

Aus der Klinik für Kleintiere - Chirurgie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

und der

Klinik für Strahlentherapie - Medizinische Physik
des Universitätsklinikums Essen
Betreuer: PD Dr. Lutz Lüdemann

Etablierung eines Schweinemodells zur
Validierung von pharmakokinetischen Parametern
in der dynamischen kontrastmittelbasierten
Magnetresonanztomographie: Korrelation mit
histologischen Parametern

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Anika Frauke Christine Söhner, geb. Sauerbrey
Tierärztin aus Essen

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer
PD Dr. Lutz Lüdemann
Prof. Dr. Eberhard Burkhardt

Tag der Disputation: 12.10.2017

**Diese Arbeit wurde durch die
Deutsche Forschungsgemeinschaft
(LU 844/8-1) gefördert.**

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Grundlagen	4
2.1	Biologische Bestrahlungsplanung und Ziel der Arbeit	4
2.2	Anatomie und Funktion der Skelettmuskulatur	5
2.3	Anatomie und Funktion der Gefäße	7
2.3.1	Adenosin	9
2.4	Magnetresonanztomographie	10
2.5	Kontrastmittel	12
2.5.1	Verwendete Kontrastmittel	14
2.6	DCE-MRI und pharmakokinetische Modelle	15
2.6.1	TWIST-Sequenz	16
3	Eigene Arbeiten	18
3.1	Originalarbeit 1: Establishment of a Swine Model for Validation of Perfusion Measurement by Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging	18
3.2	Originalarbeit 2: Validation of Interstitial Fractional Volume Quantification by Using Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscles	19
3.3	Originalarbeit 3: Validation of Blood Volume Fraction Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscle	20
4	Diskussion	21
4.1	Das Schwein als Modell	21
4.2	Einflüsse auf die DCE-MRI	22
4.3	Tofts-Modelle und Zwei-Kompartimente-Austausch-Modell	24
4.4	Histologische Validierung der pharmakokinetischen Modelle	25
4.5	DCE-MRI und biologische Bestrahlungsplanung in der Tiermedizin	28
5	Zusammenfassung	30
6	Summary	33
7	Literaturverzeichnis	36
8	Anhang	47
9	Danksagung	58
10	Selbstständigkeitserklärung	60

1 Abkürzungsverzeichnis

[18F]FMISO PET	F-18-Fluoromisonidazol- Positronenemissionstomographie
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
2CXM	Zwei-Kompartimente-Austausch-Modell
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
AIF	Arterial Input Function, arterielle Eingangsfunktion
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
B ₀	Feldstärke
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DCE-MRI	Dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomografie
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10- tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EES	Extravaskulärer-extrazellulärer Raum
F	Blutfluss, Perfusion
Gd	Gadolinium
Gd-DOTA	Gadotersäure
Gd-DTPA	Gadolinium -Diethylentriaminpentaacetat

h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
k^{trans}	Austauschkonstante
M.quadrizeps femoris	Musculus quadrizeps femoris, vierköpfiger Oberschenkelmuskel
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomographie
MVD	Mittlere Gefäßdichte, Mean Vascular Density
MVA	Mittlere Gefäßfläche, Mean Vascular Area
nm	Nanometer
osmol/kg	Osmolalität
PET	Positronenemissionstomographie
PS	Permeabilitäts-Oberflächenprodukt
s	Sekunde
T	Tesla

T_1	T1-Relaxationszeit
T_2	T2-Relaxationszeit
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
TWIST	Time-resolved angiography With Interleaved Stochastic Trajectories
u.a.	unter anderem
v_b	Blutvolumen
v_e	Relatives interstitielles Volumen
z.B.	zum Beispiel

2 Grundlagen

2.1 Biologische Bestrahlungsplanung und Ziel der Arbeit

Die biologische Bestrahlungsplanung ist ein Konzept innerhalb der Strahlentherapie, das versucht, mittels Dosismodulation (dose painting) Tumoren inhomogen zu bestrahlen, um Dosispitzen innerhalb des Tumors zu erreichen. Die bisher überwiegend angewandte homogene Bestrahlung solider Tumoren berücksichtigt nicht, dass innerhalb eines Tumors Areale mit unterschiedlicher Strahlensensibilität vorkommen können. Dies hat zur Folge, dass bestimmte Bereiche des Tumors zu hohe oder zu geringe Anteile der erforderlichen Strahlendosis erhalten und somit der Effekt der Therapie nicht optimal ist. Es ist, u.a. durch Einführung der Tomotherapie, möglich eine intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) durchzuführen (Thorwarth et al. 2008).

Die Strahlensensibilität eines Tumors ist in hohem Maße vom Sauerstoffgehalt des Gewebes abhängig. Je höher der Sauerstoffgehalt im Gewebe ist, desto empfindlicher reagiert das Gewebe auf Strahlung. Tumoren können bereits in einer frühen Phase des Wachstums durch die zunehmende Größe einen kritischen Abstand zu Blutgefäßen bekommen, sodass sie einer schlechteren Nährstoffversorgung und Hypoxie unterliegen. Der kritische Abstand beträgt etwa 100µm (Helmlinger et al. 1997). Durch die Hypoxie kann die eingeschränkte Versorgung einerseits zu einer Hemmung von Wachstum und Differenzierung des Tumorgewebes bis hin zum Zelltod führen, andererseits kann sich der Tumor an die hypoxische Umgebung anpassen (Moulder et al. 1987).

Die Hypoxie des Tumors kann die Bildung von Angiogenese-Faktoren induzieren und es kann zusätzlich durch Gefäßneubildung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Vaskulogenese kommen. Diese Tumorgefäße sind chaotisch organisiert und funktionell ungeeignet, um den Tumor vollständig mit Blut zu versorgen. Nekrosen und hypoxische Areale sind die Folge (Weber et al. 2013). Durch den sogenannten Sauerstoffeffekt reagieren diese Areale kaum auf eine Bestrahlung im Gegensatz zu sauerstoffreichem Gewebe. Gewünschte Effekte der Therapie wie die Tumorrückbildung, Wachstumsverzögerung und Tumorkontrolle sind stark reduziert oder bleiben aus. Sauerstoff fungiert als Radiosensibilisator und beeinflusst auch andere Therapiemaßnahmen, wie die Chemotherapie,

Immuntherapie und photodynamische Therapie. Der Grad der Hypoxie beeinflusst den Therapieerfolg maßgeblich (Vaupel et al. 2007, Hockel et al. 2001).

Die biologische Bestrahlungsplanung ermöglicht die gezielte Bestrahlung hypoxischer Areale mit einer erhöhten Strahlendosis. Die Detektion dieser Areale durch bildgebende Verfahren ist für diese Methode essentiell. Die dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomografie (DCE-MRI) bietet ein schnelles und sicheres Verfahren, diese Areale mit guter Ortsauflösung darzustellen. Es müssen Parameter bestimmt werden, die Anzeichen für hypoxische Gebiete sind. Die Messung der Perfusion, des Blutvolumens und des interstitiellen Volumens bieten diese Möglichkeiten. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Tiermodells, um Perfusionsmessungen mittels DCE-MRI validieren zu können und die Genauigkeit der Messungen des interstitiellen Volumens und des Blutvolumens zu überprüfen.

2.2 Anatomie und Funktion der Skelettmuskulatur

Der grundlegende Baustein der Skelettmuskulatur ist die Muskelfaser. Muskelfasern können mehrere Zentimeter lang sein und einen Durchmesser von 10-100 μm erreichen. Der Anteil der Muskelfasern am Gesamtvolumen der Muskulatur liegt zwischen 75-92 % (Aberle et al. 2001). Die Zellen liegen i.d.R. in paralleler Anordnung vor. Muskelfasern sind Synzytien, also aus mehreren Einzelzellen fusionierte Riesenzellen. Deshalb enthalten Muskelfasern oft mehrere Hundert Zellkerne. Jede Muskelfaser ist von einer Zellmembran, dem Sarkolemm, umgeben und enthält das Sarkoplasma genannte Zytoplasma. Im Sarkoplasma befinden sich die kontraktile Einheiten der Muskelzelle. Diese sogenannten Myofibrillen enthalten die Filamente Aktin und Myosin. Die Myofibrillen sind von den Kraftwerken der Zelle, den Mitochondrien, und dem sarkoplasmatischen Retikulum, auch longitudinale Tubuli genannt, welches dem endoplasmatischen Retikulum entspricht, umgeben. Das Sarkolemm enthält Einstülpungen, die eine wichtige Rolle bei der nervalen Erregungsübertragung spielen, die in der Kontraktion resultiert. Diese werden transversale Tubuli genannt (Huppelsberg et al. 2013).

Jede Muskelfaser ist von einer Bindegewebshülle, dem Endomysium, umgeben. Im Endomysium liegen Kapillaren und motorische und sensible Nervenfasern. Die Muskelfasern

werden durch das bindegewebige Perimysium internum zu Primärbündeln zusammengefasst. Diese Bündel werden wiederum durch das Perimysium externum zu Sekundärbündeln zusammengefasst. Im Perimysium verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern. Die äußere Hülle des Muskels bildet das Epimysium, das in die Faszien übergeht (Abb. 2.1) (Liebich 2004).

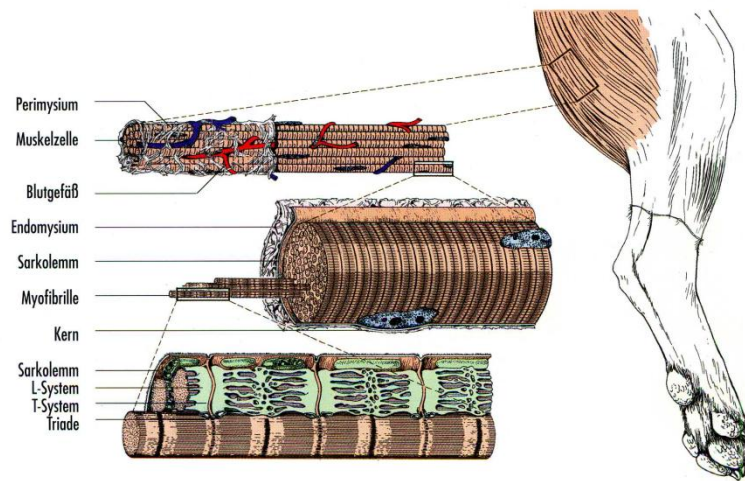


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des quergestreiften Skelettmuskelgewebes (Liebich 2004).

Die Skelettmuskulatur kann aufgrund ihrer besonderen Gefäßversorgung bei Belastung größere Mengen Blut rekrutieren. Skelettmuskeln machen einen erheblichen Anteil der Körpermasse aus und stellen die größte Anzahl an Kapillaren bereit (Payne et al. 2006). Die Skelettmuskulatur ist durch nutritive und nicht-nutritive Gefäßabschnitte in der Lage, den Blutfluss zu regulieren (Clark et al. 2000). Dies kann zu einer heterogenen Verteilung des Blutes in den arbeitenden Muskeln führen (Heinonen et al. 2010). Vorgeschaltete Arteriolen bestimmen den Blutfluss im Kapillarnetz. In Ruhe kann durch Öffnung von nicht-nutritiven Shunts das Kapillarnetz umgangen werden. Nur etwa 10-25% der Kapillaren sind geöffnet (Damon et al. 1984). Dies erklärt den sehr geringen Blutfluss im ruhenden Muskel von wenigen ml pro Minute pro 100g Gewebe. Etwa 50% des Blutflusses im ruhenden Muskel befindet sich in Shuntgefäßen und stellt somit eine Flussreserve dar (Zhang et al. 2005).

Die Belastung des Skelettmuskels erfordert eine schnelle Bereitstellung dieser Flussreserven. Nicht-nutritive Gefäße werden geschlossen und vorgeschaltete Arteriolen des Kapillarnetzes geöffnet, sodass der Muskel mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann (Thomas et al. 2004). Während maximaler Kontraktion kann der Blutfluss im Gegensatz zum ruhenden Muskel um das 20-fache und mehr gesteigert werden (Carlier et al. 2006). Die nervale Regulation der Gefäße erfolgt in Ruhe über alpha-adrenerge Rezeptoren des Sympathikus, die eine Vasokonstriktion bewirken. Beginnt der Muskel zu arbeiten, überwiegen vasodilatatorische Eigenschaften cholinergischer sympathischer und beta-adrenerger Rezeptoren (Delp et al. 2004).

2.3 Anatomie und Funktion der Gefäße

Der Blutkreislauf der Säugetiere ist ein schnell regulierbares, geschlossenes System bestehend aus dem Herzen als zentrales Organ und den Blutgefäßen, die sich in Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen unterteilen. Die Aufgaben des Blutes sind der konvektive Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid, Wasser und Elektrolyten, Nährstoffen, Metaboliten des Zellstoffwechsels, Hormonen und Mediatoren, Säuren und Basen zur Regulation des pH-Wertes, sowie Wärme und Komponenten des zellulären und humoralen Abwehrsystems (Thews et al. 2005).

Arterien und Venen bestehen aus drei Schichten. Von außen nach innen werden sie als Tunica externa (Externa), Tunica media (Media) und Tunica intima (Intima) bezeichnet. Die Tunica externa verbindet die Blutgefäße mit dem umliegenden Gewebe. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, das aus elastischen und Kollagenfasern zusammengesetzt ist und Nervenfasern und im Falle großer Gefäße auch zusätzliche Blutgefäße (Vasa vasorum) enthält. Die Tunica media besteht aus glatten Muskelzellen, elastischen Fasern und Kollagenfasern. Große Arterien enthalten zwischen der Media und der Externa zusätzlich die Membrana elastica externa, eine Schicht aus elastischen Fasern. Die Innenauskleidung der Gefäße wird von der Tunica intima gebildet. Sie besteht aus einer Basalmembran, dem Endothel, einem einschichtigen platten Epithel und dem Stratum subendotheliale, einer Bindegewebsschicht, die glatte Muskelzellen und Abwehrzellen enthalten kann. Zwischen Intima und Media befindet sich bei Arterien und teilweise bei Venen die aus elastischen Fasern bestehende

Membrana elastica interna (Aumüller et al. 2014). Arteriolen und größere Venolen besitzen ebenfalls den dreischichtigen Aufbau (Abb. 2.2). Kapillaren und postkapilläre Venolen besitzen eine Endothelschicht und eine Basalmembran. Von außen können den Endothelzellen Perizyten aufliegen (Liebich 2004).

