

## **3. Eigene Untersuchungen**

### **3.1. Material und Methoden**

#### **3.1.1. Kaninchen**

Die Gruppe der Watanabe-Kaninchen wurde für die vorliegende Arbeit von Covance Research Products Inc., Denver, USA bezogen. Die Tiere waren zwischen 14 und 31 Monaten alt und wogen zwischen 2,9 und 4,0 kg. Die Gruppe bestand zu gleichen Teilen aus männlichen und weiblichen Tieren.

Als Kontrolltiere wurden männliche Neuseelandkaninchen ebenfalls von Covance Research Products Inc., Denver, USA bezogen. Sie waren zwischen 9 und 16 Monaten alt und wogen zwischen 3,1 und 3,6 kg. Die Haltung aller Tiere erfolgte durch die Versuchstierhaltung des Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf in Einzelkäfigen mit Stroh. Die Tiere erhielten ein Mal täglich das Ovator-Futter für Kaninchen der Firma Sniff sowie täglich eine Hand voll Heu und Wasser zur freien Verfügung.

Die Tierversuche wurden mit Zustimmung der zuständigen Landesbehörde (Nr. 38/03; Behörde für Umwelt und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg) in Übereinstimmung mit § 7 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

#### **3.1.2. Versuchsablauf**

##### **3.1.2.1. Magnetresonanztomographie**

###### **3.1.2.1.1. Narkose**

Die Kaninchen wurden für die MR-Untersuchungen zunächst mit 0,34 ml/kg (34 mg Ketamin/kg) Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100, Atarost GmbH & Co, Twistringen, Deutschland) sowie mit 0,2 ml/kg Xylazin (Rompun® 2%, Bayer, Deutschland) intramuskulär anästhesiert.

War eine Untersuchungsdauer von über einer Stunde notwendig, wurde die Narkose durch Nachdosierung mit einer Ketamin/Natriumchlorid-Lösung (1ml/5ml) über die Venenverweilkanüle (Introcan®-W, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in der Ohrvene aufrechterhalten.

#### **3.1.2.1.2. Kontrastmittelverabreichung**

Das jeweilige Kontrastmittel wurde am narkotisierten Tier im Magnetresonanztomographen manuell als Bolus über eine Venenverweilkanüle (Introcan®-W, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Ohrvene injiziert und jeweils mit 0,9%iger NaCl-Lösung nachgespült.

Im Verlauf der Eisenstudie wurde zusätzlich immer bei der Untersuchung 120 h nach Kontrastmittelgabe jeweils 8 ml einer Magnevist®/NaCl-Lösung zur Kontrastdarstellung des Gefäßlumens während der MR-Sequenzen per Injektionsautomat mit einer Flussrate von 0,1 ml/s über einen Zeitraum von 80 Sekunden über die Ohrvene injiziert. Dies war nötig, da sich das Blut zu diesem Zeitpunkt kontrastarm darstellte und eine Beurteilung der Aortenwand somit erschwert wurde.

#### **3.1.2.1.3. Untersuchungstechnik**

Die Experimente im MRT fanden im Zentrum für Bildgebende Diagnostik und Intervention in der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf statt.

Die Kaninchen wurden bei 3 Tesla in einem Philips Intera MRT (Philips Medical Systems, Best, Niederlande) mit Hilfe einer 8-Kanal Array Kopfspule untersucht. Die Erstellung der Sequenzen erfolgte durch die Physiker des Zentrums für Bildgebende Diagnostik und Intervention des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Kontrastmittelabteilung der Firma Schering in Berlin.

##### **3.1.2.1.3.1. *Positionierung der Tiere***

Alle Kaninchen wurden jeweils einzeln unter Vollnarkose in Rückenlage in der Mitte einer gewöhnlichen Kopfspule (8-Kanal-Arrayschule) gelagert. Die Position wurde so gewählt, dass sich das Herz immer im Gerätemittelpunkt befand.

### **3.1.2.1.3.2. EKG**

Um die Störung der Bildqualität durch Bewegungsartefakte durch den Herzschlag so minimal wie möglich zu halten, wurden die hochauflösenden T1 und T2- Sequenzen mit langen Untersuchungszeiten mit Hilfe einer EKG-Triggerung gemessen.

Hierfür wurde ein EKG mit Brustwandableitung gewählt.

### **3.1.2.1.3.3. Gruppeneinteilung**

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt und dann per Zufall jeweils einem Kontrastmittel zugeteilt.

Die **Eisengruppe** umfasste 25 Tiere, davon 19 Watanabe und 6 Kontrolltiere. Diese Tiere wurden in vier Untergruppen unterteilt. Zunächst wurde mit vier Watanabe ein Vorversuch (Gruppe I) gestartet, bei welchem jedes Tier eine unterschiedliche Dosis Kontrastmittel erhielt. Hierzu wurden Schichtbilder in parasagittaler Orientierung angefertigt, um die Aorta im Längsschnitt darzustellen.

Anschließend wurden mit den anderen Tieren weiterführende Untersuchungen mit lediglich drei verschiedenen Dosen Kontrastmittel durchgeführt (Gruppen II-IV). Bei diesen Gruppen wurden zusätzlich zum bestehenden Protokoll Schichtbilder in transversaler Orientierung angefertigt, um die Aorta auch im Querschnitt darstellen zu können. Außerdem wurden die Parameter dieser Sequenzen im Vergleich zum Sequenzprotokoll der parasagittalen Schichtbilder im Hinblick auf ihre Eisenempfindlichkeit noch weiter verbessert.

MR-Bilder mit parasagittaler Schichtführung wurden somit bei allen Tieren angefertigt, während die nachträglich ins Sequenzprotokoll aufgenommenen Sequenzen in transversaler Schichtführung lediglich bei 21 Tieren (15 Watanabe, 6 Kontrolltiere; Gruppen II-IV) durchgeführt wurden.

In der **Gadofluorine-Gruppe** wurden 20 Tiere untersucht, davon 16 Watanabe und 4 Kontrolltiere. Die MR-Bilder wurden sowohl in parasagittaler als auch in transversaler Schichtführung erstellt.

Die **Magnevist-Gruppe** umfasste 9 Tiere, davon 6 Watanabe und 3 Kontrolltiere. Die Schichtführung der Bilder erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Gadofluorine-Gruppe.

Um die Anzahl der Versuchstiere im Sinne des Tierschutzgesetzes möglichst gering zu halten, wurden bewusst kleine Gruppen exemplarischer Art gewählt.

#### 3.1.2.1.3.4. *Verwendete Sequenzen*

Bei der **Eisenstudie** wurden Schichtbilder mit folgenden Sequenzen erstellt:

- 1) Zum einen wurde eine hochauflösende Gradienten-Echo-Sequenz mit parasagittaler Schichtführung mit einer Repetitionszeit (TR) von 5,7 ms, einer Echozeit (TE) von 2,2 ms, einem Anregungswinkel von 25°, einer Matrix von 256 x 256 und einer Schichtdicke von 0,35 mm eingesetzt. Die errechnete Pixelgröße betrug somit 0,7 x 0,7 x 0,7 mm.
- 2) Zum anderen wurde eine Gradienten-Echo-Sequenz niedrigerer Auflösung mit parasagittaler Schichtführung mit einer Repetitionszeit (TR) von 4,8 ms, einer Echozeit (TE) von 1,9 ms, einem Anregungswinkel von 25°, einer Matrix von 256 x 256 und einer Schichtdicke von 0,5 mm gewählt. Daraus ergab sich eine Pixelgröße von 1,0 x 1,0 x 1,0 mm.
- 3) Zusätzlich wurden weitere Bilder mit transversaler Schichtführung erstellt. Es handelte sich hierbei um eine Gradienten-Echo-Sequenz mit selektiver Wasseranregung mit einer Repetitionszeit (TR) von 30 ms, einer Echozeit (TE) von 4,8 ms, einem Anregungswinkel von 15°, einer Matrix von 416 x 416 und einer Schichtdicke von 1,5 mm. Die errechnete Pixelgröße betrug somit 0,34 x 0,34 x 0,34 mm.

Für die **Gadofluorinestudie** wurden folgende Inversion-Recovery-Sequenzen verwendet:

- 1) Zum einen wurde eine IR-Turbo FLASH Gradienten-Echo-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 8,2 ms, einer Echozeit (TE) von 2,8 ms, einer Inversionszeit (TI) von 120 ms, einem Anregungswinkel von 20°, 15 Anregungen, einer Matrix von 256 x 256 und einer Schichtdicke von 2,5 mm verwendet, woraus sich eine Pixelgröße von 0,55 x 0,55 x 2,5 mm errechnen ließ.
- 2) Zusätzlich wurde eine 3D IR-Turbo FLASH Gradienten-Echo-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 7,3 ms, einer Echozeit (TE) von 2,2 ms, einer Inversionszeit (TI) von 120 ms, einem Anregungswinkel von 20°, 15 Anregungen, einer Matrix von 256 x 195 x 19 und einer Schichtdicke von 2,5 mm eingesetzt. Hieraus errechnete sich eine Pixelgröße von 0,55 x 0,72 x 1,6 mm.

Bei der Durchführung der **Magneviststudie** wurde eine IR-Turbo FLASH Gradienten-Echo-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 7,6 ms, einer Echozeit (TE) von 2,6 ms, einem Anregungswinkel von 20°, einer Inversionszeit (TI) von 120 ms, 15 Anregungen, einer Matrix

von 256 x 256 und einer Schichtdicke von 2,5 mm eingesetzt. Die errechnete Pixelgröße betrug 0,55 x 0,55 x 2,5 mm.

#### **3.1.2.1.4. Kontrastmitteldosis**

##### **3.1.2.1.4.1. Eisenstudie**

In der **Gruppe I** der Eisenstudie wurden folgende Kontrastmitteldosen untersucht:

- 1,0 mmol (1000 µmol) USPIO/kg Körpergewicht
- 0,5 mmol (500 µmol) USPIO/kg Körpergewicht
- 0,25 mmol (250 µmol) USPIO/kg Körpergewicht
- 0,1 mmol (100 µmol) USPIO/kg Körpergewicht

Die Kaninchen wurden unmittelbar vor sowie nach Kontrastmittelgabe im Magnetresonanztomographen untersucht. Alle Tiere bekamen zunächst eine Kontrastmitteldosis von 0,028 mmol USPIO/kg. Diese geringe Dosis führte jeweils zu einer starken Aufhellung (Weißfärbung) des Blutes im Sinne eines Bloodpoolkontrastmittels. Hierdurch konnte die Aorta in einer folgenden angiographischen Untersuchungssequenz besser beurteilt werden. Vier Minuten nach der ersten Injektion wurde das restliche Kontrastmittel injiziert.

Die Kontrolluntersuchungen fanden bei allen Tieren nach 6 h, 12 h, 48 h sowie nach 5 Tagen post Kontrastmittelgabe statt. Untersucht wurden die Tiere dieser Gruppe in parasagittaler Orientierung.

In den **Gruppen II-IV** der Eisenstudie wurden folgende Kontrastmitteldosen untersucht:

##### **Gruppe II:**

- 0,1 mmol (100 µmol) USPIO/kg Körpergewicht (5 Watanabe, 2 Kontrolltiere)

##### **Gruppe III:**

- 0,25 mmol (250 µmol) USPIO/kg Körpergewicht (5 Watanabe, 3 Kontrolltiere)

**Gruppe IV:**

- 1,0 mmol (1000 µmol) USPIO/kg Körpergewicht (5 Watanabe, 1 Kontrolltier)

Die Kaninchen wurden unmittelbar vor, sowie nach Kontrastmittelgabe im Magnetresonanztomographen untersucht. Alle Tiere bekamen wie bei Gruppe I beschrieben zunächst eine Kontrastmitteldosis von 0,028 mmol USPIO/kg als Bloodpoolkontrastmittel, bevor die restliche Dosis appliziert wurde.

Die Kontrolluntersuchungen fanden bei allen Tieren nach 48 h sowie nach 5 Tagen post Kontrastmittelgabe statt. Untersucht wurde diese Gruppe in parasagittaler und transversaler Orientierung.

Die Auswertung der parasagittalen Schichtbilder erfolgte somit bei insgesamt 25 Tieren (19 Watanabe, 6 Kontrolltiere), die Auswertung der transversalen Schichtbilder bei 21 Tieren (15 Watanabe, 6 Kontrolltiere).

**3.1.2.1.4.2. Gadofluorinestudie**

Die Tiere der Gadofluorinestudie wurden in vier Untergruppen eingeteilt:

- **Gruppe 1:** 0,1 mmol (100 µmol) Gadofluorine M/kg Körpergewicht
- **Gruppe 2:** 0,05 mmol (50 µmol) Gadofluorine M/kg Körpergewicht
- **Gruppe 3:** 0,025 mmol (25 µmol) Gadofluorine M/kg Körpergewicht
- **Gruppe 4:** 0,0125 mmol (12,5 µmol) Gadofluorine M/kg Körpergewicht

Den vier Gruppen wurden jeweils vier Watanabe sowie ein Kontrolltier zugeordnet. Die Tiere wurden unmittelbar vor, sowie direkt im Anschluss an die Kontrastmittelgabe im Magnetresonanztomographen untersucht.

