

6 Ergebnisse

6.1 Phantommessungen

Ein pharmakokinetisches Modell für frei diffusible Kontrastmittel wurde verwendet und weiter entwickelt. Aufgrund der Blut-Hirn-Schrankenstörung müssen mindestens zwei Kompartimente angenommen werden, um die Extravasation des Kontrastmittels vom vaskulären Raum in den interstitiellen Raum mit einer bestimmten Permeabilität zu beschreiben. Messungen mit Phantomen unterschiedlicher Kontrastmittelkonzentration wurden durchgeführt, um den analytischen Zusammenhang zwischen Signal und Kontrastmittelkonzentration des jeweiligen Kontrastmittels und der jeweiligen Meßsequenz zu bestimmen. Diese *in vitro* Messungen sind leicht auf *in vivo* Experimente übertragbar, da durch das Signal aus dem betrachteten Voxel nur eine additive Konstante S_{FLASH} (Gleichung 4-7) bzw. $S_{IRFLASH}$ (Gleichung 4-9) hinzukommt. Die in dieser Weise erhaltenen Fitfunktionen dienen später dazu, den gemessenen Signal-Zeit-Verlauf in einen Kontrastmittelzeitverlauf zu konvertieren. Bei der Umrechnung von der die Konzentration enthaltenden Gleichungen 4-8 und 4-10 Gebrauch gemacht, wie in Kapitel grundsätzlich für alle benutzten Kontrastmittel erläutert wurde. Das Auswertungsprogramm liefert aber nur die im Sinne der Fragestellung interessierenden Endergebnisse.

6.1.1 DDM 128

Die Messung mit einer T_2^* -gewichteten Sequenz einer Kontrastmittelreihe bestehend aus verschiedenen Konzentrationen des eisenoxidhaltigen Kontrastmittels DDM 128 zeigt einen exponentiellen Abfall des Signals bei steigender Kontrastmittelkonzentration. Die gemessenen Signalintensitäten wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Kontrastmittelkonzentrationen aufgezeichnet und die Funktion (4-8) wurde mit den in Kapitel 5 aufgeführten Werten für ρ , T_E und ϕ angepaßt. In Abbildung 6.1 sind die gemessenen Werte der Signalintensitäten und deren Standardabweichungen der Snapshot-FLASH-Sequenz für die verschiedenen Kontrastmittelkonzentrationen zusammen mit der angepaßten Funktion aufgetragen.

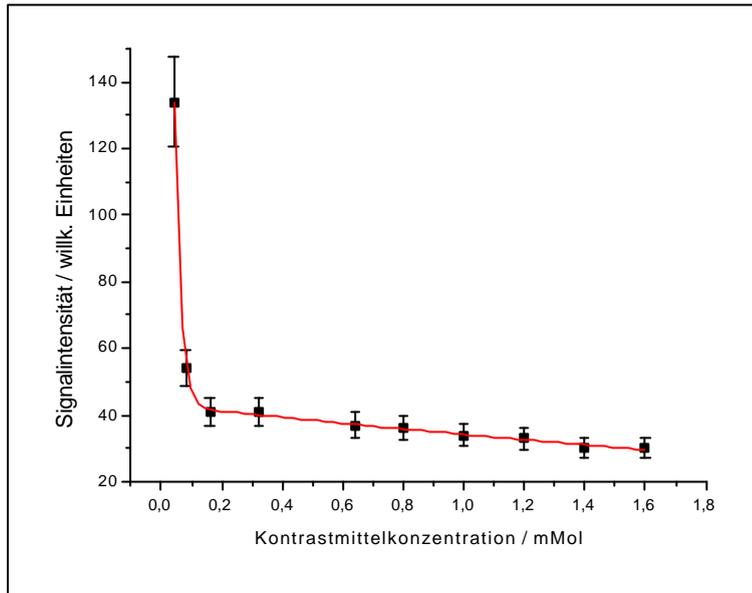


Abb. 6.1 Gemessene (Punkte) und angepaßte (rote Kurve) Signalintensitäten der Snapshot-FLASH-Sequenz in Abhängigkeit der Konzentration des Kontrastmittels DDM 128.

6.1.2 Gd-DTPA

Paramagnetische Kontrastmittel unter Verwendung von T_1 -gewichteten Sequenzen nähern sich dem Maximum der Signalintensität mit $1 - \exp(-T_1/T_1)$ und weisen einen exponentiellen Abfall für höhere Konzentrationen auf (91). Die gemessenen Signalwerte und deren Standardabweichungen sind zusammen mit der nach Gleichung (4-10) angepaßten Funktion in Abbildung 6.2 aufgetragen.

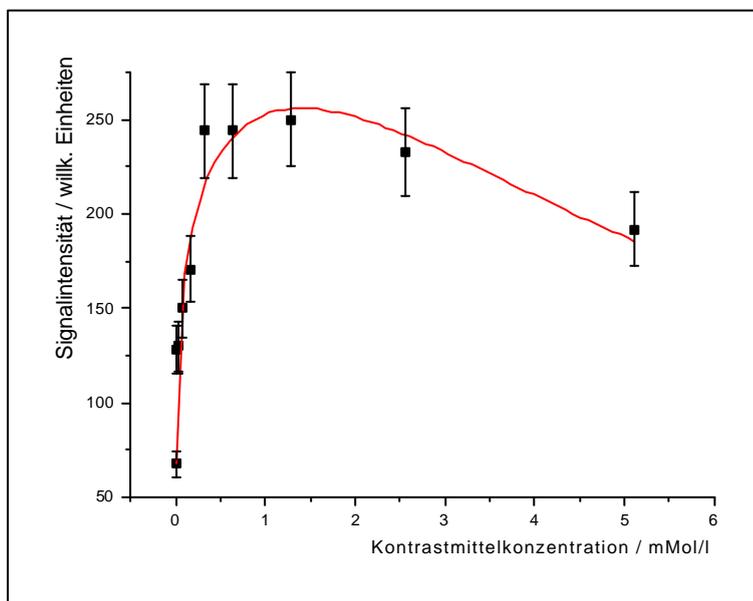


Abb. 6.2 Gemessene (Punkte) und angepaßte (rote Kurve) Signalintensitäten der Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz in Abhängigkeit von der Gd-DTPA-Konzentration.

6.1.3 Gadomer-17

Prinzipiell ist das Signalverhalten von Gadomer-17 in Abhängigkeit von der Kontrastmittelkonzentration ähnlich, wie das von Gd-DTPA. Die angepaßte Funktion mit den Meßwerten und deren Standardabweichung ist in Abbildung 6.3 verdeutlicht.

