

5 Ergebnisse

Alle eingesetzten Tiere befanden sich sowohl vor, als auch direkt nach der Injektion, sowie bei regelmäßig durchgeführten Kontrollen bis direkt vor der Organentnahme in einem guten gesundheitlichen Zustand. Bei der Sektion wurden makroskopisch weder an den entnommenen Proben, noch am übrigen Tierkörper physiologische Abweichungen oder pathologischen Veränderungen sichtbar.

5.1 Magnetresonanztomographische Untersuchungen

5.1.1 Angiographiestudie

Zeitverlauf und dosisabhängige Studie: Alle 6 getesteten Dosierungen ergeben von 15 bis 90 $\mu\text{mol Fe/kg}$ einen anhaltenden intravasalen Signalanstieg, der es erlaubt, selbst kleine Gefäße 2. und 3. Ordnung abzugrenzen. (Abb. 5). Anhand der Messungen in der Aorta in Höhe des Aortenbogens, der Nierenabgänge und der Endaufteilung der Aorta wurden für die unterschiedlichen Dosierungen (siehe Material und Methoden) ein maximales S/N berechnet (Tab. 2). Die Signalintensitäten der 3 Meßpunkte zeigen je Dosis aufgrund der gleichmäßigen Verteilung des Kontrastmittels im Gefäßsystem keine Unterschiede auf. Bis zu einer Dosierung von 75 $\mu\text{mol Fe/kg}$ wird ein signifikanter Unterschied ($p < 0.01$) im Signalanstieg zwischen den getesteten Dosierungen gefunden. Abb. 4 stellt das Signal/Rauschen (S/N) als Mittelwert der 3 Meßpunkte nach Injektion verschiedener Dosierungen von VSOP-C63 in Abhängigkeit der Zeit dar. Die Symbole zeigen die Mittelwerte der tatsächlich gemessenen Werte (Mittelwerte und Standardabweichungen). Die durchgezogene Linie ist der theoretische Verlauf, der mit Hilfe einer einfachen exponentiellen Anpassung berechnet wurde. Bis zu einer Dosierung von 75 $\mu\text{mol Fe/kg}$ KM stimmt die Anpassung mit den Mittelwerten weitgehend überein. Für die Dosis von 90 $\mu\text{mol Fe/kg}$ KM wird zu den frühen Zeitpunkten keine Übereinstimmung zwischen Anpassung und Meßwerten gefunden, da hier die T2*-verkürzende Wirkung der Partikel zu einer Signalminderung führt (Überdosierungseffekt). Dieser Überdosierungseffekt (T2*-Reduktion), welcher bei der hier verwendeten Technik ab 75 $\mu\text{mol Fe/kg}$ eintritt, überlagert zu den frühen Zeitpunkten den signalsteigernden Effekt, so daß die berechnete Kinetik mit dem Verlauf des S/N nicht mehr übereinstimmt. Für die

unterschiedlichen Dosierungen ergeben sich verschiedene Bluthalbwertszeiten (Tab. 2), wobei das Verhältnis zwischen Dosis und Halbwertszeit einem einfachen exponentiellen Zusammenhang folgt.

Tab. 2: Darstellung der Werte des max. S/R und der Bluthalbwertszeit mit Standardabweichungen bei den verschiedenen Dosierungen

Kontrastmittel -Dosis in $\mu\text{mol/kg KM}$	max. S/R	Bluthalbwertszeit in min
15	25 \pm 1	15 \pm 2
30	43 \pm 2	20 \pm 3
45	49 \pm 4	29 \pm 6
60	57 \pm 3	37 \pm 5
75	64 \pm 3	61 \pm 16
90	63 \pm 3	86 \pm 21

