

## 6 Diskussion

Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Aufgrund der Fortschritte in der Diagnostik durch den Einsatz moderner bildgebender Verfahren wie zum Beispiel der MRT ist eine frühzeitige Erkennung der Veränderungen möglich geworden. Auch die Differenzierung einer entdeckten Neoplasie ist durch den Einsatz der bildgebenden Verfahren in weiten Bereichen möglich. Einen wichtigen Beitrag zur Einstufung der Neoplasie leistet die Untersuchung mit Hilfe von Kontrastmitteln. Durch deren pharmakokinetische Eigenschaften und die Eigenschaften des betreffenden Gewebes sind Rückschlüsse auf dessen Morphologie und Physiologie möglich geworden. Standardgemäß wird in der MRT-Tumordiagnostik Gd-DTPA basiertes Kontrastmittel eingesetzt. Dies zeichnet sich durch seine extrem schnelle Extravasation aus und erlaubt aufgrund seines Anreicherungsverhaltens die Differenzierung von Gewebearten. Gewöhnlich beziehen sich die Untersuchungen auf die Anflutungsphase des Kontrastmittels. In späten Untersuchungen fiel jedoch an malignen Neoplasien ein charakteristisches Verhalten der Kontrastmitteldynamik auf, das als „peripheres Washout“ bezeichnet wurde. Hier kommt es zur Verschiebung der Signalintensitätsverhältnisse im Gegensatz zur Anfangsphase der Messung. Der Randbereich des Tumors, der initial maximale Signalverstärkung zeigte, erscheint am Ende der Messung signalarm, während die angrenzenden Bereiche jetzt eine höhere Signalverstärkung zeigen. Dieses Phänomen tritt allein bei malignen Neoplasien auf (Mahfouz et al., 1994; Sherif et al., 1997).

Höhermolekulare Kontrastmittel werden in der MRT-Diagnostik in Funktion von Blood-Pool Agenzien eingesetzt, die Darstellungen im arteriovenösen System ermöglichen, wie zum Beispiel in der Koronardiagnostik. Eine elementare Voraussetzung in der Tumorthherapie ist, dass die chemotherapeutischen Pharmaka in ausreichend hoher Konzentration im Zielgewebe eintreffen. Man begann daher, die Tumolvaskularisation mit bildgebenden Verfahren zu untersuchen und benutzte dafür die genannten höhermolekularen Kontrastmittel. Es konnten damit Perfusionsanalysen der Gewebe durchgeführt werden, es wurden aber auch pathologische Merkmale der Tumolvaskularisation wie eine erhöhte Permeabilität nachgewiesen (Shames et al., 1993). Das Kontrastmittel VSOP-C184 gehört zur Gruppe der Blood-Pool Kontrastmittel und findet sich derzeit in der klinischen Prüfung Phase II zur Coronarangiographie (Taupitz et al., 2003). Es wurde bislang nicht am Tumor untersucht.

Bei Druckmessungen im Gewebe wurde festgestellt, dass der interstitielle Druck in malignen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht ist. Dies wird durch verschiedene

Ursachen erklärt, die ihre Begründung in der malignen Wachstumsform finden. Die tumoreigene Angiogenese fördert vorrangig die Bildung zuführender Gefäße. Dem gegenüber ist die Ausbildung des ableitenden und drainierenden venösen und vor allem lymphatischen Systems unvollkommen. Als Resultat dessen kann die im Tumor antransportierte Flüssigkeit nicht adäquat abtransportiert werden. Sie staut sich im Gewebe an und verursacht diesen erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck. Die Höhe des gemessenen Druckes sinkt unter erfolgreicher Chemo- oder Radiotherapie (Boucher et al., 1996).

Histologische Untersuchungen dienen der Charakterisierung und Graduierung des Tumorgewebes. Bei der Untersuchung der Tumoren werden heute häufig immun- und glykohistochemische Färbetechniken angewandt, die eine besondere Darstellung der Vaskularisation ermöglichen. Es wurde ein Parameter etabliert, der die Gefäßdichte im Tumorgewebe beschreibt. Dieser Parameter, mikrovaskuläre Dichte (MVD) steht in direktem Zusammenhang mit der Überlebensrate von Tumorpatienten (Weidner, 1995b).

Grundlage dieser Arbeit war die gestellte These, dass das Auftreten des peripheren Washout im malignen Tumor nicht allein aufgrund vaskulärer Gegebenheiten zustande kommen kann. Die Ursache für das Auftreten des peripheren Washout muss in der Gesamtheit der pathomorphologischen und pathophysiologischen Eigenheiten des malignen Tumors begründet liegen. Dazu zählt neben den genannten vaskulären Parametern unter anderem die Besonderheit des erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruckes. Aufgabe dieser Studie war es, am Tiermodell Daten zu den genannten Faktoren zu gewinnen und zu prüfen, ob und in welcher Weise Zusammenhänge zwischen dem Auftreten des peripheren Washout in der dynamischen kernspintomographischen Untersuchung mittels Gd-DTPA, der Dynamik des Blood-Pool Kontrastmittels VSOP-C184, dem erhöhten Druck im Tumor und den histologischen Befunden bestehen.

Dazu wurde das periphere Washout am Colocarcinom CC531 der Ratte mit Hilfe von Magnetresonanztomographie, interstitiellen Druckmessungen und Histologie untersucht. Über den Vergleich der drei Untersuchungseinheiten sollten Korrelate gefunden werden, die das Auftreten des peripheren Washout determinieren.

## **6.1 Das Tumormodell**

Das Tumormodell zeigte in den durchgeführten Versuchen sehr gute und zuverlässige Eigenschaften und zeichnete sich durch eine sehr gut praktikable Handhabung aus. Die

Zellkultur CC531 präsentierte bei ordnungsgemäßer Pflege eine stabile Vitalität auf hohem Niveau ( $96,38 \pm 1,12 \%$ ), die gute Voraussetzungen für reproduzierbare Implantationsergebnisse lieferte. Die Implantation ist im angegebenen Verfahren komplikationslos und mit der nur kurzen Immobilisation für die Tiere schonend durchzuführen. Das Tumorwachstum bis zu einer Größe von ca. 2 cm Durchmesser nahm in subkutaner Lokalisation ca. 45 Tage in Anspruch. Das entspricht einem wöchentlichen Wachstum von 3,26 mm. Fischer dokumentiert eine ähnliche Wachstumszeit von 3 mm pro Woche, die Tumore waren allerdings in der Leber platziert (Fischer, 2000). Bei der Implantation einer Tumorsuspension von  $1 \times 10^8$  Zellen beiderseits in die Flanke wird innerhalb von 6 Wochen eine durchschnittliche Größe von  $2,5 \text{ cm}^3$  angegeben (Heisterkamp et al., 1999). Das dort angegebene Wachstum des Tumors entspricht trotz der hier verwendeten höheren Verdünnung in der Implantationssuspension nahezu dem Tumorwachstum der vorliegenden Studie. Der durchgehend gute Gesundheitszustand der Tiere sowie die kontinuierliche Gewichtszunahme und das Fehlen von pathologischen Veränderungen am Tierkörper nach der Tumorentnahme spricht für eine minimale Beeinträchtigung der Tiere während des Versuches.

## **6.2 MRT**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Kontrastmitteldynamik eines niedermolekularen extravasationsfähigen Kontrastmittels (Gd-DTPA) und eines höhermolekularen Blood-Pool Kontrastmittels (VSOP-C184) im Tumor untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein entsprechendes Tumor-Modell an der Ratte etabliert und die Untersuchungsparameter für die MRT-Untersuchung determiniert. Ziel war die Darstellung und Analyse des „peripheren Washout“ am Tiermodell mit Gd-DTPA, welches zuvor nur am Menschen beschrieben wurde. Mit VSOP-C184 wurde folgend ein Blood-Pool Kontrastmittel eingesetzt, welches zunächst generell auf sein Verhalten im Tumorgewebe überprüft werden und des weiteren Aufschluss über die Vaskularisation und Perfusion im Tumor liefern sollte.

In den Studien zum „peripheren Washout“ am Menschen von Sherif und Mahfouz wurde jeweils eine T1-gewichtete Spin-Echo-Sequenz verwendet (Mahfouz et al., 1994; Sherif et al., 1997). In der Studie von Sherif et al. (1997) wurde die erste Messung 90 s nach Bolusapplikation durchgeführt. Die Akquisitionszeit der gewählten Sequenz von Mahfouz et al. (1994) betrug 15-26 s, die erste Messung wurde 15 s nach der Kontrastmittelapplikation begonnen. Zur Untersuchung des Modells an der Ratte muss im Unterschied zum Menschen die höhere Kreislaufgeschwindigkeit berücksichtigt werden. Da außerdem eine explizite Untersuchung des Anflutungsverhaltens gefordert war, war eine möglichst kurze Messzeit

und damit andere Messtechnik notwendig. Die hier angewandte T1 gewichtete 3D FLASH Sequenz stellte an dem vorhandenen Gerät den optimalen Kompromiss zwischen hoher Auflösung und kurzer Akquisitionszeit (4 s) dar. Weitere Versuche sind auf dem neu installierten Gerät (Magnetom Sonata Maestro Class, Siemens) am Institut geplant, hier sind möglicherweise noch höhere Auflösungen zu erzielen.

Für diese Analyse der MRT-Untersuchung wurde innovativ die Untersuchung von vier Tumorzonen im Vergleich zur V. cava caudalis vorgenommen. In aktuellen Studien zur Kontrastmitteldynamik in Tumoren wird dieser entweder als Ganzes gemessen oder nur Zentrum und Peripherie unterschieden (Quillin et al., 1997; Ma et al., 1997). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass aber alle gewählten Zonen eine eigenständige Charakteristik der Kontrastmitteldynamik aufweisen, die somit diese Unterteilung sinnvoll macht. In diesen Zonen wurden Minimal-, Maximal und Endwerte sowie jeweils die Zeit nach Applikation des Kontrastmittels bis zum Erreichen des jeweiligen Wertes (time to maximum, time to minimum) analysiert. Die gesamte Untersuchungszeit betrug 42 Minuten. Die Auswertung der Zeitpunkte ergab ebenfalls für jede einzelne der untersuchten Zonen deutliche Charakteristika. Die Analyse der Zeitpunkte wurde unter anderem in ähnlicher Weise in der Arbeit von Daldrup beschrieben (Daldrup et al. 2002).

### **6.2.1 Kontrastmittelgestützte MRT-Untersuchung mit Gadolinium-DTPA**

Das Ziel der durchgeführten Untersuchung war die Darstellung und Analyse der Veränderung der Signalintensität im Tumor und in der V. cava caudalis nach Bolusapplikation von Gd-DTPA über den Zeitraum von 42 min unter besonderer Berücksichtigung des „peripheren Washout“.

Die Untersuchung des Tumors am Magnetresonanztomographen lässt sich mit den vorgestellten Methoden reproduzierbar durchführen und liefert mit der gewählten Dosierung von 200  $\mu\text{mol}$  Gd-DTPA/kg Körpergewicht, welches der klinisch angewandten und der in den Washout-Untersuchungen am Menschen von Sherif et al. (1997) angewandten Dosis entspricht, qualitativ sehr klare Bilder.

