

3 Material und Methoden

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens (Genehmigungs- Nr. G0016/99) durchgeführt.

3.1. Untersuchte Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 55 männliche Wistar-Ratten eingesetzt (Herkunft Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden gemäß ihrer Körpermassen (KM) in drei Altersgruppen unterteilt. Gruppe *Jung* (Alter < 40 d) wog zwischen 100 und 200 g, Gruppe *Mittel* (Alter 40 - 80 d) zwischen 200 und 400 g, Gruppe *Alt* (Alter > 80 d) zwischen 400 und 600 g zum Zeitpunkt der Organentnahme (Tab. 1).

Als Kontrolltiere dienten je 5 Tiere aus den drei Altersgruppen zur Beurteilung der Lymphknoten in der Histologie. Weitere 5 Tiere der jeweiligen Gruppen *Mittel* bzw. *Alt* wurden im MRT untersucht.

Tab. 1: Darstellung der Gruppenaufteilung mit Alter und Gewicht

Altersgruppe	Jung	Mittel	Alt
<i>Körpermasse (Gramm)</i>	100-200 g	200-400 g	400-600 g
<i>Alter (Tage)</i>	< 40 d	40 – 80 d	> 80 d
<i>Kontrollgruppe</i>	Histologie	Histologie/ MRT	Histologie/ MRT
<i>Kontrastmittelgruppe</i>	keine	Histologie/ MRT	Histologie/ MRT

Bei eisenhaltigem Kontrastmittel wird die Dosierung in Eisenmenge ($\mu\text{mol Fe}$) pro Kilogramm Körpermasse (kg KM) angegeben (Abkürzung im weiteren Verlauf der Arbeit: $\mu\text{mol/kg}$).

Zur Ermittlung der optimalen Dosis wurden je 5 Tiere der Altersgruppe *Mittel* mit drei verschiedenen Dosierungen (25, 50 bzw. 75 $\mu\text{mol Fe/kg KM}$ intravenös) des Kontrastmittels VSOP-C144T untersucht. Die Organentnahme erfolgte 24 h nach Applikation. Diese Organe wurden im MRT untersucht, um die beste Dosis zu ermitteln.

Mit der Dosierung 75 $\mu\text{mol Fe/kg KM}$ iv. wurde 15 weiteren Tieren der Altersgruppe *Mittel* das Kontrastmittel VSOP-C144T appliziert. Zur Beurteilung des Zeitverlaufs wurden die Organe zum Zeitpunkt 1 Woche (Altersgruppe *Mittel*) und 1 Monat sowie 2 Monate nach

Kontrastmittelapplikation entnommen. Die Gruppen 1 Monat und 2 Monate nach Applikation sind über den langen Untersuchungszeitraum gealtert und gehören zum Zeitpunkt der Organentnahme einer anderen Altersstufe (Altersgruppe *Alt*) an als zum Zeitpunkt der Kontrastmittelgabe (Altersstufe *Mittel*) (Tab. 2).

Die Organe wurden sowohl im MRT als auch histologisch untersucht.

Tab. 2: Gruppeneinteilung mit Dosierung und Zeitpunkt der Organentnahme für MRT/ Histo

Gruppe (Tiere pro Gruppe)	Kontrastmittel, iv. Gabe	Zeitpunkt der Entnahme der Organe p.i.	Alter bei Entnahme der Organe	,Gruppen- Name‘
Kontrolle (5)	keines	0	Jung	,Kon. Jung‘
Kontrolle (5/5)	keines	0	Mittel	,Kon. Mittel‘
Kontrolle (5/5)	keines	0	Alt	,Kon. Alt‘
Kontrastmittel (5)	25 µmol Fe/ kg KM	24 Stunden	Mittel	,25 µmol/kg‘
Kontrastmittel (5)	50 µmol Fe/ kg KM	24 Stunden	Mittel	,50 µmol/kg‘
Kontrastmittel (5)	75 µmol Fe/ kg KM	24 Stunden	Mittel	,75 µmol/kg‘ bzw. ,24 h‘
Kontrastmittel (5)	75 µmol Fe/ kg KM	1 Woche	Mittel	,1 Wo‘
Kontrastmittel (5)	75 µmol Fe/ kg KM	1 Monat	Alt	,1 Mo‘
Kontrastmittel (5)	75 µmol Fe/ kg KM	2 Monate	Alt	,2 Mo‘

