

4 Material und Methoden

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer: G 0016/99).

4.1 Untersuchte Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 101 männliche Ratten des Stammes Wistar, bezogen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland), verwendet (Tab. 1).

Für den Dosisvergleich der magnetresonanztomographischen Untersuchungen wurden 36 Ratten mit einer Körpermasse von 300-350 g verwendet. Für die histologische Untersuchung wurden 55 Ratten in zwei Kontrollgruppen zu 10 Tieren (Gruppe K und Gruppe K56) und nach Kontrastmittelapplikation zum Zeitverlauf in fünf Gruppen à 7 Tieren (Gruppen A-E) eingeteilt. Die Auswahl der Tiere für die Zuordnung in die einzelnen Gruppen erfolgte zufällig. Diese Tiere hatten zu Versuchsbeginn eine durchschnittliche Masse von 160-200 g. Die Schwankungen der Körpermasse waren durch die zeitlichen Differenzen der bestellten Tiere und den zur Verfügung stehenden magnetresonanztomographischen Untersuchungsterminen nicht zu vermeiden. Zur zeitabhängigen Erfassung der Metabolisierung des Kontrastmittels wurden von allen 55 Tieren die Lebern und Milzen in ein Phantom gebettet und im MRT untersucht. Als zusätzliche Leerwerte wurde eine weitere Kontrollgruppe mit 10 einheitlichen leichten, bzw. jungen Tieren hinzugezogen (Gruppe K0). Die detaillierte Beschreibung der durchgeführten Untersuchungen ist Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Körpermasse und Alter der für die histologischen und MRT-Phantom-Messungen verwendeten Tiergruppen mit Angabe der untersuchten Proben. Die Altersangaben für Wistar-Ratten Crl: WI BR wurden dem Katalog Charles River Laboratories 2000 entnommen.

L = Leber, M = Milz, Lu = Lunge, N = Nieren, H = Herz, \bar{x} = arithmetisches Mittel der Körpermasse, O.E. = Organentnahme, Inj.-Zeit = Zeit nach Injektion, Inj.-Med. = Injektionsmedium

Tiergruppe	Tieranzahl	Körpermasse [g]	\bar{x} [g]	Alter bei O.E. [d]	im Text	Inj.-Zeit [d]	Inj.-Med.	Histologie (Organe)	MRT (Organe)
K0	10	155-198	173,4	ca. 39	jung	1	NaCl	L,M	L,M
K	10	155-281	188,8	ca. 40	jung	1	NaCl	L,M,Lu,N,H	L,M
K56	10	415-448	430,7	> 84	alt	56	NaCl	L,M	L,M
A	7	164-201	188,9	ca. 40	jung	1	VSOP	L,M,Lu,N,H	L,M
B	7	159-298	216	ca. 42	jung	2	VSOP	L,M,Lu,N,H	L,M
C	7	211-243	223,1	ca. 48	jung	7	VSOP	L,M,Lu,N,H	L,M
D	7	379-440	401,4	> 84	alt	28	VSOP	L,M,Lu,N,H	L,M
E	7	413-478	452,1	> 84	alt	56	VSOP	L,M,Lu,N,H	L,M

4.1.1 Haltung der Tiere

Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen in Gruppen zu 3-4 Tieren gehalten und erhielten das Standard-Rattenzuchtfutter der Firma Altromin (Lage, Lippe) und Wasser ad libitum. Als Einstreu in die Käfige wurde Tierstreu granulat der selben Firma verwendet. Die Käfige standen in klimatisierten Räumen mit gefilterter Frischluft, einer Luftfeuchtigkeit von 30-40% und einer Raumtemperatur von 22°C. Die Beleuchtung war in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet.

4.2 Kontrastmittel

Die hier verwendeten, mit Zitrat stabilisierten Eisenoxidpartikel (VSOP-C63) sind nach einer Methode von Pilgrimm hergestellt worden (Pilgrimm, 1997). Die Partikel haben einen Kerndurchmesser von 5 nm, welcher mit einem Elektronenmikroskop gemessen wurde. Der hydrodynamische Durchmesser beträgt ca. 8 nm und wurde mittels Laser light scattering ermittelt. Bei 0,47 Tesla (T) beträgt die T1-Relaxivität $R1 = 30$ und die T2-Relaxivität $R2 = 39$ l/(mmol*s), gemessen bei 37°C in 0.9 % NaCl (Minispec PC 100, Bruker GmbH,

Karlsruhe, Germany). Dies ergibt ein R2/R1 – Verhältnis von 1,3.