Das „periphere Washout“ wurde als Kontrastverlust im peripheren Tumorbereich definiert, der in Verbindung mit einer anhaltenden Kontrastverstärkung der „marginal“ und einer zunehmenden Kontrastverstärkung der zentral davon gelegenen Tumorareale („intermediär“ und „zentral“) in der Spätphase der Messung auftritt.

In dieser Arbeit konnte das Phänomen erstmalig am experimentellen Colocarcinom CC531 der Ratte dargestellt werden und zwar an allen untersuchten Tumoren. Das „periphere Washout“ konnte nach Kontrastmittelapplikation mit leichten Schwankungen von Tier zu Tier nach etwa 8 Minuten erkannt werden und es wurde eine zunehmend deutlichere Ausprägung bis zum Ende Untersuchung nach 42 min festgestellt.

Viele dynamische MRT-Untersuchungen an Tumoren am Menschen berücksichtigen allein das Anflutungsverhalten des Kontrastmittels zur Diagnostik und beschränken sich daher auf die ersten 7 Minuten nach der Applikation (Fobben et al., 1995). Dass jedoch auch durch die Analyse späterer kontrastmitteldynamischer Effekte Informationen beispielsweise über die Tumormalignität gewonnen werden können, wurde von Mahfouz et al. (1994) gezeigt. Er stellte auf Aufnahmen 10 Minuten nach der Applikation zuerst das „periphere Washout“ dar. In der Studie von Sherif et al. (1997) erfolgte die Darstellung über einen Zeitraum von 60 Minuten. Experimentelle Untersuchungen am Tier werden durchaus bis zu 30 Minuten ausgeweitet, befassten sich aber häufig mit der progressiven Kontrastierung des gesamten Tumors oder unterschieden durch die Platzierung der Regions of interest (ROI's) maximal zwischen Tumorzentrum und Tumorrand (Shames et al., 1993).

In den Untersuchungen von Mahfouz et al. (1994) und Sherif et al. (1997) wurden jeweils in zwei Regionen ROI's platziert. Die erste gewählte Lokalisation befand sich in der Peripherie des Tumors, in dem Bereich, der zu Beginn der Untersuchung die höchste Kontrastverstärkung aufwies, die zweite Lokalisation wurde im Zentrum des Tumors gewählt. Die Auswahl dieser Regionen spiegelt die Unterscheidung zwischen schwach vaskularisiertem und gering durchblutetem Tumorzentrum und stärker vaskularisierter und gut durchbluteter Tumorperipherie wieder. Bei der Analyse der ersten Aufnahmen der vorliegenden Studie im Vergleich mit der Histologie wurde deutlich, dass genauere Informationen gewonnen werden können, wenn eine differenziertere Unterteilung der Regionen vorgenommen wird. So fand hier die Auswertung in vier Zonen („marginal“, „peripher“, „intermediär“, „zentral“) statt. Es konnte gezeigt werden, dass jede dieser Zonen eine eigenständige charakteristische Dynamik aufweist, somit verbergen die Studien allein mit zwei Tumorzonen einen Teil der zu analysierenden Daten.

Grundsätzlich orientiert sich die Festlegung der auszuwertenden Tumorzonen an der Modellvorstellung eines sphärischen Tumors (Jain, 1988; Jain, 1989; Baxter und Jain, 1989). Es wird hier die Unterscheidung von drei Regionen im Tumor vorgenommen. Von zentral nach peripher gehend handelt es sich um a) die nekrotische schlecht vaskularisierte, b) seminekrotische minder vaskularisierte und c) vitale gut vaskularisierte Region. Diese von Jain (1988) beschriebenen Zonen dienten für diese Studie als Vorlage zur Platzierung der

ROI's. Hinzugefügt wurde die Zone „marginal“, die im äußersten Randbereich des Tumors liegt. Dies ist der Bereich, der beim Auftreten des „peripheren Washout“ marginal zu diesem eine Kontrastverstärkung aufweist. Schematisch ließ sich dieses Modell auf alle untersuchten Tumore übertragen und mit Hilfe der Vier-Zonen-Einteilung konnte durch die Platzierung der entsprechenden ROI's in allen Bereichen die Kontrastmitteldynamik bestimmt werden. Für die Bewertung des „peripheren Washout“ ist es wichtig zu beachten, dass sich diese Zonen aber nicht immer ringförmig um den gesamten Tumor verfolgen lassen, wie es das sphärische Modell vorgibt. So handelt es sich teils nur um kleine Areale am Tumor, die dann aber die entsprechende Dynamik aufweisen.

Das applizierte Kontrastmittel Gd-DTPA folgt aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften einem definierten An- und Abflutungsmuster im Organismus. Dabei durchläuft es mehrere Phasen. Nach der Bolusapplikation kommt es zur Anflutung des Kontrastmittels im intravasalen Kompartiment. Aufgrund der verwendeten Formulierung beginnt fast unmittelbar zeitgleich, also im First-pass, im Kapillarbett die Extravasation in das extravasale Kompartiment, welches etwa die fünffache Größe des intravasalen Kompartiments besitzt. Bei niedermolekularen Kontrastmitteln ist daher der limitierende Faktor für die Aufnahme in den Tumor die Perfusion dieses Gewebes. Die Ausscheidung über die glomeruläre Filtration der Niere reduziert ständig die Konzentration des Kontrastmittels im Intravasalraum. Dadurch kehren sich die Konzentrationsverhältnisse im Gegensatz zur initialen Anflutung langsam um und es kommt zur Diffusion des Kontrastmittels aus dem Extravasalraum zurück in das Gefäßbett, aus welchem weiterhin über das Ausscheidungskompartiment Niere Kontrastmittel eliminiert wird. Der Abtransport des Kontrastmittels aus dem Interstitium per Diffusion in das Gefäßbett dauert aufgrund der vorliegenden Konzentrationsverhältnisse länger als die Anflutung und wird zeitlich maßgeblich von der Eliminationsgeschwindigkeit in der Niere bestimmt (Speck, 1998). In der vorliegenden Arbeit war aufgrund der angewandten Messtechnik keine Blutprobenentnahme am Tier zur Bestimmung der Gd-DTPA Konzentration im Plasma möglich. Hier wird daher der Verlauf der jeweiligen Signalintensität im Gewebe zum Nullwert relativiert betrachtet und auf die Verläufe in der V. cava caudalis bezogen bzw. untereinander verglichen. Eine Berechnung der Konzentration im Gewebe kann daher nicht erfolgen. Dies ist ein Aspekt, der in Folgeversuchen erarbeitet werden könnte.

In den vorliegenden Versuchen wurde in der V. cava caudalis 42 s nach Bolusapplikation das Maximum mit 117,2 % der Ausgangssignalintensität im Präkontrastbild gemessen. 12 min nach Bolusapplikation waren noch 59,9 %, nach 42 min waren noch 8,5 % der Ausgangssignalintensität nachzuweisen. Auffälligerweise ergab sich 16 s nach der Bolusapplikation ein negativer Messwert von – 11,5 %. Hier kommen T2-Effekte zum Tragen

und weisen darauf hin, dass sich bei der gewählten Dosis von 200  $\mu\text{m}$  Gd-DTPA/kg initial leichte Überdosierungseffekte einstellen. Diese Überdosierungseffekte ließen sich zum gleichen Zeitpunkt statistisch signifikant im „marginalen“ (- 8,6 %) und „intermediären“ (- 4,8%) Messbereich des Tumors darstellen. In der Zone „peripher“ konnte dieser Effekt ebenfalls dargestellt werden, erwies sich aber statistisch nicht als signifikant. Man kann aufgrund der rapiden Extravasation bei diesem Kontrastmittel keine rein intravasale Phase abgrenzen, wie beispielsweise bei einem Blood-Pool-Kontrastmittel. Daher ist in diesen Gebieten nur eine gute Vaskularisation und deutliche Extravasation aufgrund des frühen Antransportes zu vermuten.

Bezogen auf diesen Aspekt müssen beim Vergleich der Maximalwerte, die in den einzelnen Tumorzonen erreicht werden, die Zeitpunkte (time to maximum) besonders beachtet werden. In der Zone „peripher“ wird das Maximum (105,9 %) bei 4 Minuten zuerst erreicht. Diese Zone weist zufolge der berechneten Anstiegskonstante im aufsteigenden Bereich der Kurve (vergl. Abb. 12 und 13) den steilsten Verlauf auf. Dies ist die Zone, in der später das Washout festzustellen ist. Dies entspricht auch der von Sherif et al. (1997) gekennzeichneten peripheren Zone. Da in dieser Zone früh eine Kontrastverstärkung nachzuweisen ist, ist von einer guten Perfusion und Permeabilität der Gefäßstrukturen des Gebietes auszugehen. Es ist wichtig nochmals zu bemerken, dass dieser Effekt nicht allein durch intravasales Kontrastmittel hervorgerufen wird. Der größere Anteil des Kontrastmittels, der maßgeblich der Kontrastverstärkung dient, ist aufgrund der pharmakokinetischen Vorgaben bereits extravasiert im Interstitium zu erwarten. Zu diesem Zeitpunkt hat die  $SI_{\text{rel}}$  in der V. cava caudalis bereits um ca.  $\frac{1}{4}$  abgenommen. „Marginal“ wird das Maximum (130,5 %) 8 min nach der Bolusapplikation erreicht. Aufgrund der zu Beginn der Messung aufgetretenen Überdosierungseffekte kann auch in diesem Bereich von deutlicher Vaskularisation und entsprechender Extravasation ausgegangen werden.

Je später der Maximalwert erreicht wird, umso größer ist der Einfluss interstitieller Verteilungsprozesse auf das Kontrastmittel. Da „marginal“ zum genannten Zeitpunkt eine Signalintensität oberhalb des in der Vene erreichten Maximums nachzuweisen war und das Maximum signifikant später als in der Zone „peripher“ und in der Vene erreicht wurde, scheint eine Akkumulation des Kontrastmittels mit verzögerter Anreicherung vorzuliegen, die für die starke Intensivierung des Signals zum gemessenen Zeitpunkt verantwortlich ist. Ursächlich dafür können nur interstitielle Verschiebungen des Kontrastmittels durch Diffusion, Konvektion und andere Kräfte sein. In der Druckmessung wurden erhöhte Werte des IFP für dieses Tumormodell dargestellt. Entsprechend des Modells von Jain (1989) werden hier für die Verteilung des Kontrastmittels aus der peripheren Region in die marginale Zone Konvektionskräfte entlang des Druckgefälles verantwortlich gemacht.

