

Material und Methoden

Vorbemerkung

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits in der Doktorarbeit von Herrn Robert Gust (FU-Berlin) publiziert. Darin wird über in vivo-MRT-Ergebnisse von 20 Kaninchen berichtet. Die gegenwärtige Untersuchung basiert auf Untersuchungen derselben Tiere einschließlich der ex vivo-MRT und der korrespondierenden Radiographie und Histologie.

Kontrastmittel

Es wurde eine Präparation von ultrakleinen supraparamagnetischen Eisenoxidpartikeln verwendet (DDM 43/34, Institut für Diagnostikforschung, IDF, der FU Berlin). Es handelt sich um Carboxydextran-ummantelte Eisenoxidkristalle. Diese Kristalle sind Magnetite und Maghemite etwa im Verhältnis 1:1. Der äußere, hydrodynamische Durchmesser beträgt 25 nm. Die R1- und R2-Relaxivität in Wasser bei 37° und 0,27 Tesla betragen 39,0 und 65,0 l/(mmol s). Die Plasma-Halbwertszeit von DDM 43/34 im Kaninchen beträgt ca. 6 Stunden (Schätzwert).

Tiergruppen und Kontrastmittelapplikation

Die Haltung und Versorgung der Versuchstiere erfolgte nach dem Deutschen Tierschutzgesetz. Die Experimente wurden von der zuständigen Landesbehörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit, Tierversuchsvorhaben D 0109/98). Als Tiermodell diente das Watanabe hereditäre hyperlipidämische (WHHL)-Kaninchen. Die Tiere haben eine Spontanmutation, die zu einem Defekt des LDL-Rezeptors (Low density Lipoprotein) führt. Die Tiere entwickeln aufgrund dieses Rezeptormangels eine Hyperlipidämie, die zu einer Atherosklerose führt. Es wurden vorzugsweise Kaninchen mit einer fortgeschrittenen Erkrankung gewählt. Die Tiere waren beiderlei Geschlechts, 12 bis 28 Monate alt und

wogen im Mittel 3800 bis 4500 g. Die Tiere wurden von Covance Research Products, Denver, USA oder dem Universitätskrankenhaus Eppendorf Universität Hamburg geliefert. Sie wurden mit einer Kombinationsanästhesie aus Ketamin und Ketanest narkotisiert. Alle Untersuchungen wurden in tiefer Narkose durchgeführt. Die Tiere wurden mit jeweils $n = 5$ Tieren je Gruppe in vier Gruppen aufgeteilt, Tabelle 2. Das Kontrastmittel wurde mit manueller Injektion in einem Volumen von 3 bis 4 ml in eine Ohrvene über eine Verweilkanüle aus Plastik, gefolgt von 1 ml Kochsalz, gespritzt.

Tabelle 2 Tiergruppen

| Gruppe | Tiermodell | Dosis ($\mu\text{mol Fe/kg}$) | Postkontrast Intervall (h) |
|--------|------------|---------------------------------|----------------------------|
| a | WHHL | 0 | 0 |
| b | WHHL | 50 | 8 |
| c | WHHL | 50 | 24 |
| d | WHHL | 200 | 48 |

Präparation und ex vivo-Bildgebung

Die Tiere wurden mit einer Überdosis von Xylacin getötet. Der Thorax wurde eröffnet und der linke Ventrikel mit einer Kanüle zum Anschluss eines Druckinfusionssystems punktiert. Die Druckinfusion erfolgte mit einem Liter 5 %iger Formaldehydlösung, die bei einem Druck von 100 mm Hg über 30 Min. appliziert wurde. Dies Verfahren verhindert den Kollaps der Aorta und erhält das Gefäß in der physiologischen Distension. Anschließend wurde die Aorta von überstehendem Bindegewebe befreit und für 24 Stunden in einer 5 %igen Formaldehydlösung gelagert. Danach wurden die Aortenpräparate von Hand in 3 mm lange Segmente geschnitten.

Für die ex vivo-MRT und Röntgenbildgebung wurden die Segmente in einem 3 %igen Agar (Sigma-Aldrich-Steinheim, Deutschland) eingebettet, ohne dass die Präparate über 40° erwärmt wurden. Dem Agar wurden 0,5 μmol Gadolinium DTPA

(Magnevist®, Schering, Berlin) hinzugefügt, um das hohe Gefäßsignal der in vivo-Untersuchungen zu simulieren. Es resultierte ein Agar-Block von 11 x 16 x 2 cm Größe.