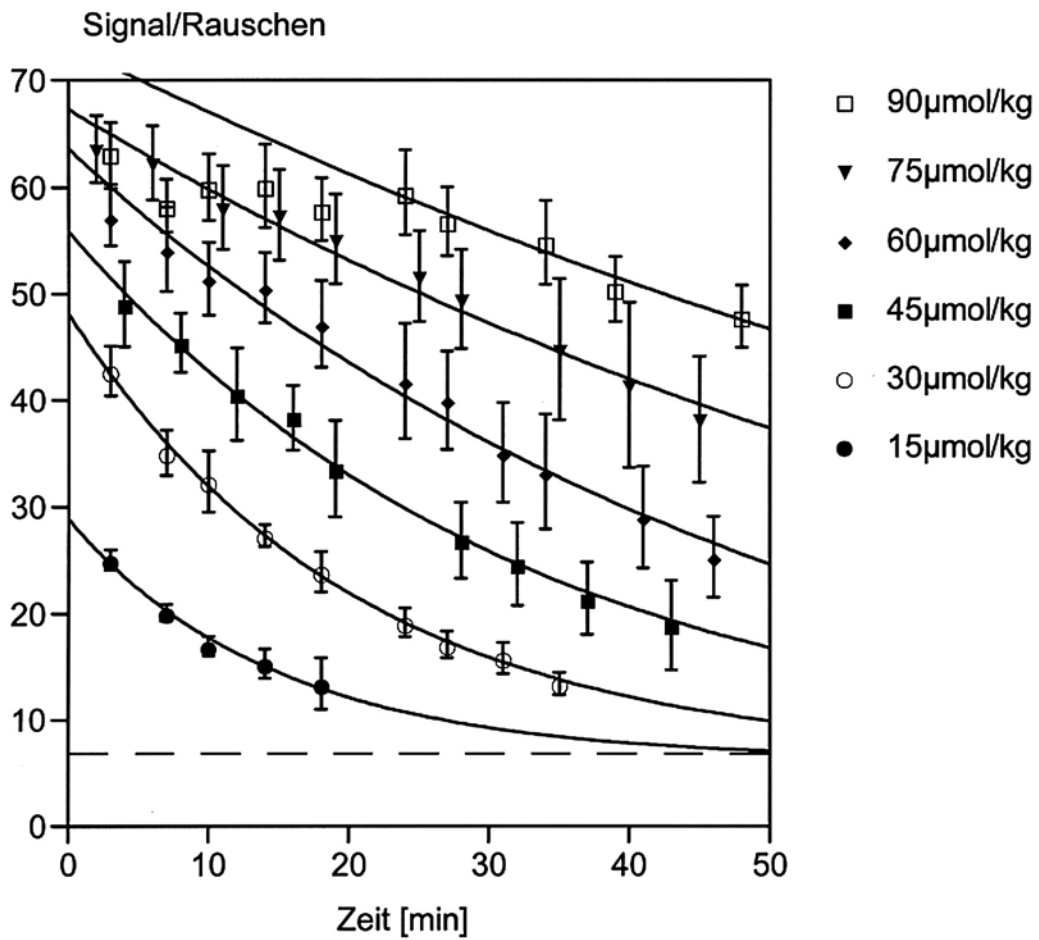


Abb. 4: S/N als Mittelwert der drei Meßpunkte (Aortenbogen, Höhe der Nierenarterien, Endaufteilung der Aorta) der unterschiedlichen Dosierungen im Zeitverlauf, Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Tieren pro Dosis

Abb. 6 zeigt die **MR Angiographie mit Kontrastmittelbolus an Ratten**: Die hier angewendete 3D-FLASH Sequenz erlaubt mit einer Meßzeit von 5 sec die angiographische Darstellung der Aorta an der Ratte. Die Studien mit dieser zeitoptimierten Technik zeigen, daß mit einem Bolus von 45 $\mu\text{mol Fe/kg}$ Körpermasse durch VSOP-C63 derselbe Signalanstieg in der Aorta erreicht wird, wie mit einem Gd-DTPA-Bolus von 0.2 mmol Gd/kg KM. Die Mittelwerte (S/N) betragen Magnevist = $71,5 \pm 11,5$ versus VSOP-C63 = $65,1 \pm 18,3$. Es besteht kein signifikanter Unterschied.

5.1.2 Phantome

Für die magnetresonanztomographische Darstellung der Lebern und Milzen wurden die präparierten Organe in Agar eingebettet und im Ex-vivo-Modell dargestellt. Nach Kontrastmittel-Injektion zeigte sich durch Aufnahme des Kontrastmittel-Eisens in all diesen Organen zeitabhängig eine Signalreduktion, d.h. das MR-Signal war dunkler als bei den Leertieren. Durch Messung der Signalintensitäten kann ein Rückschluß auf die Kontrastmittel-Anreicherung in den Lebern und Milzen gezogen und die Eisenspeicherung zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden. Die Beschreibung der SI erfolgt anhand der errechneten Mittelwerte aus den Tieren der jeweiligen Gruppe.

Die verwendeten Sequenzen PDSE und T2GRE stellen den Eisengehalt in den Organen zu den einzelnen Zeitpunkten in unterschiedlichen Signalintensitäten, aber mit dem gleichen Kurvenverlauf dar. Als Vergleichsparameter wurde die relative Signalintensität zur Signalintensität des Agars (rel.SI/A) verwendet, je größer die rel. SI/A, desto stärker fällt die Signalreduktion aus, d.h. desto mehr Kontrastmittel-Eisen befindet sich in den Organen.

5.1.2.1 Leber

- Kontrolltiere

Beim Vergleich der Kontrolltiere ist bei einer Zeitdifferenz von 2 Monaten, dies entspricht hier einem Zuwachs der durchschnittlichen Körpermasse von 173 g in Gruppe K0 auf 431 g in Gruppe K56, ein geringer Anstieg der SI zu bemerken, d.h. die Leber wird mit zunehmendem Alter heller. Die Werte der Gruppe K sind aber nahezu mit denen der gleichen Alters-, bzw. Gewichtsklasse in Gruppe K0 indentisch. Zwischen allen drei Kontrollgruppen besteht bei beiden Meßsequenzen kein signifikanter Unterschied.