Auch in der Zone „intermediär“ sind die bereits „marginal“ und in der Vene dargestellten Überdosierungseffekte wenige Sekunden nach Applikation zu erkennen. Dies spricht wiederum dafür, dass auch hier unmittelbar nach Applikation reichlich Kontrastmittel anflutet. In der Literatur konnte dafür keine Entsprechung gefunden werden, da in den Arbeiten von Sherif et al. (1997) und Mahfouz et al. (1994) nur eine gröbere Zoneneinteilung mit einer „Gesamtzone zentral“ vorgenommen wurde und die Messequenzen diesen frühen zeitlichen Rahmen nicht abdecken. Es wurde aber berichtet, dass an Malignomen am Menschen nahe der zentralen Nekrose eine kurzzeitige Signalintensivierung auf den frühesten Aufnahmen auffällt (Taupitz, 2003). Im weiteren Verlauf der Messung beherrschen in der Zone „intermediär“ und „zentral“ vollkommen andere Verhaltensmuster der Signalintensivierung das Bild. Die Maxima werden im letzten Drittel der Messung erreicht („intermediär“: 34,5 min mit 91,1 % und „zentral“: 42 min mit 82,1 %). „Zentral“ scheint initial nur gering Kontrastmittel anzufütten, was sich in der berechneten niedrigsten Anstiegskonstante für den Verlauf der entsprechenden Kurve bis zum Maximum widerspiegelt. Dies ist als Hinweis zu werten, dass dieser Bereich des Tumors aufgrund mangelhafter Vaskularisation bzw. Degeneration des Gewebes hauptsächlich über interstitielle Transportvorgänge mit Kontrastmittel gespeist wird und folglich erst spät eine Signalintensivierung erfährt. In der Zone „intermediär“ scheinen die Verhältnisse ähnlich wie „zentral“ zu liegen, außer dass hier noch ein höherer Anteil an direkt vaskulär eingebrachtem Kontrastmittel - unter anderem über die hier histologisch nachgewiesenen Hotspots - für eine geringfügig stärkere initiale Anflutung sorgt.

Das Kontrastmittel bewegt sich im Tumor nach der initialen Extravasation abgesehen von der Resorption zurück in das intravasale Kompartiment entlang von Diffusionsgradienten im Interstitialraum. Zu dem sind in die Tumorperipherie gerichtete Verteilungen aufgrund von Konvektion entlang von Druckprofilen, wie dem hier ermittelten, zu erwarten. Die diffusionsbedingte Verteilung im Interstitium ist mitverantwortlich für die Kontrastierung im Tumor in der späten Phase der Messung, daher noch einmal ein Blick zurück auf die initiale Anflutung und somit die Ausgangsverhältnisse, welche die Diffusionsrichtung bestimmen. Aufgrund der ermittelten signifikanten Minimalwerte ist in den gemessenen Zonen „marginal“ und „intermediär“ sehr früh eine Beeinflussung der SI durch das applizierte Kontrastmittel zu bestätigen. Im Bereich „peripher“ wurde ebenfalls eine deutliche Signalreduktion gemessen. Sie fand bereits 12 s nach Applikation statt, erwies sich allerdings nicht als statistisch signifikant. In diesem Bereich wird aber eine rasche Signalintensitätssteigerung gemessen, welche, bewiesen durch die berechnete Anstiegskonstante, schneller als die aller anderen Tumorzonen vonstatten geht. Somit ist auch peripher von starker Extravasation auszugehen. Die höchste Signalintensität lässt sich in dieser Zone nach 4 Minuten bestimmen, zu diesem Zeitpunkt liegt in den anderen Tumorzonen die Signalintensität noch niedriger. Das bedeutet, dass zunächst das Kontrastmittel von hier aus zu Orten niedriger Konzentration verteilt wird.



Räumlich kommen die Zonen „marginal“ und „intermediär“ sowie nachfolgend „zentral“ in Frage. In der Zone „marginal“ wird im Vergleich zur Zone „peripher“ nach geringfügig langsamerer Anflutung das Maximum nach 8 min, also später als „peripher“, erreicht. Es ist anzunehmen, dass ein Teil des in der peripheren Zone extravasierten Kontrastmittels hierhin per Diffusion umverteilt wird. Zusätzlich werden hier entlang des Druckgradienten konvektive Kräfte die Umverteilung in den Randbereich des Tumors beeinflussen. Ein Teil des Kontrastmittels bewegt sich nach der Theorie des Konzentrationsausgleiches aus der Zone „peripher“ aber in Richtung Zentrum des Tumors. Aus den durchgeführten Versuchen wurde ermittelt, dass die Anflutung des Kontrastmittels in der Zone „intermediär“ erheblich langsamer vonstatten geht als marginal oder peripher. Damit besteht in diesem Bereich, also zwischen den Zonen „peripher“ und „intermediär“, ein deutliches Konzentrationsgefälle, welches eine Diffusion in Richtung Zentrum ermöglicht. Die Zone „zentral“ flutet noch langsamer an, so dass auch hier ein Konzentrationsausgleich per Diffusion aus der Zone „intermediär“ möglich ist. Diese gefundenen dynamischen Vorgänge entsprechen dem von Jain vorgestellten Modell bezüglich der Verteilung von Molekülen im Tumor (Jain, 1989).

„Marginal“ und „peripher“ fallen die Signalintensitäten nach dem frühen Erreichen des Maximums ab. In beiden Zonen geht dieser Vorgang kontinuierlich vonstatten, so dass zum Ende der Messung „peripher“ nur noch 54,5 % der initialen SI messbar sind. In der Zone „marginal“ fällt die SI auf 82,4 % der initialen SI. Die Verläufe der Kurvenabschnitte der beiden genannten Zonen zeigen etwa die selbe Neigung, allerdings auf unterschiedlichem SI-Niveau. „Marginal“ fällt der  $SI_{rel}$ -Wert auf ca. 60 % der maximal erreichten SI, also ein geringerer Signalverlust als in der Zone „peripher“, in der die SI auf die Hälfte des Maximalwertes gefallen ist. Nach dem vorgeschlagenen Modell der interstitiellen Umverteilung verliert die Zone „peripher“ Kontrastmittel in die Peripherie per Konvektion entlang des Druckgradienten sowie per Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten gen Zentrum. Ein zusätzlicher Verlust von Kontrastmittel gen Peripherie durch Diffusion entlang des Konzentrationsgefälles ist ebenfalls möglich. Die periphere Region verliert also mehr Kontrastmittel als die marginale Region, die neben den Verlusten von Kontrastmittel durch vaskulären Abtransport und möglichem Verlust in das umliegende Gewebe von „peripher“ gespeist wird.

Der Verlust an Kontrastmittel in der Zone „marginal“, die histologisch der Kapsel entspricht, kann durch den hohen Anteil der Gefäße an der Gewebefläche (ca. 10%) erklärt werden. Am Ende der Messung besteht ein starker Gradient zwischen Kontrastmittelkonzentration in Blut und Gewebe, so dass aufgrund der vorhandenen großen Austauschfläche Kontrastmittel in die Blutbahn übertreten kann und den dargestellten SI-Verlust verursacht.

Dahingegen wird in den Zonen „intermediär“ und „zentral“ zum Ende der Untersuchung das jeweilige Maximum erreicht. „Intermediär“ scheint sich die SI ab dem Erreichen des Maximums zum Zeitpunkt 34,5 min auf einem Plateau einzupendeln, „zentral“ war eine kontinuierliche Steigerung bis zum Ende der Messung nach 42 min festzustellen. Für diese späten Signalverstärkungen können nur interstitielle Transportprozesse verantwortlich sein, da von vaskulärer Seite aufgrund der Elimination durch die Niere und damit verbundener sinkender Plasmakonzentration Signalminderungen zu erwarten sind. Aufgrund des vorgeschlagenen Modells ist anzunehmen, dass es sich hierbei um interstitielle Diffusionsprozesse handelt. Es wäre eine Aufgabe für folgende Studien festzustellen, ob und in welchem Zeitrahmen sich die letztgenannten Signalintensitäten wieder senken. In Verbindung mit einer Bestimmung der Plasmakonzentration des Kontrastmittels könnte unter Beachtung der kinetischen Modelle und der Geschwindigkeit des Molekültransportes im Gewebe weiterer Aufschluss über die Transportvorgänge gewonnen werden.

Bezüglich der Analyse des „peripheren Washout“ kann anhand der gewonnenen quantitativen SI-Werte folgende Aussage getroffen werden: Das Bild des „peripheren Washout“ ergibt sich aus dem starken Signalverlust in der „peripheren“ Zone in Kombination mit dem geringen Signalverlust in der „marginalen“ Zone und dem Signalanstieg in der „intermediären“ Zone zum Ende der Messung hin. Die Neoplasien, welche in dieser Studie an der Ratte durch die Injektion einer Zellsuspension aus der experimentellen malignen Tumorzelllinie CC531 entstanden sind, haben sich als Modell zur Darstellung des „peripheren Washout“ und zur Analyse der im Tumor ablaufenden Kontrastmitteldynamik bewährt.

### **6.2.2 Kontrastmittelgestützte MRT-Untersuchung mit VSOP-C184**

Das Ziel dieses Abschnitts der Studie war die Analyse der Kontrastmitteldynamik nach Bolusapplikation des superparamagnetischen Blood-Pool Kontrastmittels VSOP-C184 anhand des Verlaufes der Signalintensität im Tumor und in der V. cava caudalis. Im Vergleich zum extravasationsfähigen Gd-DTPA ist von diesem Kontrastmittel eher ein intravasaler Verbleib zu erwarten, die Extravasation dieses Kontrastmittels wurde am Tumor noch nicht explizit überprüft. Die dynamische MRT-Untersuchung wurde nach dem selben Messprotokoll wie die vorhergehende Messung durchgeführt. Die gewählte Dosierung betrug hier 30  $\mu\text{mol Fe/kg}$  Körpergewicht. In den Studien zur klinischen Prüfung des Kontrastmittels werden am Menschen derzeit Dosierungen zwischen 20 und 60  $\mu\text{mol Fe/kg}$  eingesetzt (Wagner, 2003). Die Auswertungsbereiche wurden analog der ersten Messung übertragen, so dass hier ebenfalls die Dynamik in der Vene und in den Tumorzonen gemessen werden konnte.

Visuell ergab die Analyse der Aufnahmen ein wesentlich weniger klares Bild als die Aufnahmen der vorhergehenden Untersuchung. Es zeigte sich initial eine Signalverstärkung im Randbereich des Tumors, während die zentralen Areale unverändert blieben oder eher Signal zu verlieren schien. Am Ende der Untersuchung blieb ein signalstarker Randbereich erkennbar. Nach zentral folgte dann, ähnlich wie in der vorhergehenden Untersuchung mit Gd-DTPA, eine signalarme Zone, an die sich wieder eine leicht signalverstärkte Zone anschließt. Das eigentliche Zentrum des Tumors scheint unverändert zu bleiben. Es scheint sich also der Bereich der Signalverstärkung während der Messung zu verschieben, vergleichbar zum „peripheren Washout“. Rein visuell blieb dies jedoch stellenweise unklar, daher muss hier unbedingt die quantitative Auswertung der Zonen herangezogen werden. Für weitere Studien im Hinblick auf die klinische Anwendung dieses Kontrastmittels in der Tumordiagnostik sollte eine deutlichere Signalverstärkung erreicht werden. Dies ist möglicherweise über eine veränderte Dosierung oder eine Optimierung der Sequenz zu erreichen.

