

Aus dem Institut für Klinische Radiologie  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter L. Heindel-

**MRT-Kontrastmittel für das Knochenmark:  
Vergleichende experimentelle Untersuchungen  
von USPIO, SPIO und Gd-DOTA**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Claudia Reinländer  
aus Essen  
2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms- Universität Münster.

Dekan: Univ.- Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-D. Richter
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Möllmann

Tage der mündlichen Prüfungen: 04.11.03; 07.11.03; 17.11.03

Aus dem Institut für Klinische Radiologie  
Der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter L. Heindel-  
Referent: Prof. Dr. med. K.-D. Richter  
Koreferent: Prof. Dr. med. M. Möllmann

### **ZUSAMMENFASSUNG**

MRT-Kontrastmittel für das Knochenmark: Vergleichende experimentelle Untersuchungen von  
USPIO, SPIO und Gd-DOTA

genehmigt durch: Bezirksregierung Münster am 14.10.1998 (Aktenz.: 23.0835.1.0 (G 43/98))

Claudia Reinländer

**Ziel:** Vergleich von SPIO, USPIO und Gd-DOTA für die MR-tomographische Beurteilung des hämatopoetischen Knochenmarkes vor und nach externer Bestrahlung: Quantifizierung der Permeabilität der Knochenmark-Sinus und der Phagozytoseaktivität der RES-Zellen.

**Methoden:** 36 Neuseeland-Kaninchen wurden MR-tomographisch vor und nach Injektion von SPIO (n=12), USPIO (n=12) oder Gd-DOTA (n=12) untersucht. In jeder Kontrastmittel-Gruppe wurden LWS und Os sacrum von jeweils 4 Kaninchen vor, nach 4 Gy und nach 12 Gy Ganzkörperbestrahlung untersucht. Pulssequenzen umfaßten T<sub>1</sub>-und T<sub>2</sub>-gewichtete Spinecho (SE)- und Turbo-SE (TSE)- sowie dynamische T<sub>1</sub>-gewichtete FLASH-Sequenzen vor und nach Kontrastmittelinjektion (p.i.). Änderungen der Signalintensitäten (SI) des Knochenmarkes wurden als  $\Delta SI(\%) = | ((SI_{\text{post}} - SI_{\text{prä}}) / SI_{\text{prä}}) \times 100\% |$  quantifiziert und mit der Histopathologie des Knochenmarkes verglichen.

**Ergebnisse:** Radiogene Endothelschäden der Knochenmark-Sinus konnten mit der dynamischen USPIO-unterstützten MRT quantifiziert und für die verschiedenen Gruppen vor und nach Bestrahlung signifikant unterschieden werden (p<0,05), nicht jedoch mit SPIO oder Gd-DOTA. Späte Postkontrast-Aufnahmen zeigten einen größeren Signalabfall des Knochenmarkes nach Injektion von USPIO im Vergleich zu SPIO, histologisch einer höheren RES-Phagozytose der USPIO entsprechend.

**Schlußfolgerung:** Die MR-tomographische Quantifizierung der Permeabilität der Knochenmark-Sinus und der RES-Phagozytoseaktivität des Knochenmarkes gelingt mit USPIO besser als mit SPIO oder Gd-DOTA.

Tage der mündlichen Prüfungen: 04.11.03; 07.11.03; 17.11.03

**Meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit gewidmet**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Ziel dieser Arbeit	4
<b>2.</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1.	MR-tomographische und histologische Darstellung des Knochenmarkes	5
2.2.	Verwendungsgrund von Kontrastmitteln	8
2.3.	Paramagnetische Kontrastmittel	12
2.3.1.	Gadoterat-Meglumin (Gadolinium-DOTA, Dotarem®)	12
2.4.	Superparamagnetische Kontrastmittel	18
2.4.1.	Allgemein	18
2.4.2.	Ferumoxides (Endorem®)	21
2.4.3.	Ferumoxtran (Sinerem®)	25
2.4.4.	Physikalische Eigenschaften von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln	28
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1.	Tiermodell	30
3.2.	MR-Kontrastmittel	34
3.3.	MRT-Gerät und Pulssequenzen	35
3.4.	Auswertung der MR-Daten	39
3.5.	Histopathologie	40
3.6.	Statistik	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1.	Pulssequenz-Optimierung	45
4.2.	Dynamische Untersuchungen der Knochenmarks- Perfusion	48
4.3.	RES-Phagozytoseaktivität des Knochenmarkes	53
4.4.	Histopathologie	55

<b>5. Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>6. Literaturangaben</b>	<b>68</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>79</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>80</b>

## **Anhang**

- I. Arbeitsmaterialien und Lösungen**
- II. Erklärung**
- III. Kopie des Genehmigungsbescheides über die Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

# 1. Einleitung

Die Magnetresonanztomographie (MRT) hat für die bildgebende Diagnostik des Knochenmarkes neue Möglichkeiten eröffnet. In der Vergangenheit basierte die Darstellung des Knochenmarkes auf der konventionellen Radiologie, der Nuklearmedizin (z.B. Knochenmarksszintigraphie) und der Computertomographie (1).

Die Anatomie des normalen und neoplastischen Knochenmarkes wurde in ersten Studien bereits untersucht (3,11,12,13,14). Die MRT erlaubt eine direkte Darstellung des hämatopoetischen und fettigen Knochenmarkes mit hoher anatomischer Auflösung und gutem Weichteilkontrast (3,4,5,6). Zudem können morphologische Veränderungen infolge von Knochenmarkerkrankungen, Chemo- oder Strahlentherapie sowie physiologische altersabhängige Veränderungen in der MRT gut beurteilt werden. Damit wurde erstmals eine bildgebende in vivo Diagnostik der Knochenmark-Konversion von hämatopoetischem zu fettigem Knochenmark in Abhängigkeit vom Lebensalter und verschiedenen Therapien, wie z.B. aplasiogener Chemotherapie und Radiatio, möglich (3,4,5,7).

Während das überwiegend fettige, zellarme Knochenmark und das zellreiche hämatopoetische Knochenmark gut auf konventionelle MR-Aufnahmen anhand von unterschiedlichen Signalintensitäten zu unterscheiden ist, kann ein Zellreichtum des Knochenmarkes infolge einer aktiven Hämatopoese oder Tumorerkrankung mit nativen MR-Standardsequenzen nicht unterschieden werden. Dieses diagnostische Problem gewinnt in den letzten Jahren an Bedeutung, da zunehmend Medikamente (z.B. G-CSF = granulocyte colony stimulating factor) verwendet werden, die die Hämatopoese nach einer Chemotherapie zur raschen Überwindung der Aplasie anregen und damit zu einem vermehrten Zellreichtum des normalen hämatopoetischen



Knochenmarkes führen. Die Verteilung der Zellansammlung kann bei Kenntnis der normalen Knochenmark-Konversion für die Differentialdiagnose zu einer Tumordinfiltration hilfreich sein, eine sichere Differenzierung zwischen Ansammlungen von hämatopoetischen Zellen oder Tumorzellen im Knochenmark ist jedoch bei Verwendung von konventionellen nativen MR-Standardaufnahmen nicht möglich (2,4).

Eine Markierung des normalen hämatopoetischen Knochenmarkes mit zell-spezifischen Kontrastmitteln könnte zwischen aktivem hämatopoetischem Knochenmark, das dieses Kontrastmittel aufnimmt, und neoplastischen Infiltrationen, die dieses Kontrastmittel nicht aufnehmen, differenzieren. Vertreter der zell-spezifischen Kontrastmittel, die in der Lage sind RES-Zellen des hämatopoetischen Knochenmarkes zu markieren, sind eisenoxid-haltige-MR-Kontrastmittel. Zu diesen Eisenoxid-Kontrastmitteln gehören die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO, Ferumoxides) und die ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxide (USPIO, Ferumoxtran). Die Wertigkeit dieser Kontrastmittel für die bildgebende Diagnostik des Knochenmarkes wurde bisher in nur wenigen Studien untersucht (6,15,16).

Die neuen Eisenoxid-Kontrastmittel unterscheiden sich von dem Standard-Kontrastmittel neben ihrer zell-spezifischen Aufnahme in den Zielorganen auch durch ein etwa 1000-fach höheres Molekulargewicht. Daher erlauben diese Kontrastmittel auch neuartige Perfusionsstudien: Die Eisenoxid-Kontrastmittel verbleiben in der initialen Perfusionsphase unter normalen Bedingungen im Intravasalraum und treten nur bei einer pathologisch erhöhten Kapillarpermeabilität in das Interstitium der Zielorgane über. Eine Untersuchung des Knochenmarkes mit diesen Kontrastmitteln erlaubt damit eine Quantifizierung der sogenannten „Blut-Knochenmark-Schranke“ („blood-bone marrow barrier“ = BMB). Die BMB wird vom Endothel der Knochenmark-Mikrogefäße (Sinus) und wandständigen Adventitialgefäßen gebildet und reguliert den Zellaustausch zwischen Blut und Knochenmark (19).

Die Permeabilität der Knochenmark-Sinus ist von Bedeutung für das Engraftment von intravenös infundierten Spender-Stammzellen vor einer Knochenmark-Transplantation. Histopathologische Untersuchungen haben gezeigt, daß die konditionierende Ganzkörperbestrahlung vor der Knochenmark-Transplantation die endotheliale Permeabilität der Knochenmark-Sinus deutlich erhöht und damit den Eintritt der infundierten Spender-Stammzellen in das hämatopoetische Host-Kompartiment steigert (20). Bisher ist jedoch zur genauen Darstellung und somit zur Quantifizierung der BMB-Permeabilität keine zuverlässige Methode gefunden worden. Neuere experimentelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, daß mit der MRT unter Verwendung von eisenoxid-haltigen makromolekularen Kontrastmitteln diese Änderung der Permeabilität der Knochenmark-Sinus in vivo quantifiziert werden kann (18).

## 1.1. Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Studie soll untersuchen, ob die kleineren, noch nicht zugelassenen USPIO-Partikel (Ferumoxtran) oder die größeren, bereits zugelassenen SPIO-Partikel (Ferumoxides) besser für die Markierung des hämatopoetischen Knochenmarkes geeignet sind. Die Ergebnisse werden mit dem Standard-Kontrastmittel Gd-DOTA (Gadoterat) verglichen und weiter auf eine Korrelation mit der histologischen Zusammensetzung des hämatopoetischen Knochenmarkes hin untersucht. Zusätzlich werden die Knochenmarkperfusion und die Sinus-Endothel-Permeabilität dieser drei Kontrastmittel einerseits am normalen und andererseits am bestrahlten Knochenmark verglichen.

Ziele dieser vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Optimierung der zu verwendenden Pulssequenzen für die verschiedenen Kontrastmittel Ferumoxides, Ferumoxtran und Gd-DOTA
- 2) Markierung des normalen hämatopoetischen Knochenmarkes mit neuen eisenoxid-haltigen Kontrastmitteln für die MRT
  - a) MRT: 

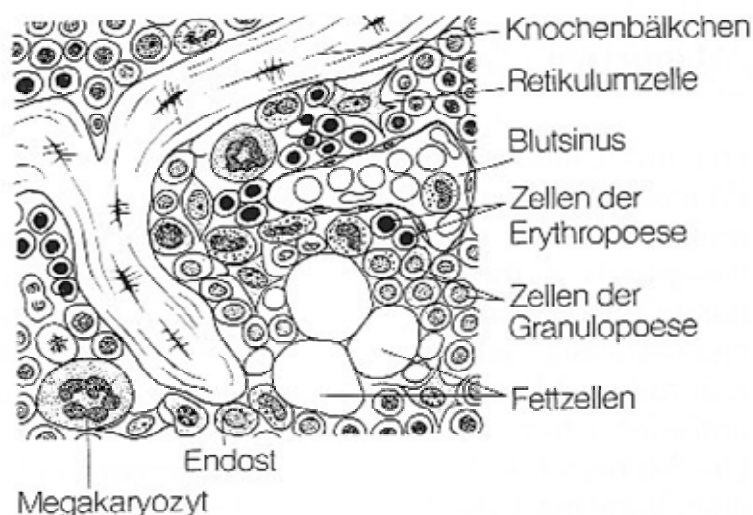
bestrahltes Knochenmark
normales, nicht-bestrahltes Knochenmark
  - b) Histopathologie: 

bestrahltes Knochenmark
normales, nicht-bestrahltes Knochenmark
- 3) Quantifizierung der Blut-Knochenmark-Schranke
- 4) Untersuchung des Einflusses einer Bestrahlung auf die Beurteilung der RES-Phagozytoseaktivität und BMB-Permeabilität

## 2. Grundlagen

### 2.1. MR-tomographische und histologische Darstellung des Knochenmarkes

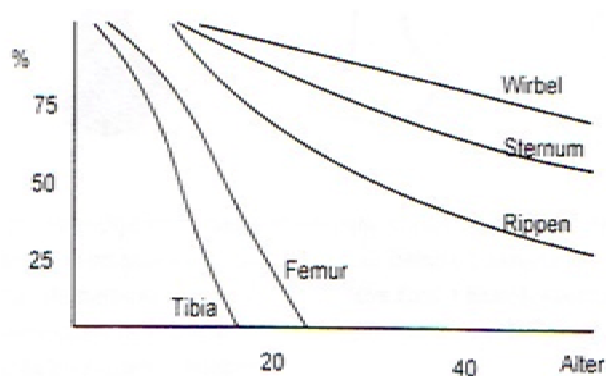
Das Knochenmark ist eines der größten Organsysteme des Menschen. Es besteht aus hämatopoetischen Zellen, Fettzellen, Stroma, Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) und Sinus (Abbildung 1). Zum Zeitpunkt der Geburt enthält nahezu das gesamte Skelettsystem hämatopoetisches Knochenmark (8). Das Verhältnis zwischen rotem hämatopoetischem, und gelbem, überwiegend fettigem Knochenmark, ändert sich im Laufe des Lebens. So gibt es graduelle Unterschiede zwischen der Verteilung des roten und gelben Knochenmarkes von Geburt an bis zum Erwachsenenalter (2).



**Abbildung 1: Anatomie des Knochenmarkes (Schiebler/ Schmidt/ Zilles: Anatomie; Springer-Verlag; 8. Auflage)**

Mit zunehmendem Lebensalter findet ein Rückgang der hämatopoetischen Zellen statt, und es wird vermehrt Fett eingelagert (9). So ändert sich nicht nur das Verteilungsmuster, sondern auch die relative Zusammensetzung des Knochenmarkes im Laufe des Lebens. Das hämatopoetische rote Knochenmark besteht aus ca. 40% Wasser, 40% Fett und 20% Protein. Hingegen besteht das fettige Knochenmark aus ca. 15% Wasser, 80% Fett und 5% Protein (74). Die Konversion von hämatopoetischem aktiven Knochenmark zum inaktiven fettigen Knochenmark schreitet in den Extremitäten langsam nach proximal fort. Beim Erwachsenen findet sich nur noch in den proximalen Metaphysen von Humerus und Femur, im Becken, in den Wirbelkörpern, in den Rippen, im Sternum, in der Skapula, im Kalkaneus und in der Schädelkalotte hämatopoetisches aktives Knochenmark.

Dieses Verteilungsmuster ist etwa mit dem Erreichen des 20. Lebensjahres vorhanden, wobei eine gewisse Schwankungsbreite vorliegen kann (9). Eine weitere Zunahme des prozentualen Fettgehaltes des hämatopoetischen Markes und einer damit progredienten Konvertierung des aktiven roten Knochenmarkes in inaktives Knochenmark, ist mit zunehmenden Alter zu erkennen (9, Abbildung 2). Mit der MRT kann diese Konversion dargestellt werden, und muß bei der Beurteilung von pathologischen Prozessen berücksichtigt werden (2).



**Abbildung 2: Prozentualer Anteil von Hämatopoesemark in Abhängigkeit vom Alter in verschiedenen Knochen (9)**

Bei der MRT des Knochenmarkes hängt die Signalintensität (SI) von der Verteilung und Relaxivität der Protonen ab, die wiederum dem Verhältnis der Fettzellen zu den hämatopoetischen Zellen unterliegt (10). So ist die SI auf T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern, auf denen das Fett überwiegt, erhöht (10). Fettiges, konvertiertes Knochenmark läßt sich durch eine Verkürzung von T<sub>1</sub> und einer daraus resultierenden Signalintensitätssteigerung erkennen (1). Zellreiches Knochenmark stellt sich signalarm auf T<sub>1</sub>- und signalreich auf T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern dar. So zeichnen sich z.B. Knochenmarkhyperplasien durch die Reduzierung der Fettzellen und Überwiegen der zellulären Anteile aus. In der MRT ist dieses durch eine Verlängerung von T<sub>1</sub> und Verminderung der Signalintensität ersichtlich (1,10).

Die Knochenmark-Biopsie aus dem Beckenkamm ist essentieller Bestandteil für die Diagnostik von potentiellen neoplastischen Prozessen. Verschiedene Studien konnten jedoch zeigen, daß ein positiver MRT-Befund bei negativen konventionellen diagnostischen Methoden signifikant mit der Überlebensrate von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen und Plasmozytomen korreliert (6). Die MRT bietet die Möglichkeit zur Detektion eines fokalen Knochenmark-Befalls bei negativer Histologie, Planung einer gezielten Punktion von fokalen Läsionen, nicht-invasiver Verlaufskontrolle und Ganzkörperstaging im Gegensatz zu fokalen Befunden bei der Biopsie.

Die histologische Darstellung des Knochenmarkes ist allerdings auch heute noch ein unverzichtbares diagnostisches Verfahren zur Beurteilung von Knochenmark-Konversionen, -Hyperplasien und -Infiltrationen. So wird bei einem Verdacht auf mögliche Knochenmark-Infiltrationen, Plasmozytomen, Non-Hodgkin-Lymphomen oder aplasiogener Tumoren Knochenmark-Proben aus Sternum oder Beckenkamm entnommen. Die histologischen Präparate werden mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Ein gesundes Knochenmark läßt hierbei neben vielen hämatopoetischen Stammzellen auch Stroma- und Fettzellen erkennen (schematische Zeichnung auf Abbildung 1).

## 2.2. Verwendungsgrund von Kontrastmitteln

Im Sinne des Arzneimittelgesetzes gelten Kontrastmittel als Pharmaka und müssen vielen Anforderungen wie organspezifische Anreicherung, gute Verträglichkeit, leichte und zumutbare Applikation, Stoffwechsellinaktivität, schnelle Ausscheidung und ökonomische Verordnungsweise (70) erfüllen.

Es gibt verschiedene Einteilungen der neuen MR-Kontrastmittel. Ein System beurteilt den primären Effekt der Kontrastmittel auf die Bildgebung und unterscheidet zwischen  $T_1$ - und  $T_2$ -Kontrastmitteln. Weiterhin findet man eine Unterteilung in extrazelluläre versus makromolekulare Kontrastmittel und unspezifische versus spezifische Kontrastmittel (13, Tabelle 1).

MR-Kontrastmittel, die eine Verkürzung der  $T_1$ -Relaxationszeit bewirken, nennt man  $T_1$ -Kontrastmittel. Die Kontrastmittel verstärken die Signalintensität von Blut und Geweben auf  $T_1$ -gewichteten Bildern (25,72).  $T_1$ -Kontrastmittel sind um so wirksamer, je länger die  $T_1$ -Relaxationszeiten ohne Kontrastmittel sind (71). Klassische Vertreter der  $T_1$ -Kontrastmittel sind gadolinium-haltige Kontrastmittel (z.B. Magnevist<sup>®</sup>, Dotarem<sup>®</sup>).  $T_2$ -Kontrastmittel nennt man hingegen MR-Kontrastmittel, die auf  $T_2$ -gewichteten Bildern eine Verkürzung der  $T_2$ -Relaxationszeit mit konsekutivem Signalabfall der Zielorgane zeigen (25,72). Klassischer Vertreter der  $T_2$ -Kontrastmittel ist Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>).

Die extrazellulären MR-Kontrastmittel werden i.v. verabreicht, um dann rasch in den extrazellulären Raum zu diffundieren. Klassische Vertreter extrazellulärer MR-Kontrastmittel sind Gd-DTPA und Gd-DOTA, die ein Molekulargewicht von <1 kDa haben. Sie besitzen ein Verteilungsvolumen, das annähernd dem Extrazellulärvolumen entspricht, eine hohe glomeruläre Filtrationsrate und in der Regel eine rasche renale Eliminierung (Abbildung 6).