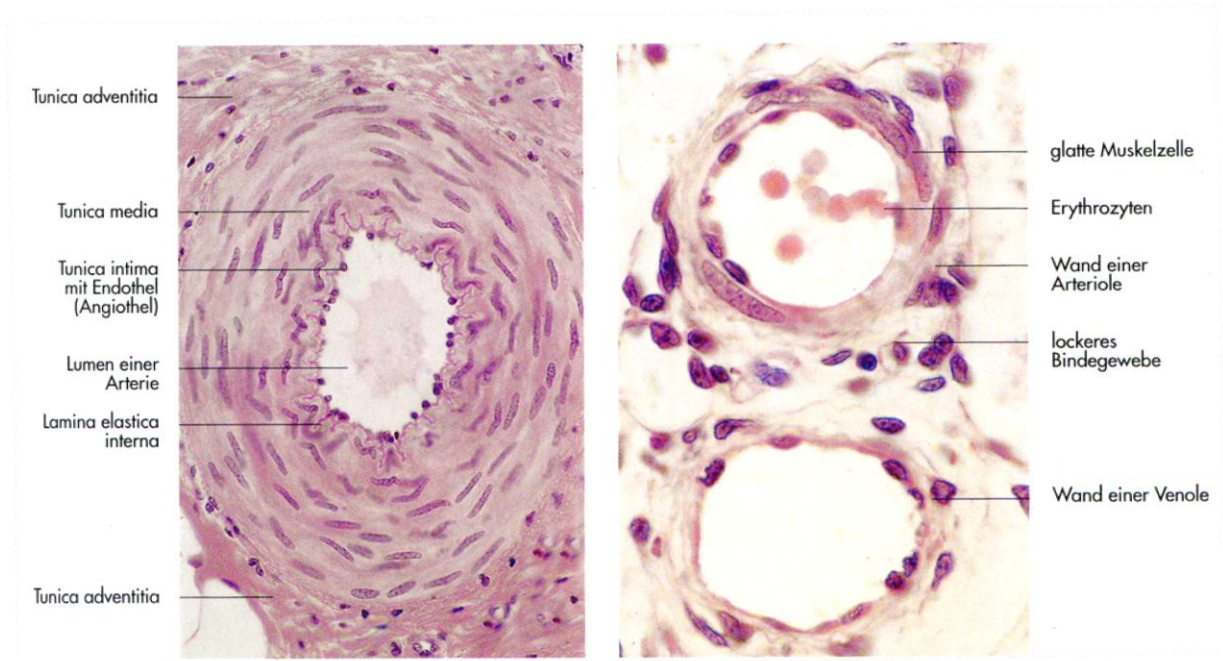


Abb. 2.2: Histologischer Schnitt durch eine Arterie (links) und durch eine Arteriole und eine Venole (rechts) (König et al. 2014).

Kapillaren und postkapilläre Venolen dienen dem Stoffaustausch. Dieser erfolgt entweder durch Diffusion, durch Transzytose oder durch in der Zellmembran liegende Transporter. Lipophile Substanzen wie O_2 und CO_2 können frei durch das Endothel diffundieren.

Hydrophile Substanzen können bei geringer Molekülgröße durch Poren im Endothel diffundieren, während größere Moleküle durch Transzytose oder durch Transporter durch das Endothel geschleust werden (Liebich 2004).

Der Aufbau der Kapillarwand spielt beim Transportprozess eine große Rolle. Man unterscheidet drei verschiedene Kapillartypen. Kontinuierliche Kapillaren kommen im Körper am häufigsten vor und besitzen ein vollständig oder fast vollständig geschlossenes Endothel. Dieser Typ ist in der Skelettmuskulatur zu finden. Fenestrierte Kapillaren besitzen ein von Poren durchsetztes Endothel. Moleküle geringer Größe können schnell diffundieren, während

größere Moleküle die Poren nicht passieren können. Dieser Kapillartyp kommt im Dünndarm, in der Niere und in endokrinen Organen vor. Diskontinuierliche Kapillaren, auch Sinusoide genannt, haben eine siebartige Struktur, die auch großen Molekülen den Übertritt gewährt. Die Basalmembran kann vollständig fehlen. Dieser Typ kommt in der Leber vor (Abb. 2.3) (Aumüller et al. 2014).

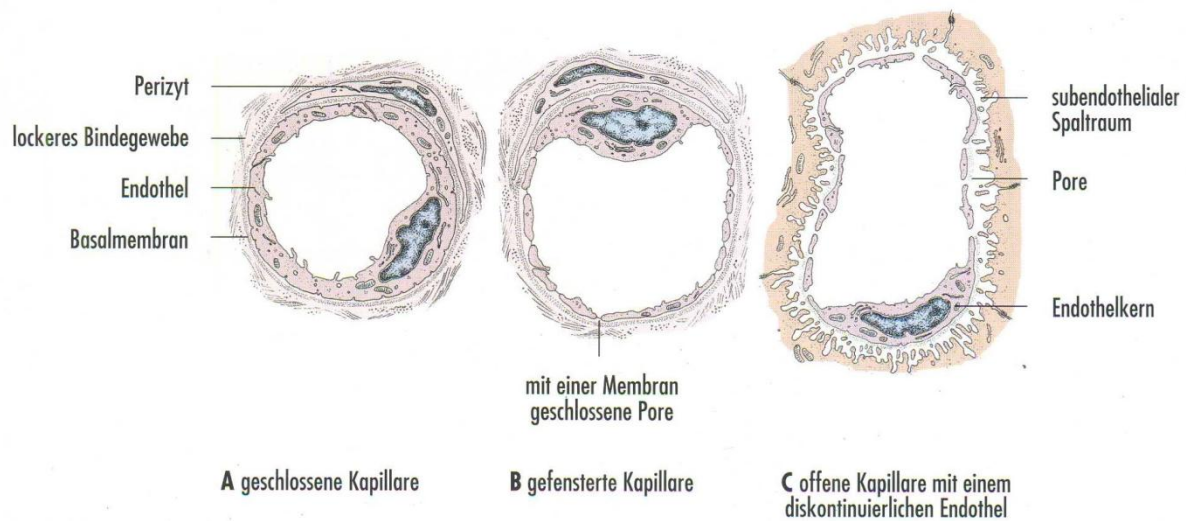


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Kapillartypen. A: Kapillare mit einem zusammenhängenden Endothel, B: Kapillare mit fenestriertem Endothel, C: sinusoide Kapillare (Liebich 2004).

2.3.1 Adenosin

Adenosin ist ein körpereigenes Nukleosid mit vielfältigen Aufgaben im Organismus. Adenosin besteht aus der Nukleinbase Adenin und dem Zucker β -D-Ribose (Aggarwal et al. 1994). Spezifische Rezeptoren für Adenosin befinden sich u.a. auf der Membranoberfläche der glatten Muskelzellen der Gefäße und auf Endothelzellen. Es handelt sich um G-proteingekoppelte Rezeptoren, die purinergischen Rezeptortypen P1 und P2 mit den beiden P1-Subtypen A1 und A2 (Lynge et al. 2000, Pelleg et al. 1990). Adenosin besitzt eine starke vasodilatatorische Wirkung insbesondere an Widerstandsgefäßen entweder direkt durch Bindung an A2-Rezeptoren in der glatten Muskulatur der Blutgefäße oder indirekt durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO, Endothelium derived relaxing factor) oder von Prostaglandin (Cano et al. 1992).

Die Blutflussverteilung durch Adenosinabgabe ähnelt der im arbeitenden Muskel. Jedoch werden bei körperlicher Arbeit deutlich mehr nutritive Gefäße durchblutet, während Adenosin besonders nicht-nutritive Shuntgefäße öffnet (Clark et al. 2008). Dies führt zu einer heterogenen Blutflussverteilung. Heinonen und Mitarbeiter (2009) beobachteten nach Adenosinapplikation in die Femoralarterie beim Menschen eine besonders stark erhöhte Durchblutung in tieferen Oberschenkelmuskelregionen, die viele kapillarreiche rote Muskelfasern enthalten. Der Blutfluss war besonders im M. quadriceps femoris signifikant inhomogen. Der Blutfluss auf der kontralateralen Seite wurde etwa auf ein Drittel des Ruheflusses gesenkt (Heinonen et al. 2009).

Die Plasmahalbwertszeit von Adenosin ist mit deutlich unter zehn Sekunden sehr kurz (Moser et al. 1989). Die Wirkung setzt innerhalb von 30 Sekunden nach peripherer venöser Verabreichung ein. Eine schnellere Wirkung wird nach Injektion in den zentralen Kreislauf erwartet. Um die Wirkung von Adenosin über längere Zeiträume aufrechtzuerhalten, sollte es kontinuierlich z.B. über einen Perfusor appliziert werden. Die vasodilatatorische Wirkung von Adenosin hat eine Blutdrucksenkung zur Folge. Reflextachykardie und Reninausschüttungen werden bei Adenosin im Gegensatz zu vielen anderen Vasodilatoren seltener beobachtet. Adenosin stellt die Koronargefäße des Herzens weit. Deshalb wird es in der Diagnostik der coronaren Herzkrankheit mittels Stress-MRT eingesetzt (Schwitter et al. 2006). Adenosin verlängert außerdem die Überleitungsgeschwindigkeit am AV-Knoten des Herzens und verringert die Herzfrequenz. Es wird therapeutisch als Antiarrhythmikum bei paroxysmalen supraventrikulären Tachykardien, u.a. zur Beendigung der AV-Reentry-Tachykardie, eingesetzt (Aggarwal et al. 1994).

2.4 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein komplexes bildgebendes Verfahren, das ermöglicht Schnittbilder des Körpers detailliert mit einem sehr guten Weichteilkontrast darzustellen. Um ein Gewebe mittels MRT darstellen zu können, müssen unpaare Elemente vorhanden sein, weil diese ein messbares magnetisches Kernmoment enthalten. Das bedeutendste Element für die medizinische Nutzung der Kernspintomographie ist der Wasserstoff (^1H). Die Verteilung der Wasserstoffatomkerne im Gewebe ist charakteristisch

und macht somit eine Unterscheidung der verschiedenen Gewebe möglich. Ein Wasserstoffatom besteht aus einem positiv geladenen Proton und einem negativ geladenen Elektron und ist somit elektrisch neutral. Das Proton besitzt neben seiner positiven Ladung den sogenannten Spin, eine Grundeigenschaft der Elementarteilchen (Weishaupt et al. 2014). Das Proton dreht sich wie ein Kreisel um sich selbst um eine Rotationsachse. Anders als beim mechanischen Kreisel kann ein Spin nicht abgebremst oder beschleunigt werden, er bleibt immer konstant. Nur die Lage der Rotationsachse kann durch äußere Magnetfelder beeinflusst werden und gemessen werden. Das Proton besitzt durch die rotierende elektrische Ladung ein magnetisches Moment. Es verhält sich wie ein Magnet, der durch seine Bewegung Spannung in einer Empfangsspule induzieren kann (Weishaupt et al. 2014).

Wird der Patient in ein statisches magnetisches Feld gebracht, so richten sich die Spins der Wasserstoffatome nach der magnetischen Achse aus. Wie bei einem Kreisel, auf den eine Kraft wirkt, kommt es zu einer Ausgleichsbewegung bei den Spins bei der Rotation um die Achse, die Präzessionsbewegung genannt wird. Diese erfolgt in einer charakteristischen Frequenz, der sogenannten Larmorfrequenz. Die Larmorfrequenz ist proportional zur Feldstärke des Magnetfeldes B_0 und die Grundlage der MRT-Bildgebung. Es entsteht allmählich durch die Stabilisierung der Spins in dem Magnetfeld eine Längsmagnetisierung. Die Spins ordnen sich entweder energetisch günstig im parallelen Zustand entlang der Feldlinien an oder im energetisch ungünstigerem antiparallelen Zustand. Es befinden sich geringfügig mehr Spins im parallelen Zustand. Diese kleine Differenz zwischen parallelen und antiparallelen angeordneten Spins ermöglicht die Messung der Längsmagnetisierung. Je stärker das angelegte Magnetfeld ist, umso deutlicher fällt die Längsmagnetisierung aus (Weishaupt et al. 2014).

Neben dem statischen Magnetfeld kann ein Magnetresonanztomograph ein dynamisches Magnetfeld induzieren. Durch Radiofrequenzpulse von Hochfrequenz- oder Gradientenspulen, die der Larmorfrequenz entsprechen, werden die Spins aus der stabilen Ruhelage achsensynchron ausgelenkt. Diese transversale Magnetisierung erzeugt ein MR-Signal. Die Protonen sind je nach Position einem etwas unterschiedlichen Magnetfeld ausgesetzt. Die umgebenden Moleküle schirmen das Magnetfeld zusätzlich etwas ab, sodass die Spins relativ schnell ihre Phasenkohärenz verlieren. Nach Abschalten des Pulses relaxieren die Spins in ihren Ausgangszustand. Man unterscheidet dabei die Longitudinal- und die Transversalrelaxation, die unabhängig voneinander ablaufen (Weishaupt et al. 2014).

Die longitudinale Relaxation ist der Wiederaufbau der longitudinalen Magnetisierung. Bei diesem Vorgang wird Energie an die Umgebung abgegeben, das MR-Signal wird schwächer. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs kann durch die T_1 -Relaxationszeit beschrieben werden. Die transversale Relaxation ist die Abnahme der transversalen Magnetisierung. Bei der Transversalrelaxation kommt es zu einer Interaktion zwischen den Spins, die durch eine Dephasierung gekennzeichnet ist. Die Energie wird nicht an die Umgebung abgegeben, sondern an benachbarte Spins. Die Zeitkonstante, die diesen Prozess beschreibt, ist die T_2 -Relaxationszeit. Sie ist weitgehend unabhängig von der Magnetfeldstärke (Breitenseher et al. 2008). Zu erwähnen ist, dass durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes durch das Gerät und den Patienten selbst eine zusätzliche Dephasierung der Protonen bewirkt wird, die schneller abläuft als die T_2 -Relaxationszeit. Sie wird als T_2^* -Relaxationszeit bezeichnet. Die Relaxationsraten sind stoffspezifische Eigenschaften (Breitenseher et al. 2008).

Die Spulen des Magnetresonanztomographen empfangen die Signale der einzelnen Voxel, die in entsprechende Grauwerte umgewandelt werden. Durch die Messung der Longitudinal- und die Transversalrelaxation wird die Generierung T_1 - oder T_2 - gewichteter Bildkontraste ermöglicht (Breitenseher et al. 2008).

2.5 Kontrastmittel

Oftmals reichen Signalintensitätsdifferenzen unterschiedlicher Gewebearten nicht aus, um einen deutlichen Bildkontrast darzustellen. Deshalb werden häufig Kontrastmittel eingesetzt, um eine bessere Beurteilung der Gewebsstrukturen zu ermöglichen (Weishaupt et al. 2014). Ein geeignetes Kontrastmittel muss neben physikochemischen auch adäquate pharmakologische Eigenschaften besitzen. Kontrastmittel sollen möglichst unverändert und ohne eine eigene Wirkung vom Organismus aufgenommen und schnell wieder ausgeschieden werden. Um den MR-Kontrast zu erhöhen, kann ein Kontrastmittel die Relaxationszeiten (T_1 , T_2 , und/oder T_2^*) verkürzen, lokale Magnetfeldhomogenitäten verändern (Suszeptibilitätseffekte), die Anzahl der Protonen in einem Voxel verändern oder die Larmofrequenz verschieben (Weishaupt et al. 2014). Die am häufigsten eingesetzten Kontrastmittel sind Gadoliniumkomplexe, die eine Verkürzung der drei Relaxationszeiten bewirken. Sie weisen eine hohe Dipol-Dipol- und Dipol-Gitter-Wechselwirkung auf. In der klinischen Anwendung spielt insbesondere die Verkürzung der T_1 -Zeit eine Rolle, bei der den

angeregten Spins schneller Energie entzogen wird und das Signal bei T₁-gewichteten Sequenzen zunimmt (Weishaupt et al. 2014).