Eigene orientierende Vorversuche zur Verträglichkeit von VSOP-C63 an Ratten (n=5) hatten bis zu einer Dosis von 3 mmol/kg bei bolusförmiger Injektion weder eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere noch makro- oder mikroskopisch feststellbare pathologische Veränderungen an den Organen erbracht.

4.3 Versuchsablauf

4.3.1 Magnetresonanztomographische Angiographie an Ratten

4.3.1.1 Narkose

Die Ratten wurden für die MR-Untersuchungen in kurzer Äthernarkose zur Immobilisation mit 50 mg/kg Ketaminhydrochlorid i.m. (Ketavet[®], Parke-Davis, Berlin, Germany), 5 mg/kg Xylazin i.m. (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen, Germany) und 2 mg/kg Diazepam s.c. anästhesiert.

4.3.1.2 Kontrastmittelverabreichung

Nach Narkotisierung der Tiere wurde das Kontrastmittel für alle MR-Untersuchungen unmittelbar vor der Meßsequenz als Bolus über eine Venenverweilkanüle (G22, Braun, Germany) in eine seitliche Schwanzvene injiziert und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült.

Es wurden insgesamt 36 Ratten verwendet. Für den Dosisvergleich wurden 30 Tiere in 6 Gruppen zu jeweils 5 Tieren aufgeteilt und erhielten pro Gruppe Konzentrationen von 15, 30, 45, 60, 75 und 90 µmol Fe/kg. Für die first pass MRA wurden 6 Ratten zunächst mit 0,2 mmol Gd/kg KM (Magnevist[®], Schering AG, Berlin, Germany) untersucht und nach renaler Elimination der Substanz nachfolgend mit 45 µmol Fe/kg KM VSOP-C63 untersucht.

4.3.1.3 Untersuchungstechnik

Die Untersuchungen mittels MRT fanden im Institut für Radiologie an der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, statt.

- Positionierung der Ratten

Jeweils drei narkotisierte Ratten wurden nebeneinander in Rückenlage, auf gleicher Höhe auf einer waagrechten Styroporunterlage in der Mitte einer Extremitätenspule mit einem Innendurchmesser von 23 cm gelagert. Die Positionierung erfolgte derart, daß sich der Spulenzentrum auf einer gedachten Waagerechten caudal des Sternums, in Höhe der Lebern der Tiere befand. Nach Kontrastmittel-Applikation jeder untersuchten Dosis wurde anhand der errechneten Einzelbilder mittels MIP (s.S. 23) die Signalintensitäten im Gefäßbett der Tiere dargestellt (Abb. 3).

- Wahl der Meßsequenz

Die in-vivo Untersuchungen erfolgten bei 1,5 Tesla (T) an einem Siemens Vision MRT mit einer kommerziellen Extremitätenspule (*commercially available extremity coil*).

Im Rahmen des Dosisvergleiches erfolgten die MRA Untersuchungen der Ratten mit einer hochaufgelösten 3D-fast low angle shot (FLASH) Sequenz. Die Sequenzparameter waren wie folgt: Repetitionszeit (TR) = 6.6 ms, Echozeit (TE) = 2.3 ms, Anregungswinkel (α) = 25°, field of view (FOV) = 197 x 300; Matrix = 235 x 512, Blockdicke 50 mm, 40 gemessene Partitionen, 80 rekonstruierte Partitionen, effektive Schichtdicke = 0.625 mm, Gesamtmeßzeit = 85 sec. Meßzeitpunkte waren ca. alle 3-4 min bis maximal 50 min nach Kontrastmittelapplikation.

Für die first pass MRA an Ratten wurde ebenfalls eine 3D-FLASH Sequenz mit folgenden Parametern eingesetzt: TR = 4.5 ms, TE = 1.7 ms; α = 25°, FOV = 197x160, Matrix = 100x256, Blockdicke 40 mm, 16 gemessene Partitionen, 32 rekonstruierte Partitionen, effektive Schichtdicke = 1.25 mm, Gesamtmeßzeit = 5 sec. Meßzeitpunkte waren vor sowie

alle 5 bis 20 sec nach Kontrastmittelapplikation.