Tab. 3: Darstellung der rel. SI/A beider Sequenzen der Leber der Kontrollgruppen

Gruppe	rel. SI/A PDSE	rel. SI/A T2GRE
K0	1,68 ± 0,17	1,89 ± 0,28
K	1,68 ± 0,17	1,88 ± 0,38
K56	1,49 ± 0,1	1,71 ± 0,13

- Kontrastmitteltiere

Nach Kontrastmittel-Applikation (Abb. 7) kommt es innerhalb von 24 h zu einer maximalen SI-Reduktion und einer anschließend langsam wieder ansteigenden SI, bzw. SI-Reduktionsminderung. Der SI-Reduktion nach zu schließen, ist die Aufnahme des Kontrastmittel-Eisens nach der Kontrastmittel-Injektion am größten und nimmt im Laufe der Zeit kontinuierlich wieder ab, erreicht nach 2 Monaten jedoch nicht den Ausgangswert, sondern liegt bei beiden Meßtechniken über dem Wert der SI der entsprechenden Vergleichstiere. Hier besteht bei beiden Meßsequenzen ein signifikanter Unterschied zwischen allen Kontrollgruppen und den Tieren, die zwei Monate nach Kontrastmittel-Injektion untersucht wurden. Das in die Blutbahn injizierte Kontrastmittel führt zu einer Eisenanreicherung in der Leber, die über den Untersuchungszeitraum kontinuierlich abnimmt und nach 2 Monaten noch nicht restlos abgebaut ist.

Tab. 4: Darstellung der rel. SI/A beider Sequenzen der Leber nach Applikation von 60µmol Fe/kg KM

Gruppe	Zeit post inject.	rel. SI/A PDSE	rel. SI/A T2GRE
A	24 h / 1 d	5,62 ± 0,74	12,28 ± 1,42
B	48 h / 2 d	5,29 ± 0,63	11,92 ± 1,25
C	1 Wo / 7 d	3,1 ± 0,17	8,16 ± 1,74
D	1 Mo / 28 d	2,92 ± 0,1	5,52 ± 1,2
E	2 Mo / 56 d	2,51 ± 0,7	4,1 ± 1,21

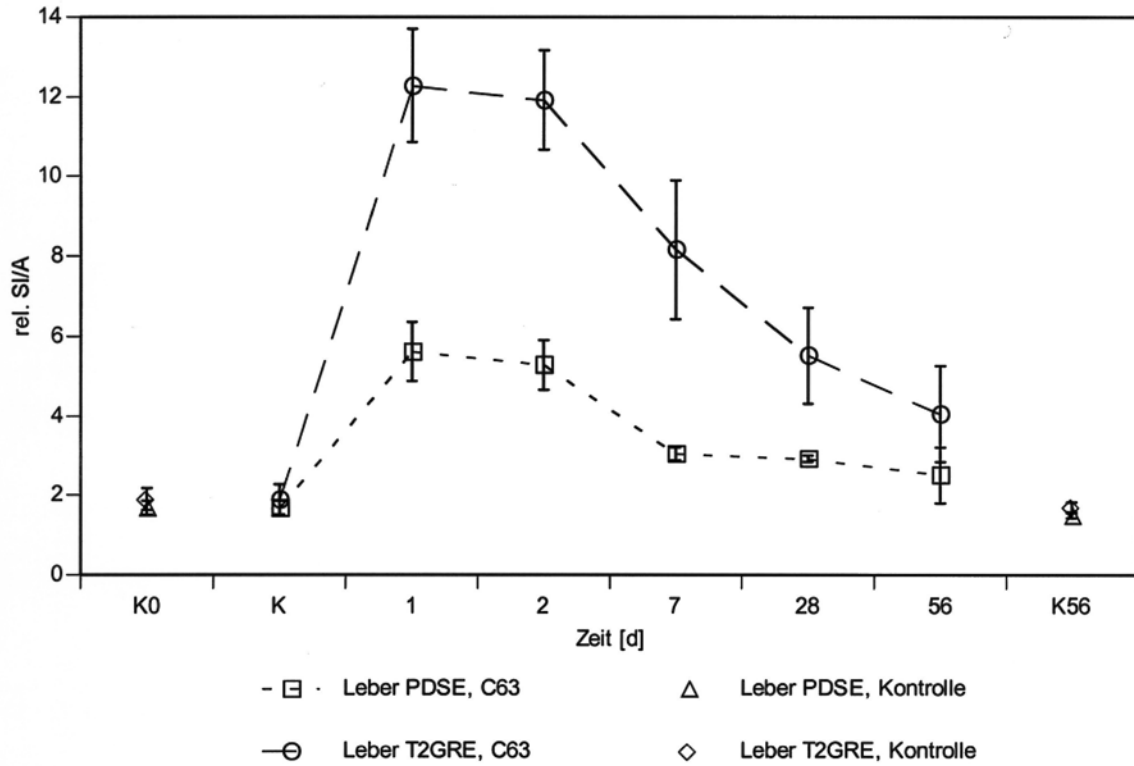


Abb. 7: Signalgebung der Leber im Zeitvergleich mit Mittelwerten und Standardabweichung von je 10 Tieren in den Kontrollgruppen und je 7 Tieren in den Kontrastmittel-Gruppen