Gadoliniumkomplexe gehören zu den paramagnetischen Kontrastmitteln. Gadolinium selbst ist ein Element aus der Gruppe der Lanthanoide und ist in ungebundener Form hochtoxisch. Gadoliniumionen verhalten sich aufgrund ihrer praktisch identischen Molekülgröße wie Kalzium und können so zahlreiche Kalzium-abhängige Prozesse im Körper blockieren (Schulte et al. 2006).

Es wird deshalb an Chelate, wie z.B. DTPA oder DOTA, gebunden. Diese Komplexe können metabolisch unverändert nach einer Plasmahalbwertszeit von etwa 90 min renal ausgeschieden werden. Nach ca. 24 h ist das Kontrastmittel fast vollständig ausgeschieden (Schulte et al. 2006). Die verwendeten Liganden haben Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften des Kontrastmittels. So können niedermolekulare oder hochmolekulare Komplexe erzeugt werden, die unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten in der Praxis bieten. Niedermolekulare Kontrastmittel extravasieren in den meisten Gewebearten nach intravenöser Applikation schnell und reichern sich im Interstitium an. Sie eignen sich deshalb insbesondere zum Nachweis von Geweben mit veränderter Vaskularisation, wie z.B. in Tumoren, Entzündungen oder Infarkten, zur Perfusionsdarstellung oder zur Funktionsdarstellung der Nieren. Im Gehirn wird bei einer intakten Blut-Hirn-Schranke ein Übertritt ins Gewebe verhindert. Deshalb werden diese Kontrastmittel häufig genutzt, um Leckagen anzuzeigen (Weishaupt et al. 2014).

Hochmolekulare Gadoliniumverbindungen können als sogenannte Blutpool-Kontrastmittel verwendet werden. Sie verbleiben länger intravasal und eignen sich besonders zur Darstellung von Gefäßen. Angiographien können so länger und wiederholt durchgeführt werden. Die Detektion schwierig darzustellender Gefäßstrukturen oder Thrombembolien wird ermöglicht. Durch den verlängerten Aufenthalt in den Gefäßen eignen sich intravasale Kontrastmittel gut zur Perfusionsquantifizierung. Neben hochmolekularen Gadoliniumkomplexen sind auch kleine ummantelte superparamagnetische Eisenoxidpartikel als intravasale Kontrastmittel geeignet (Weishaupt et al. 2014). Nach Weishaupt (2014) ist keines der zugelassenen intravasalen Kontrastmittel auf dem europäischen Markt erhältlich. Dies hat sich nach unserem Kenntnisstand nicht geändert.

2.5.1 Verwendete Kontrastmittel

Zur Darstellung der Extravasation wird das niedermolekulare Kontrastmittel Gadotersäure, bzw. Gd-DOTA, (Dotarem®, Guerbet, Frankreich) verwendet. Dotarem besteht aus einem Gadolinium-Ion, das an den makrozyklischen Komplexbildner DOTA ligiert ist. Dotarem hat ein Molekulargewicht von 0,56 kDa und einen Durchmesser von 0,9 nm. Es wird im Organismus kaum an Proteine gebunden und folglich rasch über die Nieren ausgeschieden. Seine Osmolalität beträgt in Wasser mit einer Temperatur von 37°C 1350 mOsmol/kg und die Relaxivität $3,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (bei 20MHz). Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 48 min und das Verteilungsvolumen 187 ml/kg (Niendorf et al. 2013). Dotarem verkürzt sowohl die T_1 - als auch die T_2 -Relaxationszeit mit deutlichem Schwerpunkt auf der T_1 -Relaxationszeit. Dotarem gilt als risikoarmes, gut verträgliches Kontrastmittel. Es kann gelegentlich zu allergischen Reaktionen kommen. Weitere mögliche Nebenwirkungen sind Nausea, Hautausschläge, Dyspnoe, Bronchospasmen, Exzitationen, Kopfschmerzen und Hitzeempfindungen. Sehr selten und bei bestehender Vorschädigung der Nieren kann es zur nephrogenen systemischen Fibrose führen (Ishiguchi et al. 2010).

Zur Darstellung der Gefäße wird das intravasal verbleibende, makromolekulare Kontrastmittel Gadofosveset Trinatrium (Vasovist®, Bayer Schering, Berlin, Deutschland/Ablavar® Lantheus Medical Imaging, Inc., USA) verwendet. Vasovist besteht aus einem stabilen Gadolinium-Diethylen-Triamin-Pentaacetat-Chelat (Gd-DTPA), das mit einer albuminbindenden Diphenyl-Cyclohexylphosphat-Gruppe substituiert ist. Vasovist bindet sich reversibel an Serumalbumin. Speziesabhängig ergeben sich unterschiedliche Bindungsraten. In niedriger Konzentration bindet Vasovist bis zu 90% an humanes Serumalbumin (Lauffer et al. 1998). Beim Schwein ist die Bindungsrate mit 83-87% etwas niedriger, jedoch vergleichsweise höher als bei anderen Tierarten (Eldredge et al. 2006). Durch seine Bindung an Albumin vergrößert sich sein Molekulargewicht von 957 Da auf 68 kDa (Barrett et al. 2006). Erst durch diese Bindung spricht man von einem makromolekularen Kontrastmittel, das lange intravasal verbleiben kann und kaum extravasiert. Die mittlere Halbwertszeit der Verteilungsphase beträgt nach intravenöser Applikation einer Dosis von 0,03 mmol/kg etwa 0,48 h. Das Verteilungsvolumen beträgt im Gleichgewicht etwa 148 ml/kg. Die Relaxivität beträgt bei 20 MHz im Plasma 33,4 bis $45,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und die Osmolalität bei 37 °C im Wasser 825 Osmol/kg. Die Eliminations- Halbwertszeit ist relativ

lang und beträgt ca. $16,3 \pm 2,6$ h (Weishaupt et al. 2014). Als Nebenwirkungen können Übelkeit, Pruritus, Parästhesien, Kopfschmerzen und Geschmacksveränderungen auftreten.

2.6 DCE-MRI und pharmakokinetische Modelle

Bei der dynamischen kontrastmittelverstärkten Magnetresonanztomographie (DCE-MRI) werden dynamische Bilder nach einer Bolusinjektion eines Kontrastmittels akquiriert (Sourbron et al. 2013). Sie wird insbesondere eingesetzt, um die Gewebepfusion und Permeabilität der Gefäße darzustellen. Es werden die zeitlichen Signaländerungen, die durch Veränderungen der Kontrastmittelkonzentration im Blut und Gewebe entstehen, gemessen (Runge et al. 1984). Meistens wird ein niedermolekulares Kontrastmittel intravenös injiziert. Zunächst befindet sich das Kontrastmittel fast ausschließlich intravaskulär. Um die Anflutung des Bolus darstellen zu können, wird eine hohe zeitliche Auflösung benötigt (Pettigrew et al. 1986). Bereits nach kurzer Zeit beginnt das Kontrastmittel mittels Diffusion in den interstitiellen Raum zu extravasieren. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist abhängig von der Perfusion, der Art des Gewebes, der Anzahl und Permeabilität der Blutgefäße, dem Gefäßwiderstand, der Beschaffenheit des Interstitiums und dem venösen Abfluss (Lucia et al. 1998). Die Akquisitionszeit muss entsprechend lang gewählt werden, um den Vorgang adäquat abbilden zu können (Tofts et al. 1989).

Durch Verwendung geeigneter pharmakokinetischer Modelle können die Vaskularisation des Gewebes beschreibende Parameter bestimmt werden. Für die Diagnostik wichtige Parameter wie die Perfusion, Blutvolumen, interstitielles Volumen und das Zellvolumen sind hierbei von besonderem Interesse (Jahng et al. 2014). Zur Bestimmung können pharmakokinetische Kompartimentmodelle verwendet werden. Dazu können die durch die DCE-MRI ermittelten Signalintensitäten in Kontrastmittelkonzentrationen konvertiert werden. Es wird für diese mathematischen Modelle die arterielle Eingangsfunktion (AIF) bestimmt. Die AIF bildet den Bolus des Kontrastmittels nach Injektion ab. Die Kontrastmittelkonzentration in der zuführenden Arterie des Gewebes von Interesse wird gemessen. Eine hohe zeitliche Auflösung ist hierfür erforderlich (Sourbron et al. 2013).

Man unterscheidet je nach angenommener Anzahl der Verteilungsräume Ein-, Zwei- und Mehrkompartimentmodelle. Das einfachste Modell ist das Ein-Kompartimentmodell, das annimmt, dass sich das Kontrastmittel ausschließlich intravasal befindet (Rosen et al. 1989). Dieses Modell wird häufig angewendet, um die Perfusion und das Blutvolumen im Gehirn bei intakter Blut-Hirn-Schranke zu bestimmen. Bei gestörter Blut-Hirn-Schranke oder in Geweben, in denen das Kontrastmittel auch extravasieren kann, liefert dieses einfache Modell jedoch unzuverlässige Ergebnisse (Bruening et al. 1996).

Um die Extravasation zu berücksichtigen kann ein zweites Kompartiment hinzugezogen werden, das Interstitium. Zwei-Kompartiment-Modelle beschreiben den Austausch des Kontrastmittels zwischen Gefäßsystem und Interstitium. Neben der Perfusion und der Permeabilität lassen sich mit diesem Modell auch das Blutvolumen und das interstitielle Volumen bestimmen (Lüdemann et al. 2000). Je nach Fragestellung können in Mehr-Kompartiment-Modellen noch weitere Kompartimente hinzugenommen werden.

2.6.1 TWIST- Sequenz

Um die arterielle Eingangsfunktion und die Extravasation der Kontrastmittel mittels DCE-MRI darstellen zu können, ist eine hohe zeitliche Auflösung erforderlich bei adäquater Ortsauflösung. Die in den Arbeiten verwendete TWIST-Sequenz (Time-resolved angiography With Interleaved Stochastic Trajectories) bietet eine hohe Zeitauflösung und zugleich eine gute räumliche Auflösung. Um einen etwa zehn Sekunden dauernden Bolusdurchgang im zu messenden Gefäß darstellen zu können, ist eine zeitliche Auflösung von deutlich unter zwei Sekunden erforderlich (Song et al. 2009). Dies wird durch eine bestimmte k-Raum-Abtastung erreicht. Der k-Raum wird hierbei in zwei Regionen geteilt. Der zentrale k-Raum bietet Informationen zum Bildkontrast, während der periphere k-Raum die räumlichen Informationen beiträgt. Die zentralen k-Raum-Zeilen werden bei der TWIST-Sequenz während der Kontrastmittelgabe häufiger abgetastet als die peripheren, wodurch die Akquisitionszeit deutlich verkürzt werden kann und der Bolus im Zielvolumen gut erfasst wird. Diese sogenannte Schlüssellochtechnik wurde entwickelt, um DCE-MRI-Aufnahmen von Tumoren und Gefäßläsionen anzufertigen. Zielführend waren hierbei die wiederholte zentrale k-Raum-Abtastung und die nur zufällige Abtastung des peripheren k-Raumes. Der TWIST-Sequenz liegt eine 3D-Gradientenechosequenz zugrunde, die eine dünne Schichtdicke

mit sehr kurzen TRs und TEs bei niedrigen Anregungswinkeln mit Parallelbildgebung akquiriert (Laub et al. 2006). Die TWIST-Sequenz wird in der Klinik unter anderem für die periphere Angiographie verwendet, um durch Darstellung hämodynamischer Prozesse z.B. Stenosen zu erkennen. Im Gehirn dient die Sequenz der Erkennung von Gefäßmalformationen und in der Aorta der Darstellung von Aortendissektionen. Desweiteren können dynamische Aufnahmen der Lungen-, Nieren- oder Lebergefäße angefertigt werden (Laub et al. 2006).

3 Eigene Arbeiten

3.1 Originalarbeit 1:

Sauerbrey, A., Hindel, S., Maaß, M., Krüger, C., Wissmann, A.,
Kramer, M., Nafz, B., Lüdemann, L.

Establishment of a swine model for validation of perfusion measurement
by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging

BioMed Research International, 2014

3.2 Originalarbeit 2:

Hindel, S., Söhner, A., Maaß, M., Sauerwein, W., Baba, H. A.,
Kramer, M., Lüdemann, L.

Validation of Interstitial Fractional Volume Quantification by Using
Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine
Skeletal Muscles

Investigative Radiology, 2016, 52(1), 66-73

3.3 Originalarbeit 3

Hindel, S., Söhner, A., Maaß, M., Sauerwein, W., Möllmann, D.,
Baba, H. A., Kramer, M., Lüdemann, L.

Validation of Blood Volume Fraction Quantification with 3D Gradient Echo
Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine
Skeletal Muscle

PloS one, 12(1), 2017, e0170841.

4 Diskussion

4.1 Das Schwein als Modell

In Deutschland wurden im Jahr 2014 laut dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft etwa 2 Millionen Wirbeltiere und Kopffüßer für Tierversuche eingesetzt. Mäuse und Ratten machten mit rund 80% den größten Anteil aus. Schweine wurden nur zu etwa 0,5% eingesetzt. Schweine sind dem Menschen aufgrund ihrer Größe, Gewicht und sowohl vielen anatomischen und physiologischen Eigenschaften sehr ähnlich. Deshalb werden sie häufig für Untersuchungen kardiovaskulärer Fragestellungen eingesetzt (Swindle et al. 2012). Minipigs werden wegen ihrer geringeren Größe häufiger eingesetzt als Landschweine. In dieser Arbeit wurden Landschweine, sogenannte Hybriden, verwendet, weil sie sehr schnell ein dem Menschen ähnliches Gewicht und Größe erreichen. So konnte mit der MRT ein Volumen untersucht werden, das einem menschlichen Patienten entspricht. Zudem hat die Größe einen Einfluss auf Eigenschaften des Herz-Kreislaufsystems, die für Perfusionsstudien mit dem Ziel der klinischen Anwendung von erheblicher Bedeutung sind. Die Herzfrequenz der verwendeten Schweine lag zwischen 60-80 Schlägen/min und entspricht somit der Herzfrequenz eines Erwachsenen. Der Blutdruck liegt physiologischerweise bei Schwein und Mensch bei etwa 120/80 mmHg (Egner 2002). Der für die Berechnung der Parameter wichtige Hämatokrit ist bei Schwein und Mensch ebenfalls ähnlich. Er liegt bei Hybridschweinen zwischen 0,29 bis 0,45% (Kixmüller 2004), bei Männern bei ca. 0,47% und bei Frauen bei ca. 0,42% (Jelkmann 2010).

