

## **4 MATERIAL UND METHODIK**

Das Tierversuchsvorhaben wurde von der zuständigen Behörde genehmigt (G 0110/98) und unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt. An der entsprechenden Versuchstierreihe wurden neben den MR-angiographischen Untersuchungen zur Thrombendetektion weitere MR-tomographische Messungen zur Thrombencharakterisierung [185] vorgenommen, die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

### **4.1 Studiendesign**

Im Rahmen des gesamten Tierversuchsvorhabens wurden an 75 Versuchstieren Embolisationen vorgenommen. Aus der Gesamtzahl der erfolgreichen Thrombusinduktionen rekrutierten sich zwei annähernd deckungsgleiche Kollektive, eines für die vorliegende MR-angiographische, das andere für eine MR-tomographische Studie [185]. Die Population der MR-angiographischen Studie umfasst 50 Versuchstiere, von denen alle mit dem 4.4 beschriebenen Verfahren embolisiert wurden. 17 Versuchstiere des Studienkollektivs erhielten neben der Injektionsnarkose die unter 4.3 aufgeführte Prämedikation.

### **4.2 Versuchstiere**

Verwendet wurden ausnahmslos Kaninchen der Rasse Chinchilla-Bastards. Die Tiere unterschiedlichen Alters und Geschlechts hatten ein Körpergewicht zwischen 2000 - 4000 g. Das jeweilige Gewicht wurde vor Versuchsbeginn bestimmt. Zwischen den Untersuchungstagen wurden die Tiere mit freiem Zugang zu Futter und Wasser in einem Tierstall untergebracht.

### **4.3 Narkose und Prämedikation**

Die Tiere erhielten zur Narkoseeinleitung eine Kombination von 40 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Kenatest<sup>®</sup>; Parke-Davis GmbH, Berlin) und 17 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun<sup>®</sup>; Bayer Vital, Leverkusen) als intramuskuläre Injektion. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgten primär in Abhängigkeit zur Narkosetiefe, spätestens nach 60 – 90 Minuten Nachinjektionen in gleicher Dosierung. Eine Einschät-

zung der Narkosetiefe war durch Kontrolle von Atemfrequenz, Atemexkursionen und Körperbewegungen, insbesondere dem Lidschlag möglich. Nach beiderseitiger Punktion einer Ohrvene mit einer 20 G Venenverweilkanüle (Braunüle<sup>®</sup>; B. Braun, Melsungen) wurde zunächst eine Anaphylaxie-Prophylaxe mit 1 mg/kg Prednisolonehydrogensuccinat (Solu-Decortin<sup>®</sup>; Merck, Darmstadt), 0,01 mg/kg Clemastinhydrogenfumarat (Tavegil<sup>®</sup>; Norvatis Consumer Health, München) und 0,25 mg/kg Ranitidin (Ranitic inject<sup>®</sup>; Hexal AG, Holzkirchen) durchgeführt.

#### **4.4 Experimentelle Thromboseinduktion**

Ein Embolisationsvorgang mit Narkoseeinleitung, Prämedikation, phlebographischer Dokumentation und angemessener Nachbeobachtungszeit dauerte ca. 60 Minuten.

Unter Durchleuchtung (Philips, DIAGNOST 73/OPTIMUS, 63 kV) erfolgte die Kontrastmittel-Darstellung beider Jugularvenen mit insgesamt 10 - 15 ml Iopromid (Ultravist<sup>®</sup>-300; Schering, Berlin). Nach Selektion der vom Kaliber und dem Gefäßverlauf günstigeren Seite wurde per Seldinger-Technik eine 3,0 F Führungsschleuse (Highflow-DSA-flush-catheter) 2 - 3 cm proximal der Konfluenz von Vena jugularis und Vena facialis auf Höhe des vierten und fünften Halswirbelkörpers platziert. Durch die Schleuse wurde nachfolgend ein elastischer Mikrokatheter (Polyethane, 0,28 mm Innendurchmesser, 0,61 mm Außendurchmesser) vorgeschoben, dessen Spitze das Schleusenende um 1 cm überragte. Unter fluoroskopischer Kontrolle erfolgte die Embolisation mit 0,1 - 0,2 ml eines Gemisches (Verhältnis 1 : 1) aus n-Butylzyanoakrylat (Histoacryl<sup>®</sup>; B. Braun Surgical GmbH, Melsungen) und einem öligen Kontrastmittel, dem Fettsäureäthylester des jodierten Oleum Papaveris (Lipiodol<sup>®</sup>; Byk Gulden, Konstanz). Über einen neuen Mikrokatheter wurde zur Darstellung des Gefäßverschlusses zunächst Kontrastmittel appliziert. Bei nur partieller Okklusion wurde der Embolisationsvorgang wiederholt, um artifiziellen arteriellen Embolien vorzubeugen. Nach gesichertem Verschluss des Gefäßes wurden 100 Einheiten bovines Thrombin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 0,1 ml einer 0,9-prozentigen Kochsalzlösung injiziert. Der Thrombin-Injektion folgte die sofortige Dekatheterisierung und Entfernung der Schleuse, um eine endovaskuläre Fixierung des Materials zu vermeiden (siehe Embolisationsmaterialien und skizzierter Embolisa-