Die Gefäßsegmente wurden mit einem 1,5 Tesla-System (Magnetom Vision, Siemens,

Erlangen) unter Verwendung einer 3D-Gradientenechosequenz (Fast low angle shot, FLASH) und einem selektiven Wasserexzitationsradiofrequenzimpuls untersucht. Die folgenden Sequenzparameter wurden verwendet:

Repetitionszeit 41 ms; Echozeit 11 ms; Anregungswinkel 15°, zwei Anregungen; 256 x 256 Matrix, Field-of-view 100 x 100 mm; Schichtdicke 0,5 mm. Akquisitionszeit 22 Minuten.

Nach der MR-Bildgebung wurden die Agar-Blöcke mit einer Mammographie-Röntgeneinheit untersucht. Die Radiographie diente zum Nachweis von kleinen Verkalkungen in der Gefäßwand, die eine potentielle Fehlermöglichkeit der MRT sein können.

Die frisch geschnittenen Präparate wurden zum Nachweis von wandständigen Thromben mit einem Nahobjektiv-Fotoapparat dokumentiert.

Nach der Radiographie wurden die Aortensegmente aus dem Agar entfernt, dehydriert und in Paraffin eingebettet. 3 µm dicke Schnitte wurden von dem caudalen Ende eines jeden Segmentes hergestellt und mit einer Eisenfärbung (Berliner Blau) gefärbt.

Analyse der Referenzmethoden Histologie und Radiographie

Es wurde eine vorläufige Auswertung von 5 anatomischen Regionen von 3 Kaninchen der Gruppe d durchgeführt. Dabei wurden Tiere ausgesucht bei denen eine gute anatomische Übereinstimmung von in vivo MRT-Bildern und histologischen Schnitten vorlag. Die Schichten konnten anhand von Gefäßabgängen eindeutig zugeordnet werden. Der Vergleich von in vivo-MRT-Bildern mit den korrespondierenden Histologien zeigte, dass mehr als 20 eisenpositive Zellen bei einer 100fachen Vergrößerung vorliegen mussten, um in der MRT einen Effekt zu produzieren. Die abschließende Auswertung wurde dann von einem unabhängigen

Pathologen durchgeführt, der keine Kenntnis von den in vivo-Messungen, der Radiographie und der Tatsache hatte, ob die Tiere Kontrastmittel bekommen hatten. Die Untersuchung wurde an einem Standardmikroskop (Leitz, Wetzlar) durchgeführt. Es wurden drei Eisengewebskonzentrationen für eine Haupt- und eine Alternativauswertung abgeschätzt:

Als histologisch positiv wurde ein histologisches Segmentpräparat, d.h. ein Transversalschnitt der Aorta, genau dann gewählt, wenn in einem Segment an mindestens einer Stelle bei 100facher Vergrößerung ein mikroskopischer Bildausschnitt mit 20 oder mehr eisenpositiven Zellen oder eisenpositiven Arealen von zelläquivalenter Größe gefunden wurde.

Als histologisch negativ wurden in der Hauptauswertung alle Segmente gewertet, die weniger als 20 eisenpositive Zellen oder entsprechende eisenpositive Areale aufwiesen.

Für eine alternative Auswertung dokumentierte der Pathologe auch, ob ein histologisches Segmentpräparat mindestens ein Areal in der Intima mit einem „geringen Eisengehalt“ zeigte. Als „geringer Eisengehalt“ wurde notiert, wenn bei 100facher Vergrößerung 3 - 19 eisenpositive Zellen oder eisenpositive Areale von zelläquivalenter Größe vorlagen.

Die Radiographien in Mammotechnik wurden auf einem Lichtkasten mit einer Leuchtkraft von 2 500 cd/m² durchgeführt. Der Auswerter befandete die Verkalkungen in der Aortenwand. Alle Strukturen mit einer erhöhten Röntgendichte wurden als Verkalkung gewertet. Im Falle einer Verkalkung wurde diese als „dicht“ oder „transparent“ klassifiziert:

Als „dichte“ Verkalkung wurde ein Areal gewertet, das eine homogene Densität und eine solide Struktur aufwies und als weiß imponierte.