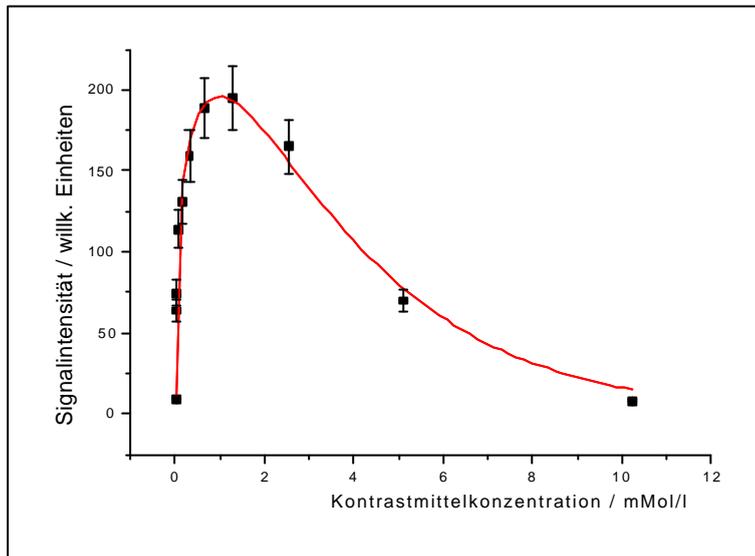


Abb. 6.3 Gemessene (Punkte) und angepaßte (rote Kurve) Signalintensitäten der Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz in Abhängigkeit der Konzentration des Kontrastmittels Gadomer-17.

6.2 Dynamische Messung an experimentellen Hirntumoren unter Verwendung der Kontrastmittel Gd-DTPA und Gadomer-17: Auswertung nach dem Weissleder-Modell

Das bereits kurz in Kapitel 4 erläuterte Modell von Weissleder galt als Einstieg in die Thematik und diente unter anderem zur Sequenzoptimierung, zum Bilddatenhandling und Handling mit Bildbearbeitungsprogrammen wie NIH Image. Folgende Abbildung stellt den Signalzeitverlauf in verschiedenen Regionen des Gehirns dar. Während der Akquisition mit der dynamischen Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz wurden die beiden Kontrastmittel Gadomer-17 und Gd-DTPA im Abstand von 12 Minuten appliziert.

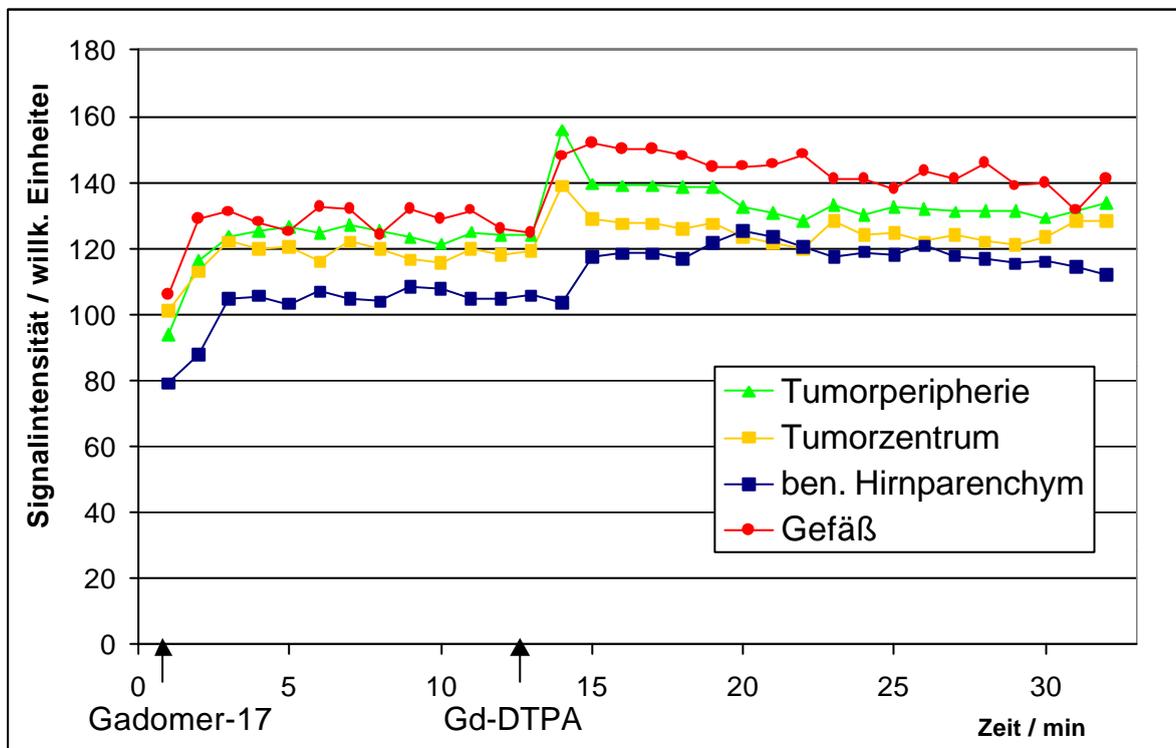


Abb. 6.4 Signalintensität der T_1 -gewichteten dynamischen Sequenz in Abhängigkeit der Zeit in verschiedenen Regionen des Rattengehirns. Im Abstand von 12 Minuten wurde das Kontrastmittel mit dem kleineren Molgewicht injiziert.

Die Postkontrastaufnahme in Abbildung 6.5 verdeutlicht das den Tumor umgebende Ödem und ist kein Maß für die genaue Abgrenzung des Tumors. Die Berechnung eines Maßes des vaskulären Volumens beinhaltet eine einfache Subtraktion des Grundsignals von dem Signal nach Gadomer-17-Gabe. Das vaskuläre Kontrastmittel Gadomer-17 verbleibt im Gefäßraum und ist somit ein Maß für die Vaskularisation. Die Subtraktion des Gadomersignals von dem Signal nach der Gabe beider Kontrastmittel liefert ein Maß für das Volumen des Interstitiums, wie in Abbildung 6.5 dargestellt ist. Das zuletzt injizierte Kontrastmittel Gd-DTPA ist ein

Marker für die Blut-Hirn-Schrankenstörung und extravasiiert in das Interstitium. D.h. eine Signalzunahme ist mit der Anreicherung des Kontrastmittels im interstitiellen Raum zu korrelieren. Die Abbildung demonstriert, daß das Kontrastmittel nur im Tumor, bei Störung der Blut-Hirn-Schranke, in den interstitiellen Raum extravasiiert. Im gesunden Hirnparenchym ist keine Anreicherung zu verzeichnen. Dieses Verfahren erlaubt jedoch nur eine schematische Darstellung des zerebralen Blutvolumens und des interstitiellen Raumes und gestattet in keiner Weise quantitative Schlüsse. Aus diesem Grund konnte keine Grautonskala angegeben werden. Das Bild links unten in der Abbildung stellt die histologische Gefäßfärbung dar und verdeutlicht die räumliche Abgrenzung des Tumors.

