 werden bei einer unterschiedlichen Vorgehensweise in der Versuchsdurchführung erwartet. Vor der Planung neuer Studien sollte eine kleine Gruppe stärker erkrankter Versuchstiere des gleichen Genotyps auf eine Korrelation zwischen Messwerten für T1, T2, T2*, SI und SNR der Leber und dem FibroScore sowie dem Hydroxyprolingehalt überprüft werden.

Für BALB-*Abcb4*^{-/-} Versuchstiere kann keine Empfehlung für die Durchführung von Longitudinalstudien gegeben werden. Ansätze zur Fortführung magnetresonanztomographischer Untersuchungen bieten sich dennoch. Unter Umständen lassen sich für diese Versuchstiergruppe stärker mit histopathologischen Parametern korrelierende Messwerte mit Hilfe optimierter Messverfahren für die T2-Zeit oder durch Anwendung T2-gewichteter MRT-Techniken mit kürzerer TE (zur Erhöhung des SNR) erzielen. Die endgültige Etablierung im Vergleich zwischen erkrankten und gesunden Versuchstieren aussagekräftigerer T2-gewichteter bildgebender Verfahren durch die Anwendung niedrigerer TEs ≤30 ms wäre gerade für die Untersuchungen der

Mäuse mit homozygotem Gendefekt des *Abcb4*-Transporters wünschenswert, da sich eine über die Zeit gesteigerte Retention wässrigen Gallensekrets in der Leber in Längsschnittuntersuchungen als Signalintensitätserhöhung bemerkbar machen sollte und somit eine weitere Kontrollmöglichkeit bestünde.

Abschließend sollen nun die initialen Fragen beantwortet werden, die zur Entstehung dieser Promotion geführt haben.

1. Wie sinnvoll ist die Bestimmung von Signalintensitäten zur Charakterisierung der Leberfibrose in verschiedenen gewichteten MRT-Sequenzen?
Signalintensität und Signal-zu-Rausch-Verhältnis der verschiedenen gewichteten MRT-Untersuchungen zeigen z. T. eine gute Korrelation zu den drei wichtigsten untersuchten histologischen und biochemischen Parametern der fibrotischen Veränderung. Hervorzuheben ist die T2*-gewichtete Bildgebung, deren Einsatz zur Charakterisierung der Schwere einer Leberfibrose für zwei der drei untersuchten Tiermodelle, CCl₄ –behandelte BALB/cJ-Versuchstiere und FVB-*Abcb4* -/- Genotypen, gegeben ist.
2. Wie sind die Standardwerte für T1-, T2- und T2*-Zeiten bei verschiedenen Maustiermodellen der Leberfibrose?
Die Bestimmung der Relaxationszeiten T1, T2 und T2* bei den angewandten Tiermodellen war technisch möglich. Die ermittelten Werte der Relaxationszeiten sind der Tabelle 23 zu entnehmen. Diese Parameter sind prinzipiell für die Charakterisierung der Leber bei den von uns verwendeten und verwandten Mausmodellen geeignet. Allerdings fehlt für alle drei Kenngrößen eine sichere Korrelation zur Schwere der Lebererkrankung. Dies liegt in erster Linie daran, dass es sich um Messgrößen handelt, die von verschiedenen ätiologischen Faktoren unterschiedlich beeinflusst werden. Außerdem liefern sowohl die histologische als auch die biochemische Bestimmung des Schweregrades der Leberfibrose uneinheitliche Ergebnisse. Als wesentliche Ursache kommt die individuelle Variation der Versuchstiere in Betracht, die sich aufgrund der relativ geringen Anzahl an untersuchten Tieren in den einzelnen Subgruppen stark auswirken dürften. Die unterschiedlichen Ätiologien der Lebererkrankungen für die verschiedenen Tiermodelle bedingen unterschiedliche histopathologische und biochemische

Reaktionen bzw. Ergebnisse. Auch die kernspintomographischen Parameter der Relaxationszeiten werden durch die verschiedenen Ätiologien wahrscheinlich unterschiedlich beeinflusst. Dies ist eine weitere Erklärung für die Variabilität der Ergebnisse.