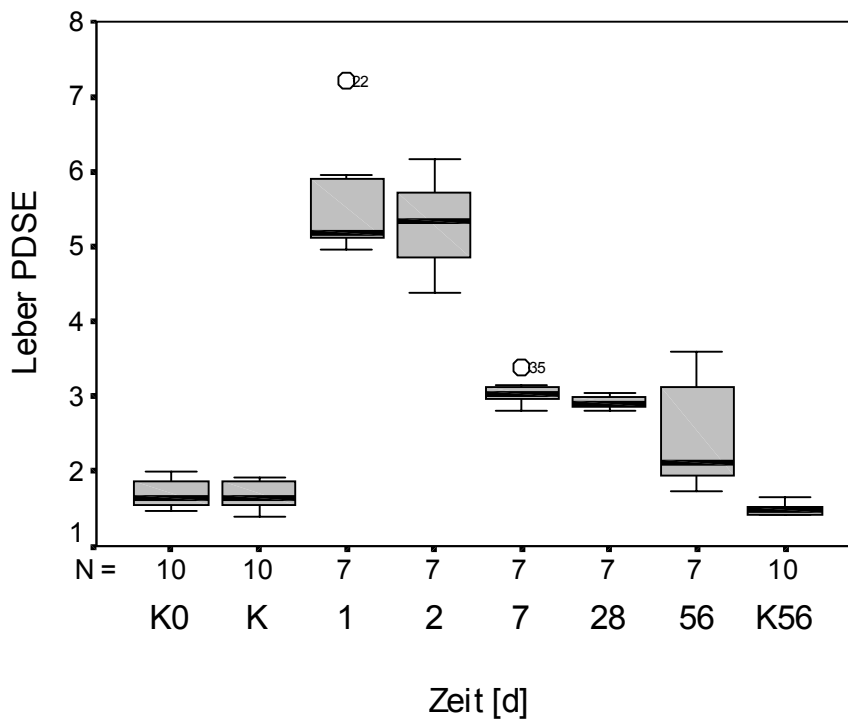


Abb. 8: Relative Signalintensitäten der Leber, PDSE-Sequenz

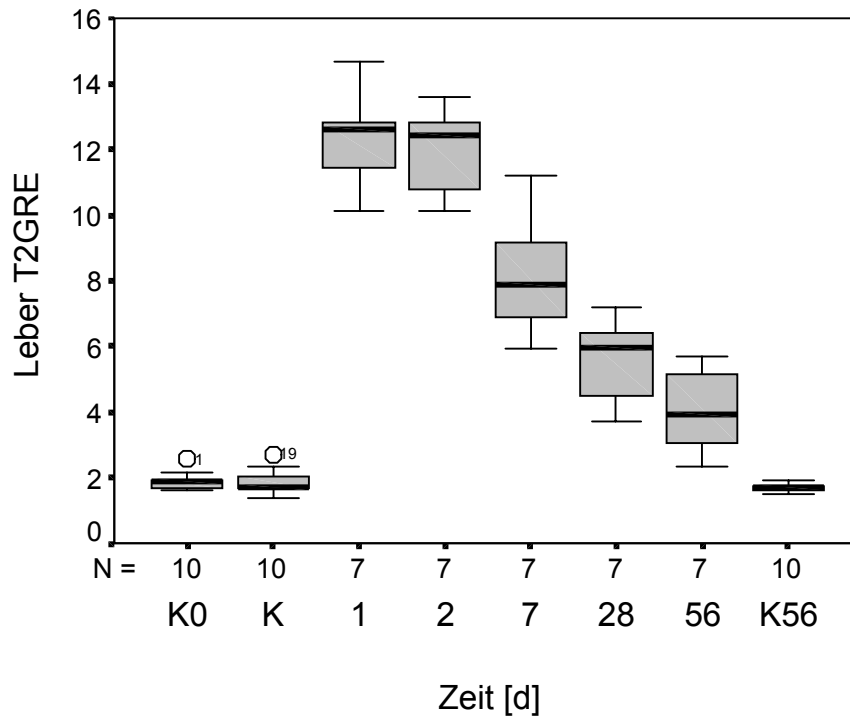


Abb. 9: Relative Signalintensitäten der Leber, T2GRE-Sequenz

5.1.2.2 Milz

- Kontrolltiere

Beim Vergleich der Kontrolltiere kann bei einer Altersdifferenz von 2 Monaten, mit einer durchschnittlichen Körpermasse von 173 g in Gruppe K0 bzw. 189 g in Gruppe K sowie 431 g in Gruppe K56, ein signifikanter Abfall der SI registriert werden, d.h. die Milz wird mit zunehmendem Alter dunkler. Wie auch in der Leber sind die Unterschiede zwischen den Werten der Gruppe K und denen der Gruppe K0 nicht signifikant.

Tab. 5: Darstellung der rel. SI/A beider Sequenzen der Milz der Kontrollgruppen

Gruppe	rel. SI/A PDSE	rel. SI/A T2GRE
K0	1,34 ± 0,22	1,38 ± 0,22
K	1,31 ± 0,19	1,43 ± 0,27
K56	1,62 ± 0,1	3,29 ± 0,68

- Kontrastmitteltiere

Nach Kontrastmittel-Applikation kommt es innerhalb von 24h in der Gruppe A zu einer signifikanten, maximalen SI-Reduktion. Die Eisen-Aufnahme ist hier am größten, die Milz stellt sich dunkel dar. Anschließend steigt die SI langsam wieder an, bis nach einer Woche die SI nahezu wieder den Ausgangswert erreicht, es besteht hier kein signifikanter Unterschied mehr zum Ausgangswert. Die Kontrastmittel-Injektion führt folglich zu einer Speicherung von Kontrastmittel-Eisen in der Milz, die nach einer Woche wieder abgebaut ist. Nach 2 Monaten werden die Milzen wieder dunkler und die SI sind mit denen der gleichschweren Kontrolltiere der Gruppe K56 vergleichbar. Es besteht hier zwischen diesen beiden Gruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Tab. 6: Darstellung der rel. SI/A beider Sequenzen der Milz nach Applikation von 60 μ mol Fe/kg Körpermasse