tionsablauf im Anhang, Abbildungen 8-2 und 8-3 a-i). Nach einer zehnminütigen Beobachtungszeit wurden Lokalisation und Ausdehnung des Embolisates abschließend schriftlich und röntgenologisch dokumentiert.

#### 4.5 Phlebographische Untersuchung

Frühestens nach 24 Stunden, spätestens jedoch nach 9 Tagen, erfolgte bei allen Tieren die phlebographische Kontrolle beider Jugularvenen. Der Untersuchungsablauf unterschied sich dabei prinzipiell nicht von den phlebographischen Voruntersuchungen im Rahmen der Embolisation. Nach Narkoseeinleitung und beidseitiger Punktion einer Ohrvene mit einer 20 G Venenverweilkanüle erfolgte abermals die Kontrastmittel-Darstellung beider Jugularvenen in zwei Ebenen mit insgesamt 10 – 15 ml Iopromid-Lösung (Ultravist<sup>®</sup>-300; Schering, Berlin). Lokalisation und Ausdehnung der Thrombose wurden schriftlich und röntgenologisch dokumentiert (siehe Abbildung 4-1 a-b). Der phlebographische Untersuchungsvorgang inklusive Narkoseeinleitung, Punktion und Prämedikation dauerte ca. 30 Minuten.

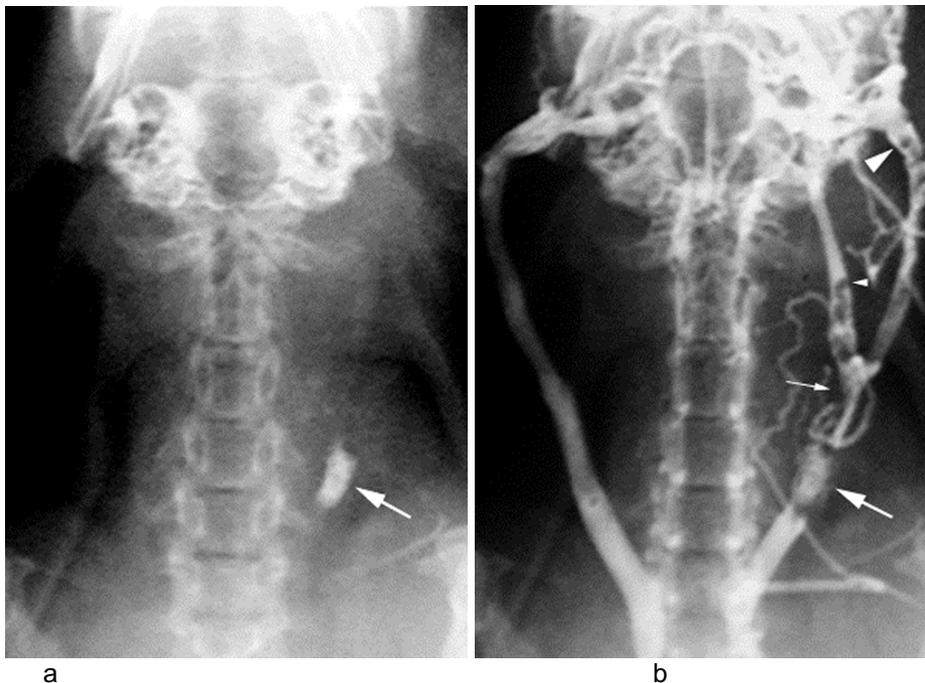


Abbildung 4-1 a-b Nativaufnahme (a) und Phlebogramm (b) eines Kaninchens mit Embolisat in der Vena jugularis externa links 5 Tage nach Thrombusinduktion (a und b, großer Pfeil). Kontrastmittelabfluss über regionale Kollateralvenen und die Vena jugularis der Gegenseite sowie Darstellung eines wurmförmigen Thrombus in der Vena facialis (b, kleiner Pfeilkopf), in der Vena jugularis externa kranial (b, großer Pfeilkopf) und kaudal der Konfluenz beider Venen (b, kleiner Pfeil).