Zur Validierung der Perfusionsmessungen mittels DCE-MRI musste ein Modellgewebe ausgewählt werden. Die Messung von Perfusion, Blutvolumen und interstitiellem Volumen soll für das Staging von Tumoren eingesetzt werden. Es wäre deshalb naheliegend, Tumorgewebe zu untersuchen. Tumoren sind jedoch sehr inhomogen; Blutvolumen und interstitielles Volumen können variieren und stark vom gesunden Gewebe abweichen. Deshalb führten Vergleiche zwischen MRT- und histologischen Daten häufig nicht zum Erfolg (Egeland et al. 2009) und eine Validierung wird erschwert. Ein gesundes, homogenes Gewebe wie die Skelettmuskulatur ist deshalb deutlich besser geeignet. Sie kommt nahezu überall im Körper vor und kann gut als Referenzorgan dienen. Die Blutgefäßversorgung der

Muskulatur von Schwein und Mensch ist sehr ähnlich. Die Kapillardichte im Oberschenkel des Menschen liegt je nach Autor zwischen etwa 200-470 Gefäßen/mm² (Zoladz et al. 2005, Weber et al. 2006, Döring 2008). Dies entspricht auch der mittleren vaskulären Dichte (MVD) von etwa 370 Gefäßen/mm², die in dieser Arbeit histologisch im Oberschenkel beim Schwein gemessen wurden. Der Durchmesser der Kapillaren in der Skelettmuskulatur des Menschen beträgt zwischen 5-10µm (Tymł 1987). Morphometrisch ermittelt wurde in dieser Studie beim Schwein ein durchschnittlicher Durchmesser von 6,2 µm, der jedoch wahrscheinlich unterschätzt wird, weil die Gefäße durch fehlenden Blutdruck und histologische Präparation kollabiert waren.

Neben dem ähnlichen Aufbau der Muskulatur von Schwein und Mensch bietet auch die Funktionsweise einen Vorteil. Die Muskulatur ist in ihrer Perfusion sehr variabel. Die Applikation von Vasodilatoren wie Adenosin ermöglicht mehrere Messungen von unterschiedlichen Perfusionsstufen pro Schwein. Dies senkt den Verbrauch von Versuchstieren.

4.2 Einflüsse auf die dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRI)

Die DCE-MRI wird zunehmend eingesetzt, um Tumorgewebe zu untersuchen (Hylton et al. 2006; Zahra et al. 2007). Vergleiche der Daten, die mit DCE-MRI und mit histologischen Methoden ermittelt wurden, zeigen häufig eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen (Franiel 2011; Gemeinhardt 2008; Kiessling et al. 2004b). Doch auch bei gesundem Gewebe lassen sich manche Einflüsse nicht vermeiden. Die DCE-MRI basiert auf der intravenösen Bolusgabe eines Kontrastmittels. Das Kontrastmittel wird mit dem Blut zu dem zu messenden Gewebe transportiert. Durch den Weg durch den Körper kommt es zu einer Verzögerung der Ankunft im Gewebe und zu einer Aufweitung des Bolus. Eine ideale deltaförmige Bolusform kann physiologischerweise nicht generiert werden. Deshalb beschreibt die arterielle Eingangsfunktion (AIF) den Bolus in vivo. Aus dieser kann die Konzentration des anflutenden Kontrastmittels berechnet werden. Sourbron und Mitarbeiter (2011) messen der intravaskulären Phase der Kontrastmittel eine hohe Bedeutung zu. Sie stellten fest, dass das erweiterte Tofts-Modell in Gewebe mit mittleren oder geringen Blutflüssen das Blutvolumen

unterschätzt, weil die Bolusdispersion zwischen Messort in einer großen Arterie und der Ankunft im Gewebe nicht berücksichtigt wird. Das interstitielle Volumen kann überschätzt werden (Sourbron et al. 2011).

Neben modellabhängigen Effekten können bei der Messung der AIF auch Partialvolumeneffekte eine Rolle spielen. Deshalb sollte bei der Auswahl der Schichtdicke darauf geachtet werden, dass die relevante Arterie adäquat abgebildet wird. Zur Extraktion der AIF sollten deshalb nur Vollblutvoxel verwendet werden (Carreira 2009; Kiessling et al. 2004a). In dieser Arbeit hat sich die Aorta abdominalis bei der ausgewählten Schichtdicke als geeignet erwiesen, dieses Ziel zu erfüllen. Es kann jedoch sein, dass je nach gewähltem Gewebe, bzw. Körperteil, kein genügend großes Gefäß in der Nähe ist. Somit bestehen die Voxel nicht nur aus dem Signalanteil des Blutes, sondern auch aus dem Signalanteil des umliegenden Gewebes. Das Gewebeblutvolumen kann deshalb überschätzt werden.

Im Gewebe können desweiteren Wasseraustauscheffekte auftreten. Es wird angenommen, dass zwischen den Blutgefäßen und dem Interstitium ein stetiger Wasseraustausch stattfindet. Ein intravasales Kontrastmittel bewirkt eine schnellere Relaxation der Wasserstoffkerne im Blut. Diese Wasserstoffkerne können extravasieren und täuschen so im kapillären Gebiet des Gewebes eine Anwesenheit von Kontrastmittel vor. Gleichzeitig strömen schwächer relaxierte Wasserstoffkerne in die Blutgefäße, in denen das Kontrastmittel wiederum die Relaxation beschleunigt (Carreira 2009).

Bleiben diese Wasseraustauscheffekte unberücksichtigt, kann das Blutvolumen überschätzt werden. Carreira und Mitarbeiter (2011) haben diese Wasseraustauscheffekte untersucht und eine Überschätzung im Tumorgewebe von etwa 60% gefunden. Im gesunden Gewebe fiel diese Überschätzung deutlich geringer aus.

Der Unterschied zwischen gesundem und Tumorgewebe könnte durch eine veränderte Gefäßstruktur und -permeabilität begründet sein. Im Tumorgewebe sind kleinere Kapillaren zu finden, aber ihre Anzahl pro Flächeneinheit ist deutlich erhöht. Die Angiogenese in Tumorgewebe verläuft meist sehr rasch und chaotisch. Die Permeabilität der Kapillaren kann dadurch ebenfalls erhöht sein (Gemeinhardt 2008).

Neben Wasseraustauscheffekten kann auch die Extravasation der verwendeten Kontrastmittel die Ergebnisse beeinflussen. Das in dieser Arbeit verwendete Vasovist ist ein intravasales Kontrastmittel. Jedoch ist zu bedenken, dass etwa 90% des Kontrastmittels intravasal

verbleiben, während 10% extravasieren (Laufer et al. 1998). Eine hohe zeitliche Auflösung während des Bolusdurchgangs soll die Auswirkungen dieses Effektes minimieren. Bei alleiniger Verwendung eines niedermolekularen Kontrastmittels, wie Dotarem, könnte die schnellere Extravasation einen deutlich höheren Einfluss auf die Berechnung der Parameter nehmen.

4.3 Tofts-Modelle und Zwei-Kompartimente-Austausch-Modell

In der DCE-MRI werden pharmakokinetische Modelle verwendet, um durch die Verwendung von Signal-Zeit-Kurven die Dynamik eines Kontrastmittels im Gewebe zu beschreiben. In der Onkologie trugen diese Modelle bereits früh dazu bei, Therapieerfolge zu überprüfen (O'Connor et al. 2007). Kompartimentmodelle teilen das zu messende Gewebe in Verteilungsräume eines Indikators auf. Es wird angenommen, dass die Verteilung des Indikators in dem jeweiligen Kompartiment homogen ist. Erste Kompartimentmodelle wurden von Tofts und Mitarbeitern (1991) entwickelt, um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu berechnen. Der Transport eines niedermolekularen Kontrastmittels aus den Gefäßen, genauer aus dem Blutplasma, ins Interstitium wird in diesem Ein-Kompartimentmodell beschrieben. Es wird entweder nur die Konzentration innerhalb der Gefäße und nicht im Interstitium oder nur die Verteilung des Kontrastmittels im Interstitium berücksichtigt, während die Konzentration in den Gefäßen vernachlässigt wird. Im Tofts-Modell werden die Perfusion und das Permeabilitäts-Oberflächenprodukt (PS) in der Austauschkonstante k^{trans} zusammengefasst. Eine getrennte Quantifizierung von Perfusion und Permeabilität ist nicht möglich. Durch stetige Verbesserung der MRT-Technik wurde die Messung weiterer physiologischer Parameter ermöglicht. Die Verwendung von Ein-Kompartimentmodellen reicht häufig insbesondere bei der Untersuchung von Tumorgewebe nicht mehr aus (Carreira et al. 2011; Li et al. 2000; Port et al. 1999).

Das erweiterte Tofts-Modell schließt neben dem interstitiellen Volumen auch die Verteilung des Kontrastmittels in den Gefäßen mit ein. Somit ist es möglich, das Blutvolumen zu bestimmen. Mit einer hohen zeitlichen Auflösung wird der Bolusdurchgang des zuführenden Gefäßes, in diesem Falle der Aorta, gemessen. Die AIF dient der Berechnung der Plasmakonzentration des Kontrastmittels. Nach der intravenösen Injektion eines Kontrast-

mittels kommt es zu einer Aufweitung des Bolus zwischen Messort in einer großen Arterie und der Ankunft im Gewebe, der Dispersion. Dies kann zu einer Unterschätzung des Blutvolumens führen (Sourbron et al. 2011).

Die Berücksichtigung der Bolusaufweitung führt zu genaueren Ergebnissen der Berechnung des Blutvolumens im Zielgewebe. Beim Zwei-Kompartimente-Austausch-Modell (2CXM) wird die Dispersion im Kapillarnetz mit einbezogen. Dieses Modell besteht aus den Kompartimenten des Kapillarnetzes und des extravaskulären-extrazellulären Raum (EES), dem Interstitium. Es wird angenommen, dass Kontrastmittel nicht nur ins Interstitium extravasiert, sondern auch wieder ins Blutgefäßsystem zurückfließt. Dies trifft auf die meisten Gewebe im Körper zu. Es wird bei diesem Modell also nicht nur davon ausgegangen, dass es einen arteriellen Zufluss von Kontrastmittel gibt, sondern auch einen weiteren Zufluss, nämlich den Rückfluss des bereits extravasierten Kontrastmittels aus dem Gewebe. Deshalb wird dieses Modell als Austauschmodell bezeichnet. Das Modell ist durch die vier Parameter interstitielles Volumen (v_e), Plasmavolumen (v_b), Blutfluss (F) und PS charakterisiert. Die Bolusaufweitung wird in diesem Modell jedoch nicht optimal bestimmt (Sourbron et al. 2013).

Ein weiterer Ansatz, um Perfusionsmessungen weiter zu verbessern, könnte die Verwendung von Distributionsmodellen sein. Bei dieser Art Modell wird das Gewebe nicht in Kompartimente aufgeteilt, sondern es handelt sich um Modelle aus der Strömungslehre. Kapillaren werden als Röhren betrachtet, in denen alle Partikel die exakt gleiche Geschwindigkeit haben (Sourbron et al. 2011). Diese Röhre wird in eine Kette aus einzelnen Kompartimenten aufgeteilt, in denen jeweils eine identische Plasmakonzentration des Kontrastmittels herrscht. Die Kontrastmittelkonzentration entlang des Kapillarnetzes kann so bestimmt werden. Die Validierung dieses Modells könnte die Perfusionsmessungen mittels DCE-MRI weiter verbessern.

4.4 Histologische Validierung der pharmakokinetischen Modelle

Für die Tumordiagnostik ist die Anwendung bildgebender Verfahren von hoher Bedeutung. Sie geben Informationen über die genaue Lokalisation, Form und Größe des Tumors. Häufig

ist es allerdings nicht möglich, die Dignität des Tumors zu bestimmen, sodass eine Biopsieentnahme mit anschließender histologischer Untersuchung notwendig wird. Dies kann für den Patienten mit Risiken verbunden sein und in manchen Fällen ist eine Biopsieentnahme nicht möglich. Neben morphologischen Eigenschaften des Tumors ist es deshalb sinnvoll, auch funktionelle Parameter zu bestimmen, die auf die Dignität des Tumors schließen lassen. Hinweise auf die Malignität eines Tumors bieten die Perfusion, das Blutvolumen und das interstitielle Volumen (Lüdemann et al. 2006; Weidner et al. 1993). Die Gefäße von Tumoren unterscheiden sich in Aufbau und Funktion deutlich von Gefäßen im gesunden Gewebe. Die Gefäßmuster bösartiger Tumoren sind oft unstrukturiert und chaotisch. Die Gefäße können erweitert, blind endend und gewunden sein und zudem können ein unterbrochenes Endothel oder fehlende Basalmembranen dazu führen, dass es zur Extravasation von Blut und Blutbestandteilen kommen kann (Vaupel 2009). Die Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes kann deshalb auch innerhalb eines Tumors erheblich variieren. Außerdem spielen intratumorale Druckgradienten und akute oder chronische Anämie in der Sauerstoffversorgung ebenfalls eine Rolle.

Hypoxische Areale finden sich vor allem in großen Tumoren mit nekrotischen Bereichen. Auch kleine Tumoren, operative Randbereiche, Areale mit Tumordinfiltration und Mikrometastasen können hypoxisch sein (Harrison et al. 2002).

Eine Veränderung des Volumenanteils des Interstitiums kann auf einen krankhaften Prozess hindeuten. Tumoren und Nekrosen können ein verändertes interstitielles Volumen aufweisen. Die meisten Tumoren zeigen im Vergleich zu gesundem Gewebe ein um das 3-5-fache vergrößertes Interstitium mit erhöhtem Kollegengehalt (Jain 1987, Vaupel 2009). Insbesondere bei Hirntumoren kann eine Vergrößerung des interstitiellen Volumens, vor allem im Bereich nekrotischer Areale, beobachtet werden (Lüdemann et al. 2005). Eine Zunahme des interstitiellen Volumens kann außerdem auf einen hypoxischen Bereich hindeuten (Vaupel 2009). Da hypoxische Tumoreareale vermindert auf eine Bestrahlung ansprechen, hat die Detektion dieser Areale eine große Bedeutung für die Bestrahlungsplanung.