3. Sind nicht invasive Longitudinalstudien zur Bestimmung von T1-, T2- und T2*-Zeiten bei Mausmodellen der Leberfibrose zur Reduktion der Anzahl von Versuchstieren möglich?

Mit Hilfe der parametrischen Bildgebung - also der alleinigen Bestimmung der Relaxationszeiten T1, T2 und/oder T2* - kann man bei den von uns verwendeten Mausmodellen für bestimmte Schweregrade bzw. Ätiologien Anzeichen für die Progredienz der Erkrankung bestimmen. Die minimal invasive Methode der MRT erlaubt somit Longitudinalstudien und das Einsparen von Versuchstieren, insbesondere bei Therapiestudien zur Überwachung des Therapieerfolgs.

6. Literaturverzeichnis

1. Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB (2006) Liver Fibrosis: Noninvasive Diagnosis with Double Contrast Material enhanced MR Imaging. *Radiology* 239:425-437
2. Argyropoulou MI, Astrakas L (2007) MRI evaluation of tissue iron burden in patients with beta-thalassaemia major. *Pediatr Radiol* 37:1191-1200
3. Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P (2007) Diagnosis and Measurement of Liver Fibrosis by MRI in Bile Duct Ligated Rats. *Dig Dis Sci* 52:2601–2609
4. Barikbin R, Neureiter D, Wirth J, Erhardt A, Schwinge D, Kluwe J, Schramm C, Tiegs G, Sass G (2012) Induction of heme oxygenase 1 prevents progression of liver fibrosis in Mdr2 knockout mice. *Hepatology* 55:553-562
5. Batts KP, Ludwig J (1995) Chronic Hepatitis An Update on Terminology and Reporting. *Am J Surg Pathol* 19: 1409-1417
6. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. (2005) Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 42:44-52
7. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Croce LS, Tiribelli C, Bellentani S (2007) Incidence and Natural Course of Fatty Liver in the General Population: The Dionysos Study. *Hepatology* 46: 1387-1391
8. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S (2001) Liver biopsy. *N Engl J Med* (344): 495-500
9. Bydder M, Shiehmorteza M, Yokoo T, Sugay S, Middleton MS, Girard O, Schroeder ME, Wolfson T, Gamst A, Sirlin C (2010) Assessment of liver fat quantification in the presence of iron. *Magn Reson Imaging* 28:767-776
10. Chen BB, Hsu CY, Yu CW, Wei SY, Kao JH, Lee HS, Shih TT (2012) Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging with Gd-EOB-DTPA for the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis patients. *Eur Radiol* 22:171-180
11. Chow A, Gao DS, Fan SJ, Qiao Z, Lee F, Yang J, Man K, Wu EX (2012) Measurement of Liver T1 and T2 Relaxation Times in an Experimental Mouse Model of Liver Fibrosis. *J Magn Reson Imaging* 36:152-158

12. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011): Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* 332:1519 -1523
13. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G (2003) Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol* 39: 239-244
14. Faria SC, Ganesan K, Mwangi I, Shiehmorteza M, Viamonte B, Mazhar S, Peterson M, Kono Y, Santillan C, Casola G, Sirlin CB (2009) MR Imaging of Liver Fibrosis. Current State of the Art. *Radiographics* 29:1615-1635
15. Fickert, P. et al. (2004) Regurgitation of Bile Acids From Leaky Bile Ducts Causes Sclerosing Cholangitis in Mdr2 (Abcb4) Knockout Mice! *Gastroenterology* 127:261-274
16. Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadham D, Sterling RK, Su GL, Ghosh M, Wright EC, HALT-C Trial Group (2008) Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 47:789-798.
17. Gandon Y, Guyader D, Heautot JF, Reda MI, Yaouanq J, Buhé T, Brissot P, Carsin M, Deugnier Y (1994) Hemochromatosis: diagnosis and quantification of liver iron with gradient-echo MR imaging. *Radiology* 193:533-538
18. Gao B, Bataller R (2011) Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141:1572-1585
19. Gardinali M, Conciato L, Cafaro C, Crosignani A, Battezzati PM, Agostoni A, Podda M (1998) Complement system is not activated in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol Immunopathol* 87:297-303
20. Glaser S, Francis H, Demorrow S, Lesage G, Fava G, Marzioni M, Venter J, Alpini G (2006) Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol* 12:3523-3536
21. Guimaraes AR, Siqueira L, Boland G, Gervais D, Chew M, Hahn P (2011) T2 Relaxation Time as a Surrogate Marker of Liver Fibrosis. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 19:395
22. Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M, Hoffer FA, Li CS, Wang WC, Ware RE, Hillenbrand CM (2009) R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood* 113:4853-4855