Eine Verkalkung wurde als „transparent“ gewertet, wenn der größte Anteil dieses Areales eine heterogene Struktur aufwies und die Dichte einen mittleren Grauwert zeigte.

Zusätzlich wurden von dem Auswerter typische Verteilungsmuster beschrieben.

Auswertung der Magnetresonanztomographien

Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte anhand von Filmen (Laserdrucker), die eine Serie von 20 aneinander angrenzenden MRT-Bildern enthielten. Auf diesen Bildern waren alle Segmente in Zeilen und Reihen angeordnet. Die Gefäßsegmente wurden in einer Querschnittsansicht dargestellt. Eine repräsentative Schicht, auf der die Gefäßanatomie am besten mit der korrespondierenden Histologie übereinstimmte, wurde in einer Vorauswertung definiert und für die weitere Auswertung markiert. Segmente wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, wenn keine anatomische Übereinstimmung zwischen dem histologischen Schnitt und dem MRT-Bild vorhanden war, wenn das Segment zu klein war, wenn es kollabiert war oder wenn kleine Luftblasen oder Verunreinigungen im Agar vorlagen.

Die MRT-Filme wurden von 2 unabhängigen Auswertern ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit und der Ergebnisse der Referenzmethoden ausgewertet. Die Auswerter befundeten die Röntgenfilme unabhängig voneinander in separaten Sitzungen. Ein Auswerter war Veterinär, der andere Radiologe. Beide hatten über 10 Jahre Erfahrungen auf dem Gebiet der eisenoxydverstärkten MRT und waren erfahren in der Interpretation der eisenoxydverstärkten MRT arteriosklerotischer Wandläsionen.

Die Auswerter bestimmten für jedes Aortensegment, ob eine fokale Signalauslöschung vorlag. Eine fokale Signalauslöschung wurde definiert als ein Areal in der Arterienwand, das unmittelbar an das Lumen der Arterienwand angrenzte und eine sehr niedrige Signalintensität in der T2*-gewichteten Sequenz auswies. Dieses Areal sollte scharf gegenüber dem Arterienlumen getrennt sein und Ausläufer in der Tiefe der Wand aufweisen, ggf. durften einige Areale konfluieren. Für jedes Segment erhoben die Auswerter jeweils einen Befund. Dieser Befund berücksichtigte auch das subjektive Vertrauen in die gestellte Diagnose auf einer 5-Punkte-Skala: „Negativ“, „vermutlich negativ“, „unklar“, „vermutlich positiv“ und „positiv“.

Richtigkeit und Übereinstimmung zwischen Auswertern

Die Auswertung erfolgte mittels einer ROC-Analyse. Die ROC-Analyse ist eine Schätzfunktion auf Grundlage einer binormalen Verteilung, welche die falsch-positive Fraktion (FPF) als Funktion der tatsächlich-positiven Fraktion (TPF) für jeden Auswerter bestimmt (Metz CE, 1978; Metz CE, 1986; Metz CE, 1989). Die Auswertung erfolgte auf einer speziellen Software (Rockit 0,91 Beta). Die Richtigkeit der MRT hinsichtlich der Detektion eines hohen Eisengehaltes wurde als Fläche unter der ROC-Kurve (area under the curve, AUC) definiert (Swets JA, 1979). Die Übereinstimmung zwischen Auswertern wurde angegeben als die Schätzfunktion der Zwischen-Auswerter-Korrelation. Das Vertrauensniveau der Untersuchung wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Analyse der Fehlermöglichkeiten

Ein MRT-Befund eines Segmentes wurde als falsch-positiv gewertet, wenn der Befund bei einem histologisch negativem Segment entweder „positiv“ oder „vermutlich positiv“ lautete. Er wurde als falsch-negativ gewertet, wenn der MRT-Befund „negativ“ oder „vermutlich negativ“ lautete, aber ein histologisch positiver Befund vorlag. Für jede falsche MRT-Diagnose versuchte ein weiterer Radiologe anhand der Referenzmethoden (Fotographie des makroskopischen Präparates, ex vivo-MRT, Radiographie in Mammotechnik und Histologie) Fehlerquellen zu identifizieren. Bei unschlüssigen Fällen wurde der Pathologe für eine Entscheidungsfindung hinzugezogen.