Die Validierung pharmakokinetischer Modelle in der DCE-MRI ist deshalb von großem Interesse. Die Verwendung der Morphometrie als Referenzmethode bietet ein einfaches, von der Bildgebung unabhängiges Verfahren, um bedeutsame Parameter wie Blutvolumen,

Gefäßdichte, Gefäßdurchmesser oder das interstitielle Volumen zu bestimmen. Bisherige Arbeiten haben vor allem Tumorgewebe als Modell gewählt. Tumorgewebe ist ein sehr heterogenes Gewebe, sodass ein Vergleich von MRT-Daten mit histologischen Analysen schwierig und oft nicht erfolgreich ist (Egeland et al. 2009; Gemeinhardt 2008; Franiel 2011; Lutterbeck 2011). Die Untersuchung der gesunden Skelettmuskulatur hat den Vorteil, dass es sich um ein homogenes Gewebe handelt. Eine räumliche Zuordnung der Proben ist im Gegensatz zum Tumorgewebe von geringer Bedeutung. Dennoch ist zu bedenken, dass die Histologie nur einen sehr kleinen Teil des Muskels abbilden kann, während die DCE-MRI auch große räumliche Abdeckungen ermöglicht.

Die adäquate Präparation der histologischen Proben ist essentiell, um zuverlässige morphometrische Ergebnisse zu erhalten. Dazu wurden je nach Fragestellung verschiedene Präparationsmethoden verwendet. Zur Untersuchung des interstitiellen Volumens sollen die Präparate möglichst den anatomischen Gegebenheiten in vivo entsprechen. Die Verwendung von Gefrierschnitten bietet den Vorteil, dass nur eine minimale Präparation notwendig ist und das Gewebe sehr gut erhalten bleibt (Mulisch et al. 2015). Schrumpfungen fallen nicht so ins Gewicht, wie es z.B. bei Paraffinschnitten der Fall ist. Eine gute Schneidetechnik ist notwendig, um Brüche und Überlagerungen des Gewebes auf ein Minimum zu beschränken. Die Auswahl der Bereiche, die morphometrisch untersucht werden sollen, muss zufällig erfolgen, jedoch sollten artefaktreiche Areale von der Messung ausgeschlossen werden. Die Verwendung einer semi-automatischen Morphometriesoftware bietet den Vorteil, dass eine gute, objektive Vorauswahl der zu messenden Strukturen möglich ist. Der Schwellwert muss jedoch manuell gesetzt werden, sodass der Auswahl eine gewisse Subjektivität innewohnt. Da Gewebefärbungen immer variieren können, ist eine manuelle Korrektur unumgänglich. Es muss berücksichtigt werden, dass morphometrische Analysen somit systematische Fehler enthalten könnten, wenn sie nur von einem Untersucher durchgeführt werden.

Die Bestimmung des Blutvolumens, bzw. genauer des histologischen Korrelats, der mittleren Gefäßfläche (MVA), wurde an paraffinfixierten, isolectingefärbten Schnitten durchgeführt. Bei der Bestimmung der Gefäßfläche sollte ebenfalls auf die Untersuchung artefaktreicher Areale verzichtet werden. Bei paraffinfixierten Schnitten tritt zudem eine deutliche Schrumpfung des Gewebes auf, die berücksichtigt werden muss. Durch den fehlenden Blutdruck in der Probe fallen Gefäße in sich zusammen. Um das Blutvolumen zu bestimmen,

müsste die Gefäßlumenfläche bestimmt werden. Da dies nicht möglich war, wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet, um das Blutvolumen zu ermitteln. Im ersten Verfahren wurden die deutlich gefärbten Gefäßwände detektiert und die Lumenflächen, falls notwendig, manuell hinzugefügt. So konnte die MVA bestimmt werden. Jedoch ist durch die zusammengefallenen Gefäße mit einer Unterschätzung des Wertes zu rechnen. Um das Blutvolumen genauer bestimmen zu können, wurde deshalb die Anzahl der Gefäße pro mm² (mittlere Gefäßdichte, MVD) herangezogen. Die MVD wurde mit der mittleren Gefäßlumenfläche multipliziert, wobei ein mittlerer Gefäßdurchmesser der Kapillaren laut Literatur von 8 µm (Renkin 1989) angenommen wurde. Die so ermittelten Werte entsprechen eher den realen Werten.

4.5 DCE-MRI und biologische Bestrahlungsplanung in der Tiermedizin

Die durchschnittliche Lebenserwartung von Hunden und Katzen ist in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen (Kraft 1997). Mit zunehmendem Alter nehmen Tumorerkrankungen zu. Auch rassebedingte Prädispositionen für Tumorerkrankungen spielen eine Rolle. Zugleich werden Diagnose- und Therapiegeräte wie Magnetresonanztomographen und Linearbeschleuniger verfügbarer. Der Anspruch und die Bereitschaft der Tierbesitzer, teure und aufwendige Therapieverfahren zur Tumorbehandlung nutzen zu wollen, wächst (Hill 2014). Die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) wird von einigen großen Kliniken bereits eingesetzt. In einem Fallbericht wurde vermutlich durch den Einsatz der IMRT bei einem intranasalen Tumors eines Shi-Tzus die Überlebenszeit deutlich erhöht (Rancilio et al. 2015). Um hypoxische Areale von Tumoren adäquat bestrahlen zu können, ist ihre Detektion essentiell. Viele Wissenschaftler haben sich bereits mit Tumorphoxie bei Hunden und Katzen beschäftigt. Bruehlmeier et al. (2005) untersuchten mit [18F]FMISO-PET die Hypoxie in caninen Sarkomen. In Fibrosarkomen Grad II, anaplastischen Sarkomen und Osteosarkomen konnten die Autoren hypoxische Areale finden, in Myxosarkomen und Fibrosarkomen Grad I hingegen nicht (Bruehlmeier et al. 2005). Maligne Maulhöhlentumoren weisen ebenfalls klinisch relevante hypoxische Areale auf (Achermann et al. 2004).

Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome bei Katzen und Menschen verhalten sich biologisch sehr ähnlich. Auch hier ist die Hypoxie ein wichtiger Faktor, die Aggressivität und

Strahlenempfindlichkeit zu bestimmen (Ballegeer et al. 2013). Meier und Mitarbeiter (2016) stuften deshalb Perfusionsmessungen als relevant für Tumorphoxiebestimmungen ein.

Zur nicht-invasiven Quantifizierung der Perfusion von Hirntumoren bei Hunden wurden bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) und MRT empfohlen, weil auch diese Tumoren eine veränderte Perfusion und Blutvolumen zeigen als gesundes Gewebe (MacLeod et al. 2009, Zwingenberger et al. 2016). Der Behandlungserfolg sollte ebenfalls mit bildgebenden Verfahren überprüft werden. Besonders zur Bestrahlungsplanung komplexer Strukturen, wie z.B. Nasenhöhle und Gehirn, und um eine genaue Dosisverteilung zu gewährleisten, sollten CT- und MRT-Methoden angewendet werden (Withrow et al. 2007, McEntee et al. 1991). Die Erhöhung der Überlebenszeit von Hunden mit Nasentumoren soll vor allem auf die Verbesserung der Bestrahlungspläne zurückzuführen sein (McEntee et al. 1991). Die Messung der Perfusion und anderer Parameter in Tumoren mittels DCE-MRI würde die Bestrahlungsplanung tierischer Patienten deutlich verbessern. Zur Überprüfung des Therapieerfolgs einer Hyperthermie-Behandlung caniner Weichteilsarkomen hat sich die DCE-MRI als geeignet erwiesen (Viglianti et al. 2009). Diese Arbeit hatte das Ziel, ein Tiermodell zu entwickeln, um Perfusionsmessungen und andere Parameter mittels DCE-MRI validieren zu können. In erster Linie stand zunächst die Vergleichbarkeit mit dem Menschen im Vordergrund. Die Anwendbarkeit der Protokolle bei kleineren Tieren wie Hunden und Katzen ist grundsätzlich gut vorstellbar und bedarf weiterer Erforschung. Insbesondere die bei kleineren Tieren höheren Herzfrequenzen und Zirkulationsraten machen eine gezielte Überprüfung der Methodik bei diesen Tieren notwendig. Die klinische Relevanz von Perfusionsmessungen konnte gezeigt werden. Um geeignete Perfusionsmessungen auch bei Haustieren verfügbar zu machen soll diese Arbeit Ansatzpunkte für weitere Forschungen bieten.

5 Zusammenfassung

Die Messung der Perfusion, des Blutvolumens und des interstitiellen Volumens von Tumorgewebe ist von großer Bedeutung für das Staging von Tumoren und die biologische Bestrahlungsplanung. Die Perfusion oder Durchblutung des Gewebes zeigt die Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und vor allem Sauerstoff an. Die Abwesenheit von Sauerstoff, z.B. in nekrotischen Tumorarealen, hat eine Erniedrigung der Strahlensensibilität des Gewebes zur Folge (Sauerstoffeffekt). Kenntnisse über die Perfusionsverhältnisse im Tumor sind essentiell für eine gezielte Bestrahlung. Weitere Parameter, wie das Blutvolumen und das interstitielle Volumen, geben zudem Aufschluss über die Malignität des Tumors. Eine Messung dieser Parameter mit nicht-invasiven Methoden, die den Patienten nicht zusätzlich belasten sollen, ist deshalb erstrebenswert. Die in diesem Zusammenhang häufig durchgeführten nuklearmedizinischen Untersuchungen z.B. mit der Positronenemissionstomographie (PET), belasten den Patienten zusätzlich mit Strahlung, die bei der Gesamtbehandlungsdosis berücksichtigt werden muss und dauern zudem oft mehrere Stunden. Zudem ist die Ortsauflösung oft nur sehr gering. Die dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRI) ist ein schnelles Verfahren ohne zusätzliche Strahlenbelastung bei höherer Ortsauflösung. Jedoch wurde ihre Genauigkeit der Messungen von Perfusion, Blutvolumen und interstitiellen Volumen bei niedrigperfundiertem Gewebe bisher nicht hinreichend überprüft. Die Etablierung eines Tiermodells zur Validierung dieser Messungen mit der DCE-MRI soll das Ziel dieser Arbeit sein. Das Schwein hat sich als geeignetes Modell erwiesen. Seine anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen ermöglichen vergleichbare Perfusionsmessungen. Die Skelettmuskulatur dient als Modell für ein niedrig perfundiertes Gewebe, das jedoch den Vorteil bietet, durch Gabe eines Vasodilatators auch die Untersuchung höherer Perfusionsstufen zu ermöglichen.

Die Messungen der Perfusion mittels DCE-MRI wurden am Hinterlauf der Schweine durchgeführt. Die narkotisierten Schweine wurden in ein MRT-Gerät mit 1,5 T gebracht. Über einen zentralen Venenkatheter wurden das hochmolekulare intravasale Kontrastmittel Gadofosveset und das niedermolekulare, schnell extravasierende Kontrastmittel Gadotersäure appliziert. Die dynamischen Messungen wurden mit einer TWIST-Sequenz (3-D

Gradientenechosequenz mit Schlüsselochtechnik) durchgeführt. Die arterielle Eingangsfunktion (AIF) wurde in der Aorta abdominalis gemessen. Das Versorgungsgebiet der Femoralarterie wurde mittels lokaler Kontrastmittelgabe ermittelt und anschließend mit der Software Amira® konturiert. Die Signal-Zeit-Kurven wurden durch Anwendung verschiedener pharmakokinetischer Modelle ausgewertet. Als von der Bildgebung unabhängiges Referenzverfahren diente eine an der Femoralarterie implantierte Ultraschall-Flusssonde. Über einen Arterienkatheter, der ebenfalls an der Arterie angebracht wurde, konnten durch Applikation des Vasodilatators Adenosin pro Experiment mehrere Perfusionsstufen erreicht werden. Die Daten sollen eine Überprüfung der Quantifizierung der Perfusion ermöglichen. In dieser Arbeit soll jedoch zunächst die qualitative Überprüfung der Perfusionsdaten im Vordergrund stehen. Die mittels DCE-MRI ermittelten Daten wurden deshalb neben den Ultraschallflusswerten mit den Daten einer Patientin verglichen. Die Messungen an der Patientin wurden am Unterschenkel durchgeführt. Die Kurvenverläufe der ermittelten Werte der Patientin und der Schweine ergaben eine gute Übereinstimmung. Da bei den Schweinen pro Experiment mehrere Flussstufen gemessen wurden, kam es durch Kontrastmittelanreicherung bei der zweiten und dritten Messung zu einer Signalerhöhung der AIF. Der Kurvenverlauf der Messdaten der Patientin lag auf einem niedrigeren Niveau. Weil die AIF aus einer kleineren Arterie des Unterschenkels ermittelt wurde, ist dies durch Partialvolumeneffekte erklärbar. Die Zirkulationsrate der Patientin betrug $19,7 \pm 4,8$ s und die der Schweine im Mittel bei $20,4 \pm 5,1$ s. Dies deutet auf eine gute Vergleichbarkeit der Kreislaufphysiologien von Mensch und Schwein hin.

Um die Messungen mittels DCE-MRI von Blutvolumen und interstitiellem Volumen validieren zu können, wurden Muskelproben aus dem Hinterlauf des Schweines entnommen. Die Schnitte der Proben wurden entweder mit einer modifizierten van-Gieson-Färbung ohne Kernfärbung zur Darstellung des Bindegewebes oder mit einer endothelspezifischen Isolectinfärbung gefärbt. Anschließend erfolgte die histologische Untersuchung mit einer semiautomatischen Morphometriesoftware. Zur Bestimmung des interstitiellen Volumens wurden in Muskelproben des medialen Oberschenkels der extrazelluläre Raum und das Bindegewebe markiert und die Fläche berechnet. Das histologisch ermittelte interstitielle Volumen betrug im Median 4,8%. Dieser Wert wurde mit drei verschiedenen pharmakokinetischen Modellen, dem Tofts-Modell, dem erweiterten Tofts-Modell und dem Zwei-Kompartimente-Austauschmodell (2CXM), bei verschiedenen Akquisitionszeiten korreliert. Zwischen den einzelnen Methoden wurde keine Korrelation gefunden, aber auch

kein signifikanter Unterschied zwischen den histologischen und den MR- Methoden. Das Tofts- Modell zeigte mit höherer Akquisitionszeit steigende interstitielle Volumina an. Das 2CXM war für solche Effekte weniger anfällig. Die beste Übereinstimmung zwischen den pharmakokinetischen Modellen lag bei einer Akquisitionszeit von 10min. Der Median von Tofts- Modell und 2CXM lag bei 6,6% und der vom erweiterten Toftsmodell bei 6,8%. Die beste Übereinstimmung von Histologie und MRT-Messung lieferte das Tofts-Modell bei einer Akquisitionszeit von 6min mit einem Median von 5,1%. Die Werte von Histologie und der Modelle zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung. Die Genauigkeit des 2CXM und seine Unabhängigkeit von der Akquisitionszeit lassen einen Einsatz in der klinischen Routine zu.