Die Kontrolluntersuchung fand bei den Gruppen 2-4 nach 24 h post Kontrastmittelgabe, sowie bei der Gruppe 1 nach 48 h statt. Eine spätere Untersuchung war bei dieser Gruppe nötig, da sich nach 24 h das Blut der Gruppe 1 aufgrund der hohen Kontrastmittelkonzentration noch hell darstellte und daher eine Auswertung zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war.

#### **3.1.2.1.4.3. *Magneviststudie***

Die Tiere der Magnevistgruppe erhielten 0,2 mmol (200 µmol Gd-DTPA) Magnevist® pro kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden unmittelbar vor sowie direkt nach Kontrastmittelgabe über einen Zeitraum von sechzig Minuten alle acht Minuten im Magnetresonanztomographen untersucht.

#### **3.1.2.2. *Histologische Untersuchung***

##### **3.1.2.2.1. *Narkose und Euthanasie***

Jeweils am letzten Tag eines Untersuchungsintervalls wurden die Kaninchen nach der letzten MRT-Untersuchung während der Narkose mit einer letalen Dosis Xylazin in die Ohrvene euthanasiert und im Anschluß daran sezirt, um die Aorta zu entnehmen.

##### **3.1.2.2.2. *Entnahme der Aorta***

Zur Entnahme der Aorta wurde der Thorax entlang der Linea alba eröffnet und die Lunge entfernt. Die Aorta sowie das Herz wurden freipräpariert und aus dem Thorax entnommen. Anschließend wurde das Bindegewebe entfernt und die Aorta direkt am Herzen abgetrennt. Die Aorta wurde nun mit 4%igem Formalin gespült und sodann für 24 h in 4%igem Formalin fixiert.

##### **3.1.2.2.3. *Herstellung der histologischen Schnitte***

Nach der Entnahme wurden die Aorten für 24 h in 4%igem Formalin gelagert. An den dem MR-Bild entsprechenden Lokalisationen der Aorta wurden ca. 0,8 cm breite Segmente von der Aorta abgeschnitten. Diese Ringe wurden entwässert, entfettet und anschließend in Paraffin eingebettet.

Mit dem Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnittreihen von jedem Segment angefertigt. Insgesamt wurden fünf Schnittreihen von jedem einzelnen Segment entnommen, welche jeweils mit HE, Berliner Blau, Elastika, Masson-Goldner und RAM 11 gefärbt wurden.

Die Herstellung der histologischen Präparate wurde vom Institut für Neuroanatomie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter Leitung vom Direktor des Instituts Prof. Schumacher durchgeführt.

### **3.1.2.2.4. Färbungen**

#### **3.1.2.2.4.1. HE**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung gilt als typische Routinefärbung und dient oft als Übersichtsfärbung.

Das Kernchromatin mit Ausnahme des Nucleolus wird durch Hämatoxylin blau-violett gefärbt. Diese Färbung entsteht durch das Vorkommen negativ geladener Anteile wie z.B. der DNA, die die positiv geladenen Farbstoffionen (Hämalaun) anziehen. Eosin dagegen färbt das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanz, mit Ausnahme der basophilen Anteile rot, da die negativ geladenen Erythrosinionen von positiv geladenen Gewebsstrukturen (z.B. Aminogruppen der Proteine) gebunden werden (Burck 1988; Leonhardt 1990; Weyrauch 1998; Welsch 2003).

#### **3.1.2.2.4.2. Berliner Blau**

Diese Färbung ist ein histochemischer Nachweis für  $Fe^{+++}$ , welches sich als blaue Körnchen darstellt. Eisenhaltige Granula und Zellen färben sich somit leuchtend blau. Zu Hämosiderin abgebautes Hämoglobin lässt sich im dreiwertigem Zustand mit dieser Färbung ebenfalls nachweisen. Zellkerne und das Zytoplasma färben sich nach Gegenfärbung mit Kernechtrot rot (Romeis 1989).

#### **3.1.2.2.4.3. Elastica**

Es handelt sich um die Resorcin-Fuchsin-Färbung nach Weigert. Diese Färbung ermöglicht die selektive Darstellung elastischer Fasern, die sich grün anfärben. Zellkerne färben sich rot (Burck 1988; Weyrauch 1998).

#### **3.1.2.2.4.4. Masson-Goldner**

Hierbei handelt es sich um eine Trichrom-Färbung (Eisenhämatoxylin/Pikrinsäure/Säurefuchsin).

Die Kerne färben sich braunschwarz, das Zytoplasma orange bis ziegelrot. Kollagenfasern färben sich grün, während elastische Fasern oft nicht speziell gefärbt werden, z.T. erscheinen sie grünlich bis hellrot. Muskelgewebe erscheint blassrot (Burck 1988; Weyrauch 1998).

#### **3.1.2.2.4.5. RAM 11**

Hierbei handelt es sich um eine immunhistologische Färbung. RAM 11 ist ein gegen Kaninchen-Makrophagen gerichteter monoklonaler Antikörper. Makrophagen stellen sich leuchtend rot dar (Rosenfeld et al. 1987; Rosenfeld et al. 1987; Schmitz et al. 2000; Gust 2003).

### **3.1.3. MRT-Auswertung**

#### **3.1.3.1. Eisenstudie**

Die Auswertung der MR-Tomogramme erfolgte in zwei Schritten.

Zunächst wurden die Schichtbilder einzeln ausgewertet und die jeweiligen Befunde definiert. Im Anschluss folgte eine Quantifizierung der Befunde. Miteinander verglichen wurden jeweils nur jene Schichtbilder, welche mit den gleichen Sequenzen gemessen wurden.

Die Aorta wurde auf jedem Bild nur dann befundet, wenn sie bei der Verwendung der parasagittalen Schichtführung etwa in der Mitte bzw. bei Verwendung der transversalen Schichtführung im rechten Winkel geschnitten war. Veränderungen in Form von Signalauslösungen wurden nur gewertet, wenn sie mindestens auf zwei hintereinander folgenden Bildern sichtbar waren.

Im Mittel wurden pro Tier und Zeitpunkt in der Gruppe I zweiunddreißig MR-Tomogramme und in den Gruppen II-IV zweiundsiebzig MR-Tomogramme befundet. In den Gruppen II-IV war die Anzahl der befundeten Tomogramme höher, da in dieser Gruppe zusätzlich Untersuchungen mit zwei weiteren Sequenzen in transversaler Schichtführung stattfanden, die bei der Gruppe I noch nicht durchgeführt wurden. Diese neuen Sequenzen wurden jeweils vor der Injektion des Kontrastmittels, sowie 48 h und 120 h nach der Kontrastmittelgabe verwendet.

Bei den Gruppen II-IV wurden nur noch vier Zeitpunkte im Vergleich zu sechs Zeitpunkten bei der Gruppe I ausgewertet. Im Verlauf der Untersuchung hatte sich gezeigt, dass auf die Messungen nach 6 h, sowie nach 24 h verzichtet werden konnten. Die MR-Tomogramme lieferten zu diesen beiden Zeitpunkten keine für den untersuchten Verwendungszweck des Kontrastmittels ausschlaggebenden Informationen. Das Blut der Tiere enthielt zu beiden Zeitpunkten noch eine derart hohe Konzentration an Eisenoxidpartikeln, dass durch die hierdurch hervorgerufene Signalauslöschung in den Gefäßen und ihrer angrenzenden

Gebiete eine Beurteilung der Aortenwand nicht möglich war. Die Untersuchung der Tiere zu diesen Zeitpunkten bot somit nach Abwägung von Nutzen und Aufwand für den Verlauf der Experimente keine unverzichtbaren Erkenntnisse. So erhielten die Kaninchen nur noch drei Narkosen, was für die Tiere zu einer erheblichen Stressminderung führte. Hierdurch konnte die Anzahl der Tierversuche im Sinne des Tierschutzgesetzes gesenkt werden.

Insgesamt wurden somit in der Gruppe I pro Tier 192 MR-Tomogramme und in den Gruppen II-IV pro Tier 216 MR-Tomogramme befundet.

Die Befunde wurden immer im Vergleich zu der Nativaufnahme (ohne Kontrastmittel) gestellt. Folgende Befunde traten bei der Auswertung der **parasagittalen Schichtbilder (Gruppe I-IV)** auf:

- „**Normal**“: Die Gefäßwand der Aorta und das Lumen stellten sich in Bezug auf die Nativaufnahme unverändert dar; es waren keine signalarmen Areale in der Aortenwand sichtbar.
- „**Signalauslöschung**“: Signalarme Areale ließen sich der Aortenwand zuordnen und waren vom Lumen sowie vom umgebenden Gewebe abgrenzbar.
- „**Lymphknotenartefakt**“: Signalarmes Areal an der Aortenwand im Bereich der dem Herzen zugewandten Seite des Aortenbogens, welches auf in die Lnn. tracheobronchiales sinister et dexter angereichertes USPIO zurückzuführen war.
- „**Rippenartefakt**“: Signalarmes Areal an der Aortenwand im Bereich der Aorta descendens, das durch die Einlagerung von USPIO in das Knochenmark der Wirbelkörper bzw. der Rippen zu erklären war.

Folgende Befunde traten bei der Auswertung der **transversalen Schichtbilder (Gruppen II-IV)** auf:

- „**Normal**“: Gefäßwand der Aorta und das Lumen stellten sich in Bezug auf die Nativaufnahme unverändert dar; es waren keine signalarmen Areale in der Aortenwand sichtbar.

- „**Signalauslöschung**“: Signalarme Areale ließen sich der Aortenwand zuordnen und waren vom Lumen sowie vom umgebenden Gewebe abgrenzbar.
- „**Rippenartefakt**“: Signalarmes Areal an der Aortenwand im Bereich der Aorta descendens, das auf die Einlagerung von USPIO in das Knochenmark der Wirbelkörper bzw. der Rippen zurückzuführen war.

Eine derart strenge Definition der einzelnen Befunde war notwendig, um die Artefakte eindeutig von den durch das USPIO hervorgerufenen Signalauslöschungen trennen zu können. Das Auftreten von Artefakten wurde für jedes Schichtbild dokumentiert, fand jedoch bei der Auswertung der Ergebnisse keine weitere Beachtung, da nur die Signalauslöschungen durch das USPIO als bedeutend eingestuft wurden.

### **3.1.3.2. Gadofluorinestudie**

Die Auswertung der MR-Tomogramme erfolgte in zwei Schritten.

Jedes Schichtbild, auf dem sich die Aorta darstellte, wurde zunächst einzeln auf Veränderungen der Signalintensität vor und nach der Kontrastmittelgabe hin untersucht und die jeweiligen Befunde wurden dokumentiert. Anschließend erfolgte eine Messung der Signalintensität der Aortenwand jeweils vor und 24 h bzw. 48 h nach der Kontrastmittelgabe.

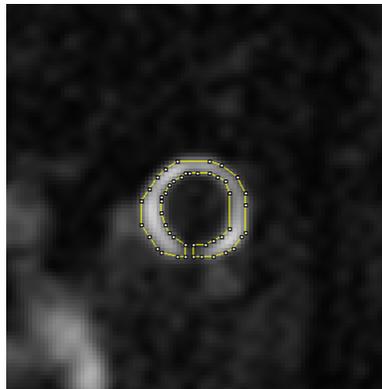
Die Messung der Signalintensität 48 h nach der Kontrastmittelgabe erfolgte nur bei der Gruppe 1 (höchste Dosis), da sich das Blut 24 h nach Kontrastmittelgabe noch signalstark darstellte und so die Gefahr bestand, zu diesem Zeitpunkt die Werte der Messung der Signalintensität der Aortenwand zu verfälschen. 48 h nach Kontrastmittelgabe stellte sich dann auch bei dieser Gruppe das Blut signalarm dar, so dass eine klare Abgrenzung der Aortenwand zum Lumen hin möglich war.

Aus dem Wert der Signalintensität sowie der jeweiligen Standardabweichung der Signalintensität der Luft wurde jeweils das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Aortenwand ermittelt. Hierzu wurde der Quotient aus der Signalintensität der Aortenwand und der Standardabweichung der Signalintensität der Luft gebildet.

Zur Messung der Signalintensität von Aortenwand und Luft wurde das Computerprogramm ImageJ verwendet. Mit Hilfe dieses Programms ist es möglich, bestimmte Regionen (ROIs),

in diesem Fall die Aortenwand, auszuwählen und manuell zu markieren, um die Signalintensität innerhalb des so gezeichneten Polygons zu bestimmen (Abb. 4). Die Signalintensität wurde bei jedem Tier jeweils im Querschnitt an der gleichen Stelle im Bereich des Aortenbogens gemessen.

Da die Gruppe 4 (niedrigste Dosis) nur auf wenigen Schichtbildern eine mit bloßem Auge sichtbare Erhöhung der Signalintensität zeigte, wurden bei dieser Gruppe die ROIs an den Schichtbildern angelegt, die das durchschnittlich repräsentativste Bild zeigten, nämlich an Bildern, an denen sich visuell keine erhöhte Signalintensität feststellen ließ.