- Auswertung der MRT-Untersuchungen

Die Auswertung der MRT-Bilder wurde mit einem automatischen Auswertprogramm (NIH Image) durchgeführt, das den unterschiedlichen Graustufen der Signalintensitäten (SI) eine Zahl zuordnet. Die SI hängt aber neben den Gewebeparametern auch von gerätetechnischen Parametern ab, die von Messung zu Messung variieren können, wodurch die Zahlenwerte nicht mehr vergleichbar wären. Daher müssen die gemessenen SI gegen einen internen Standard relativiert werden. Hierfür wurde das sich neben den Tierkörpern dunkel darstellende Rauschen gemessen und in Relation zu den SI in den Gefäßen gesetzt.

Für die MRA-Messungen zum Dosisvergleich wurden in den entsprechenden Einzelschichten für alle Zeitpunkte die intravasale Signalintensitäten der Aorta in Höhe des Aortenbogens, der Nierenarterienabgänge und der Endaufteilung der Aorta sowie die SI des Rauschens mittels standard ROI (region of interest) measurements bestimmt. Es wurde das Verhältnis aus intravasalem Signal zu Rauschen (S/N) gebildet. Mit Hilfe einer einfachen exponentiellen Funktion

$$y = (a \cdot \exp (-b \cdot x)) + c$$

mit y: S/N-Werte, a: Schnittpunkt der Funktion mit der y-Achse, b: Zeitkonstanten der Kinetik, x: Zeit p.i. in min, c: S/N Leerwert wurde anhand der S/N-Werte über den Zeitverlauf die Kinetik und die Halbwertszeit der intravasalen SI bestimmt.

- Statistische Auswertung:

Mit dem Wilcoxon Test für ungepaarte Stichproben wurde auf einem Signifikanzniveau von $p = 0.01$ geprüft, ob im Dosisvergleich Unterschiede zwischen den verschiedenen Dosierungen bezüglich der intravasalen Signalintensität bestehen. In gleicher Weise wurde beim Vergleich zwischen Magnevist[®] und VSOP-C63 mit Hilfe des Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W-tests ($p < 0.01$) geprüft, ob Unterschiede zwischen den beiden Substanzen bezüglich der

Signalgebung bei unterschiedlichen Dosierungen bestehen.