Zur Bestimmung des Blutvolumens wurden Proben aus der lateralen, cranialen, der oberflächlichen und tiefen medialen Oberschenkelmuskulatur sowie dem Unterschenkel entnommen. Das Blutvolumen wurde histologisch mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt. Die angefärbten Endothelien wurden markiert und das Lumen der Gefäße manuell hinzugefügt. Durch die histologische Präparation und den fehlenden Blutdruck waren die Gefäße kollabiert, sodass eine alleinige Messung der Lumenfläche nicht möglich war. Es war deshalb mit einer Unterschätzung des realen Wertes zu rechnen. Deshalb wurde zusätzlich die mittlere Gefäßdicke (MVD) bestimmt. Um das Blutvolumen zu errechnen, wurde die MVD mit dem mittleren Gefäßdurchmesser der Kapillaren laut Literatur von 8 μm multipliziert.

Die histologisch ermittelten Blutvolumina wurden mit den Daten aus der DCE-MRI, die mit vier verschiedenen pharmakokinetischen Modellen, dem erweiterten Tofts- Modell, dem 2CXM, der Bolusdekonvulotion und der Equilibrium-MR, bestimmt wurden, korreliert. Die Blutvolumina in den jeweiligen Muskelgruppen, die mit der MVD-Berechnung bestimmt wurden und die MRT-Daten, außer dem erweiterten Tofts-Modell, zeigten eine gute Übereinstimmung. Das erweiterte Tofts-Modell unterschätze das Blutvolumen um 10-20%, vermutlich weil das Modell eine Bolusaufweitung nicht berücksichtigt. Das 2CXM bildet die physiologischen Gegebenheiten im Gewebe gut ab. Es ist in der Lage, mehrere Parameter zu bestimmen, birgt allerdings auch die Gefahr der Überanpassung bei alleiniger Verwendung eines niedermolekularen Kontrastmittels. Durch die Verwendung der Kombination eines hoch- und eines niedermolekularen Kontrastmittels wird jedoch eine genauere Bestimmung des Blutvolumens ermöglicht.

6 Summary

The measurement of perfusion, blood volume and interstitial volume of tumor tissue is of high importance for the staging of tumors and biological irradiation planning. The perfusion indicates the supply of the tumor tissue with nutrients and especially oxygen. The absence of oxygen, e.g. in necrotic areas, results in a lower radiation sensitivity of the tissue (oxygen effect). Gaining information about tumor perfusion is essential for the targeted radiotherapy. Additional, parameters as blood volume and interstitial volume provide information about the tumors malignancy. The measurement of these parameters with non-invasive methods is therefore desirable and includes no additional stress for the patient. Diagnostic nuclear medicine, e.g. the positron emission tomography (PET), is an often used method to gain information about the tumor perfusion. It must be taken into account that there is an additional radiation burden for the patient. This diagnostic method can last several hours and the spatial resolution is relatively low. The dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) is a fast method without additional radiation burden and with a higher spatial resolution. However, the accuracy of measurements of perfusion, blood volume and interstitial volume in low perfused tissue has not been tested adequately.

The aim of this work was the establishment of an animal model for the validation of these measured parameters using DCE-MRT. The pig has proven to be a suitable model. Its anatomical and physiological similarity to humans allows comparable perfusion measurements. The skeletal musculature is intended to serve as a model for a low perfused tissue and enables the possibility to examine various perfusion levels by application of a vasodilator. The measurements of the perfusion by means of DCE-MRI were carried out on the hind legs of the pigs. The anesthetized pigs were placed in an MRI device with 1.5 T. The high-molecular blood pool contrast medium gadofosveset and the low-molecular weight, fast extravasating contrast agent gadoteric acid were applied via a central venous catheter. The dynamic measurements were performed by a TWIST sequence (3D gradient echo sequence with keyhole technique). The arterial input function (AIF) was measured in the abdominal aorta. The supply area of the femoral artery was determined by a local application of contrast medium and subsequently contoured with the software Amira®. The signal-time curves were evaluated by using different pharmacokinetic models. An ultrasonic transit time flow probe,

that served as an independent reference method of the perfusion imaging technique, was attached to the femoral artery. Via a catheter that was implanted in this artery several perfusion stages per experiment could be achieved by applying the vasodilator adenosine. It is intended to use the data to enable a precise quantification of the perfusion. In this work, however, the qualitative examination of the perfusion data will be the main focus. The data determined by DCE-MRI were therefore compared with the data of a patient and the ultrasonic flow values of the pigs. The measurements on the patient were performed on the lower leg. The curves of the values of the patient and the pigs showed a good agreement. Since several flow levels per experiment were measured in the pigs, a signal increase of the AIF occurred as a result of contrast medium accumulation in the second and third measurements. The patient's curve was at a lower level. Because the AIF was determined from a smaller artery of the lower limb, this can be explained by partial volume effects. Furthermore, the time intervals between first and second pass of the contrast medium in the vessels were determined in five patients enrolled in a clinical study and in the pigs. The time between first and second pass corresponds to the circulation rate. The mean interval was 19.7 ± 4.8 s in the patients and 20.4 ± 5.1 s in the pigs. The data obtained in the pig experiments compare well with those in humans.

To validate the measurements by means of DCE-MRI of blood volume and interstitial volume, muscle samples were taken from the hind leg of the pig.

The sections of the samples were stained with either a modified van Gieson stain without nucleus staining to visualise the connective tissue or with an endothelium-specific isolectin staining. Subsequently, the histological examination was performed with a semi-automatic morphometry software. Within the muscle samples of the medial thigh the interstitial volume, the extracellular space and the connective tissue were labeled and the area was determined. In the median, the interstitial volume was found to be 4.8 %. This value was correlated with three different pharmacokinetic models, the Tofts model, the extended Tofts model and the two-compartment exchange model (2CXM) at different acquisition times. No correlation was found between the individual methods. Furthermore, there was also no significant difference between the histological and the MR-methods. The Tofts model showed increasing interstitial volumes with an increasing acquisition time. The 2CXM was less susceptible to such effects. The best match between the pharmacokinetic models was at an acquisition time of 10 min. The median of the Tofts model and the 2CXM was 6.6 % and the median of the extended

Tofts model was 6.8 %. The best agreement between histology and MRI measurements yielded the Tofts model at an acquisition time of 6 min with a median of 5.1 %. The values of histology and the models showed a good agreement overall. The accuracy of the 2CXM and its independence from the acquisition time enable it for use in the clinical routine.

For determination of the blood volume, samples were taken from the lateral, cranial and superficial and deep medial thigh muscles as well as the lower leg. The blood volume was determined histologically by two different methods. The stained endothelia were labeled automatically and the lumen of the vessels was added manually.

Due to the histological preparation and the lack of blood pressure, the vessels collapsed so that a reliable measurement of the lumen area was not possible. Therefore, it was to be expected that the real value could be underestimated. Hence, the mean vascular density (MVD) was determined additionally. In order to calculate the blood volume, the MVD was multiplied by the mean vessel diameter of the capillaries, according to the literature of 8 μm .

The histologically determined blood volumes were correlated with the data from the DCE-MRI, which were calculated by the use of four different pharmacokinetic models, the extended Tofts model, the 2CXM, the bolus deconvolution and the equilibrium-MR. The blood volumes in the respective muscle groups determined by the MVD calculation and the MRI data except the extended Tofts model showed a good agreement. The extended Tofts model underestimates the blood volume by 10-20 %, presumably because the model does not consider the bolus dispersion. The 2CXM describes the physiological conditions in the tissue well. It is able to determine several parameters, but it also carries the risk of overfitting when using only a low-molecular-weight contrast medium. By using the combination of a high and a low molecular weight contrast medium, however, a more accurate determination of the blood volume is possible.

7 Literaturverzeichnis

Aberle, E.D., Forrest, J.C., Gerrard, D.E., Mills, E.W. (2001). Principles of Meat Science. 4.Aufl. Dubuque, USA, Kendall/Hunt Publishing Company. 84-85.

Achermann, R.E., Ohlerth, S.M., Rohrer Bley, C., Gassmann, M., Inteeworn, N., Roos, M., Schärz, M., Wergin, M.C., Kaser-Hotz, B. (2004). Oxygenation of spontaneous canine tumors during fractionated radiation therapy. *Strahlenther Onkol*, 180(5): 297–305.

Aggarwal, A., Warltier, D.C. (1994). Adenosine: present uses, future indications. *Curr Opin Anesthesiol*, 7(1): 109-122.

Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J. (2014). Herz-Kreislaufsystem Grundlagen. In: *Duale Reihe Anatomie*. 3.Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 152-159.

Ballegeer, E.A., Madrill, N.J., Berger, K.L., Agnew, D.W., McNiel, E.A. (2013). Evaluation of hypoxia in a feline model of head and neck cancer using ⁶⁴ Cu-ATSM positron emission tomography/computed tomography. *BMC cancer*, 13(1): 218.

Barrett, T., Kobayashi, H., Brechbiel, M., Choyke, P.L. (2006). Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis. *Eur J Radiol*, 60: 353–366.

Breitenseher, M., Nöbauer- Huhmann, I.M. (2008). Bildgebende Diagnostik von Weichteiltumoren. In: Breitenseher M. (Hrsg.): *Bildgebende Diagnostik und Therapie der Weichteiltumoren: mit pathologischer Klassifikation, Nuklearmedizin, interventioneller Therapie*; 21 Tabellen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 72-75.

Bruehlmeier, M., Kaser-Hotz, B., Achermann, R., Bley, C.R., Wergin, M., Schubiger, P.A., Ametamey, S.M. (2005). Measurement of tumor hypoxia in spontaneous canine sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound*, 46(4): 348-354.

Bruening, R., Kwong, K.K., Vevea, M.J., Hochberg, F.H., Cher, L., Harsh, G.R., Niemi, P.T., Weisskoff, R.M., Rosen, B.R. (1996). Echo-planar MR determination of relative cerebral blood volume in human brain tumors: T1 versus T2 weighting. *Am J Neuroradiol*, 17(5): 831-840.

Cano, C., Malik, K.U. (1992). Adenosine receptor-mediated alterations in prostacyclin production and cardiac function in the isolated rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 261: 660-668.

Carlier, P.G., Bertoldi, D., Baligand, C., Wary, C., Fromes, Y. (2006). Muscle blood flow and oxygenation measured by NMR imaging and spectroscopy. *NMR Biomed*, 19: 954-967.

Carreira, G.C. (2009). Untersuchung der Grenzen des Kompartimentmodells bei der kontrastmittelgestützten dynamischen Magnetresonanztomographie mittels Diffusionssimulation. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.

Carreira, G.C., Gemeinhardt, O., Gorenflo, R., Beyersdorff, D., Franiel, T., Plendl, J., Lüdemann, L. (2011). Limitations of the permeability-limited compartment model in estimating vascular permeability and interstitial volume fraction in DCE-MRI. *Magn Reson Imaging*, 29(5): 639-649.

Clark, M.G., Rattigan, S., Clerk, L.H., Vincent, M.A., Clark, A.D., Youd, J.M., Newman, J.M. (2000). Nutritive and non-nutritive blood flow: rest and exercise. *Acta Physiol Scand*, 168: 519-30.

Clark, M.G., Rattigan, S., Barrett, E.J., Vincent, M.A. (2008). Point: Counterpoint: There is/is not capillary recruitment in active skeletal muscle during exercise. *J Appl Physiol*, 104: 889–891.

Damon, D.H., Duling, B.R. (1984). Distribution of capillary blood flow in the microcirculation of the hamster: an in vivo study using epifluorescent microscopy. *Microvasc Res*, 27: 81-95.

Delp, M.D., O'Leary, D.S. (2004). Integrative control of the skeletal muscle microcirculation in the maintenance of arterial pressure during exercise. *J Appl Physiol*, 97: 1112-1118.

Döring, A. (2008). Etablierung eines Kontrastmittelgestützten Ultraschallverfahrens zur Beurteilung der Skelettmuskelperfusion am Beispiel des M. biceps brachii des Menschen. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.

Egeland, T.A., Simonsen, T.G., Gaustad, J.V., Gulliksrud, K., Ellingsen, C., Rofstad, E.K. (2009). Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of tumors: preclinical validation of parametric images. *Radiat Res*, 172: 339-347.

Egner, B. (2002). Blutdruckmessen - Grundlagen und praktische Umsetzung. In: *Blutdruck auf den Punkt gebracht*. Stuttgart, Paul-Parey-Verlag. 1-21.

Eldredge, H.B., Spiller, M., Chasse, J.M., Greenwood, M.T., Caravan, P. (2006). Species dependence on plasma protein binding and relaxivity of the gadolinium-based MRI contrast agent MS-325. *Invest Radiol*. 41(3): 229–243.

Franiel, T. (2011). Pharmakokinetische Parameter für die MRT-Diagnostik der Prostata: Histologische Validierung und Anwendungen für die Klinik. Habilitationsschrift, Berlin, Charité- Universitätsmedizin Berlin.

Gemeinhardt, O. (2008). Funktionelle Bildgebung der Vaskularisation und Perfusion des Prostatakarzinoms mit dynamischer MRT: Korrelation mit morphometrischen Parametern. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.

Harrison, L.B., Chadha, M., Hill, R.J., Hu, K., Shasha, D. (2002). Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist*, 7: 492–508.

Heinonen, I., Kemppainen, J., Kaskinoro, K., Peltonen, J.E., Borra, R., Lindroos, M.M., Boushel, R. (2010). Comparison of exogenous adenosine and voluntary exercise on human skeletal muscle perfusion and perfusion heterogeneity. *Journal of Applied Physiology*, 108(2): 378-386.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., Jain, R.K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*, 3(2): 177-182.

Hill, M., Hirschberger, J., Zimmermann, K., Dörfelt, R., Reese, S., Wergin, M. (2014). Lebensqualität der Patienten nach primärer und adjuvanter Strahlentherapie in der Kleintieronkologie. *Tierärztliche Praxis (K)*, 42(3): 157-165.

Hockel, M. Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4): 266-276.

Huppelsberg, J., Walter, K. (2013). Muskulatur. In: *Kurzlehrbuch Physiologie*. 4.Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 235-242.

Hylton, N. (2006). Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as an imaging biomarker. *J. Clin. Oncol*, 24: 3293-3298.

Ishiguchi, T., Takahashi, S. (2010). Safety of gadoterate meglumine (Gd-DOTA) as a contrast agent for magnetic resonance imaging. *Drugs R D*, 10(3): 133-145.

Jahng, G.H., Li, K.L., Ostergaard, L., Calamante, F. (2014). Perfusion magnetic resonance imaging: a comprehensive update on principles and techniques. *Kor J R*, 15(5): 554-577.

Jain, R.K. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 47(12): 3039-3051.

Jelkmann, W., (2010). Aufgaben und Zusammensetzung des Blutes. In: Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. 31. Aufl. Heidelberg, Springer-Verlag. 478.

