

**Pharmakokinetische Modellierung zur  
Quantifizierung der Blutperfusion mit  
dynamisch-kontrastmittelverstärkter  
Magnetresonanztomographie**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Stefan Ronald Hindel**

aus Andernach

Düsseldorf, 22. November 2017

Aus dem Institut für Experimentelle Physik der kondensierten Materie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Berichterstatter:

1. PD Dr. rer. nat. Lutz Lüdemann
2. Professor Dr. rer. nat. Thomas Heinzl

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Mai 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Physiologische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Mikrovaskulatur und Mikrozirkulation . . . . .	5
2.2	Lokale Blutflussregulation . . . . .	6
2.3	Nicht-nutritive Gewebedurchblutung . . . . .	11
2.4	Extravasation von Nährstoffen . . . . .	12
2.5	Tumorpathophysiologie . . . . .	13
<b>3</b>	<b>Technische Grundlagen</b>	<b>19</b>
3.1	Biologische Bestrahlungsplanung . . . . .	19
3.2	Kontrastmittel . . . . .	21
3.3	Pharmakokinetische Modellierung . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Kumulativer Teil</b>	<b>31</b>
4.1	Validierung der Perfusionmessungen . . . . .	33
4.2	Messung des interstitiellen Volumens . . . . .	57
4.3	Messung des Blutvolumens . . . . .	59
4.4	Perfusionsmessung mit LMCA . . . . .	85
4.5	Darstellung der Eigenleistung . . . . .	87
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Die Schnittbildgebung auf Grundlage der magnetischen Resonanz von Atomkernen mit magnetischem Dipolmoment ist eine verhältnismäßig neue Technik, deren theoretische Grundlage erst Mitte der 1940er Jahre von Felix Bloch und Edward Purcell entdeckt wurde. Schon in den 1950er Jahren fanden diese Erkenntnisse in Form der Magnetresonanzspektroskopie erste Anwendungen mit medizinischer Relevanz<sup>1</sup>. Es dauerte jedoch bis Anfang der 1970er Jahre bis, maßgeblich durch Peter Mansfield, Techniken entwickelt wurden, um die medizinische Bildgebung auf Grundlage der Kernspinresonanz zu ermöglichen. Schon Ende der 1970er Jahre entstanden Magnetresonanztomographietechniken, die sich auch heute noch im routinemäßigen klinischen Einsatz befinden, wie die auf einer sehr schnellen Umschaltung der Magnetfeldgradienten basierende sogenannte Echoplanar-Bildgebung, mit der Bilderzeugungen von unter einer Sekunde möglich wurden. Anfang der 1980er Jahre wurde von Jürgen Henning in Freiburg die sehr aufnahmezeiteffiziente und gleichzeitig hochsensitive Spin-Echo-Sequenz entwickelt. Im Jahr 1985 entwickelte die Gruppe um Axel Haase in Göttingen mit der FLASH-Sequenz (*fast low angle shot*) ein Schnellbildgebungsverfahren, welches bei gleichbleibender Bildqualität die damals üblichen Aufnahmedauern um mehr als eine Größenordnung verringerte. Diese Technik ermöglichte eine Vielzahl an vorher nicht denkbaren klinischen Anwendungen, wie Aufnahmen im Bauchraum, dreidimensionale Aufnahmen der Anatomie, sequenzielle Messungen im dynamischen Gleichgewicht, Gefäßdarstellungen (Angiographie) und funktionelle Kartierungen des Gehirns mit hoher Auflösung. Mit diesem maßgeblichen Durchbruch wurde die diagnostische Magnetresonanztomographie (MRT) als tomografisches Verfahren insbesondere in der Onkologie etabliert<sup>2</sup>. Im Vergleich zu anderen Verfahren wie der Computertomographie (CT), Ultraschall (US) und der Positronenemissionstomogra-

phie (PET) kann die MRT die Tumormorphologie insbesondere in Weichteilgewebe durch die Abgrenzung pathologischer Bereiche zu benachbarten gesunden Gewebestrukturen minimalinvasiv und hochaufgelöst beschreiben.<sup>3</sup>

Seit Egas Moniz Ende der 1920er Jahre eine Technik zur zerebralen Angiographie unter Verwendung von strahlenundurchlässigen Kontrastmitteln kombiniert mit konventioneller Radiologie beschrieb, sind Radiologen an der Bildgebung und bildgebungsbasierten Messung der Gewebedurchblutung interessiert. Vor der Entwicklung entsprechender MRT-Techniken wurden jodhaltige Kontrastmittel routinemäßig zur kontrastmittelverstärkten CT angewendet. Dies ermöglichte eine präzisere Differentialdiagnose von Tumorgewebe auf Grundlage von zusätzlichen funktionellen Informationen. Die Magnetresonanztomographie hat im Vergleich zu anderen etablierten Verfahren wie CT und PET viele Vorteile, wie die große Auswahl an verschiedenen Kontrastmitteln, mit unterschiedlichen physikalischen, chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften, das breite Spektrum an verschiedenen Sequenzen und deren Einstellungsmöglichkeiten und nicht zuletzt als minimal invasives Bildgebungsverfahren die Freiheit von Strahlungsbelastung bei gleichzeitig exzellentem Weichteilkontrast. Seit Beginn der 1990er Jahre wurden insbesondere für die Onkologie auf Grundlage ultraschneller MRT-Techniken sequenzielle Aufnahmen der Verteilung gadoliniumbasierter Kontrastmittel im menschlichen Gewebe ermöglicht. Die dynamisch-kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) ist aufgrund dieser überlegenen funktionellen Bildgebungsmöglichkeiten seit vielen Jahren eine etablierte Technik für die onkologische Diagnose, Überwachung und Nachkontrolle solider Tumoren.<sup>4</sup>

Pathophysiologische Veränderungen der Mikrovaskulatur resultieren in zeit-räumlichen Variationen der kontrastmittelinduzierten Kontrastverstärkungsdynamik, die wertvolle Informationen für die Tumorbewertungen liefern. Mit Analysemethoden der DCE-MRT wird darauf abgezielt, die biologisch relevanten Informationen aus den sequenziell aufgenommenen, dynamischen MRT-Signaländerungen in Verbindung zu setzen mit den zugrundeliegenden physiologischen Zuständen und Prozessen im Gewebe. Die dynamischen Aufnahmen von Kontrastmittelanreicherungsmustern werden über die Gewebeblutperfusion hinaus noch von einer Vielzahl anderer mikroanatomischer Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise der Gefäßdichte, dem Blutvolumen, der Endothelwanddurchlässigkeit (Permeabilität), dem Interstitialvolumen und der Blutplasmatransitzeitheterogenität. Von den vielen verschiedenen vorgeschlagenen quantitativen und semi-quantitativen Methoden zur Informationsgewinnung aus DCE-MRT-Gewebekontrastzeitkurven hat sich insbesondere der von Kety in den 1950er Jahren für Inertgas ent-

wickelte<sup>5</sup> und von Tofts<sup>6</sup> erstmals in den 1990er Jahren für die DCE-MRT vorgeschlagene Ansatz auf der Grundlage pharmakokinetischer Modellierung durchgesetzt. Die Analyse dieser Modelle auf Grundlage von Annahmen über die Kontrastmitteldynamik in der Mikrophysiologie fand seither weite Verbreitung in der Untersuchung der Tumorangiogenese.<sup>4</sup>

Während der weltweiten Etablierung der semi-quantitativen Tofts Modelle als Standard der pharmakokinetischen Gewebeanalyse hat die Weiterentwicklung der Scannerhardware und verbesserte Bildakquisitionstechniken zu einer verbesserten Bildqualität und erhöhten zeitlichen Auflösung der Bildsequenzen geführt. Dies hat einerseits Einschränkungen der bisherigen Modelle aufgezeigt, wie beispielsweise das Messen lediglich einer einzelnen Volumentransferkonstante, die den konvektiven Transportprozess der Blutperfusion mit diffusiven Transportprozessen wie der Endothelwandpermeabilität kombiniert zusammenfasst. Andererseits eröffnete sich die Möglichkeit zur Untersuchung und Etablierung neuerer Modelle, die physikalisch sinnvolle Größen quantifizieren können und somit erstmals eine zuverlässige, voxelweise individualisierte, räumlich heterogene Bestrahlungsplanung ermöglichen.<sup>7,8</sup>

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Tauglichkeit verschiedener quantitativer pharmakokinetischer Modelle der DCE-MRT mit Hilfe von *in-vivo*-Experimenten in der Skelettmuskulatur von Hausschweinen zu evaluieren und diese Modelle insbesondere hinsichtlich ihrer Blutperfusionsergebnisse anhand biologischer DCE-MRT-Messreihen in einem klinisch realistischen Rahmen zu validieren. Es ist von besonderem Interesse, die quantitative MRT auf Grundlage pharmakokinetischer Modelle zu etablieren, um eine individualisierte Gewebewertung und eine bedarfsgerechtere Therapie zu ermöglichen. Die Validierung von DCE-MRT-Perfusionsmessungen in der Skelettmuskulatur stellt jedoch im Vergleich zu Messungen in hochperfundierten Organen wie Herz, Gehirn und Nieren aufgrund der geringen Ruhedurchblutung der Skelettmuskulatur und des damit einhergehenden geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine besondere technische Herausforderung dar. Die Darstellung einer großen Bandbreite an Perfusionszuständen ist von besonderem Interesse, da in aggressiven soliden Tumoren niedrig perfundierte und somit sauerstoffunterversorgte (hypoxische) Bereiche direkt neben hochvaskularisierten und hochperfundierten Gewebegebieten liegen. Die großen Blutflussrekrutierungsreserven der Skelettmuskulatur und ihre heterogene Ansprechcharakteristik auf die arterielle Administration von gefäßerweiternden Substanzen wie Adenosin ermöglichen die Nachahmung dieser durch Durchblutungsheterogenität gekennzeichneten mikrovaskulären Zustände solider Tumoren. Die funktionelle und quantitative MRT kann

über ihren klinischen Nutzen hinaus aufgrund ihrer minimalen Invasivität und ihrer großen Auswahl an Techniken, Sequenzeinstellungen und Kontrastmitteln auch in der Grundlagenforschung Klarheit schaffen über derzeit noch umstrittene physiologische Gegebenheiten, wie beispielsweise der genauen Architektur der Mikrovaskulatur, sowohl in gesundem als auch im pathologischem Gewebe<sup>7,9</sup>.



# Kapitel 2

## Physiologische Grundlagen

### 2.1 Mikrovaskulatur und Mikrozirkulation

Der Hauptzweck des Herz-Kreislauf-Systems ist es, Sauerstoff und andere Nährstoffe zu Zellen des Körpers hin und Kohlendioxid und andere Abfallstoffe von diesen weg zu transportieren. Die Mikrozirkulation ist der Transport von Blut in den kleinsten Blutgefäßen. Sie findet in den im Organgewebe eingebetteten Blutgefäßen (Vaskulatur) statt. Die Gefäße der Mikrovaskulatur im Skelettmuskelgewebe sind die terminalen Arteriolen, Metarteriolen, die kontinuierlichen Blutkapillaren (in dieser Arbeit durchgehend als Kapillaren bezeichnet), arteriovenösen Anastomosen (AVAs) und Venolen. Der konvektive Transport des Blutes in diesen mikrovaskulären Gefäßen, definiert als die Volumenstromstärke (mL/min) des Blutflusses pro Gewebeeinheitsvolumen (oder Masse), wird als Perfusion (oder spezifische Durchblutung) bezeichnet. Eines der entscheidendsten Prinzipien des Blutkreislaufes ist die Fähigkeit jeden Gewebes, seine individuelle lokale Blutperfusion proportional angepasst an seine aktuellen metabolischen Bedürfnisse zu steuern.<sup>10-12</sup>

Das Mikrogefäßsystem der Skelettmuskulatur ist ein wohlstrukturiertes Netzwerk, in dem Arteriolen in Metarteriolen und diese in Kapillaren übergehen (siehe Abb. 1)<sup>11,13</sup>. Arteriolen sind kleine Arterien mit einem Innendurchmesser (Lumen) von weniger als 100  $\mu\text{m}$ . Sie sind ein wesentlicher Bestandteil der Durchblutungsregulation und des Blutdrucks und können durch Verengung und Erweiterung die durchfließende Blutmenge regulieren. Ihr Gefäßwandaufbau besteht wie der von Arterien aus vier Bereichen: der außen liegenden Tunica adventitia/externa, Tunica media, Tunica intima (bestehend aus Membrana elastica interna, subendotheliale Bindegewebsschicht und dem Endothel) und dem Gefäßlumen. Die glatte Muskulatur

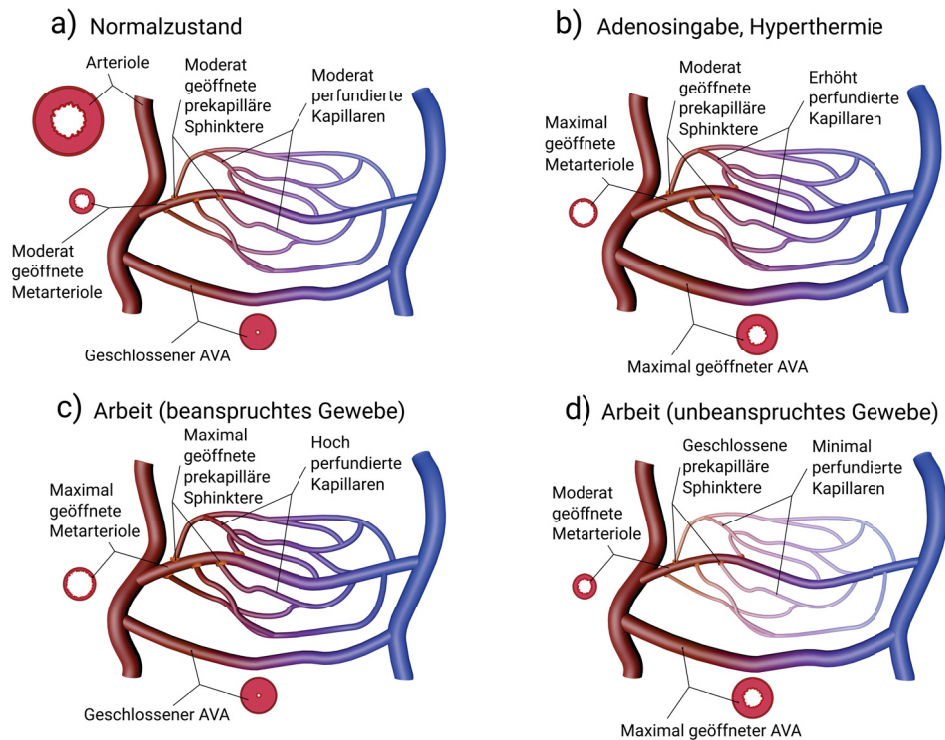
der Tunica media ist in der Lage, die Arteriolen zu kontrahieren. Ihr Zusammenziehen führt dazu, dass das anschließende Kapillarbett weniger von Blut durchströmt wird, wodurch gering beanspruchtes Gewebe weniger durchblutet wird. Der Reibungswiderstand des Blutes nimmt in den Arteriolen stark zu und die Fließgeschwindigkeit und der Blutdruck nehmen in den Arteriolen auf dem Weg zum Kapillarbett stark ab. Die Anzahl an durchgehenden Lagen glatter Muskelzellen wird als Definitionskriterium zur Unterscheidung zwischen Arterien und Arteriolen verwendet. Wobei, je nach Autor, arterielle Gefäße mit nur einer bis drei Lagen zu den Arteriolen gezählt werden<sup>14,15</sup>.

Die Metarteriolen dienen als Hauptdurchgangskanäle durch das Gewebe und bleiben auch unter Ruhebedingungen offen. Im Bereich des venösen Ausgangs des Kapillarbetts gehen sie in Sammelvenolen über. Metarteriolen sind Gefäßtypen, die strukturelle Charakteristiken sowohl von Kapillaren als auch von Arteriolen erfüllen. Sie sind etwas größer als Kapillaren und die Tunica media der Metarteriole ist nicht kontinuierlich, sondern formt vor den Eingängen zu den Kapillaren Ringe aus glatten Muskeln (Sphinkter). Jede Metarteriole entsteht aus den Endarteriolen und teilt sich in 10 bis 100 Kapillaren auf<sup>12</sup>. Von den Metarteriolen ausgehend wird den Kapillaren das vom Herz kommende Blut zugeführt<sup>11</sup>. Die Kapillaren der Skelettmuskulatur sind sehr enge, elastische Gefäße, deren Lumen im Falle der Skelettmuskulatur von etwa 4 bis 10  $\mu\text{m}$  in der Größenordnung des Durchmessers der Erythrozyten (rote Blutkörperchen) liegt, welcher etwa 6 bis 8  $\mu\text{m}$  beträgt. Das Lumen ist also gerade groß genug, dass die roten Blutzellen sich durch die elastischen Kapillaren zwängen können (siehe Abb. 3).<sup>11,16</sup>

## 2.2 Lokale Blutflussregulation

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen zur lokalen Blutflussregulation angegeben. Ein insbesondere für Organe wie das Gehirn, Herz und die Skelettmuskulatur relevanter Mechanismus beruht auf der Wirkung vasodilatatorischer Substanzen wie Adenosin<sup>17</sup>. Umso größer die metabolische Rate ist und je weniger Sauerstoff und andere Nährstoffsubstanzen zur Verfügung stehen, desto höher ist auch die Rate der endogenen Freisetzung vasodilatativer Substanzen in den lokal umgebenden Gewebezellen<sup>11,17</sup>. Diese vasodilatativen Substanzen diffundieren durch das Gewebe zu den präkapillären Sphinkteren, Metarteriolen und Arteriolen, und verursachen dort eine Weitstellung der Gefäße. Außer Adenosin sind Kohlendioxid, Adenosin-Phosphatverbindungen, Histamin, Kaliumionen und Wasserstoffionen vermutete Vasodilatoren.

Ein weiterer Mechanismus zur lokalen Blutflussregulation beruht auf der



**Abbildung 1.** Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Zustände der Mikrovaskulatur. Die variierenden Frequenzen der Kontraktion und Dilatation der arteriolen Gefäße sind im Sinne einer zeitlichen Mittelung durch veränderte Gefäßdurchmesser und die Veränderung der nutritiven Perfusion durch die Farbsättigung der Kapillaren angedeutet. In a) ist der Ruhezustand des Gefäßsystems gezeigt. Abbildung b) stellt den Gefäßsystemzustand im Falle von kontinuierlicher Adenosinadministration oder Hyperthermie dar. Im Fall c) führt Muskelarbeit im beanspruchten Gewebe zu einer hohen Perfusion der Kapillaren. d) Hingegen wird im nicht beanspruchten Gewebegebiet während Muskelarbeit oder während eines Schocks die Versorgung mit Nährstoffen reduziert. Die Farbdarstellung versinnbildlicht die Änderung im Blutsauerstoffgehalt während des Blutflusses durch die Kapillaren von hoch (rot) zu gering (blau).<sup>11,12</sup>

direkten Wirkung von Nährstoffmangel auf die vaskuläre Muskulatur. Sauerstoff und andere Nährstoffe sind nötig, um die vaskuläre Kontraktion aufrecht zu erhalten. Deshalb werden sich beispielsweise bei Abwesenheit einer adäquaten Sauerstoffversorgung die Blutgefäße entspannen und somit spontan weit stellen. Da die glatte Muskulatur der Gefäße Sauerstoff benötigt, um kontrahiert zu bleiben, werden sich die präkapillären Sphinktere als auch die Metarteriolen schließen, bis die Gewebezellen den überschüssigen Sauer-

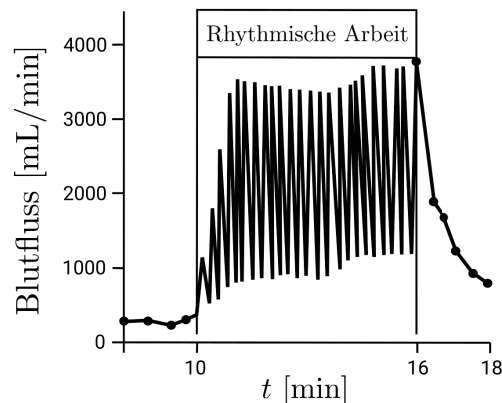
Organ	Durchblutung			Organgewicht [kg]
	absolute [mL/min]	relative (HZV-bezogene) [%]	spezifische (gewichtsbezogene) [mL·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	
Gehirn	780	15	0.56	1.4
Herzmuskulatur	250	5	0.83	0.3
Nieren	1200	23	4.0	0.3
Skelettmuskulatur	900	17	0.03	30.0
Haut	400	8	0.1	4.0
Leber	1500	28	1.0	1.5

**Tabelle 2.1.** Durchschnittswerte der absoluten, relativen und spezifischen Durchblutung verschiedener Organe für Erwachsene in körperlicher Ruhe und bei Indifferenztemperatur<sup>10</sup>.

stoff konsumiert haben. Wenn der Sauerstoffüberschuss verbraucht ist und die Sauerstoffkonzentration sinkt, öffnen sich die Muskeln der präkapillären Sphinktere und Metarteriolen wieder und der Zyklus beginnt von neuem. Das Phänomen des periodisch alle paar Sekunden ein- und aussetzenden Blutflusses in den Kapillaren wird als Vasomotion bezeichnet. Wenn die Sauerstoffsverbrauchsrate des Gewebes groß ist und somit die Sauerstoffkonzentration unterhalb des Normalniveaus sinkt, erhöht sich die Frequenz der periodischen Blutflussschübe. Dadurch führt das kapilläre Blut dem Gewebe eine erhöhte Menge an Sauerstoff und anderen Nährstoffen zu.<sup>11,12</sup> Es wird angenommen, dass beide Mechanismen, die lokale chemische Regelung durch Vasodilatoren als auch der Nährstoffmangel, in hypoxischem Gewebe synergetisch zusammenwirken.<sup>11,12,18,19</sup>

In Tabelle 2.1 sind durchschnittliche Werte der Ruhedurchblutung verschiedener Organe im erwachsenen Menschen gezeigt. Im Vergleich zu allen anderen Organen hat die Skelettmuskulatur bei weitem die geringste spezifische Durchblutung (Perfusion). Die Blutperfusion beträgt unter Ruhebedingungen im Skelettmuskel etwa 3 bis 4 mL/min/100g<sup>11</sup>. Sie steigert sich durch Muskelarbeit jedoch lokal auf das bis zu 25- bis 50-fache, also etwa auf 100 bis 200 mL/min/100g. Die Perfusion des Muskels steigt und fällt dabei mit jeder Muskelkontraktion. Wegen der Kompression der Blutgefäße fällt die Muskelgewebepерfusion während jeder Kontraktion auf einen vergleichsweise geringen Wert ab (siehe Abbildung 2). Über einen längeren Zeitraum, in dem sehr viele Muskelkontraktionen erfolgen, steigt das Grundperfusionsniveau der Muskulatur insgesamt auf ein hohes Vielfaches der Ruheperfusion und fällt von dort erst über einen Zeitraum von mehreren Minuten wieder auf das Grundniveau ab.<sup>11,12</sup>

Während der durch die starken Kontraktionen verursachten Blutgefäßkompressionen wird der Blutfluss in den Gefäßen beinahe gestoppt, wodurch



**Abbildung 2.** Verlauf des Blutflusses bei Arbeit im Wadenmuskel eines Menschen während starker rhythmischer Kontraktion. Der Blutfluss ist während der Kontraktion viel geringer als zwischen den Kontraktionen. Das Gesamtniveau des Blutflusses steigt im Vergleich zum Ruheblutflussniveau insgesamt aber stark an und fällt erst innerhalb mehrerer Minuten wieder auf das Ruheniveau ab.<sup>11,20</sup>

anschließend, aufgrund des oben beschriebenen Nährstoffmangelmechanismus, die Kontraktion erheblich geschwächt wird. Unter Ruhebedingungen findet in einigen Kapillaren gar kein oder nur wenig Blutfluss statt. Bei beispielsweise strapaziöser sportlicher Betätigung werden alle Kapillaren des beanspruchten Gewebes rekrutiert. Das Öffnen der Ruhekapillaren verringert die Distanz, welche der Sauerstoff und andere Nährstoffe von den Kapillaren zu den kontrahierenden Muskelfasern diffundieren müssen und führt mitunter zu einem zweifachen bis dreifachen Anstieg der kapillären Oberfläche, durch welche Sauerstoff und andere Nährstoffe vom Blut zum Gewebe permetieren können.<sup>11,12</sup>

Die Skelettmuskulatur ist außerdem mit sympathischen Vasokonstriktionsnerven ausgestattet. In einigen Tieren, jedoch nicht beim Menschen<sup>21</sup> existieren zudem sympathische Vasodilatatornerven. Die sympathischen vasokonstriktiven Nervenfasern sondern Noradrenalin an ihren Nervenenden ab und wenn sie maximal aktiviert sind, können sie den Blutfluss in ruhendem Muskel bis zur Hälfte oder bis zu einem Drittel des Ausgangswertes senken. Diese Vasokonstriktion spielt eine wichtige Rolle bei Schock und generell in Situationen, in denen es darauf ankommt, einen normalen arteriellen Druck aufrecht zu erhalten (Abb. 1d).<sup>11</sup>

Der hohe Anstieg der Skelettmuskelperfusion während sportlicher Beanspruchung geschieht maßgeblich durch chemische Effekte, die direkt auf die Arteriolen wirken und deren Dilatation verursachen (siehe Abb. 1c) und

durch eine verringerte adrenerge Aktivität des sympathischen Nervensystems<sup>11,13</sup>. Da aktive Muskeln Sauerstoff in kurzer Zeit rapide verbrauchen, verringern sie dabei gleichzeitig die für die Muskelkontraktion notwendige Sauerstoffkonzentration in der Gewebeflüssigkeit. Dies führt zur lokalen arteriolen Vasodilatation, da die arteriolen Wände die Kontraktion in der Abwesenheit von Sauerstoff nicht aufrechterhalten können. Experimente haben gezeigt, dass große Mengen des Vasodilatators Adenosin, welche direkt in eine Muskelarterie injiziert wurden, keine Blutperfluationsanstieg im Ausmaß des Anstiegs bei sportlicher Muskelarbeit zur Folge hatten<sup>11</sup>. Studien in Hinterläufen von Hunden zeigten, dass Adenosin nicht verantwortlich ist für die Gefäßweitstellung und Höherdurchblutung aufgrund von Beanspruchung<sup>22,23</sup>. Studien in Katzen deuten lediglich darauf hin, dass die Aktivierung von Adenosinrezeptoren bis zu 40% der Vasodilatation während isometrischer Zuckungskonstriktion im Grazilismuskel von Katzen beisteuert<sup>23,24</sup>.