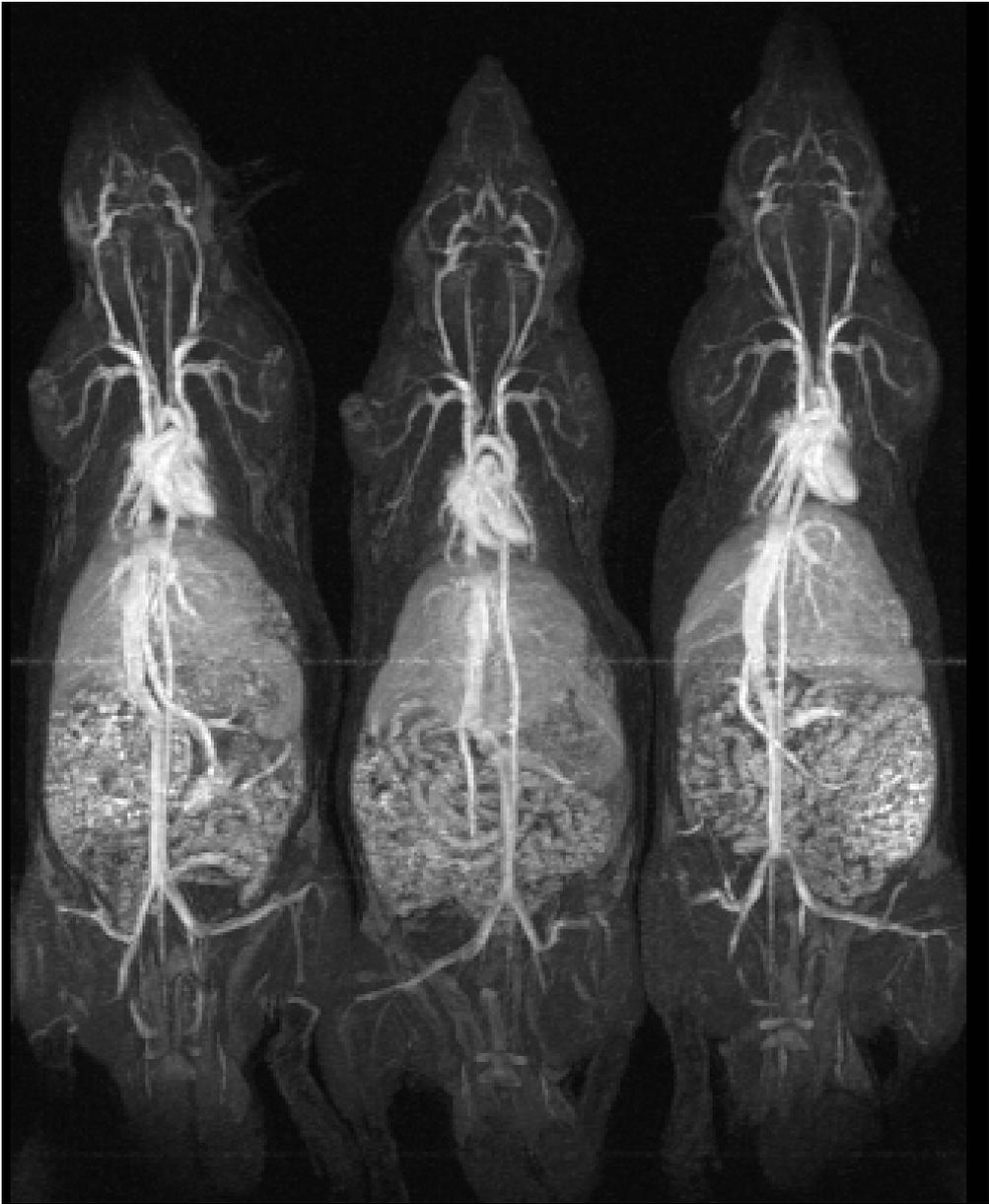


Abb. 3: Positionierung von 3 Ratten in der Kniespule nach Kontrastmittelgabe und Errechnung der MIP zur Ermittlung der Signalintensitäten in den einzelnen Gefäßabschnitten

4.3.2 Histologische Untersuchungen

4.3.2.1 Narkose und Kontrastmittelverabreichung

Alle Ratten für die histologische Untersuchung erhielten nur eine kurzzeitige Äthernarkose um einen schnellen und sicheren Zugang mit einer Venenverweilkanüle in eine seitliche Schwanzvene zu ermöglichen.

Als Kontrolltiere erhielten sowohl 10 junge Ratten (Gruppe K) mit einer Körpermasse von 155-281 g sowie 10 alte Tiere (Gruppe K56) mit einer Körpermasse von 403-448 g zur Wahrung der gleichen Untersuchungsbedingungen 1ml 0,9%ige NaCl-Lösung langsam injiziert. Die Körpermassen der Gruppe K56 wurden so gewählt, daß sie denen der Gruppe D und E entsprachen.

35 Tiere erhielten die gleiche Dosis von 60 $\mu\text{mol Fe/kg}$ und wurden dann in 5 Gruppen zu jeweils 7 Tieren eingeteilt.

4.3.2.2 Organentnahme und histologische Aufarbeitung

Die Entnahme der Organe erfolgte nach der Kontrastmittel-Injektion in der Gruppe A nach 24 h, Gruppe B nach 48 h, Gruppe C nach 1 Woche, Gruppe D nach 1 Monat und in Gruppe E nach 2 Monaten.

Alle Ratten zur histologischen Untersuchung wurden in Äthernarkose nach Eröffnung der Bauchhöhle über die Bauchaorta entblutet. Daraufhin wurden folgende Organe entnommen und in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung fixiert: Leber, Nieren, Milz, Lunge und Herz.

Nach der Entwässerung der Proben wurden diese in Paraffinblöckchen eingebettet. Daraufhin sind histologische Schnitte mit einer Dicke von 4 μm angefertigt worden. Anschließend erfolgte die histologische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Turnbull-Blau (TB). Die HE-Färbung diente zur Charakteristik von Zellkern und Zytoplasma mit Beurteilung von

eventuell physiologischen Abweichungen, bzw. pathologischen Veränderungen, während die TB-Färbung als Eisenfärbung die Darstellung des im Gewebe vorhandenen, bzw. aufgenommenen Eisens ermöglicht.

- Auswertung der Turnbull-Blau-Färbung

Da es sich bei dieser Arbeit um ein eisenhaltiges Kontrastmittel handelt, kann es mit dieser Eisenfärbung dargestellt werden. Hier muß jedoch das in physiologischer Weise im Organismus vorkommende Eisen berücksichtigt werden, weshalb der Vergleich zu dem Eisengehalt der gleichen Organe in den Kontrolltieren nötig ist. Wurde bei der mikroskopischen Betrachtung der Schnitte eine deutliche Eisenanreicherung festgestellt, erfolgte die Bestimmung des Eisengehaltes morphometrisch, ansonsten semiquantitativ.