Kiessling, F., Huber, P.E., Grobholz, R., Heilmann, M., Meding, J., Lichy, M.P., Fink, C., Krix, M., Peschke, P., Schlemmer, H.P. (2004a). Dynamic magnetic resonance tomography and proton magnetic resonance spectroscopy of prostate cancers in rats treated by radiotherapy. *Invest Radiol*, 39(1): 34-44.

Kiessling, F., Lichy, M., Grobholz, R., Heilmann, M., Farhan, N., Michel, M.S., Semmler, W. (2004b). Simple models improve the discrimination of prostate cancers from the peripheral gland by T1-weighted dynamic MRI. *Eur Radiol*, 14(10): 1793-1801.

Kixmüller, M. (2004). Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

König, H.E., Liebich, H.G. (2014). Allgemeine Anatomie des Kreislaufs. In: *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 6. Aufl. Stuttgart, Schattauer Verlag. 32-39.

Kraft, W. (1997). Wann werden Hund und Katze „alt“?. *Tierärztl. Praxis (K)*, 25(5): 536-539.

Laub, G., Kroeker, R. (2006). Syngo TWIST for dynamic time-resolved MR angiography. *Magnetom Flash*, 3: 92-95.

Lauffer, R.B., Parmelee, D.J., Dunham, S.U., Ouellet, H.S., Dolan, R.P., Witte, S., Walovitch, R.C. (1998). MS-325: albumin-targeted contrast agent for MR angiography. *Radiology*, 207(2): 529-538.

Li, K.L., Zhu, X.P., Waterton, J., Jackson, A. (2000). Improved 3D quantitative mapping of blood volume and endothelial permeability in brain tumors. *J Magn Reson Imaging*, 12(2): 347-357.

Liebich, H.G. (2004). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 4. Aufl. Stuttgart, Schattauer Verlag. 102-140.

Lucia, M.S., Bostwick, D.G., Bosland, M., Cockett, A.T., Knapp, D.W., Leav, I., Pollard, M., Rinker-Schaeffer, C., Shirai, T. und Watkins, B.A. (1998). Workgroup I: rodent models of prostate cancer. *Prostate*, 36(1): 49-55.

Lüdemann, L., Hamm, B. und Zimmer, C. (2000). Pharmacokinetic analysis of glioma compartments with dynamic Gd-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*, 18(10): 1201-1214.

Lüdemann, L., Grieger, W., Wurm, R., Wust, P., Zimmer, C. (2005). Quantitative measurement of leakage volume and permeability in gliomas, meningiomas and brain metastases with dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Imaging*, 23(8): 833-841.

Lüdemann, L., Grieger, W., Wurm, R., Wust, P., Zimmer, C. (2006). Glioma assessment using quantitative blood volume maps generated by T1-weighted dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a receiver operating characteristic study. *Acta Radiol*, 47: 303-310.

Lutterbeck, E.M. (2011). Die Rolle von " Hotspots" in der Korrelation von Histologie und Parameterkarten der pharmakokinetischen MRT des Prostatakarzinoms. Dissertation. Berlin, Freie Universität Berlin.

Lynge, J., Hellsten, Y. (2000). Distribution of adenosine A1, A2A and A2B receptors in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 169(4): 283-290.

MacLeod, A.G., Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Higgins, R.J., Pollard, R.E. (2009). Quantitative assessment of blood volume and permeability in cerebral mass lesions using dynamic contrast-enhanced computed tomography in the dog. *Acad Radiol*, 16(10): 1187–1195.

McEntee, M.C., Page, R.L., Heidner, G.L., Cline, J.M., Thrall, D.E. (1991): A retrospective study of 27 dogs with intranasal neoplasms treated with cobalt radiation. *Vet Radiol*, 23: 135-139.

Meier, V., Guscetti, F., Roos, M., Ohlerth, S., Pruschy, M., Bley, C. R. (2016). Hypoxia-related marker GLUT-1, CAIX, proliferative index and microvessel density in canine oral malignant neoplasia. *PloS one*, 11(2): e0149993.

Moser, G.H., Schrader, J., Deussen, A. (1989). Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*, 256: 799-806.

Moulder ,J.E., Rockwell, S. (1987). Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 5(4): 313-341.

Mulisch, M., Welsch, U. (Hrsg.). (2010). Schnittpräparation. In: Romeis- Mikroskopische Technik. 18.Aufl. Heidelberg, Springer-Verlag. 105-115.

Niendorf, H.P., Balzer, T., Reimer, P. (2013). Kontrastmittel. In: Reiser, M., Semmler, W. (Hrsg.): *Magnetresonanztomographie*. Heidelberg, Springer-Verlag. 111-130.

O'Connor, J.P., Jackson, A., Parker, G.J., Jayson, G.C. (2007). DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. *Br J Cancer*, 96: 189-195.

Payne, G.W., Bearden, S.E. (2006). The microcirculation of skeletal muscle in aging. *Microcirculation*, 13: 275-277.

Pelleg, A., Porter, R.S. (1990). The Pharmacology of Adenosine. *Pharmacotherapy*, 10: 157-174.

Pettigrew, R.I., Avruch, L., Dannels, W., Coumans, J., Bernardino, M.E. (1986). Fastfield-echo MR imaging with Gd-DTPA: physiologic evaluation of the kidney and liver. *Radiology*, 160(2): 561-563.

Port, R.E., Knopp, M.V., Hoffmann, U., Milker- Zabel, S., Brix, G. (1999). Multicompartment analysis of gadolinium chelate kinetics: blood-tissue exchange in mammary tumors as monitored by dynamic MR imaging. *J Magn Reson Imaging*, 10: 233-241.

Rancilio, N.J., Custead, M.R., Poulson, J.M. (2015). Radiation therapy communication – reirradiation of a nasal tumor in a brachycephalic dog using intensity modulated radiation therapy. *Vet Radiol Ultrasound*, 57(5): 46-50.

Renkin, E.M., (1989). Microcirculation and Exchange. In: Patton, H.D., Fuchs, A.F., Hille, B., Scher, A.M., Steiner, R. (Hrsg.): *Textbook of Physiology*. 21. Aufl. Philadelphia, USA, W.B. Saunders. 860-878.

Rosen, B.R., Belliveau, J.W., Chien, D. (1989). Perfusion imaging by nuclear magnetic resonance. *Magn Reson Q*, 5(4): 263-281.

Runge, V.M., Clanton, J.A., Herzer, W.A., Gibbs, S.J., Price, A.C., Partain, C.L., James, A.E. (1984). Intravascular contrast agents suitable for magnetic resonance imaging. *Radiology*, 153(1): 171-176.

Schulte, B., Boldt, A., Beyer, D., Aupperle, Th. (2006). Kontrastmittel in der kardiovaskulären MRT. In: *MRT des Herzens und der Gefäße*. Heidelberg, Springer-Verlag. 34-36.

Schwitzer, J., Wacker, C., Wilke, N., Al-Saadi, N., Hoebel, N., Simor, T. (2006). Magnetic resonance imaging for myocardial perfusion assessment in coronary artery disease trial (MR-IMPACT II): A phase III multicenter, multivendor trial comparing perfusion cardiac magnetic resonance versus single photon emission computed tomography for the detection of coronary artery disease. *Circulation*, 114(18): 806.

Song, T., Laine, A.F., Chen, Q., Rusinek, H., Bokacheva, L., Lim, R.P., Laub, G., Kroeker, R., Lee, V.S. (2009). Optimal k-space sampling for dynamic contrast-enhanced MRI with an application to MR renography. *Magn Reson Med*, 61(5): 1242-1248.

Sourbron, S.P., Buckley, D.L. (2011). Tracer kinetic modelling in MRI: estimating perfusion and capillary permeability. *Phys Med Biol*, 57(2): 1-33.

Sourbron, S. P., Buckley, D. L. (2013). Classic models for dynamic contrast-enhanced MRI. *NMR Biomed*, 26(8): 1004-1027.

Swindle, M.M., Makin, A., Herron, A.J., Clubb, F.J., Frazier, K.S. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol*, 49(2): 344-356.

Thews, G., Vaupel, P. (2005). Blutkreislauf. In: *Vegetative Physiologie*. 5.Aufl. Heidelberg, Springer-Verlag. 157-158.

Thomas, G.D., Segal, S.S. (2004). Neural control of muscle blood flow during exercise. *J Appl Physiol*, 97: 731-738.

Thorwarth, D., Soukup, M., Alber, M. (2008). Dose painting with IMPT, helical tomotherapy and IMXT: a dosimetric comparison. *Radiother Oncol*, 86(1): 30-34.

Tofts, P.S., Kermode, A.G. (1989). Blood brain barrier permeability in multiple sclerosis using labelled DTPA with PET, CT and MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 52(8): 1019-1020.

Tofts, P.S., Kermode, A.G. (1991). Measurement of the blood–brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging: 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med*, 17: 357-367.

Tyml, K. (1987). Red cell perfusion in skeletal muscle at rest and after mild and severe contractions. *Am J Physiol*, 252: 485-493.

Vaupel, P., Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, 26(2): 225-239.

Vaupel, P. (2009). Pathophysiology of solid tumors. In: *The impact of tumor biology on cancer treatment and multidisciplinary strategies*. Heidelberg, Springer-Verlag. 51-92.

Viglianti, B.L., Lora-Michiels, M., Poulson, J.M., Lan, L., Yu, D., Sanders, L., Craciunescu, O., Vujaskovic, Z., Thrall, D.E., MacFall, J., Charles, H.C., Wong, T., Dewhirst, M.W. (2009). Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a predictor of clinical outcome in canine spontaneous soft tissue sarcomas treated with thermoradiotherapy. *Clin Cancer Res*, 15(15): 4993-5001.

Weber, K.J., Wenz, F. (2013). Strahlenbiologische Grundlagen. In: Wannemacher, M., Wenz, F., Debus, J. (Hrsg.): *Strahlentherapie*. 2.Aufl. Heidelberg, Springer Verlag. 48-70.

Weber, M.A., Krakowski-Roosen, H., Delorme, S., Renk, H., Krix, M., Millies, J., Kinscherf, R., Künkele, A., Kauczor, H.-U., Hildebrandt, W. (2006). Relationship of Skeletal Muscle Perfusion Measured by Contrast-Enhanced Ultrasonography to Histologic Microvascular Density. *Ultrasound Med*, 25: 583-591.

Weidner, N., Carroll, P.R., Flax, J., Blumenfeld, W., Folkman, J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 143(2): 401-409.

Weishaupt, D., Köchli, V.D., Marincek, B. (2014). *Wie funktioniert MRI?*. 7.Aufl. Heidelberg, Springer-Verlag. 1-10.

Withrow, S., Vail, D.M. (2007). Therapeutic modalities for cancer patient. In: Withrow & MacEwen's *Small animal clinical oncology*. 4.Aufl. Philadelphia, WB Saunders. 157-347.

Zahra, M.A., Hollingsworth, K.G., Sala, E., Lomas, D.J., Tan, L.T. (2007). Dynamic contrast-enhanced MRI as a predictor of tumour response to radiotherapy. *Lancet Oncol* 8: 63-74.

Zhang, L., Newman, J.M., Richards, S.M., Rattigan, S., Clark, M.G. (2005). Microvascular flow routes in muscle controlled by vasoconstrictors. *Microvasc Res*, 70: 7-16.

Zoladz, J.A., Semik, D., Zawadowska, B., Majerczak, J., Karasinski, J., Kolodziejski, L., Kilarski, W.M. (2005). Capillary density and capillary-to-fibre ratio in vastus lateralis muscle of untrained and trained men. *Folia Histochem Cytobiol*, 43(1): 11-17.

Zwingenberger, A.L., Pollard, R.E., Taylor, S.L., Chen, R.X., Nunley, J., Kent, M.S. (2016). Perfusion and Volume Response of Canine Brain Tumors to Stereotactic Radiosurgery and Radiotherapy. *J Vet Intern Med*, 30(3): 827-835.

8 Anhang

Die Ergebnisse der morphometrischen Untersuchungen werden im Folgenden tabellarisch aufgelistet.

Mittelwerte der morphometrischen Auswertung der Isolectin-gefärbten Muskelpräparate

Oberschenkel lateral				
Tiernummer	Anteil Gefäßfläche [%]	Durchmesser der Gefäße [µm]	Gefäße pro mm² (MVD)	mittlerer interkapillärer Gefäßabstand [µm]
Schwein Nr.1	0,62	5,09	232,96	67,96
Schwein Nr.2	0,87	6,06	237,08	66,98
Schwein Nr.3	0,76	5,28	243,82	69,02
Schwein Nr.4	0,92	5,00	360,09	55,77
Schwein Nr.5	0,58	4,47	283,44	66,93
Schwein Nr.6	0,55	5,37	186,13	75,94

Oberschenkel cranial				
Tiernummer	Anteil Gefäßfläche [%]	Durchmesser der Gefäße [µm]	Gefäße pro mm² (MVD)	mittlerer interkapillärer Gefäßabstand [µm]
Schwein Nr.1	0,77	6,20	218,16	69,45
Schwein Nr.2	1,28	7,81	195,78	79,04
Schwein Nr.3	0,41	3,63	300,72	59,26
Schwein Nr.4	0,75	5,10	295,2540959	59,97
Schwein Nr.5	0,24	4,19	143,48	91,78
Schwein Nr.6	0,70	5,44	222,85	73,27

Oberschenkel medial oberflächlich				
Tiernummer	Anteil Gefäßfläche [%]	Durchmesser der Gefäße [µm]	Gefäße pro mm² (MVD)	mittlerer interkapillärer Gefäßabstand [µm]
Schwein Nr.1	0,70	5,34	248,11	68,15
Schwein Nr.2	1,17	4,98	440,30	49,41
Schwein Nr.3	0,52	4,59	225,71	71,50
Schwein Nr.4	0,94	5,69	275,26	62,18
Schwein Nr.5	0,69	4,61	280,95	65,96
Schwein Nr.6	1,85	6,26	450,85	47,71

Oberschenkel medial tief				
Tiernummer	Anteil Gefäßfläche [%]	Durchmesser der Gefäße [µm]	Gefäße pro mm² (MVD)	mittlerer interkapillärer Gefäßabstand [µm]
Schwein Nr.1	1,16	6,04	331,85	57,86
Schwein Nr.2	1,39	5,18	468,46	47,07
Schwein Nr.3	0,91	3,87	515,99	46,29
Schwein Nr.4	1,26	5,80	327,74	67,06
Schwein Nr.5	0,77	4,92	260,14	69,06
Schwein Nr.6	1,64	5,59	476,21	46,71

Unterschenkel				
Tiernummer	Anteil Gefäßfläche [%]	Durchmesser der Gefäße [µm]	Gefäße pro mm² (MVD)	mittlerer interkapillärer Gefäßabstand [µm]
Schwein Nr.1	1,71	4,65	763,53	50,63
Schwein Nr.2	0,85	4,55	309,97	58,58
Schwein Nr.3	0,79	5,13	248,26	68,69
Schwein Nr.4	1,34	5,34	342,07	56,51
Schwein Nr.5	0,53	4,05	305,18	62,09
Schwein Nr.6	1,17	6,04	303,16	59,43