Mit Hilfe von makromolekularen Kontrastmitteln wie albumingebundenem Gd-DTPA oder USPIO gelang es verschiedenen Autoren, die Mikrovaskularisation im Tumor durch MRT-Untersuchungen zu analysieren. Den Prototyp des Kontrastmittels stellt dabei das albumingebundene Gd-DTPA dar (92 kDa, 6 nm Durchmesser, Plasmahalbwertszeit in der Ratte 3 h). In der Studie von Turetschek et al. (2001d) wurde für die MRT-Untersuchung eine T1-gewichtete 3D Gradienten Echo Sequenz (SPGR) verwendet, die über einen Zeitraum von 50 min in zweiminütigen Intervallen Daten akquirierte. Als Kontrastmittel wurden Albumin-Gd-DTPA und USPIO (Durchmesser 3-4 nm, hydrodynamischer Durchmesser < 25 nm, Plasmahalbwertszeit in der Ratte 1 h) verwendet. Für die Auswertung der Aufnahmen wurden die ROI's in jeder Ratte zu jedem Zeitpunkt mit Hilfe einer semiautomatisierten schwellenbasierten Methode platziert. Dabei wurden stark signalverstärkte Pixel auf den späten Aufnahmen selektiert um die Tumorperipherie zu repräsentieren, in der die Signalintensität über den Verlauf der Untersuchung gemessen wurde. Es wurde des weiteren nur in einem Kontrast-Phantom und in der V. cava caudalis die Signalintensität gemessen, eine weitere Analyse innerhalb des Tumors unterblieb. Mit Hilfe eines kinetischen Rechenmodells konnte hier eine Permeabilität für beide Kontrastmittel nachgewiesen werden (Turetschek et al., 2001d). In anderen Arbeiten wurde ebenfalls die Darstellung der Mikrovaskularisation und Permeabilität geprüft, doch beschränkte sich auch hier die Auswertung entweder nur auf die Peripherie des Tumors (Turetschek et al., 2001a) oder zusätzlich noch auf das Zentrum des Tumors (Shames et al., 1993).

In der vorliegenden Studie lag das Augenmerk der quantitativen Auswertung auf der Analyse der Veränderung der Signalintensität im gesamten Tumor und im Vergleich dazu in der V.

cava caudalis. Zudem sollten Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zur ersten Untersuchung herausgearbeitet werden. Daher wurde hier das bereits in der ersten Messung angewandte 4-Zonen Modell mit den analog übertragenen ROI's angewendet und in der selben Zeitspanne von 42 min untersucht.

Das verwendete Kontrastmittel VSOP-C184 folgt aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften einem definierten Anflutungs- und Verteilungsmuster. Es werden auch hier verschiedene Phasen durchlaufen. Nach der Applikation kommt es zu einer Anflutungsphase die ca. 10 s andauert und rein intravasal verläuft. Es hat sich herausgestellt, dass sich das Kontrastmittel initial zunächst nicht vollständig mit dem Blut vermischt, sondern bildlich gesprochen gleich einer Wand durch den Kreislauf strömt. Aufgrund der daher örtlich höheren Konzentration können Überdosierungseffekte bei der gewählten Dosierung entstehen, die sich in einem initialen Abfall der SI spiegeln. Dann folgt die Verteilungsphase, in der sich das Kontrastmittel gleichmäßig mit dem Blut durchmischt. Diese dauert ca. 100 - 120 s und kann Aufschluß über die Kapillardichte geben. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt noch keine Extravasation. Dem folgt eine Klärungs- (Leber) bzw. Extravasationsphase im Gewebe (> 2 min), je nach dem ergibt sich ein positiver oder negativer SI- Verlauf in der späteren Untersuchung. Die Bluthalbwertszeit beträgt in der Ratte  $21,3 \pm 5,5$  min (Wagner et al., 2002; Wagner, 2003). Da in der vorliegenden Studie aufgrund der messtechnischen Vorgaben keine Bestimmung der Plasmakonzentration über den Verlauf der Untersuchung stattfinden konnte, wird der jeweilige Signalintensitätsverlauf zum Nullwert relativiert betrachtet und auf den Verlauf in der V. cava caudalis bezogen bzw. die Zonen untereinander verglichen.

Zunächst ist anzumerken, dass bei dieser Messung stärkere Schwankungen auftraten, als in der vorhergehenden Untersuchung. In der quantitativen Auswertung fiel dies besonders in der Anflutungsphase auf, so dass hier keine Kurvenanpassung vorgenommen werden konnte.

Der Verlauf der Signalintensität in der Vene stellte sich für dieses Kontrastmittel typischerweise mit frühem Erreichen des Maximums (44 s, 154,1%) und anschließendem langsamen kontinuierlichen Abfall der Signalintensität dar. Nach 42 min lag die Signalintensität noch bei 46,5 %. Initial wurde ein hoher Signalverlust ermittelt (16 s, -19,5 %), der durch die erwähnten Überdosierungseffekte aufgrund der Verteilungskinetik im Blut bei der gewählten Dosierung zu erklären ist. „Marginal“ (12 s, -7,7 %), „peripher“ (16 s, -3,7 %) und „intermediär“ (16 s, -7,3 %) spiegeln sich ebenfalls signifikant die Überdosierungseffekte, die aufgrund der Gefäßversorgung in diesen Bereichen des Tumors zustande kommen können. Interessanter Weise war in der Zone „peripher“ wie schon in der vorangegangenen Messung die geringste negative Signalintensität nachzuweisen. Eine

derartige Vergleichbarkeit der Signalintensität ergibt sich zwischen den Messungen auch für die Zonen „marginal“ und „intermediär“ sowie für die Vene.

Die Signalintensitäten der Messung mit VSOP-C184 in den Zonen „marginal“ und „intermediär“ unterscheiden sich nicht signifikant im Minimalwert. Es ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt das Kontrastmittel rein intravasal lokalisiert ist und im Beginn der Durchmischungsphase mit dem Blut ist. Somit zeigt dies den Beginn der kapillären Phase an, die Rückschluß auf die Perfusion zulässt. In den Bereichen „marginal“ und „intermediär“ des Tumors scheint demnach eine ähnlich starke Perfusion vorzuliegen. In der histologischen Untersuchung konnte in diesen beiden Zonen keine identische Vaskularisation gefunden werden. Die Kapsel des Tumors zeigte Vaskularisation mit einem Flächenanteil von 10%. Im nekrosenahen Vitalgewebe finden sich ebenfalls Areale hoher Gefäßdichte. Diese Gefäße schienen im Vergleich zu Gefäßen im Vitalgewebe nahe des Tumorrandbereiches größer zu sein. Möglicherweise ist dies eine Ursache für die gleichförmige Kontrastierung der beiden Zonen und zwar in der Hinsicht, dass für die Signalgebung im MRT die Größe der Objekte und damit verbundene Streuung an Signal entscheidend ist.

„Zentral“ weist nach einem deutlich negativen Minimalwert (68 s) einen hohen Maximalwert auf. Obwohl der Zeitpunkt des Minimalwertes in die Phase fällt, in der das Kontrastmittel bereits verteilt ist und in der Aussagen über die Kapillardichte getroffen werden könnten, kann hier mit Bezug auf die Histologie nicht von gefäßversorgtem Gewebe ausgegangen werden, so dass es sich hier möglicherweise um Anreicherungseffekte anderer Ursache oder Flusseffekte handeln könnte. Da sich aber in der Histologie auch in den Nekrosezonen immer wieder kleine Inseln restlichen Vitalgewebes anfinden, wäre auch denkbar, dass hier Kontrastmittel über restliche, möglicherweise defekte Gefäße eingeströmt ist, anschließend liegen blieb und für Überdosierungseffekte sorgte. Das würde das kontinuierlich negative Signal im Verlauf der letzten 2/3 der Messung erklären.

Bei der Betrachtung und Bewertung, zu welchem Zeitpunkt und mit welcher Intensität das Maximum in den Tumorzonen erreicht wird, muss neben den statistisch erarbeiteten  $SI_{rel}$ -Werten unbedingt die Verlaufskurve (Abb. 21 und 22) betrachtet werden. Innerhalb der Tumorzonen wird das Maximum zeitgleich zuerst bei 1,3 min „intermediär“ und „zentral“ erreicht, die Zone „peripher“ folgt nur unwesentlich später bei 1,4 min. Zu beachten ist, dass nach 44 s bereits in der Vene das Maximum erreicht ist und die SI danach kontinuierlich sinkt. Das bedeutet also, dass in jenen Zonen, die das Maximum nach der Vene erreichen, aus der das Kontrastmittel über die Leber und das MPS eliminiert wird, Kontrastmittel angereichert wird. Dafür kommen Extravasationsvorgänge in Frage, bei denen Kontrastmittel

in den Extrazellulärraum des Tumors hineingelangt, zunächst dort verbleibt und somit für den Anstieg der Signalintensität verantwortlich ist. Dazu wurden in der histologischen Untersuchung entsprechende Hinweise gefunden: Gefäßnah konnten in der Turnbull-Blau-Färbung extravasal lokalisierte phagozytierte und zum Teil frei liegende Eisenoxydpartikel dargestellt werden. Der limitierende Faktor für die Aufnahme makromolekularer Substanzen in das Tumorinterstitium ist der Transport über die Gefäßwand. Ist er hier im Gegensatz zu gesundem Gewebe möglich, scheinen im Tumorgewebe vaskuläre Insuffizienzen vorzuliegen, die eine Extravasation dieses Blood-Pool-Kontrastmittels ermöglichen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Kontrastmittel aufgrund der tumoreigenen Gefäßarchitektur mit Schlaufenstrukturen und blinden Enden antransportiert wird, aber aufgrund unregelmäßiger Durchblutung akkumulieren kann (Less et al., 1991). Auch andere Autoren beschreiben Extravasation makromolekularer Substanzen im Tumor. Die Ähnlichkeit der beschriebenen Vorgänge zu den hier gefundenen legen die Vermutung nahe, dass es sich tatsächlich um Extravasation aus undichten Gefäßen handelt (Daldrup et al., 2002; Turetschek et al., 2001a; Shames et al., 1993).

Nicht nur die Anreicherung des Kontrastmittels bis zu Erreichen des Maximums erfolgt in den Tumorzonen später als in der Vene, auch der prozentuale Abfall der Signalintensität geht in der Vene rascher vonstatten als in den Tumorzonen. Das deutet wiederholt darauf hin, dass Kontrastmittel im Tumor bleibt bzw. langsamer abtransportiert wird. Falls das extravasierende Kontrastmittel entlang eines Konzentrationsgradienten wieder in das Gefäß gelangt, ist das Gefälle am Ende der Messung bei weitem nicht so steil wie in der ersten MRT-Messung. Die Umverteilung wäre damit auch nur langsamer möglich. Anhand der Kompartimentmodelle (siehe 3.2) können Invasions- und Evasionskonstanten von Pharmaka innerhalb von Geweben bestimmt werden. Da in dieser Arbeit Hinweise auf die Extravasation des Kontrastmittels VSOP-C184 im Tumor gefunden wurden, kann die Aufgabe folgender Studien die Determinierung der Parameter sein.