Adenosin wird als pharmakologisches Medikament eingesetzt, um Blutflusssteigerungen unter kontrollierten Bedingungen hervorzurufen. Es sollen damit die Mechanismen der Hyperämie, wie sie bei sportlicher Aktivität oder generell bei Muskelarbeit auftreten, simuliert werden. Heinonen et al. bestätigten mit <sup>15</sup>O-H<sub>2</sub>O-PET-Messungen bei gleichzeitiger Adenosinadministration in die Femoralarterie von menschlichen Probanden<sup>25</sup>, dass Grund zur Annahme besteht, dass diese beiden Ursachen (exogene Adenosinadministration und Muskelarbeit) nicht die gleiche Wirkung hinsichtlich der skelettmuskulären Blutflussverteilung hervorrufen. Sequenzielle PET-Bildgebung mit sauerstoffmarkiertem Wasser misst nur den kapillären Fluss, der auch die Muskelzellen erreicht. Mit diesen PET-Messungen der nutritiven kapillären Blutperfusion und deren Heterogenität in menschlicher Beinmuskulatur konnte gezeigt werden, dass die Blutflussheterogenität bei exogener Adenosinadministration signifikant höher war als bei Muskelarbeit und dass die mit PET gemessenen Blutflusssteigerungen weitaus geringer waren als bei anderen Studien mit Druckmanschettensolierung der Wade gemessen wurde<sup>25,26</sup>. Die Autoren schließen daraus in Übereinstimmung mit anderen Studien<sup>27-31</sup>, dass ein wesentlicher Anteil der Blutflusssteigerungen bei hoher Adenosininfusion in den nicht-nutritiven arteriovenösen Anastomosen (AVAs) der Muskulatur stattfindet. Die Heterogenität im Sinne eines unterschiedlichen Rekrutierens nutritiver Kapillaren, wie sie bei Muskelarbeit auftritt, wird laut den Autoren durch intra-arterielle exogene Adenosingabe hingegen nicht hervorgerufen.

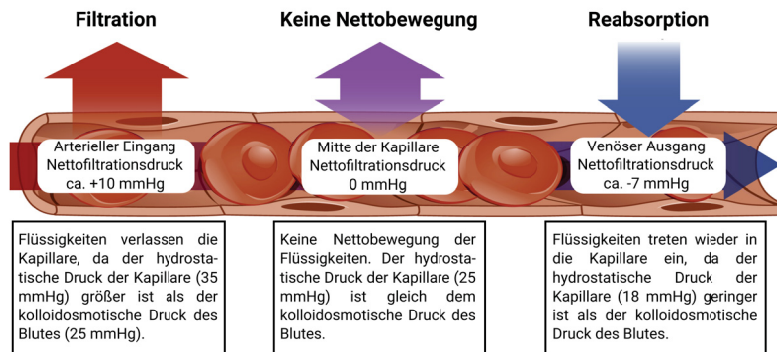
Die Ergebnisse von Blutflussstudien in menschlicher Beinmuskulatur zeigten, dass die körperliche Betätigung zu einer Beschränkung der Hypoxie in

den kontrahierten Muskeln führt und Hyperämie in den beanspruchten Muskeln nicht auf die direkte Wirkung endogenen Adenosins zurückzuführen ist. In den nicht kontrahierten Muskelbereichen hingegen ist eine erhöhte Blutflussheterogenität zu beobachten<sup>32</sup>. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Unterschenkelmuskulatur von Sarkompatienten während Hyperthermie und simultaner DCE-MRT-Messungen gemacht werden. Post-Hyperthermie-Kontrastanreicherungszeitkurven zeigten einen höher konzentrierten Kontrastmittelbolus in der frühen Phase der Gewebekurve<sup>33</sup>. Dieser erhöhte Informationsanteil der Signalcharakteristik deutet ebenfalls auf eine erhöhte Flussheterogenität im Gewebe als Ergebnis der Hyperthermie hin. Vergleichende Messungen mit einer Temperatursonde und Wasser-PET zeigten keine Übereinstimmungen mit diesen Blutflussmessmethoden, was die Autoren ebenfalls mit der nicht vorhandenen Fähigkeit zur Bestimmung nicht-nutritiver Perfusion durch <sup>15</sup>O-H<sub>2</sub>O-PET-Messungen erklären<sup>34</sup>.

### 2.3 Nicht-nutritive Gewebedurchblutung

Arteriovenöse Anastomosen sind eine parallel zum Kapillarbett verlaufende Kurzschlussverbindung zwischen Arteriolen und Venolen (siehe Abb. 1)<sup>11-13</sup>. Sie dienen der Durchblutungsregulation und können geöffnet und geschlossen werden. Sie dienen einerseits zur Regelung der bedarfsgerechten Organdurchblutung und andererseits der Temperaturregulierung von Organen (siehe Abb. 1b). Da das pro Zeiteinheit vom Herzen gepumpte Blutvolumen nicht ausreichend ist, um bei aufrechterhaltenem Blutdruck alle Kapillarbettssysteme des Körpers höchstmöglich zu versorgen, kann durch die lokal-chemisch durch vasodilatative Substanzen gesteuerte Öffnung eines parallel zu ihm verlaufenden AVAs ein Kapillarbett, welches Gewebezellen mit gegenwärtig geringer Stoffwechselaktivität versorgt, vom Blutfluss gemieden und hin zu Geweben mit höherem Nährstoffbedarf umlaufen werden<sup>35</sup>. Verschiedene Studien geben an, dass die Perfusion nicht-nutritiver AVAs in der Skelettmuskulatur für über 50% der in ihr stattfindenden Gesamtruheperfusion verantwortlich sind<sup>30,36</sup>.

Insbesondere die AVAs im subkutanen Gewebe der Haut dienen der Temperaturregulierung durch Wärmeabgabe. Aufgrund des geringen Gefäßwiderstandes der AVAs erfolgt eine stärkere Gesamtdurchblutung des betroffenen Gewebes, wenn sie geöffnet sind<sup>11-13</sup>. Dadurch kann Wärme vom Gewebe durch das durchfließende Blut wirkungsvoll aufgenommen und abtransportiert werden (siehe Abb. 1b). Bei einer notwendigen Wärmeabgabe erfolgt ebenfalls eine erhöhte Durchblutung des Kapillarbetts. Die temperaturregulative Durchblutung der AVAs findet parallel zu dieser Kapillarbett-



**Abbildung 3.** Darstellung des Transports der Erythrozyten in einer Kapillare und des kapillären Austauschs<sup>12</sup>. In dieser Abbildung angedeutet ist auch das Größenverhältnis des Durchmesser der Erythrozyten und der Kapillaren (siehe Seite 25, Pfropfenstrom).

Blutperfusion statt. Beide Gefäßsystemzustände werden in erster Linie durch das sympathische Nervensystem gesteuert. Im Falle der Temperaturregelung werden die AVAs schon bei geringer konstriktorischer Aktivität des Sympathikus geschlossen<sup>37</sup>. Die Verfügbarkeit von Parallelwegen über die AVAs ist im Vergleich zu der theoretisch ebenfalls denkbaren Hyperperfusion der Kapillarwege zweckmäßiger, da durch sie eine Verschiebung des lokalen chemischen Milieus, wie beispielsweise eine Verringerung des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks, verhindert wird.<sup>37</sup>

## 2.4 Extravasation von Nährstoffen

Der primäre Antrieb für den Flüssigkeitstransport von den Kapillaren in den interstitiellen (extravaskulären-extrazellulären) Geweberaum ist der kapilläre hydrostatische Druck des Blutes auf die Blutgefäße. Wenn Flüssigkeit die Kapillaren verlässt und sich in das Gewebe bewegt, steigt der hydrostatische Druck im interstitiellen Raum entsprechend an. Der kapilläre hydrostatische Druck am arteriellen Eingang des Kapillarbetts (etwa 35 mmHg) ist im Allgemeinen wesentlich größer als der interstitielle hydrostatische Druck (etwa 3 mmHg), da Lymphgefäße kontinuierlich die überschüssige Flüssigkeit im Interstitium absorbieren. Deshalb fließt Flüssigkeit aus dem arteriellen Eingang der Kapillaren in die interstitielle Flüssigkeit (Filtration).

Der kapilläre hydrostatische Druck sinkt hin zum venösen Ausgang des Kapillarbetts kontinuierlich auf etwa 18 mmHg. Durch osmotischen Druck gelangt dort Flüssigkeit aus der interstitiellen Flüssigkeit wieder zurück in



die Kapillaren (Resorption). Der osmotische Druck ergibt sich als Konzentrationsgradient aus vaskulärer und interstitieller Lösungskonzentration. Der kolloidosmotische Druck des Blutplasmas wird hauptsächlich durch Proteine wie Albumin bestimmt und bleibt entlang der gesamten Kapillarlänge konstant bei etwa 25 mmHg. Die Kapillarwand ist nur durchlässig für kleinmolekulare Plasmabestandteile zwischen drei bis sechs Nanometern<sup>38</sup>. Wasserlösliche Substanzen, welche durch die Kapillarwand diffundieren, tun dies durch den interzellulären Spalt. Dieser Spalt hat eine Öffnung von etwa sechs bis sieben Nanometern, was etwas weniger ist als der Durchmesser eines Albuminmoleküls von acht bis elf Nanometern<sup>11,39</sup>. Die interzellulären Spalte machen zwar nur etwa ein Tausendstel der gesamten Kapillarwandoberfläche aus<sup>11</sup>, der kleine Durchmesser der Kapillare und die dünne Endothelwand minimieren jedoch den Diffusionsweg für Moleküle vom Kapillarkern zum direkt anschließenden Gewebe außerhalb des Gefäßes. Der Diffusionsweg ist in der Tat so kurz, dass die meisten Gase und anorganischen Ionen die Kapillarwand unterhalb von 2 ms passieren können<sup>38</sup>. Durch die geringe Durchlässigkeit der kapillären Endothelwand für größere Moleküle wird ein intravasaler Druck erzeugt, der dem hydrostatischen Druck nach extravasal entgegengesetzt ist. Die Differenz aus hydrostatischem und kolloidosmotischem Druck wird als effektiver Filtrationsdruck bezeichnet und beträgt für den arteriellen Eingang des Kapillarbetts etwa 10 mmHg. In der Mitte des Kapillarbetts sinkt er auf null, was gleichbedeutend ist mit einem verschwindenden Nettoaustausch von Substanzen über die Kapillarwand. Am venösen Ende des Kapillarbetts sinkt der effektive Filtrationsdruck auf -7 mmHg. Die vom venösen Blut in den Unterdruckbereichen des Kapillarbetts enthaltenen Stoffwechselendprodukte werden vom Kapillargefäßsystem wieder aufgenommen, über die Venolen abtransportiert und letztlich über die Leber, die Nieren und den Darm ausgeschieden.<sup>11,38</sup>

## 2.5 Tumorpathophysiologie

Die abnormale Entstehung neuer Gefäße (Neoangiogenese) durch Sprießungsprozesse wird durch Wachstumsproteine eingeleitet, die der Tumor selbst sekretiert, mit dem einzigen Nutzen der Aufrechterhaltung seiner eigenen Nährstoffversorgung. Dies führt zu einem niedrig strukturierten Zustand des Vaskularsystems, mit einerseits stark geweiteten, durchlässigen Mikrogefäßen und signifikant gesteigerter nicht-nutritiver arteriovenöser Anastomosen<sup>40-43</sup>. Das Blutvolumen als prozentualer Anteil des Mikrogefäßsystems am Gesamtgewebe, ist ein entscheidender, mit der DCE-MRT nichtinvasiv bestimmbarer Gewebeparameter für die Gradierung von Tumoren in ver-

schiedenen Organen<sup>44,45</sup>. Beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen Glukoseaufnahme und mikrovaskulärem Blutvolumen festgestellt werden, der wiederum Aussagen zulässt über den Grad der Tumorangiogenese<sup>46</sup>. Auch die Gewebheterogenität von Gehirntumoren kann direkt über die Bestimmung des Blutvolumens ermittelt werden. Dabei wird unter anderem eine hohe Gefäßdichte in der Peripherie des Tumors gemessen und eine wesentlich geringere Dichte in der zentralen Region des Tumors.<sup>47</sup> Das mikrovaskuläre Blutvolumen ist nicht nur ein essenzieller Biomarker für die Aktivität und Malignität von Gehirntumoren<sup>48–51</sup> sondern auch in Geweben niedrig perfundierter Organe wie Skelettmuskulatur und Brust<sup>40,52–54</sup>.

Das interstitielle Volumen ist der Gewebeanteil, der weder zur Vaskulatur noch zu den Zellen zählt. Als nicht vaskulärer Zellzwischenraum besteht es zum Großteil aus Bindegewebe und der blutplasmaartigen Interstitialflüssigkeit, über die niedermolekulare Kontrastmittelmoleküle außerhalb der Vaskulatur durch Diffusionsprozesse transportiert werden<sup>55</sup>. Die Tumorausbreitung und der Grad der Ansprache auf therapeutische Maßnahmen stehen im Zusammenhang mit dem interstitiellen Gewebeanteil in malignem Gewebe. Daher ist eine Änderung des interstitiellen Volumens ein wichtiger prognostischer Faktor und ein Indikator zur Bewertung des Erkrankungsprozesses während der Behandlung von Krebspatienten<sup>56</sup>. Ein Anstieg des interstitiellen Volumens kann auf Mikronekrosen tumorösen Gewebes hindeuten<sup>56–59</sup>. Generell zeigen Tumoren ein im Vergleich zum gesunden Gewebe drei bis fünfmal größeres interstitielles Volumen mit höherem Bindegewebeanteil<sup>9,60</sup>. Ein erhöhtes interstitielles Volumen geht oft mit Tumorphoxie einher und reduziert damit die strahlentherapeutische Wirkung. Andererseits wird ein erhöhtes interstitielles Volumen auch als Reaktion auf die Bestrahlungstherapie beobachtet. Dies dient als wichtiger Bewertungsfaktor in der Nachverfolgung und Überwachung des Therapieerfolges<sup>61</sup>.

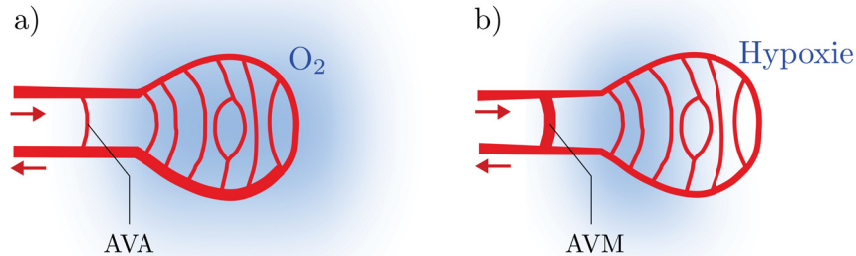
Die Blutgefäßnetzwerke in Tumorgewebe haben eine heterogene Struktur mit krankhaften Gefäßfehlbildungen und stark variierenden Blutflussweglängen<sup>62</sup>. Um eine effiziente Blutflussverteilung zu erhalten, müssen im Gefäßsystem Mechanismen zur Gefäßdurchmesseranpassung integriert sein, um die Ausformung von funktionellen Gefäßkurzschlüssen zu verhindern<sup>62</sup>. Bei pathologischem Fluss durch arteriovenöse Malformationen (AVM) werden die Gefäße kurzer Blutflusspfade geweitet, so dass der Blutfluss längere (nutritive) Pfade umgeht (Abb. 4)<sup>62,63</sup>. Die notwendigen Adaptionsmechanismen zur Verhinderung dieses Systemzustandes machen die Weitergabe von Informationen über den metabolischen Gewebeszustand an die vorgeschalteten zuführenden Gefäße erforderlich<sup>62</sup>. Beispielsweise wird gefäßweiterndes Adenosintriphosphat (ATP) von den roten Blutkörperchen

als Antwort auf einen zu niedrigen Sauerstoffpartialdruck und PH-Wert ausgeschüttet<sup>64</sup>. Eine beeinträchtigte vaskuläre Kommunikation in tumorösen Mikrovaskulärnetzwerken, die zu funktionellen Gefäßkurzschlüssen führt, ist eine Hauptursache für dysfunktionale Mikrozirkulation und lokale Hypoxie in Tumoren<sup>62,63</sup>. Die Existenz heterogener Perfusion und Gefäßpermeabilität ist ein Kennzeichen aggressiver, metabolisch unterversorgter Tumoren<sup>65</sup>. Die damit einhergehende pathologische Gewebhypoxie ist einer der Gründe weshalb selbst eine optimale Radiochemotherapie nicht in der Lage ist, fortgeschrittene Kopf-Hals-Tumoren unter Kontrolle zu bringen<sup>66,67</sup>.

Messungen des AVM-Flusses in malignen Tumoren zeigten, dass ein Anteil von mindestens 30% des arteriellen Blutes durch Tumoren passieren kann, ohne am mikrozirkulatorischen Austauschprozess beteiligt zu sein<sup>9</sup>. In mit interarterieller Chemotherapie behandelten Kopf-Hals-Krebs-Patienten wurde ein AVM-Fluss von 8 bis 43% des Gesamtflusses gemessen, wobei letzterer durchgehend die Normalgewebedurchblutung des Kopfes überstieg<sup>9</sup>. Aggressive Tumoren weisen zudem eine erhöhte Gefäßdichte bei gleichzeitig signifikant erhöhten Anteilen hypoxischer Regionen auf<sup>68</sup>. Die beeinträchtigte Regulation von Wachstums- und Adaptionsmechanismen in vaskulären Netzwerken von Tumoren ist eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch.

Die verschiedenen miteinander in Beziehung stehenden adaptiven Rückmeldemechanismen konstituieren ein selbstregulierendes System, um eine effiziente Blutverteilung im Normalgewebe zu gewährleisten. Es besteht Grund zur Annahme, dass eine heterogene Gewebepfusion in Tumoren aus Störungen dieses Selbstkontrollsystems resultiert. In diesen konzeptuellen Modellen erhöht Neoangiogenese die Perfusionsheterogenität in Tumoren durch die Erhöhung des Ungleichgewichts zwischen parallelen Niedrig- und Hochwiderstandsflusspfaden<sup>68</sup>. Die Heterogenität von vaskulären Transitzeiten hat einen starken Einfluss auf die Berechnung der Gewebesauerstoffversorgung und auf die Charakteristik von Indikatorverdünnungszeitkurven<sup>69</sup>. Beispielsweise hängt die zerebrale Sauerstoffverfügbarkeit von den zerebralen Absolutwerten der Perfusion, aber auch von der zerebralen Durchblutungscharakteristik ab und bei einer großen kapillären Transitzeitheterogenität führt eine erhöhte Blutperfusion zu keiner signifikanten Verbesserung der zerebralen Sauerstoffversorgung<sup>70</sup>.

Solide Tumoren sind gekennzeichnet durch ihre heterogene Verteilung der Gewebedurchblutung. In ihnen haben Zellen in großer Entfernung von voll funktionsfähigen Blutgefäßen eine signifikant geringere Sauerstoffversorgung als in Normalgewebe<sup>73</sup>. Da das arterielle Blut den Sauerstoff transportiert, ist die Gewebedurchblutung ein hauptsächlich determinierender



**Abbildung 4.** Vergleich der gesunden mit pathologisch hypoxischer Mikrovaskulatur. a) In gesundem Gewebe liegt eine funktionale, hochstrukturierte Verfassung der Mikrovaskulatur vor. Bei einem hohen Nährstoffbedarf der über das jeweilige Kapillarbett versorgten Gewebezellen sind parallel zum Kapillarbett verlaufende, nicht-nutritive AVA-Blutflussdurchgangswege geschlossen (siehe auch Abbildung 1). b) Aufgrund neoangiogenetisch entstandener oder dysfunktional permanent dilatierter, parallel zum Kapillarbett verlaufender, nicht-nutritiver AVM-Routen mit geringerem vaskulärem Widerstand wird der eigentlich für das Kapillarbett vorgesehene Blutfluss umgeleitet und die Gewebezellen mit Nährstoffen unterversorgt. Die Unterversorgung mit Sauerstoff führt zu hypoxischen Regionen<sup>62,63,71</sup>. Weitstellung der nicht-nutritiven AVM-Durchblutung führt zu einer erhöhten Heterogenität der Gewebepfusion aufgrund einer diskreten Verteilung von Hoch- und Niedrigwiderstandsflusswegen<sup>25,68</sup>. Da nur die kapilläre Perfusion zum metabolischen Austausch beiträgt, liefert ausschließlich ihre Messung Informationen über die Nährstoffversorgung des Gewebes und über potentielle Mikronekrosegebiete.<sup>72</sup>

Faktor des Oxygenierungsstatus in malignem Gewebe<sup>74</sup>. Die Bestimmung des Grades der Perfusion ermöglicht die Quantifizierung des hypoxischen Gewebeanteils<sup>75</sup>. Die Hypoxie ist ein prinzipiell unabhängig von anderen Gewebeeigenschaften diagnostizierbares Charakteristikum vieler solider Tumore, das zu einer Entwicklung einer aggressiveren Tumorform führen kann. Die sauren Hypoxieregionen stimulieren die Entstehung einer metastatischen Ausprägung des Tumors<sup>68</sup> und Neoangiogenese<sup>76</sup>. Aufgrund des Sauerstoffeffektes hat die Hypoxie eine erhöhte Resistenz gegen Therapien zur Folge<sup>74,77</sup>. Da hypoxische Tumorzellen zudem klonogen bleiben, ist ihre Bestrahlungsresistenz ein starker Einfluss auf den Therapieerfolg<sup>77</sup>.

Hypoxie tritt häufig in Prostatakrebs auf, dem in den meisten westlichen Ländern am häufigsten diagnostizierten Krebsorte bei Männern<sup>74</sup>. Die durchschnittliche Gewebepfusion ist in Prostatakarzinomen ungefähr

dreimal höher als in Normalgewebe und zeigt Intra- und Intertumorvariabilität<sup>74</sup>. Trotz der hohen Blutperfusion in Prostatakrebs ist der durchschnittliche Gesamtsauerstoffpartialdruck in diesem etwa viermal geringer als in Normalgewebe (6 vs. 26 mmHg) und die Gewebeoxygenierung ist in Prostatakrebs extrem heterogen<sup>74</sup>. Bei strahlentherapeutischer Behandlung führt eine lokale Dosisescalation in Patienten mit hypoxischem Prostatakrebs zu einer Verbesserung des Behandlungserfolges<sup>78</sup>. Brustkrebs ist einer der häufigsten Krebsarten bei Frauen<sup>79</sup>. Fast in allen Fällen enthalten Brustkrebstumoren hypoxische Areale<sup>73</sup>, wobei 90% aller Todesfälle durch Brustkrebs eine Folge von Metastasierung sind<sup>73,80</sup>. Auch in menschlichen Gliomen liefert die Kenntnis über die Heterogenität der vaskulären Transitzeiten, verursacht durch arteriovenöse Malformationen, wertvolle Informationen über das Mikromilieu des Tumors, insbesondere über die Neoangiogenese und die Effizienz der Gewebesauerstoffversorgung<sup>71</sup>.



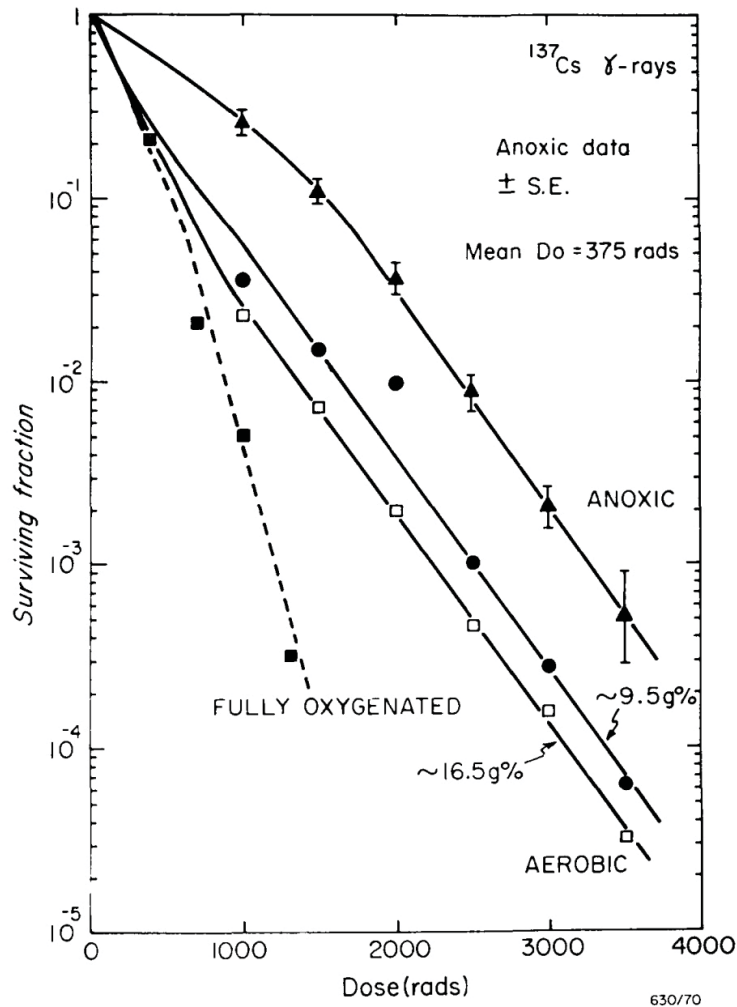
## Kapitel 3

# Technische Grundlagen

### 3.1 Biologische Bestrahlungsplanung

Aufgrund der durch den Sauerstoffeffekt verursachten Strahlenresistenz ist die Blutperfusion ein für die Gewebezustandsbewertung besonders entscheidender mikrophysiologischer Parameter. Die Strahlenempfindlichkeit von Makromolekülen ist in Gegenwart von Sauerstoff erhöht<sup>81,82</sup>. Hypoxie hingegen bedeutet ein durch Mangelversorgung an Blut verursachtes saures Milieu. Die Tumorphypoxie beeinträchtigt bei einer homogenen Bestrahlung des Gesamtzielvolumens die Heilungschancen einer Strahlentherapie erheblich. Wie in Abbildung 5 durch die Dreiecksmarkierungen dargestellt, überlebt in anoxischen beziehungsweise hypoxischen Gewebebereichen ein wesentlich größerer Anteil an Tumorzellen bei gleicher Strahlenexposition, verglichen mit stark oxidierten (gefüllte Quadrate) und aerobischen Arealen (gefüllte Punkte, leere Quadrate)<sup>83</sup>. Um einen optimalen strahlentherapeutischen Effekt zu erzielen, müssen deshalb in diesen potentiell nekrotisierenden, infiltrierten beziehungsweise durch Tumorwachstum charakterisierten Arealen unterschiedlich hohe Strahlungsdosen eingebracht werden. Die selektiv intensive Bestrahlung dysfunktionaler Geweberegionen kann die Perfusionseffizienz erhöhen und den therapeutischen Effekt verbessern<sup>68</sup>.