3.1.1. Haltung der Modelltiere

Die Ratten wurden in Gruppen von 3-5 Tieren in Makrolonkäfigen mit entstaubtem Holzgranulat der Firma Altromin (Lage, Lippe, Deutschland) gehalten. Sie erhielten das Standard-Rattenzuchtfutter derselben Firma und Wasser ad libitum. Die Temperatur in den klimatisierten Räumen betrug 20-22° C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem Hell- Dunkel- Rhythmus von 12 Stunden.

3.2. Kontrastmittel

Bei dem verwendeten Kontrastmittel handelt es sich um superparamagnetische Eisenoxidpartikel, die mit einem Gemisch aus Zitrat und Tannin ummantelt sind. Die Ummantelung dient der galenischen Stabilisierung.

Der Gesamtdurchmesser (hydrodynamischer Durchmesser) der Partikel liegt bei 8 nm mit einem Kerndurchmesser von 5 nm (gemessen im LLS).

Die T1- Relaxivität ($R1=23,3$) und T2- Relaxivität ($R2=92,02$) wurden bei 0,94 Tesla (Bruker Minispec mq40, Karlsruhe, Deutschland) gemessen ($l/mmol*s$, in Aqua ad injectabile).

3.3. Versuchsablauf

3.3.1. Narkose

Die Tiere wurden zur Injektion des Kontrastmittels mit Hilfe einer Ethernarkose immobilisiert. Zwar sind intravenöse Zugänge auch an wachen Tieren möglich, aufgrund der geringen Injektionsmenge wurde aber auf einen sicheren Zugang Wert gelegt, bei dem es während der Injektion nicht zu Abwehrbewegungen der Ratten kommt.

Zur Entnahme der Lymphknoten wurden die Tiere ebenfalls narkotisiert und mit Hilfe eines Zugangs über die Aorta abdominalis entblutet. Der Tod wurde durch Fehlen des Kornealreflexes sowie Ausbleiben von Herzkontraktionen und Atmung festgestellt.

3.3.2. Kontrastmittelverabreichung

Das Kontrastmittel wurde von 500 $\mu\text{mol/ml}$ auf eine Konzentration von 50 $\mu\text{mol/ml}$ mit einer Kochsalzlösung 0,9% verdünnt, um die Genauigkeit bei der Verabreichung zu gewährleisten. Den narkotisierten Tieren wurde in die seitliche Schwanzvene (Vena coccygealis lateralis) ein Venenverweilkatheter (22G/1^{cc}) gelegt, über den das Kontrastmittel in Dosierungen von 25, 50 resp. 75 $\mu\text{mol/kg}$ KM injiziert wurde.

3.3.3. Sektion und Organentnahme

Während der Organentnahme wurden die Tiere auf eventuelle Veränderungen der Organe hin untersucht. Folgende Organe wurden entnommen:

Große Organe: Leber, Milz und Femurschaft inklusive Knochenmark

Lymphknoten (im weiteren verwendete Abkürzung):

- Ln. mandibularis (Mand)
- Ln. cervicalis profundus cran (Cerv)
- Ln. axillaris (Ax)
- Ln. axillaris accessorii (Ax Ac)
- Ln. subiliacus (Subili)
- Ln. popliteus (Pop)
- Ln. iliacalis (Ili)
- Lnn. jejunales (Jejun, rsp. Darmln), nicht paarig

Die paarigen Lymphknoten wurden auf der rechten und linken Körperseite getrennt entnommen. Alle Organe wurden in 3%igem Formaldehyd fixiert.