**Abbildung 4**

**Markierung der Aortenwand zur Messung der Signalintensität einer ROI mit ImageJ.**

Bei der Auswertung der Schichtbilder wurden nur solche Bilder berücksichtigt, auf denen sich die Aorta im rechten Winkel angeschnitten darstellte. Die MR -Tomogramme, die vor sowie nach der Kontrastmittelgabe entstanden, wurden jeweils im Vergleich untersucht. Besonderes Augenmerk wurde bei der Auswertung auf den Bereich des Aortenbogens gelegt.

Insgesamt wurden pro Tier durchschnittlich 62 MR-Tomogramme befundet.

Folgende Befunde traten bei der Auswertung der Inversion-Recovery-Sequenzen auf:

- „erhöhte Signalintensität“: Signalreiche Areale ließen sich der Aortenwand eindeutig zuordnen und waren vom Lumen sowie vom umgebenden Gewebe abgrenzbar. Idealerweise stellten sich diese Areale leuchtend weiß dar.

- „**keine Signalintensität**“: Es waren keine signalreichen Areale in der Aortenwand sichtbar. Gefäßwand der Aorta und das Lumen stellten sich in Bezug auf die Nativaufnahme unverändert signalarm dar.

In einigen Tomogrammen kam es durch eine teilweise unzureichende Fettunterdrückung zu einem gut abgrenzbaren bandförmigen signalreichen Areal, das sich auf Höhe der Leber über der Aorta, der Leber sowie der Wirbel sowohl in der Nativ- als auch in der Kontrolluntersuchung bemerkbar machte. Dieses Phänomen war darauf zurückzuführen, dass der Tierkörper nicht vollständig in der verwendeten Kopfspule lag. Der Teil des Tierkörpers, welcher sich außerhalb der Kopfspule befand, zeigte sich anfällig für diesen Artefakt. Um Fehlinterpretationen auszuschließen, wurde dieser Bereich daher aus der Auswertung ausgeschlossen.

Im Anschluß an die Auswertung der Schichtbilder wurden die Werte des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit Hilfe des gepaarten T-Tests untersucht. Hierzu wurden die Werte des SNR der Tiere vor der Kontrastmittelgabe mit den entsprechenden Werten derselben Tiere nach Kontrastmittelgabe verglichen. Die Untersuchung erfolgte getrennt nach der verwendeten Kontrastmitteldosis. Durch die Bestimmung des Signifikanzniveaus  $p$  sollte untersucht werden, ob sich der Anstieg der Signalintensität nach Kontrastmittelgabe signifikant darstellte. War  $p$  kleiner als 0,05, wurde das Ergebnis als signifikant gewertet (Sachs 1999).

### **3.1.3.3. Magneviststudie**

Die Auswertung der MR-Tomogramme erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Gadofluorinestudie.

Zunächst wurde jedes Schichtbild einzeln auf Veränderungen der Signalintensität vor und nach der Kontrastmittelgabe untersucht und die jeweiligen Befunde wurden dokumentiert. Im Anschluß daran erfolgte eine Messung der Signalintensität und die Ermittlung des SNR der Aortenwand jeweils vor und auf den sieben darauf folgenden Untersuchungssequenzen nach der Kontrastmittelgabe.

Hierzu wurde ebenfalls das Computerprogramm ImageJ verwendet. Die Signalintensität wurde bei jedem Tier jeweils an der gleichen Stelle im Bereich des Aortenbogens gemessen.

Es wurden bei der Auswertung der Schichtbilder nur solche Bilder verwendet, auf denen sich die Aorta im Anschnitt im rechten Winkel darstellte. Die MR-Tomogramme, die vor sowie nach der Kontrastmittelgabe entstanden, wurden zusätzlich jeweils im Vergleich untersucht.

Besonderes Augenmerk wurde bei der Auswertung auf den Bereich des Aortenbogens gelegt.

Pro Tier wurden insgesamt 64 MR-Tomogramme befundet.

Folgende Befunde traten bei der Auswertung der Inversion-Recovery-Sequenzen auf:

- **„erhöhte Signalintensität“:** Signalreiche Areale ließen sich der Aortenwand zuordnen und waren vom Lumen sowie vom umgebenden Gewebe abgrenzbar. Idealerweise stellten sich diese Areale leuchtend weiß dar.
- **„keine Signalintensität“:** Es waren keine signalreichen Areale in der Aortenwand sichtbar. Gefäßwand der Aorta und das Lumen stellten sich in Bezug auf die Nativaufnahme unverändert signalarm dar.

#### **3.1.4. Histologie-Auswertung**

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte an einem Standardmikroskop (Axioskop; Firma Zeiss, Deutschland). Die histologische Auswertung erfolgte ausschließlich bei den Tieren der Eisenstudie.

Es wurden jeweils die Lokalisationen der Aorta bzw. des Aortenbogens histologisch untersucht, die mit den Lokalisationen der MRT-Bilder übereinstimmten. Die histologische Auswertung der Präparate der Eisenstudie erfolgte semiquantitativ.

Jeder Schnitt wurde zunächst in der Übersichtsvergrößerung durchgemustert und anschließend mit 200facher und 400facher Vergrößerung genauer untersucht.

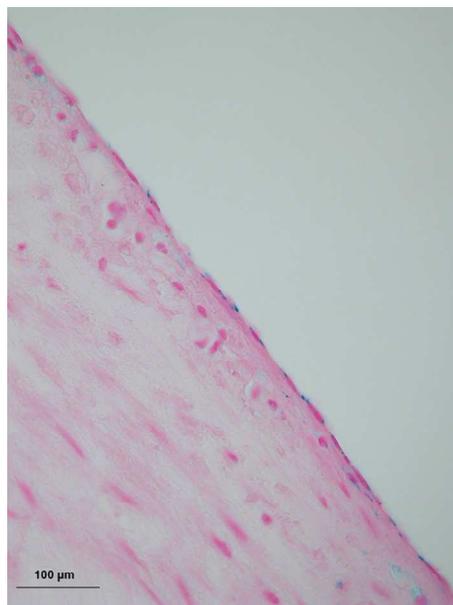
In einer ersten Auswertung wurden die Präparate in Hinblick auf ihre pathologischen Veränderungen untersucht. Hierbei wurde eine Einteilung anhand der AHA-Klassifikation verwendet. Die Veränderungen wurden als Frühläsion registriert, wenn sie dem Typ I, II oder III der AHA-Klassifikation zugeteilt werden konnten bzw. wurden sie als Spätläsion benannt, wenn sie Typ IV, V oder VI der AHA-Klassifikation entsprachen.

In einer zweiten Auswertung wurde bei 100facher sowie bei 400facher Vergrößerung der Gehalt an eisenbeladenen Zellen in den einzelnen Aortensegmenten bestimmt. Gewertet

wurden hierbei nur solche Zellen, die intakt waren und bei denen das Eisen direkt im Zelleib lokalisiert werden konnte.

Um dies sicherzustellen, wurde hierfür die 400fache Vergrößerung gewählt. Um die Quantität der eisenbeladenen Zellen zu ermitteln, wurden die Segmente der Aorta bei 100facher Vergrößerung im Mittel in sieben gleichgroße Abschnitte unterteilt (Gust 2003). In jedem Abschnitt wurde dann der Gehalt an eisenbeladenen Zellen wie folgt ermittelt.

Als eine **geringgradige Ansammlung** von Eisenzellen wurden solche Stellen gewertet, die folgendem Bild entsprachen:

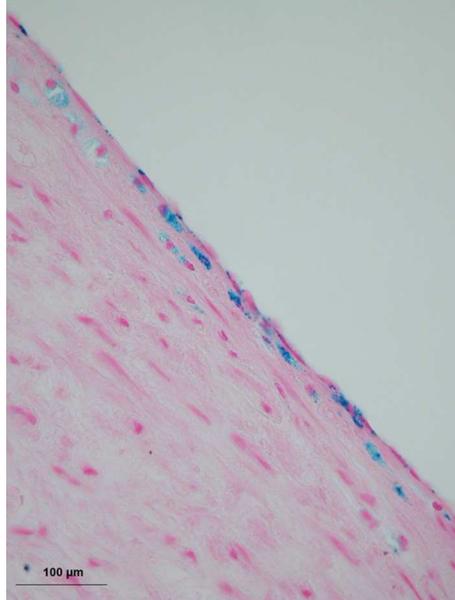


**Abbildung 5**

**Geringgradige Eisenansammlung (Berliner Blau, 400fache Vergrößerung)**

Eine geringgradige Ansammlung entsprach einer Zellmenge von ca. 0-15 eisenbeladenen Zellen pro Lokalisation im jeweiligen Abschnitt eines Aortensegmentes.

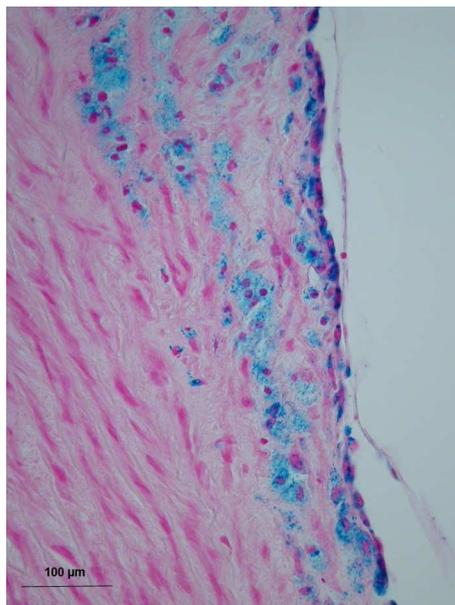
Als eine **mittelgradige Ansammlung** von Eisenzellen wurden solche Stellen gewertet, die folgendem Bild entsprachen:



**Abbildung 6: Mittelgradige Eisenansammlung (Berliner Blau, 400fache Vergrößerung)**

Eine mittelgradige Ansammlung entsprach einer Zellmenge von ca. 16-30 eisenbeladenen Zellen.

Als eine **hochgradige Ansammlung** von Eisenzellen wurden solche Stellen gewertet, die folgendem Bild entsprachen:



**Abbildung 7**

**Hochgradige Eisenansammlung (Berliner Blau, 400fache Vergrößerung)**

Eine hochgradige Ansammlung entsprach einer Zellmenge von über 30 eisenbeladenen Zellen.

Der so ermittelte Eisengehalt wurde für jeden Abschnitt jedes histologischen Präparats dokumentiert. Pro Tier wurden somit jeweils sieben Berliner Blau Präparate ausgewertet. Zusätzlich wurde dokumentiert, ob sich das Eisen im Endothel, in der subendothelialen Intima oder in der Media angereichert hatte.

Um den entzündlichen Charakter der Plaques nachzuweisen, der eine Voraussetzung für die Aufnahme des USPIO in den Plaque darstellte, wurden die Aortensegmente auf Makrophagen untersucht. Dies geschah mit Hilfe der RAM 11 Färbung in einer dritten Auswertung. Um die Quantität der Makrophagen zu bestimmen und somit einen Vergleich zwischen Eisenaufnahme und Plaqueaktivität herstellen zu können, wurde das gleiche Auswertungsschema verwendet wie jenes, welches schon für die eisenbeladenen Zellen beschrieben wurde.

## 3.2. Ergebnisse

### 3.2.1. Eisenstudie

#### 3.2.1.1. Magnetresonanztomographische Untersuchungen

Die Untersuchung der **parasagittalen Schichtbilder** erbrachte folgende Ergebnisse: Der Befund Signalauslöschung wurde bei keinem der untersuchten Tiere gestellt (Abb. 8a und b).