<b>Kontrastmittel</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Applikation</b>
<b>T<sub>1</sub>-Kontrastmittel</b>		
Gd-DOTA	Dotarem	ZNS-, Organ-, Gefäßdarstellung
Gd-DTPA	Magnevist	ZNS-, Organ-, Gefäßdarstellung
Gd-BOPTA	MultiHance	Leber- und Pankreasdarstellung
<b>T<sub>2</sub>-Kontrastmittel</b>		
Feruglose	Clariscan	MR-Angiographie, Perfusionsstudien
Ferumoxides	Endorem	Leberdarstellung
Ferumoxtran	Sinerem	Lymphknotendarstellung
<b>EZR-Kontrastmittel</b>		
Gd-DOTA	Dotarem	ZNS-, Organ- und Gefäßdarstellung
Gd-DTPA	Magnevist	ZNS-, Organ- und Gefäßdarstellung
<b>Makromolekulare Kontrastmittel</b>		
Albumin-Gd-DTPA	—	MR-Angiographie, Perfusionsstudien: v.a. Tumorperfusion
Polylysine-Gd-DTPA	—	MR-Angiographie, Perfusionsstudien: v.a. Tumorperfusion
Carboxymethyl-dextran-Gd-DOTA	—	MR-Angiographie, Perfusionsstudien: v.a. Tumorperfusion
P 792	Vistarem	MR-Angiographie
Gd-Cascade-Polymer	Gadomer 17	MR-Angiographie
<b>spezifische Kontrastmittel</b>		
<b>hepatobiliär</b>		
Gd-EOB-DTPA	Eovist	Leberdarstellung
Mn-DPDP	Teslascan	Leberdarstellung
Gd-BOPTA	MultiHance	Leberdarstellung
<b>RES</b>		
Ferumoxides	Endorem	Leberdarstellung
Ferumoxtran	Sinerem	Leber-, Lymphknoten- u. Gefäßdarstellung

**Tabelle 1: Einteilung von MR-Kontrastmitteln in verschiedene Gruppen (22,34); diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll nur einen Überblick über die verschiedenen MR-Kontrastmittel liefern!**



Makromolekulare Kontrastmittel haben ein Molekulargewicht von  $>1$  kDa. Albumin-Gd-DTPA stellt den Prototyp dieser Gruppe von neuen MR-Kontrastmitteln dar, deren Verteilungsvolumen annähernd dem Blutvolumen von Geweben entspricht. Die superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel Ferumoxides und Ferumoxtran zählen auch zu der Gruppe der makromolekularen Kontrastmittel. Sie sind zwar relativ kleine Eisenpartikel, deren Größe jedoch mit der von Plasmaproteinen vergleichbar ist. Daher verhalten sie sich physiologisch als Makromoleküle.

Gleichzeitig kann man die superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel Ferumoxides und Ferumoxtran zu den zell-spezifischen Kontrastmitteln zählen, da sie sich spezifisch in RES-Zellen anlagern (Tabelle 1). Mit Hilfe dieser Kontrastmittel kann man bestimmte Organe, wie Milz, Knochenmark, Lymphknoten und Leber markieren. Die Kontrastmittel-Partikel werden vom RES phagozytiert und führen im abgebildeten normalen Gewebe zu einem Signalintensitätsverlust. Weitere Vertreter der zell-spezifischen Kontrastmittel sind Gd-DTPA-EOB und Gd-BOPTA, die spezifisch Hepatozyten markieren. Die niedermolekularen Standard-Kontrastmittel (Gd-DTPA, Gd-DOTA) reichern sich im Gegensatz zu diesen Kontrastmitteln unspezifisch in allen Organen außerhalb des ZNS an und werden daher auch als „unspezifische Kontrastmittel“ bezeichnet.

Bei der MRT hängt die bildliche Auflösung von den darzustellenden Signalintensitäten ab. Je höher das Signal-/ Rauschverhältnis zwischen dem physiologischen und dem pathologischen Gewebe ist, desto günstiger sind die Voraussetzungen für die bildliche Auflösung. Durch den Einsatz von Kontrastmitteln in der bildgebenden radiologischen Diagnostik wird der Kontrast zwischen unterschiedlichen anatomischen Strukturen und pathologischen Läsionen beeinflusst (71).

Mehrere Parameter können den Bildinhalt und damit die diagnostische Aussagekraft der MRT bestimmen. Die Protonendichte des Gewebes steht bei

Verwendung entsprechender protonendichte-gewichteter Aufnahmen in einer linearen Beziehung zur Signalintensität, das heißt, daß mit steigender Protonendichte das Resonanzsignal linear verstärkt wird. Zusätzlich bestimmen die  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten der Gewebe die Signalintensität auf den MR-Aufnahmen und können bei Verwendung von entsprechend gewichteten Pulssequenzen hervorgehoben werden. So führt z.B. eine kurze Repetitions- und Echozeit zu einer hohen Signalintensität auf  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen, eine lange Repetitions- und Echozeit zu einer hohen Signalintensität auf  $T_2$ -gewichteten Aufnahmen. Durch von außen eingebrachte Substanzen (z.B. Kontrastmittel) lassen sich intrinsische Parameter des Zielgewebes beeinflussen (71,73). Kontrastmittel, die die  $T_1$ -Relaxationszeiten verkürzen, führen zu einer Zunahme des  $T_1$ -Signals, Kontrastmittel, die die  $T_2$ -Relaxationszeit verkürzen, führen zu einem Abfall des  $T_2$ -Signals. Die Konzentration des Kontrastmittels im Gewebe beeinflusst zusätzlich das Signalverhalten: bei relativ geringen Kontrastmittel-Konzentrationen im Zielgewebe sind die Konzentrationen von  $T_1$ -Kontrastmitteln proportional zum  $T_1$ -Signal der Zielgewebe, die Konzentrationen der  $T_2$ -Kontrastmittel umgekehrt proportional zum  $T_2$ -Signal der Zielgewebe. Für höhere Kontrastmittel-Konzentrationen im Zielgewebe ergibt sich dann jedoch eine logarithmische oder sogar umgekehrte Beziehung (71).

Klinische Anwendungen von Kontrastmitteln in der MRT haben unter anderem folgende Vorteile der kontrastverstärkenden Untersuchungen gegenüber der Nativuntersuchungen gezeigt: verbesserte Sensitivität, verbesserte Detailerkennbarkeit und die Möglichkeit funktioneller Untersuchungen (25). Zudem können bei Verwendung von Kontrastmitteln genauere Aussagen wie z.B. über Perfusionseigenschaften und die Kapillarpermeabilität, z. B. über Störungen der Bluthirnschranke und die Knochenmark-Blut-Schranke (BMB) gemacht werden (72).

## 2.3. Paramagnetische Kontrastmittel

### 2.3.1. Gadoterat-Meglumin (Gadolinium-DOTA, Dotarem®)

Gadolinium-Chelate sind Vertreter von niedermolekularen, extrazellulären paramagnetischen MR-Kontrastmittel. Sie werden als Standard-Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie eingesetzt. Aufgrund ihrer Eigenschaft, die Signalintensität von Geweben auf  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen zu erhöhen, werden sie als positive Kontrastmittel bezeichnet.

Gadolinium ist eine seltene Erde und besitzt eine besonders hohe Zahl von sieben ungepaarten Elektronen. Daher weist Gadolinium einen starken paramagnetischen Effekt auf (26). Da die Dipolmomente von Atomkernen mit ungepaarten Ladungen (z.B. Wasserstoff) um den Faktor 600-800 schwächer als die magnetischen Dipolmomente paramagnetischer Substanzen sind, entsteht eine starke Wechselwirkung zwischen gadolinium-haltigem Kontrastmittel und Wasserstoff-Protonen (Abbildung 3). Infolge dieser Wechselwirkung sind die Präzession der Wasserstoffatome des jeweiligen Gewebes und damit die  $T_1$ -Relaxationszeiten und Signalintensitäten zu beeinflussen (25).

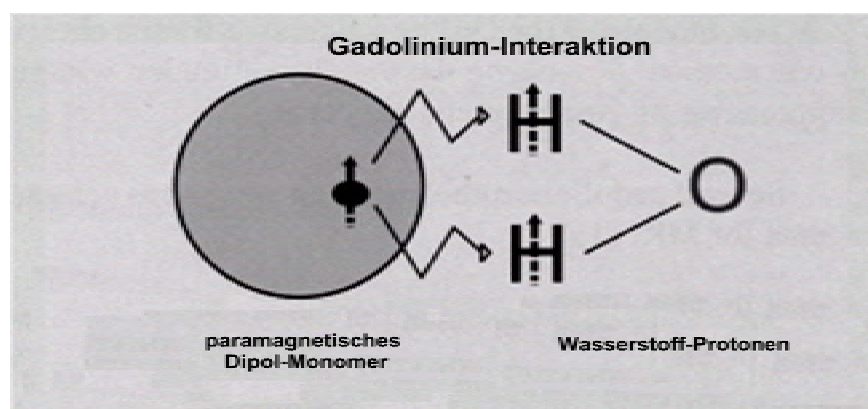


Abbildung 3: Gadolinium-Interaktion (27)

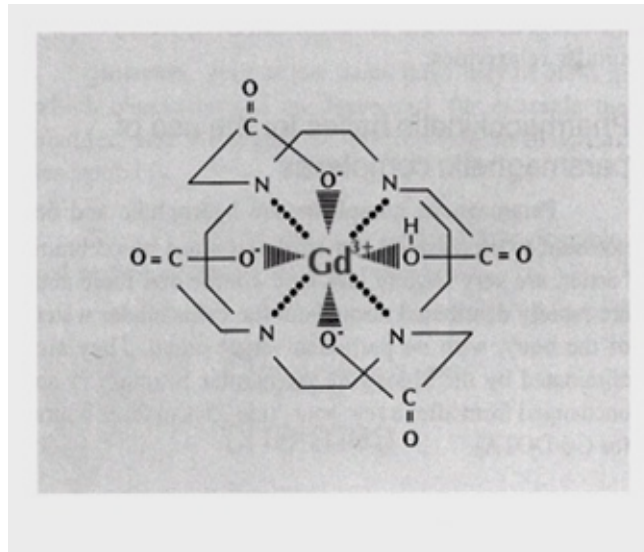
Aufgrund der hohen Toxizität von Gadolinium wird das Element in MR-Kontrastmitteln mit dem Chelatbildner DOTA (tetraazacyclododecanetetraacetic acid) komplexiert (Tabelle 2), so daß eine nichttoxische, wasserlösliche Gadolinium-Verbindung entsteht, welche man zur Injektion nutzen kann. Die Beeinflussung der Signalintensität (SI) wird weitgehend durch das paramagnetische Gadolinium hervorgerufen, während die pharmakokinetischen Eigenschaften auf den Chelatkomplex zurückzuführen sind.

Gd-DOTA:	27,93% (m/v)
Meglumin:	9,76% (m/v)
Dichte bei 20°C:	1,1739 g/cm <sup>3</sup>
Viskosität bei 20°C:	3,2 mPa.s (or cp)
Viskosität bei 37°C:	2,0 mPa.s (or cp)
pH:	6,5- 8,0
Gd-Konzentration:	0,5 mol/l
thermodynamische Stabilität:	25,8 log K
apparente Stabilität pH 7,4:	18,8 log K
Halbwertszeit in 0,1 M HCL Lösung:	> 1Monat
Komplexbestandteile:	< 1% Zn <sup>2+</sup> (25 mM)
	< 1% Cu <sup>2+</sup> (25 mM)
Osmolalität:	1350 (mOsm/kg H <sub>2</sub> O)
Plasmaosmolalität:	1,08 (mOsm/kg KG)

**Tabelle 2: Physikalische Eigenschaften von Dotarem<sup>®</sup> (27)**

Gadolinium-DTPA war das erstmals verwendete paramagnetische, extrazelluläre gadolinium-haltige Kontrastmittel. Es wurde 1988 in Europa, den USA und Japan unter dem Handelsnamen Magnevist<sup>®</sup> (Schering, Berlin) für die kraniale und spinale MRT zugelassen. Als zweites Kontrastmittel erhielt 1989 das Monomegluminsalz Gd-DOTA (Dotarem<sup>®</sup>; Guerbet, Aulnay-sous-Bois,

Frankreich, Abbildung 4) in einigen europäischen Ländern die Zulassung (25). In Deutschland ist Dotarem<sup>®</sup> noch nicht zugelassen.



**Abbildung 4: Chemische Struktur von Dotarem<sup>®</sup> (27)**

Dotarem<sup>®</sup> verkürzt in der bildgebenden MRT die T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Relaxationszeiten des Zielgewebes, wobei bei relativ geringer Kontrastmittel-Dosis ein deutliches positives Enhancement auf T<sub>1</sub>-gewichteten Aufnahmen nachweisbar ist. Auf konventionellen T<sub>2</sub>-gewichteten Aufnahmen beobachtet man häufig keine oder nur eine geringe Signaländerung. Mit stark T<sub>2</sub>\*-gewichteten, dynamischen MRT-Aufnahmen kann man jedoch den Suszeptibilitäts-Effekt des Kontrastmittels darstellen. Weitere physikalische Eigenschaften sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Gd-DOTA (Dotarem<sup>®</sup>) verteilt sich in der initialen Perfusionsphase im Intravasalraum (Abbildung 5), tritt dann rasch in den Extrazellularraum extrazerebraler Gewebe über und wird renal, entsprechend der glomerulären Filtrationsrate, eliminiert (25,28, Abbildung 6). Nach Gabe von Dotarem<sup>®</sup> wurden keine Veränderungen der Nierenfunktion oder des Serumkreatininwertes, selbst bei bereits eingeschränkter Nierenfunktion, festgestellt (25). Die Ausscheidung der Substanz erfolgt in unveränderter Form,

das bedeutet, daß sie nicht dissoziiert, nicht metabolisiert und nicht retiniert wird. Das Verteilungs- und Ausscheidungsverhalten ist dosisunabhängig, was auf eine geringe oder fehlende biochemische Wechselwirkung mit dem Organismus schließen läßt (25). Da sich Gd-DOTA nicht-selektiv im Extrazellularraum sämtlicher extra-zerebraler Gewebe verteilt, ist es nicht organspezifisch einzusetzen. Die Plasmahalbwertszeit im menschlichen Organismus beträgt etwa 15 Minuten (28).

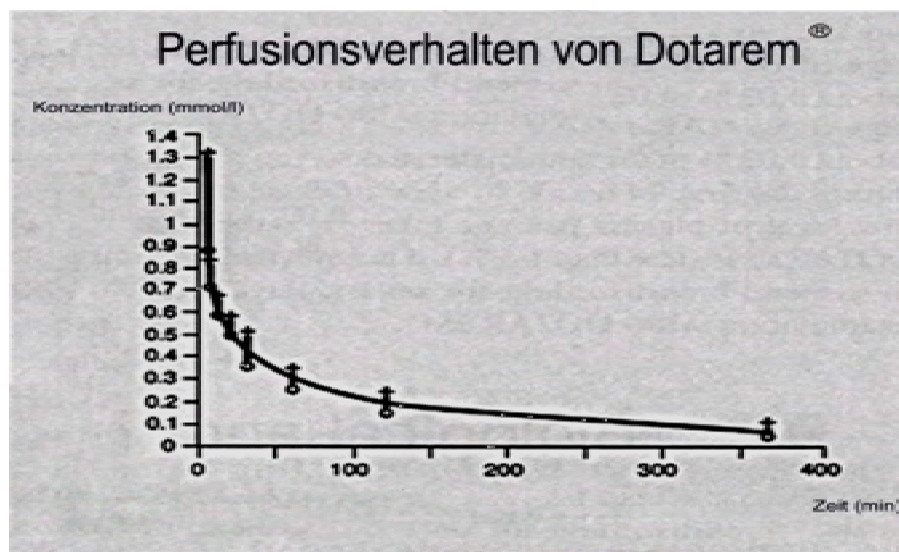


Abbildung 5: Perfusionsverhalten von Dotarem® (27)

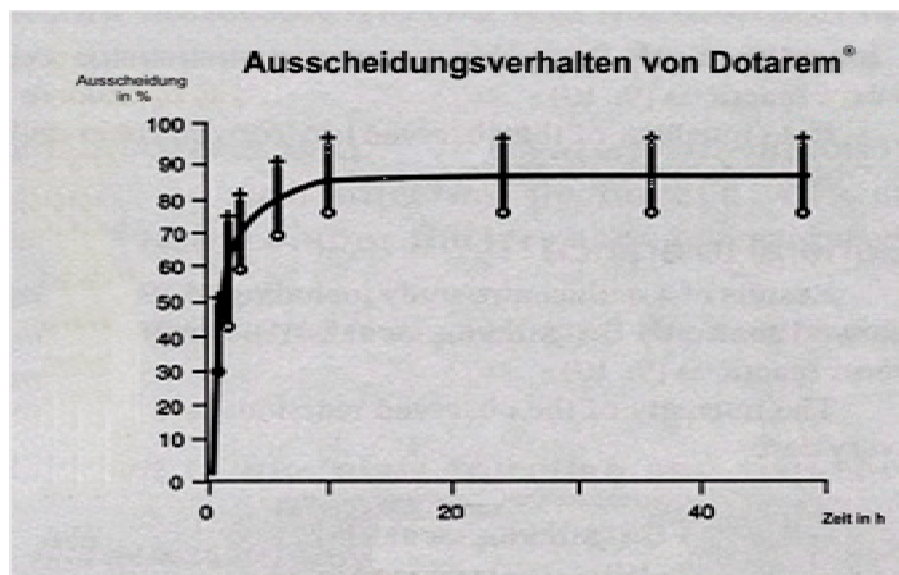


Abbildung 6: Ausscheidungverhalten von Dotarem® (27)

Die Nebenwirkungen von paramagnetischen MR-Kontrastmitteln sind im Vergleich zu den Röntgen-Kontrastmitteln etwa um den Faktor zwei bis drei niedriger. Allergoide Symptome liegen um den Faktor acht unter der Häufigkeit von nicht-ionischen jod-haltigen Röntgen-Kontrastmitteln. Bei etwa ein Prozent der Patienten treten, von Mißempfindungen an der Injektionsstelle abgesehen, weitere unerwünschte Wirkungen auf (25, Tabelle 3). Auch ist nach einer Bolusinjektion die Verträglichkeit der Substanzen im Vergleich zur langsamen intravenösen Infusion nicht verändert (25). Die Akuttoxizität (LD<sub>50</sub>) weist einen Sicherheitsfaktor von  $\geq 100$  auf.

Erbrechen	0,19%
Übelkeit	0,12%
Hitze	0,13%
Kopfschmerzen	0,10%
Unwohlsein	0,12%
Exantheme	0,04%
Unangenehmer Geschmack im Mund	0,04%
Atembeschwerden	0,02%
Andere	0,24%

**Tabelle 3: Nebenwirkungen von Dotarem® (25)**

Dotarem® gehört physikochemisch zu den makrozyklischen Gadoliniumverbindungen, denen gute thermodynamische Eigenschaften zugeschrieben werden (3). Gd-DOTA hat einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ungefähr 5 nm und ein Molekulargewicht von <1 KDa. Die empfohlene Dosis von Dotarem® beträgt 0,1 mmol/kg, entsprechend einer Dosis von 0,2 ml/kg.

Die meisten klinisch-diagnostischen Erfahrungen mit Dotarem<sup>®</sup> sammelte man in der kranialen und spinalen MRT zur Untersuchung des zentralen Nervensystems (ZNS). Studien an extrazerebralen Geweben haben gezeigt, daß das Ausmaß dieser SI-Zunahme auf T<sub>1</sub>-gewichteten Aufnahmen nach Gd-DOTA Injektion sowohl vom Vaskularisationsgrad und dem Wassergehalt des Gewebes, als auch der Größe des interstitiellen Raumes abhängt. Pharmakokinetische Studien haben gezeigt, daß sich Gd-DOTA auch im Knochenmark anreichert und hier zu Signalveränderungen auf T<sub>1</sub>-gewichteten Aufnahmen führt. Bisher gibt es jedoch keine klinischen Studien, die sich mit der bildgebenden Darstellung des Knochenmarkes mit Dotarem<sup>®</sup> beschäftigten.