Gruppe	Zeit post inject.	rel. SI/A PDSE	rel. SI/A T2GRE
A	24 h / 1 d	1,54 \pm 0,16	3,38 \pm 0,34
B	48 h / 2 d	1,39 \pm 0,11	2,79 \pm 0,28
C	1 Wo / 7 d	1,26 \pm 0,1	1,36 \pm 0,1
D	1 Mo / 28 d	1,3 \pm 0,1	2,72 \pm 0,32
E	2 Mo / 56 d	1,6 \pm 0,32	3,2 \pm 0,51

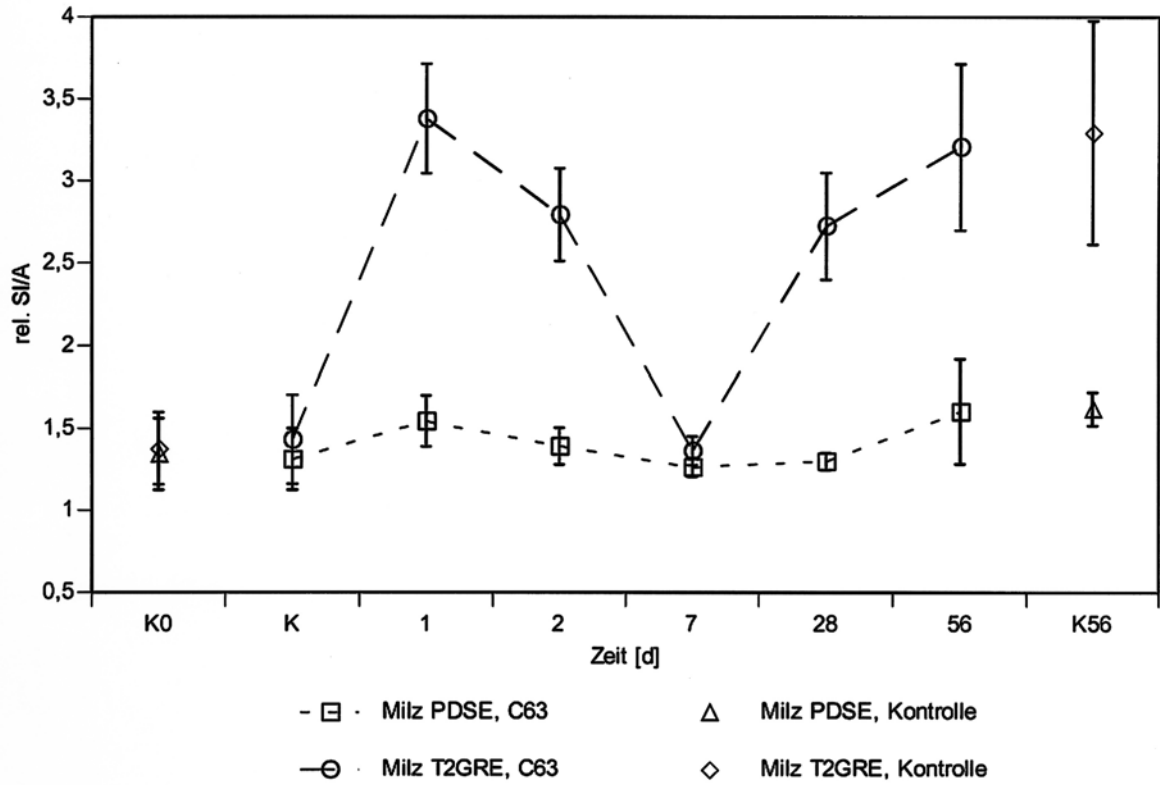


Abb. 10: Signalgebung der Milz im Zeitvergleich mit Mittelwerten und Standardabweichung von je 10 Tieren in den Kontrollgruppen und je 7 Tieren in den Kontrastmittel-Gruppen