3.4. Magentresonanztomographische Untersuchung

3.4.1. Herstellung eines Agarphantoms

Die zur Untersuchung im MRT vorgesehenen Organe wurden in das Agarphantom nach PFEFFERER et al. (1993) und WAGNER et al. (1995) eingebettet. Dieses Ex- Vivo Modell erlaubt es, die sehr kleinen Organe in einer definierten Signalumgebung, die als Kontrast dient, darzustellen. Dies gelingt bei den meisten Lymphknoten in vivo nicht. Nach 24-stündiger Fixation wurden die Lymphknoten von umgebenden Fettgewebsresten befreit und eingebettet. Dazu wurde 2%iger Agar-Agar für die Mikrobiologie (Fluka Chemie, Neu-Ulm, Deutschland) mit einem Zusatz von 0,5 mmol Gd-DTPA/l (Magnevist®, Schering, Berlin, Deutschland) schichtweise in eine Glasküvette (7,5cm x 9,5cm x 6,0cm) gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden die Organe eines Tieres in einer Schicht angeordnet, und eine weitere Schicht Agar luftblasenfrei darüber gegossen. Diese Technik ermöglicht die Messung von einer Gruppe von 5 Tieren in einem Phantom. Der Zusatz von Gd-DTPA dient zur Verstärkung des Matrixsignals und erleichtert später die Auswertung.

3.4.2. Untersuchungstechnik im Magnetresonanztomographen

Die MR- Untersuchungen fanden am Institut für Radiologie der Charité- Campus Mitte/ Humboldt Universität zu Berlin statt. Das Gerät ist ein 1,5 Tesla Magnetom Vision (Siemens,

Erlangen, Deutschland). Die Untersuchungen fanden mit Hilfe einer kommerziellen Extremitätenspule statt. Das Phantom wurde mittig in der Spule plaziert, so daß es sich im Isozentrum der Spule befand, und alle Organe einer Schicht auf einmal darstellbar waren. Diese reproduzierbare Positionierung wurde bei allen Messungen in gleicher Art vollzogen. Das Meßfeld (FOV, field of view) betrug 150 x 150 mm. Die Matrix betrug bei den angewandten Sequenzen 256 x 256 Pixel, die Schichtdicke 2 mm. Die Untersuchung wurde mit einer T_{2w}GRE- Sequenz sowie einer d_wSE- Sequenz durchgeführt (Tab. 3).

Tab. 3: Pulssequenzen für die MR-tomographische Untersuchung

Sequenz	TR/ TE/ α	Meßzeit
T _{2w} GRE	135 ms/ 15 ms/15°	3,29 min
d _w SE	2000 ms/ 15 ms/ 90°	6,27 min

3.4.3. Auswertung der MR-tomographischen Untersuchung

Die Messung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programmes NIH Image (National Institute of Health, USA), mit dem es möglich ist, den als verschiedene Graustufen dargestellten Signalintensitäten einen relativen, natürlichen Zahlenwert zuzuordnen. Das Programm errechnet dann den Mittelwert der Signalintensitäten in der ausgewählten Meßregion. Idealerweise wird in der Meßregion der gesamte Lymphknoten berücksichtigt, was bei schwachem Kontrast oder kleinen Organen schwer ist. In dem Fall wurden die sicher zum Lymphknoten gehörenden Areale gemessen.

Um Veränderungen der Signalintensitäten durch externe Faktoren, z. B. exogenen Störungen, Magnetfeldinhomogenitäten etc., berücksichtigen zu können, wird der gewonnene Meßwert gegen einen Standard relativiert. Als Standard dient die Signalintensität der Agarmatrix, der Meßwert des Organs wird durch den Wert der benachbarten Agarmatrix dividiert.