Ferner kann auch das zuerst applizierte Kontrastmittel im Fall einer gestörten Blut-Hirn-Schranke in das Interstitium extravasieren, was zu einem verringerten Signal im Kompartiment des vaskulären Raumes und zu einer Verfälschung des Signals im interstitiellen Raum führt. Weiterhin lassen sich aus der Form des Signalanstiegs nur Rückschlüsse auf die Permeabilität ziehen, wenn nicht die zeitliche Auflösung der Meßsequenz, die der ursprüngliche Autor benutzte, deutlich erhöht wird. Der experimentelle Aufwand wie z.B. eine Meßzeit von 30 Minuten und die Applikation zweier Kontrastmittel rechtfertigt daher das Maß der Ergebnisse nicht.

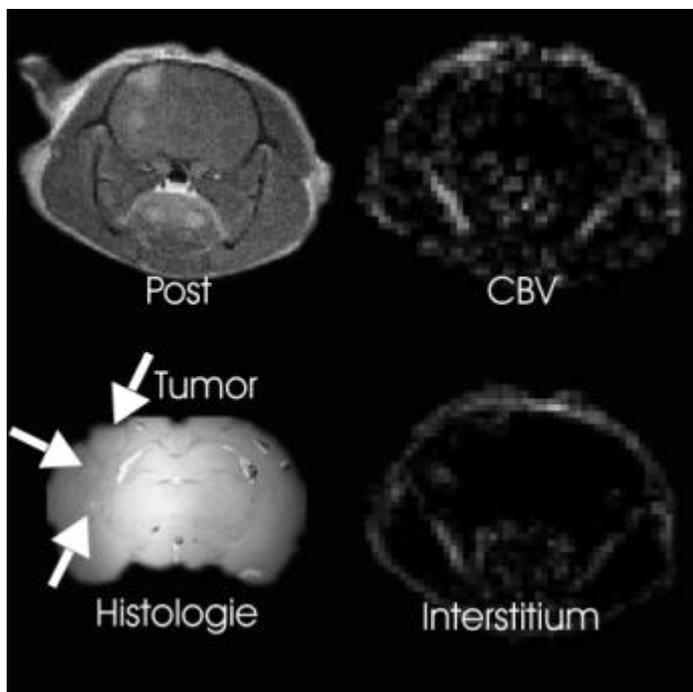


Abb. 65 Links oben: In der T₂-gewichteten Postkontrastaufnahme stellt sich das den Tumor umgebende Ödem hyperintens dar. Links unten: gefäßspezifische Lektinfärbung des Rattengehirns. Der hochvaskularisierte Tumor ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der rechten Seite sind in den berechneten Maps erhöhte Bereiche der Vaskularisation und des interstitiellen Volumens erkennbar.

6.3 Dynamische Messung an experimentellen Hirntumoren unter Verwendung des Kontrastmittels DDM 128

Die Auswertung der Messungen mit DDM 128 erfolgte mit dem in Abbildung 6.1 dargestellten Zusammenhang, wobei die Fitfunktion in „signal.f“ und die vorher berechneten Fitparameter in „parameter.in“ eingetragen wurden (siehe Anhang 9.2). Die Messungen mit dem Kontrastmittel DDM 128 und der T_2^* -gewichteten Sequenz ergaben Signal-Zeit-Verläufe, wie beispielhaft in Abbildung 6.6 gezeigt wird. Die ersten drei Bilder der dynamischen Sequenzen wurden jeweils verworfen, da in diesen Bildern das Einschwingverhalten zum Tragen kommt und diese die Ermittlung des Grundsignals fälschlich beeinflussen. Der in Abbildung 6.6 illustrierte Signal-Zeit-Verlauf des Gefäßes stellt eine Vene dar, da der Bolus in ihr sichtlich später ankommt, als in den anderen dargestellten Gewebepixeln. Deutlich zu erkennen ist auch der Rezirkulationseffekt, der sich als zweiter Bolus geringerer Amplitude und vergrößerter Halbwertsbreite äußert. Weiterhin läßt der Signal-Zeit-Verlauf im gesunden Hirnparenchym darauf schließen, daß dieses geringfügig durchblutet ist, weil nur ein kleiner Bolus erkennbar ist und sich das Signal nach Bolusdurchlauf wieder erholt. Im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie allerdings ist nach erstmaliger vollständiger Zirkulation des Kontrastmittels eine deutliche Signalreduktion gegenüber dem anfangs gemessenen Grundsignal erkennbar. Die Vaskularisation im Tumorbereich ist erhöht und zusätzlich könnte die gestörte Blut-Hirn-Schranke eine Einlagerung des Kontrastmittels in das Gewebe erlauben.

Die Berechnung mit Hilfe des FORTRAN-Programms lieferte Parameterbilder wie beispielhaft in Abbildung 6.7 dargestellt.