23. Heye T, Yang SR, Bock M, Brost S, Weigand K, Longerich T, Kauczor HU, Hosch W (2012) MR relaxometry of the liver: significant elevation of T1 relaxation time in patients with liver cirrhosis. *Eur Radiol* 22:1224-1232
24. Hillebrandt S, Goos C, Matern S, Lammert F (2002) Genome-Wide Analysis of Hepatic Fibrosis in Inbred Mice identifies the Susceptibility Locus *Hfib1* on Chromosome 15. *Gastroenterology* 123:2041-2051
25. Hillebrandt, S. et al. (2005) Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nature Genetics* 37:835-843
26. Hirai I, Ishiyama S, Fuse A, Kuzu H, Sakurai F, Kimura S, Kimura W (2001) Primary sclerosing cholangitis successfully treated by resection of the confluence of the hepatic duct. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8:169-173
27. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22:696-699
28. Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS (1981) A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 112:70-75
29. Kim H, Booth CJ, Pinus AB, Chen P, Lee A, Qiu M, Whitlock M, Murphy PS, Constable RT (2008) Induced hepatic fibrosis in rats: hepatic steatosis, macromolecule content, perfusion parameters, and their correlations--preliminary MR imaging in rats. *Radiology* 247:696-705
30. Knight RA, Han Y, Nagaraja TN, Whitton P, Ding J, Chopp M, Seyfried DM (2008) Temporal MRI Assessment of Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Stroke* 39:2596-2602
31. Kreft BP, Tanimoto A, Baba Y, Zhao L, Chen J, Middleton MS, Compton CC, Finn JP, Stark DD (1992) Diagnosis of fatty liver with MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2:463-471
32. Kreft B, Dombrowski F, Block W, Bachmann R, Pfeifer U, Schild H. (1999) Evaluation of different models of experimentally induced liver cirrhosis for MRI research with correlation to histopathologic findings. *Invest Radiol* 34:360-366.

33. Lammert F, Wang DQ, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, Matern S, Paigen B, Carey MC (2004) Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2^{-/-} mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 39:117-128
34. Manning DS, Afdhal NH (2008) Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 134:1670-1681
35. Materne R, Smith AM, Peeters F, Dehoux JP, Keyeux A, Horsmans Y, Van Beers BE (2002) Assessment of hepatic perfusion parameters with dynamic MRI. *Magn Reson Med* 47:135-42.
36. Mathur S, Vohra RS, Germain SA, Forbes S, Bryant ND, Vandeborne K, Walter GA (2011) Changes in muscle T2 and tissue damage after downhill running in mdx mice. *Muscle Nerve* 43:878-886
37. Nieto N (2011) A systems biology approach for understanding the collagen regulatory network in alcoholic liver disease. *Liver Int* 32:189-98
38. Okada M, Katsume T, Kumano S, Kagawa Y, Araki T, Tsuda N, Okuaki T, Imaoka I, Tanigawa N, Ishii K, Murakami T (2011) Unenhanced fat fraction ratios obtained by MR and enhanced T2* values with liver-specific MR contrast agents for diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Acta Radiol* 52:658-664
39. Ohshio G, Furukawa F, Manabe T, Tobe T, Hamashima Y (1986) Relationship between secretory IgA, IgA-containing (C3-fixing) circulating immune complexes, and complement components (C3, C4) in patients with obstructive jaundice. *Scand J Gastroenterol* 21:151-157.
40. Philips GM, Chan IS, Swiderska M, Schroder VT, Guy C, Karaca GF, Moylan C, Venkatraman T, Feuerlein S, Syn WK, Jung Y, Witek RP, Choi S, Michelotti GA, Rangwala F, Merkle E, Lascola C, Diehl AM. Hedgehog signaling antagonist promotes regression of both liver fibrosis and hepatocellular carcinoma in a murine model of primary liver cancer. *PLoS One* 6:e23943
41. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D (2005) Mdr2^{(Abcb4)-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol* 43:1045-1054
42. Polasek M, Fuchs BC, Uppal R, Schühle DT, Alford JK, Loving GS, Yamada S, Wei L, Lauwers GY, Guimaraes AR, Tanabe KK, Caravan P (2012) Molecular MR imaging of liver fibrosis: A feasibility study using rat and mouse models. *J Hepatol*:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.035>