## **4.6 MR-angiographische Untersuchung**

Unmittelbar im Anschluss an die phlebographischen Kontrolluntersuchungen folgten die kernspintomographischen Messungen in einem 1,5 Tesla-Magneten (Vision, Siemens, Erlangen) mit Standard-Kniespule. Die narkotisierten Kaninchen wurden in Rückenlage mit gestrecktem Hals in einer Schaumstoffschale gelagert. Zur besseren Fettsättigung wurde ein wasserhaltiges Kissen über der Halsregion der Tiere positioniert.

Das Studienkollektiv bestand aus 50 Kaninchen mit einseitiger, mittels Goldstandard nachgewiesener Thrombose. In allen Fällen wurden die konventionellen Techniken (2D-TOF, 2D-PC und 3D-PC) und in 19 Fällen zudem die kontrastverstärkten MRA-Techniken (3D-BH-FISP und 3D-FISP) durchgeführt.

### **4.6.1 Konventionelle MRA-Messtechniken**

Verwendet wurden eine 2D-TOF-Technik in transversaler Schichtführung mit einem kaudalen Vorsättigungsimpuls (TR/TE/FA 29 ms/9 ms/50°, Schichtdicke 2 mm, 64 Partitionen, räumliche Auflösung 0,55 mm x 0,55 mm, FOV 105 x 140, Messzeit 6 min 57 s), eine 3D-PC-Technik in koronarer Schichtführung (TR/TE/FA 104 ms/14 ms/10°, Blockdicke 40 mm, 40 Partitionen, effektive Schichtdicke 1 mm, Auflösung 1,04 mm x 0,78 mm, FOV 150 x 200, Messzeit 10 min 1 s) und eine 2D-PC-Technik in koronarer Schichtführung (TR/TE/FA 104 ms/14 ms/25°, Schichtdicke 25 mm, 1 Partition, Auflösung 1,03 mm x 0,78 mm, FOV 100 x 200, Messzeit 32 s). Aus den 2D-TOF- und 3D-PC-Quellbildern wurden jeweils Sekundärrekonstruktionen nach dem Prinzip der maximalen Intensitätsprojektion (MIP) angefertigt.

### **4.6.2 Kontrastmittel und Dosierung**

Bei 19 Versuchstieren folgte nach Beendigung der konventionellen MRA-Techniken die Applikation von Karboxydextran-ummantelten, ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (USPIO) mit der Laborbezeichnung DDM43/34/102 (Institut für Diagnostikforschung, Berlin). Die Partikel weisen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 25 nm auf. Die mittlere Plasmahalbwertszeit bei Ratten beträgt 56±17 Minuten. Die mittlere Letaldosis bei Ratten entspricht 35 mmol/kg Körpergewicht. Entsprechende pharmakokinetische und toxikologische Daten von

Kaninchen liegen nicht vor. Das Kontrastmittel wurde in einer Dosierung von 30  $\mu\text{molFe/kg}$  Körpergewicht, aufgelöst in 0,9 – 1,2 ml einer 0,9-prozentigen Kochsalzlösung langsam und gefolgt von 2 ml physiologischer Kochsalzlösung über die Ohrvene der gesunden Seite verabreicht.

#### **4.6.3 Kontrastverstärkte MRA-Messtechniken**

Verwendet wurden eine 3D-FISP-Gradientenecho-Sequenz in koronarer Schichtführung (TR/TE/FA 22 ms/7 ms/40°, Blockdicke 32 mm, 38 Partitionen, effektive Schichtdicke 0,84 mm, Auflösung 0,78 mm x 0,39 mm, FOV 100 x 200, Messzeit 3 min 36 s) sowie eine ultraschnelle 3D-BH-FISP-Gradienten-Sequenz (engl. breath hold) in koronarer Schichtführung (TR/TE/FA 5 ms/2 ms/25°, Blockdicke 40 mm, 26 Partitionen, effektive Schichtdicke 1,54 mm, Auflösung 0,98 mm x 0,98 mm, FOV 250 x 250, Messzeit 39 s). Aus den Quellbildern wurden abschließend MIP-Rekonstruktionen angefertigt.