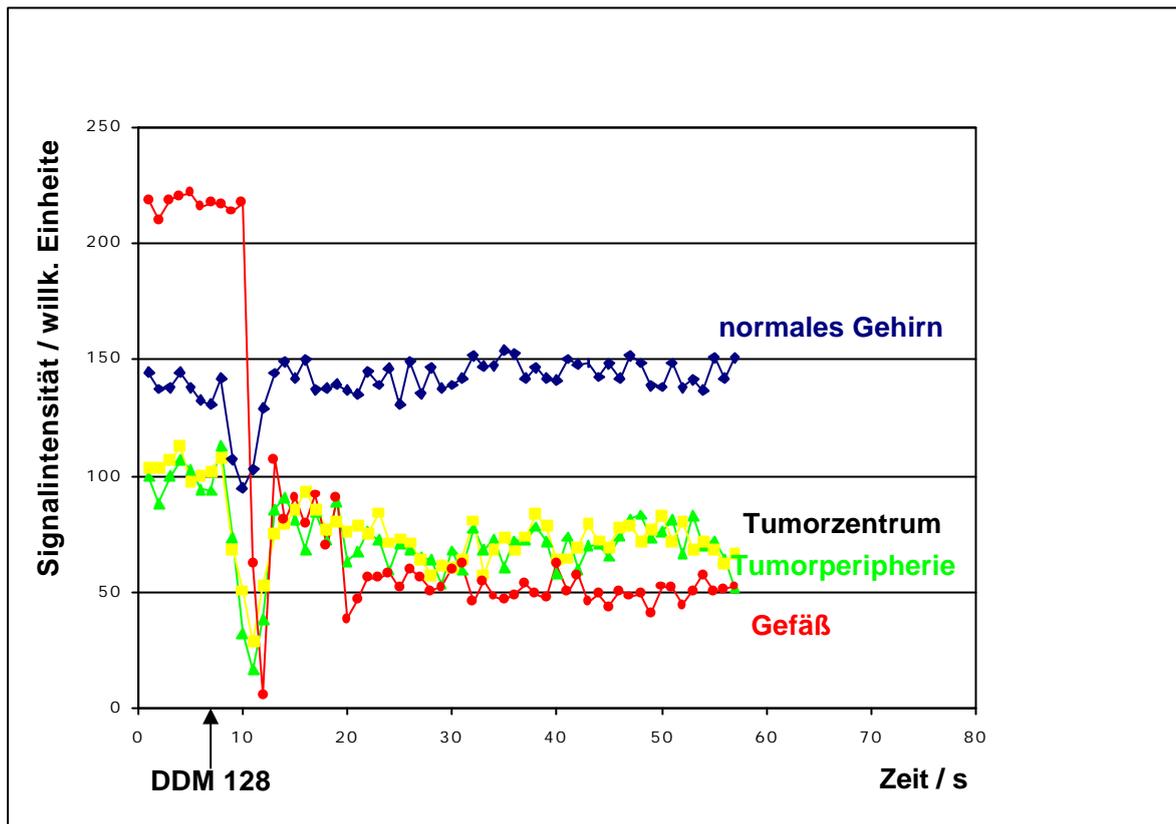


Abb. 6.6 Signal-Zeit-Verlauf der T_2^* -gewichteten Snapshot-FLASH-Sequenz vierer ausgewählter Pixel in verschiedenen Regionen des Rattengehirns. Der schwarze Pfeil deutet den Start der Kontrastmittelinjektion an.

Wie erwartet, ergab die Berechnung der Parameterbilder der Permeabilität und des interstitiellen Volumens verrauschte Parameterbilder. Das Kontrastmittel ist nicht während der Meßzeit in den interstitiellen Raum extravasiert; deshalb ist auch eine Berechnung des zellulären Volumens nicht möglich.

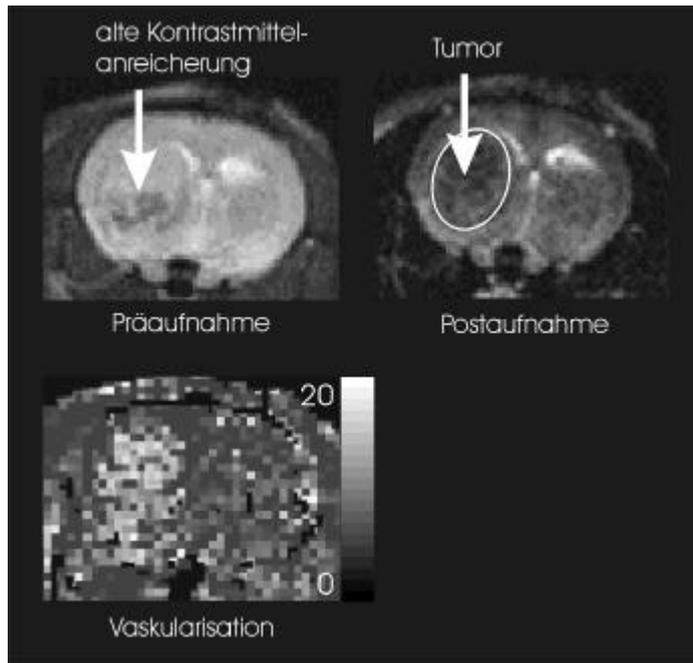


Abb. 6.7 Links oben: T₂-gewichtete Präkontrastaufnahme. Rechts oben: T₂-gewichtete Postkontrastaufnahme. Links unten: berechnetes CBV-Map. Die Grauwertskala ist auf das Maximum von 20 % vaskuläres Volumen normiert.

Erwähnenswert ist weiterhin, daß das Kontrastmittel noch nach einer Woche im Tumor nachzuweisen war, denn bereits in der Präkontrastaufnahme stellte sich ein Bereich des Tumors hypointens dar (siehe Abbildung 6.7, links oben). Da das Kontrastmittel aufgrund seines hohen Molargewichts nicht durch die Blut-Hirn-Schranke permeieren kann, ist der einzige Mechanismus, durch welchen es in den interstitiellen Raum eindringen konnte, die Transzytose an den Endothelzellen der Gefäßwände, als Resultat seiner langen Plasmahalbwertszeit von mehreren Stunden, bevor es von der Leber aufgenommen werden kann. Die Energie für diesen möglichen Effekt kann durch den osmotischen Druck und den Blutdruck zur Verfügung gestellt werden. Die in dieser Arbeit benutzten Tumoren produzieren anscheinend Faktoren für die Ausbildung neuer Gefäße, jedoch keine Faktoren für die Ausbildung neuer Lymphgefäße, die zum Abtransport von Stoffen notwendig sind. Im Gegenteil, durch das Liegenbleiben von Makromolekülen strömt Wasser aus den Gefäßen nach und führt zu einem erhöhten Druck im Tumor (92), (93).

Die nicht konkret definierte Molekülgröße des hier verwendeten Kontrastmittels und die verwendete T₂*-gewichtete Sequenz erlaubten nicht die Berechnung von wirklich quantitativen Maps, sondern ließen nur qualitativ Bereiche erhöhter Vaskularisation erkennen.

6.4 Dynamische Messung an experimentellen Hirntumoren unter Verwendung des Kontrastmittels Gd-DTPA

Abbildung 6.8 stellt beispielhaft einen Signal-Zeit-Verlauf der T_1 -gewichteten Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz nach Applikation des Gadoliniumbolus dar. Wie erwartet, läßt sich der Bolusdurchgang nicht auflösen. Gd-DTPA ist zu klein und extravasiert schon während des ersten Durchgangs (first pass effect) in das Interstitium. Gadolinium wird in der Klinik als Marker für eine gestörte Blut-Hirn-Schranke eingesetzt, was deutlich in der rechten Darstellung von Abbildung 6.9 zu erkennen ist. Hyperintense Regionen stellen Bereiche mit eindeutig gestörter Blut-Hirn-Schranke dar.