Die biologische Bestrahlungsplanung ist ein strahlentherapeutisches Konzept, das metabolische Indizes – wie beispielsweise die Blutperfusion – als Parameter zur voxelweise individualisierten Dosisescalation heranzieht. Im Gegensatz zu der in der klinischen Praxis bisher üblichen homogenen Bestrahlung innerhalb des Zielvolumens, können im Zusammenspiel mit Techniken wie der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) und der Tomotherapie durch die Bestrahlungsplanung auf Grundlage von quantitativen parametrischen Bildern, welche die biologischen Gegebenheiten widerspie-



**Abbildung 5.** Der Sauerstoffeffekt. Dargestellt ist der Anteil der überlebenden Tumorzellen (Ordinatenachse) in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis (Abszissenachse) und des Sauerstoffgehalts (dargestellt durch unterschiedliche Markierungen). Die gefüllten Quadrate stellen den Bereich sauerstoffgesättigter Zellen dar (potentielle Infiltrationszone), die gefüllten Kreise und leeren Quadrate jenen der Zellen im aerobischen Gewebereich (potentielle Proliferationszone), und die Dreiecke stellen Messungen im anoxischen beziehungsweise hypoxischen Gewebereich dar, in dem mit hoher Wahrscheinlichkeit nekrotisierende Zellen vorliegen.<sup>83</sup>

geln, gezielt gewebespezifische inhomogene Dosispitzen im Tumorgewebe erzeugt werden<sup>84-86</sup>. Das lokal unterschiedlich auf Strahlung ansprechende Tumorgewebe kann durch eine voxelweise variierender Strahlungsintensität

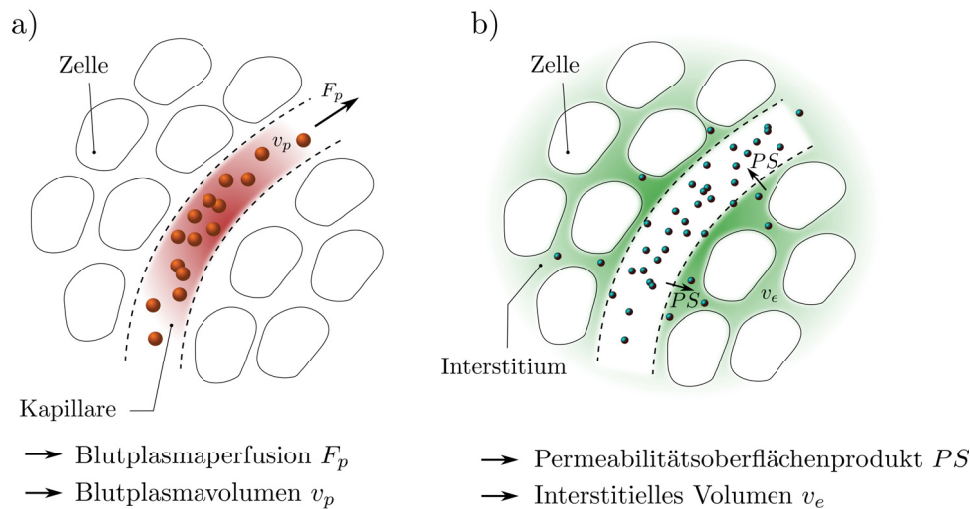


(*dose painting*) entsprechend der lokalen metabolischen Eigenschaften des Tumorgewebes optimal bestrahlt werden. Die maximal zulässige Strahlungsexposition kann durch diese Dosismodulation optimal ausgeschöpft werden<sup>8</sup>.

### 3.2 Kontrastmittel

Um verschiedene Magnetresonanzmessmethoden zur Bestimmung der unterschiedlichen Gewebeparameter zu validieren, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Kontrastmittel verwendet (siehe Abb. 6). Gadofosveset Trisodium (Handelsname: Ablavar oder Vasovist) wurde, basierend auf der Indikatorverdünnungstheorie<sup>87,88</sup>, als intravasculäres Kontrastmittel (Intravasculärkontrastmittel, engl. *blood pool contrast agent*, BPCA) verwendet für die Blutplasmavolumen- und Blutperfusionbestimmung (siehe Abb. 6a). Es ist ein klinisch zugelassenes MRT-Kontrastmittel auf Gadoliniumbasis, das aufgrund seiner reversiblen Bindung an endogenes menschliches Serumalbumin und wegen seiner hohen longitudinalen Relaxivität bei niedrigen magnetischen Feldern als intravasales Kontrastmittel verwendet wird<sup>89</sup>. Das Molekulargewicht des aktiven Kontrastmittel-Chelats ist 957 Da. Der Bindungsprozess mit Serumalbumin führt jedoch zu einer effektiven Erhöhung des Molekulargewichts auf 68 kDa und verleiht dem Kontrastmittel damit makromolekulare Extravasationseigenschaften<sup>89,90</sup>. Bei niedrigen Konzentrationen bindet 90% des Kontrastmittels an menschliches Serumalbumin<sup>91</sup>. Somit verbleibt es in der Anfangsphase seiner Verteilungsdynamik (innerhalb der ersten Minute) weitgehend im vaskulären Raum. In Blut von Hauschweinen beträgt die Bindung zu Albumin 83-87%, was den höchsten Wert im Vergleich zu anderen nicht-menschlichen Arten darstellt<sup>92</sup>. Albumingebundenes Gadofosveset Trisodium hat eine wesentlich höhere Relaxivität (in Blutplasma:  $19 \text{ L mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $1,5 \text{ T}$ ) als nicht gebundenes (in Wasser:  $5,2 \text{ L mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $1,5 \text{ T}$ )<sup>89,93</sup>. Daher ist die Extravasation von ungebundenem Gadofosveset Trisodium bei der Bestimmung von physiologischen Parametern unter Verwendung von BPCA-Methoden auf Grundlage von Daten der Relaxationsratenänderung vernachlässigbar.

Das niedermolekulare, schnell extravasierende Kontrastmittel (engl. *low-molecular-weight contrast agent*, LMCA) Gadotersäure (Gd-DOTA, Handelsname: Dotarem) wurde angewandt zur Bewertung von pharmakokinetischen Zwei-Regionen-Austauschmodellen, insbesondere im Zusammenhang der Messung des interstitiellen Volumens (siehe Abb. 6b). Gadotersäure ist ein klinisch zugelassenes und weit verbreitetes Kontrastmittel auf Gadoliniumbasis<sup>94</sup>. Es reichert sich in allen Organen außerhalb des zentralen Nervensystems an. Der hydrostatische Durchmesser eines Gadotersäuremoleküls



**Abbildung 6.** Symbolische Darstellung der Gewebeverteilung des a) an Serumalbumin bindenden, intravasalen Kontrastmittels Gadofosveset Trisodium und b) des niedermolekularen, schnell extravasierenden Kontrastmittels Gadotersäure.

beträgt etwa fünf Nanometer  $\text{nm}^{95}$  (siehe Seite 13, Durchlässigkeit der Kapillarwand), der eigentliche Moleküldurchmesser liegt bei  $0,9 \text{ nm}^{96}$ . Seine molare Masse beträgt etwa  $560 \text{ g/mol}$  ( $0,56 \text{ kDa}$ )<sup>97</sup>. Gadotersäure hat in Blutplasma eine Relaxivität von  $3,6 \text{ L mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $1,5\text{T}^{93}$ . In der anfänglichen Verteilungsphase breitet es sich in den intravaskulären Raum aus und geht dann schnell in den interstitiellen Raum über, verbleibt jedoch außerhalb der Gewebezellen<sup>94,97,98</sup>.

### 3.3 Pharmakokinetische Modellierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten pharmakokinetischen Modelle fußen auf der allgemeinen Theorie der Kontrastmitteldynamik in linearen und stationären Systemen<sup>7,99</sup>. Bei der gesamten hier dargestellten Modellierung wird angenommen, dass die Kontrastmittelmoleküle nicht in den Zellraum eindringen. Die Ausführungen in diesem Abschnitt sind zum Großteil orientiert an Arbeiten von Østergaard<sup>88</sup> und Sourbron<sup>7</sup>, in denen außerdem detaillierte formale Beschreibungen der Modelle, Lösungen der Systemgleichungen und ausführliche Vergleiche der Modelle untereinander und mit älteren, in der klinischen Praxis herkömmlicherweise verwendeten Modellen und Methoden beschrieben sind.

### Modellierung des Vaskularsystems

In diesem Unterabschnitt wird die Beschreibung eingeschränkt auf die Bewegung nicht diffundierbarer, das heißt, nicht über die Kapillarwand permeierbarer Intravasalkontrastmittel (BPCA)<sup>88</sup>. Die einzelnen BPCA-Moleküle des in eine Vene applizierten Bolus bewegen sich auf unterschiedlichen Pfaden durch die Vaskulatur. Ihre Durchgangszeiten (engl. *transit times*) haben deshalb eine Verteilung, die sowohl durch die Flusshöhe als auch durch die Struktur des Vaskularsystems bestimmt wird. Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Durchgangszeiten  $h(t)$  und die in einem Vollblutvolumenelement einer das betrachtete Gewebesystem versorgenden Arterie gemessenen arteriellen Eingangsfunktion  $c_a(t)$  (engl. *arterial input function*, AIF) bestimmen die Konzentration des Kontrastmittels am venösen Ausgang  $c_v(t)$  des betrachteten Bildvolumenelements (engl. *voxel of interest*, VOI)<sup>88</sup>:

$$c_v(t) = c_a(t) * h(t) = \int_0^t c_a(\tau)h(t - \tau) d\tau. \quad (3.1)$$

Die mittlere Transitzeit eines KM-Moleküls durch die betrachtete Vaskulatur (*MTT*) und die prozentuale Menge des intravaskulären KM im betrachteten VOI,  $v_b$ , werden folgendermaßen berechnet<sup>88</sup>:

$$MTT = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \tau h(\tau) d\tau}{\int_{-\infty}^{\infty} h(\tau) d\tau} = \frac{v_b}{F_p} \quad (3.2) \quad v_b = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} c_{\text{VOI}}(\tau) d\tau}{\int_{-\infty}^{\infty} c_a(\tau)h(t - \tau) d\tau} \quad (3.3)$$

Der Ausdruck  $c_{\text{VOI}}(t)$  bezeichnet hier den gemessenen Zeitverlauf der KM-Konzentration im VOI und  $F_p$  steht für die zugehörige Gewebeblutperfusion. Mit der Verteilung des Anteil des zum Zeitpunkt  $t$  noch in der Vaskulatur vorhandenen KM, ausgedrückt durch die Residuenfunktion  $R(t)$ , kann die Konzentration des KM im VOI folgendermaßen berechnet werden<sup>88</sup>:

$$R(t) = \left[ 1 - \int_0^t h(\tau) d\tau \right] \quad (3.4)$$

$$c_{\text{VOI}}(t) = F_p \cdot \int_0^t c_a(\tau)R(t - \tau) d\tau. \quad (3.5)$$

Linearkombinationen der Gleichungen 3.3, 3.2 und 3.5 wurden in Verbindung mit einer kompartmentellen Beschreibung der Subsysteme des Vaskularsystems,

$$R(t, MTT) = e^{-\frac{t}{MTT}}, \quad (3.6)$$

in unseren Arbeiten verwendet, um das Blutvolumen und die Blutperfusion des Vaskularsystems im betrachteten Gewebe durch numerische Entfaltung und Kurvenanpassung zu bestimmen (siehe Abb. 7c und 7h)<sup>88</sup>.

### Modelle des Kapillarbetts: Kompartiment und Pfropfenstrom

Mit dem Begriff Kompartiment ist in dieser Arbeit ein wohl durchmischter Raum gemeint, der einen physiologisch definierten Bereich des Gewebes darstellt, in dem die Kontrastmittelkonzentration als räumlich gleichförmig verteilt angenommen wird. Es wird bei dieser Art von Modell angenommen, dass sich das Kontrastmittel instantan homogen innerhalb eines Gewebesubsystems verteilt. Der Kontrastmittelausfluss eines Kompartiments zu einem Zeitpunkt  $t$  ist proportional zu der Konzentration des Kontrastmittels in dem Kompartiment zu diesem Zeitpunkt. Das Verteilungsvolumen des Kompartiments wird als zeitlich konstant angenommen<sup>7</sup>. Ein Multikompartimentmodell ist ein System aus mehreren interagierenden Kompartimenten, bei dem der Ausgang eines Kompartiments den Eingang eines anderen darstellt. Es wird in dieser Arbeit angenommen, dass die Kontrastmittelmoleküle innerhalb eines Kompartiments, und während des Austauschprozesses zwischen den Kompartimenten, keine chemischen Reaktionen durchlaufen.

In Abbildung 7 ist die Architektur eines kompartmentell modellierten Kapillarbetts mit einem Ausgang in das Interstitium dargestellt. Es besteht aus einem Blutplasmaraum mit dem Blutplasmavolumen  $v_p(t)$ , der die Kontrastmittelkonzentration des Blutplasmas  $c_p(t)$  enthält. Das Blutvolumen steht mit dem Blutplasmavolumen über den Gewebehämatokritwert in Beziehung:  $v_p = v_b \cdot (1 - \text{Hct}_t)$ ; für das Verhältnis der Kontrastmittelkonzentration des Plasmas zu der des Blutes gilt:  $c_p(t) = c_b / (1 - \text{Hct}_t)$ . Berechnet wird  $c_p(t)$  in diesem Modell durch die Plasmakonzentration  $c_a(t)$  im arteriellen Eingang, durch die Blutplasmaperfusion  $F_p$ , durch das Plasmavolumen  $v_p$  und das Permeabilitätsflächenprodukt  $PS$ .<sup>7</sup>

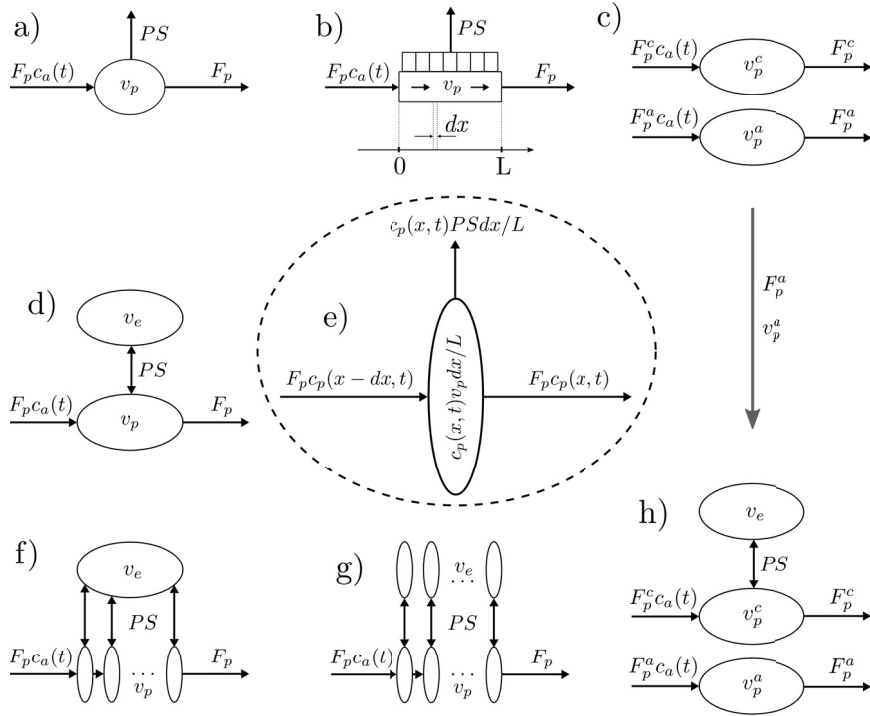
Die Permeabilität  $P$  der Kapillarwand ist der Ausfluss an Kontrastmittel pro Einheitsfläche und pro Einheitskontrastmittelkonzentration in der Umgebung nahe der Kapillarwand. Alle hier besprochenen Modelle nehmen die Konstanz von  $P$  entlang der gesamten Gefäßwand an. Somit ergibt sich die transendotheliale Durchlässigkeit  $PS$  aus dem Produkt der Gefäßoberfläche

$S$  mit der Gefäßwandpermeabilität  $P$ .<sup>7</sup>

Zur Modellierung des Kapillarbets wurden historisch bedingt unabhängig voneinander zwei verschiedene Ansätze entwickelt. Im ersten Ansatz wurde die kapilläre Vaskulatur als Kompartiment beschrieben, im anderen als Pfropfenstromgefäßsystem (engl. *plug flow*). Beide Modellarten legen die gleichen physiologischen Annahmen bezüglich des Kontrastmitteltransports durch die arteriellen Ein- und Ausgänge zugrunde. Der Unterschied besteht hinsichtlich der Verteilung des Kontrastmittels im betrachteten Gewebe. Die gekoppelten Differentialgleichungen der unten beschriebenen Zwei-Regionen-Modelle für  $c_p(t)$  und für die Konzentration am Ausgang des Interstitiums,  $c_e(t)$ , können mit Hilfe der Laplacetransformation gelöst werden. Die Lösung des Gleichungssystems in der Laplacedomäne und die anschließende Rücktransformation in die Zeitdomäne ergeben die Residuenfunktion des jeweiligen Modells. Die expliziten mathematischen Ausdrücke für  $R(t)$  sind in einem Übersichtsartikel von Sourbron et al. dargestellt<sup>7</sup>. Alle Residuenkurven haben eine biexponentielle Charakteristik und werden vollständig definiert durch die kapilläre Transitzeit  $T_c = v_p/F_p$ , die interstitielle Transitzeit  $T_e = v_e/PS$  und die Transitzeit des kombinierten Systems  $T = (v_p + v_e)/F_p$ . Wichtig anzumerken ist, dass alle hier beschriebenen Modelle mit der Perfusion  $F_p$  die nutritive, sich also mit dem extravaskulären, extrazellulären Raum in Austausch befindliche, kapilläre Gewebedurchblutung meinen.<sup>7</sup>

Abbildung 7a skizziert die Architektur eines Kompartimentmodells und Abb. 7b eines Pfropfenstrommodells des Kapillarbets. Es wird in beiden Fällen angenommen, dass das Kapillarbett Blutplasma mit der Konzentration  $c_p(t)$  enthält. Diese Konzentration wird in beiden Modellen durch die Plasmakonzentration am arteriellen Eingang  $c_a(t)$  und die venöse Ausflussrate der Blutplasmaperfusion  $F_p$ , deren Produkt die arterielle Einstromungsrate bildet, sowie das Plasmavolumen  $v_p$  und die Rate der transendothelialen Durchlässigkeit  $PS$  beschrieben. In Abbildung 7b ist außerdem der Formalismus zur Herleitung der Massenerhaltungsgleichungen 3.9 und 3.11 in einer Pfropfenstromkapillaren grafisch angedeutet, bei dem die Kapillare der Länge  $L$  in infinitesimale Abschnitte der Dicke  $dx$  eingeteilt wird. Die Annahme, dass die Konzentration  $c_p(x, t)$  innerhalb eines Abschnittes an der Position  $x$  konstant ist, reduziert das Pfropfenstromsystem zu einer Kette von infinitesimalen Kompartimenten (Abbildung 7f und g). Ein Detailausschnitt eines solchen kompartimentellen Unterelementes mit der enthaltenen Kontrastmittelkonzentration und deren Eingangs- und Ausgangsraten ist in Abbildung 7e gezeigt.

Abbildung 7c beschreibt ein Modell mit zwei parallelen rein intravasalen



**Abbildung 7.** Dargestellt in a) ist die Architektur eines Kompartimentmodells und in b) eines Pfropfenstrommodells des Kapillarbetts. Wege für möglichen Kontrastmittelaustausch sind mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Abbildung c) beschreibt ein Modell mit zwei parallelen rein intravasalen Kompartimenten: dem nutritiven kapillären Kompartiment und dem nicht-nutritiven AVA-Kompartiment. In d) ist das Zwei-Kompartiment-Austauschmodell (2CXM), in f) das Gewebehomogenitätsmodell (THM) und in g) das Verteilungsparametermodell (DPM) dargestellt. Ein Detailausschnitt eines kompartimentellen Unterelementes der Vaskulatur beider zuletzt genannten Modelle, die darin enthaltene Kontrastmittelkonzentration und deren Ein- und Ausgänge sind in Abbildung e) dargestellt. Abbildung h) zeigt eine Erweiterung des 2CXM um das AVA-Kompartiment aus Abbildung c) (E2CXM).<sup>7,100,101</sup>. Die Grafiken wurden entsprechenden Abbildungen in dem Artikel von Sourbron et al. nachgebildet.<sup>7</sup>

Kompartimenten, eines für die Blutplasmaperfusion  $F_p^c$  und das Blutplasmavolumen  $v_p^c$  des Kapillarbetts und eines für die entsprechenden Parameter  $F_p^a$  und  $v_p^a$  des nicht nutritiven AVA-Kompartiments (Zwei-Kompartiment-Intravasalraummodell, 2CBPM). Abbildung 7d, f und g skizzieren die drei in den Gleichungen 3.7 bis 3.11 beschriebenen Zwei-Regionen-Austauschmodelle. In Abb. 7d ist das Zwei-Kompartiment-Austauschmodell (2CXM), in Abb. 7f das Gewebehomogenitätsmodell (THM) und in Abb. 7g das Verteilungspara-

parametermodell (DPM) dargestellt. Jedes dieser drei Modelle enthält einen Plasmaraum (mit  $v_p$  gekennzeichnet) und einen Interstitialraum (mit  $v_e$  gekennzeichnet). Wege für möglichen Kontrastmittelaustausch sind mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Abb. 7h zeigt eine Erweiterung des 2CXM um das AVA-Kompartiment aus Abb. 7c. Die Information über die AVA-Parameter  $F_p^a$  und  $v_p^a$  wird aus dem 2CBPM übernommen.<sup>7,100,101</sup>

Das **Zwei-Kompartiment-Austauschmodell** (*2-compartment exchange model*, 2CXM) geht von einer kompartmentellen Natur sowohl des Plasmaraumes als auch des Interstitiums aus (Abb. 7d). Das Massengleichgewicht bei der zeitlichen Änderung der Konzentration im Plasmakompartiment wird durch den eingehenden arteriellen Fluss  $F_p c_a(t)$ , die transendotheliale Leckage  $PS c_p(t)$ , den transendothelialen Ausfluss  $PS c_e(t)$  und den venösen Ausfluss  $F_p c_p(t)$  beschrieben. Die zeitliche Änderung der Konzentration im interstitiellen Kompartiment wird bestimmt durch den eingehenden Kontrastmittelstrom  $PS c_p(t)$  und den Ausgangsstrom  $PS c_e(t)$ <sup>7</sup>:

$$v_p \frac{dc_p}{dt}(t) = F_p c_a(t) - F_p c_p(t) + PS c_e(t) - PS c_p(t) \quad (3.7)$$

$$v_e \frac{dc_e}{dt}(t) = PS c_p(t) - PS c_e(t). \quad (3.8)$$

Das Pfropfenstrommodell ist eine Vorstellung der Verteilung des Kontrastmittels im Vaskularbett, bei der die konvektive Flussdynamik der Blutbestandteile innerhalb ausschließlich röhrenförmiger Kapillaren mit exakt der gleichen Geschwindigkeit beschrieben wird (Abb. 7b). Es werden weiterhin die Annahmen getroffen, dass die Konzentration der Kontrastmittelmoleküle sich in radiale Richtung, also senkrecht zur Kapillare, nicht ändert, so dass die Kontrastmittelkonzentration  $c_p(x, t)$  sich nur in einer Dimension ändert und dass die mittlere Konzentration am venösen Ausgang den Wert  $c_p(L, t)$  hat. Die Konzentration  $c_p(t)$  errechnet sich aus der Mittelung der pfadabhängigen Konzentration  $c_p(x, t)$  über die Länge L. Da es keine radialen Änderungen der Konzentration gibt, ist der Leckagefluss durch die Endothelwand wie beim Kompartimentmodell  $PS c_p(t)$ . Um eine eindeutige Lösung für dieses Modell zu erhalten, muss auch die Massenerhaltung an jedem Punkt  $x$  der röhrenartigen Kapillare lokal beschrieben werden. Dazu stellt man sich das Kapillarröhrchen in dünne Scheibchen mit einer Dicke  $dx$  unterteilt vor (Abb. 7b). Da die Kapillaren in radialer Richtung als wohldurchmischt definiert sind, kann man die Konzentration innerhalb einer dieser Scheibchen als gleichmäßig betrachten und annehmen, dass sich solch eine infinitesimale Untersektion wie ein Kompartiment mit der Konzentration

on  $c_p(x, t)$  verhält. Die Kontrastmittelverteilung des Pfropfenstrommodells entspricht somit einer Kette identischer, infinitesimaler Kompartimente. Jede der Untersektionen hat das Volumen  $v_p dx L$ , die Oberfläche  $S dx L$ , die Gewebekonzentration  $c_p(x, t) v_p dx / L$ , den Leckagefluss durch die Endothelwand  $c_p(x, t) v_p dx / L$ , den eingehenden Kontrastmittelstrom vom jeweils vorherigen infinitesimalen Element  $F_p c_p(x - dx, t)$  und der ausgehende Strom der Sektion an Punkt  $x$  ist  $F_p c_p(x - dx, t)$  (Abb. 7d).<sup>7</sup>

Eine Anwendung des Pfropfenstromformalismus ist das **Gewebehomogenitätsmodell** (engl. *tissue homogeneity model*, THM, mit „Gewebe“ ist dabei das Interstitium gemeint)<sup>102</sup>. Es beschreibt das Kapillarbett als Pfropfenstromsystem und das Interstitium als Kompartiment (Abb. 7e). Der Leckagestrom ist damit wie beim 2CXM  $PS c_p(t)$  und die Massenerhaltung für das interstitielle System bleibt ebenfalls identisch (Gl. 3.10)<sup>7</sup>. Die Plasmodellgleichung (Gl. 3.9) kann hergeleitet werden durch die Betrachtung eines Elementes  $dx$  der Kapillare, an welcher aufgrund der Gleichverteilung des interstitiellen Flusses  $PS c_e(t)$  der eingehende Kontrastmittelstrom  $PS c_e(t) dx / L$  vorliegt. Zusammen mit den Überlegungen des letzten Absatzes ergibt sich für den Grenzwert eines infinitesimal kleinen Elementes  $dx$  folgende partielle Differentialgleichung zur Beschreibung des Kapillarsystems<sup>7</sup>:

$$\frac{v_p}{L} \frac{\partial c_p}{\partial t}(x, t) = -F_p \frac{\partial c_p}{\partial x}(t) + \frac{PS}{L} c_e(t) - \frac{PS}{L} c_p(x, t) \quad (3.9)$$

$$v_e \frac{dc_e}{dt}(t) = PS c_p(t) - PS c_e(t). \quad (3.10)$$

Ein Modell, das sowohl das Kapillarbett als auch das Interstitium als ein Aneinanderreihung infinitesimaler Kompartimente beschreibt, ist das sogenannte **Verteilte-Parameter-Modell** oder Verteilungsparametermodell (engl. *distributed parameter model*, DPM)<sup>7,103</sup>. Hinsichtlich der Benennung ist anzumerken, dass auch das THM in Unterscheidung zu den kompartmentellen Modellen zu der Klasse der Verteilungsmodelle zählt (engl. *distributed models*). Bei dem DPM befinden sich die interstitiellen Untereinheiten jedoch nur mit Kapillaren ihrer direkten Umgebung in wechselseitigem Kontrastmittelaustausch (Abb. 7f). Somit hängen sowohl die Kontrastmittelkonzentrationen des Plasmas  $c_p(x, t)$  als auch des Interstitiums  $c_e(x, t)$  von der Position  $x$  ab, jedoch findet in axialer Richtung des Interstitiums keine Kontrastmitteldiffusion statt. Jedes Untersegment des Interstitiums teilt sich eine Fläche  $S dx / L$  mit dem zugeordneten Kapillarbettsegment und der entsprechende Rückfluss lässt sich darstellen als  $c_e(x, t) PS dx / L$ .