43. Poinbard T, Morra R, Hlafon P (2007) Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterology* 47:40
44. Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J (2008) Physiology and Pathophysiology of Liver Damage and Repair. *J Physiol Pharmacol* 55 (107-117)
45. Reeder SB, Markl M, Yu H, Hellinger JC, Herfkens RJ, Pelc NJ (2005) Cardiac CINE imaging with IDEAL water-fat separation and steady-state free precession. *J Magn Reson Imaging* 22:44-52.
46. Robert Koch-Institut (ed) (2011) Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 52. RKI, Berlin
47. Roderfeld M, Rath T, Voswinckel R, Dierkes C, Dietrich H, Zahner D, Graf J, Roeb E (2010) Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34+ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in Abcb4-/- mice. *Hepatology* 51:267-276.
48. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, Roskams T, Pinzani M, Arthur MJ; European Liver Fibrosis Group (2004) Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 127:1704-1713
49. Ruetz S, Gros P (1994) Phosphatidyl Translocase: A Physiological Role for the mdr2 Gene. *Cell* 77:1071-1081
50. Saile B, Ramadori G (2007) Inflammation, Damage Repair and Liver Fibrosis – Role of Cytokines and Different Cell Types. *Z Gastroenterol* 45:77-86
51. Salameh N, Peeters F, Sinkus R, Abarca-Quinones J, Annet L, ter Beek LC, Leclercq I, Van Beers BE (2007) Hepatic Viscoelastic Parameters Measured With MR Elastography: Correlations with Quantitative Analysis of Liver Fibrosis in the Rat. *J Magn Reson Imaging* 26:956-962
52. Salameh N, Larrat B, Abarca-Quinones J, Pallu S, Dorvillius M, Leclercq I, Fink M, Sinkus R, Van Beers BE (2009) Early detection of steatohepatitis in fatty rat liver by using MR elastography. *Radiology* 253:90-97
53. Seeff LB, Everson GT, Morgan TR, Curto TM, Lee WM, Ghany MG, Schiffman ML, Fontana RJ, Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Dienstag JL; HALT-C Trial Group (2010): Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the HALT-C trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8: 877-83

54. Shaheen AAM, Myers RP (2007) Diagnostic Accuracy of the Aspartate Aminotransferase-to-Platelet Ratio Index for the Prediction of Hepatitis C–Related Fibrosis: A Systematic Review. *Hepatology* 46: 912-921
55. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC (1997) Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10663-10668
56. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E., van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhof R, van der Lugt NMT, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Nerns AJM, Borst P (1993) Homozygous Disruption of the Murine mdr2 P-Glycoprotein Gene Leads to a Complete Absence of Phospholipid from Bile and to Liver Disease. *Cell* 75: 451-462
57. Stark DD, Bass NM, Moss AA, Bacon BR, McKerrow JH, Cann CE, Brito A, Goldberg HI (1983) Nuclear magnetic resonance imaging of experimentally induced liver disease. *Radiology* 148:743-751
58. Stark DD, Goldberg HI, Moss AA, Bass NM (1984) Chronic liver disease: evaluation by magnetic resonance. *Radiology* 150:149-151
59. Suh YG, Jeong WI (2011) Hepatic stellate cells and innate immunity in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 17: 2543-2551
60. Tacke F, Weiskirchen R (2010) Pathophysiologie der Leberfibrose: Aktuelle Aspekte und neue Ansätze für antifibrotische Therapien. *Internist* 51:21-29
61. Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenleber SJ, West CP, Montori VM (2007) Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:1214–1220
62. Tsuchiya M, Ji C, Kosyk O, Shymonyak S, Melnyk S, Kono H, Tryndyak V, Muskhelishvili L, Pogribny IP, Kaplowitz N, Rusyn I (2012) Interstrain Differences in Liver Injury and One-Carbon Metabolism in Alcohol-Fed Mice. *Hepatology* 56:130-139
63. Van Beers BE, Materne R, Annet L, Hermoye L, Sempoux C, Peeters F, Smith AM, Jamart J, Horsmans Y (2003) Capillarization of the sinusoids in liver fibrosis: noninvasive assessment with contrast-enhanced MRI in the rabbit. *Magn Reson Med* 49:692-699
64. Yin M., Woollard J, Wang X, Torres VE, Harris PC, Ward CJ, Glaser KJ, Manduca A, Ehman RL (2007): Quantitative Assessment of Hepatic Fibrosis in an Animal Model With Magnetic Resonance Elastography. *Magn Reson Med* 58:346-353