## 2.4. Superparamagnetische Kontrastmittel

### 2.4.1. Allgemein

Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>, Laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) und Ferumoxtran (Sinerem<sup>®</sup>, Laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) gehören zur Gruppe der partikulären superparamagnetischen Eisenoxidpräparate (SPIO). Sie werden spezifisch vom retikuloendothelialen System (RES) in Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark aufgenommen und unterliegen dem physiologischen Eisenmetabolismus (6,25,23,33). Ferumoxides werden primär für die Leber-MR verwendet, da sich die Kontrastmittel hauptsächlich (zu 80%) in der Leber verteilen. Ferumoxtran wird dagegen primär zur Darstellung von Lymphknoten eingesetzt. Neuere Anwendungen schließen auch MR-Angiographie, Lymphozyten-Marking und Rezeptor-Imaging ein (34).

Die superparamagnetischen Eisenoxide (SPIO) Ferumoxides und die ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxide (USPIO) Ferumoxtran enthalten Magnetite oder Ferrite. Sie haben eine geringe Größe von 25-180 nm Durchmesser und bestehen aus einem Kristallkern mit multiplen Eisenoxid-Aggregaten, der von einer stabilisierenden Dextran-Hülle umschlossen wird (23,25). Die unterschiedliche Partikelgröße hat nicht nur Einfluß auf die Plasmahalbwertszeit, sondern auch auf den bevorzugten Aufnahmeort der Substanz. Während sich USPIO (Partikelgröße <20 nm) bevorzugt in den Lymphknoten anlagern, werden SPIO (Partikeldurchmesser 60-180 nm) bevorzugt in das RES von Leber und Milz aufgenommen.

SPIO und USPIO gehören zu den Substanzen, die in einem äußeren Magnetfeld selbst schwach magnetische Eigenschaften entwickeln. Sie führen bei Anreicherung im Gewebe zu einer Abschwächung bzw. Auslöschung des MRT-Signals (35).

Primär haben die Eisenoxid-Kontrastmittel einen  $T_2$ -Effekt, der zu einer Signalabschwächung auf  $T_2$ -gewichteten Bildern führt (23). Die  $T_2$ -Relaxationszeit ist umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser und proportional zur Partikelzahl. Folglich haben SPIO einen deutlich stärkeren  $T_2$ -Effekt als USPIO (36). Superparamagnetische Kontrastmittel gelten als „Störfelder“, die die Homogenität des von außen angelegten Feldes  $B_0$  beeinflussen. Hierbei handelt es sich um lokale Effekte, die aufgrund weiterreichender Wechselwirkungen durch das große magnetische Moment Feldinhomogenitäten erzeugen (25). Dies zeigt sich in  $T_2$ -gewichteten MRT-Aufnahmen im konsekutiven Signalabfall des entsprechenden Gewebes (23,25), also einer negativen Signalintensität (negatives Enhancement). Daher werden superparamagnetische Kontrastmittel auch als negative Kontrastmittel bezeichnet.

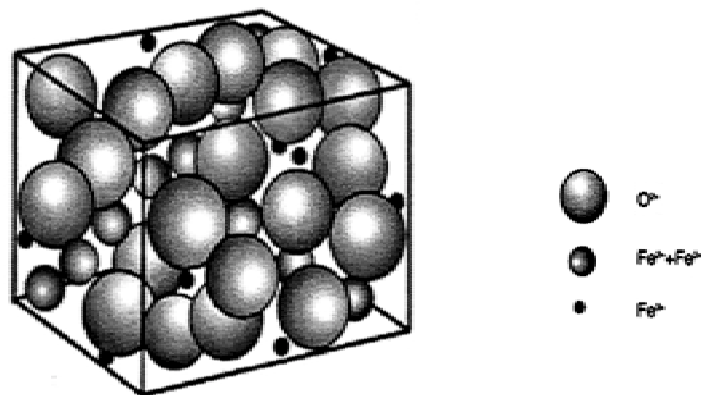
Zusätzlich zu dem beschriebenen  $T_2$ -Effekt verkürzen SPIO die  $T_1$ -Relaxationszeiten von Blut und Gewebe. Die  $T_1$ -Zeit wird von den superparamagnetischen Kontrastmitteln selektiv verkürzt. Dieses zeigt sich in einer Erhöhung der Signalintensität auf  $T_1$ -gewichteten Bildern (3,5). Die  $T_1$ -Relaxivität ( $R_1$ ) der superparamagnetischen Kontrastmittel ist um den Faktor zwei bis sechs schwächer als ihre  $T_2$ -Relaxivität ( $R_2$ ). Der  $T_1$ -Effekt der USPIO ist deutlich größer als der  $T_1$ -Effekt für SPIO. Im Vergleich mit paramagnetischen (positiven) Kontrastmitteln wie z.B. Gd-DOTA ist unter identischen Meßbedingungen (0,47 T in physiologischer Kochsalzlösung) die  $T_1$ -Relaxationszeit für die USPIO um den Faktor vier bis sechs höher.

Die superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel werden von den RES-Zellen von Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark aufgenommen und gespeichert. Sie werden in den physiologischen Eisenstoffwechsel eingeschleust und zunehmend in den Erythrozyten (Hämoglobin) gefunden (77). Wie das endogene Eisen werden die zugeführten Eisenpartikel sehr langsam ausgeschieden. Gesunde Männer haben im Normalfall eine Eisenausscheidung

von ca. 1 mg pro Tag, wobei menstruierende Frauen annähernd die doppelte Menge ausscheiden (76). Die Eisenpartikel verbleiben mehrere Tage bis Wochen im Organismus und werden dann überwiegend über die Fäces ausgeschieden. Die Urinausscheidung beträgt < 1 %. Nach etwa 84 Tagen ist 16-21 % des injizierten Eisens ausgeschieden (77).

## 2.4.2. Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>)

Das MRT-Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> (Laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) stellt ein superparamagnetisches Eisenoxidpräparat (Magnetite- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Partikel) dar (3,13,14,15). Synonyme sind AMI-25 (Name der klinischen Entwicklung) und Ferridex<sup>®</sup> (Handelsname in den USA; Fa. Berlex). Ferumoxides repräsentiert relativ große superparamagnetische Eisenoxide (SPIO). Es besteht aus mit Dextran umhüllten Eisenoxid-Partikeln mit einem Durchmesser von etwa 150 nm (120-180 nm) (6,44, Abbildung 7). Seit 1988 ist Ferumoxides in zahlreichen Studien erforscht worden (45-57) und ist das erste Beispiel für injizierbare Nanopartikel (44). Ferumoxides gehört zu den zellspezifischen Kontrastmitteln, die sich im RES von Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark (6,45,58) anlagern.



**Abbildung 7: Kristallstruktur von Endorem<sup>®</sup> ( $\text{Fe}_{24}\text{O}_{32}$ ); (44)**

Im Zielgewebe beruht die Wirkung von Ferumoxides primär auf eine Verkürzung der  $T_2$ -Relaxationszeiten. Dieser Effekt ist auf lokale Feldinhomogenitäten zurückzuführen, und macht sich auf  $T_2$ -gewichteten MR-Aufnahmen mit einem konsekutivem Signalabfall bemerkbar (6,24). Zusätzlich werden die  $T_1$ -Relaxationszeiten der Gewebe durch die Eisenoxid-Partikel

verkürzt und führen somit zu einem, im Vergleich zum T<sub>2</sub>-Effekt geringer ausgeprägten, Signalanstieg auf T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern (36). Weitere Einflüsse von Ferumoxides auf die MRT-Bildgebung sind schon im vorherigen Kapitel 2.4.1. besprochen worden.

Endorem<sup>®</sup> ist eine injizierbare Suspension von schwarzer bis braun-rötlicher Farbe und liegt als Infusionslösungskonzentrat vor. Die Zusammensetzung einer Ampulle zu 8 ml enthält 120-133 mg paramagnetisches Eisen (II, III)-oxid, die 89,6 mg Eisen entsprechen. Zusätzliche Bestandteile sind Dextran 10, wasserfreie Citronensäure, Mannitol und Wasser für Injektionszwecke (Tabelle 4).

Wirkstoff	Formel	
	a) spezifisch	b) zentesimal
Eisenoxid	q.s. 89,6 mg Eisen	q.s. 1,12 g Eisen
<b>Andere Bestandteile</b>		
Dextran	60,8 mg	0,76 g
Citrat	2,7 mg	0,034 g
Mannitol	490,4 mg	6,13 g
Wasser z Injektion	q.s. 8 ml	q.s. 100 ml
<b>Andere Bestandteile</b>		
Osmolalität	340 mOsm/kg	
Viskosität	1,3 mPa.s (20°C)	
pH	6,0-8,0	

**Tabelle 4: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem<sup>®</sup>: a) pro Ampulle (8ml) und b) pro 100 ml; (44)**

Zur besseren Verträglichkeit wird Endorem<sup>®</sup> dem Patienten in einer Dosierung von 15 µmol Fe/kg KG, das entspricht 0,88275 mg Fe/kg KG bzw. 0,075 ml/kg KG, nach Lösung in 100 ml einer 5% Glucose-Lösung innerhalb von 30 Minuten verabreicht (44).

Bei der Anwendung von Endorem<sup>®</sup> sollte darauf geachtet werden, daß das Kontrastmittel mit 100 ml 5 %iger Glucoselösung verabreicht wird, und die Infusion langsam (während der ersten 10 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/ Min.) innerhalb von 30 Minuten infundiert wird. Während der letzten 20 Minuten kann die Einlaufgeschwindigkeit auf 4 ml/ Min. gesteigert werden (44). Um hypotone Kreislaufdysregulationen zu vermeiden, darf Ferumoxides in Deutschland nicht als Bolus injiziert werden (25,49). In den USA ist die Bolusinjektion von Ferumoxides zugelassen. Die Bluthalbwertszeit im Menschen beträgt ungefähr 20 Minuten (6) und im Kaninchen 6 Stunden (75).

Endorem<sup>®</sup> ist ein gut verträgliches Arzneimittel und hat unter Berücksichtigung der Anwendungsempfehlungen wenige Nebenwirkungen. In der klinischen Erprobung eines ersten Präparates traten zum Teil folgende unerwünschte Wirkungen auf: Schmerzen im Lumbalbereich (4,8 %), Thoraxschmerzen (1,5 %), Flush (1 %), Hitzegefühl (1 %), Dyspnoe (0,7 %), leichte Blutdruckveränderungen (0,7 %), Kopfschmerzen (0,6 %) und Übelkeit (0,6 %) (44). Durch Austausch des Lösungsmittels und Verabreichung geringerer Dosierungen, gelang es, diese Überempfindlichkeitsreaktionen zu reduzieren.

Das seit 1994 zugelassene Endorem<sup>®</sup> wurde bisher primär für die Diagnostik von fokalen Leberläsionen eingesetzt (45,59). Über eine zusätzliche geringe Aufnahme in das Knochenmark wurde mehrfach berichtet (6,45,59). In einem gesunden und normal funktionierenden Organismus (speziell Leber) werden ca. 80% der Ferumoxides -Dosis von Kupfer-Stern-Zellen, 6% von der Milz und nur ein geringer Teil vom Knochenmark aufgenommen. Bei Leberkranken kann sich die Kontrastmittel-Aufnahme der Milz gegenüber der Leber verstärken, wobei die Kontrastmittel-Aufnahme der Leber unregelmäßig sein kann (34). Da

maligne Lebertumoren in der Regel keine RES-Zellen besitzen, nehmen sie das Kontrastmittel nicht auf. Dieses wird nur im tumorfreien Gewebe der Leber aufgenommen. Dadurch erscheint das Lebergewebe nach Kontrastmittel-Injektion auf T<sub>2</sub>-gewichteten MR-Bildern signalarm und die meisten Tumore signalreich (25). Klinische Untersuchungen zeigten, daß durch den Einsatz von Endorem<sup>®</sup> die Sensitivität der MRT für die Detektion von Lebertumoren gegenüber der nativen MRT gesteigert werden konnte (54). In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits eine zusätzliche geringe Aufnahme in das Knochenmark und auch eine verbesserte Detektion von Knochenmark-Tumoren berichtet (6,45,58).

### 2.4.3. Ferumoxtran (Sinerem®)

Auch Ferumoxtran (Sinerem®; Fa. Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) gehört zu der Gruppe der ultrakleinen partikulären superparamagnetischen Eisenoxid-Präparaten (USPIO) (13,14,15). Synonyme sind AMI-227 (Name der klinischen Entwicklung) und Sinerem® (Handelsname in Europa). Es ist ein neues USPIO, das ursprünglich zur Diagnostik von Lymphknoten-Erkrankungen hergestellt wurde (34). Ferumoxtran-Partikel bestehen aus einem Kristallkern mit multiplen Eisenoxid-Aggregaten, umgeben von einer stabilisierenden Dextran-Hülle. Sie haben einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 17-20 nm und sind somit deutlich kleiner als Ferumoxides. Nach i.v.-Applikation werden sie langsamer als größere superparamagnetische Eisenoxidpartikel vom RES aufgenommen. Daraus resultiert seine signifikant längere Bluthalbwertszeit von ungefähr 24 Stunden im menschlichen Organismus (15), die damit deutlich länger im Vergleich zu Ferumoxides ist. Ferumoxtran kann noch Stunden und Tage nach Kontrastmittel-Injektion in Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark nachgewiesen werden (1). Die Bluthalbwertszeit im Kaninchen beträgt ungefähr 240 Minuten (15).

Ferumoxtran zeigt eine hohe  $T_2$ -Relaxationszeit, was zu einem signifikanten Blut-Pool Enhancement auf  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen führt (61). So zeigt Ferumoxtran auf  $T_1$ -gewichteten MR-Bildern effektiv positive Kontraste, genauso wie negative Kontraste auf  $T_2$ -gewichteten Bildern (15). Weitere Einflüsse von Ferumoxtran auf die MRT-Bildgebung sind schon im Kapitel 2.4.1. besprochen worden.

Das Kontrastmittel liegt als Trockensubstanz in 10 ml-Ampullen vor. Eine Ampulle enthält 210 mg Eisen in Form von Ferumoxtran. Nach Auflösung der Trockensubstanz mit 10 ml 0,9 %igem NaCl liegt eine Konzentration von 20 mg Eisen (Fe II, III)/ml, entsprechend einer Dosis von 356  $\mu\text{mol Fe/ml}$ , vor. Die empfohlene Dosis von Sinerem® beträgt 30  $\mu\text{mol/kg KG}$ , entsprechend einer



Dosis von 1,7655 mg Fe/kg KG bzw. 0,088275 ml/kg KG. Weitere Bestandteile sind Dextran 10 und wasserfreie Citronensäure. Das Molekulargewicht beträgt ungefähr 700 000 d. Die Osmolalität beträgt 365 mOsm/kg Wasser und die Viskosität bei 25° Celsius 1,6 cps (77).

USPIO befinden sich derzeit in klinischer Prüfung für die Verwendung in der Diagnostik von Leber, Milz, Lymphknoten, Knochenmark sowie in Perfusionsstudien von Myocard und ZNS (16,42,63,64). Sinerem<sup>®</sup> verbleibt lang genug im Blutstrom, um in den Lymphknoten zu akkumulieren (34). In ersten klinischen Studien zeigte Ferumoxtran nach intravenöser Verabreichung einen Signalabfall in normalen Lymphknoten auf T<sub>2</sub>-gewichteten Aufnahmen, während Tumorinfiltrate und entzündliche Veränderungen der Lymphknoten das Kontrastmittel nicht aufnehmen (65). Aus diesem Grund stellt es ein geeignetes Kontrastmittel für onkologische Fragestellungen dar (25). Die Aufnahme in das Knochenmark beträgt etwa 5% der injizierten Dosis (16). Die geringe Menge ist ausreichend, um MRT-detektierbare Signalveränderungen hervorzurufen.

Erste klinische Studien zeigten, daß Ferumoxtran zu einem Signalverlust des Knochenmarkes auf T<sub>2</sub>-gewichteten Pulssequenzen führt (23). Dieser Verlust der Signalintensität ist auf die Aufnahme der Kontrastmittel-Partikel durch die RES-Zellen zu erklären (34). Zudem zeigt Sinerem<sup>®</sup> eine hohe R<sub>1</sub>-Relaxivität. Daher kommt es zu einer signifikanten Signalanstieg des Blut-Poolen auf T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern (23,34). Diesen Effekt kann man für die Darstellung der Knochenmarkperfusion nutzen.

In ersten klinischen Studien (76) wurden gesunde Probanden und Patienten mit Ferumoxtran untersucht. In Tabelle 5 sind aufgetretene unerwünschte Nebenwirkungen aufgeführt.

Bauchschmerzen	3,10%
Rückenschmerzen	3,70%
Kopfschmerzen	4,20%
Übelkeit	2,40%
Juckreiz	2,80%
Urtikaria	3,20%
Flush	3,30%
Atembeschwerden	1,60%

**Tabelle 5: Nebenwirkungen von Sinerem® (77)**

#### 2.4.4. Physikalische Eigenschaften von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln

Unter der magnetischen Suszeptibilität versteht man die Magnetisierbarkeit einer Substanz in einem magnetischen Feld. Durch die Bewegung der elektrisch geladenen Teilchen (Elektronen, Protonen) entsteht ein Magnetismus. Die magnetische Suszeptibilität ist ein Maß für die „Empfindlichkeit“ und Reaktion eines Moleküls auf ein von außen eingebrachtes Magnetfeld (66,67).

Den Ferromagnetismus kennzeichnet eine Anziehung des Körpers vom inhomogenen magnetischen Feld. Wenn man Multidomänenpartikel mit ferromagnetischen Eigenschaften auf eine Größe von  $<350\text{Å}$  (für  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) reduziert, erhält man sogenannte Eindomänenpartikel mit superparamagnetischen Eigenschaften (25). Der Einfluß der Brown'schen Molekularbewegung wird durch die geringe Größe der Partikel so groß, daß zwischen den magnetischen Domänen außerhalb von externen Magnetfeldern keine Ordnung entstehen kann, sie somit kein eigenes Magnetfeld aufbauen können, kein „magnetisches Gedächtnis“ besitzen und sich zufällig im Raum anordnen (25,68,69).

Gelangen die superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel in die Nähe eines ausreichend starken externen Magnetfeldes (z.B. im Rahmen der MRT), dessen Einfluß größer ist als der der Brown'schen Molekularbewegung, richten sich die magnetischen Domänen entlang der Feldlinien aus und werden durch das externe Magnetfeld geordnet (68). Nach Entfernung des Magnetfeldes behalten sie keine Restmagnetisierung, und somit kommt es zu keiner Aggregation der Partikel, die durch gegenseitige Anziehung entstehen könnte (25). Die geordneten magnetischen Domänen bauen ihrerseits ein Magnetfeld auf, welches die Homogenität des externen Magnetfeldes stört und hierdurch die Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  verkürzt. Dieser Suszeptibilitätseffekt der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel ähnelt dem der paramagnetischen

Materialien, allerdings ist die Magnetisierung, die durch ein äußeres Feld induziert wird, viel größer (25).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Tiermodell**

Unsere Versuche wurden an Tieren durchgeführt, da sich Erstuntersuchungen an Menschen verbieten, weil aufgrund der nicht vorliegenden Ergebnisse Wirkungen und Risiken nicht abschätzbar sind. Die experimentellen Untersuchungen mußten an Tieren durchgeführt werden, deren Gewebereaktion der des Menschen gleichkommt. Diese Voraussetzung trifft auf Säugetiere zu. Da die Ortsauflösung eines klinischen MRT-Gerätes die Darstellung des Knochenmarkes an den zunächst vorgesehenen Ratten nicht ermöglichte, wurden Untersuchungen an Kaninchen notwendig. Bei diesen ermöglicht die Größe der Wirbelkörper (ca. 1 x 1,5 cm) und des Os sacrum (Dicke ca. 3,2 cm) eine suffiziente Auswertung der Kontrastmittelanreicherung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster, in der Sitzung vom 14. Oktober 1998, gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105), begutachtet und genehmigt (Aktenzeichen: 23.0835.1.0. (G43/98)).

Für unsere tierexperimentelle Studie wurden 36 weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem Alter von 6 Wochen und einem mittleren Körpergewicht von 3 kg verwendet. Das Knochenmark dieser Tiere ist noch sehr zellreich und enthält überwiegend hämatopoetisches, noch nicht fettig konvertiertes Knochenmark. 12 Tiere wurden vor Bestrahlung, 12 Tiere nach einer einmaligen Ganzkörperbestrahlung von 4 Gy und weitere 12 Tiere nach einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung von 12 Gy (3 x 4 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen) MR-tomographisch untersucht.