## 4.7 Histologische Untersuchung

Nach Abschluss der MR-tomographischen und MR-angiographischen Messungen folgte die Tötung der in tiefer Narkose liegenden Versuchstiere durch Gabe einer Überdosis Xylazin gefolgt von einer Kaliumchloridlösung. Die Y-förmige Gefäßregion der Venenkonfluenz wurde beiderseits freipräpariert, durch Ligaturen isoliert, nach Fotodokumentation entnommen und für 24 Stunden in 10-prozentiger Formalinlösung fixiert (siehe Abbildung 4-2 a-b). Die Abschnitte der Vena jugularis und der Vena facialis wurden in Segmente von 3 mm Länge gegliedert und in Parafin eingebettet. Von den kaudalen Enden der Segmente wurden senkrecht zur Gefäßlängsachse Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin und Berliner-Blau angefärbt.

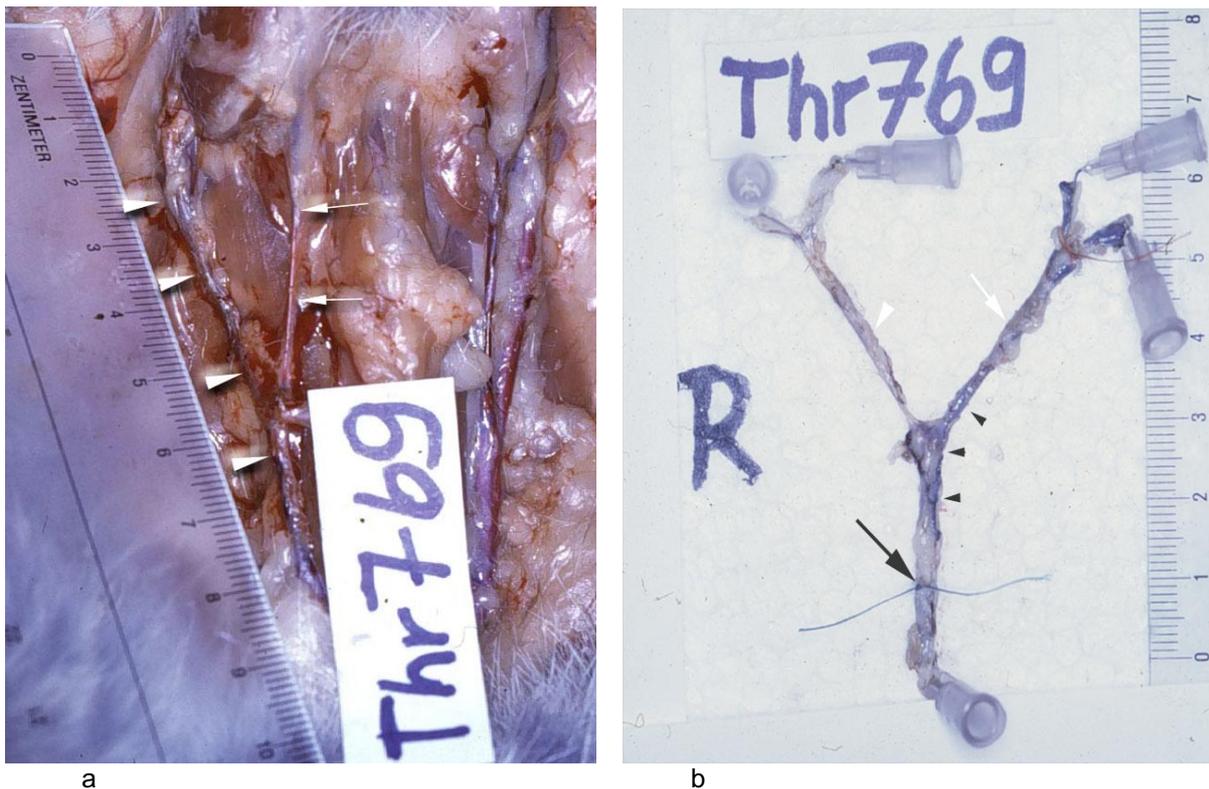


Abbildung 4-2 a-b

- in-situ-Präparat der Y-förmigen Konfluenz der thrombosierte Vena jugularis externa (weiße Pfeilspitzen) und der Vena facialis (weiße Pfeile);
- explantiertes Venenpräparat mit Ligaturen (schwarzer Pfeil); strangförmig livide Verhärtung der verdickten Vena jugularis externa (schwarze Pfeilspitzen); histologisch gesicherte Thrombose

## **4.8 Auswertung**

### **4.8.1 Auswertung Goldstandard**

Goldstandard für den Ausschluss und die Diagnose einer Thrombose waren die Befunde von Phlebographie und Histologie. Phlebographische Thrombosezeichen wurden mit Hilfe eines Erhebungsbogens dokumentiert (siehe Anhang, Abbildung 7-4). Für jeden Fall und einzelnen Gefäßabschnitt wurde eine individuelle Gesamtdiagnose im Konsens von zwei erfahrenen Untersuchern gestellt:

Untersucher 1 – klinisch-orientiert

Untersucher 2 – tierexperimentell-orientiert

Die Diagnosesicherheit für das Vorliegen einer Thrombose wurde mit folgenden Rängen kategorisiert:

- 0 - sicher keine Thrombose
- 1 - wahrscheinlich keine Thrombose
- 2 - unklar
- 3 - wahrscheinlich Thrombose
- 4 - sicher Thrombose

### **4.8.2 Auswertung MRA**

Nach Abschluss des experimentellen Studienteils, wurden Hardcopies der MR-Angiogramme randomisiert und doppelt-geblindet jeweils vier Untersuchern (drei klinisch tätigen Radiologen und dem Autor) zur Beurteilung vorgelegt. Betreffend der methodischen Erfahrung wurden Untersucher unterschiedlichen Erfahrungsgrades ausgewählt:

Untersucher 1 – große Erfahrung in der klinisch-angewandten MRA/MRT

Untersucher 2 – geringe Erfahrung in der klinisch-angewandten MRA/MRT

Untersucher 3 – solide Erfahrung in der klinisch-angewandten MRA/MRT

Untersucher 4 – solide Erfahrung in der tierexperimentellen MRA/MRT

Alle Untersucher erhielten Informationen über Versuchsmethodik und normale Gefäßtopographie von Kaninchen sowie Instruktionen für das Bewertungsschema (siehe Kapitel 7.4). Mit Hilfe von Erhebungsbögen (siehe Anhang, Abbildung 7-4)

wurden zu jedem Angiogramm quantitative Aussagen zur Diagnosesicherheit und qualitative Aussagen bezüglich der Bildqualität erhoben. Zusätzlich sollten deskriptive Aussagen im Sinne einer Urteilsbegründung und betreffend der Bildqualität getroffen werden.

### **Quantitative Bildanalyse**

Jedes einzelne Angiogramm sollte unter der Annahme beurteilt werden, dass entweder eine einseitige, eine beidseitige oder überhaupt keine Thrombose vorliegt. Beiderseits mussten die Gefäßabschnitte der Vena jugularis, der Vena facialis sowie der gesamten Venenkonfluenz hinsichtlich dem Vorliegen einer Thrombose bewertet werden. Die Sicherheit der Diagnose wurde mit folgenden Rängen kategorisiert:

- 0 - sicher keine Thrombose
- 1 - wahrscheinlich keine Thrombose
- 2 - unklar
- 3 - wahrscheinlich Thrombose
- 4 - sicher Thrombose

### **Qualitative Bildanalyse**

Die Bildqualität wurde mit den Rängen »1 = gut«, »2 = mäßig« und »3 = schlecht« beschrieben:

- gut - Gefäß stark hyperintens, homogen, glatt begrenzt, überlagerungsfrei
- mäßig - Gefäß moderat hyperintens und heterogen, durchgängig, Treppenphänomene nur in kleinen Gefäßen, geringe Überlagerungen
- schlecht - ein Kriterium von »mäßig« nicht erfüllt

Zudem konnten vorhandene pathologische Befunde und Artefakte mittels qualitativer Aussagen, die allerdings nicht in die statistische Analyse einfließen, beschrieben werden.

### 4.8.3 Statistik

Aufgrund der bilateralen Fallbewertung ergaben sich pro Gefäßabschnitt gepool 38 Bewertungen für die 3D-FISP, 40 für die 3D-BH-FISP und je 100 Bewertungen für 2D-TOF, 2D-PC und 3D-PC. Gepaart wurden nur die 38 Fälle der 3D-FISP.

Die Datenarchivierung und -verarbeitung erfolgte computergestützt mit Hilfe von EXCEL, SPSS und StatXact.

Für die quantitative Bildanalyse wurde als Maß der Übereinstimmung zwischen Goldstandard und Untersucher-Diagnosen pro Untersucher, Gefäßabschnitt und MRA-Sequenz der nach Agresti quadratisch gewichtete Konkordanzindex Kappa  $\kappa$  berechnet [186]. Aus den Einzelergebnissen der drei Untersucher wurde abschließend pro Gefäßabschnitt und MRA-Sequenz der Mittelwert gebildet.

Für die qualitative Bildanalyse wurde je Untersucher und Sequenz der arithmetischen Mittelwert der vergebenen Qualitätsränge gebildet. Die entsprechenden Einzelergebnisse wurden abschließend als arithmetisches Mittel pro MRA-Sequenz zusammengefasst.