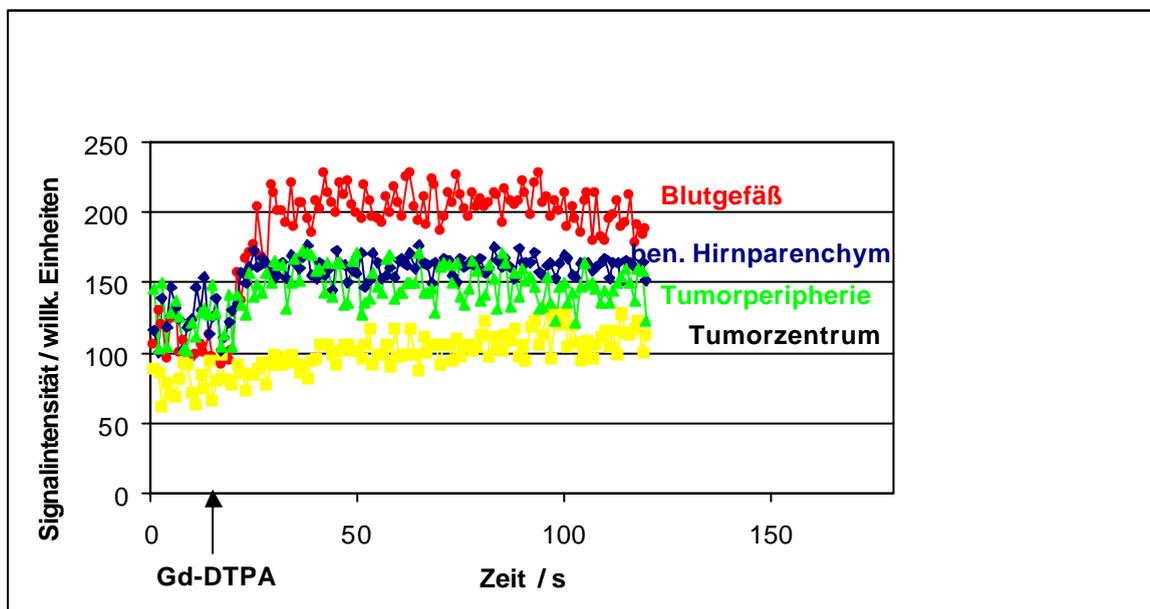


Abb. 6.8 Signal-Zeit-Verlauf der T_1 -gewichteten Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz bei Gabe von Gd-DTPA in verschiedenen Arealen des Rattengehirns.

Der Kreislauf der Ratte ist zu schnell, um einen merklichen Bolusdurchgang zu messen. Zudem bringt die Anwendung des Kontrastmittels Gd-DTPA in diesem Modell grundsätzlich keine weiter zu verwendenden Meßergebnisse, da dieses Mittel wegen der geringen Teilchengröße bereits beim ersten Bolusdurchgang extravasiert. In den Auswertungsversuchen spiegelt sich diese Tatsache darin, daß die Fitprozedur nicht konvergiert und die Berechnung von Parameterbildern der Vaskularisation aus diesem Grund nicht gelingt.

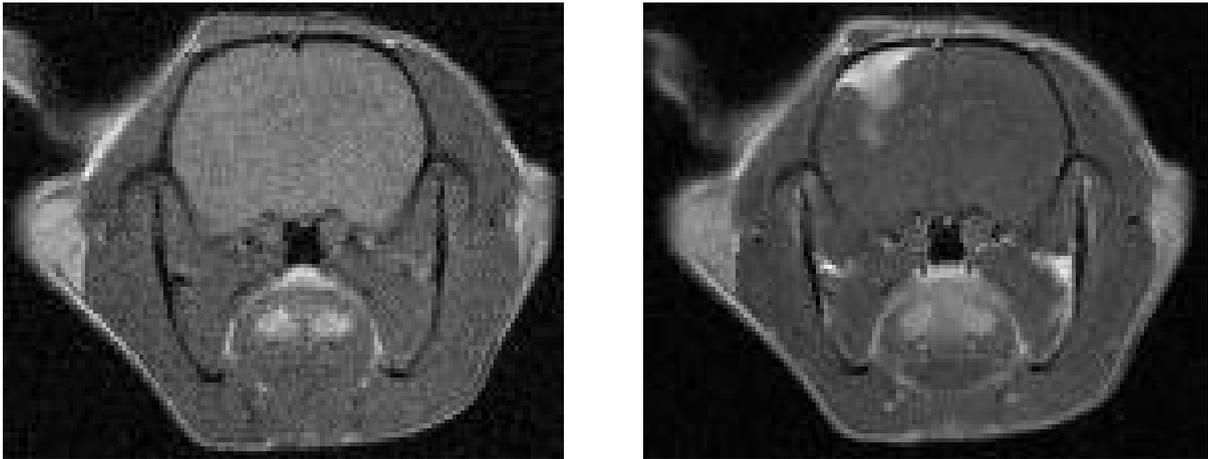


Abb. 6.9 T₁-gewichtete Prä- (links) und Postkontrastmittelaufnahme (rechts) mittels RARE-Sequenz. Der Tumor ist im rechten Bild deutlich hyperintens zu erkennen.

Die Anwendung von Gd-DTPA an Patienten ermöglicht zwar durch den längeren Bolus (Patienten werden ca. 30 ml injiziert, während es bei der Ratte nur ca. 20 µl sind) die Berechnung von CBV-Parameterbildern, aber nicht die Berechnung der Permeabilität. Am Patienten ist man durch das Kontrastmittel limitiert, da bisher noch kein Kontrastmittel höherer Molmasse in der Klinik zugelassen ist. Folgende Abbildung zeigt ein Beispiel einer solchen Berechnung, wie sie in unserer Arbeitsgruppe erfolgte. Die linke Abbildung zeigt eine T₂-gewichtete Aufnahme eines menschlichen Gehirns mit einem Glioblastom. Der Bereich des Glioblastoms zeigt sich in dieser Aufnahme als hyperintenses Ödem. Das weiß umrandete Quadrat ist im unteren linken Bildausschnitt nochmals als T₁-gewichtete Postkontrastaufnahme hervorgehoben. Hier sind die Bereiche, in denen die Blut-Hirn-Schranke gestört ist, hyperintens dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt ein farblich kodiertes berechnetes Parameterbild des vaskulären Volumens der gleichen Schicht. Es ist zu erkennen, daß das CBV (türkisgrün) nur in einem kleinen Gebiet im Bereich des Tumors erhöht ist. Die auffällig dunkel gefärbte Region stellt ein großes Gefäß, den Sinus, dar.