Die technischen Daten und die Bestrahlungszeiten sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Daten, die mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet sind, wurden speziell für die Bestrahlung der Kaninchen errechnet.

<b>Strahlenart:</b>	<b>Gammastrahlen</b>
Focus Hautabstand*:	250 cm
Feldgrösse*:	40 x 40 cm
Dosisleistung*:	0,935 Gy/min (in 100 cm Abstand 01/99)
Dosierungstiefe*:	7 cm (80 % Isodose)
Gerätetyp:	Philips 5105-Universal-Cobalt-60 (installiert seit 1984)
Quelle:	Isotop Cobalt 60
	Source S-4695
	Typ C-146
Aktivität: laut Zertifikat (1/1994):	373.0 TBq (10078 Curies) ± 3%
bei Auslieferung (3/1994):	Kenndosisleistung= 1,592 Gy/min
Quellendurchmesser:	2 cm

**Tabelle 6: technische Bestrahlungsdaten**

Daraus ergab sich eine Gesamtbestrahlungszeit von 33,44 Minuten und eine Bestrahlungsdosis pro Feld von 16,72 Minuten für 4 Gray.

Da zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestrahlt worden ist (Juli 1998, November 1998 und Januar 1999), ergaben sich unterschiedliche Dosisleistungen, so daß die Bestrahlungsdosis jeweils neu errechnet werden mußte.

Im Juli 1998 bestrahlten wir mit 15,41 min/Feld, im November 1998 mit 16,41 min/Feld und im Januar 1999 mit 16,72 min/Feld. Die genaue Errechnung der jeweiligen Bestrahlungsdosen sind im folgenden Rechenbeispiel (anhand Januar 1999) genauer nachzuvollziehen:

Die Dosisleistung bei einem Abstand von 100 cm und einer Feldgrösse von 40x40 cm ergibt 0,935 Gy/min. Das entspricht einer Bestrahlungszeit von 1,07

Minuten für ein Gray. Die Bestrahlungszeit für eine bestimmte Dosis und einer bestimmten Feldgröße in einer gewünschten Bestrahlungstiefe berechnet sich nach der Dosis, der Dosisleistung (s.o.), dem Abstand- Quadrat- Gesetz und aus der Tiefendosistabelle. In einer Tiefe von 7 cm verläuft die 80% Isodose.

$$(4 \text{ Gy} \div 80\%) \times (1,07 \text{ Min.} \div \text{Gy}) \times (250\text{cm} \div 100\text{cm})^2 = 33,44 \text{ min.}$$

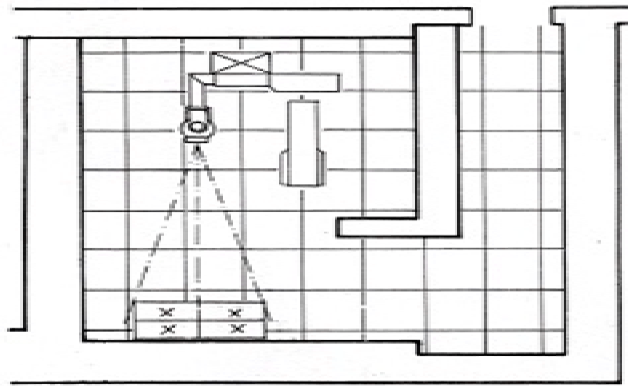
$$33,44 \text{ min} \div 2 = 16,72 \text{ min/Feld}$$

In jeder Gruppe erfolgte zudem bei jeweils 4 Kaninchen eine MR-tomographische Darstellung des Knochenmarkes ohne vorheriger Bestrahlung unter Verwendung von den Kontrastmitteln Ferumoxides, Ferumoxtran oder Gd-DOTA (Tabelle 7).

<b>Gruppe</b>	<b>MRT prä Rx</b>	<b>Radiatio (Rx)</b>	<b>MRT post Rx</b>
1) n=4	Ferumoxides		
2) n=4		4 Gy	Ferumoxides
3) n=4		12 Gy	Ferumoxides
4) n=4	Ferumoxtran		
5) n=4		4 Gy	Ferumoxtran
6) n=4		12 Gy	Ferumoxtran
7) n=4	Gd-DOTA		
8) n=4		4 Gy	Gd-DOTA
9) n=4		12 Gy	Gd-DOTA

**Tabelle 7: Einteilung der Kaninchen in die jeweiligen Gruppen**

Die genaue Anordnung der Kaninchen im Bestrahlungsraum ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Bestrahlungsraum (x = Kaninchen)**

Die experimentelle Studie sollte zeigen, ob Ferumoxides oder Ferumoxtran besser sukzessive radiogene Änderungen der Knochenmark-Physiologie zeigen kann. Dazu wurden MRT-Veränderungen des Knochenmarkes nach geringer (4 Gy) und für den Menschen normalerweise im Rahmen einer Konditionierungstherapie angewendeter einmaligen Ganzkörperbestrahlungsdosis (3 x 4 Gy) verglichen. Die nicht-bestrahlten Kaninchen wurden im Hinblick auf die Markierung des normalen hämatopoetischen Knochenmarkes und der Quantifizierung der BMB hin untersucht. Hier wurden die eisenoxid-haltigen Kontrastmittel (SPIO und USPIO) mit dem Standard-Kontrastmittel Gd-DOTA verglichen.

Nach Abschluß sämtlicher Untersuchungen wurden die Tiere durch intrakardiale Injektion von 3 ml T61 (0.2 g Embutramid, 0.05 g Mebezoniumjodid, 0.005 g Tetracainhydrochloride per ml) geopfert. Anschließend wurden Präparate aus der LWS, dem Os sacrum und der paravertebralen Muskulatur zur histologischen Aufarbeitung entnommen.



## 3.2. MR-Kontrastmittel

Die im vorangehenden Kapitel „Grundlagen“ ausführlich beschriebenen Kontrastmittel Gd-DOTA (Dotarem<sup>®</sup>), Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>) und Ferumoxtran (Sinerem<sup>®</sup>) wurden für diese tierexperimentelle Studie wie folgt intravenös in eine Ohrvene injiziert.

Dotarem<sup>®</sup> wurde in einer Dosis von 0,1 mmol Gd/ kg KG als Bolus intravenös injiziert. Diese Kontrastmittel-Dosierung entspricht den Empfehlungen des Herstellers für klinische Anwendungen.

Endorem<sup>®</sup> wurde in der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 15 µmol Fe/ kg KG in 5 ml einer 5%-Glucose-Lösung aufgelöst und über einen 5 µm-Filter innerhalb von 60-120 Sekunden intravenös injiziert.

Sinerem<sup>®</sup> wurde in einer Dosis von 30 µmol Fe/ kg KG verwendet. Auch diese Lösung wurde über einen Zeitraum von 60-120 Sekunden und über einen 5 µm Filter intravenös injiziert.

### 3.3. MRT-Gerät und Pulssequenzen

Zur Erstellung der MRT-Bilder der LWS und des Os sacrum wurde ein Magnetom Vision-Scanner (Siemens, Erlangen) mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla und eine body-phased array Spule verwendet.

Zunächst wurden an sechs Kaninchen ein Vorversuch zur Puls-Sequenz-Optimierung mit einer axialen dynamischen T<sub>1</sub>-gewichteten Turbo-Spinecho (TSE) 500/15 (Repetitionszeit (T<sub>R</sub>)/Echozeit (T<sub>E</sub>)) und FLASH 60°/150/4 (Flipwinkel  $\alpha$ /T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Sequenzen sowie T<sub>2</sub>-gewichteten FLASH 20°/50/10 ( $\alpha$ /T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Sequenzen untersucht (Tabelle 8). Für diese Untersuchungen wurde drei zusätzlichen Kaninchen das Kontrastmittel Ferumoxides und weiteren drei Kaninchen das Kontrastmittel Ferumoxtran injiziert.

Kontrastmittel	Radiatio	Kaninchen	Pulssequenz Optimierung		
Ferumoxtran	prä Rx	K1	TSE 500/15	FLASH 60°/150/4	FLASH 20°/50/10
Ferumoxtran	prä Rx	K2	TSE 500/15	FLASH 60°/150/4	FLASH 20°/50/10
Ferumoxtran	prä Rx	K3	TSE 500/15	FLASH 60°/150/4	FLASH 20°/50/10
Ferumoxides	prä Rx	K1	TSE 500/15	FLASH 60°/150/4	FLASH 20°/50/10
Ferumoxides	prä Rx	K2	TSE 500/15	FLASH 60°/150/4	FLASH 20°/50/10
Ferumoxides	prä Rx	K3	TSE 500/15	FLASH 60°/150/4	FLASH 20°/50/10

**Tabelle 8: Pulssequenz Optimierung an 6 zusätzlichen Kaninchen**

Im Anschluß an die Pulssequenz-Optimierung wurden 36 Kaninchen im Rahmen der Studienuntersuchungen untersucht. Es wurden zunächst statische, native, axiale Pulssequenzen durch LWS und Os sacrum vor Kontrastmittelgabe durchgeführt: T<sub>1</sub>-gewichtete Turbo Spinecho (TSE) 500/15 (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Aufnahmen und T<sub>2</sub>-gewichtete TSE 4000/90 (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Aufnahmen. Dabei wurden jeweils Bilder mit einer Matrix von 256 x 256 Pixel, einem Bildausschnitt ("field of view" = FOV) von 50 cm und einer Schichtdicke von 4 mm

aufgenommen. Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, daß T<sub>2</sub>-gewichtete TSE-Sequenzen sensitiver für einen Signalabfall des Knochenmarkes nach Eisenoxid-Aufnahme sind als konventionelle T<sub>2</sub>-gewichtete SE-Aufnahmen (8) wurden keine konventionellen T<sub>2</sub>-gewichteten Aufnahmen durchgeführt. Das normale Knochenmark wird bereits auf nativen Aufnahmen in konventionellen T<sub>2</sub>-gewichteten SE-Aufnahmen sehr signalarm dargestellt, so daß ein weiterer Signalabfall begrenzt ist (8).

Danach erfolgten dynamische repetitive axiale Aufnahmen durch das Os sacrum, die direkt vor und nach Kontrastmittel-Injektion von Ferumoxides, Ferumoxtran oder Gd-DOTA durchgeführt wurden (Tabelle 9). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Pulssequenz-Optimierung wurden dynamische Untersuchungen in einer axialen Schichtebene mit Ferumoxtran und Gd-DOTA unter Verwendung einer 2D-FLASH 50/4/60° (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>/α)-Sequenz mit einer Schichtdicke von 4mm, einer Matrix von 128 x 128 Pixel und einem FOV von 30 cm durchgeführt. Oberhalb und unterhalb der untersuchten Schichten wurden Versättigungspulse plziert um Flußeffecte aus den Blutgefäßen zu eliminieren. Insgesamt wurden jeweils drei präkontrast- und 60 postkontrast-Aufnahmen erstellt. Für die ersten 40 Aufnahmen wurde ein Intervall von 30 Sekunden und für die folgenden 20 Aufnahmen ein Intervall von 120 Sekunden gewählt. T<sub>1</sub>-gewichtete SE 500/15 Sequenzen wurden für die dynamischen Untersuchungen nach Injektion von Ferumoxides verwendet (Tabelle 9). Sie umfaßten drei präkontrast- und 30 postkontrast-Aufnahmen mit einem Intervall von 120 Sekunden. Die Untersuchungszeit betrug für alle dynamischen Untersuchungen 60 Minuten.

Etwa 60 Minuten nach Kontrastmittel-Injektion (späte Kontrastmittelphase, Tabelle 10), wurden nochmals T<sub>1</sub>-gewichtete TSE 500/15 (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Aufnahmen und T<sub>2</sub>-gewichtete TSE 4000/90 (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Aufnahmen durch die LWS und das Os sacrum in identischer Technik zu den Aufnahmen vor Kontrastmittelgabe durchgeführt. Die gesamte MRT-Untersuchung erforderte eine Untersuchungszeit von etwa 1,5 Stunden.

Kontrastmittel	Radiatio	Kaninchen	Sequenzen			
Ferumoxtran	prä Rx	K1	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxtran	prä Rx	K2	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxtran	prä Rx	K3	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxtran	prä Rx	K4	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxtran	post 4 Gy	K1			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 4 Gy	K2			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 4 Gy	K3			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 4 Gy	K4			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 12Gy	K1			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 12Gy	K2			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 12Gy	K3			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxtran	post 12Gy	K4			FLASH 50/4/60°	
Ferumoxides	prä Rx	K1	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxides	prä Rx	K2	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxides	prä Rx	K3	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxides	prä Rx	K4	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Ferumoxides	post 4 Gy	K1				TSE 500/15
Ferumoxides	post 4 Gy	K2				TSE 500/15
Ferumoxides	post 4 Gy	K3				TSE 500/15
Ferumoxides	post 4 Gy	K4				TSE 500/15
Ferumoxides	post 12Gy	K1				TSE 500/15
Ferumoxides	post 12Gy	K2				TSE 500/15
Ferumoxides	post 12Gy	K3				TSE 500/15
Ferumoxides	post 12Gy	K4				TSE 500/15
Gd-DOTA	prä Rx	K1	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Gd-DOTA	prä Rx	K2	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Gd-DOTA	prä Rx	K3	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Gd-DOTA	prä Rx	K4	TSE 500/15	TSE 4000/90		
Gd-DOTA	post 4 Gy	K1			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 4 Gy	K2			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 4 Gy	K3			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 4 Gy	K4			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 12Gy	K1			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 12Gy	K2			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 12Gy	K3			FLASH 50/4/60°	
Gd-DOTA	post 12Gy	K4			FLASH 50/4/60°	

**Tabelle 9: Statische und dynamische Pulssequenzen**

Kontrastmittel	Radiatio (Rx)	Kaninchen	Spätkontrast	
Ferumoxtran	prä Rx	K1		
Ferumoxtran	prä Rx	K2		
Ferumoxtran	prä Rx	K3		
Ferumoxtran	prä Rx	K4		
Ferumoxtran	post 4 Gy	K1	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 4 Gy	K2	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 4 Gy	K3	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 4 Gy	K4	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 12 Gy	K1	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 12 Gy	K2	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 12 Gy	K3	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxtran	post 12 Gy	K4	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	prä Rx	K1		
Ferumoxides	prä Rx	K2		
Ferumoxides	prä Rx	K3		
Ferumoxides	prä Rx	K4		
Ferumoxides	post 4 Gy	K1	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 4 Gy	K2	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 4 Gy	K3	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 4 Gy	K4	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 12 Gy	K1	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 12 Gy	K2	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 12 Gy	K3	TSE 500/15	TSE 4000/96
Ferumoxides	post 12 Gy	K4	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	prä Rx	K1		
Gd-DOTA	prä Rx	K2		
Gd-DOTA	prä Rx	K3		
Gd-DOTA	prä Rx	K4		
Gd-DOTA	post 4 Gy	K1	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 4 Gy	K2	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 4 Gy	K3	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 4 Gy	K4	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 12 Gy	K1	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 12 Gy	K2	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 12 Gy	K3	TSE 500/15	TSE 4000/96
Gd-DOTA	post 12 Gy	K4	TSE 500/15	TSE 4000/96

**Tabelle 10: Aufnahmen sechzig Minuten nach Kontrastmittel-Injektion**

### 3.4. Auswertung der MR-Daten

Die MR-Aufnahmen wurden ausgewertet, indem die Signalintensitäten (SI) von Knochenmark des Os sacrum und Blut der Vena cava inferior oder Vena iliaca communis, innerhalb einer frei wählbaren Untersuchungsregion (ROI, region of interest) gemessen wurde.

Um eventuell auftretende geringe Variationen des Spektrometers zu korrigieren, wurden die mittleren gemessenen Signalintensitäten durch die Signalintensität des Referenz-Phantoms dividiert. Das relative positive oder negative Kontrastmittel-Enhancement von Blut und Knochenmark wurde als Differenz der Signalintensität vor ( $SI_{prä}$ ) und nach ( $SI_{post}$ ) Kontrastmittelinjektion, normiert auf die präkontrast-Signalintensitäten, wie folgt berechnet:

$$\Delta SI = | ((SI_{post} - SI_{prä}) / SI_{prä}) \times 100\% |.$$

Die Messung der  $\Delta SI$ -Werte erfolgte für die verschiedenen Kontrastmittel, die verschiedenen Pulssequenzen und verschiedenen Aufnahmen vor Bestrahlung sowie nach 4 und 12 Gy Bestrahlung.

### 3.5. Histopathologie

Die erhaltenen quantitativen MR-Daten wurden mit der Histopathologie des Knochenmarkes verglichen. Es wurden repräsentative Schnitte durch den 5. LWK und das Os sacrum auf die relative Zellzahl und auf die Intaktheit des RES und der Blut-Knochenmark-Schranke hin untersucht.

Es wurden gesamte Lendenwirbelkörper explantiert, mit 36%igem Formalin fixiert und mit Ossafix (3% Formaldehyd, 2% Zinkchlorid und 0,9% NaCl-Lösung) entkalkt. Die zugeschnittenen, fixierten und entkalkten Gewebe wurden mit dem Autotechnikon in 22 Stunden mit einer ansteigenden Alkoholreihe (1 x 50 % Alkohol, 1 x 70 % Alkohol, 1 x 80 % Alkohol, 1 x 96 % Alkohol, 3 x 99 % Alkohol) entwässert und mit n-Butylacetat weiterbehandelt. Danach wurden die histologischen Präparate in Paraffin bei einer Temperatur von 60° Celsius eingebettet. Auf der -12° Celsius kalten Kühlplatte kühlten die Paraffinblöckchen ab.

Entsprechend der MR-Schnittführung wurden die entkalkten und in Paraffin gebetteten Knochenmarkproben mit einem Schlittenmikrotom axial geschnitten. Die 5 µm dünnen Schnitte wurden in einem Wasserbad gestreckt und dann auf Objektträger gezogen. Bevor die Proben erneut über Nacht bei 37° Celsius im Brutschrank gestreckt wurden, fügten wir Aqua dest. und einige Tropfen Eiweißglycerin hinzu.

Danach wurden die Schnittpräparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Berliner Blau (BB) gefärbt. Die genauen Durchführungen der einzelnen Färbeschritte sind Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13 zu entnehmen.

### **Berliner-Blau-Färbung (BB)**

#### Durchführung:

5 Minuten entparaffinieren in 2 x Roti-Histol

je 5 Minuten in der absteigende Alkoholreihe  
zur Entfernung des Roti-Histols eintauchen in:

2 x 99 %iger Alkohol

1 x 96 %iger Alkohol

1 x 70 %iger Alkohol

1 x 50 %iger Alkohol

1 x Aqua dest.

15 Minuten mit 2 %igem Kaliumhexacyanoferrat II und  
2 %igem HCl-Wasser (im Verhältnis 1:1 mischen) färben

Schnitte in Aqua dest. abspülen

5 Minuten mit Kernechtrotaluminiumsulfat färben (Kernfärbung)

gründliches Abspülen der Farblösung in Aqua dest.

je 1 Minute Schnitte eintauchen in:

2 x 70 %iger Alkohol

1 x 96 %iger Alkohol

2 x 99 %iger Alkohol

Eindecken mit DePeX

Abspülen mit Aqua dest.

#### Ergebnis:

Rot: Fe III-Ionen

Blau: Zellkerne

**Tabelle 11: Berliner-Blau-Färbung**



### Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

#### Durchführung:

5 Minuten entparaffinieren in 2 x Roti-Histol

je 5 Minuten in der absteigenden Alkoholreihe zur Entfernung des Roti-Histols eintauchen in:

1 x 99 %iger Alkohol

1 x 96 %iger Alkohol

1 x 70 %iger Alkohol

als Vorbereitung auf die wässrige Farblösung 5 Minuten in Aqua dest. tauchen

5 Minuten mit Hämalan nach Mayer\* färben

5 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen

ca. 30 Sekunden mit 200ml Eosin-Gebrauchslösung\*\* färben

je 1 Minute Schnitte eintauchen in:

2 x 70 %igem Alkohol

1 x 96 %igem Alkohol

2 x 99 %igem Alkohol

je 5 Minuten 2 x Roti-Histol eintauchen und mit DePeX eindecken

#### Ergebnis:

Blau:

Zellkerne

Kalk

gram-positive Bakterien (durch Hämalan nach Mayer\*)

Knorpelsubstanz (durch Hämalan nach Mayer)

#### Verschiedene Rottöne:

Zytoplasma

Bindegewebe und Kollagenfasern (durch Eosin)

Erythrozyten (durch Eosin)

**Tabelle 12: Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

**\*Hämalaun nach Mayer**

2000 ml Aqua dest. zum Kochen bringen

30 Minuten rühren unter Zugabe von:

2g Hämatoxylin

0,4g Natriumjodat

100g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat

unter Papierkontrolle (bis Farbumschlag auf blau-violett) hinzugeben

100g Chloralhydrat hinzugeben

2g Citronensäure-1-hydrat

unter Papierkontrolle (bis Farbumschlag auf rot-violett) hinzugeben

Die Farblösung sollte noch 6 Wochen stehen, bevor sie zum Färben benutzt werden kann.