Die Zone „marginal“ hebt sich durch die gemessene hohe Signalintensität von den übrigen Tumorzonen ab. Dies fand Entsprechung in der histologischen Untersuchung in der Tumorkapsel, die in dieser Zone für die Signalgebung verantwortlich ist. Hier finden sich sehr viele großlumige Gefäße, die ein derartiges Signal senden können. Gerade hier wird deutlich, dass die Vaskularisation in diesem Gebiet, welches nicht zum eigentlichen Tumorgewebe gehört, durch den Tumor geprägt ist: Dabei ist die Hypervaskularisation als auch die Insuffizienz der Gefäße, die hier eine Extravasation des Kontrastmittels ermöglichen, anzusprechen. Nochmals ist auf das späte Erreichen des Maximalwertes hinzuweisen: Es entsteht durch extravasiertes und angereichertes Kontrastmittel.

Ein besonderer Fall liegt in der Zone „intermediär“ vor. Wie beschrieben, kommt es hier initial zu Signalverlusten. Statistisch wurde ermittelt, dass der Maximalwert median zum Zeitpunkt 1,3 min erreicht wird. Bei vergleichender Betrachtung der Verlaufskurven der Zonen „peripher“ und „intermediär“ wird jedoch deutlich, dass „intermediär“ im Gegensatz zu Zone „peripher“ eine leicht ansteigende Tendenz der Kurve im Verlaufsdiagramm vorliegt. In der vorgegebenen Messzeit wird zwar der statistisch ermittelte Maximalwert zu diesem Zeitpunkt nicht übertroffen, doch die Tendenz ist ablesbar. Erklärbar ist dieser scheinbare Widerspruch, wenn man die Einzeldaten und die statistische Prozedur betrachtet. Bei 1/3 der Tiere wird der Maximalwert deutlich im letzten Drittel der Messzeit erreicht. Die Hälfte der Tiere weist den absoluten Medianwert innerhalb der ersten 2 min auf, die übrigen kurz danach. Diese Tiere zeigen aber in ihren einzelnen Verlaufskurven ebenfalls einen Anstieg der SI zum Ende der Messung. Also liegt zwar das statistisch ermittelte Maximum median im ersten Drittel der Messung, doch besitzen die Einzelkurven generell zum Ende der Messung hin steigende Tendenz. Dies weist darauf hin, dass hier noch Kontrastmittel angereichert wird, während „peripher“ deutlich eine abfallende Tendenz der Verlaufskurve zu erkennen ist, ein Hinweis auf Verlust von Kontrastmittel in diesem Bereich. „Marginal“ verläuft die Signalintensität auf deutlich höherem Niveau als in allen anderen Tumorbereichen. Die Verlaufskurve weist auch hier eine abfallende Tendenz auf, die jedoch sehr langsam vonstatten geht. In den Zonen „marginal“ und „peripher“ ist der Signalintensitätsverlust im Verhältnis zum Maximalwert gesehen wesentlich geringer als in der Vene; das bedeutet, dass es sich hier tatsächlich nicht mehr allein um intravasal lokalisiertes sondern auch extravasiertes Kontrastmittel handeln muss, welches die Signalintensität zu diesem Zeitpunkt noch beeinflusst.

Es ergibt sich zum Ende der Messung aufgrund der quantitativen Auswertung im Tumor ein Bild, welches dem aus der ersten Messung durchaus vergleichbar ist. Die signalarme Zone „peripher“ wird nach außen von der signalstärksten Zone „marginal“ und nach innen von der leicht signalverstärkten Zone „intermediär“ begrenzt. Die Zone „zentral“ weist allerdings im Gegensatz zur Gd-DTPA Messung negative SI-Werte auf. Diese späten Kontrastmittelverschiebungen sind hier ebenfalls auf extravasale Verschiebungen des Kontrastmittels zurückzuführen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die vier gemessenen Tumorzonen jeweils eine charakteristische Kontrastmitteldynamik zeigen. Es konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Kapillaren des verwendeten Tumors aus der Zelllinie CC531 soweit modifiziert oder insuffizient sind, dass sie dem verwendeten Blood-Pool Kontrastmittel gegenüber eine Permeabilität aufweisen. Dies entspricht den Angaben in der Literatur zu anderen makromolekularen Kontrastmitteln. Albumin-Gd-DTPA verursacht bis 30 min nach

der Applikation eine Signalverstärkung im Randbereich eines Adenocarcinoms der Mamma an der Ratte, wohingegen das Zentrum des Tumors keine Signalveränderung aufweist (Shames et al., 1993). Mit einem USPIO wurde in Mammatumoren ebenfalls nach 30 min der noch signalverstärkte Rand des Tumors im Gegensatz zum unveränderten Zentrum dargestellt (Turetschek et al., 2001c). In diesen Studien wurde jeweils nur eine grobe Zoneneinteilung vorgenommen, in welcher der Tumorrand als Gesamtes und somit am meisten vaskularisiertes und am wenigsten nekrotisches Gebiet ausgewertet wurde. Hauptanliegen war oftmals die Anwendung eines kinetischen Modells, um diese kapilläre Permeabilität zu analysieren. Dabei wird von einem bidirektionalen Zwei - Kompartiment – Modell für das Tumorgewebe ausgegangen, in dem die mikrovaskuläre Permeabilität ( $K^{PS}$ ) und das fraktionale Plasmavolumen (fPV) für das jeweilige Kontrastmittel rechnerisch bestimmt werden können (Turetschek et al., 2001c; Turetschek et al., 2001a; Daldrup et al., 1998). Die Berechnung dieser Parameter ist in sofern interessant, da gezeigt wurde, dass sie unter dem Einsatz von Angiogeneseinhibitoren beeinflussbar sind. Sie können somit eine Option zum Monitoring in der Tumorthherapie bieten (Brasch und Turetschek, 2000). In der vorliegenden Studie am CC531 konnte anhand der ausgewerteten Daten festgestellt werden, dass „marginal“, „peripher“, „intermediär“ die vaskularisierten Zonen des Tumors sind, auch wenn die Vaskularisation unterschiedlich stark ausgeprägt ist. In allen diesen Zonen kann Permeabilität der Gefäße für VSOP-C184 angenommen werden. Ob die Permeabilität in allen Zonen gleichwertig ist, bleibt offen. Zu dem scheinen sich in den Zonen die Abtransportgeschwindigkeiten zu unterscheiden oder es finden auch hier Verschiebungen des extravasierten Kontrastmittels VSOP-C184 durch verschiedene Kräfte statt. Im Gegensatz zu Gd-DTPA liegen aber bislang keine Untersuchungen vor, die diese Kräfte definieren oder beschreiben.

### **6.3 Druckmessung im Tumor**

Derzeit werden hauptsächlich zwei Methoden zur Messung des lokalen interstitiellen Druckes verwendet: die WIN – (wick-in-needle) Technik (Boucher und Jain, 1992; Fadnes et al. 1977) und die Mikropipettenteknik (Boucher et al. 1990). Beide Methoden besitzen Vorteile und Grenzen.

Bei der WIN-Methode werden multifilamentöse Nylonfäden in eine Kanüle eingezogen, welche mittels eines Katheters über einen Druckwandler an einer Druckmesseinheit angeschlossen ist. Die Kanüle besitzt nahe der Spitze ein eingeschliffenes Seitenloch, welches die Flüssigkeitskommunikation verbessern soll. Das System wird mit heparinisierte Kochsalzlösung gefüllt und die Kanüle in das zu messende Gewebe eingebracht. Die



Flüssigkeitskommunikation zwischen interstitieller Flüssigkeit und Flüssigkeit in der Messeinheit kann durch das Komprimieren bzw. Dekomprimieren des Katheters überprüft werden. Bisher wurde die WIN-Methode in der Form verwendet, dass zunächst in einem Tropfen Kochsalzlösung auf Höhe des Tumors ein Nullabgleich durchgeführt wurde und anschließend die Kanüle möglichst zentral in den Tumor eingebracht wurde, so dass dort der interstitielle Druck gemessen wurde (Gutmann et al., 1992; Roh et al., 1991).

Die Grenzen dieser Methode liegen hauptsächlich in der mechanischen Traumatisierung, welche durch die Kanüle im Gewebe hervorgerufen wird. Durch das Einführen der Kanüle können Blutungen hervorgerufen werden, welche die Druckverhältnisse verändern. Es wurde auch vermutet, dass der erhöhte Druck im Tumorzentrum durch Komprimierung des Gewebes beim Einführen der Kanüle verursacht wird, dies konnte jedoch widerlegt werden. Zu dem wird der so genannte „Tunnel“-Effekt beschrieben. Die Kanüle „bohrt“ beim Einführen einen Tunnel in den Tumor, in dem der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) teilweise mit dem atmosphärischen Druck equilibrieren könnte. Dies würde vor allem bei Druckmessungen im Randbereich des Tumors, die beim Zurückziehen der Nadel durchgeführt werden, zu fälschlich geringen Druckwerten führen. Dies kann jedoch einfach umgangen werden, indem hier der Druck beim Einführen gemessen wird (Boucher et al., 1990).

Bei der Mikropipettenteknik wird eine Glas-Mikropipette (Spitzendurchmesser 1 - 3  $\mu\text{m}$ ), welche auf einem Mikromanipulator befestigt ist und an eine Druckmesseinheit angeschlossen ist, in den Tumor eingeführt. Das System ist mit hochmolarer Kochsalzlösung gefüllt. Durch Verschiebung der Flüssigkeitssäule in der Pipettenspitze wird über einen veränderten elektrischen Widerstand der Druck abgeleitet. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der wesentlich geringeren Traumatisierung des Gewebes aufgrund der feinen Pipettenspitze. Aber auf Grund der Fragilität der Pipette ist es nicht möglich, weiter als 2 mm in den Tumor einzudringen. Damit ist eine Messung des zentralen Druckes ausgeschlossen. Es konnten jedoch aufschlussreiche Erkenntnisse über die Druckverhältnisse im Randbereich gewonnen werden. Boucher beschreibt einen steilen Anstieg des Druckes innerhalb des ersten gemessenen Millimeters der Messung. Zu bemerken ist allerdings, dass hier die Pipette zunächst in den Tumor eingeführt wurde und beim Extrahieren der Pipette die Messung durchgeführt wurde. Da der Hals der Pipette breiter als die Spitze ist, ergibt sich auch hier ein Tunneleffekt (Boucher et al., 1990). Die Feinmanipulationsvorrichtung, welche notwendig ist, um ein unversehrtes Einführen der fragilen Glaspipetten in den Tumor zu gewährleisten, belastet diese Methode mit erheblichem finanziellem Aufwand.