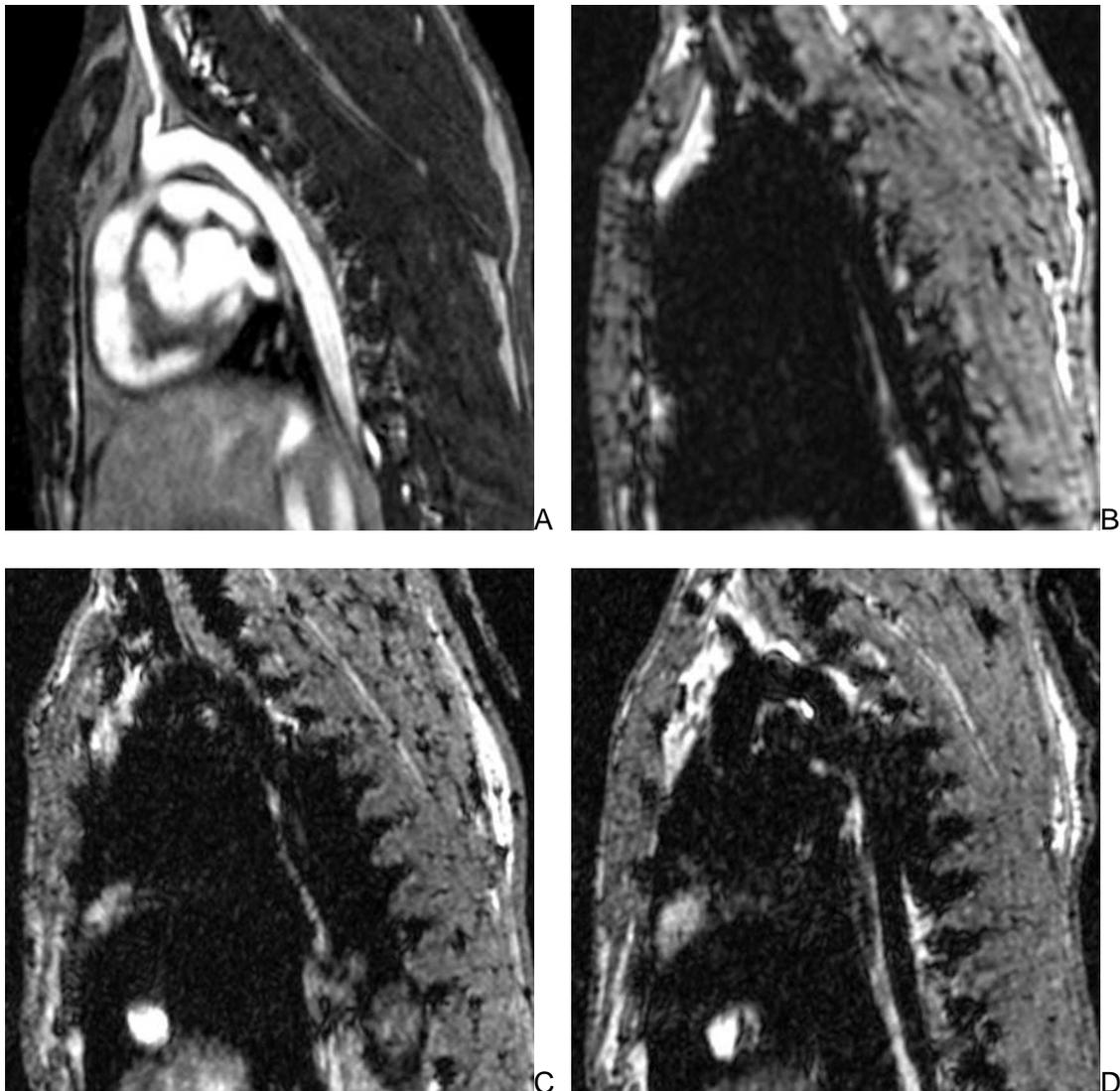


Abbildung 8a

Gradientenechosequenz eines WHHL-Kaninchens vor (A) sowie direkt nach (B) der Injektion von 1000 µmol/USPIO/KG DDM 43/34. Das Bild C zeigt dasselbe Tier 6 h, 24 h (D), 48 h (E in

Abb. 8b) und 120 h (F in Abb. 8b) nach der Kontrastmittelgabe. In Abbildung A stellten sich Herz und Aorta nach der Gabe einer geringen, lediglich bluterhellenden Dosis des USPIO (0,028 mmol/USPIO/KG) gut dar, während in B die volle Dosis appliziert wurde. Dies führte zu einer kompletten Signalauslöschung der Aorta und Umgebung. Mit der Zeit wurde das USPIO immer mehr abgebaut (C+D), bis es nach 48 h (E in Abb. 8b) wieder auf eine bluterhellende Konzentration gesunken war. In Bild F in Abb. 8b wurde Magnevist® zur besseren Kontrastdarstellung des Lumen intravenös appliziert. Es ließ sich keine fokale Signalauslöschung nach 48 h (E in Abb. 8b) oder 120 h (F in Abb. 8b) darstellen.

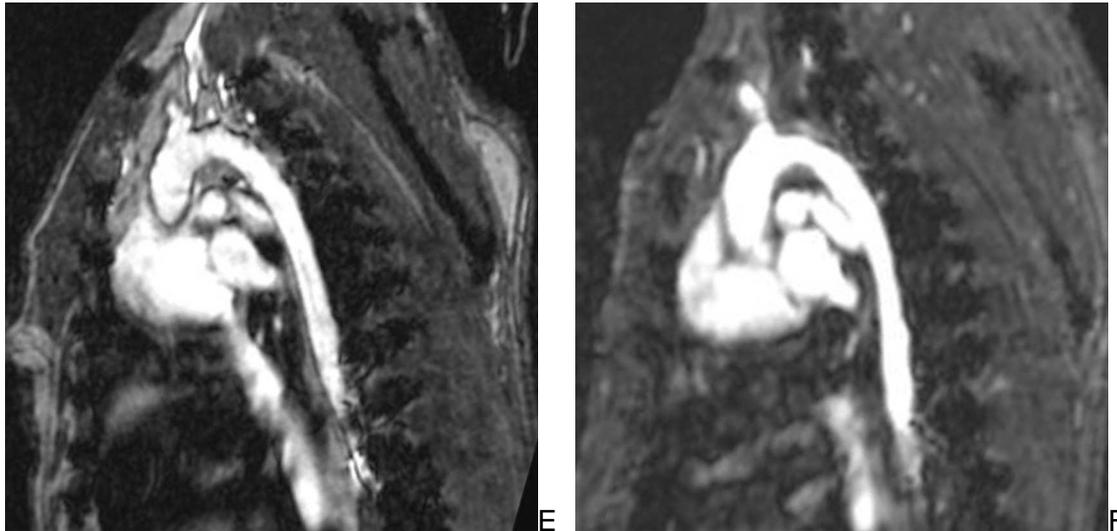


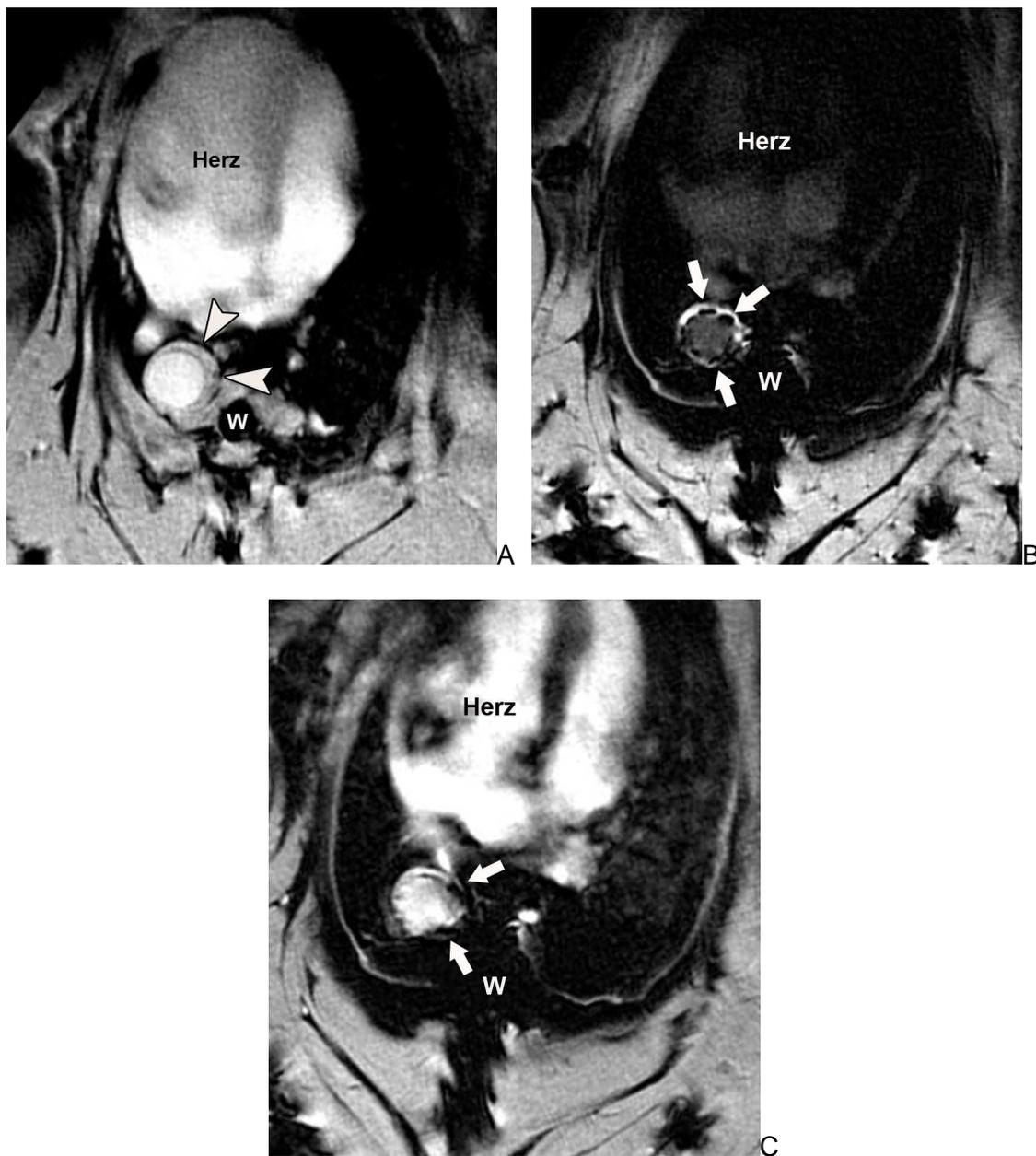
Abbildung 8b

Gradientenechosequenz des WHHL-Kaninchens aus Abb. 8a 48 h (E) und 120 h (F) nach der Injektion von 1000  $\mu\text{mol/USPIO/KG}$  DDM 43/34. Nach 48 h (E) war das Kontrastmittel wieder auf eine bluterhellende Konzentration gesunken. In Bild F wurde Magnevist® zur besseren Kontrastdarstellung des Lumen intravenös appliziert. Es ließ sich keine fokale Signalauslöschung nach 48 h (E) oder 120 h (F) darstellen.

Die Untersuchung der **transversalen Schichtbilder** ergab folgende Ergebnisse:

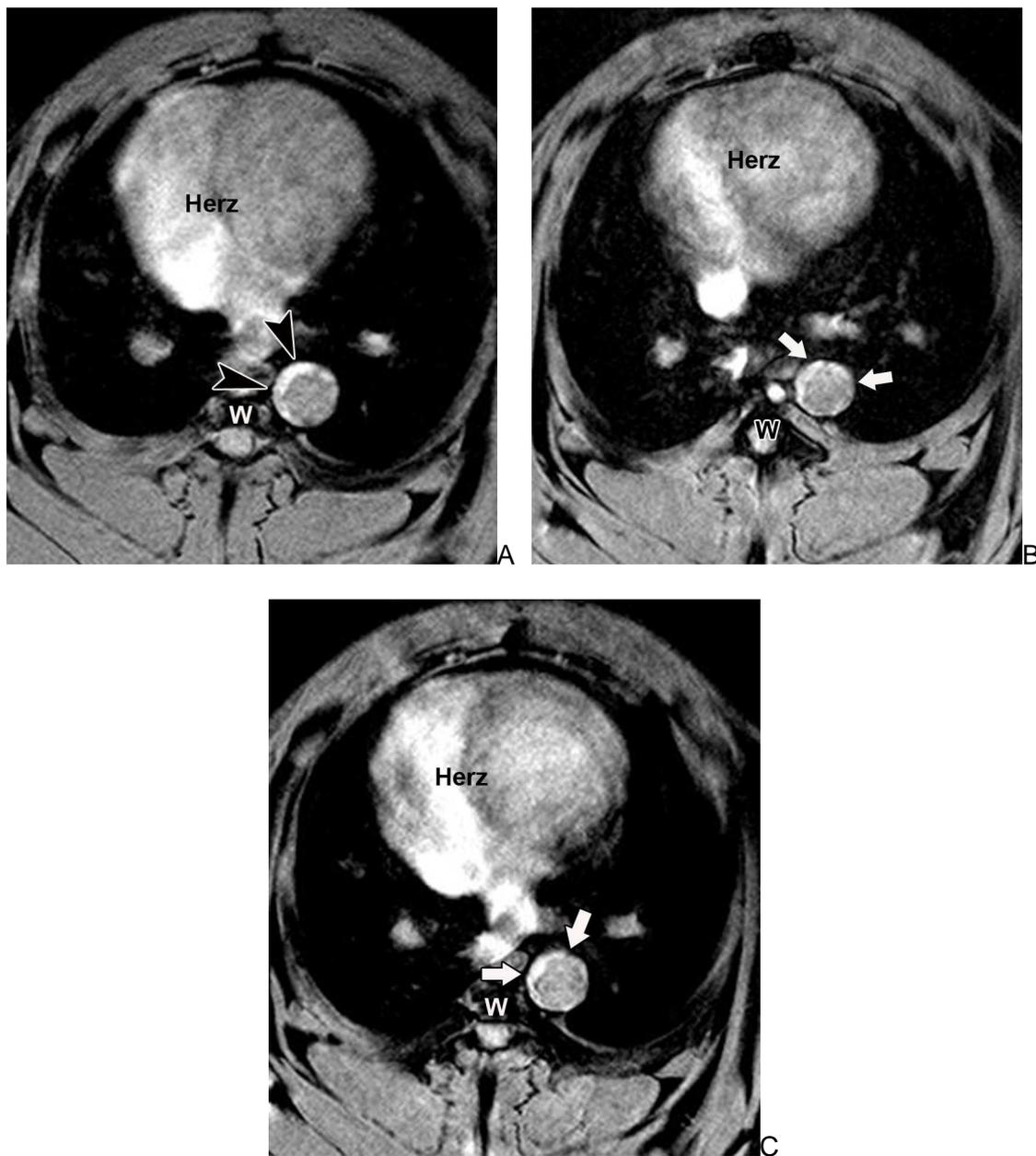
Bei den Watanabe-Kaninchen konnte der Befund einer Signalauslöschung lediglich bei Tieren der Gruppe IV, der Gruppe mit der höchsten Kontrastmitteldosis, gestellt werden (Abbildung 9). Die Tiere der Gruppen II und III sowie alle Kontrolltiere zeigten ohne Ausnahme keine Signalauslöschungen (Abbildung 10).