Je dunkler eine Struktur auf dem Meßbild aussieht, desto geringer ist die relative Signalintensität (Rel. SI). Das verwendete Kontrastmittel hat nach Aufnahme in ein Organ einen starken T2-Effekt, der eine reduzierte Signalintensität (Signalreduktion) zur Folge hat. Lymphknoten, die Kontrastmittel aufgenommen haben, stellen sich also dunkler dar. Für jeden einzelnen Lymphknoten wurde die relative Signalintensität bestimmt, um diese mit den entsprechenden Meßwerten der Kontrolltiere zu vergleichen.

3.5. Histologische Untersuchung

Es wurden folgende Gruppen histologisch untersucht:

Kontrolltiergruppen	<i>Jung, Mittel</i> und <i>Alt</i> , je fünf Tiere
Kontrastmittelgruppen	75 $\mu\text{mol Fe/kg KM}$ zu den Zeitpunkten 24 h, 1 Woche, 1 Monat und 2 Monate, je fünf Tiere

Es wurden folgende Organe zur histologischen Untersuchung herangezogen:

Oberflächliche Lymphknoten	Mand, Ax, Ax Ac, Pop jeweils rechts und links
Eingeweidelymphknoten	Ili, jeweils rechts und links, Jejun, nicht paarig
Leber und Milz	

3.5.1. Histologische Aufarbeitung

Zur histologischen Bearbeitung wurden die Organe nach der MR-tomographischen Messung aus dem Phantom entnommen und von Agarresten befreit. Nach Entwässerung in einer Alkohol-/Xylolreihe wurden die Organe in Paraffinblöckchen eingebettet. Von den Blöckchen wurden je 16-20 Schnitte mit einer Schichtdicke von 3-5 μm angefertigt und auf 2 Objektträgern fixiert. Je ein Objektträger wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) bzw. Turnbull-Blau (TB, Eisenfärbung) gefärbt. Die HE-Färbung dient der Beurteilung des Aktivitätszustandes, die Eisenfärbung zum Nachweis von Eisen.

Bei dem Nachweis des Eisens ist zu beachten, daß sowohl natürlich im Lymphknoten vorkommendes Eisen als auch das Kontrastmittel auf die Färbung reagieren, was die Beurteilung der Kontrolltiere notwendig macht.

3.5.2. Auswertung der Eisenfärbung (Turnbull- Blau- Färbung)

Die Turnbull- Blau- Färbung (TB-Färbung) ist eine Färbemethode zur Darstellung von zweiwertigem Eisen, das blau angefärbt wird. Um sowohl zweiwertiges als auch dreiwertiges Eisen darstellen zu können, wurde vor der Turnbull- Blau- Färbung die Quinckes- Reaktion durchgeführt. Diese reduziert mit Hilfe von Ammoniumchlorid dreiwertiges Eisen. Anschließend steht das gesamte Eisen als zweiwertiges Eisen für die TB-Färbung zur Verfügung. Sowohl körpereigenes Eisen als auch körperfremdes z. B. Kontrastmitteleisen reagieren mit dem Färbeagens. Der Vergleich mit den Kontrolltieren soll Aufschluß geben, wieviel Eisen vom Kontrastmittel stammt.

Die semiquantitative und morphometrische Beurteilung werden gegenüber gestellt, um die Methoden auf ihre Aussagekraft zu überprüfen.

Folgende Kompartimente wurden untersucht:

Rinde beinhaltet Kortex und Parakortex

Sinussystem beinhaltet Intermediär- und Marksinus

Der Eisengehalt in den Lymphknoten wurde mit zwei unterschiedlichen Messungen bestimmt. Bei der **semiquantitativen Messung** lag das Augenmerk auf Verteilung und Gestalt der Partikel in den verschiedenen Kompartimenten (Kortex K, Parakortex PK, Intermediärsinus IS und Marksinus MS). Des weiteren wurde die Menge evaluiert (Tab. 4).