Durch Studien, in welchen entweder die eine oder die andere Methode angewandt wurde, konnten die theoretischen Modelle von Jain (1989) sowie Baxter und Jain (1989) bestätigt werden, welche besagen, dass der interstitielle Druck im Tumor vom Randbereich ausgehend ansteigt und zentral plateauhaft erhöhte Werte aufweist (Boucher et al., 1990; Curti et al., 1993).

In der vorliegenden Studie sollte die Druckmessung im Tumor CC531 an der Ratte mit Hilfe der WIN-Technik etabliert werden mit dem Ziel, ein Druckprofil über den gesamten Tumor aufzustellen. Die Kanülenpräparation wurde dazu zunächst anhand der Beschreibungen aus der einschlägigen Literatur vorgenommen. In die Kanülen wird seitlich ein Loch eingeschliffen, um die Flüssigkeitskommunikation zu verbessern, anschließend werden Nylonfäden eingefügt. Es war geplant, im Tumor durch millimeterweisen Vorschub der Kanüle das Profil zu erstellen. Da aber die beiden Öffnungen der Kanülen schon mehrere Millimeter auseinander liegen, kommt dies natürlich für eine Profilmessung nicht in Frage. In den Vorversuchen wurde bemerkt, dass nach einer Druckmessung zentral im Tumor die vordere Öffnung der Kanüle häufig durch Koagula verstopft ist. Daher wurde getestet, ob sich mit Kanülen, bei denen diese Öffnung von vorneherein versiegelt ist, andere Messwerte ergeben. Dies war nicht der Fall. Bei den verwendeten WIN-Kanülen wurden also jeweils die vorderen Öffnungen versiegelt und allein mit der Flüssigkeitskommunikation über das seitliche Loch die Druckmessung durchgeführt. Die Kanüle wurde eingeführt und nach erfolgreichem Druckabgleich wurde der Druck beim Einführen der Kanüle sozusagen „auf dem Hinweg“ gemessen. Es wurde versucht, den Druck durch den gesamten Tumor zu messen, im letzten Teil der Messung, also am Austrittsrand aus dem Tumor, wurden häufig keine Druckveränderungen gemessen, die Kanülen waren dann oft verstopft. Daher wurde das Druckprofil bis 15 mm in den Tumor, also noch im Zentrum befindlich, gemessen. Die Kanüle wurde auf einer Manipulationseinheit fixiert, die aus dem Objektivführer eines Mikroskops gefertigt wurde, der an einem dreidimensional schwenkbaren Arm befestigt war, so dass die optimale Ebene zur Druckmessung eingestellt werden konnte. Außerdem wurde in Vorversuchen die Kanüle subkutan platziert, dort pendelten sich die gemessenen Druckwerte immer bei 0 mmHg ein.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal der interstitielle Druck im Coloncarcinom CC531 in subcutaner Lokalisation an der Ratte gemessen. In allen Tumoren aus der Zelllinie CC531 konnten erhöhte Druckwerte gemessen werden. Dies entspricht der These von Jain (1989) sowie Baxter und Jain (1989), die besagt, dass der interstitielle Flüssigkeitsdruck in malignen Tumoren erhöht ist. Es fällt auf, dass die Messwerte der einzelnen Messpunkte relativ stark schwanken. Der interstitielle Druck im Gewebe wird maßgeblich durch den mikrovaskulären hydrostatischen Druck gesteuert, der natürlich untrennbar mit dem Verhalten des zentralen

Blutdrucks gekoppelt ist (Boucher und Jain, 1992). Es ist anzunehmen, dass der Kreislaufzustand der Tiere aufgrund der Narkose beeinträchtigt wird. In den Vorversuchen wurde herausgefunden, dass allein das Warmhalten der Tiere durch Abdecken mit Tüchern die Narkose besser tolerieren ließ und die gemessenen Druckwerte insgesamt erhöhte. Möglicherweise ist durch zusätzliche Wärmezufuhr über eine Wärmeplatte oder Rotlicht eine weitere Optimierung der Narkosebedingungen zu erreichen. Dies sind wichtige Daten, die im Zuge der Auswertung und weiterer Versuche bedacht werden müssen.

Es konnten mit der angewandten Methode Druckprofile über den Tumor aufgezeichnet werden. Beim Vergleich der beiden Messungen ist zu erkennen, dass die Messwerte nach dem gleichen Profilprinzip verlaufen, in der zweiten Messung aber im Zentrum des Tumors immer unterhalb derer der ersten Messung liegen. Es kann dafür vornehmlich zwei Erklärungen geben, die wahrscheinlich beide Einfluss haben. Erstens findet die zweite Messung räumlich sehr nahe der ersten Messung statt. Der Stichkanal, also der Tunnel der ersten Messung, wird sich nach dem Herausziehen der Kanüle sicherlich mit Gewebswasser füllen. Es ist möglich, dass dies den interstitiellen Druck lokal senkt. Zweitens werden die Kreislaufbedingungen des Versuchstieres die Messung beeinflussen. Diese Art der Messung ist ein relativ zeitintensives Verfahren. Pro Millimeter Messvorschub sind mindestens 2 Minuten einzukalkulieren, die zum Einpendeln des gemessenen Druckes auf einem Niveau benötigt werden. Diese Zeit wird in der Regel überschritten. Der interstitielle Druck hängt maßgeblich vom Blutdruck ab und dieser könnte aufgrund der langen Narkosezeit trotz kreislaufschonender Narkosetechnik im Laufe der Messung sinken. Um den erstgenannten Fehler auszuschließen gibt es höchstens die Möglichkeit zu versuchen, die beiden Messpunkte möglichst weit räumlich zu trennen. Das bedeutet aber, dass nicht mehr an der breitesten Stelle des Tumors gemessen werden kann. Die zweite Messung findet ohnehin schon nicht mehr an der breitesten Stelle statt, was sich auch in deren gemessenem Profil darstellt, da in den letzten Millimetern die Tendenz der Kurve sinkend ist. Die Messung findet hier schon wieder im Randbereich des Tumors statt, während bei der ersten Messung an der breitesten Stelle hier noch die Plateauphase herrschte. Zwei Messungen sind zum Beweis der Gültigkeit zwingend notwendig, diese Schwierigkeit muß also in Kauf genommen werden. Um die Kreislaufsituation zu optimieren. ist neben der optimalen Narkosetechnik unbedingt darauf zu achten, dass die Tiere nicht auskühlen. Dazu sind wärmeisolierende Tücher oder vorsichtige Rotlichtbestrahlung angezeigt. In Folgeversuchen wäre eine gleichzeitige Überprüfung des Blutdruckes wünschenswert. Dabei muss beachtet werden, dass durch die übliche Messweise des Blutdruckes bei der Ratte oft eine Vagotonie entsteht, die dann ohnehin zur Blutdrucksenkung führt. Die größte Störanfälligkeit der Methode liegt in der Obstruktion der Flüssigkeitskommunikationsöffnung der WIN-Kanüle mit Blutkoagula. Die Hoffnung, durch eine Erhöhung der Heparinkonzentration der Lösung, die sich im

Druckmesssystem befindet, die Koagulabildung zu unterbinden, wurde nicht erfüllt. Es kommt in diesem Fall rasch zu Blutungen aus dem Tumor.

Die gemessenen Werte liegen für die erste Messung median im Maximum bei 3,85 mmHg, weisen aber eine große Schwankung auf. Maximal wurden bei einem Tier an diesem Punkt 22,9 mmHg gemessen. Diese Druckwerte scheinen relativ gering. Am humanen colorektalen Carcinom in nativer Lokalisation wurden im Mittel  $21 \pm 12$  mmHg gemessen, auch mit relativ weiter Schwankungsbreite (Less et al., 1992). Es kommen mehrere Ursachen für die gemessenen relativ geringen Druckwerte in Frage. Zum einen wirken subkutan wenig Kräfte von außen auf den Tumor ein. Als ein Grund für den erhöhten interstitiellen Gewebedruck im Tumor wird angeführt, dass die Zellen auf engem Raum stark proliferieren (Boucher und Jain, 1992; Boucher et al., 1990; Wiig et al., 1982). Subkutan gibt es lockere Gewebestrukturen im Vergleich beispielsweise zur Leber, wo der Tumor durch die Leberkapsel in seiner Ausbreitung eingeengt ist. An einem Tier wurde in beiden Messungen ein besonders hoher Druck gemessen. Dieses Tier war besonders kräftig, es lag in der Gewichtsklasse an erster Stelle und wurde während der Messung mit Rotlicht bestrahlt. Möglicherweise wurde die Narkose von diesem Tier auf Grund der guten Kondition sehr gut toleriert und zeigte wenig Einfluss auf das Kreislaufgeschehen, welches mit der Höhe des mikrovaskulären Druckes maßgeblich für die Höhe des interstitiellen Flüssigkeitsdruckes verantwortlich ist (Boucher und Jain, 1992). Die gemessenen Werte zeigten im ersten und zweiten Durchgang einen kontinuierlichen Anstieg über die Distanz vom 8 mm auf, danach wurde eine Plateauphase erreicht. Die Modelle aus der Arbeitsgruppe um Jain, gemessen mit der Mikropipettenteknik, beschreiben einen Druckanstieg innerhalb der ersten 1 – 2 mm vom Tumorrand ausgehend (Jain, 1989; Baxter und Jain, 1989). Dies lässt sich möglicherweise über die wesentlich punktuell genauere Messung mit der Mikropipettenteknik erklären. Die Flüssigkeitskommunikationsöffnung in der modifizierten WIN-Kanüle hat einen Durchmesser von 2 - 3 mm. Dadurch verwischen natürlich die millimeterweisen Veränderungen. Gemessen an einer Stelle im Randbereich, in der bereits ein Druckanstieg erfolgt, wird hier immer noch der Randbereich mit geringem Druck das Messergebnis beeinflussen, so dass die Werte erniedrigt werden und über eine längere Millimeterzahl einen Anstieg aufweisen. Zudem ist zu beachten, dass die Kommunikationsöffnung einige Millimeter von der Kanülenspitze entfernt liegt. Es wird also bereits im „Tunnel“ gemessen, möglicherweise kann sich der Druck in der geschaffenen Höhlung geringfügig ausgleichen und damit sinken bzw. das Profil verwischen.

Trotzdem konnte mit der angewandten modifizierten WIN-Technik nachgewiesen werden, dass im CC531 in subcutaner Lokalisation an der Ratte ein erhöhter interstitieller Flüssigkeitsdruck vorliegt. Zudem konnte ein Druckprofil erstellt werden, welches deutlich

zeigt, dass der Druck vom Tumorrand zum Tumorzentrum hin ansteigt. Für Folgeversuche wäre anzustreben, die Mikropipettentchnik in Kombination mit der WIN-Technik anzuwenden. Mit ersterer könnten die Druckverhältnisse im Randbereich genauer analysiert werden, letztere würde zusätzlich die Druckverhältnisse im Tumorzentrum darlegen.