**Tabelle 13: \*Hämalaun nach Mayer**

Die \*\*Eosin-Stammlösung wurde aus 10 g Eosin und 1000 ml 70%igem Alkohol angefertigt. Die \*\*Eosin-Gebrauchslösung wurde aus 10 ml Eosin-Stammlösung, 90 ml Aqua dest. und ca. 3 Tropfen Eisessig hergestellt.

Anhand der Hämatoxylin-Eosin-Präparate untersuchte ein erfahrener Tierpathologe die relative Anzahl der hämatopoetischen Zellen im Vergleich zu Stroma- und Fettzellen vor und nach Bestrahlung. Die Eisenaufnahme im bestrahlten und nicht bestrahlten Knochenmark nach Injektion von Ferumoxtran, Ferumoxides und Gd-DOTA wurde anhand der Berliner-Blau-Präparate lichtmikroskopisch untersucht. Hier wurde die Eisenreaktion des Knochenmarkes als nicht nachweisbar (n.n.), gering positiv (+) oder deutlich positiv (++) bewertet.

### 3.6. Statistik

Die quantitativen Werte für die Knochenmark-Signalintensitäten vor ( $SI_{\text{prä}}$ ) und nach ( $SI_{\text{post}}$ ) Injektion von Ferumoxides, Ferumoxtran und Gd-DOTA und das Knochenmark-Enhancement ( $\Delta SI$  (%)) wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgeführt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den Daten vor und nach Kontrastmittelinjektion und den Daten vor und nach Radiatio wurde mit einer Varianzanalyse für repetitive Messungen (T-Test für gepaarte Stichproben) analysiert. Die Signifikanz von Unterschieden der SI- und  $\Delta SI$  (%) -Mittelwerte wurde mit dem Scheffe´s-Test getestet. Das Signifikanzniveau wurde für  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Alle statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung eines "Stat View" (4.0)-Computerprogramms durchgeführt.

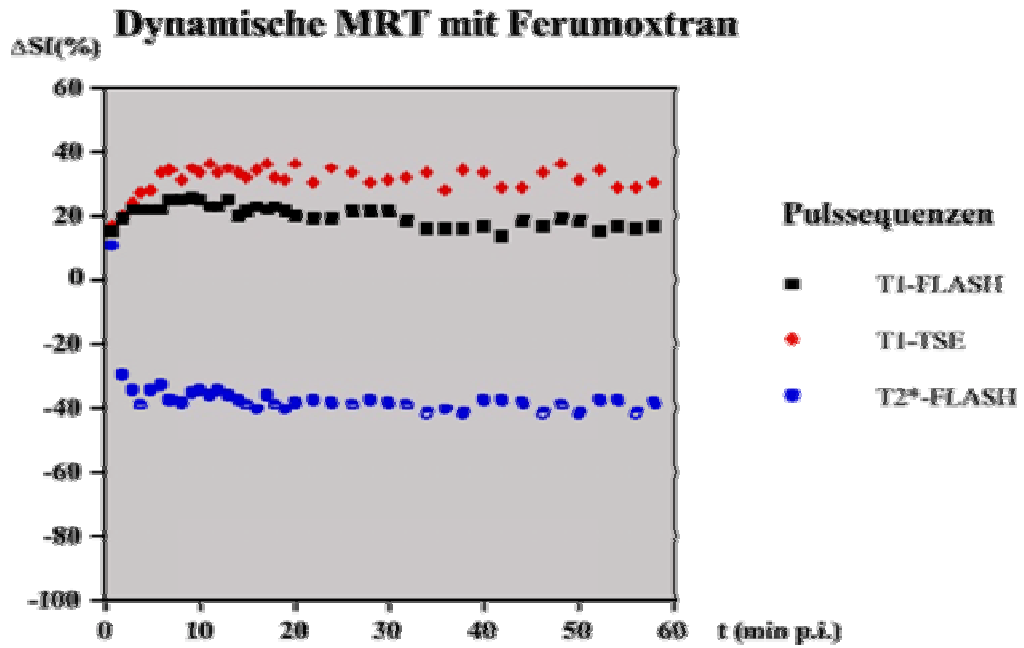
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Pulssequenz-Optimierung

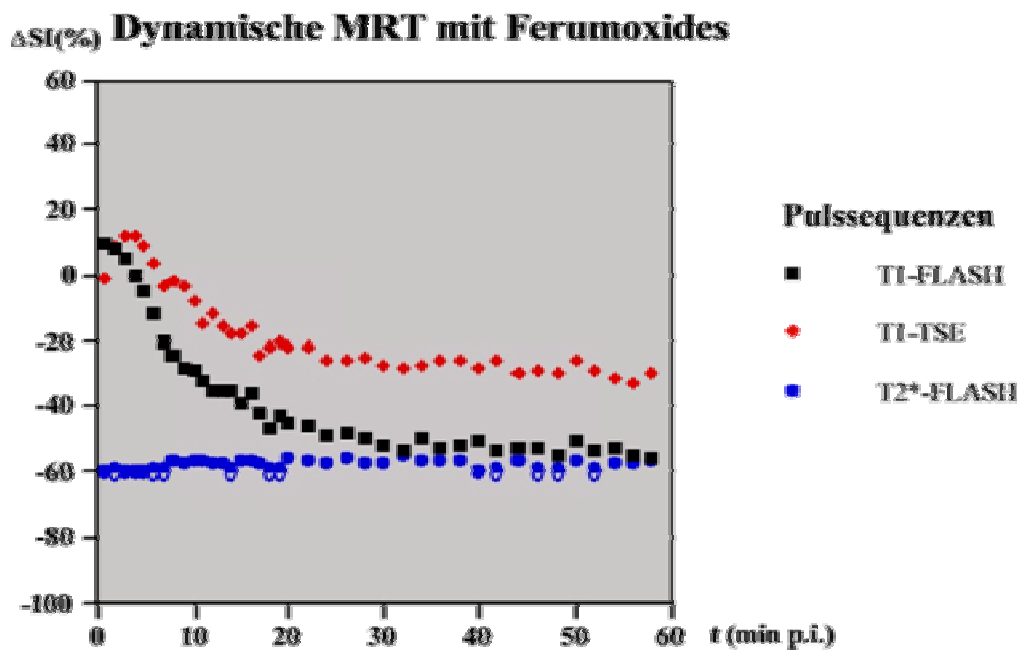
Für Ferumoxides ergab die initiale Perfusionsphase auf den  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen zunächst einen Signalanstieg des Knochenmarkes (Abbildung 9 b). Mit steigender SPIO-Anreicherung im Knochenmark nahm dann jedoch der Signalabfall stetig zu. Dieser überlagernde  $T_2$ -Effekt war bei der  $T_1$ -gewichteten SE-Sequenz deutlich niedriger als bei der Suszeptibilitäts-empfindlicheren  $T_1$ -gewichteten FLASH-Sequenz (relativ kurzes  $T_E = 4$  ms) (Abbildung 9 b). Eine weitere Reduzierung der Echozeiten für die  $T_1$ -gewichteten FLASH-Sequenzen war an dem von uns verwendeten klinischen Standard-MR-Scanner zum Zeitpunkt der Studiendurchführung nicht möglich.

Auf  $T_2^*$ -gewichteten FLASH-Aufnahmen (relativ langes  $T_E = 10$  ms) zeigte Ferumoxides, wie auch Ferumoxtran, einen signifikanten Signalabfall, der jedoch bei der jeweils verwendeten Standarddosis einen Sättigungseffekt zeigte ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 9 a, b).

Die Kontrastmitteldosis konnte für Ferumoxides nicht weiter verringert werden, da die Aufnahme in das Knochenmark für SPIO unter 5% der injizierten Dosis beträgt. Aus diesem Grund wurde die  $T_1$ -gewichtete SE-Sequenz als die am wenigsten Suszeptibilitäts-empfindliche Sequenz für die nachfolgenden Perfusionsstudien des Knochenmarkes ausgewählt.



(a)



(b)

Abbildung 9: Pulssequenz Optimierung: Dynamische Untersuchungen nach Injektion von Ferumoxtran (a) und Ferumoxides (b) unter Verwendung von  $T_1$ - und  $T_2$ -gewichteten Spinecho- sowie  $T_2^*$ -gewichtete FLASH-Sequenzen

Dagegen ergab die initiale Pulssequenz-Optimierung auf  $T_1$ -gewichteten FLASH- und TSE-Aufnahmen für Ferumoxtran ein signifikantes, positives Enhancement ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 9 a). Auf  $T_2^*$ -gewichteten FLASH-Aufnahmen (relativ langes  $T_E = 10$  ms) zeigte USPIO einen signifikanten Signalabfall (Abbildung 9 a). Diese Reduzierung der Signalintensität zeigte jedoch bei der verwendeten Standarddosis einen Sättigungseffekt ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 9 a).

## 4.2. Dynamische Untersuchungen der Knochenmark-Perfusion

Repräsentative Aufnahmen der dynamischen Untersuchungen für die drei verschiedenen Kontrastmittel, Gd-DOTA, Ferumoxtran und Ferumoxides, sind in den Abbildungen 10 und 11 gezeigt. Im Vergleich zum nicht bestrahlten Knochenmark zeigten dynamische  $T_1$ -gewichtete FLASH-Aufnahmen des Os sacrum nach Injektion von Gd-DOTA für das bestrahlte Knochenmark ein zunehmendes Knochenmark-Enhancement. Zudem zeigten sich für das bestrahlte Knochenmark signifikant höhere  $\Delta SI(\%)$ -Werte (Abbildung 12;  $p < 0,05$ ). Histologisch entsprachen diese Signaländerungen dilatierten Knochenmark-Sinus, die auf die Bestrahlung zurückzuführen sind. Es bildeten sich interstitielle Ödeme mit erhöhten Extrazellulärvolumina. Die Gd-DOTA-unterstützten Aufnahmen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede der  $\Delta SI(\%)$ -Werte nach Bestrahlung mit geringer (4 Gy) und höherer (12 Gy) Dosis ( $p > 0,05$ , Abbildung 12).

Nach Ferumoxides-Injektion zeigte das Knochenmark in allen Fällen vor Bestrahlung, nach 4 Gy- und nach 12 Gy-Bestrahlung zunächst einen Signalanstieg auf dynamischen  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen (Abbildung 10). Sowohl auf  $T_1$ -gewichtete FLASH-Aufnahmen als auch auf  $T_1$ -gewichtete SE-Aufnahmen folgte ein kontinuierlicher Abfall der Signalintensität und ein deutlicher zunehmender  $T_2$ -Effekt des Kontrastmittels (Abbildung 11). Die für die kinetischen Untersuchungen bevorzugten, weniger suszeptibilitätsempfindlichen dynamischen SE-Sequenzen zeigten mit zunehmender Bestrahlung zusätzlich einen zunehmenden  $T_1$ -Effekt (Abbildung 10).

Die  $\Delta SI(\%)$ -Werte des Knochenmarkes vor Bestrahlung, nach 4 Gy- und nach 12 Gy-Bestrahlung nahmen sukzessive zu. Da jedoch sowohl additive  $T_1$ - und  $T_2$ -Effekte als auch die Kontrastmittel-Konzentration das Knochenmark-Signal

bestimmten, waren diese Ergebnisse für eine Charakterisierung der Sinus-Integrität nicht verwertbar (Abbildung 10). Da ein Äquilibrium erreicht wurde zeigten die 30-40 Minuten nach der Kontrastmittel-Injektion durchgeführten dynamischen Aufnahmen keine signifikanten Signaländerungen.

Dagegen zeigten dynamische  $T_1$ -gewichtete FLASH-Aufnahmen nach Ferumoxtran-Injektion signifikant unterschiedliche  $\Delta SI(\%)$  Werte für alle drei Studiengruppen (Abbildung 12;  $p < 0,05$ ). Das bestrahlte Knochenmark zeigte ein deutliches Enhancement, das mit zunehmender Bestrahlungsdosis weiter zunahm (Abbildung 10). Ein geringes Ferumoxtran-Enhancement ging dagegen vom nicht bestrahlten Knochenmark aus (Abbildungen 10, 11). Die  $\Delta SI(\%)$ -Werte des Knochenmarkes vor Bestrahlung waren signifikant geringer im Vergleich zu den  $\Delta SI(\%)$  Werten nach gering dosierter Bestrahlung (4 Gy). Nach der Standard-Bestrahlung mit 12 Gy ergab sich die größte Reduktion der  $\Delta SI(\%)$  Werte (Abbildung 12;  $p < 0,05$ ).



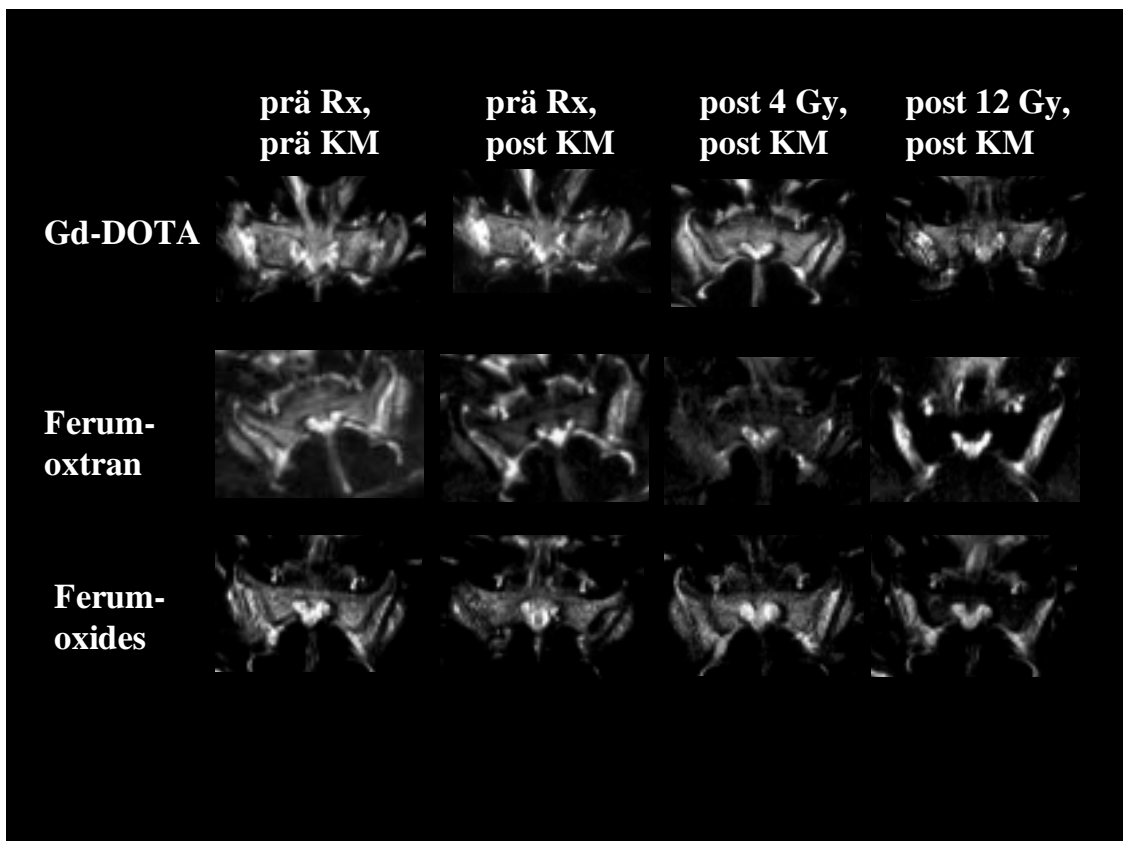


Abbildung 10: Repräsentative T<sub>2</sub>-gewichtete TSE 4000/96 (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Aufnahmen des Os sacrum vor und nach Injektion von Gd-DOTA (Dotarem<sup>®</sup>), Ferumoxtran (Sinerem<sup>®</sup>) und Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>), dargestellt vor Bestrahlung, nach 4-Gy- und 12-Gy-Ganzkörperbestrahlung (Rx = Bestrahlung, KM = Kontrastmittel).

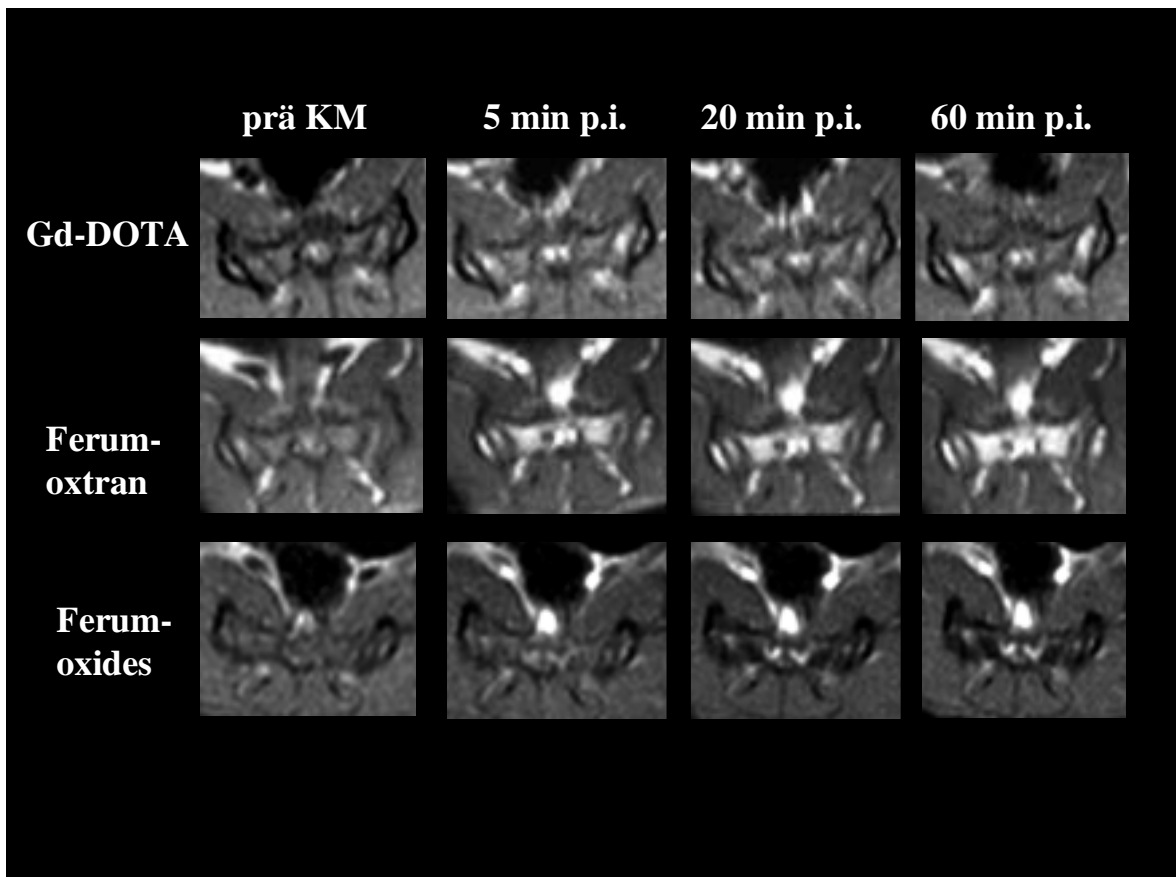


Abbildung 11: Repräsentativer Datensatz der dynamischen T<sub>1</sub>-gewichteten SE 500/15 (T<sub>R</sub>/T<sub>E</sub>)-Sequenz vor Kontrastmittelgabe sowie 5, 20 und 60 Minuten nach Injektion von Gd-DOTA (Dotarem<sup>®</sup>), Ferumoxtran (Sinerem<sup>®</sup>) und Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>)