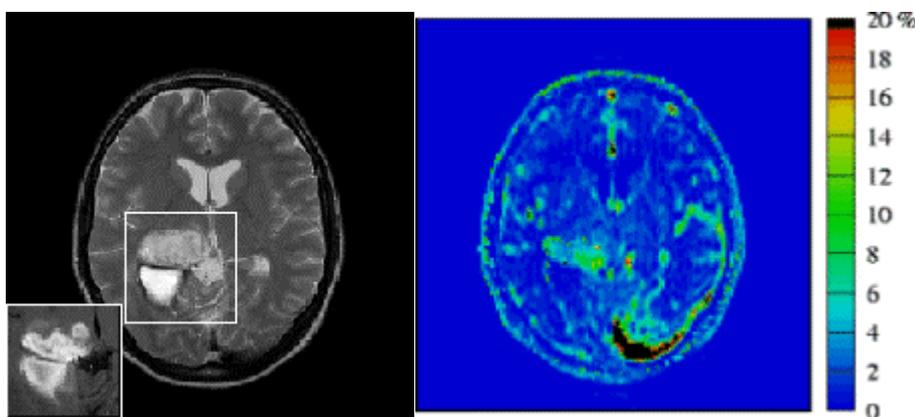


Abb. 6.10 Links: T₂-gewichtete Präkontrastaufnahme und Postkontrastaufnahme als Rechteck ausgeschnittener Bereich von einem Glioblastom. Rechts: berechnetes vaskuläres Volumen.

6.5 Dynamische Messung an experimentellen Hirntumoren unter Verwendung des Kontrastmittels Gadomer-17

Für die Auswertung der Messungen mit dem Kontrastmittel Gadomer-17 wurde der in Abbildung 6.3 verdeutlichte Zusammenhang zwischen Signal und Kontrastmittelkonzentration benutzt, wobei die Anpaßgleichung in die Datei „signalber.f“ und die jeweiligen Anpaßparameter in die Datei „parameter.in“ eingetragen wurden (siehe Anhang). Die dynamischen Messungen unter Bolusgabe des Kontrastmittels Gadomer-17 ergaben Signal-Zeit-Verläufe, wie sie beispielhaft in Abbildung 6.11 dargestellt sind. Deutlich erkennbar sind die Anreicherungen des Kontrastmittels im Tumorrand und Tumorzentrum im Gegensatz zum gesunden Hirngewebe. In dem in der Abbildung dargestellten Blutgefäß ist deutlich der zweite Durchlauf des Bolus erkennbar, der sich mit verringerter Amplitude und vergrößerter Halbwertsbreite zeigt.

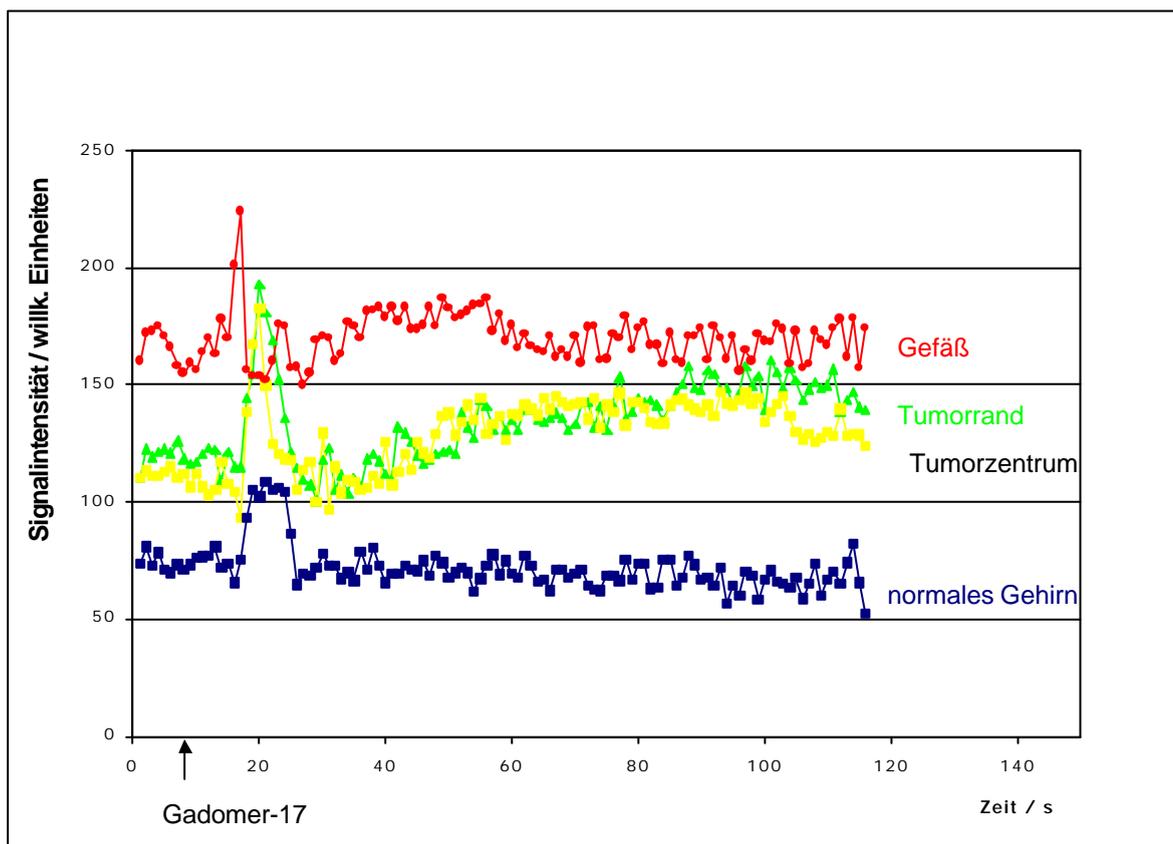


Abb. 6.11 Signal-Zeit-Verlauf der T_1 -gewichteten Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz bei Gabe von Gadomer-17 in verschiedenen Arealen des Rattengehirns in den ersten zwei Minuten.