Morphometrische Auswertung der van-Gieson-gefärbten Präparate

Interstitielles Volumen (extrazellulärer Raum mit Bindegewebe) [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.1	Schwein Nr.2	Schwein Nr.3	Schwein Nr.4
Bild 1	9,85	7,09	5,68	6,00
Bild 2	4,62	5,28	4,10	4,71
Bild 3	6,13	3,78	3,99	3,65
Bild 4	4,76	4,38	6,45	3,66
Bild 5	6,52	3,92	1,85	3,93
Bild 6	7,86	4,47	6,15	6,25
Bild 7	7,07	4,72	5,75	3,37
Bild 8	2,70	6,83	5,93	5,02
Bild 9	3,63	3,90	8,49	3,90
Bild 10	4,38	4,50	4,21	3,54
Bild 11	2,94	3,63	4,89	5,38
Bild 12	4,60	3,66	4,56	3,69
Bild 13	1,87	4,38	4,65	4,09
Bild 14	3,18	6,02	9,02	4,33
Bild 15	2,04	9,98	7,50	5,08
Bild 16	4,48	6,14	9,97	4,72
Bild 17	2,09	5,41	7,89	3,93
Bild 18	2,56	4,55	6,93	6,05
Bild 19	4,00	3,04	6,59	4,28
Bild 20	2,30	5,42	8,15	3,23
Mittelwert (SD)	4,38 ± 2,16	5,06 ± 1,59	6,14 ± 2,00	4,44 ± 0,92

Interstitielles Volumen (extrazellulärer Raum mit Bindegewebe) [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.5	Schwein Nr.6	Schwein Nr.7	Schwein Nr.8
Bild 1	7,58	4,71	4,47	2,96
Bild 2	6,59	9,84	2,13	2,32
Bild 3	8,42	3,88	4,03	2,85
Bild 4	8,87	5,92	2,96	3,53
Bild 5	5,81	5,84	4,29	2,54
Bild 6	6,29	4,61	3,26	3,40
Bild 7	5,50	3,24	3,53	2,39
Bild 8	8,42	5,74	3,14	3,60
Bild 9	14,45	5,53	4,40	5,19
Bild 10	4,41	3,81	3,07	4,19
Bild 11	4,23	3,81	2,96	4,23
Bild 12	6,87	4,08	2,59	3,50
Bild 13	7,00	5,95	3,74	7,27
Bild 14	7,38	6,05	3,52	4,69
Bild 15	5,83	4,15	3,93	2,90
Bild 16	6,48	4,78	2,63	2,80
Bild 17	7,73	4,04	3,07	7,11
Bild 18	5,27	4,80	6,21	3,51
Bild 19	9,22	3,79	3,63	4,18
Bild 20	8,72	6,63	3,52	3,28
Mittelwert (SD)	7,25 ± 2,22	5,06 ± 1,49	3,55 ± 0,88	3,82 ± 1,38

Interstitielles Volumen (extrazellulärer Raum mit Bindegewebe) [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.9	Schwein Nr.10	Schwein Nr.11	Schwein Nr.12
Bild 1	1,88	1,96	6,22	5,84
Bild 2	1,44	2,55	6,42	5,32
Bild 3	1,80	2,68	8,05	13,10
Bild 4	2,52	3,24	3,65	6,38
Bild 5	2,22	1,78	9,49	5,55
Bild 6	1,06	3,82	7,22	1,79
Bild 7	3,71	1,83	7,93	6,72
Bild 8	2,54	2,32	4,50	5,10
Bild 9	4,45	5,11	5,53	20,56
Bild 10	2,70	3,15	6,69	5,97
Bild 11	1,89	2,88	4,13	11,79
Bild 12	4,16	2,89	4,54	8,57
Bild 13	3,54	2,79	5,48	11,66
Bild 14	4,57	2,95	10,24	6,05
Bild 15	7,80	3,09	6,72	7,59
Bild 16	6,81	2,56	4,09	6,27
Bild 17	4,23	2,45	5,25	2,24
Bild 18	4,92	3,39	4,11	7,88
Bild 19	2,41	3,29	7,59	6,48
Bild 20	2,52	2,98	5,52	3,70
Mittelwert (SD)	3,36 ± 1,76	2,88 ± 0,74	6,17 ± 1,84	7,43 ± 4,23

Anteil des extrazellulären Raumes (ohne Bindegewebe) [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.1	Schwein Nr.2	Schwein Nr.3	Schwein Nr.4
Bild 1	2,59	3,82	2,54	2,02
Bild 2	3,09	2,68	2,56	2,83
Bild 3	3,42	2,86	2,64	1,68
Bild 4	3,81	2,86	3,91	2,00
Bild 5	2,07	3,04	1,48	1,97
Bild 6	1,84	3,16	5,43	2,29
Bild 7	2,93	3,38	4,29	2,35
Bild 8	1,98	3,00	5,25	2,52
Bild 9	2,97	2,93	7,98	2,71
Bild 10	2,62	2,96	3,77	2,94
Bild 11	1,82	3,54	4,48	2,77
Bild 12	2,52	3,11	2,68	2,92
Bild 13	1,53	3,59	3,04	2,42
Bild 14	2,61	3,03	7,57	3,46
Bild 15	1,66	3,81	6,13	3,28
Bild 16	1,75	3,04	9,46	3,49
Bild 17	1,62	3,66	6,00	3,54
Bild 18	2,35	3,10	6,06	3,32
Bild 19	3,10	2,08	6,34	1,58
Bild 20	1,98	3,40	7,87	2,48
Mittelwert (SD)	2,41 ± 0,66	3,15 ± 0,42	4,97 ± 2,20	2,63 ± 0,60

Anteil des extrazellulären Raumes (ohne Bindegewebe) [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.5	Schwein Nr.6	Schwein Nr.7	Schwein Nr.8
Bild 1	5,04	3,41	3,41	2,48
Bild 2	5,28	3,97	1,75	2,13
Bild 3	4,84	1,29	2,63	2,13
Bild 4	5,61	3,49	2,85	2,80
Bild 5	4,94	4,35	2,36	2,38
Bild 6	5,26	4,35	2,48	2,20
Bild 7	5,35	2,91	2,28	1,90
Bild 8	3,55	5,39	2,40	3,13
Bild 9	5,38	5,39	2,22	3,52
Bild 10	3,25	2,77	2,59	3,94
Bild 11	3,81	3,00	2,26	3,42
Bild 12	3,66	3,94	2,43	2,80
Bild 13	5,03	4,89	3,29	1,91
Bild 14	3,95	3,42	2,95	3,07
Bild 15	5,50	3,08	2,19	1,27
Bild 16	4,30	3,09	2,34	2,57
Bild 17	4,43	2,98	3,00	2,80
Bild 18	4,42	2,24	4,21	2,73
Bild 19	4,93	2,69	2,84	1,86
Bild 20	4,57	3,70	2,34	2,93
Mittelwert (SD)	4,65 ± 0,71	3,52 ± 1,02	2,64 ± 0,54	2,60 ± 0,65

Anteil des extrazellulären Raumes (ohne Bindegewebe) [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.9	Schwein Nr.10	Schwein Nr.11	Schwein Nr.12
Bild 1	0,85	1,52	2,60	1,05
Bild 2	0,90	2,13	3,61	3,99
Bild 3	1,04	2,38	4,78	3,09
Bild 4	2,00	2,44	2,98	4,23
Bild 5	0,90	1,56	2,51	3,43
Bild 6	0,70	2,31	2,58	0,68
Bild 7	2,34	1,44	3,76	2,25
Bild 8	1,30	1,46	3,02	1,93
Bild 9	1,31	1,70	2,88	1,58
Bild 10	1,52	2,01	4,48	3,66
Bild 11	1,27	2,49	2,97	1,76
Bild 12	1,43	2,25	3,77	0,71
Bild 13	1,89	2,49	3,89	0,60
Bild 14	3,81	2,35	3,56	2,58
Bild 15	2,73	2,24	2,55	2,78
Bild 16	4,38	1,95	2,51	2,50
Bild 17	3,58	2,10	3,25	1,32
Bild 18	4,56	2,80	3,07	4,02
Bild 19	2,03	3,14	5,11	4,60
Bild 20	2,19	1,48	3,54	3,67
Mittelwert (SD)	2,04 ± 1,19	2,11 ± 0,47	3,37 ± 0,77	2,52 ± 1,28

Anteil des Bindegewebes [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.1	Schwein Nr.2	Schwein Nr.3	Schwein Nr.4
Bild 1	7,26	3,27	3,14	3,98
Bild 2	1,53	2,60	1,54	1,87
Bild 3	2,70	0,93	1,35	1,97
Bild 4	0,95	1,53	2,53	1,66
Bild 5	4,44	0,88	0,36	1,96
Bild 6	6,02	1,31	0,72	3,96
Bild 7	4,14	1,34	1,47	1,02
Bild 8	0,72	3,83	0,68	2,50
Bild 9	0,65	0,97	0,50	1,19
Bild 10	1,76	1,55	0,44	0,60
Bild 11	1,12	0,09	0,41	2,61
Bild 12	2,08	0,55	1,88	0,77
Bild 13	0,34	0,79	1,60	1,66
Bild 14	0,57	2,99	1,45	0,87
Bild 15	0,39	6,17	1,37	1,79
Bild 16	2,72	3,10	0,52	1,24
Bild 17	0,47	1,75	1,89	0,39
Bild 18	0,21	1,45	0,87	2,73
Bild 19	0,90	0,96	0,25	2,70
Bild 20	0,32	2,01	0,27	0,76
Mittelwert (SD)	1,97 ± 2,03	1,90 ± 1,42	1,16 ± 0,80	1,81 ± 1,03

Anteil des Bindegewebes [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.5	Schwein Nr.6	Schwein Nr.7	Schwein Nr.8
Bild 1	2,55	1,30	1,06	0,48
Bild 2	1,31	5,87	0,38	0,19
Bild 3	3,58	2,59	1,40	0,72
Bild 4	3,26	2,43	0,11	0,73
Bild 5	0,87	1,49	1,94	0,15
Bild 6	1,02	0,27	0,78	1,20
Bild 7	0,15	0,33	1,25	0,48
Bild 8	4,87	0,35	0,74	0,47
Bild 9	9,07	0,13	2,18	1,67
Bild 10	1,16	1,04	0,48	0,25
Bild 11	0,42	0,81	0,70	0,81
Bild 12	3,21	0,14	0,16	0,70
Bild 13	1,98	1,06	0,46	5,37
Bild 14	3,43	2,63	0,57	1,62
Bild 15	0,33	1,07	1,74	1,63
Bild 16	2,18	1,69	0,29	0,22
Bild 17	3,30	1,05	0,07	4,31
Bild 18	0,85	2,56	2,00	0,78
Bild 19	4,29	1,11	0,79	2,32
Bild 20	4,15	2,94	1,18	0,35
Mittelwert (SD)	2,60 ± 2,10	1,54 ± 1,36	0,91 ± 0,66	1,22 ± 1,38

Anteil des Bindegewebes [%]				
Sichtfeld	Schwein Nr.9	Schwein Nr.10	Schwein Nr.11	Schwein Nr.12
Bild 1	1,03	0,44	3,62	4,79
Bild 2	0,54	0,41	2,81	1,33
Bild 3	0,76	0,31	3,26	10,01
Bild 4	0,52	0,81	0,68	2,15
Bild 5	1,32	0,22	6,98	2,12
Bild 6	0,36	1,51	4,64	1,12
Bild 7	1,37	0,39	4,17	4,47
Bild 8	1,24	0,86	1,48	3,18
Bild 9	3,15	3,41	2,65	18,98
Bild 10	1,18	1,14	2,21	2,31
Bild 11	0,62	0,39	1,16	10,03
Bild 12	2,74	0,64	0,77	7,86
Bild 13	1,64	0,29	1,59	11,06
Bild 14	0,77	0,59	6,68	3,48
Bild 15	5,08	0,85	4,17	4,80
Bild 16	2,43	0,61	1,58	3,78
Bild 17	0,65	0,36	1,99	0,92
Bild 18	0,37	0,60	1,04	3,86
Bild 19	0,39	0,15	2,47	1,88
Bild 20	0,33	1,49	1,98	0,04
Mittelwert (SD)	1,32 ± 1,20	0,77 ± 0,73	2,80 ± 1,80	4,91 ± 4,60

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich für die Möglichkeit zur Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Lutz Lüdemann bedanken. Besonders bedanke ich mich für die Vergabe des Themas, die fachliche Unterstützung, interessante Diskussionen und die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Sachmittel. Für den regen Austausch bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Stefan Hindel, Klaus Eickel und Marc Maaß.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Martin Kramer möchte ich mich besonders dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit zur externen Promotion gegeben hat und die gute Betreuung auch über weite Distanz.

Danken möchte ich auch dem Team des zentralen Tierlaboratoriums Essen. Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Hilken für die Möglichkeit der Nutzung des Großtier-OPs. Danke auch an die beiden Tierärzte Herrn Dr. med. vet. Andreas Wißmann und Frau Dr. med. vet. Christine Krüger für die unkomplizierte Zusammenarbeit, der Hilfe bei der Bestellung der Schweine, der Vorbereitung und Durchführung der Operationen. Für die Versorgung der Schweine danke ich Herrn Frank Grädtke. Für die Hilfe bei den Vorbereitungen danke ich Annika Bollweg und Stefanie Gulik. Die reibungslose Zusammenarbeit hat sehr viel Spaß gemacht und ich konnte sehr viel lernen.

Die Anfertigung der histologischen Präparate und die Auswertung mit der Morphometriesoftware wären ohne die Unterstützung des Instituts für Pathologie nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Hideo Andreas Baba, Frau Silke Skottky und Frau Dorothe Möllmann bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Strahlenklinik des Universitätsklinikums Essen, die das Projekt auf vielfältige Art unterstützt haben. Bei Andrea Saemisch bedanke ich mich für alle administrativen Arbeiten, bei Herrn Dr. rer.nat. Ali Sak und Herrn Michael Groneberg für die Erlaubnis der Nutzung des Labors und die kompetente Unterstützung. Bei Herrn Holger Kranke für seine feinmechanischen Fähigkeiten, die wir

anfangs bei der Planung der OPs benötigt haben und bei Patrick Zylka und Frau Dr. rer. nat. Andrea Keßler, die uns ebenfalls unterstützt haben.

Ich danke außerdem meiner Familie, vor allem Brigitte, Marie und Ellen für ihre Geduld und Unterstützung in allen Phasen und besonders meinem Mann Philipp, der mich immer aufgebaut hat, wenn es mal nicht gut lief und mich nach vielen Experimenten bis in die frühen Morgenstunden noch vom Uniklinikum abgeholt hat.

10 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Essen, den 15.10.2017

Anika Söhner