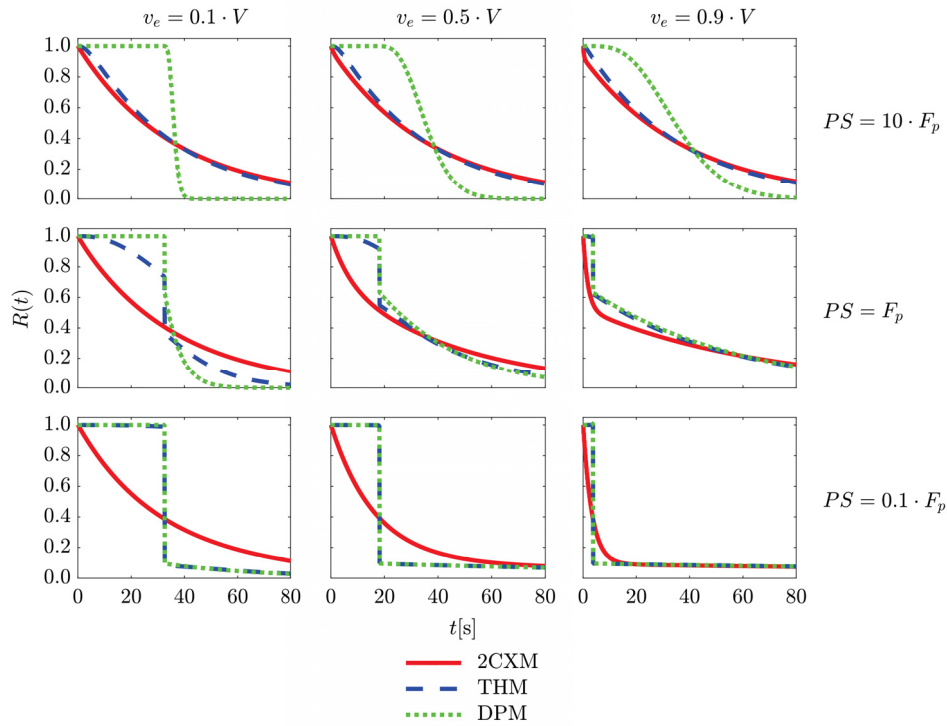


Äquivalente Überlegungen für die anderen Transportprozesse führen auf die beiden partiellen Differentialgleichungen für das DPM<sup>7,103</sup>:

$$\frac{v_p}{L} \frac{\partial c_p}{\partial t}(x, t) = -F_p \frac{\partial c_p}{\partial x}(x, t) + \frac{PS}{L} c_e(x, t) - \frac{PS}{L} c_p(x, t) \quad (3.11)$$

$$v_e \frac{\partial c_e}{\partial t}(x, t) = \frac{PS}{L} c_p(x, t) - \frac{PS}{L} c_e(x, t). \quad (3.12)$$

Explizite Lösungen für die Gleichungssysteme der drei vorgestellten Modelle für verbundene Systeme sind dargestellt in dem ausführlichen Übersichtsartikel von Sourbron et. al von 2012<sup>7</sup>. In Abbildung 8 sind graphische Darstellungen der Residuenkurven der drei Modelle für verschiedene Parameterraumbereiche gezeigt. Alle drei Modelle hängen eindeutig von den vier Parametern  $v_p$ ,  $v_e$ ,  $F_p$  und  $PS$  ab. Für die Lösungen der beiden Pfropfenstrommodelle ist deutlich zu erkennen, dass sie in weiten Teilen des Parameterraumes einen unnatürlich anmutenden Verlauf haben, bei dem die Wahrscheinlichkeit für den Aufenthalt aller Kontrastmittelmoleküle in dem betrachteten Gewebereich bis zu einem festen Zeitpunkt sehr nahe bei 1 liegt und dann von dort abrupt auf einen sehr viel niedrigeren Aufenthaltswahrscheinlichkeitswert abfällt. Eine Ausnahme bildet die obere Reihe der Darstellung, also die Fälle hoher Permeabilität. Dort verhält sich das THM sehr ähnlich wie das 2CXM. Für den zweiten und dritten Eintrag in der oberen Reihe (hohe Permeabilität und mittlerer beziehungsweise sehr hoher interstitieller Volumenanteil) zeigt auch das DPM einen glatteren Verlauf, mit S-förmiger, nur allmählich abfallender Aufenthaltswahrscheinlichkeitscharakteristik. Die Residuenkurven des Zwei-Kompartiment-Austauschmodells haben hingegen für alle Parameterbereiche einen sowohl glatten als auch kontinuierlich abfallenden Verlauf.<sup>7,101</sup>



**Abbildung 8.** Grafische Darstellung der Residuenfunktionen des 2CXM (durchgezogene rote Linie), des THM (blaue Strichlinie) und DPM (grüne Punktlinie) für  $F_p = 0.6 \text{ mL/min/mL}$  und  $V = v_e + v_p = 0.3 \text{ mL/mL}$  entsprechend.<sup>7</sup> Die Ergebnisse sind für verschiedene Regime des Parameterraumes dargestellt und zeigen den Bereich des langsamen Kontrastmittelaustausches (unterste Zeile) bis zum schnellen Austausch (oberste Reihe) und von hoher (linke Spalte) bis geringer Vaskularisation (rechte Spalte). Da  $F_p$  und  $V$  globale Skalierungsparameter sind, entspricht jede Änderung ihrer Werte einer Änderung der Zeitachseinheiten. Die Grafik wurde entsprechend einer Abbildung in dem Artikel von Sourbron et al. nachgebildet.<sup>7</sup>

## Kapitel 4

# Kumulativer Teil

Es wurden für alle Hauptstudien der vorliegenden Arbeit *in-vivo*-Untersuchungen der Skelettmuskulatur von weiblichen Hausschweinen mit einem Gewicht von etwa 60 kg vorgenommen<sup>104</sup>. Es sollte dadurch ein einer klinischen Untersuchungssituation vergleichbarer experimenteller Aufbau generiert werden. Das Schwein ist ein biomedizinisch besonders gut geeignetes Modell für die Untersuchung der Pharmakokinetik der menschlichen Mikrovaskulatur, da es von allen gängigen Versuchstieren die dem Menschen ähnlichsten kardiovaskulären Eigenschaften besitzt; das Herz des Schweines hat eine dem menschlichen Herzen ähnliche Größe, der koronare Fluss und die myokardiale Kontraktilität sind ebenfalls in einer ähnlichen Größenordnung<sup>105,106</sup>.

Die DCE-MRT-Messungen für die pharmakokinetische Analyse wurden nacheinander mit einem schnell extravasierenden, niedermolekularen Kontrastmittel und einem an Serumalbumin bindenden, intravasalen Kontrastmittel durchgeführt. Es wurde eine Gradientenechosequenz mit geringer Repetitions- und Echozeit und mit *k*-Raum-Unterabtastung eingesetzt, um den gesamten Hinterleib und den Bauchraum des Schweines in genügend hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erfassen zu können. Referenzmessungen des Flusses erfolgten mit der etablierten Goldstandardmethode einer Dopplerultraschallflusssonde an der Femoralarterie. Der von der Femoralarterie versorgte Gewebebereich wurde für die Extraktion der Gewebekurven in sieben Untersegmente (engl. *regions of interest*, ROIs) unterteilt und die Gewebekurven aller Voxel innerhalb dieser Einzelgebiete gemittelt, um das Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis (CNR) in einen auswertbaren Bereich anzuheben.

Es wurden insgesamt vier Studien für verschiedene Methodiken zur Messung verschiedener pharmakokinetischer Modellparameter angefertigt. Die

erste Studie beschäftigte sich mit der Validierung der Blutperfusionsmessung auf Grundlage von DCE-MRT-Bildgebung mit intravasalem Kontrastmittel und der Verwendung verschiedener kompartimentbasierter pharmakokinetischer Modelle. Mit der zweiten Studie wurden pharmakokinetische DCE-MRT-Messungen des interstitiellen Volumens auf Grundlage von unter Einsatz eines niedermolekularen Kontrastmittels generierten Bilddaten vorgenommen. Diese wurden mit Hilfe von histologischen Gewebemessungen validiert. Die dritte Studie untersuchte die Validierbarkeit von DCE-MRT-Messungen des Blutvolumens mit niedermolekularen und intravasalen Kontrastmitteln. Es wurden verschiedene pharmakokinetische Auswertungsmethoden untereinander und mit histologischen Gewebeanalysen verglichen. Die letzte Studie evaluierte die Tauglichkeit von in der Literatur<sup>7</sup> beschriebenen, in der klinischen Praxis bisher jedoch selten zum Einsatz gebrachten, quantitativen pharmakokinetischen Modellen für die Dynamik niedermolekularer Kontrastmittel zur Messung der Blutperfusion.

## 4.1 Validierung der Perfusionmessungen

Der Inhalt dieses Abschnitts wurde veröffentlicht in:

Hindel, Stefan; Sauerbrey, Anika; Maaß, Marc; Maderwald, Stefan; Schlamann, Marc; Lüdemann, Lutz. Validation of Perfusion Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Using a Blood Pool Contrast Agent in Skeletal Swine Muscle. *PloS One*, 10(6):e0128060, Jun 2015.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128060>

DOI: 10.1371/journal.pone.0128060

### Zusammenfassung des Inhalts der Studie

In dieser Studie wurde mit einem an Serumalbumin bindenden und somit in der ersten Minute nach der Injektion näherungsweise intravasal verbleibenden Kontrastmittel, einer  $k$ -Raum unterabtastenden Gradientenechosequenz und mit pharmakokinetischen Ein- und Zwei-Kompartimentmodellen die Perfusion in der Hinterlaufmuskulatur von Schweinen gemessen. Das Zwei-Kompartiment-Modell berücksichtigte parallel zum Kapillarbett verlaufende nicht-nutritive AVA-Durchblutung und bestand dementsprechend aus einem parallel zum kapillären Kompartiment angeordneten arteriolen Kompartiment (siehe Abschnitt 3.3). Die Gewebedurchblutung des Hinterlaufes wurde für alle Messungen über Adenosinadministration in die Femoralarterie bis zum 4,5-fachen gesteigert. Mit dieser Technik sollte durch Steigerung der AVA-Durchblutung im gesunden Gewebe der pathologische Fall der AVM-Durchblutung des tumorösen Falls simuliert werden. Zur Goldstandardreferenzblutflussmessung wurde eine Dopplerultraschallflusssonde an der Femoralarterie fixiert. Für jede der jeweils drei Messungen in sieben Schweinen wurden die zur Kontrastmittelkonzentration direkt proportionale T1-Relaxationsratenänderung in sieben Untersegmenten des Hinterlaufes als Mittelwert aller Voxel extrahiert. Bei der pharmakokinetischen Modellierung wurde die Bolusankunftszeitverzögerung zwischen Perfusionsmessgebiet (Segment des Hinterlaufgewebes) und Messgebiet der arteriellen Eingangsfunktion (Vollblutvoxel im Bereich der abdominalen Aorta) und die während dieses Weges zurückgelegte Bolusdispersion als Anpassungsparameter berücksichtigt. Mit dem F-Test wurde nach der Kurvenanpassung beider Modelle für jede Messung in jedem Gewebe-ROI entschie-

den, ob in Anbetracht der Anzahl der Anpassungsparameter und der Anpassungsqualität die Ergebnisse des einfacheren Ein-Kompartiment-Modells oder des höherparametrischen Zwei-Kompartiment-Modells verwendet werden sollen. Die Ergebnisse zeigten, dass auch bei Berücksichtigung der arteriellen Bolusdispersion das Ein-Kompartimentmodell ( $r = 0,51$ ;  $P = 0,02$ ) wesentlich schlechtere Übereinstimmungen mit den Referenzblutflusswerten zeigte als die Kombination beider Modelle über die F-Test-Selektion ( $r = 0,89$ ;  $P < 0,001$ ). In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderen Studien konnte eine große Heterogenität des Ansprechens auf exogene Adenosinabgabe für die verschiedenen Gewebereiche beobachtet werden<sup>25</sup>. Es wurde nur eine geringe Durchblutungssteigerung von 0,1 mit dem kapillären Kompartiment gemessen. Der Großteil der Blutflusssteigerung wurde unserem Modell entsprechend durch den AVA-Blutfluss hervorgerufen (Steigung der Regressionsgeraden: 1,1). Es wurde eine normalisierte arterielle Eingangsfunktion (AIF) berechnet, indem für jede Blutflussmessung, die individuelle AIF-Kurvenhöhe durch die gesamte mittlere AIF-Kurvenhöhe dividiert wurde. Diese Korrektur führte zu einer wesentlichen Erhöhung der Korrelation (unkorrigiert:  $r = 0,69$ ;  $P < 0,001$ ) und einer Verringerung des y-Achsen-Versatzes (259 statt 337 mL/min). Die schlechteren Ergebnisse, die ohne Korrektur erhalten wurden, entstanden durch eine fehlerhafte AIF-Bolusdispersionskorrektur für das kapilläre Kompartiment. Die Dispersionszeiten lagen teilweise unterhalb von Zeitwerten, die der Hälfte der Zeitauflösung entsprachen, was zu signifikanten Bestimmungsunschärfen führte.

RESEARCH ARTICLE

# Validation of Perfusion Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Using a Blood Pool Contrast Agent in Skeletal Swine Muscle

Stefan Hindel<sup>1\*</sup>, Anika Sauerbrey<sup>1</sup>, Marc Maaß<sup>2</sup>, Stefan Maderwald<sup>3</sup>, Marc Schlamann<sup>4</sup>, Lutz Lüdemann<sup>1</sup>

**1** Department of Radiotherapy, Medical Physics, University Hospital Essen, Essen, North Rhine-Westphalia, Germany, **2** Department of General and Visceral Surgery at Evangelical Hospital Wesel, Wesel, North Rhine-Westphalia, Germany, **3** Erwin L. Hahn Institute for Magnetic Resonance Imaging, Essen, North Rhine-Westphalia, Germany, **4** Department of Diagnostic and Interventional Radiology and Neuroradiology, University Hospital Essen, Essen, North Rhine-Westphalia, Germany

\* [stefan.hindel@uni-due.de](mailto:stefan.hindel@uni-due.de)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Hindel S, Sauerbrey A, Maaß M, Maderwald S, Schlamann M, Lüdemann L (2015) Validation of Perfusion Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Using a Blood Pool Contrast Agent in Skeletal Swine Muscle. PLoS ONE 10(6): e0128060. doi:10.1371/journal.pone.0128060

**Academic Editor:** Andreas-Claudius Hoffmann, West German Cancer Center, GERMANY

**Received:** January 22, 2015

**Accepted:** April 23, 2015

**Published:** June 10, 2015

**Copyright:** © 2015 Hindel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All data files are available from the Dryad database (doi:10.5061/dryad.6pr21).

**Funding:** This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, <http://www.dfg.de/>) grant number LU 844/8-1 to LL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

The purpose of our study was to validate perfusion quantification in a low-perfused tissue by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) with shared k-space sampling using a blood pool contrast agent. Perfusion measurements were performed in a total of seven female pigs. An ultrasonic Doppler probe was attached to the right femoral artery to determine total flow in the hind leg musculature. The femoral artery was catheterized for continuous local administration of adenosine to increase blood flow up to four times the baseline level. Three different stable perfusion levels were induced. The MR protocol included a 3D gradient-echo sequence with a temporal resolution of approximately 1.5 seconds. Before each dynamic sequence, static MR images were acquired with flip angles of 5°, 10°, 20°, and 30°. Both static and dynamic images were used to generate relaxation rate and baseline magnetization maps with a flip angle method. 0.1 mL/kg body weight of blood pool contrast medium was injected via a central venous catheter at a flow rate of 5 mL/s. The right hind leg was segmented in 3D into medial, cranial, lateral, and pelvic thigh muscles, lower leg, bones, skin, and fat. The arterial input function (AIF) was measured in the aorta. Perfusion of the different anatomic regions was calculated using a one- and a two-compartment model with delay- and dispersion-corrected AIFs. The F-test for model comparison was used to decide whether to use the results of the one- or two-compartment model fit. Total flow was calculated by integrating volume-weighted perfusion values over the whole measured region. The resulting values of delay, dispersion, blood volume, mean transit time, and flow were all in physiologically and physically reasonable ranges. In 107 of 160 ROIs, the blood signal was separated, using a two-compartment model, into a capillary and an arteriolar signal contribution, decided by the F-test. Overall flow in hind leg muscles,

as measured by the ultrasound probe, highly correlated with total flow determined by MRI,  $R = 0.89$  and  $P = 10^{-7}$ . Linear regression yielded a slope of 1.2 and a y-axis intercept of 259 mL/min. The mean total volume of the investigated muscle tissue corresponds to an offset perfusion of 4.7 mL/(min · 100cm<sup>3</sup>). The DCE-MRI technique presented here uses a blood pool contrast medium in combination with a two-compartment tracer kinetic model and allows absolute quantification of low-perfused non-cerebral organs such as muscles.

## Introduction

Solid tumors are characterized by a heterogeneous distribution of blood flow with cells that are located far from a functional blood vessel having significantly lower oxygen concentrations than normal tissue [1]. This hypoxia represents a significant barrier to effective radiotherapy. Since hypoxic tumor cells remain clonogenic, their resistance to treatment strongly influences the outcome of radiotherapy [2]. Tumors also often show acidity in low-flow regions. Hypoxic-acidic regions may stimulate progression to a more metastatic phenotype. On the other hand, in normal tissues, hypoxia and acidity also induce angiogenesis, which is expected to improve perfusion [3, 4].

Worldwide, breast cancer is the most common cancer in women, accounting for 25% of all cases [5]. Almost invariably, human breast tumors contain regions of hypoxia [1], and 90% of breast cancer deaths are the result of metastasis [1, 6]. Prostate cancer is the second most common cause of cancer and the fifth leading cause of cancer-related death in men worldwide [7]. Hypoxia may be a reason why even optimal radiochemotherapy often fails to achieve local control of advanced head and neck cancer [8, 9]. Hypoxia is also a typical feature of prostate cancer [10]. It has been shown that local dose escalation may improve the outcome of radiotherapy in patients with hypoxic prostate cancer [11]. The proportion of hypoxic tissue is inherently coupled to oxygen supply or tissue perfusion. The degree of perfusion allows to quantify the hypoxic tissue fraction [12].

Assuming the density of mammalian skeletal muscle tissue to be about 1.06 g/mL [13] Wilson et al. determined perfusion in the breast to be around 30 mL/(min·100cm<sup>3</sup>) [14]. Average perfusion in normal prostate tissue is 22.2 mL/(min·100cm<sup>3</sup>) vs. 28.8 mL/(min·100cm<sup>3</sup>) in benign prostate hyperplasia [10]. Perfusion in prostate cancer is approximately three times higher than in normal prostate tissue (mean: 60 mL/(min·100cm<sup>3</sup>)) and is subject to pronounced intra- and inter-tumor variability [10]. Most reviews on skeletal muscle blood flow indicate that maximum perfusion in mammalian skeletal muscle is in the range of 48 mL/(s·cm<sup>3</sup>)–480 mL/(min·100cm<sup>3</sup>) [15]. Perfusion in normal mammalian skeletal muscle is approx. 1 to 21 mL/(min·100cm<sup>3</sup>) [16]. To use dose painting for prescribing a nonuniform radiation dose to a tumor, it is necessary to quantitatively determine tumor oxygenation with high spatial resolution using imaging techniques.

With its excellent soft tissue contrast and high spatial resolution, magnetic resonance imaging (MRI) reliably distinguishes different soft tissues from each other. Additionally, dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) provides information on tumor perfusion. So far, however, dynamic MRI has mainly been used for quantifying perfusion in highly perfused organs such as the heart, the brain, the kidneys, and the liver. Particularly quantification of blood flow in the highly perfused brain is easier to accomplish because the blood-brain barrier eliminates problems such as truncation errors caused by extravasation of the clinically widely used low-molecular-weight contrast agents. Sourbron and Buckley [17] suggest that perfusion



quantification in nonbrain tissues is easier to accomplish with use of intravascular indicators. To the best of our knowledge, there is only one DCE-MRI study that uses a non-imaging technique to validate blood flow in highly-perfused tissue [18].

In areas of low perfusion, more parameters including delay and dispersion may affect perfusion estimates compared with highly perfused tissues [19–23]. Since the use of an intravascular tracer instead of a low-molecular-weight tracer reduces the number of model parameters necessary to assess local perfusion, a more reliable noninvasive method for absolute quantification of blood flow in low-perfusion tissues can be established if an intravascular contrast medium (CM) is used.

The variability of tissue perfusion underlines the importance of validating methods for blood flow quantification at different flow levels and to specifically test such methods in low-flow organs and tissues. In the present study, the skeletal hind leg musculature of swine was used as a general model for low-flow tissues. Thus, the aim of the present study is to suggest a highly accurate method for measuring perfusion minimally invasively in low-perfusion organs such as breast, prostate, and skeletal muscle. To the best of our knowledge, this is the first DCE-MRI perfusion validation study that uses an independent nonimaging-based technique for comparison in a low-perfused tissue.

## Materials and Methods

### Study Subjects

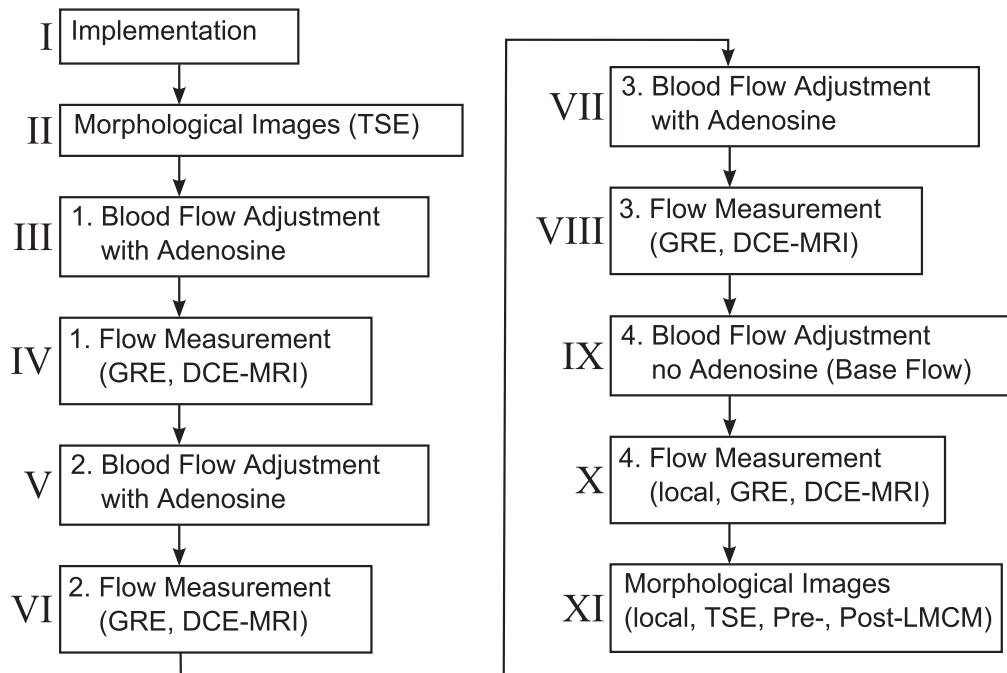
To provide a realistic setting for clinical applications we chose pigs of similar body size as humans. A total of 13 adult pigs were sacrificed for our study (German Landrace or hybrid form; age, approximately 20 weeks; body weight, 56 to 67 kg; no food restriction). In six pigs, the surgical technique and the adenosine dose (Adenosin Life Medical, 5 mg/mL, Carinopharm, Germany) response for flow enhancement were established and optimized, and the MRI sequences and the acquisition protocol were optimized for perfusion and anatomic imaging. In these preliminary experiments, we identified the adenosine doses needed to achieve three different target levels of stable perfusion. These adenosine doses were set individually for each pig and ranged from 0.3 to 6.25  $\mu\text{Mol}/\text{min}$ . In seven pigs, flow measurements were carried out in the MRI scanner. The pigs were not fed the night before the study. For more details about the surgical technique and the adenosine dose response see [24]. The animal study was approved by the Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (approval number: 84-02.04.2012.A208) and all experiments were performed in accordance with the regulations of the German animal protection law. At the end of each experiment, the pigs were sacrificed under a higher level of anesthesia by the injection of T61 (0.3 mL/kg).

### Surgical Technique

Premedication of the pigs was done by intramuscular injection of 30 mg/kg ketamine (ketamine 10%, Ceva Tiergesundheit GmbH, Germany) for alleviation of potential pain, 2 mg/kg azaperone (Stresnil Janssen-Cilag GmbH, Germany) for suppression of nausea and for sedation, and 0.02–0.05 mg/kg atropine sulfate (Atropinsulfat, B. Braun Melsungen AG, Germany) for reduction of salivation, inhibition of gastrointestinal activity, and for relaxation of smooth muscles.

The experimental workflow is presented in Fig 1. About thirty minutes after premedication, a peripheral 20-G venous catheter was placed in an ear vein to start total intravenous (IV) anesthesia. For this purpose, an infusion pump was used to inject 4–7 mg/kg/h propofol (Propofol-ratiopharm, Ratiopharm, Germany) for regulated anesthesia, 0.1–0.5 mg/kg/h midazolam (midazolam injection solution 0.5%, Germany) for anxiety reduction, central muscle

## Workflow



**Fig 1. Exemplary workflow for perfusion measurement in a single swine.** Exemplary workflow for perfusion measurement in a single swine.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g001

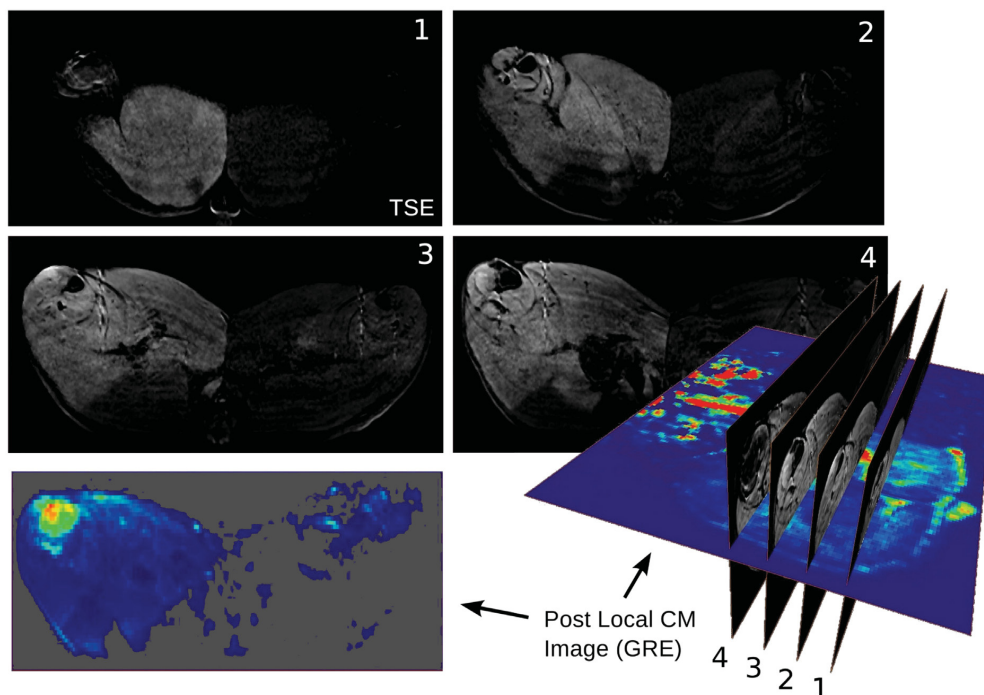
relaxation, and sedation, and 0.0015 mg/kg/h fentanyl (fentanyl citrate solution 3.925 mL/50 mL, Germany) for pain relief. A tracheal tube was inserted into the pig's throat (Hi-Contour cuffed tracheal tube, ID 8.0, Mallinckrodt, Ireland), and the pig was ventilated with a respiratory device (Fabius, Draeger, Germany).