Aus der Gruppe IV wurde bei vier der fünf Watanabe-Kaninchen (80%) der Befund einer Signalauslöschung gestellt. Der Befund trat bei diesen Tieren erstmalig nach 48 h auf und war auch nach 120 h noch deutlich erkennbar. Die Signalauslöschungen waren allerdings nicht auf allen ausgewerteten Bildern zu erkennen. Von den pro Tier nach Kontrastmittelgabe ausgewerteten Tomogrammen wurden bei den vier positiv befundenen Kaninchen bei einem Tier auf 54% der Schichtbilder, sowie bei den anderen auf 32% bzw. auf 23% und auf 3% der Schichtbilder der Befund Signalauslöschung gestellt.



**Abbildung 9**

Gradientenechosequenz eines Watanabe-Kaninchens vor (A) sowie 48 h (B) und 120 h (C) nach intravenöser Gabe von  $1000 \mu\text{mol/USPIO/KG}$  DDM 43/34. In der Abbildung A ist deutlich die verdickte Aortenwand (Pfeilköpfe) sichtbar. Die Abbildungen B und C zeigen den Abfall der Signalintensität des Wirbelkörpers (W) durch das ins Knochenmark eingelagerte Eisen. In den Abbildungen B und C finden sich fokale Signalauslöschungen durch in die Plaques eingelagertes Eisen (Pfeile).



**Abbildung 10**

Gradientenechosequenz eines Watanabe-Kaninchens vor (A) sowie 48 h (B) und 120 h (C) nach intravenöser Gabe von 100  $\mu\text{mol/USPIO/KG}$  DDM 43/34. In der Abbildung A ist ebenfalls eine deutlich verdickte Aortenwand (Pfeilköpfe) sichtbar. In den Abbildungen B und C finden sich keine fokalen Signalauslöschungen in der Aortenwand (Pfeile).

### **3.2.1.2. Histologische Untersuchungen**

#### **3.2.1.2.1. Detektion der Atherosklerose**

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die histologischen Präparate der Aorten aller Watanabe-Kaninchen der Eisenstudie ohne Ausnahme atherosklerotische Plaques aufwiesen, während die Aortenwände der Kontrolltiere keine pathologischen Befunde zeigten (Abbildung 11 und 12).

Bei den älteren Watanabe war durchweg jeweils die gesamte aortale Oberfläche atherosklerotisch verändert, während bei der Hälfte der jüngeren Tiere (18 Monate alt) im Mittel nur 60% der Oberfläche pathologisch verändert war.

Die älteren Tiere besaßen hauptsächlich fortgeschrittene Plaques vom Typ IV und V, wohingegen die jüngeren Tiere zu gleichen Teilen fortgeschrittene Plaques (Typ IV) und Frühläsionen (Typ III) sowie in geringem Maße auch Läsionen des Typ II zeigten.

Bei einem der Kontrolltiere zeigte sich in einigen Präparaten auf etwa  $7\% \pm 0,06\%$  der aortalen Oberfläche eine geringgradige intimale Verdickung der Aortenwand im subendothelialen Bereich.

#### **3.2.1.2.2. Nachweis von Eisen**

Der Nachweis von Eisen in den Zellen erfolgte mit Hilfe der Berliner Blau-Färbung.

Bei allen Watanabe-Kaninchen der Eisenstudie ließen sich Eisenanreicherungen in den Aortenpräparaten nachweisen (Abb. 11). Die Kaninchen mit der kleinsten Kontrastmitteldosis (Gruppe II) zeigten allerdings nur eine sehr geringe Aufnahme von Eisen in die Zellen der Aortenwand. Bei den Watanabetieren dieser Gruppe ( $100 \mu\text{mol USPIO/kg}$ ) wies die aortale Oberfläche jedes histologischen Präparates im Mittel  $2,17 \pm 0,85$  Stellen mit einer „geringgradigen Eisenansammlung“ und im Mittel  $0,13 \pm 0,18$  (Maximalwert:1, Minimalwert:0) Stellen mit einer „mittelgradigen Eisenansammlung“ auf. Bezirke mit einer „hochgradigen Eisenansammlung“ ließen sich nicht nachweisen. Die Kontrolltiere der Gruppe II zeigten keinerlei Eiseneinlagerung in die Zellen der Aortenwand.

Die Watanabetiere der Gruppe III ( $250 \mu\text{mol USPIO/kg}$ ) zeigten nur unwesentlich mehr in die Aortenwand eingelagertes Eisen als die Gruppe II. Hier zeigten sich im Mittel an  $5 \pm 1,62$  Stellen der Aortenwand „geringgradige Eisenansammlungen“. „Mittelgradige

Eisenansammlungen“ ließen sich an  $0,38 \pm 0,41$  Lokalisationen der Aortenwand feststellen, während auch diese Gruppe keine hochgradige Eisenansammlung aufwies. In den Aortenwänden der Kontrolltiere dieser Gruppe fand sich ebenfalls kein Eisen.

In der Gruppe IV ( $1000 \mu\text{mol USPIO/kg}$ ) kam es allerdings zu einem sichtbaren Anstieg der Eisenansammlung in den Zellen der Aorta. Hier fanden sich im Mittel an  $3,48 \pm 1,62$  Stellen der aortalen Oberfläche Eisenansammlungen, die als hochgradig eingestuft werden konnten. An  $9,27 \pm 1,76$  Orten der aortalen Oberfläche befanden sich Abschnitte mit „geringgradiger Eisenansammlung“ und an  $5,37 \pm 2,17$  Lokalisationen der aortalen Oberfläche „mittelgradige Eisenansammlungen“. Bei den Kontrolltieren fand sich jedoch kein Eisen in der Aortenwand.

Es stellte sich zudem heraus, dass sich das Kontrastmittel bei allen Gruppen ausschließlich in den pathologisch veränderten Bereichen der Aortenwand anreicherte. Zusätzlich ließ sich feststellen, dass die Eiseneinlagerungen sehr unregelmäßig und wenig homogen in den Plaques verteilt waren. Aortenbezirke ohne pathologische Befunde wiesen keine Eisenanreicherung auf. Daher konnte auch bei den Kontrolltieren kein Eisen in der Aortenwand nachgewiesen werden.

Hauptsächlich konnten Eisenansammlungen im Endothel und im Bereich der subendothelialen Intima nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der histologischen Präparate der Milz konnte festgestellt werden, dass die Kaninchen mit der höchsten Eisendosis einschließlich der Kontrolltiere eine massive Eisenanreicherung in den Zellen der Milz aufwiesen. Bei Gabe der mittleren sowie der niedrigsten Dosis USPIO konnte ebenfalls eine starke Aufnahme von Eisen in die Zellen der Milz bei allen Kaninchen einschließlich der Kontrolltiere festgestellt werden. Die Anreicherung fiel hier jedoch geringer aus als bei den Tieren, welche die höchste Dosierung erhalten hatten.

Bei der Untersuchung der Milz konnten somit anders als bei der Untersuchung der Aorten keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Watanabe-Kaninchen festgestellt werden. Beide Tiergruppen lagerten je nach Kontrastmitteldosis gleiche Mengen an Kontrastmittel in die Milz ein (Abbildung 13), während die Kontrolltiere im Gegensatz zu den WHHL kein Eisen in die Aortenwand einlagerten (Abbildungen 11 und 12).

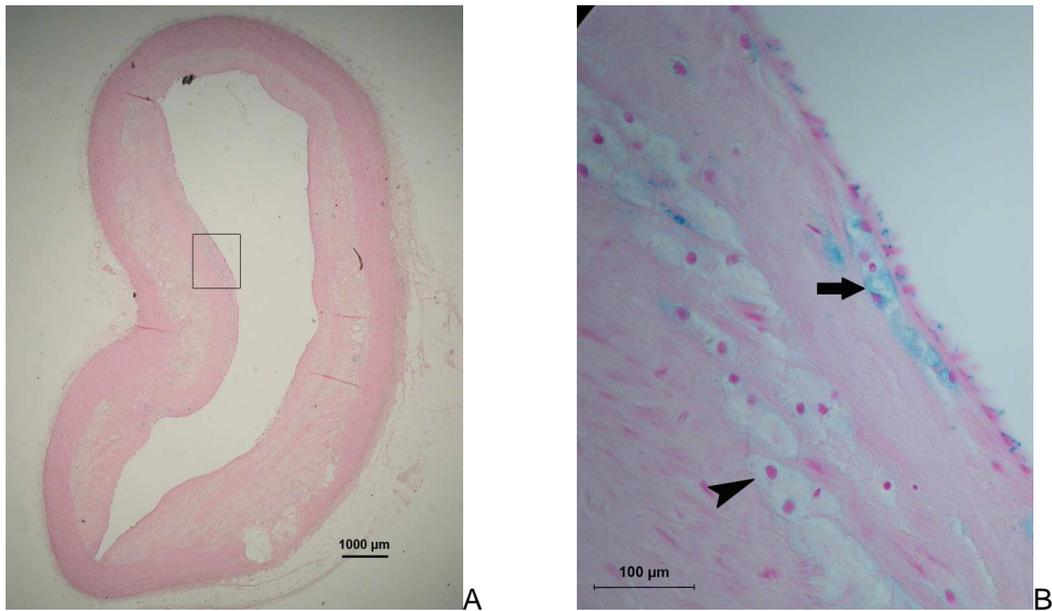


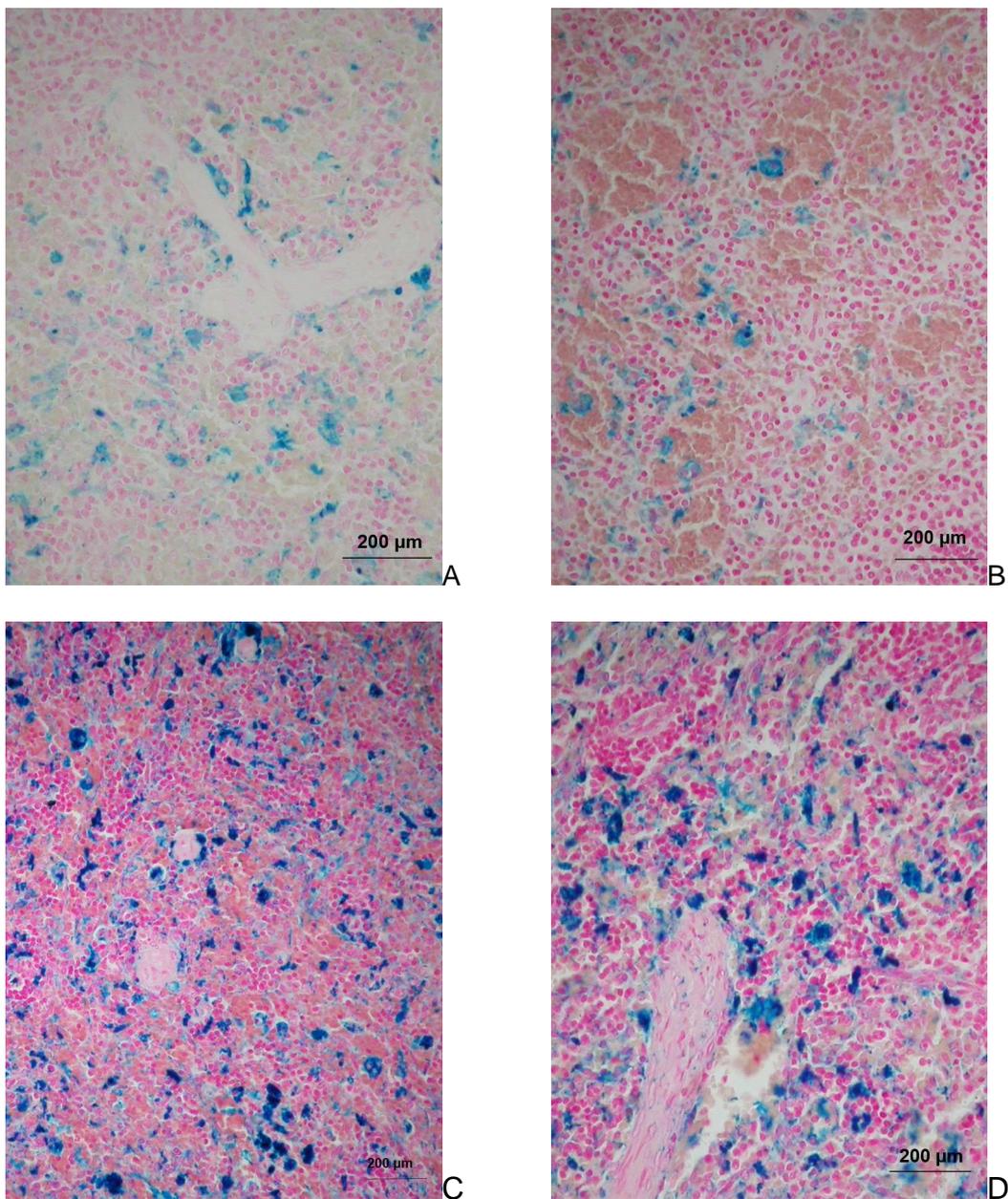
Abbildung 11

Darstellung der atherosklerotisch veränderten Aortenwand eines 31 Monate alten Watanabe-Kaninchens 120 h nach Gabe von 1000  $\mu\text{mol/USPIO/KG}$  (Berliner Blau, A: 25fache Vergrößerung; B: 400fache Vergrößerung). Deutlich sichtbar sind Schaumzellen ohne (Pfeilspitze) sowie mit Eisengranula (Pfeil).