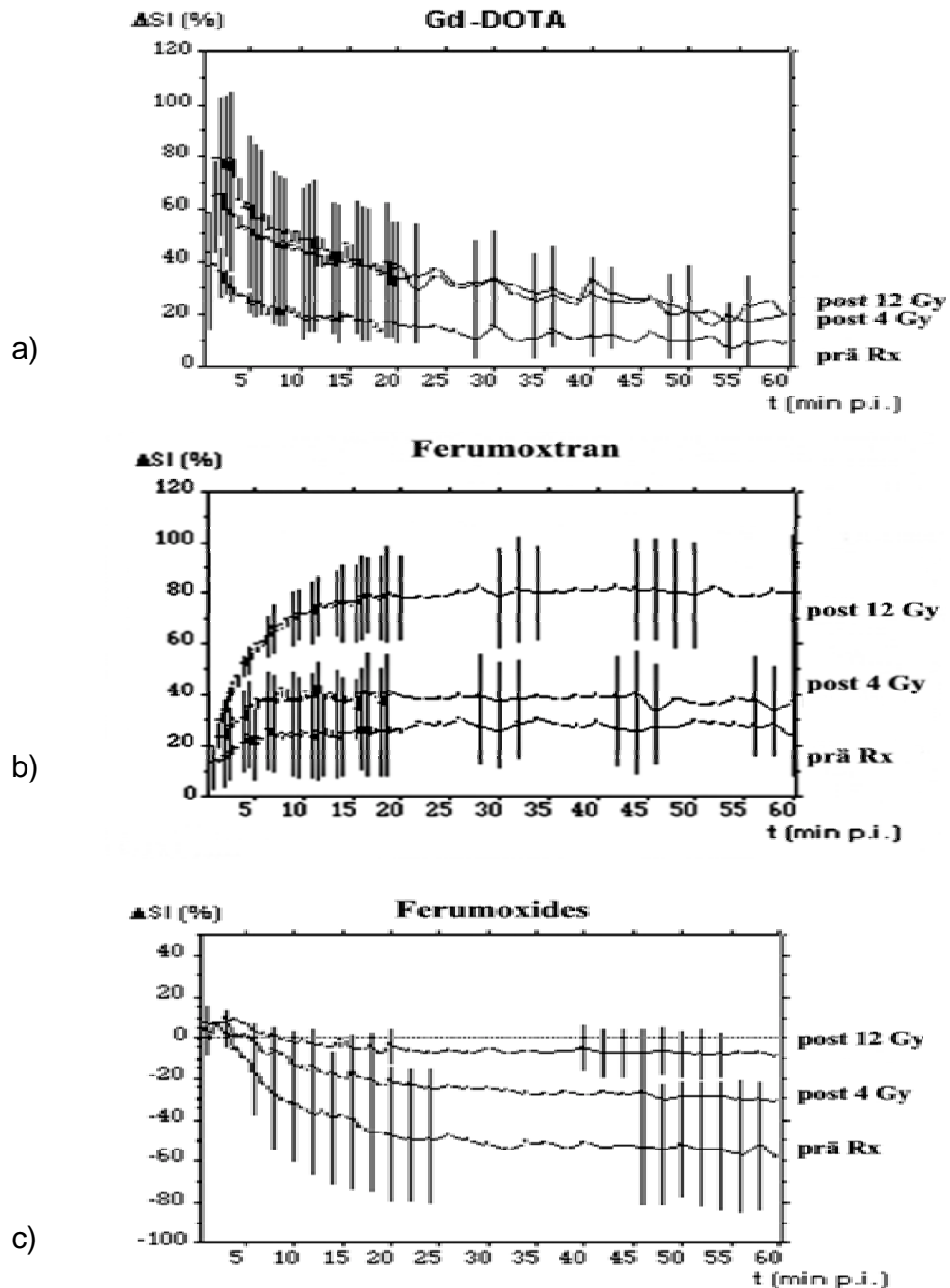


Abbildung 12: Dynamische  $\Delta SI(\%)$ -Werte des Knochenmarkes nach Injektion von Gd-DOTA (a), Ferumoxtran (b) und Ferumoxides (c), dargestellt als Mittelwerte von jeweils vier Untersuchungen vor Bestrahlung, nach 4 Gy- und 12 Gy-Bestrahlung mit Standardabweichungen.

### 4.3. RES-Phagozytoseaktivität des Knochenmarkes

Im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrollgruppe zeigten späte T<sub>2</sub>-gewichtete Aufnahmen nach Injektion von Ferumoxtran und Ferumoxides eine höhere Signalintensität des Knochenmarkes nach Bestrahlung mit 4 Gy und 12 Gy (Abbildung 10, Tabelle 14). Die Steigerung der Signalintensität ist hierbei auf das entstandene Knochenmark-Ödem zurückzuführen. Mit zunehmender Bestrahlung zeigte das Knochenmark ein zunehmendes Ödem auf nativen Aufnahmen und einen zunehmenden Signalabfall nach SPIO- und USPIO-Injektion (Abbildung 10).

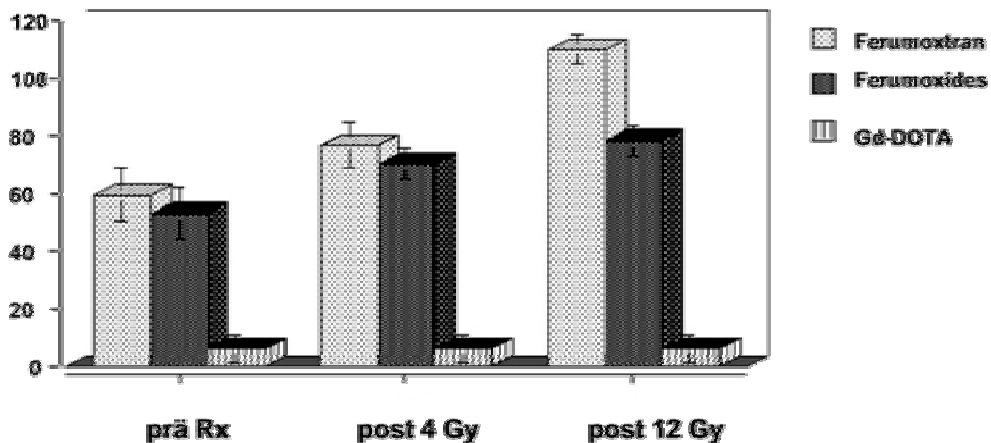
<b>MRT des Knochenmarkes</b>	<b>SI<sub>prä</sub></b>	<b>SI<sub>post</sub></b>	<b>ΔSI(%)</b>
<b>Ferumoxides</b>			
keine Bestrahlung	300,3±31,9	139,6±23,9	53,67 ± 4,22
post 4 Gy	406,4±52,9	110,3±24,1	73,04 ± 3,13
post 12 Gy	445,0±39,0	194,0±32,7	56,64 ± 3,92
<b>Ferumoxtran</b>			
keine Bestrahlung	288,2±46,8	168,0±53,9	43,02 ± 11,16
post 4 Gy	321,9±90,6	174,5±34,3	44,68 ± 6,98
post 12 Gy	410,6±31,3	101,5±40,8	75,72 ± 8,21
<b>Gd-DOTA</b>			
keine Bestrahlung	320,9±21,5	297,9±57,6	10,03 ± 9,47
post 4 Gy	360,3±28,1	380,9±15,0	5,97 ± 4,36
post 12 Gy	389,7±45,6	368,1±61,5	5,93 ± 5,99

**Tabelle 14: Vergleich der Knochenmark-Signalintensitäten (SI) auf T<sub>2</sub>-gewichteten Turbo-Spinecho-Sequenz-Aufnahmen vor (SI<sub>prä</sub>) und nach (SI<sub>post</sub>) SPIO- und USPIO-Injektion sowie des entsprechenden negativen Enhancements, quantifiziert als ΔSI(%).**

Späte T<sub>1</sub>-gewichtete Aufnahmen eine Stunde nach der Kontrastmittelinjektion zeigten für keines der drei Kontrastmittel signifikante Änderungen der  $\Delta SI(\%)$ -Werte vor Bestrahlung, nach 4 Gy und nach 12 Gy Bestrahlung.

Späte T<sub>2</sub>-gewichtete Aufnahmen eine Stunde nach der Kontrastmittelinjektion zeigten einen deutlichen Signalabfall des Knochenmarkes nach Injektion von Ferumoxtran und Ferumoxides, wobei für beide Kontrastmittel  $\Delta SI(\%)$ -Werte vor Bestrahlung, nach 4 Gy- und 12 Gy-Bestrahlung signifikant unterschiedlich waren ( $p < 0,05$ ). Nach Injektion von Ferumoxtran zeigte sich jedoch in jeder Gruppe vor und nach Bestrahlung ein größerer Signalabfall mit höheren  $\Delta SI(\%)$ -Werten im Vergleich zu Ferumoxides (Abbildung 13).

Gd-DOTA konnte, wie bei einem extrazellulären Kontrastmittel zu erwarten, die RES-Phagozytose nicht charakterisieren. Das Kontrastmittel zeigte keinen signifikanten T<sub>2</sub>-Effekt und die entsprechenden  $\Delta SI(\%)$ -Werte waren nicht signifikant unterschiedlich vor Bestrahlung, nach 4 Gy und 12 Gy Bestrahlung ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 13:  $\Delta SI$ -Daten des Knochenmarkes (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) für T<sub>2</sub>-gewichtete TSE-Aufnahmen nach Injektion von Gd-DOTA (Dotarem<sup>®</sup>), Ferumoxtran (Sinerem<sup>®</sup>) und Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup>)**

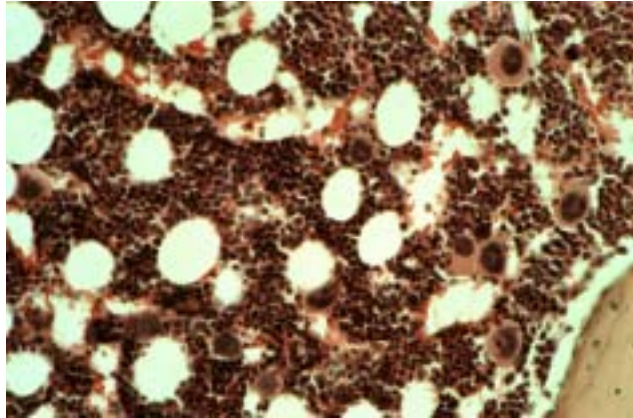
#### 4.4. Histopathologie

In den Abbildungen 14- 16 sind repräsentative histologische Präparate des Knochenmarkes vor, nach 4 Gy- und nach 12 Gy-Ganzkörperbestrahlung gezeigt. Nach der leichten (4 Gy; Abbildung 15) und starken, fraktionierten (12 Gy; Abbildung 16) Ganzkörperbestrahlung zeigte das Knochenmark eine zunehmende Entspeicherung. Die relative Zellzahl aller hämatopoetischen Zellreihen nahm unter Bestrahlung deutlich ab und die Knochenmark-Sinus zeigten eine zunehmende Dilatation und Hyperämie (Tabelle 15). Ein sehr zellreiches Knochenmark mit einzelnen Fettzellen und normalen hämatopoetischen Zellen und Megakaryozyten und allen Zellreihen der Hämatopoese, zeigte hingegen das nicht-bestrahlte Knochenmark (Abbildung 14). Das Knochenmark nach 4 Gy-Ganzkörperbestrahlung zeigte Pyknosen und Karyorhexis der blutbildenden Zellen, sowie dilatierte Sinus (Abbildung 15). Nach 12 Gy-Ganzkörperbestrahlung stellte sich das Knochenmark entspeichert dar. Es waren nur noch einzelne hämatopoetische Zellen im Stroma nachweisbar und die Knochenmark-Sinus zeigten eine zunehmende Dilatation und Hyperämie (Abbildung 16).

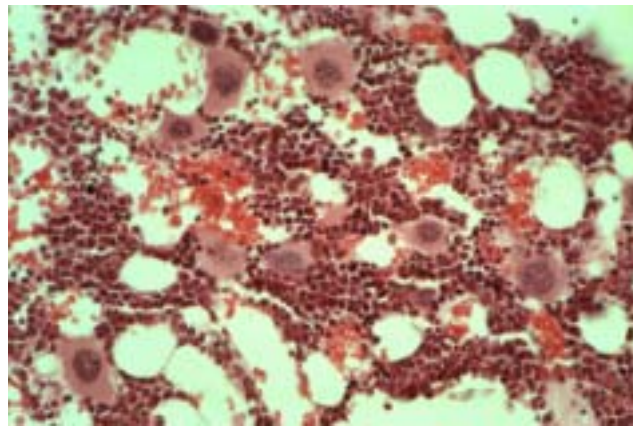
Die Berliner-Blau-Reaktion wurde in keinem Fall deutlich positiv. Das bestrahlte Knochenmark zeigte nach 4 Gy-Bestrahlung einen positiven Fall und nach 12 Gy-Bestrahlung zeigten drei Fälle eine positive Eisenreaktion (Tabelle 15). Die positive Eisenreaktion deutet auf eine geringe Akkumulation der Eisenoxide im Knochenmark hin, die unter Bestrahlung geringfügig zunahm (Abbildung 17). Beim nicht-bestrahlte Knochenmark fiel die Berliner-Blau-Reaktion negativ aus (Tabelle 15).

Da die Berliner-Blau-Färbung lediglich Eisen-III-Ionen und nicht Eisen-II-Ionen anfärbt, muß bei dieser Untersuchung berücksichtigt werden, daß nur ein Teil, der ohnehin geringen Eisenoxidpartikel im Knochenmark, mit dieser Methode nachgewiesen werden kann.

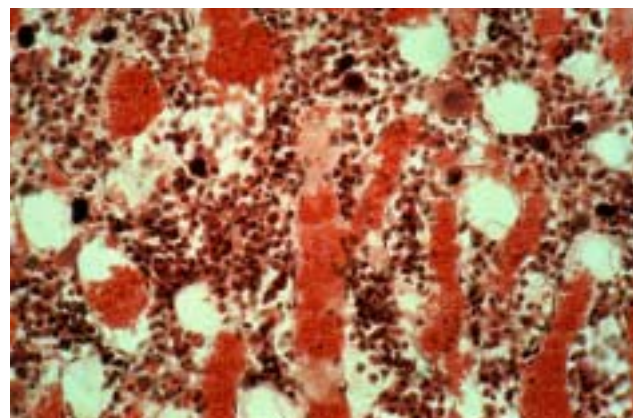
a)



b)



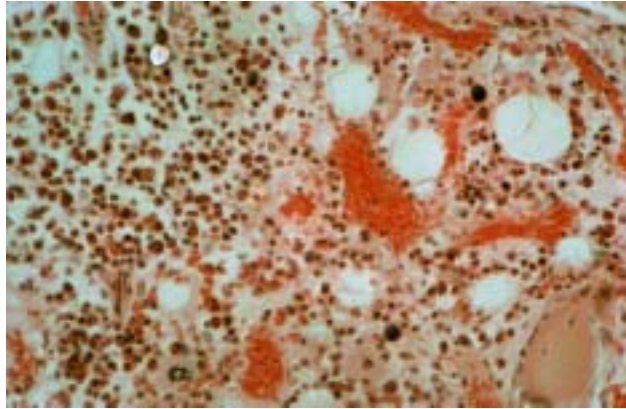
c)



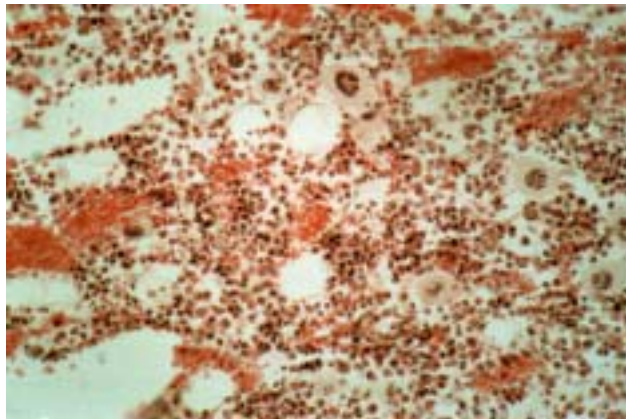
**Abbildung 14: Drei repräsentative Histologien des Knochenmarkes (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) vor Bestrahlung.**



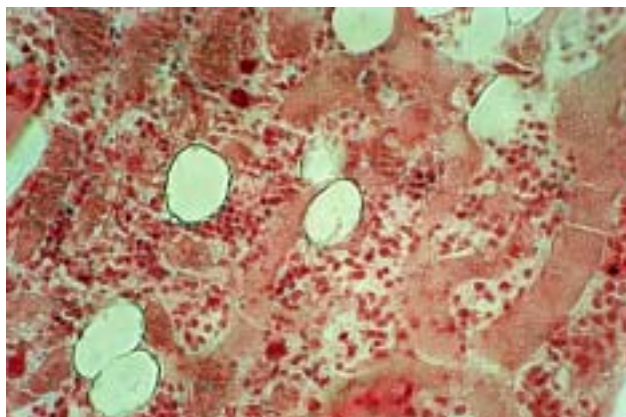
a)



b)



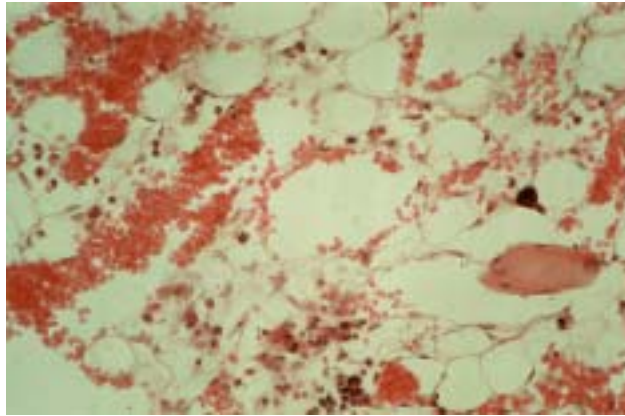
c)



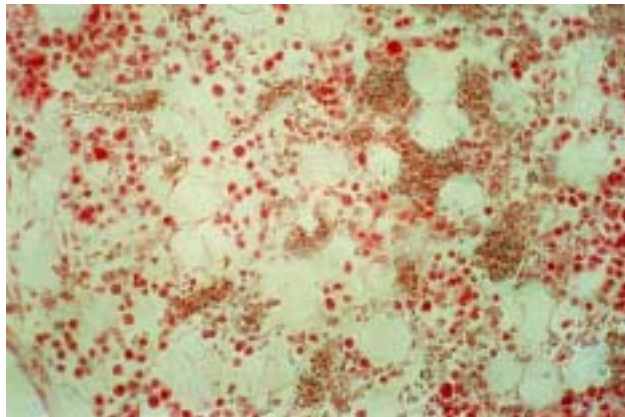
**Abbildung 15: Drei repräsentative Histologien des Knochenmarkes (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) nach 4 Gy- Ganzkörperbestrahlung.**



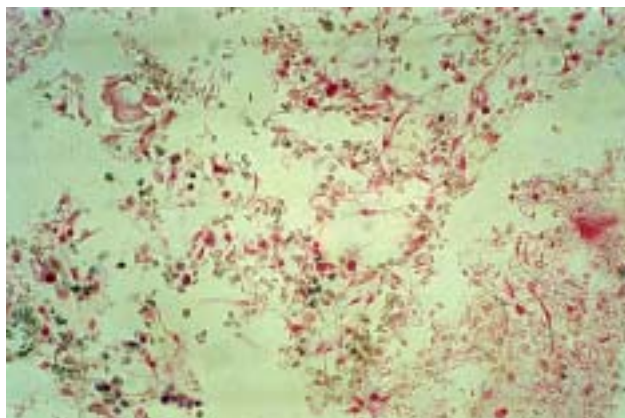
a)



b)

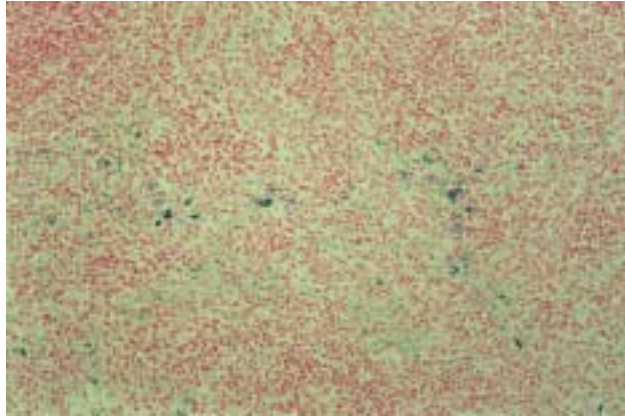


c)