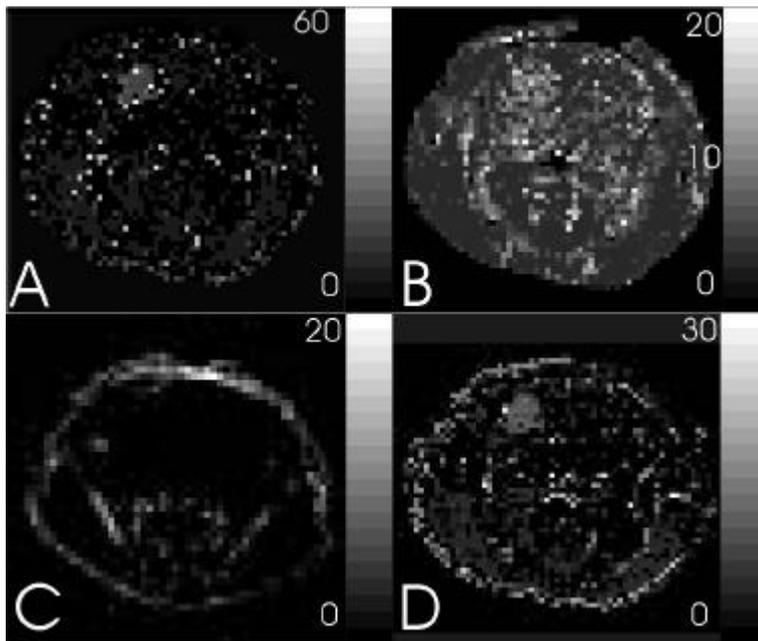


Abb. 6.12 A) Permeabilitätsparameterbild gemessen in 10^{-5} cm/s, B) CBV-Parameterbild gemessen in %, C) Zellvolumen gemessen in % und D) Interstitielles Volumen gemessen in %.

Die Berechnung der Parameterbilder ergab quantitative Maps der Vaskularisation, der Permeabilität, des Zellvolumens und des interstitiellen Volumens, wie sie in Abbildung 6.12 dargestellt sind. Deutlich ist zu erkennen, daß der Bereich der erhöhten Vaskularisation größer ist als der Bereich der erhöhten Permeabilität. Eine medizinische Interpretation dieses Zustandes wäre, daß es am Rand des Tumors zwar vermehrt Gefäße gibt, daß deren Gefäßwände aber noch nicht die pathologische Abnormalität der im Tumorrinneren vorkommenden Blutgefäße besitzen.

6.6 Histologie und Korrelation mit MR-Ergebnissen

Die Messungen und Auswertungen ergaben, daß Gadomer-17 für den speziellen Fall dieses Tiermodells am geeignetsten ist. Daher ist ein histologischer Vergleich der Tiere sinnvoll, denen Gadomer-17 als Kontrastmittel appliziert wurde. In histologischer Hinsicht erscheinen die Tumoren im Vergleich zum gesunden Gehirngewebe sehr hoch vaskularisiert.

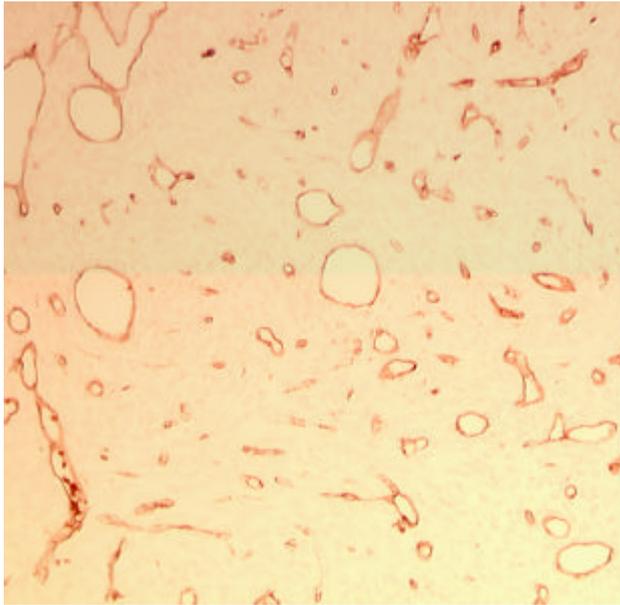


Abb. 6.13 Darstellung eines histologischen Präparates, welches zur Korrelation mit den MRI-Messungen herangezogen wurde. Die Größe des dargestellten Ausschnittes entspricht der eines Pixels in den kernspintomographischen Untersuchungen.

Die histologische Auswertung ergab, daß die Blutgefäße in diesem Tumormodell nahezu homogen verteilt sind, während die Größenverteilung der Gefäße aber eine breite Variation aufweist. Es hat sich herausgestellt, daß größere Gefäße hauptsächlich im Tumorzentrum lokalisiert sind, während kleinere in der Peripherie gefunden wurden. Abbildung 6.13 zeigt einen Ausschnitt eines histologischen Präparates, welches genau der Größe eines kernspintomographischen Pixels entspricht. Eine entsprechende pixelweise Auswertung und anschließende Berechnung des zerebralen Blutvolumens ist von der histologischen Seite zu aufwendig, da die Schichtdicke in der Histologie ca. 3 μm und die der Kernspintomographie 2 mm beträgt. Es müßten also von jedem pixelgroßen Gesichtsfeld mehrere untereinanderliegende Schnitte von Hand ausgewertet werden. Daher erfolgte eine stochastische Analyse von CBV, wie in Kapitel 5.8.7 beschrieben. Diese Auswertung zeigte zwischen den durch die Kernspintomographie berechneten CBV-Werten und den histologisch errechneten Werten eine gute augenscheinliche Korrelation. Die Korrelation wurde mit einem χ^2 -Test auf Signifikanz geprüft und erreichte für jedes Tier Werte, die unter dem kritischen Wert von $\chi^2_{0,95}=31,087$ liegen. Die Abweichungen waren innerhalb der Fehlergrenzen.

Lediglich das Diagramm E in Abbildung 6.14 weist eine Verschiebung der histologischen von den kernspintomographischen CBV-Werten auf, was mit der nicht immer reproduzierbaren Färbeprozedur zusammenhängen kann. Die histologische Messung ist mit einem systematischen Fehler behaftet, da die Färbeprozedur auch kollabierte Gefäße färbt, dieselben, welche in der Kernspintomographie nicht berücksichtigt werden.