Abbildung 12

Darstellung der pathologisch unveränderten Aortenwand eines 13 Monate alten Neuseeland-Kaninchens nach Injektion von 1000  $\mu\text{mol/USPIO/KG}$  (Berliner Blau, A: 25fache Vergrößerung; B: 400fache Vergrößerung). Es konnten keine eingelagerten Eisengranula nachgewiesen werden.



**Abbildung 13**

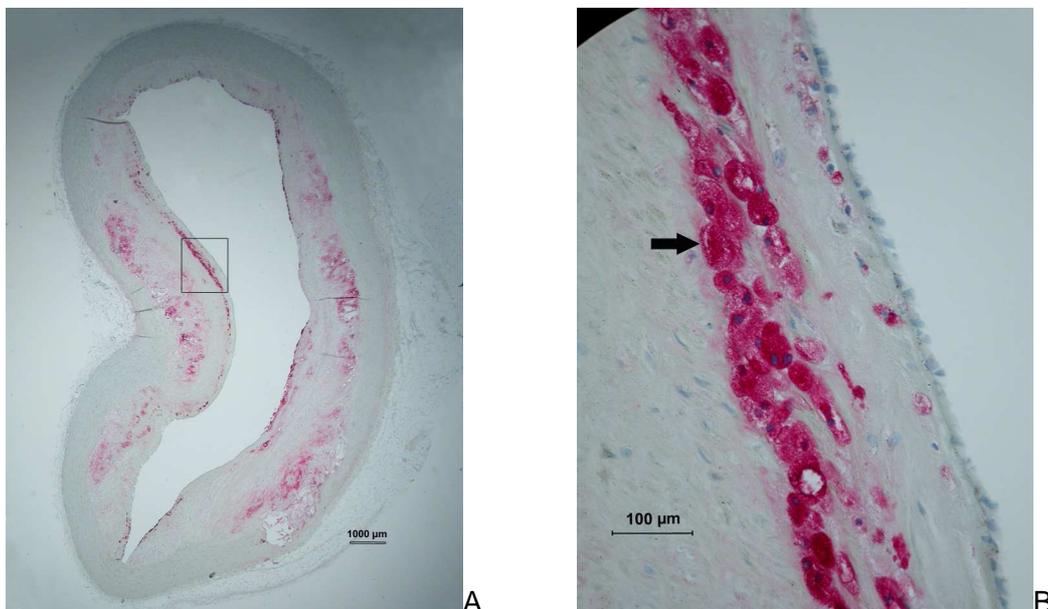
Ausschnitte der Milz eines Watanabe-Kaninchens (A) sowie eines Kontrolltieres (B) 120 h nach Gabe von 100 µmol/USPIO/KG. Beide Tiere haben etwa gleich viele Eisengranula eingelagert. Die Abbildungen C und D zeigen ein Watanabe-Kaninchen (C) und ein Kontrolltier (D), welche eine Dosis von 1000 µmol/USPIO/KG erhalten haben. Beide Tiere haben in ähnlicher Menge Eisen eingelagert. Deutlich sichtbar ist der Unterschied der eingelagerten Eisenmenge in Abhängigkeit von der Kontrastmitteldosis, wobei die Tiere mit der höchsten KM-Dosis (C+D) wesentlich mehr Eisen in der Milz enthielten, als die Tiere mit der niedrigsten KM-Dosis (A+B). (Färbung: Berliner Blau).

### 3.2.1.2.3. Nachweis von Makrophagen

Bei der Untersuchung der histologischen RAM 11- Färbung konnte festgestellt werden, dass sich jeweils an den Stellen der Aortenwand mit Eisenanreicherung auch Makrophagen nachweisen ließen (Vergleiche Abb. 11 und 14).

Es stellte sich heraus, dass Ansammlungen von Makrophagen sowie Schaumzellen ausschließlich an Stellen lokalisiert waren, an denen pathologische Prozesse abliefen. Übereinstimmend konnten in den Aortensegmenten der Kontrolltiere keine Makrophagen oder Schaumzellen nachgewiesen werden.

Die Aortensegmente der Watanabe-Kaninchen wiesen untereinander jeweils ähnliche Mengen an Makrophagen auf.



**Abbildung 14**

**Darstellung der atherosklerotisch veränderten Aortenwand des Watanabe-Kaninchens von Abbildung 11 (RAM 11, A: 25fache Vergrößerung; B: 400fache Vergrößerung). Deutlich sichtbar ist die hohe Anzahl rot angefärbter Makrophagen bzw. Schaumzellen (Pfeil) in der Aortenwand.**

### 3.2.2. Gadofluorinestudie

Die Untersuchung der MR-Tomogramme ergab folgendes:

In allen vier Gruppen stellten sich die Nativaufnahmen einheitlich signalarm dar. Bei den Kontrolltieren aller Gruppen änderte sich dies auch nach der Kontrastmittelgabe nicht. Ein Unterschied zu den Nativaufnahmen bestand hier lediglich in der erhöhten Signalintensität der Leber.

Bei den Watanabe-Kaninchen in den Gruppen 2 und 3 trat 24 h nach Kontrastmittelgabe eine starke Erhöhung der Signalintensität der Aortenwand auf (Abb. 16a und b).

Bei den Watanabe-Kaninchen der Gruppe 1 (höchste Dosis) konnte die Auswertung der Tomogramme erst 48 h nach Kontrastmittelgabe durchgeführt werden, da sich das Blut 24 h nach Kontrastmittelgabe aufgrund der hohen Kontrastmittelkonzentration noch hell darstellte und somit eine Abgrenzung des Blutes und der Aortenwand zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich war. Nach 48 h war jedoch auch bei dieser Gruppe eine deutliche Erhöhung der Signalintensität in der Aortenwand bei geringer Signalintensität des Blutes zu erkennen (Abb. 16a).

Die Aorta stellte sich jeweils in den querschnittenen (transversalen) Tomogrammen als weißer Ring, in den längsgeschnittenen (parasagittalen) Tomogrammen als weißes Band dar. In der Gruppe 4 (geringste Dosis) ließ sich eine Erhöhung der Signalintensität nur auf wenigen Schichtbildern und jeweils auch nur sehr schwach erkennen.

Die Signalintensität der Aortenwand 24 h bzw. 48 h nach Kontrastmittelgabe bei den Watanabe-Kaninchen nahm insgesamt mit sinkender Kontrastmitteldosis ab (Abbildung 15).

Bei der **Gruppe 1** (100  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine/kg Körpergewicht) zeigte sich auf allen ausgewerteten Bildern nach Kontrastmittelgabe ein im Vergleich zur Nativaufnahme erhöhtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit Werten zwischen 13,52 und 16,85. Die Differenz zu den Werten der Nativaufnahmen zeigte mit Werten zwischen 11,07 und 14,29 eine etwa 6fache und somit hochgradige Erhöhung der Signalintensität nach der Kontrastmittelgabe. Der Anstieg der Signalintensität erfolgte in dieser Gruppe signifikant mit  $p=0,00038$ .

In der **Gruppe 2** (50  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine/kg Körpergewicht) ließ sich auf allen ausgewerteten Bildern nach Kontrastmittelgabe eine im Vergleich zur Nativaufnahme erhöhte Signalintensität erkennen. Die Werte des SNR lagen in dieser Gruppe zwischen 10,53 und 14,41. Die Differenz zu den Werten der Nativaufnahmen lag mit Werten zwischen 8,21 und 11,47 ebenfalls deutlich über den Ausgangswerten vor der Kontrastmittelgabe. Die Aortenwand zeigte somit mit dieser Kontrastmitteldosis eine um das 5fache verstärkte deutliche Signalintensität nach Kontrastmittelgabe. Die Signalintensität stieg hierbei ebenfalls signifikant an ( $p=0,0008$ ).

Die **Gruppe 3** (25  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine/kg Körpergewicht) zeigte im Mittel auf 98% der ausgewerteten Bilder nach Kontrastmittelgabe eine im Vergleich zur Nativaufnahme erhöhte Signalintensität mit Werten des SNR zwischen 6,37 und 7,84. Die Differenz zu den Werten der Nativaufnahmen zeigte mit Werten zwischen 3,37 und 5,51 eine um das 2,6fache

Erhöhung der Signalintensität nach der Kontrastmittelgabe. Auf den restlichen 2 % der Bilder war mit bloßem Auge kein Unterschied in der Signalintensität der Aortenwand zwischen den Nativaufnahmen und den Bildern nach Kontrastmittelgabe festzustellen. Der Signalintensitätsanstieg erfolgte auch in dieser Gruppe signifikant mit  $p=0,0032$ .

Eine im Vergleich zur Nativaufnahme erhöhte Signalintensität der Aortenwand zeigte sich in der **Gruppe 4** ( $12,5 \mu\text{mol Gadofluorine/kg Körpergewicht}$ ) im Mittel nur auf 19% der ausgewerteten Bilder nach Kontrastmittelgabe. Diese sichtbare Erhöhung der Signalintensität zeigte sich hier nur auf Bildern im Längsschnitt (parasagittale Schichtführung), während die quergeschnittenen Bilder (transversale Schichtführung) mit bloßem Auge keine erhöhte Signalintensität erkennen ließen (Abb. 16b).

Diese Gruppe zeigte somit die geringste Veränderung in der Signalintensität in Bezug auf die Nativuntersuchung. Die Werte des SNR lagen hier mit Werten zwischen 2,84 und 4,04 nahe den Werten der Nativuntersuchung mit Werten zwischen 2,72 und 2,92. Die Differenz zu den Nativaufnahmen lag demnach mit Werten zwischen 0,01 und 1,28 nur leicht über den Ausgangswerten vor der Kontrastmittelgabe. In dieser Gruppe war der Anstieg des SNR jedoch nicht signifikant im Vergleich zum SNR vor Kontrastmittelgabe ( $p=0,08$ ).

Da die Messung des SNR stets an quergeschnittenen Schichtbildern erfolgte, wurde in dieser Gruppe das SNR somit nur auf solchen Bildern ohne sichtbare Erhöhung der Signalintensität gemessen.

Die Messung der Signalintensität der Aortenwand aller Tiere zeigte, dass jeweils die Tiere einer Dosierungsgruppe ähnliche bzw. gleiche Werte aufwiesen, welche sich mit Ausnahme der Gruppen 1 und 2 nicht mit den Werten der anderen Gruppen überschneiden. So waren die einzelnen Gruppen auch im Hinblick auf die gemessenen Werte relativ gut voneinander abgrenzbar (Abbildung 15 sowie Tabelle 2 auf S. 63).