Die semiquantitative Beurteilung der einzelnen Organe erfolgte nach folgendem Schema:

Lokalisation von Fe in der Leber	Lokalisation von Fe im Herzen
0 = nichts 1 = Kupffersche Sternzellen 2 = Kupffersche Stern- und Endothelzellen	0 = nichts 1 = vereinzelt in Makrophagen 2 = gehäuft in Makrophagen
Lokalisation von Fe in der Lunge	Lokalisation von Fe in der Milz
0 = nichts 1 = intrazellulär, stellenweise gehäuft auftretend	1 = vereinzelt in der roten Pulpa 2 = wenig in der roten Pulpa 3 = mittel in der roten Pulpa 4 = viel in der roten Pulpa
Lokalisation von Fe in den Nieren	
0 = nichts 1 = vereinzelt intrazellulär in Makrophagen im intertubulären Bindegewebe, im Cortex 2 = vermehrt intrazellulär in Makrophagen im intertubulären Bindegewebe, im Cortex	

Für die quantitative Bestimmung wurde das Bildanalysensystem Lucia M von Nikon mit einem Mikroskop (Optiphot 2, Nikon), einer Videokamera (3 CCD DXC, Sony) und einem gekoppelten 88 MB Pentium-Rechner mit einem 17" Monitor verwendet.

Die histologischen Präparate sind mit einer 200-fachen Vergrößerung untersucht und gemessen, und im Bedarfsfall mit einer stärkeren Vergrößerung zur genaueren Beurteilung

nachuntersucht worden. Im Falle von vorhandenem Eisen, welches semiquantitativ mit "viel" beurteilt wurde, wurden in dem entsprechenden Organ 15 Messungen in unterschiedlichen Bildausschnitten durchgeführt. Hierbei war das leuchtend blau eingefärbte Eisen sehr gut von den mit Kernechtrot angefärbten Zellkernen zu differenzieren und wurde von der Software mittels eines vorher definierten Schwellenwertes erfaßt und berechnet. Die zu messende Fläche wurde hierzu mit einem Binärbild überlagert und der Meßalgorhythmus gestartet. Mit Lucia M konnten bezüglich des Eisengehaltes folgende Parameter errechnet werden:

- Anzahl Partikel pro Flächenanteil (Partikel/mm²)
 - Flächenanteil der Eisenpartikel (%)
 - Durchschnittliche Größe eines Partikels (µm²)
-
- Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Durch die Färbung der Schnitte mit HE konnten die Zellen der einzelnen Organe genauer identifiziert und auf eventuelle Veränderungen hin untersucht werden. Des Weiteren wurde eine Einschätzung auf möglicherweise vermehrt vorkommende eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten, Makrophagen und Plasmazellen vorgenommen.

4.3.3 Magnetresonanztomographische Messungen der Phantome

Von den entnommenen Organen der Tiere zur histologischen Untersuchung wurden jeweils Proben von Leber und Milz in ein Phantom gebettet und im MRT untersucht. Als Vergleich diente hier zusätzlich eine Gruppe mit 10 jungen Tieren mit einer Körpermasse zwischen 155-198g (Gruppe K0) und die Gruppe K56 mit 403-448 g.

4.3.3.1 Aufarbeitung der Organproben für das Phantom

Von allen Tieren der Zeitgruppen K, K0, K56, A, B, C, D und E wurden Proben von Leber und Milz mit dem Ex-vivo-Modell von Pfefferer et al. (1993) und Wagner et al. (Wagner, 1995) dargestellt und miteinander verglichen. Hierzu wurden die Organe in ein Agar-Phantom (Glasküvette: 7,5cm x 9,5cm x 6,0cm) mit 2%igem Agar eingebettet. (Agar-Agar für die

Mikrobiologie, Fluka-Chemie, Neu-Ulm). Um eine Verstärkung des Matrixsignals zu erhalten, wurde dem Agar 0,5 mmol Gd-DTPA/l (Magnevist[®], Schering, Berlin) zugesetzt. In einer Schicht wurden die Proben von Tieren aus einer Gruppe nebeneinander eingebettet.

