

7 Zusammenfassung

Dynamische kontrastmittelgestützte magnetresonanztomographische Untersuchungen solider maligner Tumore zeigen in der Spätphase der Messung das Phänomen des peripheren Washout. Es stellt sich als zunehmend breiter hypointenser Ring in der peripheren Tumorzone dar, während die zentralen Tumoranteile hyperintens verbleiben. Dieses ist spezifisch für maligne Tumore. Interstitielle Druckmessungen zeigen, dass der interstitielle Flüssigkeitsdruck in malignen Tumoren im Gegensatz zum gesunden Gewebe oder benignen Tumoren erhöht ist. Dies liegt unter anderem in der tumorspezifischen Angiogenese und Gefäßmorphologie begründet und hat Auswirkungen auf den Transport von Molekülen innerhalb des Tumorgewebes. Zur Charakterisierung von Tumorgewebe wird der prognostisch aussagefähige Parameter mikrovaskuläre Dichte (MVD) herangezogen.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Etablierung eines Tiermodells zur Darstellung und Analyse des peripheren Washout, in dem die beeinflussenden Faktoren (interstitieller Flüssigkeitsdruck und histomorphologische Gegebenheiten) im Vergleich zur MRT-Untersuchung beurteilt werden können.

Das Modell des Colocarzinoms der Linie CC531 an der Ratte wurde erfolgreich etabliert. An 21 WAG-Ratten wurde durch die Injektion einer Zellsuspension (1×10^6 Zellen) der Linie CC531 subkutan das Wachstum des Tumors induziert. Nach 45 Tagen erreichten die Tumore eine Größe von 1,5 - 2 cm im Durchmesser und wurden im MRT (T1-gewichtete 3D-FLASH, TR = 6,8 ms, TE = 2,3 ms, $\alpha = 15^\circ$, FOV = 125 mm, Matrix = 52 % 100 x 256, Pixelgröße 0,94 x 0,49 mm, Anzahl der Akquisitionen = 1, Blockdicke = 48 mm, effektive Schichtdicke = 6 mm) einer dynamischen Kontrastmitteluntersuchung (42 min) unterzogen. Die Auswertung erfolgte anhand der Messung der relativen Signalintensität in der Vena cava caudalis und vier Tumorzonen (marginal, peripher, intermediär und zentral). In der ersten Messung wurde mit Hilfe des niedermolekularen Gd-DTPA (200 μmol Gd-DTPA/kg) das „periphere Washout“ dargestellt, 48 h später erfolgte eine vergleichende MRT-Messung mit dem Blood-Pool Kontrastmittel VSOP-C184 (30 μmol Fe/kg). 24 h später wurde ein Profil des interstitiellen Druckes mit Hilfe der Wick-in-needle (WIN)-Technik erstellt. Anschließend wurden die Tumore entnommen und histologisch zur Charakterisierung des Gewebes mittels Hämatoxylin-Eosin- (HE), zur Prüfung des Eisengehaltes mittels Turnbull-Blau-Färbung (TB) und zur Quantifizierung der Gefäßstrukturen mittels Lektin-Markierung (Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia Lektin, BSL I) untersucht.

In der MRT-Untersuchung mit Gd-DTPA konnte erstmals das periphere Washout am Colocarzinom CC531 der Ratte entsprechend dem am Menschen dargestellten Phänomen nachgewiesen und quantitativ analysiert werden. Die neu eingeführte Beurteilung des Verlaufes der Signalintensitäten im Tumor an vier Tumorzonen im Vergleich zur Vena cava caudalis ergab eine eigenständige Charakteristik für jeden der Auswertungsbereiche. Die beiden außen gelegenen Tumorzonen „marginal“ und „peripher“ zeigten im Vergleich zu den innen gelegenen Tumorzonen „intermediär“ und „zentral“ grundlegend unterschiedliche Verhaltensmuster im Verlauf der Signalintensität. Während die frühe Intensivierung der Signalintensität auf vaskulären Antransport und Extravasation zurückzuführen ist, können für die späten Signalverstärkungen nur interstitielle Transportprozesse verantwortlich sein. Mit Nachweis des erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruckes für dieses Modell sind in den Zonen „peripher“ und „marginal“ Konvektionskräfte entlang des nach außen gerichteten Flüssigkeitsstromes zum Gebiet niederen Druckes im umliegenden Gewebe verantwortlich zu machen. Die Signalintensitätssteigerung der inneren Tumorzonen ist auf eine entgegengesetzte Diffusionsbewegung des Kontrastmittels im Interstitium zurückzuführen.

An diesem Tumormodell wurden erstmalig Messungen mit VSOP-C184 durchgeführt. Sie bestätigten die Ergebnisse aus der Gd-DTPA Messung bezüglich der Perfusion des Tumorgewebes. Es war ebenfalls eine eigenständige Charakteristik aller ausgewerteten Zonen darzustellen. Erstmals wurde für die Kapillaren dieses Tumors gegenüber dem Blood-Pool Kontrastmittel eine, die Extravasation ermöglichende, Permeabilität nachgewiesen.

Die Messung des interstitiellen Flüssigkeitsdruckes mit der WIN-Methode wurde für dieses Modell etabliert. Ein Druckprofil wurde erstellt und ein erhöhter interstitieller Flüssigkeitsdruck nachgewiesen, welcher für die Dynamik des Kontrastmittels im Tumor mit verantwortlich ist.

In der histologischen Charakterisierung (HE) wurde das Gewebe als maligne eingestuft. In der Eisenfärbung (TB) wurden Hinweise auf Extravasation von VSOP-C184 gefunden. In der glykohistochemischen Färbung (BSL I) konnten erstmals in den Tumorbereichen (Kapsel, minder vaskularisiertes Vitalgewebe, Hotspot und Nekrose) Korrelate zur MRT-Messung wie die mikrovaskuläre Dichte, die Fläche der Gefäßlumina und interkapilläre Distanz ermittelt werden, welche die Ergebnisse der dynamischen MRT-Messung verifizieren.

Die Ergebnisse unterstützen die gestellte Hypothese, dass die Ursache für das Auftreten des peripheren Washout am malignen Tumor neben dem tumorspezifischen insuffizienten Gefäßsystem im erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck begründet liegt. Sie indizieren die Nutzung des peripheren Washout in der Praxis als nicht invasives Malignitätskriterium.

8 Summary

Peripheral washout sign in coloncarcinoma CC531 in rats: Comparative study by magnetic resonance imaging, measurement of interstitial pressure and histology

Solid malignant tumors display in the end phase of dynamic contrast-enhanced MRI measurements a phenomenon called peripheral washout. It is characterised by the development of a progressively widening, hypointense rim in the tumor's peripheral area, while the central part stays hyperintense. Peripheral washout is specific to malignant tumors. Measurements of interstitial pressure show that, in malignant tumors, the interstitial fluid pressure (IFP) is increased compared to normal tissue and benign tumors. Among other causes, this is due to the tumor-specific angiogenesis and morphology of tumor vessels and affects the transportation of molecules within the tumor. Thus, microvascular density (MVD) is a significant prognostic parameter, and it is used to characterise tumor tissue.

The aim of this study was to establish an animal model for the demonstration and analysis of peripheral washout, in which the interacting factors (interstitial fluid pressure and histomorphologic data) could be assessed in relation to MRI.

The coloncarcinoma CC531 was successfully established in rats. 21 WAG rats were injected with a cell suspension (1×10^6) from the experimental cell line CC531 in order to induce subcutaneous growth of coloncarcinoma. After 45 days, the tumors reached diameters of 1,5–2 cm and were subjected to dynamic (42 min) contrast enhanced MRI measurement (T1-weighted 3D-FLASH, TR = 6,8 ms, TE = 2,3 ms, $\alpha = 15^\circ$, FOV = 125 mm, Matrix = 52 % 100 x 256, pixel dimension = 0,94 x 0,49 mm, number of acquisitions = 1, block thickness = 48 mm, effective slice thickness = 6 mm). Analysis was carried out by measuring the relative signal intensity in the vena cava caudalis compared to four tumor areas (defined as marginal, peripheral, intermediate, central). In the first measurement, peripheral washout was displayed using Gd-DTPA (200 μm Gd-DTPA/kg), a contrast agent with low molecular mass. 48 h later, a comparative measurement was taken using the blood pool contrast agent VSOP-C184 (30 μm Fe/kg). Another 24 h later, a profile of the interstitial fluid pressure was recorded by use of the wick-in-needle (WIN) technique. Subsequently, the tumors were extracted and subjected to tissue characterisation by hematoxylin-eosin-(HE-) staining. They were tested for iron content by turnbull-blue-(TB-) staining and examined for quantification of vessel structures by lectin-staining (Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia Lectin, BSL I).

In the Gd-DTPA MRI study peripheral washout sign was shown for the first time in coloncarcinoma CC531 in rats, analogous to the phenomenon seen in humans. The novel establishment of assessing progression of signal intensity within four tumor areas in comparison to the vena cava caudalis revealed an independent characteristic for each evaluation area. Compared to the two external orientated tumor areas “marginal” and “peripheral”, the two internal orientated tumor areas “intermediate” and “central” show entirely different pattern of the progression of signal intensity. While early increase of signal intensity is ascribable to vascular transport and extravasation, later increase of signal intensity is due to interstitial transport processes. With the proof of elevated interstitial fluid pressure for this model external orientated convective fluid movement is in charge for later changes in signal intensity in the areas “peripheral” and “marginal”. The later elevation of signal intensity in the inner tumor areas is due to diffusion of contrast agent within the interstitial space.

For the first time examinations with VSOP-C184 were carried out on this model. They confirm the results from Gd-DTPA examination referring to perfusion of tumor tissue. Also an independent characteristic progression of signal intensity for each evaluation area was determined. For the first time evidence was found, that the tumor vessels are permeable to the blood pool contrast agent and allow extravasation.

For this model measurement of interstitial fluid pressure by WIN-technique was established. The study was able to generate a profile of interstitial fluid pressure and determine elevated interstitial fluid pressure, which is responsible for the dynamics of contrast agent in the tumor.

The tissue was rated malignant by histologic characterisation (HE-stain). By iron staining (TB) evidence indicating extravasation of VSOP-C184 was found. By glycohistochemical staining (BSL I) correlates to the MRI-study were found for the first time in the tumor areas (capsule, low vasculated vital tissue, hotspots and necrotic area) like microvascular density, vessel lumina and intercapillary distance, which verify the results from the dynamic MRI-examination.

The experimental results support the hypothesis, that peripheral washout in malignant tumors is caused not only by tumor-specific vessel insufficiency, but also by an increased interstitial fluid pressure. They indicate the use of peripheral washout as non invasive criteria of malignancy in practice.