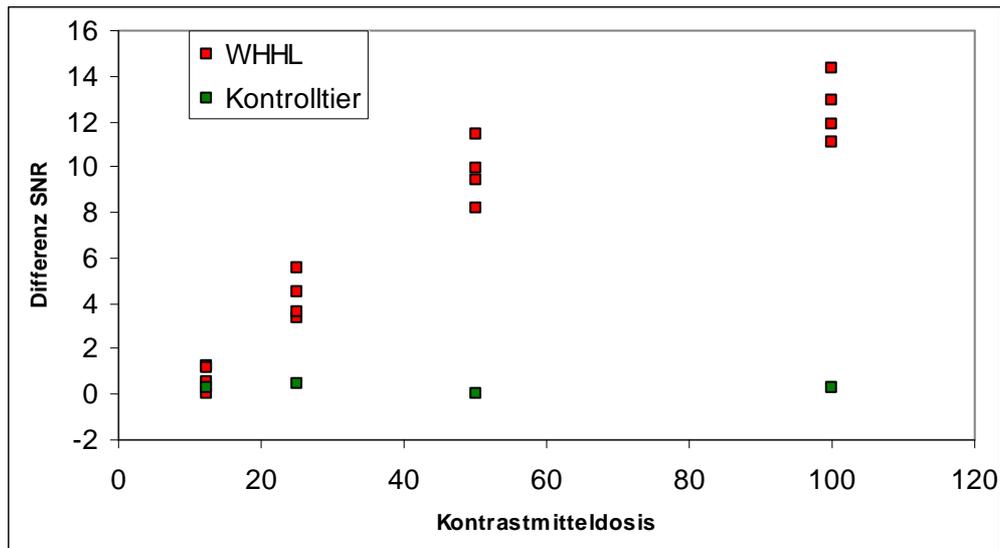


Abbildung 15

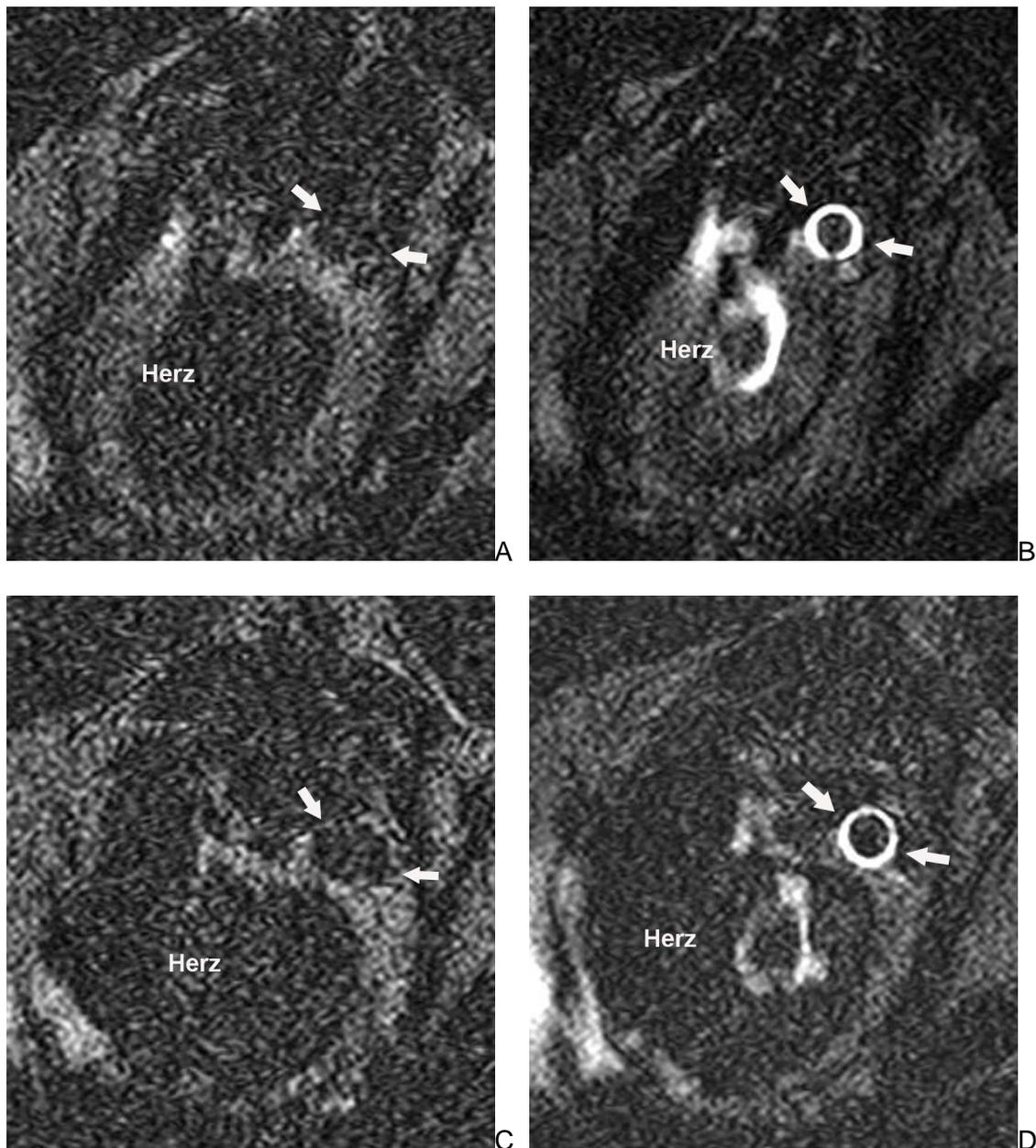
Korrelation der Differenz des SNR vor und nach Kontrastmittelgabe zur jeweiligen Kontrastmitteldosis (in  $\mu\text{mol Gadofluorine M/kg}$ ). Die mit grünen Kästchen gekennzeichneten Kontrolltiere zeigen keinen Anstieg des SNR der Aortenwand nach KM-Gabe, während die Watanabe-Kaninchen mit rot markierten Kästchen dosisabhängig einen Anstieg des SNR nach KM-Gabe aufweisen. Innerhalb der einzelnen KM-Gruppen weisen die Watanabe jeweils ähnliche Werte auf.

Tabelle 2

Datensatz zur Graphik aus Abbildung 15. Es zeigt sich, dass das SNR der Aortenwand aller Tiere vor KM-Gabe ähnlich niedrige Werte aufweist. Die Kontrolltiere zeigen nach KM-Gabe keine nennenswerte Erhöhung des SNR. Bei den Watanabe dagegen steigt das SNR dosisabhängig nach KM-Gabe deutlich an.

Probandennummer	Proband	Kontrastmitteldosis	SNR vor Kontrastmittelgabe	SNR nach Kontrastmittelgabe	Differenz der Signalintensitäten
1	WHHL	100	2,56	16,85	14,29
2	WHHL	100	2,27	14,1	11,83
3	WHHL	100	2,45	13,52	11,07
4	WHHL	100	2,68	15,65	12,97
5	Kontrolltier	100	2,26	2,52	0,26
6	WHHL	50	2,32	10,53	8,21
7	WHHL	50	2,61	12,01	9,4
8	WHHL	50	2,75	12,66	9,91
9	WHHL	50	2,94	14,41	11,47
10	Kontrolltier	50	2,55	2,59	0,04
11	WHHL	25	3	6,37	3,37
12	WHHL	25	3,15	6,75	3,6
13	WHHL	25	2,63	7,12	4,49
14	WHHL	25	2,33	7,84	5,51
15	Kontrolltier	25	2,53	2,98	0,45
16	WHHL	12,5	2,92	3,49	0,57
17	WHHL	12,5	2,76	4,04	1,28
18	WHHL	12,5	2,72	3,89	1,17
19	WHHL	12,5	2,83	2,84	0,01
20	Kontrolltier	12,5	2,29	2,55	0,26

Die Erhöhung der Signalintensität betraf in den verwendeten Sequenzen jeweils einheitlich die gesamte Aortenwand. Es konnten nur minimale Unterschiede in der Signalintensität verschiedener Areale der Aortenwand ausgemacht werden. Es erwies sich daher als schwierig, sichere Rückschlüsse auf die Dicke der Plaques, die sich über die gesamte Aortenwand erstreckten, zu treffen. Ein Einfluss des Geschlechtes und des unterschiedlichen Alters der Tiere in den untersuchten Gruppen auf die Ergebnisse konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 16a**

**Vergleichende Darstellung der Inversion-Recovery-Sequenzen der Watanabe-Kaninchen jeweils vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) intravenöser Gabe von Gadofluorine M. Gezeigt**

wird jeweils ein Kaninchen der Gruppe 1 (A vor und B nach KM-Gabe), der Gruppe 2 (C und D), der Gruppe 3 (E und F in Abb. 16b) sowie der Gruppe 4 (G und H in Abb. 16b). Deutlich sichtbar war die Erhöhung des SNR der Aortenwand nach Gabe von 100  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine M/kg (B), 50  $\mu\text{mol}$  (D) und 25  $\mu\text{mol}$  (F in Abb. 16b), während nach Gabe von 12,5  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine M/kg eine Erhöhung der Signalintensität nicht sichtbar war (H in Abb. 16b).

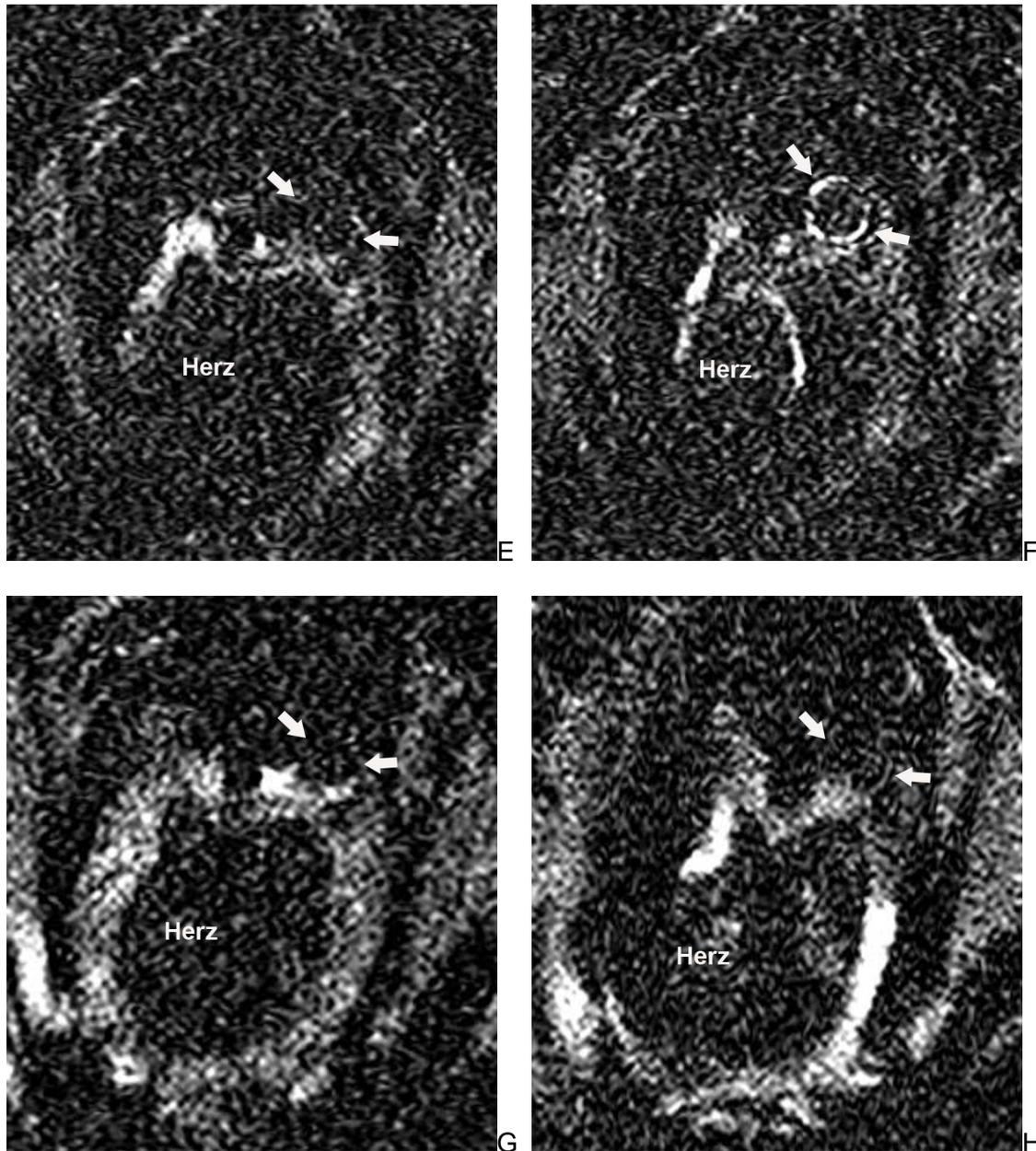


Abbildung 16b

Vergleichende Darstellung der Inversion-Recovery-Sequenzen der Watanabe-Kaninchen jeweils vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) intravenöser Gabe von Gadofluorine M. Gezeigt wird jeweils ein Kaninchen der Gruppe 3 (E und F) sowie der Gruppe 4 (G und H). Nach Gabe von 25  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine M (F) wurde die Erhöhung des SNR der Aortenwand sichtbar, während nach Gabe von 12,5  $\mu\text{mol}$  Gadofluorine M/kg eine Erhöhung der Signalintensität nicht sichtbar war (H).

### 3.2.3. Magneviststudie

Bei allen Tieren stellten sich die Nativaufnahmen einheitlich signalarm dar. Bei den Kontrolltieren änderte sich dies auch nach der Kontrastmittelgabe nicht. Es kam hier lediglich direkt nach der Kontrastmittelgabe zu einer sehr geringen Erhöhung des SNR im Vergleich zum SNR der Nativaufnahme. Dies war jedoch mit bloßem Auge nicht sichtbar und konnte nur durch die Messung der Signalintensität in der Aortenwand festgestellt werden. 24 Minuten nach der Kontrastmittelgabe war der Ausgangswert jeweils wieder erreicht. Das SNR in der Aortenwand war direkt nach Kontrastmittelgabe mit  $p=0,14$  nicht signifikant erhöht.

Bei allen Watanabe kam es nach der Kontrastmittelgabe zu einer schwachen Erhöhung des SNR der Aortenwand, welche wesentlich höher ausfiel als bei den Kontrolltieren (Abbildung 18a und b, Seite 68 und 69). Im Vergleich zur Gadofluorinestudie fiel die Erhöhung der Signalintensität nach Kontrastmittelgabe jedoch deutlich geringer aus.

Die Erhöhung der Signalintensität war allerdings im Unterschied zu den Kontrolltieren auch mit bloßem Auge sichtbar. Die untersuchte Gruppe der Watanabe-Kaninchen erwies sich hierbei als sehr homogene Gruppe mit untereinander gut vergleichbaren Werten.