## **6.4 Histologische Auswertung der Präparate**

### **6.4.1 Charakterisierung des Tumorgewebes**

Die Charakterisierung des Tumorgewebes wurde zunächst an mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) – gefärbten Tumorgewebspräparaten durchgeführt. In der organoiden Tumorstruktur des CC531 liegen die parenchymalen Colonzellen zum Teil noch drüsenförmig, meist aber als Zellhaufen im Stroma. Das Stroma besteht aus unsystematisch angeordneten Bindegewebssträngen, die zwischen den Tumorzellen liegen. Obwohl von den Tumoren keine makroskopisch sichtbaren Metastasen in den Organismus gestreut wurden, zeigen die Tumorzellen durch ihre Atypie und Polymorphie typische Malignitätscharakteristika. Insbesondere sind hier Verschiebungen im Kern-Plasma-Relationsverhältnis, sehr unterschiedliche Zellgrößen und das Auftreten von Riesenzellen anzusprechen. Der Bindegewebsanteil ist bei der mikroskopischen Betrachtung der Objekte deutlich zu erkennen und der Tumor stellte sich bei der Palpation am Tier recht derb dar. Fischer (2000) beschreibt einen hohen Bindegewebsanteil von 30 – 40 % und einen hohen Nekroseanteil des Tumorgewebes von CC531. Während in der vorliegenden Arbeit der Bindegewebsanteil nicht quantitativ erfasst wurde, konnten mit Hilfe der glykohistologischen Färbung (Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia Lektin, BSL I) der Nekroseanteil im Übersichtsbild qualitativ und quantitativ erfasst werden. Die Nekrosefläche nimmt mit 34,5 % der Gesamtfläche einen großen Anteil des Tumors ein. Zentral ist das größte zusammenhängende Areal anzutreffen, es bildet kleine Ausläufer an seinem Rand. Im angrenzenden Bereich des Vitalgewebes sind kleine Nekroseinseln aufzufinden, im Randbereich des Tumorgewebes sind kaum nekrotische Areale vorhanden. Das Bild dieses Tumors entspricht damit der von Jain beschriebenen regionalen Einteilung in nekrotische, seminekrotische und vitale Zonen (Jain, 1989). Die Kapsel des Tumors ist im Unterhautgewebe sehr deutlich ausgeprägt und trägt durch die wallartige Ansammlung von mononuklearen Zellen Zeichen der Abwehrreaktion des Körpers. Die Kapselbreite konnte nicht vollständig gemessen werden, da sie durch das Heraustrennen des Tumors aus dem Unterhautgewebe des Tieres nicht vollständig intakt bleiben konnte. Fischer konnte im intraheptisch lokalisierten CC531 nur 100 µm Kapseldicke messen (Fischer, 2000). Die erhaltene Kapselbreite liegt bereits über dieser Größe. Es wäre bei weiteren Studien auf diesem Gebiet interessant, Tumormodelle verschiedenen

Malignitätsgrades in allen vorgenommenen Disziplinen zu vergleichen. Eine vergleichende histologische Einstufung des jeweiligen Gewebes birgt möglicherweise weitere Erkenntnisse über die Grundlagen der Kontrastmitteldynamik und Druckverhältnisse.

#### **6.4.2 Eisenanreicherung im Tumor**

Die Darstellung der Eisenanreicherung im Tumor wurde mit Hilfe einer Turnbull-Blau Färbung vorgenommen. Körpereigenes Eisen ist im Tumor nicht zu erwarten, daher muss es sich bei dem nachweisbaren Eisen um Rückstände des applizierten Kontrastmittel-Eisens handeln. Hierbei wird vornehmlich phagocytirtes zweiwertiges Eisen angefärbt, das übrige Eisen wird größtenteils beim Fixierungs- und Färbeprozess herausgewaschen. Die Tumorentnahme fand 24 - 27 Stunden nach der Injektion des eisenhaltigen Kontrastmittels statt. Es war nur im Kapselbereich und im gesamten Vitalgewebe Eisen nachweisbar. Dieses Eisen befand sich in freiliegender als auch in phagocytierter Form ausschließlich nahe von bindegewebig umgebenen Gefäßstrukturen. Es konnte nicht bei allen Tumoren angefärbtes Eisen gefunden werden, der mediane relative Flächenanteil ist in beiden Zonen mit  $< 3 \times 10^{-3} \%$  verschwindend gering. Abramjuk (2001) prüfte die Anreicherung des Eisens nach Applikation eines Vorläufers des hier verwandten Kontrastmittels VSOP-C184 über die Berechnung des Flächenanteils. 24 Stunden nach der Applikation konnten in der Leber und Milz, die typischerweise den höchsten Anteil des Eisens aufnehmen, Werte um 1 % gemessen werden. Es ist anzunehmen, dass sehr kleine Kontrastmittel-Teilchen, die aufgrund ihrer Größe nach der Applikation nicht sofort vom MPS herausgefiltert werden, eine längere Verweildauer im Blut haben und möglicherweise extravasieren. Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse der MRT-Messung mit VSOP-C184, in der Signalverstärkungen dokumentiert werden konnten, die aufgrund von extravasiertem Kontrastmittel entstanden sind. Dies könnte dem Anteil an Eisen entsprechen, der partiell im Tumor nachweisbar war. Es wäre für folgende Studien zur Kinetik von VSOP-C184 im Tumor interessant, MRT-Messungen zu späteren Zeitpunkten durchzuführen, um eine genaue Korrelation zur Histologie zu ermöglichen. In unveröffentlichten Testversuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurde der Tumor direkt nach der Kontrastmittelapplikation entnommen und auf den Eisengehalt geprüft. Es konnte kein Eisen nachgewiesen werden. Es bedarf also einiger Zeit, um eine ausreichende Anreicherung und die Akkumulation zu einer entsprechenden Partikelgröße zu gewährleisten, so dass im gefärbten Präparat eine Darstellung erfolgen kann.

### **6.4.3 Vaskuläre Parameter des Tumors CC531**

Um morphologische Korrelate für die in der MRT gefundenen Phänomene und die erhöhten Druckwerte im Tumor zu finden, wurde das Kapillarbett des Tumorgewebes charakterisiert. Aufgrund der tumoreigenen Gefäßstruktur ist die Identifikation der Gefäße in der HE-Färbung erschwert und sie eignet sich nicht zur Quantifizierung. Eine Markierung und deutliche Abhebung der Gefäßstrukturen vom übrigen Gewebe im histologischen Präparat wurde durch Antikörper ermöglicht, die spezifisch mit den Oberflächenantigenen von Endothelzellen reagieren. Vielversprechende Ergebnisse werden dazu in der Literatur von Antikörper-Antigenreaktionen mit Hilfe des von-Willebrand-Faktor assoziierten Antigens (vWF), CD-31 sowie CD-34 als Endothelmarker angeführt (Obermair et al., 1998; Moore et al., 1998; Turetschek et al., 2001b). Die Problematik der immunhistochemischen Arbeit am Tiermaterial liegt vor allem darin begründet, dass die kommerziell erhältlichen Antikörper vornehmlich für Humanpräparate hergestellt werden und dass die Kreuzreaktionen auf Rattengewebe nur teilweise gelingen. Zudem ist möglicherweise im Tumor die Antigenstruktur weiter abgewandelt, so dass die Kreuzreaktion schwer gelingt. Am vorliegenden Material war trotz intensiver Überarbeitung des Färbeprotokolls keine Darstellung der Endothelien über die Antikörperreaktion möglich.

Lektine sind Stoffe pflanzlicher Herkunft. Sie reagieren ähnlich der Antigen-Antikörper-Reaktion mit jeweils bestimmten Zuckerresten im Gewebe. Gängige Lektine für die Gefäßdarstellung sind *Ulex europaeus* oder das *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* Lektin, BSL I (Bankston et al., 1991; Weidner, 1995a). Die Darstellung der Gefäße erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit BSL I. Die Bewertung der Vaskularisation erfolgt in neuesten Untersuchungen anhand des Parameters „mikrovaskuläre Dichte“ (MVD). Dazu werden die Gefäße pro Sichtfeld in den Regionen hoher Gefäßdichte („Hotspots“) ausgezählt (Weidner, 1995a). Dieser Parameter steht in direktem Verhältnis zur Malignität des Tumors und besitzt prognostische Aussagekraft (Weidner, 1995b).

Bei der Durchsicht der Präparate fielen die extremen Unterschiede in der Vaskularisation der Tumorbereiche Kapsel, Vitalgewebe und Nekrose auf. Der Unterschied zwischen Vitalgewebe und Nekrose war bekannt, doch findet die Vaskularisation der Kapsel wenig bis keine Erwähnung. Da in dieser Studie histologische Korrelate zu den im MRT gefundenen Phänomenen definiert werden sollten, wurde die MVD innovativ zusätzlich zu den Hotspots in der Kapsel, im übrigen Vitalgewebe und in der Nekrose untersucht. Somit sind für diese Areale statistisch vergleichbare Parameter vorhanden. Da allein die Zahl der Gefäße pro Fläche nur einen Teil der benötigten Informationen über die Vaskularisation birgt, wurden in

die Analyse zusätzlich die Vermessung der Gefäßlumina und deren prozentualer Flächenanteil sowie die interkapilläre Distanz IKD herangezogen.

Das Modell von Jain (s. Abb. 1) beschreibt analog zum peripher betonten Tumorwachstum den Entwicklungsstand bzw. das Vorhandensein der Tumolvaskularisation mit verschiedenen Regionen im Tumor (Jain, 1989). Die Analyse der MVD erfolgt bezüglich dieses Modells nicht in der nekrotischen Zone. Eine genauere Definition, wo im Vitalgewebe gemessen wird oder wo die Hotspots aufgefunden werden, erfolgt nicht (Weidner, 1995a; Obermair et al., 1998).

In der vorliegenden Studie lag die MVD im Hotspot bei 84,9 Gefäßen/mm<sup>2</sup>. Weidner berichtet bei gleicher ausgewerteter Fläche im Hotspot eine MVD von 101 Gefäßen in metastasierenden und 45 Gefäßen in nichtmetastasierenden Mamacarcinomen der Frau. Die MVD in metastasierenden Prostatacarcinomen lag bei 76,8 Gefäßen und bei 39,2 Gefäßen in nichtmetastasierenden (Weidner, 1995a). Diese Gefäße im Hotspot stehen für die starke angiogene Aktivität des Tumors. Sie liegen in der vorliegenden Untersuchung mit einer interkapillären Distanz von 77,1 µm nahe aneinander und nehmen im Vergleich der Zonen den zweithöchsten Flächenanteil an der Gesamtfläche ein.