65. Yin M, Talwalkar JA, Glaser KJ, Manduca A, Grimm RC, Rossman PJ, Fidler JL, Ehman RL. (2007): Assesment of Hepatic Fibrosis with Magnetic resonance Elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10:1207-1213
66. Walport MJ (2001) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344:1140-1144
67. Wagnerova D, Herynek V, Malucelli A, Dezortova M, Vymazal J, Urgosik D, Syrucek M, Jiru F, Skoch A, Bartos R, Sames M, Hajek M. (2012) Quantitative MR imaging and spectroscopy of brain tumours: a step forward? *Eur Radiol* (Elektronische Vorveröffentlichung)
68. Wang QB, Han Y, Jiang TT, Chai WM, Chen KM, Liu BY, Wang LF, Zhang C, Wang DB (2011) MR Imaging of activated hepatic stellate cells in liver injured by CCl₄ of rats with integrin-targeted ultrasmall superparamagnetic iron oxide. *Eur Radiol* 21:1016-1025
69. Wang Y, Ganger DR, Levitsky J, Sternick LA, McCarthy RJ, Chen ZE, Fasanati CW, Bolster B, Shah S, Zuehlsdorff S, Omary RA, Ehman RL, Miller FH (2011) Assessment of chronic hepatitis and fibrosis: comparison of MR elastography and diffusion-weighted imaging. *AJR Am J Roentgenol* 196:553-561
70. Welsch G, Mamisch TC, Hughes T, Zilkens C, Quirbach S, Scheffler K, Kraff O, Schweitzer ME (2008) In Vivo Biochemical 7.0 Tesla Magnetic Resonance Preliminary Results of dGEMRIC, Zonal T₂, and T_{2*} Mapping of Articular Cartilage. *Invest Radiol* 43:619-626
71. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG (1994) Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 89:397-410

7. Publikationen

1. Müller AH, Hochrath K, Krawczyk M, Bücker A, Lammert F (2012) Nicht-invasive Quantifizierung hepatischer Fibrose im toxischen und cholestatischen Mausmodell. Vortrag, 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hamburg
2. Müller AH, Hochrath K, Krawczyk M, Bücker A, Lammert F (2012) Non-invasive quantification of hepatic fibrosis in the CCl4 mouse model by magnetic resonance relaxometry (MRR). Posterpräsentation, 28. Jahrestagung der German Association for the Study of the Liver, Hamburg
3. Müller AH, Hochrath K, Krawczyk M, Bücker A, Lammert F (2011) Non-Invasive Quantification of Hepatic Fibrosis in the CCl4 Mouse Model by Magnetic Resonance Relaxometry: First Results. Hepatology 54, 907A

8. Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. Arno Bücker für die Ermöglichung dieser Promotion und die umfangreiche Unterstützung, die er mir in diesem Zusammenhang gewährt hat.