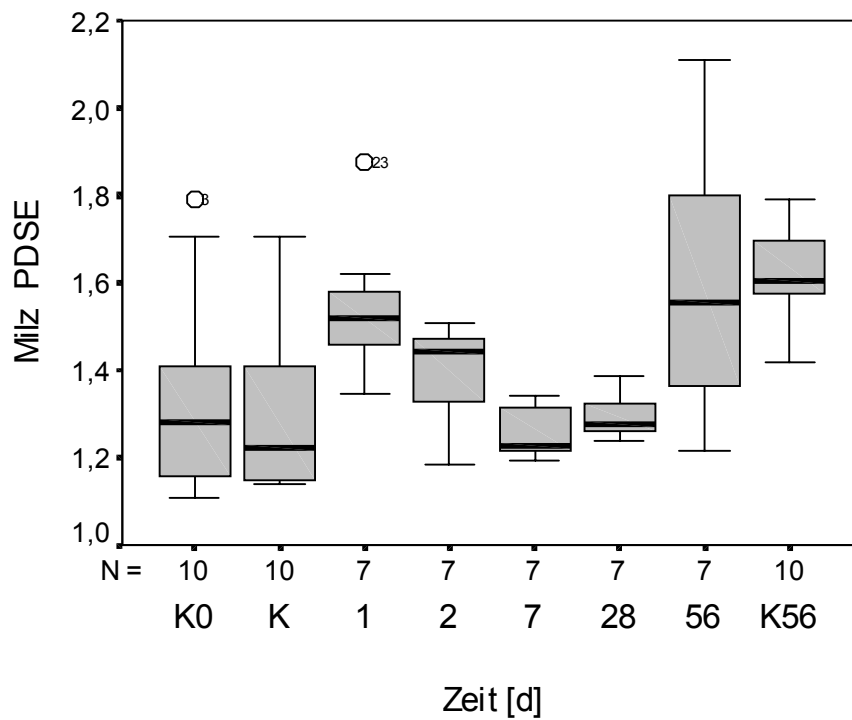


Abb. 11: Relative Signalintensitäten der Milz, PDSE-Sequenz

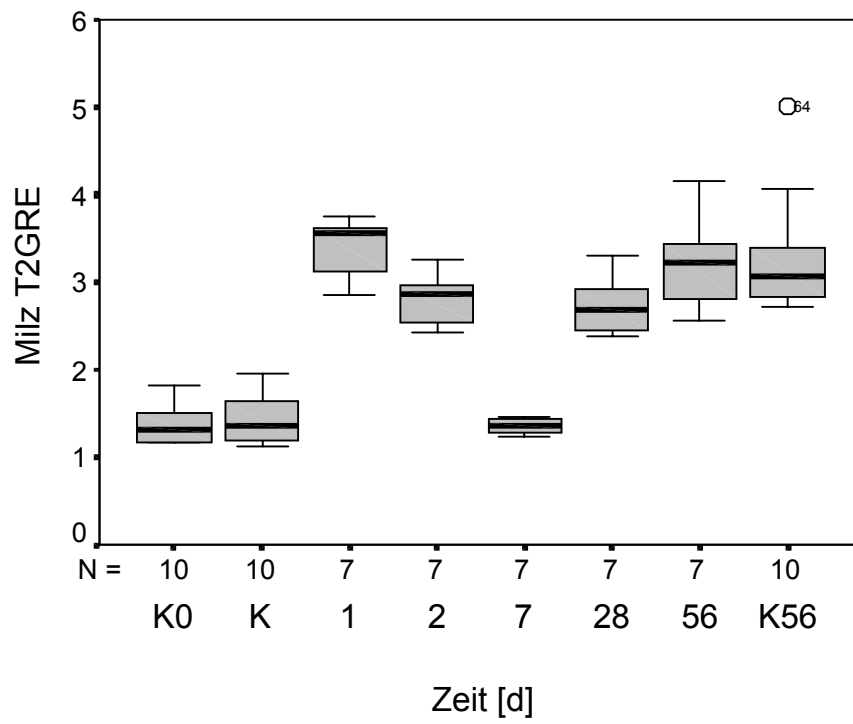
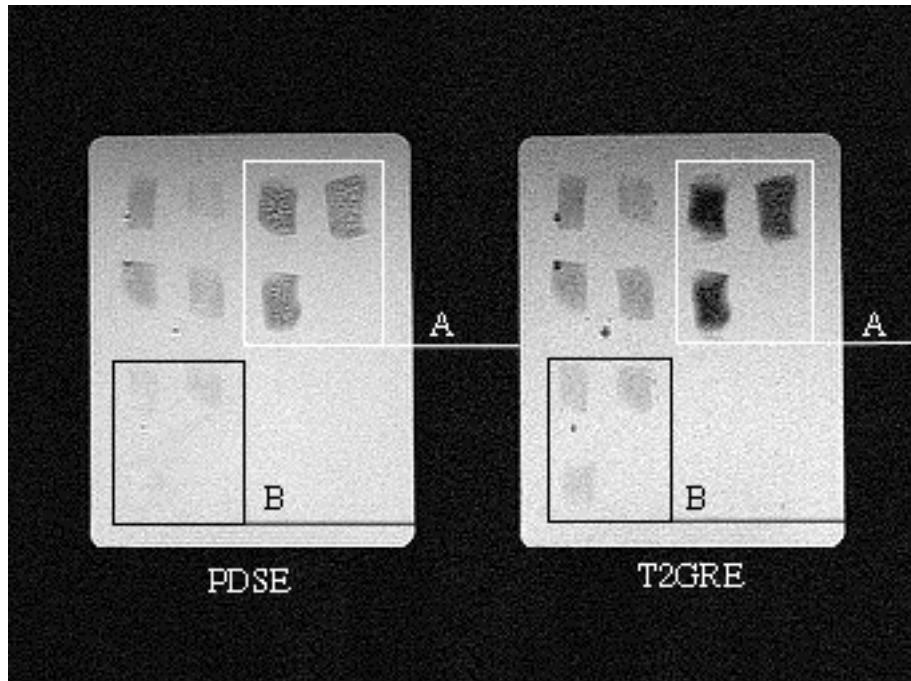


Abb. 12: Relative Signalintensitäten der Milz, T2GRE-Sequenz



A: Milzproben alter Tiere (Gruppe K56)

B: Milzproben junger Tiere (Gruppe K0)

Abb. 13: MR-Bilder der Milzproben im Phantom in Abhängigkeit vom Alter und der Sequenz

In Abb. 13 sind die selben Milzproben von Kontrolltieren mit den beiden verschiedenen Meßtechniken gegenüber gestellt worden. Die mit "A" bezeichneten Proben entstammen der Gruppe K56, die "B"-Proben der Gruppe K0. Auch ohne Kontrastmittel-Gabe stellen sich die Milzen der schwereren, bzw. älteren Tiere dunkler dar, sie präsentieren sich mit einer geringeren Signalintensität. Hier wird deutlich, daß die T2GRE-Sequenz empfindlicher auf das Eisen reagiert.