Homogenität (K, PK, IS, MS) 0 keine homogene Verteilung

1 homogene Verteilung

Es wurde weiterhin die Menge des Eisens in Kortex/ Parakortex, bzw. im Sinussystem bestimmt, zusätzlich die Verteilung des Eisens zwischen den beiden Sinuskompartimenten Intermediärsinus und Marksinus.

Tab. 4: Merkmale zur Eisenquantifizierung

Wert	Menge K/PK	Menge Sinussystem	Verteilung
0	kein Eisen	kein Eisen	vereinzelt
1	vereinzelt	gering	IS
2	Randsaum	deutlich	MS
3		viel	IS+ MS

Die **quantitative Bildanalyse** ermöglichte das Morphometriesystem Lucia 32G Version 4.11 von Nikon, wie bei FUCHS (1998) beschrieben. Über eine Videokamera (3 CCD DXC 930 P, Sony) ist das Mikroskop (Optiphot 2, Nikon) mit einem 88 MB Pentium-Rechner mit 19“ Monitor (Sony) gekoppelt. Bei 200facher Vergrößerung werden jeweils 30 Meßareale im Bereich des Markraumes, bzw. 15 im Bereich Kortex/ Parakortex aufgenommen. Auf dem Bildschirm wurde anhand eines Schwellenwertes die zu vermessende Fläche definiert. Das Eisen ist blau im Gegensatz zu den mit Kernechtrot gefärbten Zellen. Die blauen Partikel werden mit einem Binärbild überlagert und anschließend wird der Meßalgorithmus gestartet.

Die Messung diente der Bestimmung von:

- Flächenanteil des Eisens in % der Gesamtfläche
- Partikelanzahl pro mm²
- durchschnittlicher Teilchengröße (Area) in µm²

Dies geschah separat für die Rinde (Kortex/ Parakortex) bzw. das Sinussystem.

Die semiquantitative und morphometrische Beurteilung wurden ebenfalls bei *Leber* und *Milz* durchgeführt. Die Milz wurde dabei getrennt nach roter und weißer Pulpa beurteilt.

Es wurden die Homogenität, die Lokalisation und die Menge des Eisens bestimmt. Bei der Beurteilung der Eisenmenge in der Leber wurde die Anzahl der Eisen enthaltenden Kupfferzellen bestimmt (0 kein Eisen; 1-3 wenige bis viele Kupfferzellen). In der weißen Milzpulpa wurde vorhandenes Eisen entweder als leichter Schleier oder vorwiegend partikulär beobachtet (0 kein Eisen; 1-2 leichter Schleier bis vorwiegend partikulär). In der roten Milzpulpa zeigte sich vorhandenes Eisen partikulär, es wurde geringes bis häufiges Vorkommen beobachtet (0 kein Eisen; 1-3 gering bis häufig).

Bei der digitalen Auswertung wurden die gleichen Faktoren bestimmt wie bei den Lymphknoten.

3.5.3. Auswertung der Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung erlaubt, Zellen voneinander zu differenzieren. Dadurch wird eine Beurteilung des Aktivitätszustandes und des Zellbildes möglich. Um Veränderungen zu beurteilen, werden die Kontrastmittelgruppen mit den Kontrollgruppen verglichen. Variationen innerhalb der Lymphknoten eines Tieres sind möglich, da jeder Lymphknoten in seinem tributären Gebiet eine eigene Aufgabe zu erfüllen hat. Die untersuchten Kriterien sind Parameter für die Reaktionsfähigkeit und den Aktivitätsgrad, stellen aber an sich keine Kriterien für pathologische Veränderungen dar.

Zur Darstellung des Aktivitätszustandes wurden untersucht (Tab. 5):

<i>Kortex</i>	Vorkommen von aktiven Follikeln, die dominierende Form innerhalb eines Lymphknotens wurde benannt
<i>Parakortex</i>	Breite im Verhältnis zum Kortex
<i>Sinus</i>	Vorkommen und Homogenität einer Sinushistiozytose mit Vermehrung der aktiven Makrophagen

Plasmozytose

Vorkommen als Ausdruck einer spezifischen Abwehrreaktion

Im Kortex kommen in allen Sekundärfollikeln Kerntrümmerzellen vor, deren Anzahl aber variiert.

Tab. 5: Merkmale für den Aktivitätszustand

Wert	Kortex	Parakortex	Sinushistiozytose	Plasmozytose
0				keine
1	Primärknötchen	geringe Breite	inaktives Mark	vorhanden
2	Sekundärknötchen	breiter Parakortex	inhomogene	
3	Sekundärknötchen mit vielen Kerntrümmerzellen	sehr breiter Parakortex	homogene	

Bestimmte Zellen wurden hinsichtlich ihrer Anzahl untersucht (Tab. 6).

Mastzellen

kommen vornehmlich im Sinus, aber auch in anderen Kompartimenten des Lymphknotens vor

Eosinophile

Untergruppe der Granulozyten, die vornehmlich im Markraum vorkommen

Tab. 6: Bestimmte Zellparameter

Wert	Eosinophile Granulozyten	Mastzellen
0	keine	keine
1	wenige im Mark	wenige
2	viele im Mark	mäßig viele
3	sehr viele im Mark	sehr viele

Durch die histologische Aufarbeitung war es nicht immer möglich, von allen Kontrolltieren die HE-Färbung zu machen, da nicht bei allen Lymphknoten ausreichend Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand.

3.6. Statistische Auswertung

Als Beobachtungseinheit dient der einzelne Lymphknoten, da diese jeweils eigene Drainagegebiete haben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 10.0.

Als Darstellungsweise für die quantitativen Daten (MR- Messung und Morphometrie) wurde der Box- und Whiskers Plot gewählt, mit dem sich sowohl Median, Quartile, Ausreißer und Extremwerte darstellen lassen. Dabei sind 50% der Werte kleiner oder gleich dem Medianwert (2.Quartil). 25% der Werte liegen unterhalb des 1. und 25% oberhalb des 3. Quartils. Die Enden der Whisker stellen den größten bzw. kleinsten Wert dar, der nicht ausreißerverdächtig ist.

Die Balkendiagramme dienen zur Darstellung der semiquantitativen Merkmale. Den Lymphknoten wurde jeweils die dominierend ausgeprägte Eigenschaft zugeordnet, und für eine Gruppe die prozentuale Anzahl der Lymphknoten mit der jeweiligen Ausprägung dargestellt.

Die Ergebnisse der morphometrischen und der MR- Untersuchung wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis- Tests (KW) bzw. der Mann-Whitney-U- Tests (MWU) für quantitative Merkmale statistisch untersucht.

Die semiquantitativen Untersuchungen (kategoriale oder qualitative Merkmale) wurden mit Hilfe des Chi²- Tests beurteilt.

Zur Trenduntersuchung dienen der Jonckheere-Terpstra- Test (JT) für quantitative Merkmale, bzw. der Mantel-Haenszel-Chi²- Test (MH) bei kategorialen oder qualitativen Merkmalen.

In dieser Arbeit wurden die p- Werte explorativ betrachtet und nicht adjustiert. Ein p- Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Zur Beurteilung der Korrelation zwischen verschiedenen Merkmalen wurde der Spearmannsche Rangkorrelationskoeffizient r bestimmt. Dieser ermöglicht die Korrelation von nicht linearen Merkmalen. Dabei wird $r < 0,5$ als schwach korreliert, $0,5 \leq r \leq 0,8$ als mittelstark korreliert und $r > 0,8$ als stark korreliert interpretiert (SCHLITTGEN, 1996). Die graphische Darstellung der Korrelation erfolgt durch Punktwolkendiagramme (Scatter Plots).