4.3.3.2 Kontrolltiere

Als Leerwerte wurden die 10 Leber- und Milzproben der Kontrolltiere aus Gruppe K als ursprüngliche Kontrollgruppe verwendet. Da die Tiere dieser Gruppe große Schwankungen in ihren Körpermassen aufwiesen, wurden zusätzlich 20 weitere Vergleichstiere mit 10 jungen Tieren mit einer relativ einheitlichen Körpermasse von 155-198 g (Gruppe K0) und einer Gruppe mit 10 alten Tieren deren Körpermassen zwischen 403-448 g (Gruppe K56) schwankten, verwendet.

4.3.3.3 Untersuchungstechnik

Die Messungen der Phantome fanden ebenfalls in der vorne erwähnten Extremitätenspule statt.

- Wahl der Meßsequenz

Die Untersuchungen der eingebetteten Organe erfolgte mit einer protonengewichteten Spin-Echo (PDSE) -Sequenz und einer T2-betonten Gradienten-Echo (T2GRE) -Technik mit einer Matrix aus 256 x 256 Pixeln in koronarer Schichtorientierung:

Sequenz	TR / TE / Anregungswinkel
PDSE (Protonendichte-betont)	2000ms / 15ms / 90°
T2GRE (T2-betont)	300ms / 15ms / 15°

- Auswertung der MRT-Untersuchungen

Die Auswertung der Proben von Leber und Milz erfolgte wie bei der Auswertung der Angiographiestudie (s.o.) mit dem Programm NIH Image. Die gemessenen Signalintensitäten wurden mit der Gd-DTPA versetzten Agarmatrix als Standardwert relativiert. Hierzu wurden die ermittelten Signalintensitäten der Organe durch den Agarwert dividiert und zwecks der geeigneteren Darstellung als Kehrwert verwendet. Damit ist dieser relative SI/A-Wert (rel. SI/A) um so größer, je stärker die Signalreduktion ausfällt.

- Statistische Auswertung

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit Hilfe des Kalkulationprogramms "Excel" 8.0 und des Statistikprogramms "SPSS" Version 9.0. Die verwendeten Testverfahren dienen der beschreibenden Statistik um einen Vergleich der Gruppen untereinander zu realisieren. Der Nutzen der Ergebnisse ist im explorativen Sinne als Wertungsmaßstab zu sehen, daher können diese nicht ohne kritische Beurteilung verallgemeinert werden.

Zur graphischen Veranschaulichung der morphometrischen Meßergebnisse der Eisenmenge für die histologische Untersuchung wurden Boxplots gewählt, um eine bessere Übersicht über die Gesamtheit der Ergebnisse zu erreichen. Hierbei können Informationen über die Verteilung der Meßwerte, Lage, Streuung und Schiefe und gleichzeitig Ausreißer (°) und Extremwerte (*) dargestellt und entnommen werden. Die Extremwerte sind mehr als 3 Boxenlängen vom oberen bzw. unteren Rand der Box entfernt und die Ausreißer 1,5 – 3 Boxlängen. Die wichtigsten Eigenschaften der Verteilung lassen sich mit dem Median, oberes und unteres Quartil, Minimum und Maximum darstellen. Zwischen dem Median und dem jeweiligen Quartil liegen je 25 % der Verteilung, die Striche oben und unten (whiskers) zeigen den größten und kleinsten Wert an, sofern sie keine Extremwerte oder Ausreißer sind.

Der Mann-Whitney Test für ungepaarte Stichproben ($p < 0,01$) wurde zur Ermittlung der Unterschiede in den Signalintensitäten der MR-Phantome sowie ebenfalls zur Bestimmung von Signifikanzen der morphometrischen Meßwerte zur Eisenanreicherung verwendet.

Die Zusammenhänge zwischen den Signalintensitäten der beiden Sequenzen der MR-Untersuchungen und der Eisenspeicherung in Leber und Milz wurden unter Anwendung des Rangkorrelationskoeffizienten r_s von Spearman beschrieben, da keine linearen Beziehungen zwischen den Parametern vorausgesetzt werden kann. Der Korrelationskoeffizient r_s wurde in den entsprechenden Tabellen angegeben, wenn die Korrelationen auf dem Niveau von 0,01 signifikant waren und wie folgt interpretiert: 0,3 - 0,5 schwach, 0,5 – 0,8 mittelgradig und $> 0,8$ stark korreliert. Nichtsignifikante Korrelationen wurden mit nicht signifikant (n.s.) bezeichnet.