To create a setting most similar to the potential clinical application in human patients, a central venous catheter (3-Lumen-ZVK-Set, ARROWg+ and Blue, Arrow, Germany) was placed in the jugular vein on the right side of the neck for systemic CM administration (see Fig 1.I). Subsequently one of the femoral arteries was exposed, preferably the right one. The femoral artery was catheterized proximally using the Seldinger technique to enable local administration of adenosine or CM. The metal-free, MRI-compatible catheter (Arterial Leader Cath, Vygon, France) was advanced proximally and fixed with several sutures. Distal to the catheter, an ultrasound (US) flow probe (T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) was implanted around the femoral artery to measure blood flow invasively. The US probe was also fixed with sutures. The cable of the probe was led out of the wound in a direct way by tunneling of the subcutaneous tissue [24].

### MRI Technique

Heart rate and oxygen saturation were monitored with an MRI-compatible monitoring device (Veris, Medrad, Germany). The pig was placed in the supine position on the scanner table. The table had an integrated 32-channel spine coil (Siemens Magnetom Aera 1.5 T, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). A surface coil (Tim body coil, 18 RF channels, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) was placed on the hind limbs. The blood flow measurement data from the US flow probe were continuously recorded using LabVIEW 2012 (National Instruments, Austin, Texas, USA), an A/D converter card (NI USB-6211, National Instruments, Austin, Texas, USA), and a standard netbook with Microsoft Windows XP (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

After implantation of the catheters and the Doppler flow probe, morphological images were acquired before CM administration (Figs 1.II and 2). To induce vasodilatation, an infusion pump was used to locally inject adenosine via the Seldinger catheter in the femoral artery. To achieve constant blood flow levels, the adenosine perfusion rate was individually adapted in all pigs during a perfusion measurement (Fig 1.III). Three perfusion measurements at different blood flow levels were performed per animal. To avoid systematic errors, the order of flow levels following adenosine administration was randomly changed. This was done to compensate for systematic errors due to signal saturation resulting from CM accumulation. After blood



**Fig 2. Pre- and post-LMCM difference images.** Pre- and post-LMCM difference images. T1-weighted TSE and GRE images were acquired before and after local injection of contrast agent into the right femoral artery. There is significant brightening of the area supplied by the femoral artery (represented here on the left side of the axial MR images of the pig's abdomen).

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g002

flow adjustment, the MRI blood flow measurement routine was performed (Fig 1.IV). Steady blood flow occurred after approximately five minutes. Two further flow adjustments and flow measurements with systemic CM administration were performed (Fig 1.V–1.VIII), followed by a perfusion measurement with local CM administration (Fig 1.IX and 1.X). After the perfusion measurements, the supply area of the femoral artery was determined by locally injecting CM into the femoral artery. Morphological turbo spin echo (TSE) and dynamic gradient echo (GRE) images were used to generate difference images (Figs 1.IX–1.XI and 2). The difference images were created by subtraction of the pre-CM images from the post CM-images. They were necessary to separate the region supplied by the femoral artery (where the adenosine-induced increase in blood flow takes place) from the rest of the organism.

The non-CM-enhanced T1-weighted morphological images with and without fat suppression were also acquired for direct orientation during the experiment (Fig 1.II). The protocol included an axial T1-weighted TSE sequence with fat suppression in the transverse plane that was acquired with the following parameters: repetition time, TR = 625 ms, echo time, TE = 12 ms, flip angle,  $\alpha = 150^\circ$ , and voxel size,  $0.9 \times 0.9 \times 7.0\text{mm}^3$ .

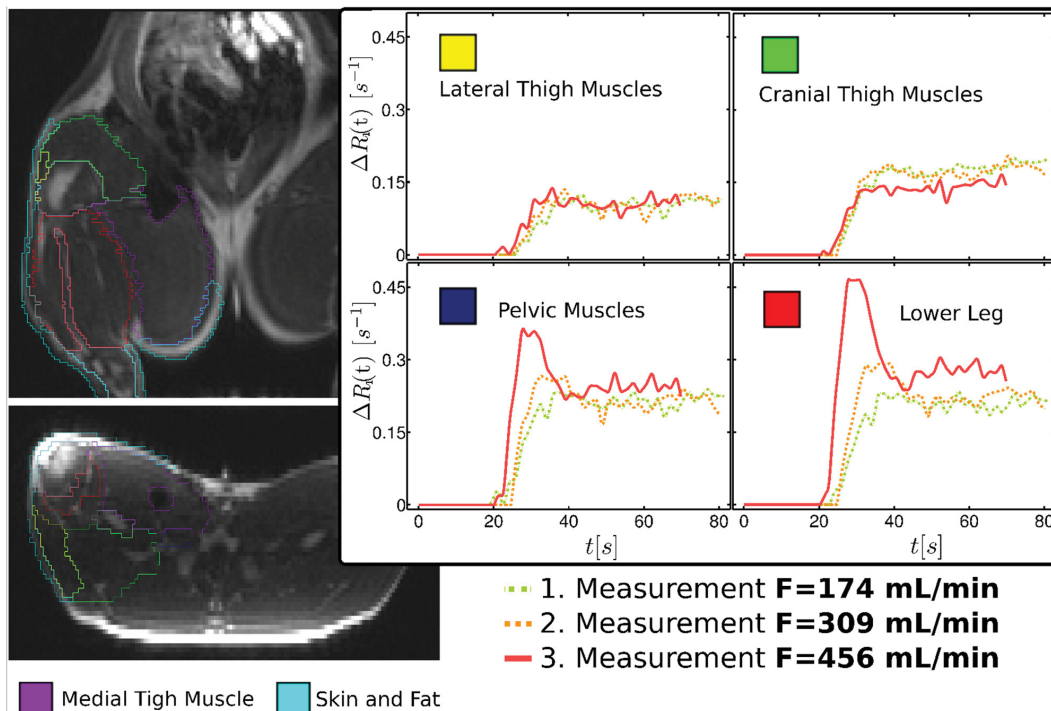
The perfusion protocols (Fig 1.IV, 1.VI, 1.VIII and 1.X) included 3D GRE sequences (TWIST, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) for estimation of baseline magnetization and relaxation rate using  $\alpha = 5^\circ, 10^\circ, 20^\circ$ , and  $30^\circ$  and the following parameters: TR = 2.69 ms, TE = 0.86 ms, voxel size of  $2.9 \times 2.9 \times 4.5\text{mm}^3$ ,  $160 \times 128 \times 48$  reconstruction matrix, frequency encoding in the axial direction, parallel imaging with GRAPPA with 32 central k-space lines and an acceleration factor of 6; central k-space region A was 100%. The 3D gradient echoes with multiple flip angles were measured before each CM injection. With identical parameters, dynamic imaging was performed for 100 measurements with a high temporal resolution of approximately 1.5 s with identical parameters, except for  $\alpha = 30^\circ$  and the use of the shared k-space. The central 20% of the central k-space lines were scanned every time. The peripheral 80% of the k-space lines were split, and each line was sampled every fifth acquisition. After the fifth acquisition of the first dynamic sequence, 0.1 mL/kg body weight of blood pool contrast medium (BPCM) (0.25 mMol/mL gadofosveset trisodium, Vasovist Bayer Schering, Berlin, Germany/Ablavar, Lantheus Medical Imaging, Inc., USA) was injected via the central venous catheter at a flow rate of 5 mL/s. CM administration was followed by injection of 20 mL 0.9% saline solution at the same rate. Time-dependent maps of T1 relaxation rate changes were computed using the method of Li et al. [25].

Increased or reduced blood flow was induced by local injection of adenosine (Adenosin Life Medical, 5 mg/mL, Carinopharm, Germany) into the femoral artery using a syringe pump. The dose was chosen according to its flow-enhancing effect. After about 5 min, a steady blood flow, measured by the US flow probe, was achieved, and MRI measurement was started. A total of up to three perfusion measurements were performed per animal. To avoid systematic errors, the order of flow levels following adenosine administration was randomly changed. This was done to compensate for systematic errors due to signal saturation resulting from CM accumulation.

The flow measurement protocols were followed by acquisition of anatomical images without CM administration (Fig 1.XI). Then scans with rapidly extravasating LMCM were obtained. A dose of 2 mL of LMCM was administered locally at 1.0 mL/s.

## Volumetry

Volumetry, segmentation (Fig 3), and determination of muscle perfusion were performed using the AmiraDev 5.2 visualization package (Mercury Computer Systems, Berlin, Germany) on a Debian Linux 64 bit workstation. The functionality of AmiraDev 5.2 has been extended by



**Fig 3. Muscle segmentation and examples of tissue blood curves.** Muscle segmentation and examples of tissue blood curves obtained by averaging over all segment voxels. The adenosine response and thus the flow increase were inhomogeneously distributed over the different muscle segments. The dash-dot line represents the measurement of the first flow state in which a flow of 174 mL/min was measured at the femoral artery with the Doppler flow probe. The dashed (solid) line represents the second (third) measurement with a Doppler flow of 309 (456) mL/min.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g003

the application of AmiraDev tools on dynamically acquired data by software packages implemented as dynamic link libraries in AmiraDev.

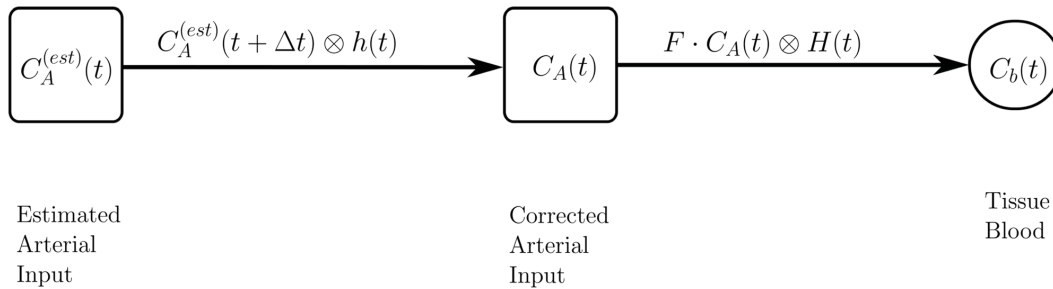
The morphological MR images and pre and post local LMCM difference images (T1-TSE) (Fig 1.II and 1.XI) and the dynamic GRE images with local CM administration (Fig 1.IX and 1.X) were used for separate segmentation of eight different tissue regions (Fig 3), henceforth called segments: medial, cranial, lateral, and pelvic thigh muscles, lower leg, bones, skin, and fat. Furthermore, the percentage volume of each tissue compartment separated in this way relative to the total volume of the hind leg was calculated.

### Perfusion Evaluation

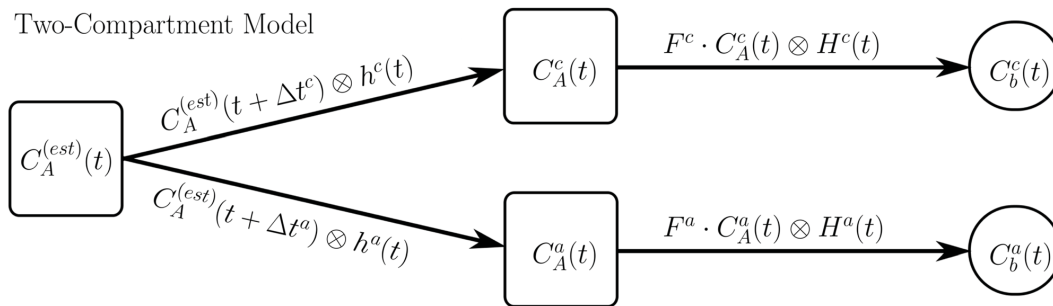
The baseline dynamic scans were used for calculation of baseline 3D longitudinal relaxation rates ( $R_{10}$ ) and magnetization maps ( $M_0$ ). The relaxation rate ( $R_{10}$ ) and magnetization ( $M_0$ ) maps were used to convert the dynamic k-space-sampled GRE scans into 4D relaxation rate change maps  $R_1(t)$ . The relaxation change-time curves are directly proportional to the concentration-time curves via the expression [25]:

$$C(t) = \frac{\Delta R}{R_1}, \tag{1}$$

One-Compartment Model



Two-Compartment Model



**Fig 4. Diagrams of the one- and two-compartment model.** Diagrams of the one- and two-compartment model.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g004

where  $\Delta R$  is the relaxation rate change and  $\mathfrak{R}_1 = 19 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (at 1.5T and 37°C) is the relaxivity of gadofosveset [26]. To calculate perfusion, the arterial input function (AIF) is necessary. The AIF,  $C_A^{(est)}(t)$ , was extracted from the voxels that were definitely and completely localized in the abdominal aorta in order to avoid partial volume effects. The volume of interest (VOI) of the AIF consisted of approximately 10 voxels, covering an absolute volume of 378  $\text{mm}^3$ . The tissue curves of the eight segments and the AIF were extracted from the dynamic relaxation change map.

The first 60 seconds of the relaxation rate change-time curves of the averaged voxels of the AIF and tissue segments were used for model fitting. Before numerical analysis of the time curves, the temporal resolution of the curves was increased to 0.1 seconds using linear interpolation. Perfusion was calculated by numerical deconvolution of the tissue relaxation rate change curves with noninvasively determined arterial input curves using an analytical approach for the residue function as described in detail by Østergaard et al in [27].

The design of our models (depicted schematically in Fig 4) was based on the indicator dilution theory and required the deconvolution of the tissue blood concentration-time curve in tissue capillaries and tissue arterioles,  $C_b^i(t)$  [28]:

$$C_b^i(t) = F^i \cdot C_A^i(t) \otimes H^i(t), \tag{2}$$

where  $i = a, c$  indicates the respective compartment (arteriolar or capillary),  $F^i$  is perfusion, and  $H^i(t)$  are the respective residue functions with mean transit times  $T^i$ :

$$H^i(t) = e^{-t/T^i}. \tag{3}$$

A single exponential was used as a first-order model to describe the residue function. For such a system, the residue function is an exponential [29]. We used general least-squared minimization to fit for  $T^i$  and  $F^i$  [27].

To calculate the AIFs  $C_A^i(t)$  for the two single compartments we corrected  $C_A^{(est)}(t)$  for delay  $\Delta t^i$  and dispersion times  $1/\beta^i$ :

$$C_A^i(t) = C_A^{(est)}(t + \Delta t^i) \otimes h^i(t), \tag{4}$$

where

$$h^i(t) = \beta^i \cdot e^{-\beta^i t} \tag{5}$$

are the vascular transport functions that describe bolus dispersion during effective transit times  $1/\beta^i$  from the site of AIF measurement to the input to the particular region of interest (ROI).

Fig 5 shows the AIFs (gray solid line) measured in the aorta for the three flow measurements of the same experiments as in the example discussed in the Results section. In addition, the corrected AIFs for the single-compartment model and for the capillary and arteriolar compartment of the two-compartment model are shown.

Finally, the sum

$$C_b(t) = v_b^c C_b^c(t) + v_b^a C_b^a(t) \tag{6}$$

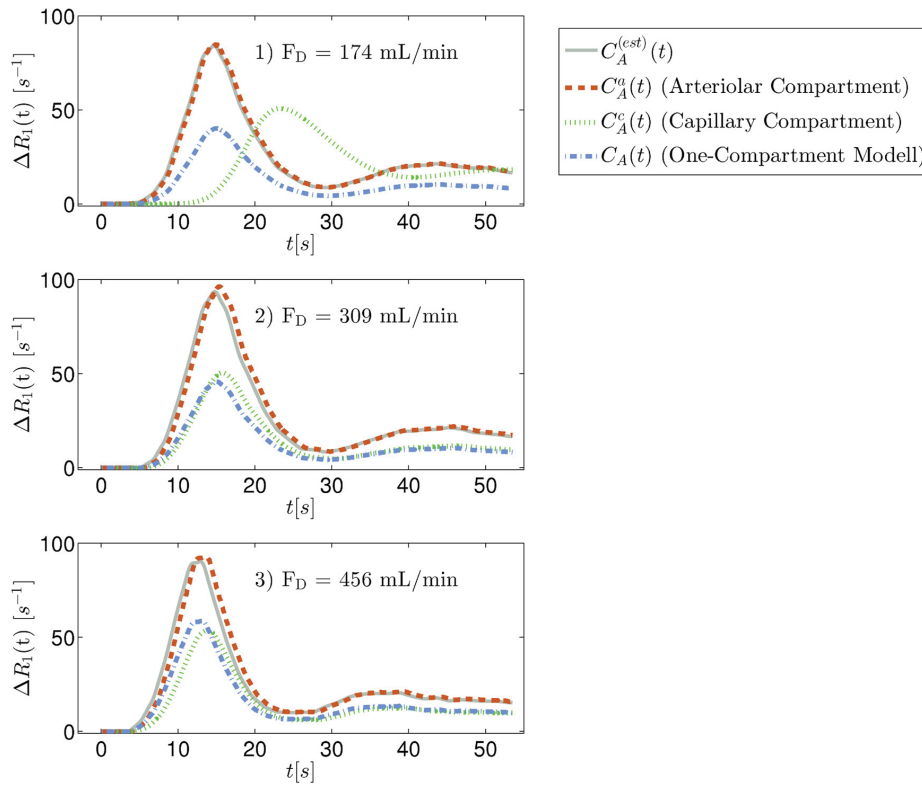
gives the average tissue concentration time-curve in the ROI under consideration, where  $v_b^c$  and  $v_b^a$  are the fractional capillary and arteriolar blood volume, respectively.

The MRI relaxation change-time curve for each segment was determined by averaging the contributions of all voxels over the volume of the entire segment. Within these ROIs, mean medullary and cortical perfusion was determined in mL/min/100cm<sup>3</sup> via model fitting with the one- and two-compartment model. As proposed by Sourbron et al. [30] and Donaldson et al. [31], the F-test for model comparison was used to decide whether to use the results of the one-compartment or two-compartment model fit.

The segment volume was multiplied with the perfusion of the respective segment to determine flow in each segment. The flow probe is surrounded by an artifact area with a radius of approximately 1 cm, which was excluded from flow calculation. Total flow was calculated by summing up the contributions of the individual segments. The total flow values were compared with the invasive blood flow measurements provided by the implanted US flow probe.

The full protocol with perfusion measurements at three different blood flow levels was performed in six of the seven pigs, while only two measurements were performed in one pig (Fig 1.III-1.VIII). For the flow measurements in each pig, different flow levels were aimed at by adenosine administration. To minimize a possible effect of CA accumulation, the order in which the three different flow levels were induced was varied, i.e. the order of flow levels was varied from highest to lowest in part of the pigs and vice versa in the other pigs.

The tissue blood flow curves were generated by averaging large tissue regions located in the center of the area covered by the body coil. The AIF, however, was derived from an area of approximately 10 voxels in the aorta close to the coil edge. This method made it necessary to correct the model flow values with regard to the AIF steady state phase of the individual measurements. For each of the  $n = 20$  flow measurements, we calculated the time-dependent



**Fig 5. Examples of correction of the arterial input function (AIF).** Examples of correction of the arterial input function (AIF). The case in question is for the lower leg and belongs to the blood-tissue curves from the example presented in the Results section.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g005

mean AIF relaxation rate  $w_n$  by averaging all AIF time curves over 20 seconds starting approximately 60 seconds after bolus arrival for each of the  $n$  measurements:

$$w_n = \langle Ca(t_j) |_{i=j, \dots, k} \rangle, n = 1 \dots 20, \quad (7)$$

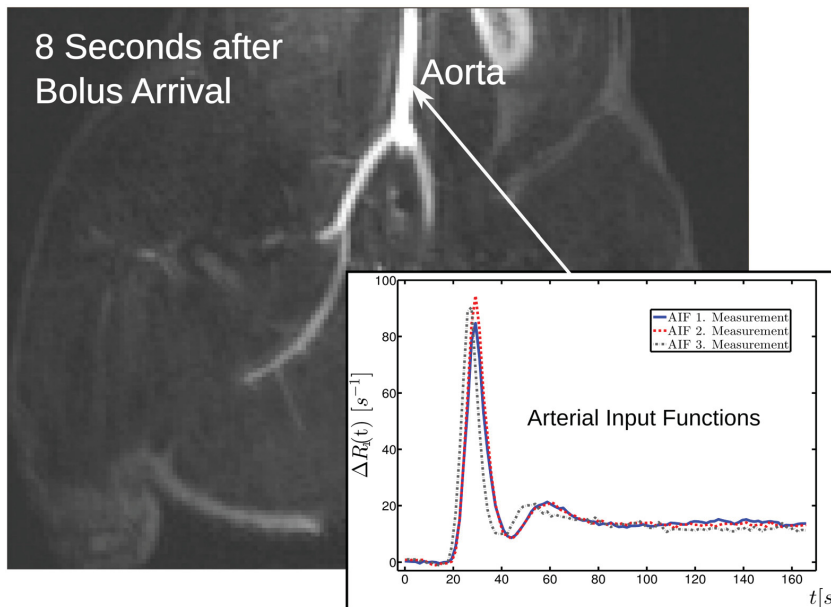
where  $i = 0$  is the index of the time of bolus arrival,  $j$  is the index for the time increment 60 seconds after bolus arrival, and  $k$  is the time increment 20 seconds after  $t_j$ . Then we calculated the mean AIF amplitude

$$W = \langle w_n \rangle \quad (8)$$

and calculated a normalized AIF for each flow measurement by dividing the individual AIF curve height by the overall mean AIF curve height:

$$F_n^{\text{Norm}} = c_n \cdot F_n, \quad (9)$$





**Fig 6. Coronal image of a dynamic GRE scan.** Coronal image of a dynamic GRE scan obtained eight seconds after bolus arrival. Also shown are examples of the three arterial input function measurements in the abdominal aorta.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g006

with

$$c_n = w_n/W. \tag{10}$$

### Statistics

Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) and Matlab R2011b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA). All values were expressed as means and standard deviations as error. The correlation between the two models (invasive flow measurement and DCE data) was assumed to be linear, and the error between the methods was assumed to be normally distributed. Correlations were calculated using the method of linear regression analysis, and significance was estimated by the Pearson correlation coefficient.  $P < 0.05$  was considered significant.

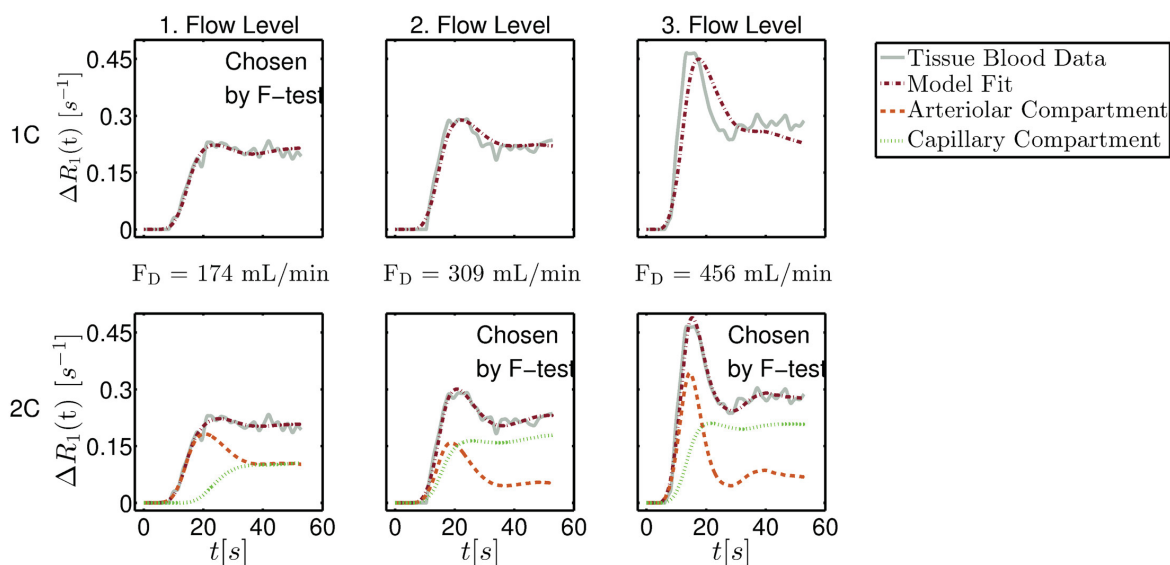
### Results

Seven animals were successfully examined and twenty flow measurements were done. The dynamic scans covered the entire abdomen including a large part of the aorta (Fig 6). To generate arterial input functions, we averaged over a set of about twenty full blood voxels in the aorta. The morphological and dynamic scans acquired with local CM administration (shown in Fig 2) were used to outline different muscle segments (see Fig 3). Apart from the displayed segments (cranial, lateral, medial thigh muscle, lower leg, skin, fat, and bone) the border region

between lower leg and upper leg was outlined as an eighth region because the assignment to the respective segments was not clear enough in this intermediate area. However, for the flow calculation by multiplication of segment perfusion and segment volume followed by summation of the individual contributions, it was of crucial importance to include the entire hind leg volume.

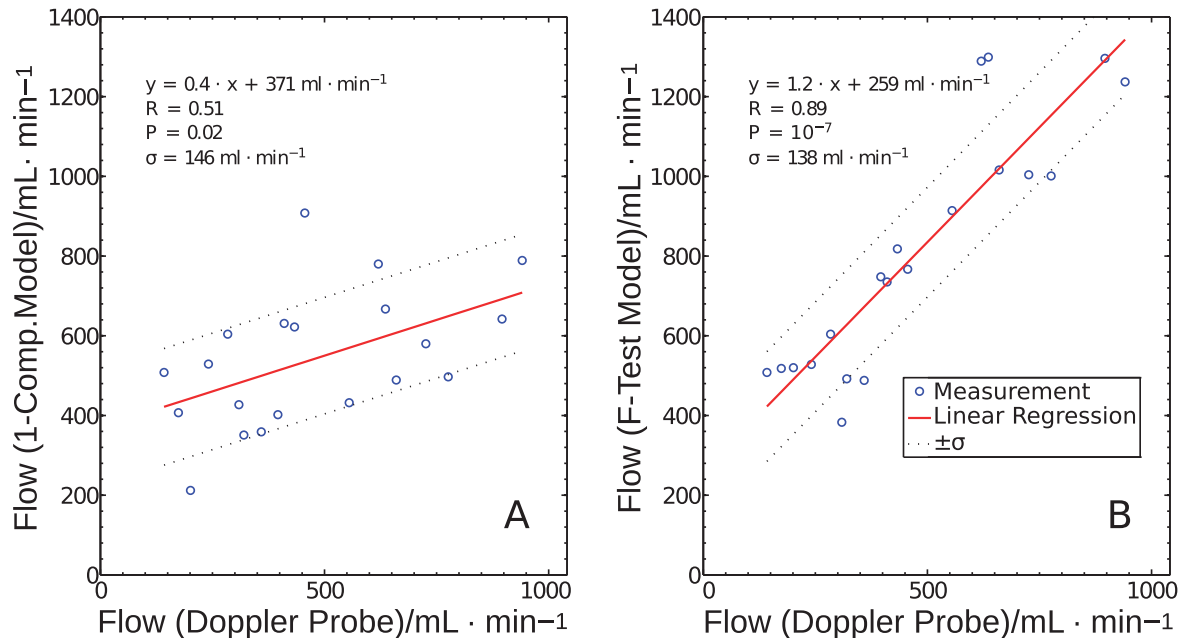
Fig 3 presents examples of the tissue blood time curves of a single pig for three perfusion values and four different muscle segments (lateral and cranial thigh muscle, pelvic muscle and lower leg). In these examples, the lateral and cranial thigh muscle shows no response to administration of the vasodilator adenosine. In all experiments, the lower leg exhibited the strongest tissue reaction to adenosine administration. In this particular example, the pelvic muscle also shows a strong reaction. The response to local adenosine injection into the femoral artery resulted in an increase in the general height of the tissue curve and especially in a strong bolus increase in height and slope.