Herrn Prof. Dr. Lammert danke ich für die zusätzliche wissenschaftliche Betreuung, die positive Ausgestaltung unserer Kooperation und die Bereitschaft, sich ergebende wissenschaftliche Fragen auch spontan zu diskutieren.

Besonders danken möchte ich Frau Diplom-Biologin Katrin Hochrath, nicht nur für die Bereitstellung und die biochemische und histologische Charakterisierung der Versuchstiere, sondern auch für den regen Austausch über die erzielten Ergebnisse und die unkomplizierte Zusammenarbeit zum Zweck der Publikation.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Kanishka Hiththetiya, Assistenzarzt des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn für die histologische Beurteilung des Fibrosegrades der Versuchstiere.

Danken möchte ich auch Herrn Prof Dr. Menger, in dessen Institut die magnetresonanztomographischen Untersuchungen durchgeführt wurden, und der wie die Mitarbeiter seines Institutes bei Bedarf immer hilfreich zur Seite stand.

Ganz besonders danke ich Frau Diane Wagner-Jochem und Frau Christa Isaacs für ihre Unterstützung, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Mit herzlichstem Dank möchte ich diese Arbeit meiner lieben Frau Dorit Scholler widmen, die mir durch Ihre Umsicht, Geduld und Unterstützung die notwendige Energie gab und den Rahmen schuf, um diese Arbeit durchzuführen und endlich abzuschließen.

9. Lebenslauf

Andreas Müller

Steigerhügel 9

67659 Kaiserslautern

Tel.: 0631-3709840

Email: andreas.h.mueller@gmail.com

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 28.04.1963

Geburtsort: Kaiserslautern

Familienstand: Verheiratet, ein Kind

Nationalität: Deutsch

Berufstätigkeit

Seit 04/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, dabei u.a.:

Eigenverantwortliche Organisation des Betriebs eines Kleintier-Magnetresonanztomographen. Eigenständige Planung und Durchführung tierexperimenteller Studien zu neurologischen, internistischen und radiologischen Fragestellungen. Erforschung von Nanopartikeln.

07/2006 -02/2009 Regional Sales Manager Southwest Germany Switzerland für Cyberonics Europe S.A., dabei u. a.:

Verkauf von Vagusnerv-Stimulatoren (VNS) für die Behandlung von Patienten mit therapieresistenter Epilepsie und Depression.

Technical Support bei der Implantation und Revision von VNS, Anleitung von Chirurgen und Funktionsüberprüfung des Implantates. Unterweisung der behandelnden Ärzte in der korrekten Programmierung der Systeme

Berufstätigkeit (Fortsetzung)

- 07/1999 – 06/2006 Pharmaberater für Fa. Novartis GmbH, Nürnberg, im niedergelassenen Bereich und in der Klinik, Besuchstätigkeit bei Fachärzten für Dermatologie, Neurologie und Psychiatrie.
- 01/1999 - 06/1999 Pharmaberater für Fa. Heinrich Mack Nachf. GmbH & Co., Karlsruhe, im Bereich Herz-Kreislauf, bei Allgemeinmedizinern und Internisten.
- 10/1997 - 12/1998 Pharmaberater für Fa. Innovex GmbH, Mannheim, im Bereich Herz-Kreislauf, bei Allgemeinmedizinern und Internisten.
- 04/1994 - 09/1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, AG Experimentelle Radiologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, dabei u.a.: Testung experimenteller Kontrastmittel für die MR-Tomographie, Röntgen- und Ultraschalldiagnostik. Präsentation von Forschungsergebnissen in nationalem und internationalem Rahmen, u. a. beim RSNA 1994 (Chicago), ECR 1995 (Wien), AOCR 1995 (Kuala Lumpur), BEMS 1995 (Boston), ESMRMB 1996 (Prag).
- 01/1992 - 03/1994 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg.

Studium

- 10/1984 – 08/1991 Studium der Biologie (Abschluss Diplom) an der Universität Kaiserslautern

Wehr-/Zivildienst

- 11/1982 – 02/1984 Zivildienst beim DRK Kaiserslautern-Stadt im Bereich Rettungsdienst

Schulbildung

- 25.06.1982 Allgemeine Hochschulreife am Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern