

6 Diskussion

Die Entwicklung der MR-Technik in den letzten Jahren hat dazu geführt, daß sehr schnelle 3D-Sequenzen mit guter Auflösung zur Verfügung stehen, die eine MR-Angiographie des arteriellen Gefäßsystems nach bolusartiger Injektion eines niedermolekularen Gadoliniumhaltigen Kontrastmittels (first pass 3D-MRA) erlauben (Prince et al., 1997). Für diese first pass MRA werden Kontrastmitteldosierungen zwischen 0,15 und 0,3 mmol Gd/kg KM verwendet. Vor allem die hohen Dosierungen über 0,2 mmol Gd/kg führen zu einer starken Verkürzung der T1-Relaxationszeit des Blutes (< 50 ms). Dies bewirkt im MR-Bild eine signal- und kontrastreiche Darstellung arterieller Gefäße. Die für die klinische first pass 3D-MRA im Menschen notwendige, kurze Meßzeit von ca 10 - 15 sec (für Hals- und Nierenarterien) bis 20 - 30 sec (Aorta, Extremitätenarterien, Koronararterien) limitiert eine weitere Steigerung der Ortsauflösung MR-angiographischer Techniken, so daß morphologische Details der Gefäßwand im Vergleich zur konventionellen Röntgenangiographie noch immer weniger gut dargestellt werden (Kessler et al., 1999). Zudem muß mittels einer Kreislaufzeitbestimmung der optimale Zeitpunkt für den Start der Messung nach Kontrastmittel-Injektion bestimmt werden. Alternativ kann bei reduzierter örtlicher Auflösung eine zeitaufgelöste MRA ohne vorherige Kreislaufzeitbestimmung durchgeführt werden. Eine Darstellung des venösen Systems im Rahmen eines Kontrastmittel-Bolus gelingt nur mit eingeschränkter Aussagekraft, da das niedermolekulare Kontrastmittel schnell extravasiiert. Dies führt zu einem reduzierten Venen-Gewebe-Kontrast.

In tierexperimentellen und klinischen Studien wurde bereits die Effektivität verschiedener Blood-pool-Kontrastmittel demonstriert. Durch die lange Verweildauer im Gefäßsystem und eine geringe oder fehlende Extravasation entsteht ein Equilibrium mit langanhaltendem Gefäß-Gewebe-Kontrast. Mit der hierdurch ermöglichten längeren Meßzeit kann eine 3D-MRA mit höchstmöglicher örtlicher Auflösung durchgeführt werden. Zudem ist hierbei eine Kreislaufzeitbestimmung nicht notwendig. Falls neben einer ersten Messung ergänzende MR-angiographische Messungen notwendig sind, können diese innerhalb der Bluthalbwertszeit der Substanz problemlos durchgeführt werden, so daß keine weitere Injektion vonnöten ist. Ein ideales Kontrastmittel für die MRA sollte jedoch neben seinen Equilibriumeigenschaften als Blood-pool-Kontrastmittel auch die Möglichkeit für eine first pass 3D-MRA bieten. Somit wären neben höchstauflösenden Messungen während der Equilibriumphase auch z.B. zeitaufgelöste bzw. funktionelle Untersuchungen während und unmittelbar nach dem first

pass möglich um z.B. ausschließlich das arterielle Gefäßsystem zu dokumentieren. Allerdings wurde in keiner der bislang zum Thema Blood-pool-Kontrastmittel für die MRA vorgestellten experimentellen oder klinischen Studien die entsprechende Substanz mit einem konventionellen niedermolekularen Kontrastmittel bezüglich ihrer Eignung für die first pass 3D-MRA verglichen. In Vergleichen zwischen niedermolekularen Substanzen und Blood-pool-Kontrastmitteln wurde jeweils lediglich ein Vergleich bezüglich der Gefäßdarstellung in der Equilibriumphase vorgestellt (Lin et al., 1997; Engelbrecht et al., 1998; Lauffer et al., 1998; Saeed et al., 1998).

Neben der Qualität der angiographischen Bildgebung ist bei der Entwicklung und Beurteilung eines neuen Blood-pool-Kontrastmittels auch dessen Anreicherungsverhalten im Organismus und Metabolisierung von Bedeutung. Eisenhaltige superparamagnetische Kontrastmittel reichern sich je nach ihrer Art in Zellen und Organen des mononukleären Phagozytosesystems an (Saini et al., 1987; Weissleder et al., 1989b; Weissleder et al., 1989c). SPIO sind aufgrund ihrer Größe dann bevorzugt in Leber und Milz, USPIO hingegen zusätzlich im Knochenmark und Lymphknoten anzutreffen. Je nach diagnostischer Fragestellung wird man dann dem entsprechenden Kontrastmittel den Vorrang geben. Die Eisenpartikel liegen nach Phagozytose durch Makrophagen in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit intrazellulär einzeln oder zu mehreren Teilchen aggregiert im Zytoplasma vor (Guimaraes et al., 1994). In Lysosomen werden sie dann teilweise abgebaut (Weissleder et al., 1989a; Weissleder et al., 1990; Hamm et al., 1992) und das Eisen wieder dem Körperstoffwechsel zugeführt (McLachlan et al., 1994; Schulze et al., 1995; Moore et al., 1997). Es gibt allerdings nur wenige Untersuchungen über die zeitliche Abbaucharakteristik von intravenös verabreichten eisenhaltigen Kontrastmitteln und deren Anreicherung in Organen, die nicht zum MPS gehören. Für die neue Substanzklasse der VSOP liegen diesbezüglich noch keine Untersuchungen vor. Daher ist die histologisch-pathologische Beurteilung der wichtigsten Organe, vor allem aber aufgrund der vorrangigen Eisenanreicherung von Leber und Milz bedeutsam. Da von den VSOP aufgrund ihrer Struktur sowohl hochwertige T1-gewichtete Angiogramme sowie T2-gewichtete Aufnahmen von Leber und Milz zu erwarten sind, ist aber auch das Abbauverhalten der Partikel zu berücksichtigen. So können mit einer Injektion von VSOP-C63 zum einen Aussagen über das Gefäßsystem und zum anderen über die Organstruktur von Leber und Milz gemacht werden. Hierbei müssten eventuell noch vorhandene Eisenkonzentrationen in der Leber von vormals durchgeführten Untersuchungen berücksichtigt werden.

6.1 Magnetresonanztomographische Untersuchungen

6.1.1 *Abhängigkeit der Signalgebung von der Dosis*

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vertreter einer neuen Generation von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (VSOP-C63) hinsichtlich der Effektivität für die 3D-MRA sowohl im first pass als auch in der Equilibriumphase getestet. Mit einer zeitoptimierten Technik gelingt mit VSOP-C63 nach Bolusinjektion von 45 $\mu\text{mol Fe/kg}$ eine gleichermaßen signalreiche Darstellung der Aorta an der Ratte wie nach Injektion von 0,2 mmol Gd/kg (Magnevist[®]). Dies ist auf die günstigen magnetischen Eigenschaften dieser neuartigen Partikel zurückzuführen. Von allen SPIO-Präparationen, die bislang in der klinischen oder experimentellen Testung sind, weist VSOP-C63 bei einer Feldstärke von 0,47 T mit 1,3 das niedrigste R2/R1-Verhältnis auf, im Gegensatz zu z.B. PEG-Ferron[®] mit einem R2/R1-Verhältnis von 1,75 (Saeed et al., 1998). Je niedriger das R2/R1-Verhältnis bei gleichzeitig hohem R1 ist, umso stärker ist der resultierende signalsteigernde Effekt in MR-angiographischen Techniken.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß die starke T1-Relaxationszeitverkürzende Wirkung der VSOP-C63 in Verbindung mit ihrer langen Bluthalbwertszeit bereits bei vergleichsweise geringen Dosierungen (45 $\mu\text{mol Fe/kg KG}$) zu einer langanhaltenden kontrastreichen Darstellung der Gefäße führt. An Ratten konnte gezeigt werden, daß auch kleinste Gefäße wie z.B. Nierenarterien mit hoher Detailgenauigkeit abgebildet werden.

Aus den angiographischen Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde für die Blut-Halbwertszeit an der Ratte eine Dosisabhängigkeit gefunden. Dies ist ein bekannter Effekt, der in der Vergangenheit für verschiedene Partikelsysteme bereits demonstriert wurde.

Diese ersten experimentellen Ergebnisse mit dieser neuen Generation von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln für die MR-Angiographie sind sehr vielversprechend. Weiterführende Studien sind notwendig um zu untersuchen, ob sich VSOP-C63 hinsichtlich der Größe und der physikalischen (Relaxivitäten) und biologischen (Blut-

Halbwertszeit, Verträglichkeit) Eigenschaften für die MR-Angiographie noch weiter optimieren läßt.

6.1.2 Signalintensität von Leber und Milz im Verlauf der Zeit

6.1.2.1 Kontrolltiere

Die Messungen der SI der Milz der Kontrolltiere in den Phantomen zeigt eine Abhängigkeit von der Körpermasse, bzw. dem Alter der Tiere (s.Tab. 1). Da die mit Kontrastmittel behandelten Tiere je nach Gruppe eine zeitliche und somit altersabhängige Differenz zu den leichteren und jüngeren Tieren der Gruppe K aufwiesen, wurden zwei weitere Kontrollgruppen untersucht. Da die Gruppe K mit einem schwereren, bzw. älteren Tier (s. Abb. 16) nicht einheitlich war, wurde als repräsentative Gruppe für junge Tiere (s. Tab. 1) mit einheitlichen Körpermassen die Kontrollgruppe K0 zur genaueren Charakterisierung der SI eingesetzt. Um einen entsprechenden Vergleich zu den Kontrastmitteltieren in Gruppe E (Zeitpunkt 56 Tage post injectionem) zu ermöglichen, wurde die Kontrollgruppe K56 mit ebenfalls relativ einheitlichen Körpermassen herangezogen. Da kein signifikanter Unterschied zwischen K und K0 besteht, ist eine Differenzierung zwischen diesen beiden Gruppen nicht nötig und die ermittelten SI können maßgeblich für junge Tiere angesehen werden. Dies gilt für beide verwendeten Sequenzen.

- Leber

Mit der Erhöhung der Körpermasse von durchschnittlich 170 g auf 450 g in 2 Monaten ist in der Leber ein nicht signifikanter Anstieg der SI zu vermerken. Dies könnte durch eine altersbedingte Fetteinlagerung in das Leberparenchym bedingt sein. Fett stellt sich sowohl in T1- wie auch in T2-gewichteten Aufnahmen hell dar (Köchli und Marincek, 1998). Die Signalgebung der Leber kann aber in den bei dieser Arbeit untersuchten Altersklassen unabhängig von der Körpermasse der jeweils untersuchten Tiere angegeben werden. Damit ist auch der direkte Vergleich mit Tieren denen Kontrastmittel verabreicht worden ist möglich.

- Milz

Mit dem zeitlichen Unterschied von 2 Monaten ist in der Milz der Kontrolltiere ein signifikanter SI-Verlust zu beobachten. Es kommt durch zunehmende Speicherung von körpereigenem Eisen zu einer deutlich sichtbaren Schwärzung der Milzen im Phantom. Der Zusammenhang zwischen dem Alter und der Menge an gespeichertem Eisen konnte durch die

histologische Aufarbeitung bestätigt werden (siehe 7.2). Bei den MRT-Untersuchungen der Milz muß bei der Beurteilung der Signalgebung, bzw. bei der Signalreduktionsänderung beim Einsatz superparamagnetischer Kontrastmittel daher das Alter, bzw. die damit verbundene Körpermasse des Tieres dringend mit berücksichtigt werden.

6.1.2.2 Kontrastmitteltiere

Von den ausgewählten Meßzeitpunkten nach Kontrastmittelapplikation kommt es zum ersten Meßzeitpunkt von 24 h post injectionem sowohl in der Leber als auch in der Milz zu einer maximalen Signalreduktion durch Aufnahme der im Körper zirkulierenden Kontrastmittelteilchen durch das mononukleäre Phagozytosesystem.

- Leber

Die durch die Eisenaufnahme verursachte Signalreduktion des Leberparenchyms ist 24 h post injectionem am größten, d.h. bis zu diesem Zeitpunkt ist die Phagozytose der Teilchen in die Kupfferschen Sternzellen abgeschlossen, da keine weitere Anreicherung mehr stattfindet.

Elste (1996) stellte bei der intravenösen Verabreichung von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln bereits nach vier Stunden eine maximale SI-Reduktion in Leber und Milz fest. Eine andere Studie führte zu dem Ergebnis, daß bereits nach 30-45 Minuten Eisenteilchen in der Leber nachweisbar waren und daß 24 h nach Kontrastmittel-Applikation der ermittelte Eisengehalt nur noch 47% von der Eisenmenge, die 1 h p.i. gemessen wurde, betrug (Majumdar et al., 1989). Da der erste MRT-Untersuchungstermin 24 h nach Kontrastmittel-Injektion angesetzt war, können erst ab diesem Zeitpunkt bezüglich der stattgefundenen Eisenanreicherung konkrete Aussagen gemacht werden. Bei den angiographischen Untersuchungen ist jedoch bereits nach dem ersten Meßzeitpunkt 3 min p.i. mit dem höchsten S/N zu erkennen, daß die SI in den Gefäßen allmählich absinkt (s. Abb. 4). Die kontinuierliche Abnahme und die ermittelte HWZ der intravasalen SI von 37 ± 5 min bei einer Kontrastmittel-Dosis von 60 $\mu\text{mol Fe/kg}$ Körpermasse gibt jedoch einen indirekten Hinweis auf den Verbleib des injizierten Kontrastmittels. Da nach dieser Zeit nur noch die Hälfte des ursprünglichen intravasalen Signals zu messen war, kann daraus geschlossen werden, daß bereits ein Teil des Kontrastmittels das Gefäßbett verlassen hat und von den spezifischen Organen des MPS aufgenommen wurde.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist bereits 48 h post injectionem die Signalreduktion nicht mehr so stark ausgeprägt wie nach 24 h, die Leber erscheint heller. Dies kann nur durch eine Verringerung der Eisenteilchen verursacht worden sein, also eine Freigabe des vormals angereicherten Eisens über das Blut in den Körperstoffwechsel. Im Verlauf der untersuchten zwei Monate kommt es zu einer stetigen Zunahme der SI, die Leber wird durch den Abbau des Eisens immer heller. Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach 56 Tagen ergibt die Messung aber trotz kontinuierlichem Anstieg der SI immer noch einen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren. Da, wie bei den Kontrolltieren aufgeführt wurde, keine gewichts-, bzw. altersabhängigen Vorgänge in der Leber hinsichtlich der Signalgebung berücksichtigt werden müssen, ist die verbleibende Schwärzung der Leber maßgeblich auf das bis zu diesem Zeitpunkt noch vorhandene, nicht restlos verstoffwechselte Eisen des Kontrastmittels zurückzuführen. Die durch die MRT-Untersuchung dargelegte kontinuierliche Abnahme des Kontrastmittel-Eisens korrespondiert mit den histologischen Messungen (7.2). Dies weist darauf hin, daß sich die signalgebenden Eigenschaften des in die Leber eingelagerten Eisens im Untersuchungszeitraum nicht wesentlich ändern.

- Milz

Auch in der Milz ist 24 h nach Kontrastmittel-Injektion die Eisenaufnahme abgeschlossen, das Organ stellt sich mit maximaler Signalreduktion dar. Weitere 24 h später ist es auch hier zu einer Verringerung der aufgenommenen Eisenmenge mit folglich SI-Erhöhung gekommen. Nach einer Woche gleichen die Werte der SI denen der gewichtsmäßig vergleichbaren Kontrolltiere, es befindet sich folglich kein Kontrastmittel-Eisen mehr in der Milz oder hat infolge der intrazellulären Verstoffwechslung keine Spinell-Struktur mehr, die für die superparamagnetischen Eigenschaften des Kontrastmittels verantwortlich ist. Die Ursache hierfür liegt in der speziellen oktaedrischen Anordnung der Eisenatome und zwei- und dreiwertigen Sauerstoffatome in den Kontrastmittel-Teilchen. Sie liegen in ihrem Kristallgitter in der sogenannten Spinellstruktur vor, welche die Fähigkeit zur Relaxationszeitverkürzung besitzt. (Fahlvik et al., 1993). Geht die Spinell-Struktur nach Phagozytose des Kontrastmittel-Partikels durch intrazelluläre Zerlegung verloren, so schwindet auch der starke Signaleffekt des Kontrastmittels, das Eisen ist aber weiterhin mit histologischen Färbungen darstellbar. Die morphometrische Eisenerfassung wurde erst dann durchgeführt, wenn sich bei der semiquantitativen Beurteilung "viel" Eisen in der Milz ergab. Da dies zu diesem Zeitpunkt nicht der Fall war, kann morphometrisch nicht überprüft werden, ob sich zwar noch Eisen in der Milz befand, im MRT allerdings nicht mehr signalgebend war.

Anhand der semiquantitativen Beurteilung (s. Tab. 7) liegt jedoch der Schluß nahe, daß tatsächlich kein Kontrastmittel-Eisen mehr nach einer Woche post injectionem vorhanden ist. Weiterhin spricht auch der Vergleich mit der Leber dafür, in der auch nach zwei Monaten noch signalgebendes Kontrastmittel-Eisen vorhanden ist, auch wenn die Abbauprozesse in den Kupfferschen Sternzellen langsamer vonstatten gehen als in den Makrophagen der Milz (Liebich, 1993). In die Blutbahn injiziertes Kontrastmittel wird somit innerhalb 24 h durch die Filtertätigkeit der Milz in den Makrophagen der roten Milzpulpa gespeichert und nach und nach wieder dem Stoffwechsel zugeführt, bis nach 1 Woche kein Kontrastmittel-Eisen mehr in der Milz anzutreffen ist. Wenn man berücksichtigt, daß der Gesamtkörpergehalt an Eisen bei einer 200 g schweren Ratte ca. 14 mg beträgt und nur 2,9-10% eines injizierten eisenhaltigen Kontrastmittels von den Makrophagen der Milz abgefangen werden (Majumdar et al., 1988; Majumdar et al., 1989; Majumdar et al., 1990; Reimer und Tombach, 1998), sind bei der in dieser Untersuchung verwendeten Dosis nur 19,5-66,9 µg an Eisen zusätzlich aufgenommen worden. Dies entspricht nur 0,13-0,47 % vermehrtes Eisen in der Milz durch das Kontrastmittel. Nun stellt sich die Frage, ob die Eisenoxidteilchen abgebaut und das Eisen dem Körperstoffwechsel zugeführt wurde, oder ob die kompletten Teilchen wieder in den Blutkreislauf abgegeben wurden und eventuell umverteilt worden sind. Sollte dies der Fall sein, so müßte bei erneuter Passage der Leber ein Abfall der SI zumindest in der empfindlichen T2GRE-Sequenz zu bemerken sein. Dieses trifft jedoch nicht zu.

Wie bereits bei den Kontrolltieren erläutert und auch in der Histologie deutlich wird, kommt es mit zunehmender Körpermasse, bzw. mit zunehmendem Alter zu einer physiologischen Eisenspeicherung in der Milz, die auch hier bei den Meßzeitpunkten nach einem und zwei Monaten wiederum zu einer Signalreduktion führt. Die SI der Kontrastmitteltiere entspricht nahezu denen der Kontrolltiere aus Gruppe K56, es besteht kein signifikanter Unterschied.

6.1.3 Beurteilung der Signalintensität der beiden verwendeten Sequenzen zur Veranschaulichung der Eisenanreicherung

Eisenhaltige Kontrastmittel werden in der klinischen Diagnostik u.a. zur Detektion von Leberläsionen eingesetzt und stellen ein großes Forschungsgebiet im Tumorstaging, bzw. in der Lymphographie dar. Hierbei ist von wesentlicher Bedeutung, daß intakte Organe, z.B. Lymphknoten, durch das mononukleäre Phagozytosesystem injizierte Eisenpartikel einlagern. Es wird davon ausgegangen, daß bei Tumoren dieses System nicht mehr funktioniert und

somit eine Abgrenzung dieses Gebietes durch die fehlende Eisenspeicherung in den Makrophagen sichtbar gemacht werden kann. In der MRT-Bildgebung muß daher mit optimalen Sequenzen bezüglich der Empfindlichkeit und Genauigkeit gearbeitet werden, um eine möglichst präzise Aussage über die Eisenoxidpartikelanreicherung zu ermöglichen. Wie bereits in früheren Dissertationen zur Charakterisierung von eisenhaltigen Kontrastmitteln beschrieben, wurden auch in dieser Arbeit die MRT-Untersuchungen mit einer Protonendichte-betonten Spin-Echo-Sequenz (PDSE) und einer T2-gewichteten Gradientenecho-Sequenz (T2GRE) durchgeführt. Die T2GRE-Sequenz zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität gegenüber Eisenoxidpartikeln aus, so daß bereits geringe Mengen solcher Partikel einen hohen Kontrast zur Umgebung verursachen, jedoch bei starker Anreicherung zu Überkontrastierung führen können. Dies kann z.B. in Lymphknoten zu einer homogenen Kontrastierung vorhandener Anreicherungsdefekte und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen (Tanoura et al., 1992; Taupitz et al., 1993). Hier führt die Kontrastmittelgabe zu einem starken homogenen Signalverlust über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg. Weiterhin führt sowohl eine Dosisverringerng zu keiner Besserung der Aussagefähigkeit, d.h. zu keiner nennenswerten SI-Erhöhung als auch eine Erhöhung der Dosis, da keine weitere Signalreduktion erfolgt (Elste, 1996; Krietsch, 1998; Schnorr, 1998; Schnorr, 1999). Dies spricht für ein schmales Dosispektrum dieser Sequenz (Taupitz et al., 1996).

Da bei dieser Arbeit nicht der Vergleich der Kontrastierung, bzw. das Anreicherungsverhalten bei unterschiedlichen Dosierungen sondern das Signalverhalten einer Dosis über einen bestimmten Zeitraum beurteilt werden soll, spielt dies hier eine geringe Rolle. Da im besonderen die Fragestellung nach dem Abbau der Partikel von Interesse ist, wird die Verwendung der T2GRE-Sequenz für eine genauere Aussage sinnvoll. Denn sie ermöglicht gerade bei wenigen Partikeln noch eine gute Kontrastierung und macht somit auch die Aufnahme geringer Eisenmengen im MRT-Bild sichtbar. Daher wird die Signalgebung im Zusammenhang mit der Histologie beurteilt. Die PDSE-Sequenz dagegen wird aufgrund ihrer guten Ortsauflösung und der ausreichenden Empfindlichkeit gegenüber SPIO als optimale Methode für die MR-Lymphographie angesehen (Hamm et al., 1992; Taupitz et al., 1993; Krietsch, 1998; Taupitz et al., 1996), obwohl bei geringerer Kontrastierung der Unterschied zu Lymphknoten ohne Kontrastmittel kaum noch erkennbar wird. Bei den vorliegenden MRT-Messungen wurden keine Lymphknoten untersucht, es sind aber trotzdem diese beiden Sequenzen gewählt worden, da es sich bei der Leber und Milz ebenfalls um Organe mit mononukleärer phagozytotischer Kompetenz handelt. Sie sind bekannt als typische

Anreicherungsorte für phagozytierte Eisenoxidpartikel. Die Sequenzen wurden einander gegenübergestellt, um eine Kontrolle über den Verlauf der Verstoffwechslung dieser Partikel und ergänzende Informationen zu erhalten. Sowohl in der Leber, als auch in der Milz weisen die Messungen bei beiden Sequenzen den gleichen zeitlichen Verlauf auf. Somit konnte die Abbaucharakteristik der Kontrastmittel-Teilchen bestätigt werden. Mit der T2GRE-Sequenz wurden aufgrund ihrer höheren Empfindlichkeit stärkere Signalreduktionen und größere Streuungen der Meßwerte ermittelt als bei der PDSE-Sequenz.

6.2 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen erfolgten anhand der HE-Färbung zur Beurteilung der Zellstruktur hinsichtlich Abweichungen von der Norm oder pathologischen Veränderungen. Die TB-Färbung wurde durchgeführt, um einen Aufschluß über den Verbleib des Kontrastmittel-Eisens zu erhalten. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Leber und die Milz, die zum einen aufgrund des typischen Anreicherungsverhaltens von Eisenoxidpartikeln die Organe sind, in denen das meiste Kontrastmittel-Eisen aufgenommen wird. Zum anderen ist die Leber in ihrer Funktion als Stoffwechselorgan unter anderem an der Phagozytose, Entgiftung und Ausscheidung von Stoffen beteiligt, während die Milz als Blutfilter und –speicher, Ort der Verstoffwechslung der Erythrozyten und des Eisens, Reifung von Makrophagen und als Organ der Immunantwort zu betrachten ist. Es wurde in allen untersuchten Proben weder Veränderungen an den jeweiligen Organen noch Veränderungen hinsichtlich Struktur und Menge von Leukozyten und Makrophagen sichtbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß eine Injektion des Blood-pool-Kontrastmittels VSOP-C63 mit einer Dosis von 60 µmol FE/kg KM zu keinerlei sichtbaren äußeren und innerlichen makroskopischen, sowie mikroskopischen Abweichungen kommt und als gut verträglich eingestuft werden kann.

6.2.1 Eisenanreicherung in den Organen

6.2.1.1 Kontrolltiere

In den untersuchten Organen der Kontrolltiere sind, wie im Ergebnisteil dargestellt, geringe Mengen an Eisen anzutreffen, wobei in der Leber und im Herzen nichts nachzuweisen war. Da diese Tiere kein Kontrastmittel erhalten haben muß es sich um Eisen handeln, das im

physiologischen Rahmen des Eisenstoffwechsels gespeichert wurde. Da bei den histologischen Untersuchungen von Lunge, Herz und Nieren nur Organproben von jungen Tieren zur Verfügung standen, sollen diese Ergebnisse auch nur für diese Altersklasse als repräsentativ gesehen werden. In der Leber wurde weder bei jungen (Gruppe K), noch bei alten Tieren (Gruppe K56) Eisen nachgewiesen. Weiterhin sei nochmals erwähnt, daß sich in jeder Milz Eisen nachweisen läßt und die jeweilige Menge vom Alter der Tiere abhängt, was in dieser Arbeit deutlich wird.

Bei den im Rahmen der Entwicklung von VSOP-C63 bereits vorher an weiteren Kontrollratten durchgeführten histologischen Beurteilungen können die oben genannten Ergebnisse bestätigt werden. Bei diesen Vorversuchen kamen auch Organproben älterer Tiere (durchschnittliche Körpermasse von 446 g) zur Begutachtung. Bei diesen Tieren war histologisch Eisen in der Milz, teilweise auch in der Lunge und den Nieren nachzuweisen. Semiquantitativ wurde der Eisengehalt mit "nichts", oder "vereinzelt" beurteilt, d.h. pro Organschnitt waren immer nur vereinzelte Zellen blau angefärbt. Zusammen mit weiteren veröffentlichten Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß bei der Ratte mit zunehmendem Lebensalter auch in anderen Organen Eisen in geringer Menge gespeichert wird (Casale et al., 1981; Massie et al., 1983).

6.2.1.2 Kontrastmitteltiere

Entsprechend dem Verhalten superparamagnetischer Kontrastmittel ist nach der Injektion von VSOP-C63 in der **Leber** bei allen Tieren jeder Gruppe (siehe auch Abbauverhalten) Eisen nachzuweisen, welches intrazellulär in den Kupfferschen Sternzellen vorliegt. Das Kontrastmittel scheint darüber hinaus eine Affinität zu den Endothelzellen der Lebergefäße zu besitzen, was auch schon in der oben erwähnten Vorstudie beobachtet wurde. Hierbei ist schwer zu unterscheiden, ob das Kontrastmittel in die Zelle aufgenommen wurde oder außen an der Zelle anliegt. Entgegen früherer Lehren, die das MPS noch retikuloendotheliales Phagozytosesystem nannten, geht man heute davon aus, daß Endothelzellen keine phagozytotischen Eigenschaften besitzen. Arweiler (1993) hat bei Menschen im Zytoplasma von Zellen des MPS ein eisenbindendes Protein nachgewiesen, welches vornehmlich an Endothelzellen und Makrophagen der Lymphknoten gebunden sein soll. Man könnte hier die These aufstellen, daß bestimmte Strukturen an Gefäßendothelien auch zu einer Anlagerung von VSOP-C63 führen. Man kann eine tendenziell stärkere peripherolobuläre Speicherung

beobachten, während um die Zentralvenen herum die Speicherung geringer ausfällt. Man kann daher den Schluß ziehen, daß die Kapazität der peripheren Makrophagen durch die applizierte Dosis noch nicht überschritten wurde. Da das Kontrastmittel über die Gefäßtrias in das Lebergewebe angeflutet wird, ist verständlich, weshalb in diesen Bereichen die stärkste Blaufärbung zu verzeichnen ist.

In den übrigen Organen läßt sich tendenziell eine stetige Zunahme des histologisch anfärbbaren Eisens im Laufe der Zeit beschreiben. Sehr kleine Kontrastmittel-Teilchen, die aufgrund ihrer Größe nicht sofort vom MPS herausgefiltert werden und deshalb eine längere Verweildauer im Blut haben, können extravasieren und anschließend im Bindegewebe bis in die Lymphknoten verfolgt werden (Weissleder et al., 1989c; Weissleder et al., 1990; Bengel et al., 1994; Reimer und Weissleder, 1996). Da es sich bei den monomer ummantelten Teilchen des VSOP-C63 um sehr kleine Teilchen mit einer langen Blut-Halbwertszeit handelt, ist der bisher noch nicht untersuchte Vorgang der Extravasation und das anschließende Vorkommen im Bindegewebe zu erwarten. Untersuchungen mit radioaktivem Fe-59 zur Bestimmung der Organaufnahme und Biodistribution von superparamagnetischen Eisenoxiden in Abhängigkeit von der Dosis des injizierten Eisens und der Größe der Kontrastmittel-Teilchen zeigten außer in Leber und Milz auch Kontrastmittel-Eisen in Lunge, Nieren und Herz (Majumdar et al., 1988; Majumdar et al., 1990). Da es sich bei den vorliegenden Befunden um eine völlig neue Substanzklasse von Blood-pool-Kontrastmitteln handelt, liegen noch keine vergleichbaren Ergebnisse vor.

6.2.1.3 Vergleich von Kontrolltieren und Kontrastmitteltieren

In allen untersuchten Kontrolltieren (sowohl in dieser Studie die jungen Tiere der Gruppe K, als auch die alten Tiere der Vorversuche) ist Eisen in der **Lunge** nachweisbar, es kommt bei diesen Tieren bis zu einem bestimmten Prozentsatz in physiologischer Weise vor. Übereinstimmend mit Majumdar et al. (1988; 1990) ist nach Kontrastmittel-Injektion auch Kontrastmittel-Eisen in der Lunge anzutreffen, es scheint zu einem initialen Anstieg des Eisens innerhalb 24 h zu kommen, welches daraufhin wieder in unbekanntem Maße verstoffwechselt wird, um erneut mit zunehmendem Alter anzusteigen (s. Abb. 18). Auch in den **Nieren** läßt sich sowohl bei jungen Kontrolltieren der Gruppe K und den alten Kontrolltieren der Vorversuche vereinzelt Eisen nachweisen. Nach Kontrastmittel-Applikation scheint eine vermehrte Eisenanreicherung stattzufinden (s. Abb. 20). Diese

Beobachtung deckt sich ebenfalls mit Majumdar's Untersuchungen. Auch in den Nieren kann jedoch nicht unterschieden werden, wo und in welchem Rahmen die Eisenverstoffwechslung einerseits und die altersabhängige physiologische Eisenspeicherung andererseits einsetzt. Denn nach Massie et al. (1983), der eine zunehmende Eisenkonzentration in verschiedenen Organen in unterschiedlichen Lebensabschnitten von Mäusen nachwies, zeigt gerade die Niere ein wahres Alterungsphänomen bzgl. der Eisenspeicherung. Somit kann vermutet werden, daß nach Kontrastmittel-Injektion zusätzlich zu dem schon vorhandenen Eisen Kontrastmittelpartikel eingelagert und mit zunehmendem Alter der Fe-Gehalt noch verstärkt wird. Dieses deckt sich ebenfalls mit den vorliegenden Ergebnissen. Der Eisengehalt im **Herzen** ist dagegen nicht eindeutig zu interpretieren. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kann kein Rückschluß dahingehend gezogen werden, ob sich die Eisenzunahme im physiologischen Rahmen erstreckt oder aber ob auch Kontrastmittel-Teilchen dazu beigetragen haben, da es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Kontrastmittel- und Kontrolltieren gibt. Um eine verlässliche Aussage über die Verteilung von Kontrastmittel-Eisen im Unterschied zu körpereigenem Eisen machen zu können, müßte mit Radiomarkern gearbeitet werden, da mit der histologischen Eisenfärbung diese Differenzierung nicht möglich ist. Gerade das vermehrte, bzw. erstmalige Auftreten von Eisen in Lunge, bzw. Herz sind ohne diese Methode schwer zu beurteilen. Wie bereits erwähnt, muß mit berücksichtigt werden, daß mit steigendem Lebensalter eine Erhöhung der Eisenmenge in vor allem Herz und Niere zu erwarten ist. So könnte das erstmalige Auftreten im Herzen der Tiere ein und zwei Monate nach Kontrastmittel-Applikation (Gruppen D und E) darauf zurückzuführen sein. Andererseits kann auch, da die Kontrolltiere negativ waren, die Kontrastmittel-Injektion nur bei diesen vier Tieren zu einer Speicherung geführt haben und somit altersunabhängig sein. Bei der Durchsicht der Ergebnisse der Eisenanreicherung in den verschiedenen Organen sind keine Individuen aufgefallen, die sich durch eine womöglich erhöhte Disposition zur Eisenspeicherung ausgezeichnet haben.

Angesichts der bei dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen können noch keine endgültigen Aussagen über den Verbleib des Kontrastmittel-Eisens in den hier nicht untersuchten Organen getroffen werden. Unter Berücksichtigung der Sektionsbefunde bei der Organentnahme und der histologischen Aufarbeitung und Beurteilung derselben kann davon ausgegangen werden, daß VSOP-C63 eine gut verträgliche Substanz ist, bei der mit keinerlei pathologischen Veränderungen in dieser Dosis gerechnet werden muß. Die hier verwendete klinische Dosis von 60 µmol Fe/kg KM (dies entspricht 0,3 mg Fe/kg) ist jedoch sehr gering,

gemessen am Gesamteisengehalt des Körpers mit ca. 70 mg Fe/kg. Die routinemäßig in der Veterinärmedizin eingesetzten Eisendextrane zur Therapie der Eisenmangelanämie der Ferkel werden in einer über hundertfachen Dosis angewendet. Weissleder et al. (1989a) zeigten selbst bei einer maximalen Dosis von 3000 µmol Fe/kg KM (dies entspricht 0,17 g Fe/kg) keine Anzeichen von toxischen Auswirkungen. Somit reiht sich dieses neue Blood-pool-Kontrastmittel in die durchgeführten Untersuchungen von Magnetiten im allgemeinen und SPIO im besonderen ein, die als untoxisch einzustufen und im allgemeinen gut verträglich sind (s. auch Kapitel 3.4.3).

6.2.2 Semiquantitative und morphometrische Bestimmung des Eisengehaltes in Leber und Milz und der Zusammenhang zur Bildgebung im Magnetresonanztomographen

Einfluß der Menge des Kontrastmittel-Eisens auf die Bildgebung der Milz

Alle Tiere unter 280 g Körpermasse in der Kontrollgruppe K, K0 und bis 1 Woche nach Gabe von VSOP-C63 (Gruppen A, B und C) weisen untereinander bezüglich des semiquantitativ beurteilten Eisengehaltes zwar keine signifikanten Unterschiede auf, zeigen aber eine unterschiedliche prozentuale Verteilung (s. Tab. 7).

Beim Vergleich der Tiere aus Gruppe K und K0 mit Gruppe C (1 Woche post injectionem) ist trotz durchschnittlicher Zunahme der Körpermasse von 32,6 g weder histologisch noch hinsichtlich der SI im MRT ein signifikanter Unterschied auszumachen. Die Gruppen A und B repräsentieren den Zeitraum von 24 h bzw. 48 h post applicationem, in dem in der MRT-Bildgebung die Kontrastmittel-verursachte SI-Reduktion hervorgerufen wird. Die statistisch hinsichtlich signifikanter Unterschiede in diesem Probenumfang zwar unrelevante, prozentual dagegen ersichtliche Veränderung zugunsten vermehrten Eisenaufkommens in Gruppe A und B muß somit durch die Speicherung von Kontrastmittel-Eisen verursacht worden sein. Auch wenn der Zusammenhang nicht nachgewiesen werden kann, so ist doch die semiquantitative Eisenbestimmung ein indirekter Hinweis auf die SI im MRT und die damit verbundene Eisenmenge. Die geringfügige Menge an zusätzlich aufgenommenem Kontrastmittel-Eisen in Gruppe A und B muß daher für den starken Signalverlust in dieser Zeit verantwortlich sein. Das Kontrastmittel-Eisen verursacht hier also zu dieser Zeit in bereits geringen Mengen eine

wesentlich stärkere Signalreduktion als das mengenmäßig wesentlich stärker eingelagerte körpereigene Eisen bei Tieren mit über 280 g Körpermasse. Dies zeigt sich auch beim Vergleich der histologischen Eisenbeurteilung und der maximalen Signalreduktion 24 h post injectionem und den Gruppen E und K56, da hier kein signifikanter Unterschied in der Signalgebung besteht. Die Ursache hierfür liegt in der bereits erwähnten Spinell-Struktur. Das semiquantitativ im prozentualen Vergleich zu Gruppe B vermehrte Eisenaufkommen in Gruppe C kann mit der beginnenden physiologischen Eisenspeicherung erklärt werden, die in diesem Umfang noch keinen Einfluß auf die MRT-Bildgebung hat. Junge Tiere haben aufgrund ihres höheren Stoffwechselgeschehens im Zuge des Wachstums und der Differenzierung noch keinen Eisenüberschuß, der später dazu führt, daß das nicht benötigte Eisen unter anderem in der Milz gespeichert wird.

Zusammenhang der Signalintensität und der Eisenmenge im Stoffwechselgeschehen

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann nach der Injektion des Blood-pool-Kontrastmittel VSOP-C63 davon ausgegangen werden, daß infolge der Stoffwechsellage der jungen Tiere (s. Tab. 1) das angereicherte Kontrastmittel-Eisen in der Milz im Verlauf einer Woche wieder freigesetzt und den Aufbauprozessen des Körpers zur Verfügung gestellt wurde. Abgebautes Eisen geht zu 90 % wieder in den Stoffwechsel ein, so daß der Körper nur noch so viel Eisen aus der Nahrung aufnehmen muß, wie er zusätzlich benötigt, bzw. durch den Verlust über Kot und Harn ausgleichen muß (Bronsch, 1976). Das durch die Kontrastmittel-Injektion erzeugte Überangebot an Eisen könnte somit eine herabgesetzte Eisenresorption aus dem Darm zur Folge gehabt haben, da das in der Wachstumsphase der jungen Tiere benötigte Eisen aus der Milz, bzw. dem Eisenspeicher zur Verfügung stand. Somit ist es zu einer Umverteilung des Kontrastmittel-Eisens aus der Milz gekommen. Über das Ausmaß dieser Umverteilung und erneuten Verstoffwechslung kann im Rahmen dieser Ergebnisse jedoch keine endgültige Aussage getroffen werden. Wie oben erwähnt und in Tab. 1 und Abb. 16 ersichtlich, erhöht sich die Eisenmenge in der Milz mit zunehmender Körpermasse, bzw. zunehmendem Alter. Es ist davon auszugehen, daß diese Eisenspeicherung deshalb erfolgt, weil es von der momentanen Stoffwechsellage nicht benötigt wird. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Tieren beginnt dieser Prozess der physiologischen Eisenspeicherung ab einer Körpermasse von 280 g (dies entspricht nach Charles River der Wistar-Ratten Crl:WI BR einem Alter von ca. 55 Tagen), da erst ab dieser Körpermasse bei der semiquantitativen Beurteilung die Eisenmenge als "viel" beurteilt wurde. Die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse lassen auf

eine vollständige Verstoffwechslung des injizierten Kontrastmittel-Eisens innerhalb einer Woche und eine physiologische Eisenzunahme ab einem Alter von 55 Tagen in der semiquantitativen Beurteilung schließen. Die Tiere, die das Kontrastmittel-Eisen innerhalb einer Woche nahezu vollständig verstoffwechselt haben, weisen eine durchschnittliche Körpermasse von 223 g mit dem entsprechenden Alter von ca. 48 Tagen auf und liegen somit unterhalb der ermittelten Grenze der beginnenden physiologischen Eisenspeicherung. Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß in jeder Milz – also auch unterhalb der Grenze von 280 g, bzw. einem Alter von ca. 55 Tagen- Eisen histologisch nachgewiesen werden konnte. Bei den Mengen “vereinzelt“, “wenig“ und “mittel“ kann keine Trennung zwischen dem Kontrastmittel-Eisen erfolgen und dem Eisen, welches der Körper schon im Rahmen der beginnenden physiologischen Speicherung in der Milz deponiert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß das applizierte Kontrastmittel-Eisen zu einem geringen Prozentsatz in der Milz verbleibt und bei den älteren Kontrastmittel-Tieren im Rahmen der physiologischen Eisenspeicherung mitgespeichert wird. Dieses wäre aber im Verhältnis zu der injizierten Kontrastmittel-Dosis vergleichsweise gering einzustufen, da hinsichtlich der MR-Messungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen K0 und C besteht. Auch die gerade für geringe Eisenschwankungen empfindliche T2GRE-Sequenz (s. Kap.7.1.3) läßt im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht die Vermutung zu, daß größere Mengen an Kontrastmittel-Eisen in den Eisenspeicher der Milz aufgenommen wurden.

Die morphometrische Eisenerfassung mit dem Programm Lucia erfolgte nur dann, wenn in diesen Organen mikroskopisch viel Eisen zu erkennen war. Dies traf für alle Leberschnitte in den Gruppen nach Kontrastmittel-Applikation und die Milzschnitte der schweren, bzw. alten Tiere zu.

Entsprechend der Charakteristik superparamagnetischer Kontrastmittel kommt es nach intravenöser Applikation durch die phagozytotische Aktivität der Kupfferschen Sternzellen der **Leber** zu einem signifikanten Anstieg der Eisenkonzentration im Leberparenchym. Sowohl die Anzahl wie auch der prozentuale Anteil der Eisenteilchen ist 24 h post applicationem am größten. Bei den hier gewählten Zeitpunkten läßt sich jedoch keine Aussage darüber machen, wann nach der Kontrastmittel-Applikation mit der Eisenspeicherung begonnen und wann das Maximum erreicht wurde. Der 24 h-Wert könnte somit die Momentaufnahme eines bereits vorher begonnenen Eisenoxidpartikelabbaus sein. Bei den genannten Parametern kann man nach diesem Meßzeitpunkt eindeutig eine Abnahme

registrieren. Bis 48 h, bei der prozentualen Bestimmung sogar bis eine Woche nach der Kontrastmittel-Injektion, kommt es bei den morphometrischen Messungen der Leber zu einem signifikanten Abfall der Eisenmenge, der mit der Bildgebung im MRT übereinstimmt. Dabei zeigte sich eine Zunahme der Partikelgröße von $0,7 \mu\text{m}^2$ eine Woche nach Kontrastmittel-Applikation auf $1,3 \mu\text{m}^2$ nach 1-2 Monaten. Diese intrazelluläre Aggregation deutet auf eine Umverteilung des Eisens im Zuge seiner Verstoffwechslung innerhalb des Organs hin. Man kann vermuten, daß die Verstoffwechslung und damit die Abnahme der Eisenoxidpartikel spätestens nach 24 h beginnt und eine Woche nach der Kontrastmittel-Injektion deutlich fortschreitet.

Im Gegensatz zur Milz befindet sich nach sieben Tagen immer noch Kontrastmittel-Eisen in der Leber, welches langsam abgebaut wird. Statistisch findet keine signifikante Verringerung mehr statt, die empfindliche T2GRE-Sequenz läßt jedoch einen sich fortsetzenden Abbau der Partikel erkennen. Die andauernde SI-Reduktion und die histologisch erfaßbare Menge an Kontrastmittel-Eisen kann, im Vergleich zur Milz, durch mehrere Parameter verursacht worden sein. Kontrastmittel zeigen aufgrund ihrer chemischen Struktur, Größe und auch aufgrund ihrer Ladung verschiedene bevorzugte Anreicherungsorte (Chouly et al., 1996; Roser et al., 1998). Nach Applikation von eisenhaltigen Kontrastmitteln findet sich ein Großteil der injizierten Dosis in der Leber wieder und nur ein kleiner Teil davon wird in die Milz aufgenommen. Die Angaben schwanken zwischen 57-80% für die Leber und 2,9-10% für die Milz (Majumdar et al., 1988; Majumdar et al., 1989; Majumdar et al., 1990; Reimer und Tombach, 1998). Diese Ungleichheit wird nicht durch eine unterschiedliche Organperfusion verursacht, auch wenn in beiden Organen je nach wechselnden funktionellen Anforderungen relativ große Durchblutungsänderungen auftreten können. Die Mittelwerte für die Durchblutung von Leber und Milz betragen z.B. beim Menschen $1,0 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Grothe, 1993). Es ist allgemein bekannt, daß Kontrastmittel mit negativen Ladungen ein bevorzugtes Anreicherungsverhalten in der Leber aufweisen (Speck, 2001), positiv geladene Hüllen von Kontrastmittel-Teilchen dagegen in erster Linie in der Milz phagozytiert werden (Wagner, 2001). Bisher durchgeführte MRT-Untersuchungen mit dem neuen monomer ummantelten VSOP-C63, das aufgrund der Charakteristik seiner Hülle ein negativ geladenes Teilchen ist, bestätigen die bevorzugte Anreicherung in der Leber auf Kosten der Milz (Schnorr, 2001; Wagner, 2001). Die histologischen Untersuchungen belegen, daß wesentlich mehr Eisen in der Leber als in der Milz gespeichert wurde. Aufgrund der mengenmäßig vermehrten Anreicherung des Kontrastmittel-Eisens in den Kupfferschen Sternzellen ist auch mit einer

längeren Abbauphase zu rechnen (s. Abb. 4). Hierbei ist weiterhin zu berücksichtigen, daß die Abbauphase in diesen Zellen im Vergleich zu den Makrophagen der Milz in reduzierter Form stattfinden (Liebich, 1993).

Das Alter ist ein weiterer Faktor, der bezüglich der Abbauphase von Eisenoxidpartikeln nicht unberücksichtigt bleiben darf. Zwar ist die Altersabhängigkeit der Phagozytoseaktivität in Tier und Mensch in der Literatur vielfach belegt, jedoch bislang für den Fall partikulärer Kontrastmittel nur von Schnorr et al. (2000) untersucht worden. Es wurde nachgewiesen, daß die unterschiedliche Phagozytoseaktivität von jungen und alten Tieren eines VSOP zu einer signifikanten Änderung der HWZ im Blut und der SI-Änderung in den Lebern führt. So war die Blut-HWZ älterer Tiere durch die geringere Phagozytoseaktivität bis zu drei mal länger als bei den juvenilen Tieren und entsprechend länger war auch die HWZ der SI-Reduktion durch die Aufnahme der Teilchen in die Kupfferschen Sternzellen. Daher kann auch eine länger andauernde Verstoffwechslung der inkorporierten Teilchen nicht ausgeschlossen werden. Der jugendliche Organismus hat weiterhin aufgrund seines Stoffwechselgeschehens einen höheren Bedarf an z.B. Mineralien und Spurenelementen. Eisen ist hier ein universeller Kofaktor für die mitochondriale Energiebildung und unterstützt das Wachstum und die Differenzierung aller Zelltypen. Erst mit zunehmendem Alter kommt es zu einer physiologischen Speicherung des Eisens im Organismus (Casale et al., 1981; Massie et al., 1983) und somit auch zu einem Einfluß auf den Abbau des injizierten Eisens.

Die morphometrischen Ergebnisse hinsichtlich der Menge der Eisenteilchen und dem prozentualen Eisenanteil bestätigen in ihrem Zeitverlauf die Bildgebung im MRT. Mengenmäßig findet sich zum ersten Meßzeitpunkt 24 h post injectionem das meiste Eisen in der Leber. Der signifikante Abfall innerhalb 48 h kommt in der Signalgebung im MRT nicht so deutlich zum Ausdruck, was auf die Eigenarten der Empfindlichkeit der Meßsequenzen bei großen Mengen an Eisenoxiden zurückzuführen ist (vgl. dazu Kap.7.1.3). Wie auch in Abb. 7 zeigen die morphometrischen Daten, daß zwar eine Verstoffwechslung, d.h. eine Abnahme der Eisenmenge erfolgt, diese aber nach zwei Monaten p.i. immer noch nicht abgeschlossen ist. Die Größe der Eisenteilchen bleibt bis zu einer Woche relativ konstant, um dann bis zu einem Monat nach Kontrastmittel-Injektion signifikant anzusteigen. Daraus ist zu folgern, daß es zu Umbauprozessen, bzw. einem veränderten Speichermodus in den Zellen gekommen ist, der auf die Signalgebung jedoch keinerlei Auswirkung hat. Wenn man die Partikelgröße der inkorporierten Eisenteilchen 24 h und 48 h post inject. interpretiert, können folgende Schlüsse

gezogen werden (s. Abb. 26). Die aufgenommenen Eisenteilchen zeigen mit ihren minimalsten Meßwerten entweder die Grenze der kleinsten gemessenen Partikel, oder aber das technisch bedingte untere Limit der angewendeten Meßmethode. Die größte Partikelfläche im gleichen Zeitraum kann die tatsächlich maximale Größe eines einzelnen Partikels sein, oder die max. Größe der Zelle, in der kleinere Partikel das Zytoplasma vollständig ausgefüllt haben und von dem Meßprogramm zu einem Meßpunkt zusammengefaßt worden sind. Dies ist ein in der Literatur oft beschriebenes und allgemein bekanntes Phänomen, daß die in den Lysosomen abgebauten Eisenpartikel letztlich einzeln oder zu mehreren aggregiert im Zytoplasma liegen (Weissleder et al., 1989b; Weissleder et al., 1990; Guimaraes et al., 1994). Durch die Aggregation mehrerer Eisenteilchen ist folglich die Größenzunahme zu erklären, wobei auch hier dann der Zusammenschluß mehrerer dicht beieinander liegender Zellen zu einem Meßwert berücksichtigt werden muß.

In der **Milz** kommt es, wie auch in der Leber, 24 h nach Kontrastmittel-Injektion zu einer maximalen SI-Reduktion durch die phagozytierten Eisenoxidteilchen des Kontrastmittels. Die zeitlich folgenden Untersuchungen lassen auf die Verstoffwechslung dieser Teilchen schließen.

In der Zeitspanne von sieben Tagen sind an den Milzen noch keine morphometrischen Messungen durchgeführt worden, da sich erst ab einem Monat nach Kontrastmittel-Injektion viel Eisen in der Milz befand. Es kann zusammen mit den Überlegungen auf S. 97 und 98 folglich davon ausgegangen werden, daß die nach Injektion von VSOP-C63 in der Milz gespeicherten Eisenoxidpartikel innerhalb von sieben Tagen in den Makrophagen "verdaut" werden. Somit verlieren sie ihre Fähigkeit der Relaxationszeitverkürzung und die Bestandteile wie z.B. Zitrat und Eisen können dem Stoffwechsel zugeführt werden. Da es sich bei dem hier verwendeten Kontrastmittel um eine neue Substanzklasse handelt, liegen bezüglich des Abbauverhaltens noch keine Ergebnisse vor. Vergleichend mit einer Studie zur Anreicherung und Verteilung von radioaktiv markierten Dextran-ummantelten superparamagnetischen Nanopartikeln ist bis zu 14 Tage lang immunhistochemisch Eisen in der Milz nachgewiesen worden, wobei man jedoch keinen Hinweis über das Alter der Ratten erhält (Okon et al., 1994). Dagegen ist bei dem in dieser Arbeit verwendeten VSOP-C63 bereits in der Hälfte der Zeit das Kontrastmittel-Eisen in der Milz weder im MRT bildgebend noch in der Histologie mehr nachweisbar.

Da in der Milz die morphometrischen Messungen nur durchgeführt wurden, wenn sich semiquantitativ "viel" Eisen in dem Organ befand, stehen nur die Gruppen D, E und K56 zum Vergleich an. Bezüglich des Flächenanteils und der Partikelanzahl gibt es keine signifikanten Unterschiede, die physiologische Eisenspeicherung in der Milz findet bei allen Tieren in nahezu gleichem Maße statt. Hinsichtlich der Größe der Teilchen ist jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen E einerseits sowie K56 andererseits zu bemerken. Wie bereits diskutiert wurde, ist davon auszugehen, daß es sich bei dem Eisen in den Gruppen mit den schweren, bzw. alten Tieren (Gruppe D, E und K56) um Speicherung im physiologischen Rahmen handelt und nicht um Kontrastmittel-Eisen. Es könnte jedoch sein, daß ein geringer, nicht näher bestimmbarer Prozentsatz an Kontrastmittel-Eisen nach einer Woche in der Milz verblieben ist (vgl. dazu entsprechendes Kapitel). Möglicherweise sind genau diese Partikel für die Größenverhältnisse der gemessenen Eisenteilchen verantwortlich, entweder weil sie selbst diesen Unterschied ausmachen, oder aber im Abbauprozess als eine Art Katalysator zu einer bevorzugten Aggregation von den Eisenteilchen führen (s. auch S.108).

6.2.2.1 Korrelationen zwischen Magnetresonanztomographie und Histologie

Die Korrelationskoeffizienten der histologischen Erfassung des Eisens als Partikelanzahl pro mm^2 und in Prozent der Fläche zeigen sowohl für die Leber als auch für die Milz eine starke positive Korrelation, beide Parameter sind damit vergleichbar. In der Leber bestehen darüber hinaus zwischen den magnetresonanztomographischen und histologischen Untersuchungen ebenfalls stark positive Korrelationen, daher bedeutet in diesem Organ eine starke Signalreduktion auch viel histologisch nachweisbares Eisen und umgekehrt. Da sich nach Kontrastmittel-Applikation mengenmäßig viel Eisen in den Kupfferschen Sternzellen anreichert, besteht weiterhin auch eine starke positive Korrelation zwischen den verwendeten Sequenzen der MRT-Untersuchungen. Die Unterschiede der beiden Sequenzen, vor allem der empfindlicheren T2GRE-Sequenz bei geringeren Eisenmengen kommen hier nicht zum Tragen. Die unterschiedlichen Korrelationen der Fläche des Kontrastmittel-Eisens erklärt sich wie in Kapitel 7.2.2 dargestellt in der von der Abnahme der Eisenmenge unberührten Zunahme der Fläche durch intrazelluläre Umbauprozesse, bzw. einem veränderten Speichermodus. Hier stehen kleinere Partikelgrößen für eine starke Abnahme der SI und nach 1-2 Monaten, große Partikel für eine höhere SI. In der Milz dagegen, in der sich nach Kontrastmittel-Applikation mengenmäßig nur wenig Eisen anreichert, stellt sich ein Unterschied heraus. Die T2GRE-Sequenz ist bei diesen Konzentrationen empfindlicher als die

PDSE-Sequenz, was sich mit mittleren Korrelationskoeffizienten zwischen Histologie und T2GRE und nur schwachen Korrelationskoeffizienten zwischen Histologie und PDSE-Sequenz darstellt. Daher ist auch nur ein mittlerer Korrelationskoeffizient zwischen diesen beiden Meßsequenzen zu erwarten. Bei magnetresonanztomographischen Untersuchungen der Milz nach Applikation von VSOP sollte daher einer T2GRE-Sequenz der Vorrang gegeben werden.