In der Kapsel, in der die MVD mit 137,7 Gefäßen/mm<sup>2</sup> weit über der des Hotspots liegt und die IKD von 45,6 µm von noch größerer Dichte der Gefäße zeugt, die übrigens mit großem Abstand zu den übrigen Bereichen den größten Flächenanteil aufweisen, wird dies ebenfalls deutlich. Vermutlich sind hier auch die Gefäße anzusprechen, die vom Tumor zur Vaskularisierung aus dem Wirtsgewebe rekrutiert werden. Zur weiteren Forschung auf dem Gebiet des peripheren Washout durch die Analyse der Gefäßstrukturen ist die Beibehaltung der Zoneneinteilung und der Auswertung in allen Zonen anzuraten, da durch die Bestimmung der MVD in den Hotspots alleine wichtige Informationen unberührt bleiben. Möglicherweise unterblieb bei anderen Autoren die Erwähnung der Kapsel auf Grund der Präparationstechnik des Tumors, die Kapsel kann nämlich nur bei sehr vorsichtiger Entnahme des Tumors erhalten bleiben.

In der Literatur konnte keine vollständige Entsprechung zur detaillierten Analyse der vaskulären Strukturen gefunden werden. Grundsätzlich entspricht der Tumor mit der Verteilung der Zonen in nekrotisch, seminekrotisch und vital dem Modell von Jain (Jain, 1989). Die explizite Erwähnung der Kapsel unterbleibt jedoch. Daten zu den dortigen prominenten Gefäßen wurden bislang ebenfalls nicht berücksichtigt.



## **6.5 Beurteilung von magnetresonanztomographischer Untersuchung, interstitieller Druckmessung und Histologie**

Die Vergleichbarkeit der MRT-Messungen mit Gd-DTPA und VSOP-C184 ergibt sich aus dem identischen Mess- und Auswertungsprotokoll. Wie aus Abbildung 49 ersichtlich, entsprechen die in der MRT definierten und sichtbaren Zonen den charakteristischen Merkmalen des Tumorgewebes und seiner Kapsel in der histologischen Untersuchung. Berücksichtigt werden muß in der weiteren Betrachtung jedoch, dass in der MRT die Schichtdicke stärker ist als die des histologischen Schnittes. Da in der MRT ein Querschnitt durch ein sphärisches Gebilde gelegt wird kommt es hier zu Projektionen, welche die einzelnen Zonen leicht in der Größendarstellung beeinflussen. In der histologischen Untersuchung muß bei der Übertragung auf die MRT-Bilder die Schrumpfung von 20 – 25 % berücksichtigt werden (Romeis, 1998). Ebenfalls muß beim Vergleich der Druckmessung an der realen Tumorgroße die Diskrepanz zu MRT und Histologie mit den erwähnten Eigenheiten in der Darstellung berücksichtigt bleiben.

Das periphere Washout am Colocarzinom CC531 in der Ratte wurde an allen Tieren in der magnetresonanztomographischen Untersuchung (Gd-DTPA) dargestellt. In der Zone „peripher“ findet in beiden MRT-Untersuchungen zu Beginn der Messung ein Abfall der Signalintensität aufgrund von Überdosierungseffekten statt. Danach kommt es hier zur primären Signalverstärkung. In der Druckmessung zeigt dieser Bereich des Tumors bereits einen erhöhten IFP. In der histologischen Untersuchung zeichnet sich diese Zone durch vitales Gewebe mit einer MVD von 42,9 Gefäßen/mm<sup>2</sup> aus. Es ergab sich zudem eine signifikante Korrelation zwischen der gemessenen Anstiegskonstante in diesem peripheren Bereich und der mikrovaskulären Dichte. Die Anstiegskonstante steht in direktem Zusammenhang mit der Perfusion des Gewebes, da diese für niedermolekulare Kontrastmittel den limitierenden Faktor zum Eintritt bzw. zur Extravasation in den Tumor darstellt.

Das Vitalgewebe wurde aufgrund der Gefäßdarstellung in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Literatur (Weidner 1995a) in Vitalgewebe minderer Gefäßdichte (Vitalgewebe) und Vitalgewebe mit hoher Gefäßdichte (Hotspot) unterteilt. Die Hotspots fanden sich als Inseln unscharfer Begrenzung verstreut im Vitalgewebe minderer Vaskularisation. Das Tumorstadium und damit auch die Angiogenese, die Neubildung von Gefäßen, findet am Rand des Tumors statt. Somit wäre es zu erklären, dass die etwas „älteren“ ausgereiften Gefäße mehr in der Tiefe des Gewebes liegen. Die Regionen „peripher“ und „intermediär“ unterscheiden sich vor allem aufgrund der Beeinflussung durch den IFP. Jain postuliert, dass die Extravasation von Molekülen vornehmlich in den Randbereichen des Tumors stattfindet,

welche im Gegensatz zu zentraleren Arealen noch über eine moderate Erhöhung des IFP verfügen (Jain und Baxter, 1988). Nach dieser These wäre somit hier die Extravasation möglich und wurde in der MRT- Messung auch nachgewiesen. In der VSOP-C184-Messung kann hier dementsprechend frühzeitige Perfusion angesprochen werden.

Was geschieht nun im Laufe der Messung mit dem „peripher“ extravasierten Kontrastmittel? Es könnte zum einen rückresorbiert werden, was aufgrund des Konzentrationsgefälles zum Intravasalraum (s. V. cava caudalis Abb. 13) im Verlauf der Messung möglich wäre. Bei einem soliden malignen Tumor wie dem CC531 ist aber davon auszugehen, dass der venöse und lymphatische Abtransport im Verhältnis gegenüber dem arteriellen Antransport insuffizient ist. Es strömt immer weiter neues Kontrastmittel nach, das aber nicht wie im gesunden Gewebe drainiert werden kann, sondern akkumuliert. Zur gezeigten Umverteilung im Laufe der Messung müssen also andere Wege gegangen werden. Es besteht ein Konzentrationsgradient zum Zentrum (Zone „intermediär“ und „zentral“) des Tumors. Hier könnte zum einen aufgrund der zumindest in der Nekrosezone mangelnden Gefäßversorgung aber auch zum anderen nach der These von Jain aufgrund des hohen interstiellen Druckes in der vaskularisierten Intermediärzone weniger Kontrastmittel extravasieren. Und entlang dieses Gradienten kann sich das Kontrastmittel im Interstitium im Laufe der Messung per Diffusion bewegen. Dies würde die späte und langsam ansteigende Signalverstärkung in der Zone „intermediär“ und „zentral“ erklären.

In der Kapsel ist histologisch eine sehr intensive Vaskularisation anzutreffen. In der Druckmessung wird hier bereits ein Druckanstieg im Vergleich zum Ausgangspunkt ermittelt, allerdings sehr gering. In diesem Bereich hat die angewandte WIN-Methode aufgrund der zuvor beschriebenen Ungenauigkeit das größte Defizit. An dieser Stelle müsste idealerweise mit der Mikropipetten-Methode das Profil aufgezeichnet werden. Im MRT zeigt die Zone „marginal“ in beiden Messungen relativ früh deutliche Signalverstärkung, welche aufgrund der vaskulären Voraussetzung und unter Berücksichtigung der Theorie von Jain, nach der hier geringe Druckstärken vorherrschen, zu erwarten ist. Jedoch wäre hier auch ein rascher Abtransport des Kontrastmittels zu erwarten. Der Verlust der Signalintensität über den Verlauf der Messung läuft jedoch schleppend. Boucher postuliert, dass aufgrund des Druckgradienten ein auswärtsgerichteter Flüssigkeitsstrom im Tumor besteht (Boucher et al., 1990). Es ist anzunehmen, dass sich entlang dieses Stromes das Kontrastmittel per Konvektion bewegt. Es fände also eine Auswaschung von „peripher“ in die „marginale“ Zone statt, die das verlangsamte Sinken bzw. die verzögerte Anreicherung der Signalintensität erklären würde. Auch hier wird wieder deutlich, dass die in der vorliegenden Studie ermittelten vaskulären Parameter alleine nicht die im späteren Teil der MRT-Messung stattfindenden Veränderungen der Signalintensität verursachen können, sondern dass der

erhöhte IFP maßgeblich beteiligt sein muß. Dieser liegt aber wiederum in der Struktur der Gefäße begründet, die weitergehend untersucht werden müsste. Dazu sind Studien mittels Elektronenmikroskopie an der Struktur der Gefäßwand, Nachweis von vaskulärem endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) und Untersuchungen zur Perfusion des Gefäßbettes mit seinen Schlaufen, blinden Enden und Dilatation anzustreben.

Die nachgewiesene Permeabilität der Tumorgefäße für das Blood-Pool Kontrastmittel VSOP-C184 weist auf weitere Besonderheiten im Zusammenhang mit dem Tumorwachstum hin. Diese „undichten“ Gefäße sind an der Erhöhung des IFP beteiligt. Ein konvektiver Flüssigkeitsstrom in die Umgebung minderen IFPs ist als permanent anzusehen. Damit könnten tumoreigene Substanzen oder lösliche Wachstumsfaktoren wie VEGF ebenfalls ausgewaschen werden und das enorme Gefäßwachstum im Kapselbereich (10% der Fläche) verursachen. Auch antitumoral wirksame Substanzen können ausgewaschen und damit vom Wirkungsort entfernt werden. Somit sorgt die Malignität des Tumors mitsamt der IFP-Erhöhung für eine gewisse „Resistenz“ des Tumors.

Die Dauer der ersten Druckmessung entspricht in etwa der Dauer der MRT-Messungen, so dass diese beiden Untersuchungen aufgrund der ähnlichen Narkosedauer vergleichbar sind. In jener Druckmessung wurde median ein Druck von 3,9 mmHg gemessen. In diesem Modell reicht demnach dieser Druck bereits aus, um das Phänomen des peripheren Washout zu bewerkstelligen.

Abschließend ist festzustellen, dass am Tiermodell an der Ratte im CC531 das periphere Washout in der MRT Untersuchung mit Gd-DTPA dargestellt werden konnte. Es entspricht dem dargestellten Phänomen am Menschen (Mahfouz et al., 1994; Sherif et al., 1997). Die MRT-Untersuchung mit dem Blood-Pool Kontrastmittel VSOP-C184 bestätigte die Ergebnisse aus der ersten Untersuchung im Hinblick auf die Perfusion des Tumorgewebes, zudem konnte für dieses Kontrastmittel im Tumorgewebe eine Extravasation nachgewiesen werden. Mit der Druckmessung durch die modifizierte WIN-Technik konnte für diesen Tumor ein erhöhter interstitieller Flüssigkeitsdruck nachgewiesen werden, wie es u.a. von Baxter und Jain (1989; 1990) für maligne Tumoren postuliert wurde. In der histologischen Untersuchung wurde zum einen der Differenzierungsgrad und die Mitoseaktivität des Tumors bestimmt, außerdem wurden die vaskulären Strukturen mit Hilfe der MVD, des kapillären Flächenanteils der Lumenfläche und der interkapillären Distanz quantifiziert, wobei hier die Auswertung im Vergleich zur vorliegenden Literatur auf alle Tumorbereiche ausgeweitet wurde (Weidner, 1995a). Die Ergebnisse unterstützen die gestellte Hypothese, dass die Ursache für das Auftreten des peripheren Washout am malignen Tumor neben dem

tumorspezifischen insuffizienten Gefäßsystem in dem erhöhten interstiellen Flüssigkeitsdruck begründet ist.