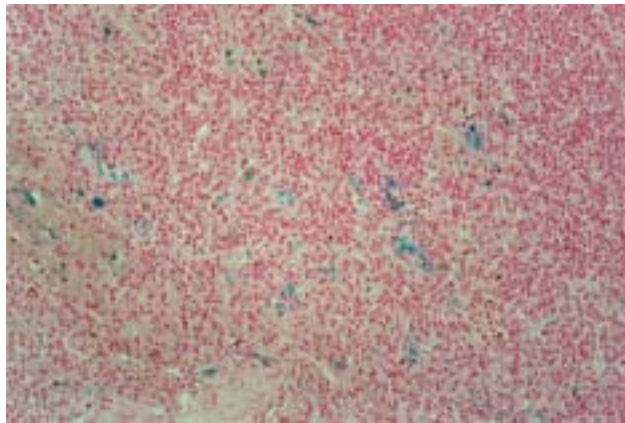


**Abbildung 16: Drei repräsentative Histologien des Knochenmarkes (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) nach 12 Gy-Ganzkörperbestrahlung.**

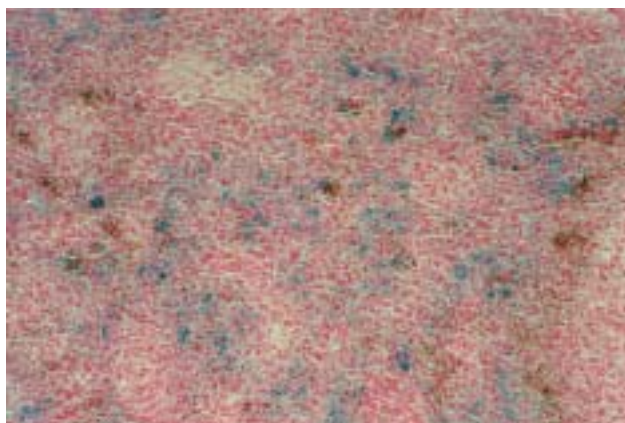
a)



b)



c)



**Abbildung 17: Drei repräsentative Histologien des Knochenmarkes (Berliner-Blau-Färbung) vor Bestrahlung (a) und nach 4 Gy- (b) und 12 Gy-Ganzkörperbestrahlung (c).**

Histologie Knochenmark	Präparat	Zellgehalt (H-E Färbung)	Eisengehalt (Berliner Blau)
keine Radiatio	#1	80-90%	n.n.
	#2	80-90%	n.n.
	#3	60-70%	n.n.
	#4	80-90%	n.n.
post 4Gy	#5	50-60%	n.n.
	#6	60-70%	n.n.
	#7	50-60%	+
	#8	50-60%	n.n.
post 12 Gy	#9	5-10%	+
	#10	5-10%	n.n.
	#11	20-30%	+
	#12	5-10%	+

**Tabelle 15: Histopathologie des nicht-bestrahlten Knochenmarkes sowie des Knochenmarkes nach 4 Gy- und 12 Gy-Ganzkörperbestrahlung mit Angabe der relativen Zellzahl hämatopoetischer Zellen im Vergleich zu Stroma- und Fettzellen, diagnostiziert anhand von Präparaten mit Standard Hämatoxylin-Eosin-Färbung, sowie Angabe der Eisenreaktion der Präparate nach Berliner-Blau-Färbung (n.n.= nicht nachweisbar, += gering positiv, ++= deutlich positiv)**

## 5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß die MR-tomographische Quantifizierung der Permeabilität der Blut-Knochenmark-Schranke und der RES-Phagozytoseaktivität des Knochenmarkes mit USPIO besser gelingt als mit SPIO oder Gd-DOTA. Zudem verdeutlicht sie, daß durch Verwendung von neuen eisenoxid-haltigen Kontrastmitteln eine Markierung der hämatopoetischen Zellen des Knochenmarkes möglich ist. Potentielle klinische Anwendungen dieser MR-tomographischen Untersuchungen der Knochenmark-Physiologie finden sich in der onkologischen Diagnostik, z.B. bei der Untersuchung von Patienten vor einer geplanten Knochenmark-Transplantation und bei der Untersuchung von Patienten mit Knochenmark-Tumoren.

Es ist zu erwarten, daß die USPIO-unterstützte MRT den Ablauf einer Knochenmark-Transplantation methodisch optimieren kann. Die bisherige Therapie-Strategie besteht darin, bei Patienten mit Leukämien und Lymphomen, die in Remission und infektfrei sind, zunächst eine intensive Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung durchzuführen und anschließend allogenes Knochenmarkspirat eines histokompatiblen Spenders intravenös zu infundieren. Histopathologische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Konditionierungstherapie vor der Knochenmark-Transplantation die endotheliale Permeabilität der Knochenmark-Sinus deutlich erhöht und damit den Eintritt der infundierten Spender-Stammzellen in das hämatopoetische Host-Kompartiment ermöglicht (20,80,81).

Anhand des Anstiegs der Granulozyten ist nach heutigem Forschungsstand erst zwei bis drei Wochen nach der Stammzelltransfusion abzusehen, ob die Knochenmark-Transplantation erfolgreich war. In der Literatur sind histologische Schädigungen der BMB-Ultrastruktur infolge Chemotherapie und Radiatio in der Prätransplantationsphase beschrieben worden (19,20). Die

Autoren folgerten, daß die Erhöhung der BMB-Permeabilität essentiell für die erfolgreiche Knochenmark-Transplantation sei, um den Eintritt der infundierten Stammzellen in das hämatopoetische Kompartiment zu gewährleisten (20,21). Dieser erfolgt im Intervall der erhöhten BMB-Permeabilität. Die Permeabilität der Knochenmark-Sinus, die die Blut-Knochenmark-Schranke bilden, ist damit ein entscheidender Faktor für die Fähigkeit des Empfängerorganismus zur Akzeptanz der histokompatiblen Spendersubstanz (20).

Neuere Studien haben gezeigt, daß die konditionierende Ganzkörperbestrahlung, deren Effekt auf das Zielgewebe bisher ohne individuelle Kontrolle erfolgt, ein Spektrum von Zweit-Tumoren induzieren kann (82). Die Reduktion der Dosis der Konditionierungs-Bestrahlung ist daher in neuen Therapieansätze das Ziel. Bisher ist nicht bekannt, welche minimale Dosis notwendig ist, um eine Eradikation von residuellen Tumorzellen und eine Hyperpermeabilität der Blut-Knochenmark-Schranke zu erreichen. Darüberhinaus gibt es bisher keine zuverlässige diagnostische Methode, diese Parameter in vivo zu quantifizieren. Unsere Studie hat gezeigt, daß die Permeabilität der Blut-Knochenmark-Schranke mit der dynamischen USPIO-unterstützten MRT quantifiziert werden kann. Diese Ergebnisse werden durch frühere MR-tomographische Untersuchungen unter Verwendung des makromolekularen Kontrastmittels Carboxymethyldextran-A2-Gd-DOTA bestätigt (18).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen ferner, daß das niedermolekulare Standard-Kontrastmittel Gadoterat-Meglumin (Gd-DOTA; Dotarem<sup>®</sup>; 500 Da) nicht geeignet für die Diagnostik von Änderungen der Permeabilität der Knochenmark-Sinus ist. Dies bestätigen Studien mit radioaktiv markiertem FITC-Dextran (3 kDa), <sup>153</sup>Gd-DTPA (600 Da) und <sup>99m</sup>Tc-DTPA (550 Da), die übereinstimmend zeigten, daß niedermolekulare Tracer nicht-selektiv nahezu jede Kapillare außerhalb des ZNS passieren (84-86). Eine Erhöhung der Permeabilität der Kapillarwand kann daher den bereits

maximalen Übertritt der niedermolekularen Tracer vom Intravasalraum in das Interstitium der extrazerebralen Gewebe nicht weiter steigern (18).

Von der Charakterisierung der Kapillarpermeabilität ist die MR-tomographische Quantifizierung des Blutvolumens zu unterscheiden. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß niedermolekulare Standardkontrastmittel das Blutvolumen des Knochenmarkes charakterisieren können (12,17). Anhand des Signalmaximums in der initialen Perfusionsphase ("first pass") konnten Änderungen des Blutvolumens des normalen Knochenmarkes und von Knochenmark-Tumoren mit Gadopentetat Dimeglumin (Gd-DTPA) quantifiziert werden (12,17). Änderungen des Knochenmark-Blutvolumens haben jedoch keinen Einfluß auf das Engraftment von Spender-Stammzellen bei einer Knochenmark-Transplantation (20).

Nach Injektion von USPIO und SPIO wird das Knochenmark-Enhancement in der frühen Perfusionsphase durch die Permeabilität der Knochenmark-Sinus und in der späten Perfusionsphase durch die RES-Phagozytose bestimmt (6,23). Dabei dominiert in der frühen Phase der  $T_1$ -Effekt der Kontrastmittel, da die überwiegend im Intravasalraum und im Interstitium lokalisierten Eisenoxidpartikel frei mit Wasserprotonen interagieren können. In der späten Perfusionsphase dominiert dagegen der  $T_2$ -Effekt, da die phagozytierten Eisenoxide sich zu "Klustern" zusammenlagern und Suszeptibilitätseffekte hervorrufen (65).

USPIO erwiesen sich als geeignet für Perfusionsstudien, da  $T_1$ -Relaxivität und Kontrastmittelkonzentration im verwendeten Dosisbereich proportional zueinander sind. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Eisenoxide haben eine hohe  $T_1$ -Relaxivität, die bis zu sechsfach höher im Vergleich zu den gadolinium-haltigen Standard-Kontrastmitteln ist, zusätzlich zu der bekannten hohen  $T_2$ -Relaxivität (36). SPIO haben einen deutlich stärkeren  $T_2$ -Effekt als USPIO, der das Signal des Zielgewebes auch auf  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen beeinflusst (36). In diesem Fall sind  $T_1$ -Relaxivität und

Kontrastmittelkonzentration des Zielgewebes nicht mehr proportional zueinander und kinetische Signalintensitäts-Zeit-Kurven geben keinen Aufschluß mehr über die Quantität der Kontrastmittel-Anreicherung und – Abflutung (36, 83), d.h. ein Signalabfall im Zielgewebe könnte bedingt sein durch abnehmende Kontrastmittelkonzentration mit abnehmendem  $T_1$ -Effekt oder zunehmende Kontrastmittelkonzentration mit zunehmenden  $T_2$ -Effekt. Der in der vorliegenden Studie beobachtete  $T_2$ -Effekt bei SPIO kann minimiert werden durch Verwendung von SE-Sequenzen, kleinem  $T_R$  (mit  $T_R=T_1$ ), kleinem  $T_E$  und geringerer Kontrastmitteldosis (83). Mit zunehmender Bestrahlungsdosis zeigten die SPIO auf dynamischen  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen in der frühen Perfusionsphase relativ geringe, in der späten Perfusionsphase allerdings auf  $T_2$ -gewichteten Aufnahmen relativ stärkere  $T_2$ -Effekte. Eine mögliche Ursache könnten überviegender  $T_1$ -Effekte sein, die durch eine deutliche Zunahme an extrazellulären Eisenoxidpartikeln im ödematösen Knochenmark-Interstitium entstehen. Dem gegenüber steht eine relativ geringe Zunahme an intrazellulären, phagozytierten Eisenoxidpartikeln, deren  $T_2$ -Effekt überwiegt. Weitere Studien müssen zeigen, ob zusätzliche technische Optimierungen Perfusionsuntersuchungen mit SPIO ermöglichen.

Als weiterer physiologischer Untersuchungsparameter wurde die RES-Phagozytoseaktivität des Knochenmarkes im Hinblick auf die Möglichkeit der Markierung der hämatopoetischen Knochenmark-Zellen mit eisenoxid-haltigen Kontrastmitteln, untersucht. SPIO- und USPIO-Partikel werden von den Zellen des retikuloendothelialen Systems des Knochenmarkes phagozytiert und bieten damit eine Möglichkeit hämatopoetisches Knochenmark zu markieren. Verschiedene Studien beschrieben eine Aufnahme der eisenoxid-haltigen Kontrastmittel Ferumoxides und Ferumoxtran in das Knochenmark (6,16). Dabei ist zu beachten, daß die RES-Phagozytose ein langsamer, sich über Stunden erstreckender Prozess ist (6).

Bei MR-Untersuchungen an Probanden oder durch zufällige Beobachtung, wurde die Aufnahme von SPIO in das normale Knochenmark bereits mehrfach

beschrieben (6,78). Nach unseren Erfahrungen ist die Aufnahme von USPIO deutlich stärker als die Aufnahme von SPIO (79). Weissleder et al. bestätigt die 20-mal höhere Akkumulation im Knochenmark der USPIO im Vergleich zu SPIO (24). Dies ist zu erklären durch die etwa 20-mal höhere Knochenmark-Akkumulation der USPIO im Vergleich zu SPIO (23), die bedingt ist durch den geringeren Partikeldurchmesser der USPIO (Ferumoxtran-Durchmesser ungefähr 20 nm; Ferumoxides-Durchmesser ungefähr 150 nm), die höhere Bluthalbwertszeit der USPIO (Ferumoxtran ungefähr 80 Minuten; Ferumoxides ungefähr 20 Minuten) und die geringere Aufnahme der USPIO in Leber und Milz im Vergleich zu SPIO (6,23). Diese physikalischen Gegebenheiten erleichtern die Diffusion der Partikel über das Sinusendothel in das Knochenmark-Interstitium und erlauben eine längere Interaktion der Partikel mit dem Sinusendothel und wandständigen Makrophagen (6,24).

Potentielle Anwendungen der RES-Markierung des hämatogenen Knochenmarkes mit eisenoxid-haltigen Kontrastmitteln bietet die MR-tomographische Detektion von fokalen Knochenmark-Tumoren und die Differenzierung von rezidivierenden Tumorinfiltraten und hyperplastischem Knochenmark nach Chemotherapie oder Radiatio. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß Eisenoxide von normalem hämatogenem Knochenmark, aber nicht von fokalen Knochenmark-Tumoren aufgenommen werden (16). Dies würde potentiell auch eine Unterscheidung von Tumorrezidiv und hyperplastischem, rekonvertierten Knochenmark nach Chemotherapie ermöglichen, da der Kontrast zwischen Tumor und Knochenmark potentiell verbessert werden kann. Besonders bei Patienten, die eine autologen Knochenmark-Transplantation erhalten haben, ergibt sich diese Fragestellung.

Da sich sowohl hämatopoetisches Knochenmark als auch Tumorinfiltrate zellreich und mit ähnlichen MR-Signalen auf konventionellen Pulssequenzen darstellen, ist insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen die MR-tomographische Detektion von Knochenmark-Tumoren erschwert (3), da in diesem Alter noch sehr zellreiches und fettarmes Knochenmark vorliegt.



Besonders bei diesen Patienten könnten Eisenoxide für die Tumordetektion hilfreich sein. Für unsere Studie verwendeten wir 6 Wochen alte Kaninchen, die ähnlich wie Kinder und junge Erwachsene, sehr zellreiches hämatopoetisches Knochenmark besitzen.

Späte postkontrast-Aufnahmen wurden bei dieser Studie eine Stunde nach der Kontrastmittelinjektion durchgeführt. Wie die initialen dynamischen Untersuchungen zeigten, war zu diesem Zeitpunkt eine Sättigungskinetik erreicht, so daß mit keinen relevanten weiteren Signaländerungen des Knochenmarkes zu rechnen war (Abbildung 12). Systematische sequentielle Verlaufskontrollen der MR-Signalgebung des Knochenmarkes nach Injektion von SPIO bei Patienten bestätigten eine maximale Änderungen der  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten 45-60 Minuten nach der Injektion, die über mindestens 12 Stunden konstant blieben und dann langsam über Wochen und Monate wieder zum Ausgangszustand zurückkehrten (6). Folglich ist auch zu beachten, daß eine diagnostische Untersuchung mit Eisenoxiden nicht mehrfach in kurzen Zeitabständen möglich ist. Eine erneute Untersuchung kann frühestens nach mehreren Monaten erfolgen.

Unsere Studie konnte zeigen, daß die Phagozytoseaktivität der RES-Zellen im Rahmen einer Konditionierung durchgeführten Ganzkörperbestrahlung in der frühen Phase nach der Konditionierung nicht negativ beeinflusst worden ist. Es kam zu einer deutlichen Reduktion aller hämatopoetischen Zellreihen im Knochenmark, und die RES-Phagozytoseaktivität steigerte sich mit steigender Bestrahlungsintensität. Die RES-Phagozytoseaktivität muß in weiteren Studien im Hinblick auf ihren längerfristigen Verlauf nach einer autologen Knochenmark-Transplantation untersucht werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, daß die MR-Tomographie unter Verwendung von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO) und ultrakleinen SPIO (USPIO) die RES-Phagozytoseaktivität des Knochenmarkes charakterisieren kann und daß USPIO zusätzlich die Permeabilität der

Knochenmark-Sinus quantifizieren können. Zudem hat unsere Studie gezeigt, daß im Rahmen einer Konditionierungstherapie, wie sie vor einer autologen Knochenmark-Transplantation durchgeführt wird, diese Phagozytoseaktivität nicht vermindert. Damit erlauben Eisenoxid-Kontrastmittel eine Charakterisierung der Knochenmark-Physiologie zusätzlich zu Standard-Untersuchungen der Knochenmark-Anatomie mit dem Kontrastmittel Gd-DOTA. Mögliche Anwendungsgebiete ergeben sich für die Detektion und Differenzierung von fokalen Knochenmark-Tumoren speziell bei jungen Patienten mit zellreichem hämatopoetischem Knochenmark. Zudem kann die eisenoxid-unterstützte MRT für die Differenzierung von Tumorrezidiv und hyperplastischem rekonvertiertem Knochenmark bei Patienten nach einer autologen Knochenmark-Transplantation hilfreich sein.

## 6. Literaturangaben

1. **Yoshida H, Asai S, Yashiro N, Iio M.** MRI of bone marrow. *Radiat Med.* 1985; 3 (1): 47-55
2. **Pozzi-Mucelli R, Ricci C, Cova M.** Magnetic resonance of the bone marrow. *Radiol Med (Torino)* 1990; 80 (4): 409-23
3. **Moore S, Dawson K.** Red and yellow marrow in the femur: Age related changes in appearance at MRI. *Radiology* 1990; 175: 219-223
4. **Steiner R, Mitchell D, Rao V, Schweitzer M.** Magnetic resonance imaging of diffuse bone marrow disease. *Radiologic Clinics of North America* 1993; 31 (2); 383-408
5. **Smith S, Williams C, Davies J, Edwards R.** Bone marrow disorders: Characterisation with quantitative MR imaging. *Radiology* 1989; 172: 805-810
6. **Van de Berg B, Lecouvet F, Kanku J, Jamert J, Van Beers B, Maldague B, Maighem J.** Ferrumoxides-enhanced quantitative magnetic resonance imaging of the normal and abnormal bone marrow: Preliminary assessment. *J Magn Res Imaging* 1999; 9: 322-328
7. **Gerard E, Ferry J, Amrein P.** Compositional changes in vertebral bone marrow during treatment for acute leukemia: Assessment with quantitative chemical shift imaging. *Radiology* 1992; 183: 39-46.
8. **Kricum ME (1985).** Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesion. *Skeletal Radiol* 14: 10-19

9. **Vahlensieck M, Schmidt HM.** Normales Knochenmark und seine Variationen in der MRT. *Der Radiologe* 2000; 40: 688-693
10. **Schicha, Schobers.** Nuklearmedizin. Schattauer; 3. Auflage
11. **Algra P, Bloem J, Tissing H, Falke T, Arndt J, Verboom L.** Detection of vertebral metastases: comparison between MR imaging and bone scintigraphy. *RadioGraphics* 1991; 11: 219-232
12. **Cova M, Kang Y, Tsukamoto H, Jones L, McVeigh E, Neff B, Herold C, Scott W, Hungerford D, Zerhouni E.** Bone marrow perfusion evaluated with gadolinium-enhanced dynamic fast MR imaging in a dog model. *Radiology* 1991; 179: 535-539
13. **Flickinger F, Salahattin S.** Bone marrow MRI: techniques and accuracy for detecting breast cancer metastases. *Magn Reson Imaging* 1994; 12: 829-835
14. **Jones K, Unger E, Granstrom P, Seeger J, Carmody R, Yoshino M.** Bone marrow imaging using STIR at 0,5 Tesla and 1,5 Tesla. *Magn Reson Imaging* 1992; 10: 169-176
15. **Daldrup H, Link T, Blasius S, Strozyk A, Könemann S, Jürgens H, Rummeny E.** Monitoring radiation induced changes in bone marrow histopathology with ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO)-enhanced MRI. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9: 643-652.
16. **Seneterre E, Weissleder R, Jaramillo D, Reimer P, Lee A, Brady T, Wittenberg J.** Bone marrow: Ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging. *Radiology* 1991; 179: 529-533.