Fitting examples for the one- and the two-compartment-model are presented in Fig 7. The examples show the fit to the tissue blood-time curves at three different stable flow levels in the lower leg segment. The F-test chooses the model fit with respect to the goodness of fit and the number of model parameters. For the first and lowest blood flow level (174 mL/min), the F-test chose the one-compartment model. For the second (309 mL/min) and third (456 mL/min) flow levels with significantly higher flows measured with the Doppler probe, and thus a high bolus contribution, the parallel two-compartment model was chosen by the F-test. Especially for the third measurement, with the large bolus contribution, the one-compartment model underestimates the bolus increase as well as the washout region.



**Fig 7. Fitting results for the two different models (one-compartment (1C) and two-compartment (2C)).** Fitting results for the two different models (one-compartment (1C) and two-compartment (2C)) and for different flow levels. The solid line represents the tissue blood data and the dashed-dotted line represents the fitting result. The dotted (dashed) line shows the fitting result for the capillary (arteriolar) compartment.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g007



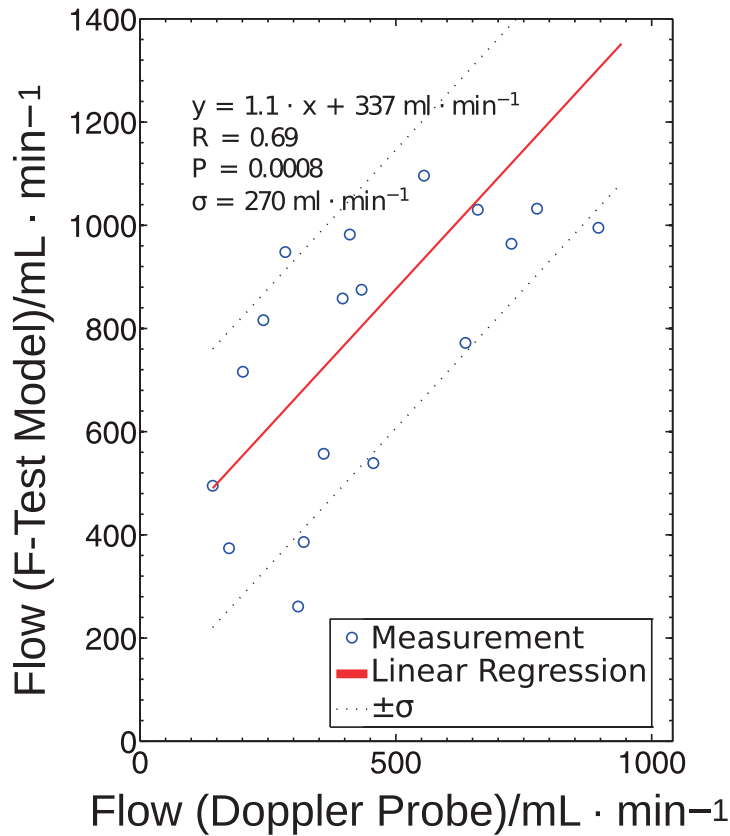
**Fig 8. Regression of the corrected DCE-MRI models.** Regression of the corrected DCE-MRI model results with the Doppler flow values for the one-compartment model (A) and for the F-test selection method (B). The solid line represents the linear regression fit of the measured data (circles). The dotted line depicts the standard deviation of the data related to the linear regression.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g008

We plotted 20 flow values from seven pigs measured with the DCE-MRI model versus the corresponding Doppler flow values (Fig 8). If only the one-compartment model is used for all segments (Fig 8A), a correlation of  $R = 0.51$  is obtained with a significance of  $P = 0.02$ , a slope of the regression line of  $m = 0.4$ , and an ordinate axis intercept of the regression line of 371 mL/min. Ideally, a slope of 1 and an ordinate intercept of zero would be expected. If we take into account both the one-compartment and the two-compartment model and let the F-test decide which one delivers the most accurate results (Fig 8B), we obtain a correlation of the flow values of  $R = 0.89$  with a significance of  $P = 10^{-7}$ , a slope of the regression line of 1.2, and an ordinate intercept of 259 mL/min. The ordinate intercept of 259 mL/min represents an average perfusion of the hind leg of 4.7 mL/(min·100cm<sup>3</sup>).

Fig 9 depicts the correlation of the uncorrected results obtained with the F-test selection method and the flow values measured with the Doppler probe. With a correlation of  $R = 0.69$  and significance of  $P < 0.001$ , the correlation is still high. The slope of the regression line,  $m = 1.1$ , is very close to the expected result. However, the standard deviation  $\sigma$  is 270 mL/min for the uncorrected case and only 138 mL/min for the corrected case. Also, the ordinate intercept is higher (337 mL/min) than for the corrected case (259 mL/min). This result underlines that, in the present setting, flow correction with respect to the AIF steady state is justified.

Table 1 presents mean perfusion values in the eight different muscle (values determined by using the F-test and corrected AIF) and tissue segments for four categories of flow values measured with the Doppler probe. The perfusion values measured with DCE-MRI ranged from 2



**Fig 9. Regression of the uncorrected DCE-MRI model.** Regression of the uncorrected DCE-MRI model results with the Doppler flow values for the F-test selection method. The solid line represents the linear regression fit of the measured data (circles). The dotted line depicts the standard deviation of the data related to the linear regression.

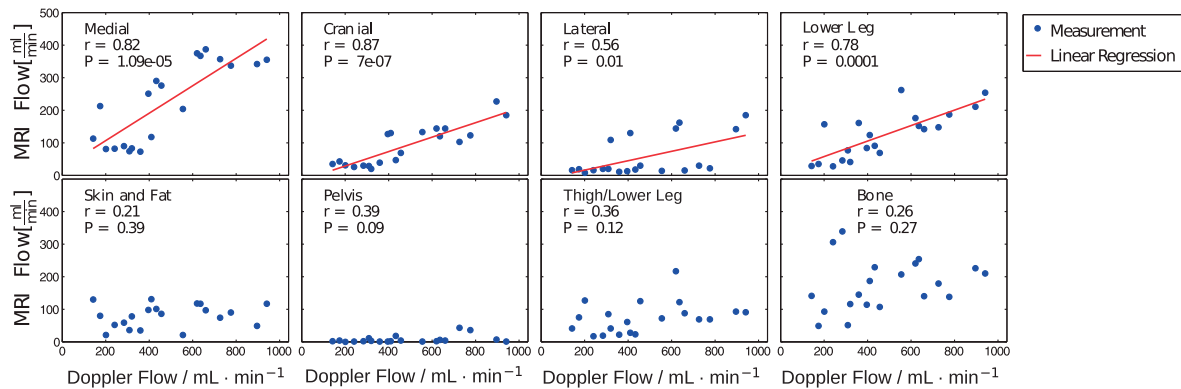
doi:10.1371/journal.pone.0128060.g009

**Table 1. Mean perfusion values in four different Doppler flow regions and for the different muscle segments.**

Segment	Mean Perfusion [mL/(min·100cm <sup>3</sup> )]	Doppler Flow [mL/min]			
		142–320	359–456	555–726	776–941
Lat. Thigh		4	2	8	7
Cran. Thigh		3	9	21	14
Skin & Fat		8	11	10	12
Med. Thigh		8	14	23	25
Lower Leg		9	15	32	23
Pelvis		14	11	22	24
Thigh/L.Leg		19	18	31	44
Bone		23	25	27	29

Mean perfusion values in four different Doppler flow regions and for the different muscle segments.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.t001



**Fig 10. Correlation of the corrected DCE-MRI model results.** Correlation of the corrected DCE-MRI model results with the Doppler flow values for the F-test selection method in the different muscle segments. The measurements are plotted using blue dots and the significant correlations ( $P < 0.05$ ) using a red line.

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g010

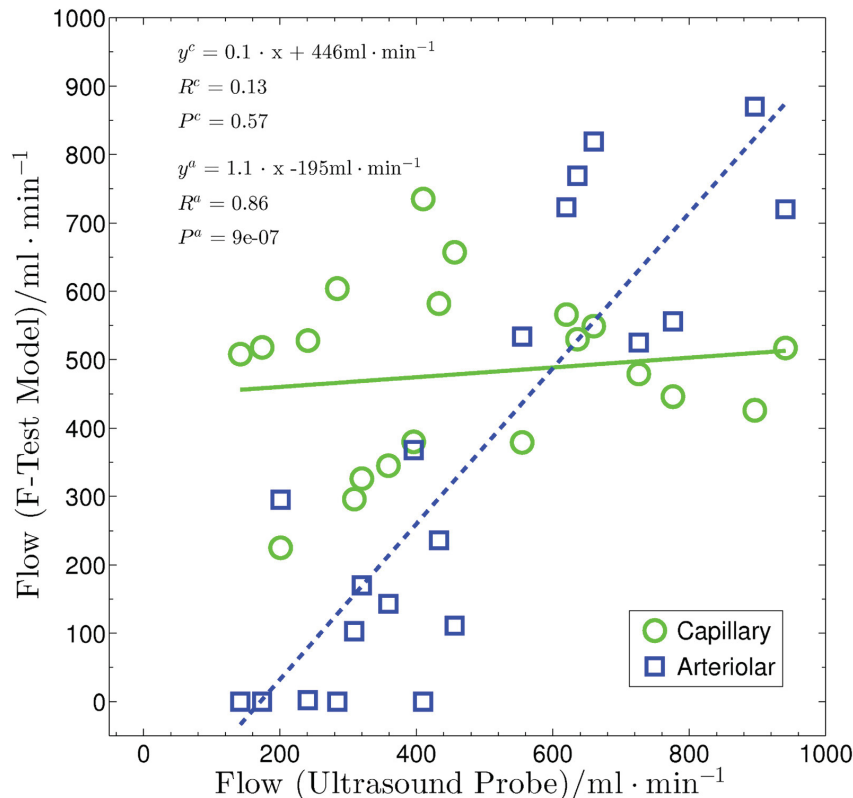
mL/(min·100 cm<sup>3</sup>) to up to 44 mL/(min·100 cm<sup>3</sup>). Moreover, especially in the muscle segments with low and moderate perfusion (Fig 10, upper row), there were high correlations between the corrected DCE-MR flow values and the Doppler flows,  $R = 0.56$ – $0.87$ . The faintest response to adenosine administration was found in non-muscular tissue, namely bone, skin, and fat. The highest blood flow increase was observed in the medial thigh muscle (Fig 10, upper left plot).

For flow calculation, the entire perfused volume supplied by the femoral artery had to be included. Therefore, voxels not definitely assignable to the upper or lower leg had to be summarized in a separate segment referred to as “thigh/lower leg” and including contributions of skin and fat. Compared to the high correlations in the thigh muscles and in the lower leg, the low correlation in the combined segment confirms that segmentation of the muscles was necessary.

Plotting the arteriolar and capillary contributions of the corrected F-test model flows against the Doppler measurements (Fig 11) shows that the flow increase is mainly detected in the arteriolar compartment. The overall flow of the hind leg muscles, as measured by the ultrasound probe, highly correlates with the arteriolar contribution of the flow from the MRI measurement,  $R^a = 0.86$  and  $P^a = 9 \cdot 10^{-7}$ . Linear regression yields a slope of 1.1 and a y-axis intercept of -195 mL/min. The capillary flow contribution of the MRI measurement results in a correlation coefficient of only  $R^c = 0.13$  with a significance of  $P^c = 0.57$ , and linear regression reveals a slope of 0.1 and a y-axis intercept of 446 mL/min. These results suggest that flow increases caused by adenosine administration are mainly due to the activation of arterio-venous shunts [32–36].

## Discussion

In our experiments, dynamic scans were acquired using a k-space undersampling and data-sharing method known as Time-resolved angiography With Stochastic Trajectories (TWIST) [37, 38]. This technique yields sufficiently high temporal resolution without sacrificing spatial resolution and anatomic coverage. However, k-space undersampling may distort enhancement curves, especially when the signal is changing rapidly, for example, during first-pass perfusion [37]. This might affect the accuracy of our kinetic modeling parameters especially with regard



**Fig 11. Regression of the corrected DCE-MRI model results.** Regression of the corrected DCE-MRI model results with the Doppler flow values for the F-test selection method. The solid line represents the linear regression fit of the measured data with the capillary contribution of the model flow values (circles). The dashed line depicts the linear regression fit of the measured data with the arteriolar contribution of the model flow values (squares).

doi:10.1371/journal.pone.0128060.g011

to the determination of the arterial input function and the generation of high-flow tissue blood curves with a large bolus contribution, where the two-compartment model is employed. A central region of 20% and a sampling density of about 20% is often used in the tracer kinetic community [37, 39]. This approach combines high temporal resolution of approx. 1.5 seconds with minimal view sharing of the non-bolus phases during first pass (full width at half maximum (FWHM)  $\approx$  10 seconds).

However, the inclusion of k-space lines from the surrounding time points may lead to a drop of the bolus peak. A too low AIF bolus peak leads to perfusion overestimation. This holds in particular for cases in which the F-test selects the arteriolar compartment for flow states with a large bolus contribution (Fig 7 right plot column). Thus, especially at high flow states, the TWIST technique may overestimate flow. This may explain a slope of the regression line larger than 1 and/or the y-axis intersection in the correlation plot (Fig 8B). Since tumors can be very small (few mm), the small number of k-lines sampled every time point also might be a hindrance in actual clinical applications. Moreover, since tumors tend to have leaky vasculature, the intravascular agent will leak into the interstitial compartment thereby producing the condition that would

exist in tissue with intact vasculature and use of a low-molecular-weight contrast agent that passes into the interstitial compartment. However, in this study we want to restrict the analysis to the general case of healthy tissue as a basis for more advanced applications.

Incorrect bolus dispersion times might lead to underestimation or overestimation of dispersion for the arteriolar compartment. Compared to the actual time resolution, the dispersion times are rather small. Along with the inherent errors of the shared k-space technique, this might preclude determination of dispersion times altogether.

Kershaw et al. suggest that an accurate measurement of model parameters relies on acquiring data with high temporal resolution and low noise, particularly for models with large numbers of free parameters [40]. They investigated model accuracy in a simulation study, examining the effects of temporal resolution, noise levels, and error on the measured arterial input function. A temporal resolution of 1.5 s and high signal-to-noise ratio (SNR; noise  $sd = 0.05$ ) were found to ensure minimal bias ( $< 5\%$ ) in all four model parameters (in their study: extraction fraction, blood flow, mean transit time, and extravascular extracellular volume).

Temporal resolution in our experiments was approximately 1.5 s. We calculated a contrast-to-noise ratio (CNR), by dividing the average height of the T1 relaxation rate change time curves by the standard deviation of the time curves in the ten seconds before bolus arrival. The CNR of the tissue blood curves was enhanced by averaging over all voxels of the muscle segments. Even for the lowest blood tissue uptake curves, we obtained CNRs of approximately 9 (noise  $SD = 0.04$ ). Because of the height of the arterial input signal of the aorta we had a CNR of the arterial input function in the order of 70, but due to averaging over just up to twenty full blood voxels, we had a rather high arterial input noise  $SD$  of 0.25.

Despite the administration of the same body weight-adjusted CM dose in all pigs, there were significant differences among the seven experiments in the height of the steady-state phase of the AIFs. However, the steady-state phases of the three AIF measurements within one experiment had approximately the same height (see Fig 6). The signal differences may be attributable to magnetic field inhomogeneities in the few AIF voxels at the edge of the TIM body coil and differences in automated shimming between the seven experiments.

In addition, we cannot rule out that, in the coil border regions, the true flip angles deviated from the prescribed sequence values. When converting the scanner signals into a relaxation rate change map, this effect will naturally lead to systematic errors. Moreover, accuracy of signal calculation is expected to be highest in the coil center since each coil element of the body coil has a maximum number of neighbors. Therefore, in the border region of the coil (where the abdominal aorta AIF is measured), signal corruption may take place.

Moreover, the amount of inflowing spins depended on the heart rate of each pig at the time of measurement. Thus, different rates of new inflowing spins not in steady state may lead to differences between the various AIF heights. The AIF had approximately 100 times higher signal values than the tissue blood curves, causing errors in the neighboring AIF voxels to be more heavily weighted. Neglecting  $T2^*$  effects could be an additional source of error.

Data quality might have decreased slightly from the first to the third measurement due to contrast medium saturation, thus causing a lower CNR. However, significant data degradation was not apparent. It is conceivable to take four measurements in future experiments. However, to reduce a potential impact on flow correlation, we varied the order of the flow level change within each experiment.

The accuracy of the reference Doppler flow probe is, according to manufacturer specifications,  $\pm 10\%$  [41]. Due to interference by the scanner signal, flow could not be measured by the Doppler flow meter during MRI acquisitions. Therefore, Doppler flow values obtained right

before the start of MR scans were averaged. The flow levels were stable for five minutes before starting the MR measurement, and therefore significant drifts in flow levels during imaging were unlikely.

## Perfusion Modeling

Use of a more complex model does not automatically result in higher accuracy or precision. Fitting a model is a reasonable method to learn more about underlying tissue physiology. But if too few parameters are used, the model does not describe the data (underfitting). On the other hand, using too many parameters may lead to a situation where the extra parameters only describe noise (overfitting). Our guiding principle was that the simplest model that describes the data is the most appropriate. If a set of models with different numbers of parameters is used, then the appropriate model for fitting the data can be determined by using statistical tests for model comparison.

It is not clear whether the compartments actually separate physiological information. For example, we cannot say with certainty that what we measure in the arteriolar compartment actually describes physiologic information gathered solely from the tissue arteries and arterioles. At least, with better separation of different physiological structures, the capability of the model to provide information on these separate structures increases. While the delay and dispersion correction of the individual arterial input functions improves separation of the contributions from the two compartments, the use of more model parameters leads to additional problems such as overfitting, the same curve can be described by different parameter sets. As a result, it is difficult to separate the effects of the vascular transport function from those of the residual function resulting, in under- or overestimation of perfusion.

Comparison of the flow results using only the one-compartment model versus F-test selection (Fig 8) clearly shows that the combined use of both models is necessary for accurate perfusion determination. Exclusive use of the two-compartment model leads to a correlation between MRI flow values and Doppler flows of  $R = 0.66$ , with a significance of  $P < 0.002$ , a regression line of  $y = 1.2x + 689$  mL/min, and a standard deviation from the regression line of 335 mL/min. Thus, the two-compartment model improves determination of the flow increase compared with the one-compartment model. F-test selection prevents curve fitting improvement due to noise rather than physiologically accessible information and thus provides the most accurate overall results. However, as stated by Sourbron et al. in [30], automated selection criteria such as the F-test are useful as indicators for global trends, but they are not reliable on a case-by-case basis, or when differences are more subtle. Therefore, due to incorrect selections by the F-test in individual cases, statistical errors may arise.

Our results prove that, with a large amount of data and use of delay and dispersion correction, it is possible to obtain precise flow measurements even in low-perfusion tissue. To obtain precise results, it is most important to use different models for high and low tissue perfusion states and to use a statistical test to choose the optimal model for each case (as suggested by [30] and [31]). Our results in Fig 8 and the results using only the two-compartment model demonstrate that the two-compartment model overestimates flow in tissue in which no structural separation is possible between bolus phase and washout. Applying the one-compartment model in regions where this separation is possible will most likely result in an underestimation of flow.

A drawback of the use of delay and dispersion correction is that additional model parameters must be taken into account. According to Sourbron and Buckley [17], the state of an n-compartment model can only be identified when the corresponding residue function contains n clearly separated exponential terms. Hence, to stabilize the fit and to restrict the parameter



space of the model, physically meaningful constraints were imposed on parameters. For example, it was required that the bolus delay and the bolus dispersion of the arteriolar compartment should always be lower than those of the capillary compartment.

The perfusion values measured in the present study cover the range of flow levels reported in the literature for low-flow muscle, healthy and diseased prostate, and the lower end of high muscle perfusion during activity. Thus, our study shows that muscle blood flow can be used as a tissue model for perfusion validation studies. Armstrong et al. determined average muscle perfusion of the hind leg of miniature pigs during treadmill exercises. Depending on stress, the values ranged between 20 and 124 mL/(min·cm<sup>3</sup>) [42]. Moreover, our results confirm several earlier studies [15, 42–46] stating that muscle perfusion differs among muscles and that primarily the high-oxidative extensor muscles have blood flows above average muscle blood flow. Furthermore, our study confirms that muscles have the ability to adapt their perfusion to physiologic requirements.

Moreover, whereas normal microvasculature is characterized by well structured branching, tumor angiogenesis in prostate cancer is characterized morphologically by an increase in the number of blood vessels including new capillaries, capillary sprouts, non-endothelialized capillaries and arterio-venous shunts [32–36, 47–49]. Different vessel types might also significantly contribute to local perfusion as well as found in the muscle. Thus, the findings of the present study might help in improving the accuracy of noninvasive imaging-based perfusion measurement in low-flow tumor tissue.

## Conclusion

The DCE-MRI technique presented here uses a blood pool contrast agent and a F-test selection method for different model approaches. It allows absolute quantification of skeletal muscle flow and is thus applicable for low perfused organs like prostate and breast. Our results show that the technique has sufficient accuracy and reproducibility to be transferred to the clinical setting.

## Acknowledgments

We are grateful to Professor Wolfgang Sauerwein for useful discussions and technical support. We also like to thank Professor Gero Hilken, Christine Krüger and Andreas Wissmann for providing equipment and taking care of the animals.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LL. Performed the experiments: LL MM AS SH. Analyzed the data: SH. Contributed reagents/materials/analysis tools: LL MS SM. Wrote the paper: SH LL. Helped with technical issues of the MR scanner: SM.

## References

1. Gilkes DM, Semenza GL (2013) Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future oncology* (London, England) 9: 1623–1636. doi: [10.2217/fon.13.92](https://doi.org/10.2217/fon.13.92)
2. Jordan BF, Sonveaux P (2012) Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Frontiers in pharmacology* 3: 94. doi: [10.3389/fphar.2012.00094](https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00094) PMID: [22661950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661950/)
3. Gillies RJ, Schornack PA, Secomb TW, Raghunand N (1999) Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia* (New York, NY) 1: 197–207. doi: [10.1038/sj.neo.7900037](https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900037)
4. Höckel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 266–276. doi: [10.1093/jnci/93.4.266](https://doi.org/10.1093/jnci/93.4.266) PMID: [11181773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181773/)

5. Stewart B, Wild C (2014) World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.
6. Chaudary N, Hill RP (2006) Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast disease* 26: 55–64. PMID: [17473365](#)
7. Baade PD, Youlden DR, Krnjacki LJ (2009) International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res* 53: 171–184. doi: [10.1002/mnfr.200700511](#) PMID: [19101947](#)
8. Budach V, Stuschke M, Budach W, Baumann M, Geismar D, et al. (2005) Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the german cancer society 95–06 prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 23: 1125–1135. PMID: [15718308](#)
9. Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier WJ, et al. (1998) Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 338: 1798–1804. doi: [10.1056/NEJM199806183382503](#) PMID: [9632446](#)
10. Vaupel P, Kelleher DK (2013) Blood flow and oxygenation status of prostate cancers. *Advances in experimental medicine and biology* 765: 299–305. PMID: [22879048](#)
11. Nahum AE, Movsas B, Horwitz EM, Stobbe CC, Chapman JD (2003) Incorporating clinical measurements of hypoxia into tumor local control modeling of prostate cancer: implications for the alpha/beta ratio. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 391–401. doi: [10.1016/S0360-3016\(03\)00534-0](#) PMID: [12957250](#)
12. Vaupel P (1990) Oxygenation of human tumors. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]* 166: 377–386.
13. Urbanchek MG, Picken EB, Kalliainen LK, Kuzon WM (2001) Specific force deficit in skeletal muscles of old rats is partially explained by the existence of denervated muscle fibers. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 56: B191–B197. doi: [10.1093/gerona/56.5.B191](#) PMID: [11320099](#)
14. Wilson CB, Lammertsma AA, McKenzie CG, Sikora K, Jones T (1992) Measurements of blood flow and exchanging water space in breast tumors using positron emission tomography: a rapid and noninvasive dynamic method. *Cancer research* 52: 1592–1597. PMID: [1540969](#)
15. Laughlin MH (1987) Skeletal muscle blood flow capacity: role of muscle pump in exercise hyperemia. *The American journal of physiology* 253: H993–1004. PMID: [3318504](#)
16. Durán WN, Renkin EM (1974) Oxygen consumption and blood flow in resting mammalian skeletal muscle. *The American journal of physiology* 226: 173–177. PMID: [4809879](#)
17. Sourbron SP, Buckley DL (2013) Classic models for dynamic contrast-enhanced mri. *NMR in biomedicine* 26: 1004–1027. doi: [10.1002/nbm.2940](#) PMID: [23674304](#)
18. Lüdemann L, Nafz B, Elsner F, Grosse-Siestrup C, Meissler M, et al. (2009) Absolute quantification of regional renal blood flow in swine by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging using a blood pool contrast agent. *Investigative radiology* 44: 125–134. doi: [10.1097/RLI.0b013e318193598c](#) PMID: [19151609](#)
19. Lüdemann L, Prochnow D, Rohlfing T, Franiel T, Warmuth C, et al. (2009) Simultaneous quantification of perfusion and permeability in the prostate using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging with an inversion-prepared dual-contrast sequence. *Annals of biomedical engineering* 37: 749–762. doi: [10.1007/s10439-009-9645-x](#) PMID: [19169821](#)
20. Calamante F, Gadian DG, Connelly A (2000) Delay and dispersion effects in dynamic susceptibility contrast mri: simulations using singular value decomposition. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 44: 466–473. doi: [10.1002/1522-2594\(200009\)44:3%3C466::AID-MRM18%3E3.3.CO;2-D](#)
21. Calamante F, Willats L, Gadian DG, Connelly A (2006) Bolus delay and dispersion in perfusion mri: implications for tissue predictor models in stroke. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 55: 1180–1185. doi: [10.1002/mrm.20873](#)
22. Ibaraki M, Shimosegawa E, Toyoshima H, Ishigame K, Ito H, et al. (2005) Effect of regional tracer delay on cbf in healthy subjects measured with dynamic susceptibility contrast-enhanced mri: comparison with 15o-pet. *Magnetic resonance in medical sciences: MRMS: an official journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine* 4: 27–34. doi: [10.2463/mrms.4.27](#)
23. Ibaraki M, Shimosegawa E, Toyoshima H, Takahashi K, Miura S, et al. (2005) Tracer delay correction of cerebral blood flow with dynamic susceptibility contrast-enhanced mri. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25: 378–390. doi: [10.1038/sj.jcbfm.9600037](#)