5.2 Histologische Untersuchungen

Bei der Entwicklung neuer MR-Kontrastmittel steht neben der bildgebenden Funktion auch das Interesse an der Metabolisierung und den Auswirkungen auf den Organismus hinsichtlich Verträglichkeit, Nebenwirkungen und pathologischen Veränderungen im Vordergrund. Im Zusammenhang mit dem charakteristischen Verhalten eisenhaltiger Kontrastmittel sind hierbei an erster Stelle die Aufnahme und der Abbau von Eisen in Leber und Milz zu nennen. Die Eisenfärbung dient dem Vergleich der im physiologischen Rahmen ablaufenden Eisenspeicherung zur kontrastmittelinduzierten Anreicherung. Weiterhin dient die

Eisenfärbung der Beurteilung der gesamten Eisenmenge im Verhältnis zu der magnetisch wirksamen, d.h. im MRT signalgebenden Eisenmenge.

5.2.1 Eisenlokalisierung und histologisch-pathologische Beurteilung

Zur histologischen Untersuchung wurde von allen 35 Ratten nach Kontrastmittelinjektion die Lebern, Milzen, Lungen, Nieren und Herzen untersucht. Die gleichen Organe wurden von den Kontrolltieren der Gruppe K und weiterhin nur die Lebern und Milzen von 10 jungen (Gruppe K0) und 10 alten Ratten (Gruppe K56) gegenübergestellt und beurteilt.

5.2.1.1 Leber

- Kontrolltiere (Gruppe K0, K und K56)

Die Lebern dieser Kontrolltiere weisen alle ein relativ einheitliches mikroskopisches Bild mit deutlich charakterisierbaren Hepatozyten und Leberzellbalken, Sinusoiden, Zentralvenen und Trias auf. Die Leberzellen zeigen in allen Schnitten schwankende gering- bis mittelgradige periphero- bis panlobuläre Vakuolenbildung. In den Leberschnitten der Gruppe K können vereinzelt Lymphozyten v.a. um die Triasgefäße herum und bei vier Tieren (40%) eosinophile Granulozyten differenziert werden. Bei der histologischen Beurteilung der Lebern der alten Tiere sind keine nennenswerten Unterschiede aufgefallen. In allen Lebern wurde kein Eisen nachgewiesen.

- 24 h post injectionem (Gruppe A)

Die Lebern entsprechen in ihrem Erscheinungsbild und dem Auftreten von Blutzellen denen der Kontrollgruppen. Deutlich wird bei der Fe-Färbung die intrazelluläre Eisenanreicherung der Kupfferschen Sternzellen über das gesamte Leberparenchym hinweg. Bei allen Tieren dieser Gruppe ist es peripherolobulär zu einer starken Phagozytose, verbunden mit regelmäßig auftretender Anfärbung der Gefäßendothelien der Trias gekommen (Abb. 15).

- 48 h post injectionem (Gruppe B)

Die zellmorphologische Beurteilung der Leberschnitte dieser Gruppe zeigt keine wesentlichen Unterschiede zu den bisherigen Gruppen. Bei der Eisenfärbung ist 48 h post injectionem der Fe-Gehalt etwas geringer als in Gruppe A, die peripherolobuläre Tendenz der Eisenanreicherung ist allerdings noch prägnant. Eine deutlich sichtbare Fe-Anreicherung in den Kupfferschen Sternzellen zeigt sich hier vorwiegend um die Trias herum, wobei eine Anfärbung der Triasgefäßendothelien weniger häufig zu beobachten ist.

- 1 Woche post injectionem (Gruppe C)

Eine Woche nach der Kontrastmittel-Injektion sind am Zellbild keine Auffälligkeiten zu beobachten. Bei der Beurteilung der Fe-Färbung ist insgesamt deutlich weniger Eisen und dieses nur noch um die Trias herum zu vermerken. Die Anfärbung von Triasendothelien zeigt sich noch bei 5 Proben (71,4%) und ist dann auch nur noch als Blauschleier wahrnehmbar.

- 1 und 2 Monate post injectionem (Gruppen D und E)

Die Lebern der Tiere nach 1 und 2 Monaten post injectionem weisen ein unauffälliges Zellbild auf. In Gruppe D gewinnt man den Eindruck, als ob die Einlagerung des Eisens wieder etwas kräftiger als in Gruppe C, aber in Gruppe E daraufhin wieder abgeschwächt ist. Auch hier präsentiert sich die intrazelluläre Eisenanreicherung der Kupfferschen Sternzellen vorwiegend nur noch im Gebiet um die Trias. Eine Anfärbung der Triasendothelien findet sich regelmäßig, aber nur in wenigen Gesichtsfeldern je Schnitt.