Bei der Messung der Signalintensitäten der Aortenwand aller Watanabe mit Image J zeigte sich, dass es direkt nach der Kontrastmittelgabe zu einer maximalen Erhöhung des SNR in der Aortenwand auf einen Mittelwert von  $5,63 \pm 1,41$  kam. Dies bedeutete eine Erhöhung der gemittelten Signal-zu-Rausch-Verhältnisse aller Watanabe im Vergleich zu den Nativaufnahmen um einen Wert von 3,21.

Hiernach kam es zu einem raschen Signalabfall 8 Minuten post injektionem. Bei vier Tieren wurde der Ausgangswert der Signalintensität nach 40 Minuten post injektionem, bei zwei weiteren Tieren schon 32 Minuten post injektionem wieder erreicht (Abbildung 17, Seite 67).

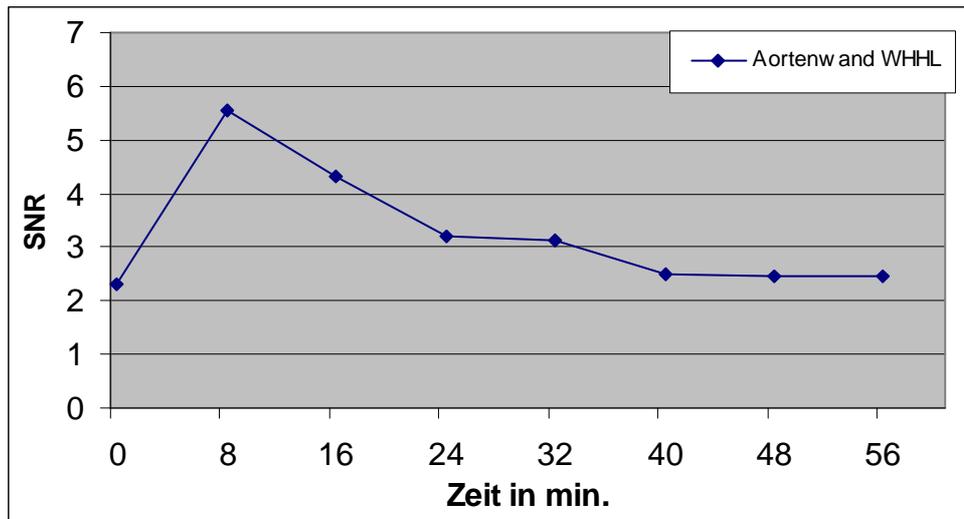
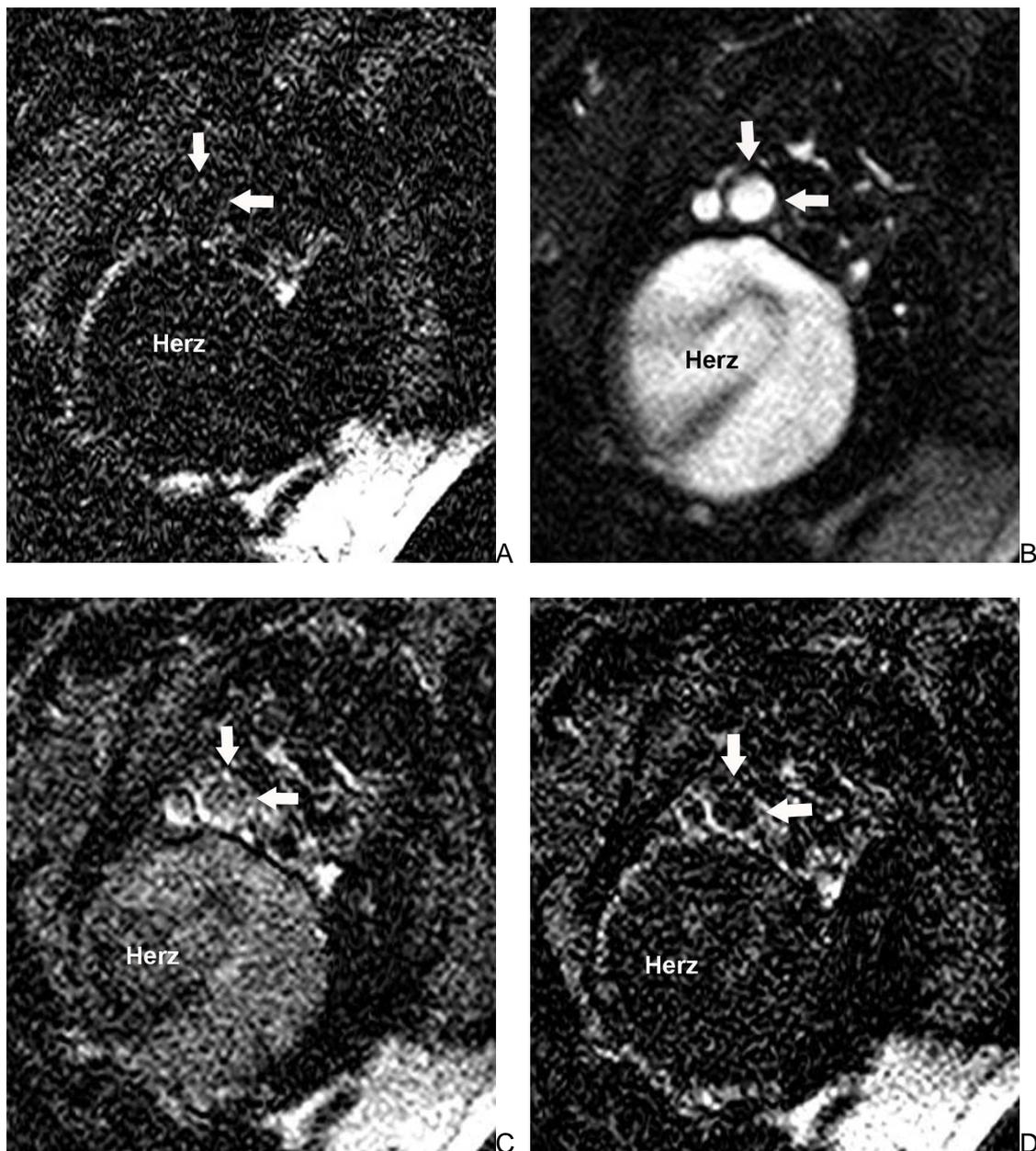


Abbildung 17

Graphische Darstellung eines mit Magnevist® untersuchten Watanabe-Kaninchens. Dargestellt wird eine typische Kurve, die das SNR der Aortenwand über den Untersuchungszeitraum im MRT in Minuten anzeigt. Die Kontrastmittelinjektion erfolgte 8 Minuten nach Untersuchungsbeginn. Hiernach kam es zunächst zu einem Anstieg des SNR. Im Anschluss daran fiel das SNR über den Untersuchungszeitraum stetig ab. 32 Minuten nach Kontrastmittelgabe (40 min. nach Untersuchungsbeginn) war der Ausgangswert (vor Kontrastmittelgabe) wieder erreicht.

Bei allen Tieren zeigte sich allerdings nur eine geringe Verstärkung der Signalintensität im Bereich der Aortenwand. Das SNR war jedoch direkt nach Kontrastmittelgabe mit  $p=0,004$  signifikant zum SNR vor KM-Gabe erhöht. Die Signifikanz der Erhöhung des SNR blieb auch bei den nachfolgenden Untersuchungssequenzen erhalten, bis sie 40 Minuten nach Kontrastmittelgabe mit  $p=0,64$  abfiel.

Die signalreichen Areale waren hierbei auf die Aortenwand begrenzt, jedoch nur schwach sichtbar. Eine Unterscheidung von Segmenten mit oder ohne Plaques erwies sich als schwer möglich. Nach dem vollständigen Verschwinden des Kontrastmittels aus dem Blut waren keine signalreichen Areale mehr sichtbar (Abbildung 18a und b, Seite 68 und 69).



**Abbildung 18a**

Inversion-Recovery-Sequenz eines WHHL vor Kontrastmittelgabe (A) und direkt nach intravenöser Gabe von 200  $\mu\text{mol}$  Gd-DTPA (B). Die Bilder B-H (Abb. 18a+b) zeigen den Verlauf nach der Kontrastmittelgabe. Die Messung der Sequenzen wurden alle 8 Minuten durchgeführt. Deutlich lässt sich die erhöhte Signalintensität der Aortenwand 8 Minuten (C), 16 Minuten (D) und 24 Minuten (E in Abb. 18b) erkennen, die mit zunehmender Zeit wieder stark absank (Pfeile).

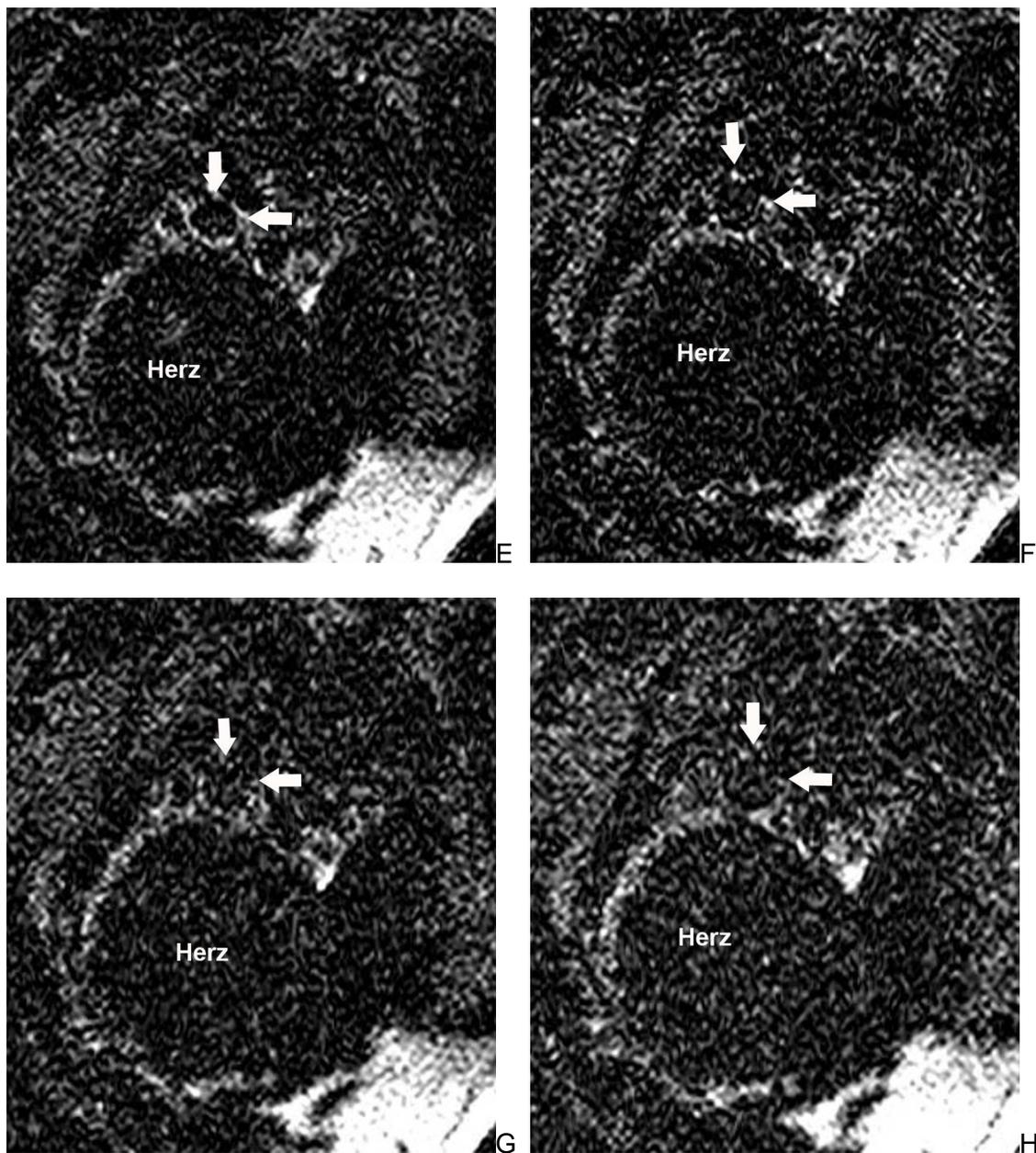


Abbildung 18b

Inversion-Recovery-Sequenz des WHHL aus Abbildung 18a nach intravenöser Gabe von 200  $\mu\text{mol}$  Gd-DTPA. Die Bilder B-H (Abb. 18a+b) zeigen den Verlauf nach der Kontrastmittelgabe. Die Messung der Sequenzen wurden alle 8 Minuten durchgeführt. Deutlich lässt sich die erhöhte Signalintensität der Aortenwand erkennen (Pfeile), die mit zunehmender Zeit stark absank, bis sie 32 Minuten nach KM-Gabe nahezu nicht mehr sichtbar war (F). 40 Minuten (G) sowie 48 Minuten (H) nach KM-Gabe ließ sich ebenso keine erhöhte SNR der Aortenwand mehr erkennen.