24. Sauerbrey A, Hindel S, Maaß M, Krüger C, Wissmann A, et al. (2014) Establishment of a swine model for validation of perfusion measurement by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *BioMed research international* 2014: 390506. doi: [10.1155/2014/390506](https://doi.org/10.1155/2014/390506) PMID: [24719859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24719859/)
25. Li KL, Zhu XP, Waterton J, Jackson A (2000) Improved 3d quantitative mapping of blood volume and endothelial permeability in brain tumors. *Journal of magnetic resonance imaging: JMIRI* 12: 347–357. doi: [10.1002/1522-2586\(200008\)12:2%3C347::AID-JMIRI19%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2586(200008)12:2%3C347::AID-JMIRI19%3E3.0.CO;2-7) PMID: [10931600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931600/)
26. Rohrer M, Bauer H, Mintonovitch J, Requardt M, Weinmann HJ (2005) Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol* 40: 715–724. doi: [10.1097/01.rli.0000184756.66360.d3](https://doi.org/10.1097/01.rli.0000184756.66360.d3) PMID: [16230904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16230904/)
27. Ostergaard L, Weisskoff RM, Chesler DA, Gyldensted C, Rosen BR (1996) High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. part i: Mathematical approach and statistical analysis. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 36: 715–725. doi: [10.1002/mrm.1910360510](https://doi.org/10.1002/mrm.1910360510)
28. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, et al. (1999) Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced t(1)-weighted mri of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols. *Journal of magnetic resonance imaging: JMIRI* 10: 223–232. doi: [10.1002/\(SICI\)1522-2586\(199909\)10:3%3C223::AID-JMIRI2%3E3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2586(199909)10:3%3C223::AID-JMIRI2%3E3.0.CO;2-S) PMID: [10508281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508281/)
29. Renkin E (1984) *Handbook of physiology: Section 2, The cardiovascular system. Microcirculation: pt. 2. Bd. 4.* American Physiological Soc.
30. Sourbron SP, Buckley DL (2012) Tracer kinetic modelling in mri: estimating perfusion and capillary permeability. *Physics in medicine and biology* 57: R1–33. doi: [10.1088/0031-9155/57/2/R1](https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/2/R1) PMID: [22173205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173205/)
31. Donaldson SB, West CML, Davidson SE, Carrington BM, Hutchison G, et al. (2010) A comparison of tracer kinetic models for t1-weighted dynamic contrast-enhanced mri: Application in carcinoma of the cervix. *Magnetic Resonance in Medicine* 63: 691–700. doi: [10.1002/mrm.22217](https://doi.org/10.1002/mrm.22217) PMID: [20187179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20187179/)
32. Molls M, Vaupel P, Nieder C, Anscher M (2009) *The Impact of Tumor Biology on Cancer Treatment and Multidisciplinary Strategies.* 1 st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
33. Vaupel P, Grunewald W, Manz R, Sowa W (1978) Intracapillary hbo2 saturation in tumor tissue of ds-carcinosarcoma during normoxia. *Adv Exp Med Biol* 94: 367–375.
34. Weiss L, Hultborn R, Tveit E (1979) Blood flow characteristics in induced rat mammary neoplasia. *Microvasc Res* 17: 119.
35. Endrich B, Hammersen F, Goetz A, Messmer K (1982) Microcirculatory blood flow, capillary morphology, and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma a-mel-3. *J Natl Cancer Inst* 68: 475–485. PMID: [6950176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6950176/)
36. Wheeler R, Ziessman H, Medvec B, Juni J, Thrall J, et al. (1986) Tumor blood flow and systemic shunting in patients receiving intra-arterial chemotherapy for head and neck cancer. *Cancer Res* 46: 4200–4204. PMID: [3488122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3488122/)
37. Song T, Laine AF, Chen Q, Rusinek H, Bokacheva L, et al. (2009) Optimal k-space sampling for dynamic contrast-enhanced mri with an application to mr renography. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 61: 1242–1248. doi: [10.1002/mrm.21901](https://doi.org/10.1002/mrm.21901)
38. Laub G, Kroeker R (2006) Syngo twist for dynamic time-resolved mr angiography. *MAGNETOM FLASH.*
39. Sourbron S, Sommer WH, Reiser MF, Zech CJ (2012) Combined quantification of liver perfusion and function with dynamic gadoxetic acid-enhanced mr imaging. *Radiology* 263: 874–883. doi: [10.1148/radiol.12110337](https://doi.org/10.1148/radiol.12110337) PMID: [22623698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22623698/)
40. Kershaw LE, Cheng HLM (2010) Temporal resolution and snr requirements for accurate dce-mri data analysis using the aath model. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 64: 1772–1780. doi: [10.1002/mrm.22573](https://doi.org/10.1002/mrm.22573)
41. Transonic Animal Research Flowmeters T106/T206 Series.
42. Armstrong RB, Delp MD, Goljan EF, Laughlin MH (1987) Distribution of blood flow in muscles of miniature swine during exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)* 62: 1285–1298.
43. Laughlin MH, Armstrong RB (1982) Muscular blood flow distribution patterns as a function of running speed in rats. *The American journal of physiology* 243: H296–H306. PMID: [7114239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7114239/)
44. Laughlin MH, Mohrman SJ, Armstrong RB (1984) Muscular blood flow distribution patterns in the hindlimb of swimming rats. *The American journal of physiology* 246: H398–H403. PMID: [6703075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6703075/)

45. Laughlin MH, Armstrong RB (1985) Muscle blood flow during locomotory exercise. *Exercise and sport sciences reviews* 13: 95–136. doi: [10.1249/00003677-198500130-00006](https://doi.org/10.1249/00003677-198500130-00006) PMID: [3891377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3891377/)
46. Armstrong RB, Laughlin MH (1985) Rat muscle blood flows during high-speed locomotion. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md: 1985) 59: 1322–1328.
47. Luczyńska E, Anioł J (2013) Neoangiogenesis in prostate cancer. *Contemporary oncology* (Poznań, Poland) 17: 229–233.
48. Russo G, Mischi M, Scheepens W, De la Rosette JJ, Wijkstra H (2012) Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJU Int* 110: 794–808. doi: [10.1111/j.1464-410X.2012.11444.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11444.x)
49. Mork C, Asker CL, Salerud EG, Kvernebo K (2000) Microvascular arteriovenous shunting is a probable pathogenetic mechanism in erythromelalgia. *The Journal of investigative dermatology* 114: 643–646. doi: [10.1046/j.1523-1747.2000.00944.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00944.x) PMID: [10733667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10733667/)

## 4.2 Messung des interstitiellen Volumens

Der Inhalt dieses Abschnitts wurde veröffentlicht in:

Hindel, Stefan; Söhner, Anika; Maaß, Marc; Sauerwein, Wolfgang; Möllmann, Dorothe; Baba, Hideo Andreas; Kramer, Martin; Lüdemann, Lutz. Validation of Interstitial Fractional Volume Quantification by Using Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscles. *Investigative Radiology*. 52(1):66–73, Jan 2017.

[http://journals.lww.com/investigativeradiology/Citation/2017/01000/Validation\\_of\\_Interstitial\\_Fractional\\_Volume.8.aspx](http://journals.lww.com/investigativeradiology/Citation/2017/01000/Validation_of_Interstitial_Fractional_Volume.8.aspx)

**DOI:** 10.1097/RLI.0000000000000309

Aus urheberrechtlichen Gründen ist dieser Artikel in der Dissertationsschrift nicht enthalten.

### Zusammenfassung des Inhalts der Studie

Es wurden 12 Niedrigblutflussmessungen unserer Tierexperimente verwendet, um in niedrig perfundiertem Skelettmuskelgewebe verschiedene pharmakokinetische Modelle für schnell extravasierendes, niedermolekulares Kontrastmittel hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Messung des interstitiellen Volumens zu untersuchen. Es handelte sich dabei um das einfache (TM) und das erweiterte Toftsmodell (ETM) und das Zwei-Kompartiment-Austauschmodell (2CXM). Als Referenzmessung wurden histologische Mikroskopieuntersuchungen von Gewebebiopsien durchgeführt. Es wurde außerdem das Verhalten verschiedener Modellparameter gegen variierende Akquisitionsdauern untersucht. Die Übereinstimmungen zwischen Histologie ( $\tilde{v}_e = 4,8\%$ ) und den Messungen mit dem 2CXM ( $\tilde{v}_e = 6,6\%$ ) waren in Anbetracht der Messunsicherheit (Interquartialabstand ca. 2,5% (Histologie) beziehungsweise 4,5% (2CXM)) gut. Für die beiden Toftsmodelle wurden identische Ergebnisse mit einer starken Abhängigkeit von der Akquisitionsdauer erhalten. Für kurze Akquisitionsdauern von etwa sechs Minuten, welche aus praktischen Gründen in der klinischen Anwendung üblich sind, ergaben sich zwar zufälligerweise recht gute Übereinstimmungen mit den histologischen Messungen ( $\tilde{v}_e = 5,2\%$ ), für lange Messdauern von 15 Minuten, für die eine größere Verlässlichkeit der Ergebnisse zu erwarten war, überstiegen die  $v_e$ -Medianwerte der Toftsmodelle mit beinahe 8% die histologischen Referenzmessungen aber bei weitem. Das 2CXM verhielt sich aufgrund seiner

größeren Anzahl an Anpassungsparametern und somit realistischeren Gestalt gegen Änderungen der Akquisitionsdauer bei der Messung des interstitiellen Volumens wesentlich stabiler als die Toftsmodelle. Für die klinische Tumorbewertung auf Grundlage des Extravasationsparameters  $v_e$  ist das 2CXM deshalb weitaus besser geeignet als die üblicherweise verwendeten Toftsmodelle.

### 4.3 Messung des Blutvolumens

Der Inhalt dieses Abschnitts wurde veröffentlicht in:

Hindel, Stefan; Söhner, Anika; Maaß, Marc; Sauerwein, Wolfgang; Baba, Hideo Andreas; Kramer, Martin; Lüdemann, Lutz. Validation of Blood Volume Fraction Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscle. *PLoS One*. 12(1):e0170841, Jan 2017.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170841>

**DOI:** 10.1371/journal.pone.0170841

#### Zusammenfassung des Inhalts der Studie

In neun tierexperimentellen Messungen, in denen mit kontinuierlicher interarterieller Adenosinadministration niedrige Blutflüsse eingestellt wurden, wurde das Blutvolumen mit verschiedenen DCE-MRT-Methoden bestimmt. Dies geschah in fünf Skelettmuskelgewebereichen der Hinterläufe der Versuchstiere. Ziel war es, die Messgenauigkeit der verschiedenen Modelle und Methoden in niedrig perfundiertem und niedrig vaskularisiertem Gewebe zu evaluieren. Die DCE-MRT-Ergebnisse wurden mit Lichtmikroskopieauswertung immunohistochemischer Isolectingewebefärbungsdaten verglichen. Es wurden sowohl DCE-MRT-Methoden auf Grundlage von mit intravasculären Kontrastmitteln (BPCA) generierten Messdaten ausgewertet als auch Methoden auf Grundlage von niedermolekularen, schnell extravasierenden Kontrastmitteln (LMCA). Für die Berechnung des Blutvolumens mit den BPCA-Daten verwendeten wir die in Abschnitt 3.3 beschriebene Bolusentfaltungstechnik und eine einfache Verhältnisbildung aus den Gleichgewichtsbereichen der Gewebe- und AIF-Konzentrationszeitkurven. Die LMCA-Daten wurden mit dem erweiterten Toftsmodell (ETM) und dem Zwei-Kompartiment-Austauschmodell (2CXM) ausgewertet. Für alle MRT-Methoden wurden, je nach Gewebereich, Blutvolumenmedianwerte im Bereich von  $v_b \approx 1,0\% - 3,0\%$  gefunden, mit einer guten Übereinstimmung sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den histologisch ermittelten Blutvolumenwerten und auch mit muskelgewebereichsbezogenen Literaturvergleichswerten. Eine Ausnahme bildete dabei das ETM, das um eine Größenordnung geringere Blutvolumina zeigte. Die Varianz der erhaltenen Werte war für alle Muskelgewebegruppen am größten für das 2CXM. Für den

vaskulären Parameter  $v_b$  wurden besten Übereinstimmungen mit den Histologiewerten bei gleichzeitig geringster Werteverianz mit den beiden BPCA-MRT-Methoden erhalten.



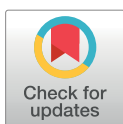
RESEARCH ARTICLE

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

Stefan Hindel<sup>1\*</sup>, Anika Söhner<sup>1</sup>, Marc Maaß<sup>2</sup>, Wolfgang Sauerwein<sup>1</sup>, Dorothe Möllmann<sup>3</sup>, Hideo Andreas Baba<sup>3</sup>, Martin Kramer<sup>4</sup>, Lutz Lüdemann<sup>1</sup>

**1** Department of Radiotherapy, Medical Physics, University Hospital Essen, Essen, North Rhine-Westphalia, Germany, **2** Department of General and Visceral Surgery at Evangelical Hospital Wesel, Wesel, North Rhine-Westphalia, Germany, **3** Department of Pathology, University Hospital Essen, Essen, North Rhine-Westphalia, Germany, **4** Hospital of Veterinary Medicine, Department of Small Animal Surgery, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Hesse, Germany

\* [stefan.hindel@uni-due.de](mailto:stefan.hindel@uni-due.de)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Hindel S, Söhner A, Maaß M, Sauerwein W, Möllmann D, Baba HA, et al. (2017) Validation of Blood Volume Fraction Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscle. PLoS ONE 12(1): e0170841. doi:10.1371/journal.pone.0170841

**Editor:** Wolfgang Rudolf Bauer, Universitätsklinikum Würzburg, GERMANY

**Received:** August 18, 2016

**Accepted:** January 11, 2017

**Published:** January 31, 2017

**Copyright:** © 2017 Hindel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, <http://www.dfg.de/>) grant number LU 844/8-1 to LL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The purpose of this study was to assess the accuracy of fractional blood volume ( $v_b$ ) estimates in low-perfused and low-vascularized tissue using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI). The results of different MRI methods were compared with histology to evaluate the accuracy of these methods under clinical conditions.  $v_b$  was estimated by DCE-MRI using a 3D gradient echo sequence with k-space undersampling in five muscle groups in the hind leg of 9 female pigs. Two gadolinium-based contrast agents (CA) were used: a rapidly extravasating, extracellular, gadolinium-based, low-molecular-weight contrast agent (LMCA, gadoterate meglumine) and an extracellular, gadolinium-based, albumin-binding, slowly extravasating blood pool contrast agent (BPCA, gadofosveset trisodium). LMCA data were evaluated using the extended Tofts model (ETM) and the two-compartment exchange model (2CXM). The images acquired with administration of the BPCA were used to evaluate the accuracy of  $v_b$  estimation with a bolus deconvolution technique (BD) and a method we call equilibrium MRI (EqMRI). The latter calculates the ratio of the magnitude of the relaxation rate change in the tissue curve at an approximate equilibrium state to the height of the same area of the arterial input function (AIF). Immunohistochemical staining with isolectin was used to label endothelium. A light microscope was used to estimate the fractional vascular area by relating the vascular region to the total tissue region (immunohistochemical vessel staining, IHVS). In addition, the percentage fraction of vascular volume was determined by multiplying the microvascular density (MVD) with the average estimated capillary lumen,  $\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2$ , where  $d = 8\mu\text{m}$  is the assumed capillary diameter (microvascular density estimation, MVDE). Except for ETM values, highly significant correlations were found between most of the MRI methods investigated. In the cranial thigh, for example, the  $v_b$  medians (interquartile range, IQRs) of IHVS, MVDE, BD, EqMRI, 2CXM and ETM were  $v_b = 0.7(0.3)\%$ ,  $1.1(0.4)\%$ ,  $1.1(0.4)\%$ ,  $1.4(0.3)\%$ ,  $1.2(1.8)\%$  and  $0.1(0.2)\%$ , respectively. Variances, expressed by the difference between third and first quartiles (IQR)

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

were highest for the 2CXM for all muscle groups. High correlations between the values in four muscle groups—medial, cranial, lateral thigh and lower leg - estimated with MRI and histology were found between BD and EqMRI, MVDE and 2CXM and IHVS and ETM. Except for the ETM, no significant differences between the  $v_b$  medians of all MRI methods were revealed with the Wilcoxon rank sum test. The same holds for all muscle regions using the 2CXM and MVDE. Except for cranial thigh muscle, no significant difference was found between EqMRI and MVDE. And except for the cranial thigh and the lower leg muscle, there was also no significant difference between the  $v_b$  medians of BD and MVDE. Overall, there was good  $v_b$  agreement between histology and the BPCA MRI methods and the 2CXM LMCA approach with the exception of the ETM method. Although LMCA models have the advantage of providing excellent curve fits and can in principle determine more physiological parameters than BPCA methods, they yield more inaccurate results.

## Introduction

Capillaries form a microvascular network that supplies the tissue with nutrients. Changes in microcirculation can be used as a diagnostic indicator of abnormal lesions and to optimize the treatment of disease [1]. For example, the fractional tissue blood volume,  $v_b$ , which is defined as the volume fraction inside the capillary bed [2], represents one of the most valuable parameters for noninvasive tumor grading and can be estimated using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) [3, 4].

DCE-MRI can be performed with different MRI sequence settings and contrast agents, thus enabling detailed assessment of microvascular integrity [5, 6]. This MRI technique enables diagnostic estimation of individual tumor vessel parameters and assessment of the response of tumor vessels to various forms of therapy [7, 8]. Using intravascular contrast agents (also called blood pool contrast agents, BPCA),  $v_b$ , and blood flow inside a voxel can be estimated. BPCA have the advantage that short acquisitions of 1-2 minutes are sufficient to determine vascular parameters. Imaging with well-established extravasating contrast agents (low-molecular contrast agents, LMCA) on the other hand require about ten minutes to acquire meaningful data [2].

DCE-MRI using LMCA enables determination of the interstitial volume fraction and permeability surface area product and other parameters. So far, the most widely used pharmacokinetic model applied to data of this kind in clinical routine is the extended Tofts model [9]. However, it has the disadvantage of not taking into account the dispersion of the contrast agent bolus while passing through the vascular system, which results in considerable underestimation of blood volume [10, 11]. Moreover, its parameter,  $K^{trans}$ , combines various types of essential information on tissues structure and function into a single quantity.

Combined administration of an LMCA and a BPCA has the potential to separate more accurately the relevant physiological transport processes (perfusion and permeation) [2, 12, 13]. Improvement of MRI scanner hardware and image reconstruction software has led to an increase in image quality and temporal resolution combined with good spatial coverage, which makes an evaluation of more complicated models conceivable, e.g., the two-compartment exchange model (2CXM) [1, 2]. More elaborate models presumably describe the microvascular tissue structure and function more realistically and are likely to provide more detailed and reliable information on tumor pathophysiology.

Abnormal formation of new vessels by sprouting or splitting processes (neoangiogenesis), initiated by growth proteins secreted by the tumor for the sole purposes of its own nutrient supply, leads to an anarchistic vascular organization of largely dilated microvessels accompanied by significantly increased arteriovenous shunt flow [13–15]. The degree of angiogenesis is an essential biomarker providing information on the activity and malignancy of brain tumors [16]. Increasing density of tumor neovascularization is a prominent sign of increasing histological grade and progression of many types of tumors. Histologically, neovascularization is quantified by measurement of microvascular density [17].

Microvascular blood volume has become important in the study of tissue malignancy in low-perfused organs such as skeletal muscle and the breast [13, 18–20] as well as in highly perfused brain tumors [3, 4, 21–27]. Preclinical BPCA-DCE-MRI results suggest that tumor vascular permeability or tumor blood volume clearly correlates with tumor grade and tumor angiogenesis, as estimated by histological microvascular density quantification, and with tumor response to anti-angiogenic therapy [28]. In addition, the endothelial walls of tumor vessels become more permeable. Therefore, the simultaneous determination of endothelial permeability and tumor blood volume in a single test in the same subject is desirable.

In vivo studies of the well-described skeletal muscle of large mammals with DCE-MRI provide detailed insights into the contrast enhancement of low-perfused tissue, and thus provide a clearer understanding of the functional and structural composition of its tissue architecture. The findings from well-reproducible studies in healthy homogeneous tissue constitute an essential reference for the clinical detection and characterization of malignant tissue in humans. In particular, the pig is a well-suited biomedical non-rodent model for the pharmacokinetics of the human microvasculature because it shares various physiological similarities with humans, especially with regard to its cardiovascular system [29]. Pig hearts are about the same size as human hearts, and coronary blood flow, hemodynamics, and myocardial contractility are similar [30]. Moreover, using domestic pigs as a model allows choosing animals with a body weight similar to humans to ensure maximum comparability. Thus, in the present study, swine skeletal muscle was used to validate the ability of pharmacokinetic DCE-MRI models to quantify the blood volume fraction.

## Materials and Methods

### Animals

In the present study, 14 adult female pigs (German Landrace or hybrid form; age: approximately 20 weeks; body weight: 56 to 67 kg; no food restriction) were sacrificed. Before this study, another 6 pigs were used to develop and optimize the surgical technique [31] and to establish optimal DCE-MRI and anatomical MR imaging protocols. Two or three animals at a time were bought from a local pig breeding farm. Two weeks before the experiments they were housed together in a 20 square meter vivarium with species-appropriate entertainment facilities. Only healthy animals without known cardiovascular or musculoskeletal disorders were used. The pigs were not fed overnight prior to the experiment but had free access to water. The local institutional ethics committee, the Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Approval No. 84-02.04.2012.A208), authorized the animal study, and all experiments were performed in accordance with the German Animal Protection Act. An MRI-compatible monitoring device (Veris, Medrad, Germany) was used for monitoring heart rate and oxygen saturation. None of the pigs woke up during any phase of the experiments. At the end of the experiment, the pig was euthanized under a higher anesthetic dose and by the injection of T61 (0.3 mL/kg).

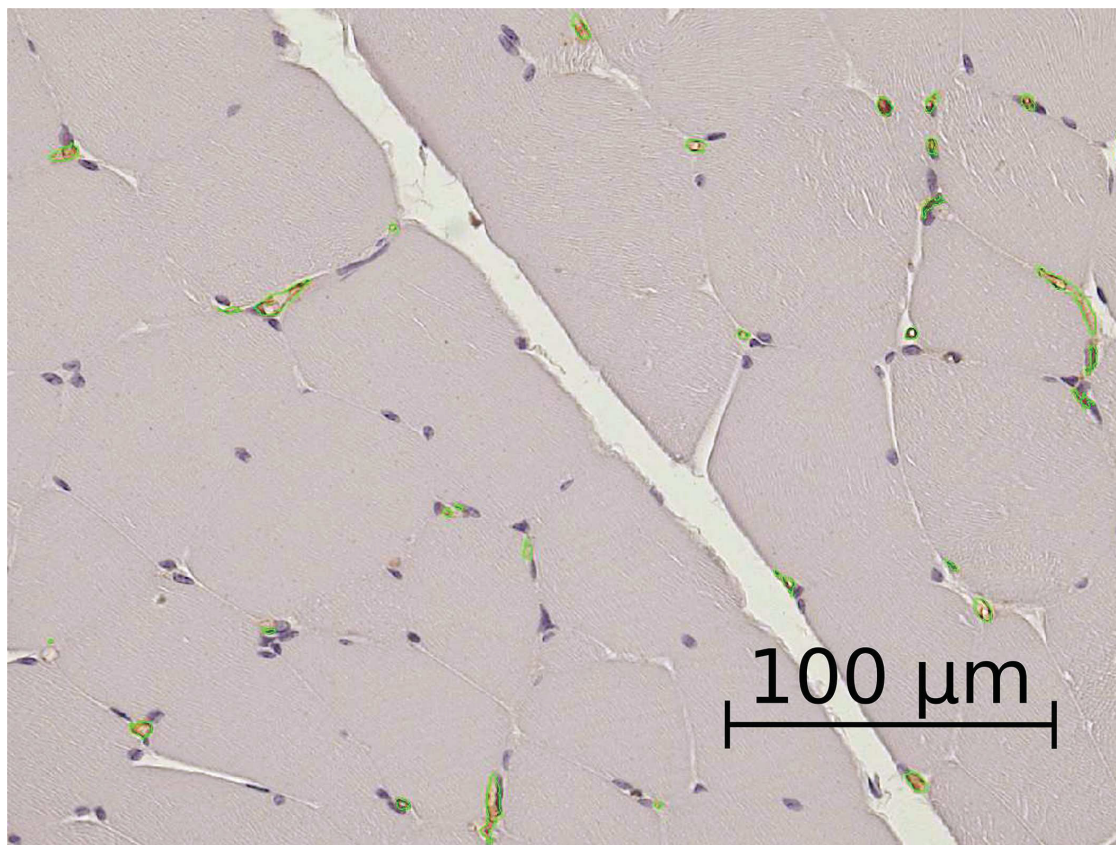
## Surgical Technique and Histology

All surgical procedures were performed, under aseptic conditions, in an operating room equipped for large animals. The pigs were premedicated via an intra-muscular injection of 30 mg/kg ketamine (ketamine 10%, Ceva Tiergesundheit GmbH, Germany), 2 mg/kg azaperone (Stresnil Janssen-Cilag GmbH, Germany), and 0.02–0.05 mg/kg atropine sulfate (Atropinsulfat, B. Braun Melsungen AG, Germany). A peripheral 20-G venous catheter was placed in a ear vein and, approximately 30 min after premedication, total intravenous anesthesia was initiated. A perfusor was used to inject 4–7 mg/kg/h propofol (Propofol-ratiopharm, Ratiopharm, Germany), 0.1–0.5 mg/kg/h midazolam (midazolam injection solution 0.5%, Germany), and 0.0015 mg/kg/h fentanyl (fentanyl citrate solution 3.9 mL/50 mL, Germany). A tracheal tube was placed (Hi-Contour cuffed tracheal tube, ID 8.0, Mallinckrodt, Ireland), and the pig was ventilated with a respiratory device (Fabius, Draeger, Germany). The tidal volume was set at 10 mL/kg, the respiratory rate at 12–14 breaths/min, and the positive end-expiratory pressure at 5 mbar. The tidal volume and frequency were adjusted to keep end-expiratory CO<sub>2</sub> within 35–40 mmHg and to maintain at least 95% peripheral oxygen saturation. A central venous catheter (3-Lumen-ZVK-Set, ARROWgard Blue, Arrow, Germany) was placed in the jugular vein on the right side of the neck; the central venous catheter was used for administration of the contrast agent (CA).

In six experiments, MRI acquisitions were followed by obtaining muscle biopsies (1 × 1 × 1 cm) from the lateral (biceps femoris muscle), the cranial (rectus femoris muscle) and the medial (gracilis muscle and adductors) thigh muscles and from the lower leg muscle (gastrocnemius muscle). Except of one, these experiments were no subset of the MRI experiments. The tissue samples were fixed in formaldehyde (4.5%), embedded in paraffin and cut with a rotary microtome (HM355S, Microm International GmbH, Walldorf, Germany) into 2–3 μm-thick sections.