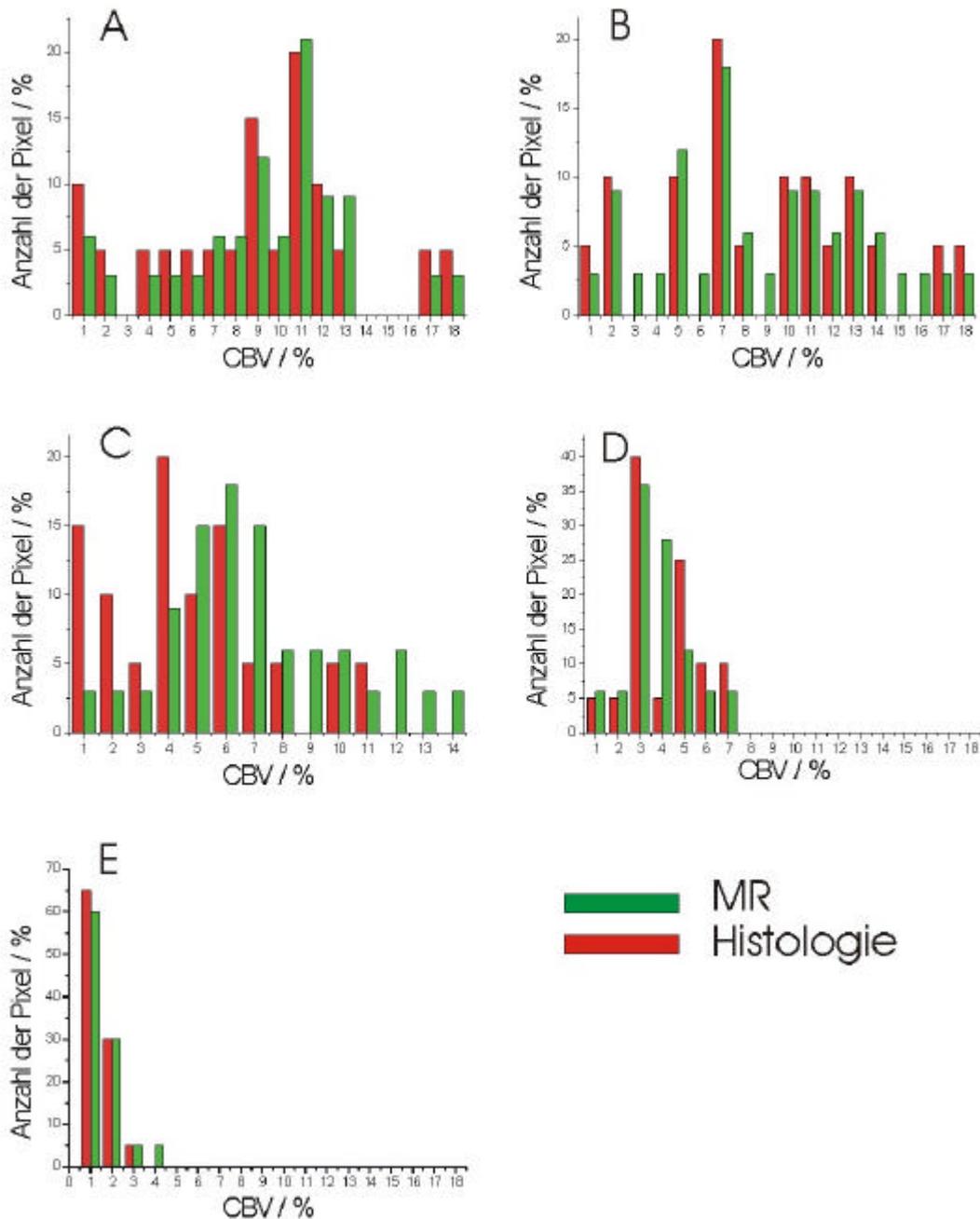


Abb. 6.14 Vergleich zwischen den kernspintomographisch errechneten und den histologisch errechneten CBV-Werten von fünf verschiedenen Tieren. Hier ist die Häufigkeitsdichte der berechneten Volumina in Prozent angegeben.

6.7 Fehlerbetrachtung

Die berechneten Parameterbilder sind mit verschiedenen Meßfehlern behaftet. Eine typische MRI-Unsicherheit ist die Feldinhomogenität ΔB , die sowohl lokal als auch zeitlich variiert. Die zeitliche Variation beruht auf der zeitlich schwankenden Gradientenstromstärke. Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich aus dem Signal/Rausch-Verhältnis der akquirierten Bilder. Die Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses erfolgte aus der Messung des Signals in einem ROI, das im Gehirn der Ratte platziert war und sechs gleich großen ROIs, die in Bereichen platziert sind, welche mit Sicherheit kein Signal beinhalten. Das Signal/Rausch-Verhältnis ergab sich aus dem Quotienten des Signalwertes des im Gehirn platzierten Signals und der Standardabweichung der sechs außerhalb des Rattenkopfes platzierten ROIs, was zu einer Meßgenauigkeit von ca. 10 % führte. Die darauf beruhenden statistischen Unsicherheiten aufgrund des Fits bei der Berechnung der Volumenanteile hielten sich daher in gerade diesen Grenzen.

Ein weiterer systematischer Fehler ist der Einfluß des Flusses, der zu einer Signalerhöhung aufgrund der nicht angeregten Spins, die in die Schicht hineinfließen. Dieser Effekt macht eine Signalerhöhung von 2 % aus, der aber mittels Überprüfung durch dynamische Phantommessungen korrigiert werden konnte.

Die Wahl der beiden zur quantitativen Auswertung benötigten Gefäßvoxel kann unexakt sein, wenn das ausgewählte Voxel nicht komplett im Gefäß platziert ist, was nicht immer ausgeschlossen werden kann. Hier kommt es zum Partialvolumeneffekt. D.h., daß durch die folgende nicht korrekte Berechnung des vaskulären Volumens alle nachfolgenden Berechnungen falsch werden. Da sich ein Gefäß aber meist durch mehrere Pixel darstellt, ließ sich mit NIH Image immer ein geeignetes Pixel auswählen.

Das halbautomatische histologische Auswerteprogramm erfaßt die Gefäßdurchmesser mit einer hundertstel Genauigkeit, so daß hier nur ein Fehler in der Annahme eines gewichteten Mittels des Gefäßdurchmessers bei der Berechnung der Permeabilität entsteht.

Obwohl alle Schritte der histologischen Präparation etabliert sind, ist kein Faktor beschrieben, der die genaue Vergrößerung oder Verkleinerung der Gefäßradien während der histologischen Präparation angibt. Somit mußte bei der Angabe des gewichteten Gefäßradius der systematische Fehler mit 10 % konsequent angenommen werden. Die genannte Präparationstechnik muß die folgenden Schritte mit ihren individuellen Konsequenzen für die Gefäßstruktur beinhalten.

- Perfusionsfixierung mit Formalin

- Einbetten in Paraffin \Rightarrow Schrumpfung des Gewebes
- Schneiden der Gehirne in 3 μm dicke Schnitte
- Streckung der Schnitte im Wasserbad
- Übertragung der Schnitte auf den Objektträger
- Trocknen im Ofen für 24 Stunden
- Einlegen in Xylol
- Einlegen in einer absteigenden Alkoholreihe

Hinzu kommt weiterhin, daß die *in vivo* Situation ganz unterschiedlich gegenüber der *in vitro* Situation ist. Der entscheidende Punkt ist wahrscheinlich das Fehlen des Blutdrucks, der zu einer teilweisen Kollabierung der Gefäße führen kann.