17. **Saifuddin A, Bann K, Ridgway J, Butt W.** Bone marrow blood supply in gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging. *Skeletal Radiology* 1994; 23: 455-457.
18. **Daldrup-Link H, Link T, Rummeny E, Könemann S, August C, Bonnemain B, Heindel W.** Assessing permeability alterations of the blood bone marrow barrier due to total body irradiation: In vivo quantification with contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25 (1): 71-78.
19. **Tavassoli M, Yoffey J.** Bone marrow structure and function. New York. A.R. Liss 1983
20. **Shirota T, Tavassoli M.** Alterations of bone marrow sinus endothelium induced by ionizing irradiation: Implications in the homing of intravenously transplanted marrow cells. *Blood Cells* 1992; 18: 197-214.
21. **Gale R. Bone marrow transplantation.** *CRC Crit Rev Oncol Hematol* 1985; 2: 261-296.
22. **Brasch R.** New directions in the development of MR imaging contrast media. *Radiology* 1992; 183: 1-11
23. **Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito C, Bengele H, Josephson L.** Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterisation of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 1990; 175: 489-493
24. **Weissleder R, Stark D, Engelstad B, Bacon B, Compton C.** Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol* 1989; 152: 167-173

25. **Reiser, Semmler.** Magnetic Resonance Tomographie 1997; Springer, 2.Auflage
26. **James TL.** NMR in biochemistry. Academic Press 1975; New York
27. **Laboratoire Guerbet.** Dotarem®: Wissenschaftliche Informationen, Stand 1999
28. **Tweedle M, Wedeking P, Kumar K.** Biodistribution of radiolabeled, formulated gadopentetate, gadoteridol, gadoterate and gadodiamide in mice and rats. *Invst Radiol* 1995; 30: 372-380.
29. **Schörner W, Laniado M, Niendorf HP, Schubert C, Felix R.** Time-dependent changes in image contrast in brain tumors after Gd-DTPA. *AJR* 1986; 7: 1013-1020
30. **Laniado M, Niendorf HP, Schörner W, Felix R.** Spin echo and inversion recovery sequences for Gd-DTPA enhanced magnetic resonance imaging of intra-cranial tumors. *Acta Radiol (Stockh)* 1986; (Suppl) 369: 469-471
31. **Laniado M, Sander B, Schörner W, Kornmesser W, Deimling M, Felix R.** The impact of steady state imaging of Gd-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 1987; 5: 543-544
32. **Sage MR.** Blood-brain barrier: phenomenon of increasing importance to the imaging clinician. *AJR* 1982; 138: 887-898
33. **Jung CW.** Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferrumoxides, ferrumoxtran, ferrumoxisil. *Magn Res Imag* 1995; 13: 675-691.

34. **Earls JP, Bluemke DA.** New MR imaging contrast agents. *Magn Reson Imaging* 1999; 7 (2): 255-273
35. **Vogl T, Helmberger H, Hamm B.** Verbesserte Tumordiagnostik durch organspezifische Kontrastmittel in der MRT. *RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1999; 171 (Beilage)
36. **Chambon C, Clement O, Le Blanche A, Schouman-Claeys E, Frija G.** Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence. *Magn Reson Imaging* 1993; 11: 509-519
37. **Grandin C, Van Beers BE, Robert A, Gigot JF, Geubel A, Pringot J.** Benign hepatocellular tumors: MRI after superparamagnetic iron oxide administration. *J Comput Assist Tomogr* 1995; 19: 412-418
38. **Grangier C, Tourniaire J, Mentha G, Schiau R, Howarth N, Chachuat A, Grossholz M, Terrier F.** Enhancement of liver hemangiomas on T<sub>1</sub>-weighted MR SE images by superparamagnetic iron oxide particles. *J Comput Assist Tomogr* 1994; 160: 52-58
39. **Hendrick RE, Haacke EM.** Basic physics of MR contrast agents and maximization of image contrast. *J Magn Reson Imaging* 1993; 3: 137-148
40. **Mayo-Smith WW, Saini S, Slater G, Kaufman JA, Sharma P, Hahn PF.** MR contrast material for vascular enhancement: Value of superparamagnetic iron oxide. *Am J Roentgenol* 1996; 166: 73-77
41. **Rogers J, Lewis J, Josephson L.** Use of AMI-227 as an oral MR contrast agent. *J Magn Reson Imaging* 1994; 12: 631-639

- 42. Small WC, Nelson RC, Bernadino ME.** Dual contrast enhancement of both T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>-weighted sequences using ultrasmall superparamagnetic iron oxide. J Magn Reson Imaging 1993; 11: 645-654
- 43. Urhahn R, Adam G, Busch N, Chen JH, Euringer W, Günther RW.** Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Welchen Stellenwert hat der T<sub>1</sub>-Effekt für die MR-Diagnostik fokaler Leberläsionen? RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr 1996; 165: 364-370
- 44. Laboratoire Guerbet.** Endorem<sup>®</sup>: Wissenschaftliche Informationen, Stand 1995
- 45. Bellin MF, Zaim S, Auberton E, Sarfati G, Duron JJ, Khayat D, Grellet J.** Liver metastases: safety and efficacy of detection with superparamagnetic iron oxide in MR imaging. Radiology 1994; 193: 657-663
- 46. Denys A, Arrive L, Servois V, Dubray B, Najmark D, Sibert A, Menu Y.** Hepatic tumors: detection and characterization at T1-MR imaging enhanced with AMI-25. Radiology 1994; 193: 665-669
- 47. Duda SH, Laniado M, Kopp AF, Grönewäller, Aicher KP, Pavone P, Jehle E, Claussen CD.** Superparamagnetic iron oxide: detection of focal liver lesions at high-field-strength MR imaging. J Magn Reson Imaging 1994; 4: 309-314
- 48. Hamm B, Reichel M, Vogl TJ, Taupitz M, Wolf KJ.** Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Klinische Ergebnisse in der MR-Diagnostik von Lebermetastasen. RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr 1994; 160: 52-58



- 49. Laniado M, Chachuat A.** Verträglichkeitsprofil von Endorem<sup>®</sup>. *Radiologe* 1995; 35 (Suppl. 2): 266-270
- 50. Marchal G, van Hecke P, Demaerel P, Decrop E, Kennis C, Baert AL, van der Schueren E.** Detection of liver metastases with superparamagnetic iron oxide in 15 patients: results of MR imaging at 1,5 T. *Am J Roentgenol* 1989; 152: 771-775
- 51. Ros PR, Freeny PC, Harms SE, Seltzer SE, Davis PL, Chan TW, Stillman AE, Muroff LR, Runge VM, Nissenbaum MA, Jacobs PM.** Hepatic MR imaging with ferumoxides: a multicenter clinical trial of the safety and efficacy in the detection of focal hepatic lesions. *Radiology* 1995; 196: 481-488
- 52. Schwartz LH, Seltzer SE, Tempny CMC, Silverman SG, Piwnica-Worms DR, Adams DF, Herman LA, Hooshmand R.** Superparamagnetic iron oxide hepatic MR imaging: efficacy and safety using conventional and fast spin-echo pulse sequences. *J Magn Reson Imaging* 1995; 5: 566-570
- 53. Stark DD, Weissleder R, Elizondo G, Hahn PF, Saini S, Todd LE, Wittenberg J, Ferrucci JT.** Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* 1988; 168: 297-301
- 54. Vogl TJ, Hammerstingl R, Pegios W, Hamm B, Eibl-Eibesfeldt A, Woessner B, Lissner J, Felix R.** Wertigkeit des leberspezifischen superparamagnetischen Kontrastmittels AMI-25 für die Detektion und Differentialdiagnose lebereigener Tumoren versus Metastasen. *RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1994; 160: 319-328

- 55. Vogl TJ, Hammerstingl R, Schwarz W, Mack MG, Müller PK, Pegios W, Keck H, Eibl-Eibesfeldt A, Hoelzl J, Woessmer B, Bergman C, Felix R.** Superparamagnetic iron oxide-enhanced versus gadolinium-enhanced MR imaging for differential diagnosis of focal liver lesions. *Radiology* 1996; 198: 881-887
- 56. Weissleder R, Elizondo G, Stark DD, Hahn PF, Marfil J, Gonzalez JF, Saini S, Todd LE, Ferrucci JT.** The diagnosis of splenic lymphoma by MR imaging: value of superparamagnetic iron oxide. *Am J Roentgenol* 1989; 152: 175-180
- 57. Weissleder R, Hahn PF, Stark DD, Elizondo G, Saini S, Todd LE, Wittenberg J, Ferrucci JT.** Superparamagnetic iron oxide: enhanced detection of focal splenic tumors with MR imaging. *Radiology* 1988; 169: 399-403
- 58. Saini S, Stark D, Hahn P, Wittenberg J, Brady T, Ferruci J.** Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* 1987; 162: 211-216.
- 59. Weissleder R.** Liver MR imaging with iron oxides: toward consensus and clinical practice. *Radiology* 1994; 193: 593-595.
- 60. Böck JC, Knollmann FD, Teltenkötter S, Wlodarczyk W, Mühler A, Vogl TJ, Felix R.** Eisenoxydkontrastmittel verbessern die kernspintomographische Darstellung des portalvenösen Systems- eine tierexperimentelle Untersuchung. *RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1997; 166: 153-158

61. **Frank H, Weissleder R, Brady TJ.** Enhancement of MR angiography with iron oxide: Preliminary studies in whole-blood phantom and in animals. *Am J Roentgenol* 1994; 162: 209-213
62. **Saini S, Edelman RR, Sharma P, Li W, Mayo-Smith WW, Slater GJ, Eisenberg PJ, Hahn PF.** Blood-pool MR contrast material for detection and characterization of focal hepatic lesions: initial clinical experience with ultrasmall superparamagnetic iron oxide (AMI-227). *Am J Roentgenol* 1995; 164: 1147-115230
63. **Benderbous S, Bonnemain B.** Superparamagnetic nanoparticles as blood-pool contrast agents. *Radiologe* 1995; 35 (Suppl. 2): 248-252
64. **Mergo PJ, Helmberger T, Nicolas AI, Ros PR.** Ring enhancement in ultrasmall iron oxide MR imaging: a potential new sign for characterization of liver lesions. *Am J Roentgenol* 1996; 166: 379-384
65. **Guimaraes R, Clement O, Bittoun J, Carnot F, Frija G.** MR lymphography with superparamagnetic iron nanoparticles in rats: pathologic basis for contrast enhancement. *AJR* 1993; 162: 201-207.
66. **Cullity BD.** Introduction to magnetic materials. Addison-Weasley, Reading/MA 1972
67. **Saini S, Frankel RB, Stark DD, Ferruci JT.** Magnetism: a primer and review. *AJR* 1988; 150: 735-743
68. **Fahlvik AK, Klaveness J, Stark DD.** Iron oxides as MR imaging contrast agents. *J Magn Reson Imaging* 1993; 3: 187-194

- 69. Josephson L, Lewis J, Jacobs P, Hahn PF, Stark DD.** The effects of iron oxides on proton relaxivity. *Magn Reson Imaging* 1993; 3: 137-148
- 70. Kauffmann, Moser, Sauer.** Radiologie: Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin 1996; Urban und Schwarzenberg
- 71. Hermann.** Nuklearmedizin. 4. Auflage; Urban und Schwarzenberg
- 72. Richard P, Moser Jr MD.** The Radiologic clinics of North America; März 1993
- 73. Hahn K, Bockisch A.** Nuklearmedizin. 2. Auflage; Thieme
- 74. Vogler JB, Murphy WA.** Bone marrow imaging. *Radiology* 1988; 168: 679-693
- 75. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, Winterhalter S, Wagner S, Kresse S, Kresse M, Semmler W, Wolf KJ.** Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Invest Radiol* 2000; 35 (8): 460-71
- 76. Petersein J, Saini S, Weissleder R.** Liver II: Iron oxide-based reticuloendothelial contrast agents for MR imaging. *MRI Clinics of North America* 1996; Volume 4, Number 1
- 77. Laboratoire Guerbet.** Sinerem<sup>®</sup>: Investigator's Brochure, Stand Mai 2001
- 78. Gandon Y, Heautot J, Brunet F, Guyader D, Deugnier Y, Carsin M.** Superparamagnetic iron oxide: clinical time response study. *Eur J Radiol* 1991; 12: 195-200

- 79. Daldrup-Link H, Rummeny E, Ihßen B, Silling-Engelhard H, Link T.** Comparison of SPIO and USPIO for MRI of the Bone Marrow in Patients with Non-Hodgkins Lymphomas. *Radiology* 2000 (Suppl. 1); 217: S356
- 80. Shirota T, Tavassoli M.** Cyclophosphamide-induced alterations of bone marrow endothelium: Implications in homing of marrow cells after transplantation. *Exp Hematol* 1991; 19: 369-373
- 81. Yamazaki K, Allen T.** Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation. *Blood Cells* 1991; 17: 527-549
- 82. Curtis R, Rowlings P, Deeg J, Shrira D, Socie G, Travis L, Horowitz M, Witherspoon R, Hoover R, Sobocinski K, Fraumeni J, Boice J.** Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1997; 336: 897-904
- 83. Roberts T.** Physiologic measurements by contrast-enhanced MR imaging: expectations and limitations. *JMRI* 1997; 7: 82-90
- 84. Dvorak H, Nagy J, Dvorak J, Dvorak A.** Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating makromolecules. *Am J Pathol* 1988; 133: 95-109
- 85. Prato F, Wisenberg G, Marshall T, Uksik P, Zabel P.** Comparison of the biodistribution of Gadolinium-153 DTPA and Technecium-99m DTPA in rats. *J Nucl Med* 1988; 29: 1683- 1687
- 86. Wedekind P, Eaton S, Covell D, Nair S, Tweedle M, Eckelman W.** Pharmacokinetic analysis of blood distribution of intravenously administered <sup>153</sup>Gd-labeled Gd(DTPA)<sub>2</sub><sup>-</sup> and <sup>99m</sup>Tc(DTPA) in rats. *Mag Res Imag* 1990; 8: 567-575

## 7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle und vor allem für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums ganz herzlich bedanken!

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heindel und Herrn Prof. Dr. Willich für die Ermöglichung dieser Arbeit! Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. T. M. Link und Frau Dr. H. E. Daldrup-Link für die Einführung in die Thematik der Arbeit und ihre überaus exzellenten Betreuung meiner Dissertation bedanken!

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Richter, bei Frau Agyemang und beim gesamten Team des Tierstalls für die Pflege der Kaninchen und die immer freundliche und sehr hilfsbereite Mitarbeit bedanken.

Ferner geht mein Dank an Herrn Dr. Könemann von der Strahlentherapie und den Medizinisch-Technischen Assistentinnen am Kobaltgerät, die mir die Bestrahlungen der Kaninchen ermöglichten. Auch bedanke ich mich bei den Physikern der Abteilung, speziell bei Herrn Moustakis.

Des weiteren habe ich mich bei Herrn Dr. Heinecke aus dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten zu bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Berdel aus der Hämatologie/Onkologie für die kritischen Anregungen bedanken.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Claudia Reinländer  
Geboren: 02. April 1976 in Essen  
Familienstand: ledig  
Eltern: Manfred Reinländer, Kaufmann  
Karin Reinländer, geb. Kubitza, kaufm. Angestellte  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: evangelisch

### Schulbildung:

1982 - 1984 Grundschule Remchingen-Wilferdingen  
1984 - 1986 K.v.G.-Grundschule Drensteinfurt  
1986 - 1995 Kant-Gymnasium Münster-Hiltrup  
05/1995 Abitur

### Nebentätigkeiten im Bereich der Medizin:

09/1995 - 04/1996 Freiwilliges Soziales Jahr,  
Orthopädische Spezialklinik, Volmarstein

### Studium:

04/1996 Immatrikulation für Humanmedizin, WWU Münster  
03/1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)  
03/1999 Erstes Staatsexamen  
03/2001 Zweites Staatsexamen  
10/2001 – 09/2002 Praktisches Jahr an der WWU Münster  
11/2002 Drittes Staatsexamen

# Anhang

## I. Arbeitsmaterialien und Lösungen

### I.I. Zur Durchführung der Ganzkörperbestrahlung

- Cobaltgerät: Philips 5105-Universal-Cobalt-60; Fa. Philips GmbH; Hamburg

### I.II. Zur Durchführung der MRT

- Magnetresonanztomograph: Magnetom Vision-Scanner; Fa. Siemens, Erlangen
- Ketanest: Injektionslösung; Fa. Parke- Davis GmbH; Freiburg
- Rompun: Trockensubstanz zur Infusionsbereitung; Zulassungsnummer: 15.751; Fa. Bayer; Leverkusen

### I.III. Zur Tötung der Versuchs-Tiere

- T 61 ad us. vet.; Injektionslösung (Embutramid, Mebezoniumjodid, Tetracainhydrochlorid); Fa. Veterinaria AG; Zürich

### I.IV. Zur Anfertigung und Färbung der histologischen Präparate

- Autotechnikon: Modell-Nr.: 2050/z; Fabrik-Nr.: 840754; Leistung: 600 W; Anschluß: 220 V/ 50 Hz; Fa. BAVIMED Laborgerätebau GmbH; Birkenau
- Mikrotom: Typ Schlittenmikrotom; Modell: Mod.Hn 40; Fa. Mikrovid GmbH; Arnsberg



- Paraffin-Dispenser: Modell: Tissue-Tek-II; Fa. Leica AG; Wetzlar
- Formaldehyd: Desinfektionslösung; PZN: 0706332; Fa. WIRA GmbH; Göppingen
- Zinkchlorid: Kombilösung; PZN: 8425271; Fa. Baxter Deutschland GmbH; Unterschleißheim
- Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, reinst; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- Chloralhydrat, Ph Eur, BP, JP; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- Citronensäure-1-hydrat, klein, krist., reinst; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- DePeX, Mounting medium; Fa. SERVA; Electrophoresis GmbH; Heidelberg
- Deckgläser, 24x60 mm; Fa. Menzel-Gläser & Co KG; Braunschweig
- Eisessig, p.a., 100% Essigsäure; Fa. Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
- Eiweißglycerin, Typ: 3t012, Fa. Chroma GmbH & Co; Münster
- Eosin, C.I. 45380; Fa. Fluka, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Formalin, purum, Formaldehyd-Lösung ca. 36%ig (T) in Wasser; Fa. Fluka, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Hämatoxylin, krist., C.I. 75290; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- Kernechtrot, für die Mikroskopie, C.I. 60760; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- Natriumjodat, p.a.; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- n-Butylacetat, reinst; Fa. Merck KGaA; Darmstadt
- Objektträger, 76 x 26 mm, Fa. Engelbrecht; Medizin- und Labortechnik GmbH; Edermünde
- Paraffin: Medim-Plast 52; Tissue Embedding Medium; Fa. NOVOGLAS Labortechnik; Bern

- Roti-Histol, Lösungsmittel zum Entparaffinieren; Fa. Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe

#### I.V. Zum Erstellen der Dia-Positive

- Photomikroskop: Ident. Nr.:109122; Geräte-Typ: Orthoplan; Serien-Nr.:860283; Fa. Leica Camera AG; Wetzlar
- Dia-Film: Typ: CR 100 S Chrome; Color-Diafilm: 24 x 36 mm; Process: E 6; 36 Aufnahmen; Fa. TURA AG; Düren

## II. Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, daß ich die Dissertation mit dem Titel:

MRT-Kontrastmittel für das Knochenmark:  
Vergleichende experimentelle Untersuchungen  
von USPIO, SPIO und Gd-DOTA

im Institut für Klinische Radiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster; Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter L. Heindel

unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. M. Link und Frau Dr. H. E. Daldrup-Link

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt, habe.