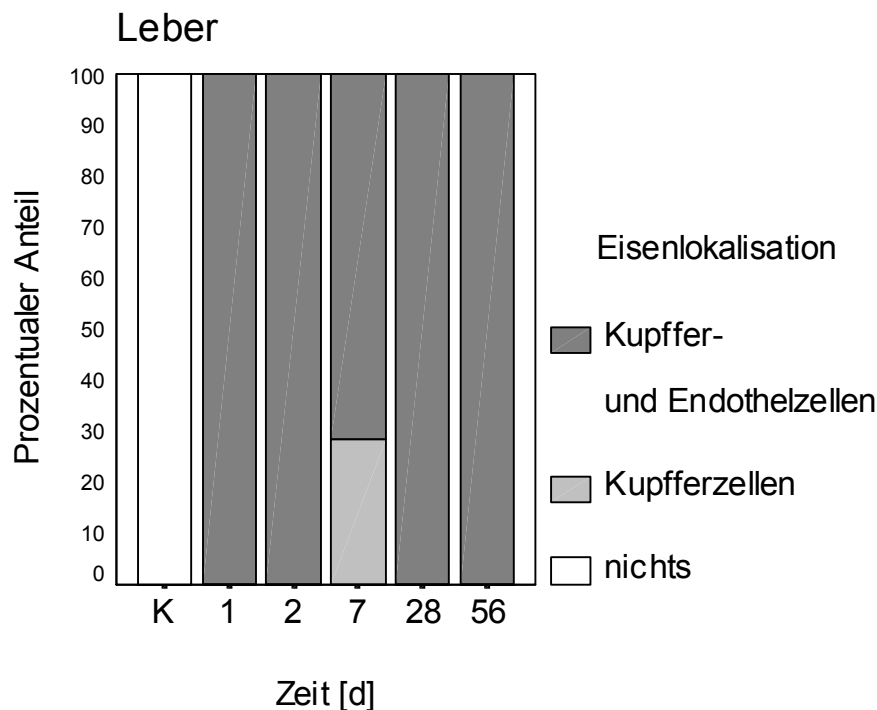


Abb. 14: Lokalisation des Eisens in der Leber als relativer Anteil der Fälle (%)

Zusammenfassend kann bei der Beurteilung der Leberschnitte folgendes festgehalten werden. Das Kontrastmittel führt über einen Zeitraum von 2 Monaten zu keinerlei pathologischen Veränderungen am Zellbild der Lebern. Durch die Anflutung des Kontrastmittels über die

Triasgefäße kommt es innerhalb von 24 h zu einer starken, ausschließlich auf die Kupfferschen Sternzellen und Endothelzellen lokalisierten, intrazellulären Eisenaufnahme des gesamten Leberparenchyms, die besonders peripherolobulär ausgeprägt ist. Im Laufe der folgenden 2 Monate nimmt die Eisenmenge kontinuierlich ab, bis die Eisenspeicherung nur noch im Gebiet um die Trias herum nachweisbar ist.

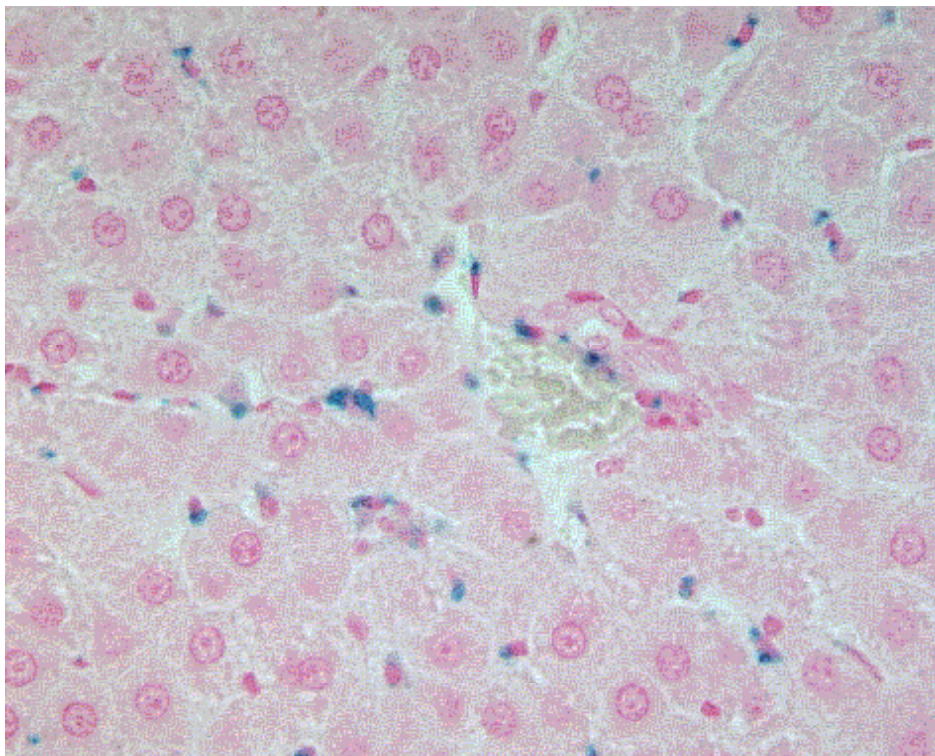


Abb. 15: Anfärbung von Eisen in den Kupfferschen Sternzellen und Gefäßendothel der Leber, Gruppe A, Turnbull-Blau-Färbung, ca. 400-fache Vergrößerung