Vascular endothelium was labeled using immunohistochemical staining with isolectin. The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a descending alcohol series (100%, 95%, 70%) and tap water. Subsequently, the sections were placed in a 3% solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min and rinsed with wash buffer (DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany). This step was followed by a protein block with 10% donkey normal serum (DNS) in Dako Real Antibody Diluent (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) for 60 min at room temperature. The sections were rinsed with wash buffer and stored at 4°C over night in a solution of isolectin (Biotinylated *Bandeiraea simplicifolia* lectin I Isolectin B4, Vector Laboratories, inc., Burlingame, USA) at a dilution of 1:100 or 1:500 with block buffer (10% DNS in Dako Real Antibody Diluent). After rinsing with wash buffer, the sections were overlaid for 45 min with streptavidin-HRP (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) at a dilution of 1: 500 and then rinsed again. After that the sections were placed in diaminobenzidine (DAB) solution twice for five minutes and again rinsed with wash buffer. This was followed by counterstaining with hematoxylin and blueing under running tap water. The sections were dehydrated in ascending alcohol series (70%, 95%, 100%) and xylene and covered with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

The samples were examined with a light microscope (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). From each muscle section, 20 images (magnification 400×) were taken with a special camera. Images were taken randomly in a meandering manner, selecting only low-artifact fields of view, where possible without breaks or overlays. This was followed by semiautomatic analysis of the images with the microscope's morphometry software (Zeiss Axio Vision, Axio Vs40 4.6.3.0, Jena, Germany).



**Fig 1. Light microscopy image of a histological preparation from the medial thigh muscle with vascular endothelium stained brown by isolectin.** The selection was performed by semiautomatic analysis of the images with the microscope's morphometry software to determine the area, number and diameter of the vessels. The outer borders of the segmented vessels are labeled in green.

doi:10.1371/journal.pone.0170841.g001

**Immunohistochemical Vessel Staining Estimation Method.** The images of isolectin-stained sections were segmented using a first threshold set to label the whole tissue area including muscle cells, connective tissue, vessels, vessel lumina and other tissue structures. The tissue area was determined. A second threshold was set to label brown-colored endothelial cells (Fig 1). Manual correction was performed to include vessel lumina while excluding falsely detected areas such as cell nuclei. The area, number and diameter of the vessels were determined. [S1 File](#)

Parameter analysis was performed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Washington, United States). First, the total tissue area was determined. The tissue areas composed of muscle cells, connective tissue, vessels and their lumina, and other tissue structures were determined in square microns using the morphometry software. Note that paraffin embedding leads to tissue shrinkage and makes intercellular spaces appear larger.

Thus, the fluid-filled portions of the intercellular spaces cannot be determined reliably. In a previous study, the percentage of interstitial fluid space (IFS) in frozen sections was determined [32]. We added this value to the morphometrically determined tissue area in this study to obtain the total tissue area. Then the percentage of the vascular area of the total tissue area was determined. The diameter of the vessels was calculated by the morphometry software in microns. Since tissue processing is associated with approx. 20% shrinkage [33], this shrinkage loss was added to the output value. In the following, we refer to this method of histological blood volume determination as immunohistochemical vessel staining (IHVS).

**Microvascular Density Estimation Method.** Using the sites of the vessels determined for IHVS, microvascular density (MVD) was calculated as the number of these vessels per square micrometer. For a second method to estimate the fractional blood volume histologically, the MVD was used to estimate the true vascular lumen. The MVD was multiplied by the average estimated capillary lumen,  $(d/2)^2 \cdot \pi$ , given by the mean capillary diameter,  $d$ , assumed to be  $d = 8\mu\text{m}$  [34]. In the following, we refer to this method as microvascular density estimation (MVDE).

## MRI Technique

The pig was positioned supine on the scanner table. The MR scanner table had a built-in 32-channel coil (Siemens Magnetom Aera 1.5 T, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). A body surface coil (array body coil, 18 RF channels, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) was placed on the lower body of the pig. Heart rate and oxygen saturation were monitored with an MR-compatible device (Veris, Medrad, Germany).

Nine of the 14 pigs were investigated using MRI methods to estimate fractional blood volume. To create relaxation-rate-change-time curves, baseline magnetization and relaxation rates were determined before each dynamic acquisition using a T1w 3D gradient echo sequence (TWIST, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) with different flip angles ( $\alpha = 5^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $20^\circ$ , and  $30^\circ$ ). The sequence parameters were: TR = 2.69 ms, TE = 0.86 ms, voxel size:  $2.9 \times 2.9 \times 4.5\text{mm}^3$ ,  $160 \times 128 \times 48$  reconstruction matrix, frequency encoding in the axial direction, parallel imaging (GRAPPA) in 3D with 32 central k-space lines and an acceleration factor of 6. The central k-space region was 100%, i.e., k-space sharing was not used for the baseline acquisitions. To improve reproducibility of signal recordings, automatic sequence adjustments were turned off.

The subsequent first 100 dynamic acquisitions were performed using both, peripheral recording density and a central region of 20% each. The other settings were the same as for the baseline acquisitions, except flip angle  $\alpha = 30^\circ$ . k-space sharing ensured a temporal resolution of approx. 1.5 sec. The LMCA (Dotarem, Gadoteric Acid, 0.5 mmol/mL, molecular weight 0.56 kDa, Guerbet, France, 0.2 mL/kg body weight) was administered at an injection rate of 5 mL/sec during the dynamic scan starting after acquisition of the fifth image and was directly followed by a 20 mL saline flush injected at the same rate. The 100 3D GRE acquisitions with high temporal resolution were followed by 250 acquisitions with a read-out fraction of the central k-space of 50% and an identical peripheral k-space sampling density. These settings resulted in a lower temporal resolution (approx. 3.5 sec) for the wash-out of the LMCA.

After each acquisition with LMCA we performed a BPCA acquisition using the same sequence settings as before. After the fifth acquisition of the first dynamic sequence, 0.1 mL/kg body weight BPCA (0.25 mMol/mL gadofosveset trisodium, Vasovist Bayer Schering, Berlin, Germany/Ablavar, Lantheus Medical Imaging, Inc., USA) was injected via the central venous catheter at a flow rate of 5 mL/s followed by 20 mL saline using the same injection rate. The molecular weight of the active chelate is 957 Da, but bonding of the contrast agent to serum

albumin effectively increases the molecular weight to 68 kDa, resulting in a compound with macromolecular properties [35, 36]. More details of the entire experimental setup can be found elsewhere [31, 32].

### Image Data Processing

The baseline 3D GRE images acquired with different flip angles were used to determine baseline longitudinal relaxation rate ( $R_{10}$ ) and magnetization ( $M_0$ ). Together with the k-space-shared dynamic acquisitions, the time-dependent 3D relaxation rate change maps  $\Delta R_1(t)$  were generated using the method of Li et al. [37].  $\Delta R_1(t)$  was assumed to be proportional to the time-dependent contrast agent concentration. [S2 File](#)

To avoid partial volume effects, the estimated arterial input function (AIF),  $c_a^{(est)}(t)$ , was determined from voxels that definitely were completely in the abdominal aorta. The AIF volume of interest consisted of approx. 20 voxels with a total volume of approx. 750 mm<sup>3</sup>.

Morphological images and the pre- and post-LMCA difference images (T1-TSE) and the dynamic GRE images with local contrast agent administration were used for contouring the medial thigh muscle. For tracer kinetic modeling, averaged relaxation rate change time curves of these virtually segmented muscle regions were used.

We used the Amira Dev 5.2 visualization package (Mercury Computer Systems, Berlin, Germany) on a Debian Linux 64 bit workstation with eight 3.4 GHz processors and 16 GB RAM for virtual segmentation of the muscle area of interest and for calculation of the relaxation rate change time curves. The functionality of Amira 5.2 has been extended for the applicability of software packages that are included as link libraries in AmiraDev.

### Blood Volume Quantification Methods

Four different methods of blood volume quantification were applied—two using BPCA and two LMCA. They are briefly described in the following paragraphs. For detailed information we refer to the literature.

**Extended Tofts Model (ETM).** The extended Tofts model is described in detail in [1, 2, 9]. It is mathematically described as follows:

$$c_t(t) = v_p \cdot c_a(t) + K^{\text{trans}} \cdot e^{-k_{\text{ep}} t} \otimes c_a(t), \tag{1}$$

where  $c_t(t)$  and  $c_a(t)$  are the concentration-time curves of the tissue of interest and of the blood plasma of the artery supplying the tissue, respectively.  $v_p$  is the fractional plasma volume. In case of a compartmental description [38]:

$$K^{\text{trans}} = \frac{F_p \cdot PS}{F_p + PS}. \tag{2}$$

The permeability-surface product,  $PS$ , describes the exchange of the CA between the vascular and the interstitial compartment over the endothelial barrier. The transfer constant from the interstitial space back to the blood plasma,  $k_{\text{ep}}$ , is defined as follows:

$$k_{\text{ep}} = \frac{K^{\text{trans}}}{v_e}. \tag{3}$$

Here,  $v_e$  is the interstitial volume fraction. Plasma perfusion  $F_p$  is related to blood perfusion  $F$  by the relationship  $F_p = F \cdot (1 - \text{Hct}_t)$ , where  $\text{Hct}_t$  is the microvascular or tissue hematocrit level.

For LMCA data, we used the estimated arterial input function,  $c_a^{(est)}(t)$ , measured in the aorta, to calculate the arterial plasma concentration also known as arterial input function,  $c_a(t)$ , at the inlet of the vascular compartment of the tissue of interest, taking into account a time delay  $\Delta t$ :

$$c_a(t) = c_a^{(est)}(t - \Delta t). \tag{4}$$

Fig 2a shows an example of the corrected AIF measured in the abdominal aorta with use of LMCA. The arterial blood concentration,  $c_{a,b}(t)$ , is directly related to the arterial plasma concentration,  $c_a(t)$ , by the arterial hematocrit level:  $c_{a,b}(t) = c_a \cdot (1 - \text{Hct}_a)$  ([2]). For the arterial blood of the pig, we used an estimated value of  $\text{Hct}_a = 0.4$  ([39, 40]). The concentration-time curve in the tissue of interest is given by  $c_t(t)$ , and the fractional plasma volume,  $v_p$ , is related to the fractional blood volume by the relationship  $v_p = v_b \cdot (1 - \text{Hct}_t)$ . In this study, we assumed the level of microvascular or tissue hematocrit,  $\text{Hct}_t = 0.2$ , to be 50% of the arterial hematocrit [41].

Fig 2b shows  $\Delta R(t)$  of the fit of the medial thigh and the fit of ETM to  $\Delta R(t)$  data. Also shown are the blood plasma (blue dashed line) and the interstitial contribution (green dots). The ETMs vascular contribution is the AIF downscaled by the factor  $v_p$ .

**Two-Compartment Exchange Model (2CXM).** A more general model for the distribution of contrast agent in tissue is the two-compartment exchange model [1, 2]. Unlike the ETM, the 2CXM accounts for broadening of the AIF in the vascular compartment and can be described by the following two mass balance equations:

$$v_p \frac{dc_p(t)}{dt} = F_p \cdot c_a(t) - F_p \cdot c_p(t) + PS \cdot c_e(t) - PS \cdot c_p(t) \tag{5}$$

$$v_e \frac{dc_e(t)}{dt} = PS \cdot (c_p(t) - c_e(t)). \tag{6}$$

The total tissue concentration is calculated as

$$c_t(t) = v_p \cdot c_p(t) + v_e \cdot c_e(t). \tag{7}$$

Here,  $c_e$  is the interstitial CA concentration. Fig 2c shows  $\Delta R(t)_1$  measured using LMCA and the fit of the 2CXM in comparison to ETM to the same data.

**Bolus Deconvolution (BD).** To describe the distribution of the BPCA in the vascular system of the tissue according to the indicator dilution theory, we estimated the tissue blood concentration,  $c_b$ , by convolution of the first 45 seconds of the AIF with a single exponential [42]:

$$c_b(t) = \xi \cdot F \cdot c_a(t) \otimes H(t), \tag{8}$$

where  $F$  is blood perfusion and  $H(t)$  the residue function with the vascular mean transit time,  $MTT$ :

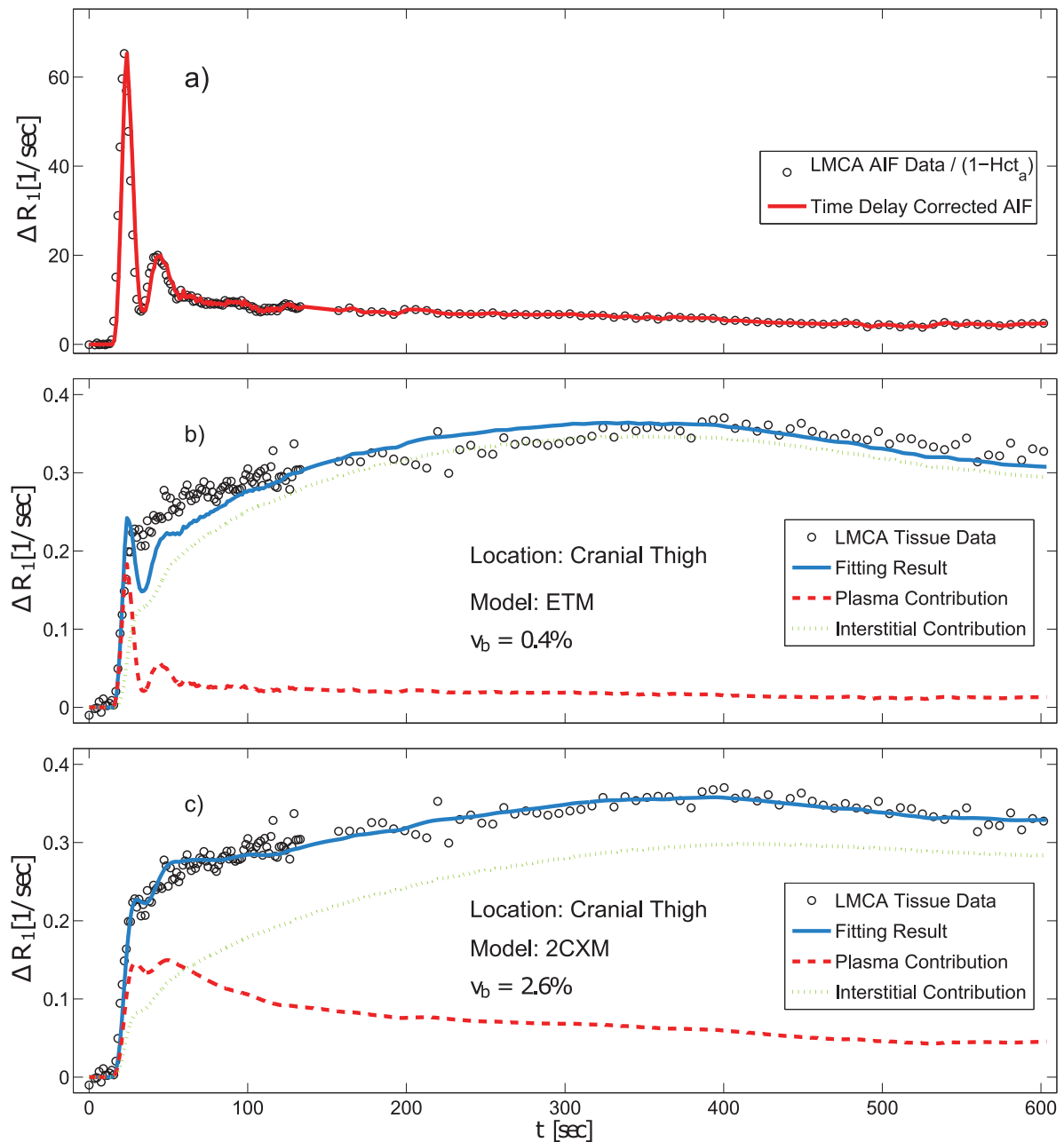
$$H(t) = e^{-t/MTT}, \tag{9}$$

and the blood volume is calculated via the central volume theorem [42]:

$$v_b = MTT \cdot F. \tag{10}$$

Factor  $\xi$  in Eq (8) is a proportionality constant which depends on the difference in hematocrit levels between capillaries and large vessels. It compensates for the fact that only the plasma volume is accessible to the contrast agent. Technically, it also depends on the density of the





**Fig 2. Representative LMCA relaxation-rate-change time curves measured a) in the aorta and b) and c) in the medial thigh muscle are shown using black circles.** Fig a) shows the bolus-delay-corrected arterial input function (red solid line) related to the arterial hematocrit  $Hct_a$ . Fig b) demonstrates the curve fitting result with the ETM and Fig c) the result with the 2CXM (red solid lines) and individual results for the plasma fraction (blue dot-dashed line) and the interstitial contribution (green dotted line). Obviously, the data are much better fitted using the 2CXM. Taking bolus broadening into account, the 2CXM yields

a significantly larger area under the curve for the plasma contribution compared to the ETM, where the plasma compartment is merely the AIF scaled down with the plasma volume. As a result of the larger blood plasma fraction, the interstitial contribution using the 2CXM is lower, especially during the CA uptake period.

doi:10.1371/journal.pone.0170841.g002

tissue, which is set to 1.0 g/mL in this study. In this way we can assume:

$$\xi = \frac{1 - \text{Hct}_t}{1 - \text{Hct}_a} \tag{11}$$

To calculate the AIF  $c_a(t)$  for the capillary compartment we corrected  $c_a^{(est)}(t)$  for delay  $\Delta t$  and dispersion times  $1/\beta$ :

$$c_a(t) = c_a^{(est)}(t + \Delta t) \otimes h(t), \tag{12}$$

where

$$h(t) = \beta \cdot e^{-\beta t} \tag{13}$$

is the vascular transport function that describes bolus dispersion during effective transit time  $1/\beta$  from the site of AIF measurement to the entry of the particular region of interest. Details of this method can be found for example in [43–46]. Fig 3a presents relaxation rate changes,  $\Delta R_1(t)$ , of the measured and dispersion-corrected AIF. Fig 3b presents an example of the BD fit to the blood tissue  $\Delta R_1(t)$  curve measured in the medial thigh muscles of intravascular contrast agent enhancement in the tissue after bolus injection.

**Equilibrium MRI (EqMRI).** Starting 40 seconds after bolus arrival, both the concentration-time curves of the BPCA-AIF and the curve of the tissue blood were averaged over a period of 20 seconds. In this period, we assumed an approximate equilibrium of contrast agent concentration. To estimate the blood volume, these two averages were related to each other [47]:

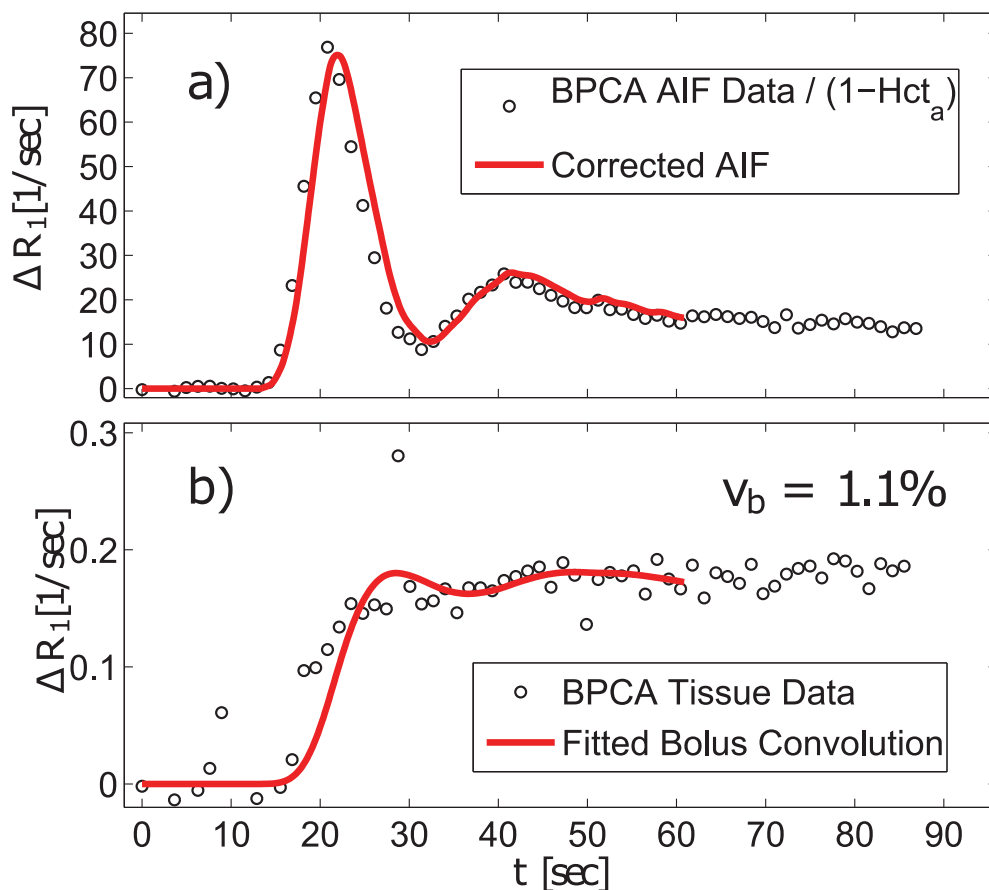
$$v_b = \xi^{-1} \cdot \frac{\langle c_b(t) \rangle_{t=40s}^{t=60s}}{\langle c_a(t) \rangle_{t=40s}^{t=60s}}, \tag{14}$$

with  $\xi$  as defined in Eq (11). Fig 4 shows the method based on the same data as in Fig 3 for the AIF (a) and the tissue blood signal (b). Here, the red solid lines represent the mean values of the relaxivity rate change over an interval of 20 sec, starting 40 sec after bolus arrival.

### Curve Fitting

To produce an approximation of the relaxation rate change time curve information that would have been obtained by sampling the signal at a higher rate, we performed temporal upsampling to 0.1 sec by linear interpolation. This procedure was carried out to propagate the model fit flexibility by a higher possible temporal interframe correspondence between the estimated AIF,  $c_a^{(est)}$ , and the tissue time course,  $c_t(t)$ . For both model fits, ETM and 2CXM, we used the first ten min of the relaxation-rate-change time curves.

We implemented the curve fitting algorithm in MATLAB 2011b (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) and applied MATLAB's constrained nonlinear optimization algorithm (fmincon) with a sequential quadratic programming method. A multi-start method with 1,000 starting points was used to find the global optimal solution for the set of model parameters. The boundaries of the parameter space were set to a wide range and were set the same for all models. The starting value of the time delay,  $\Delta t$ , was estimated from the individual bolus arrival time (BAT).

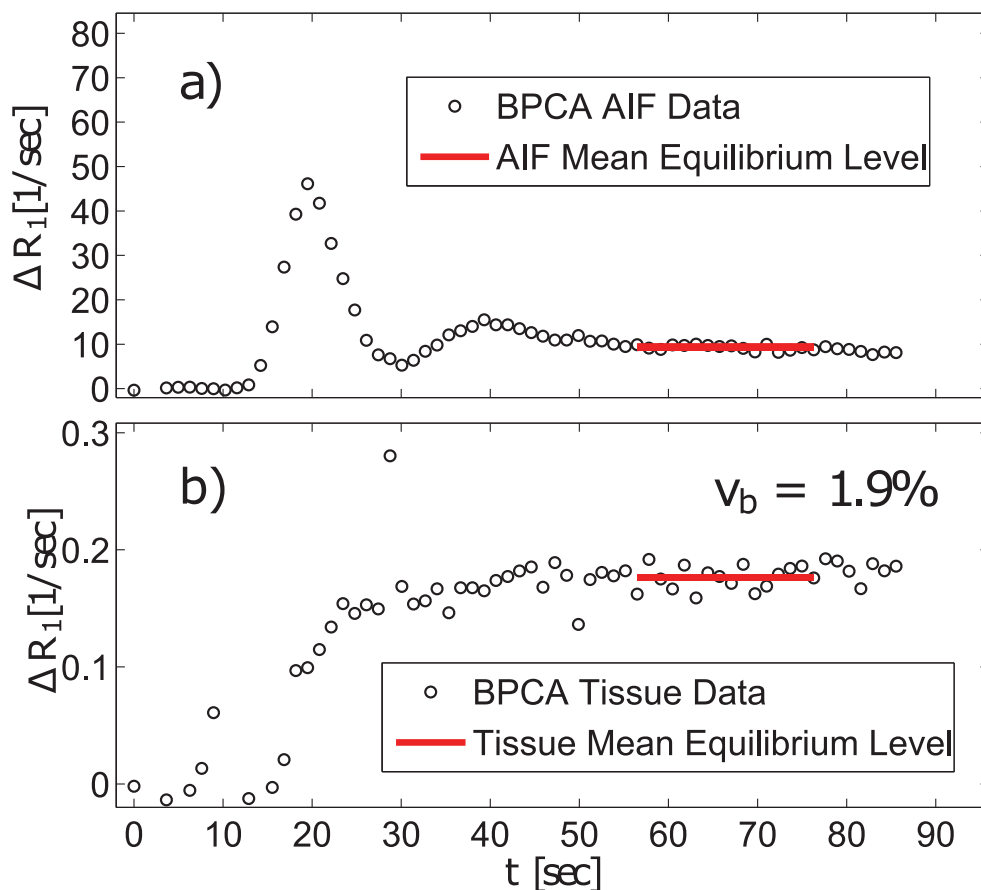


**Fig 3.** BPCA data recorded from CA-induced time-dependent relaxation rate changes in a) the aorta (related to the arterial hematocrit level  $Hct_a$ ) and b) the medial thigh muscle (black circles) of the same experiment as the examples in Fig 2. Additionally, in a) the time delay and bolus-dispersion-corrected AIF and in b) one example of the fitting results with the BD method (red solid lines) is shown. As indicated by the statistical results (Table 1),  $v_b$  is determined lower by BD compared with 2CXM (Fig 2) and EqMRI (Fig 4).

doi:10.1371/journal.pone.0170841.g003

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) and MATLAB R2011b. All results were expressed as medians with interquartile ranges, IQR (the difference between third and first quartile), as variances. Correlations were calculated using Pearson ( $r_p$ ) and Spearman ( $r_s$ ) correlation coefficients considering  $p < 0.05$  to indicate significant differences.



**Fig 4.** For the EqMRI method, the same BPCA relaxation rate changes as in Fig 3 are shown as black circles. No correction with respect to the arterial hematocrit level was performed at this point. Red solid lines represent the estimated average equilibrium states of a) the AIF in the aorta and in b) the medial thigh muscle (black circles) according to Eq (14) are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0170841.g004

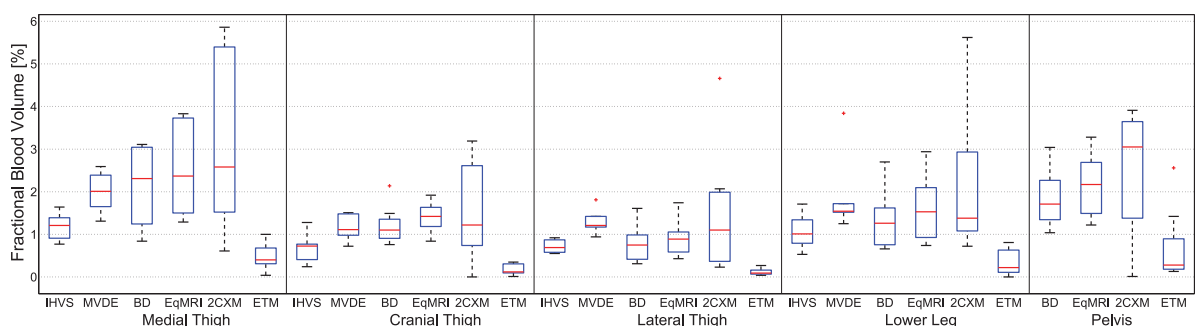
### Results

Isolectin staining of the medial thigh muscle labeling endothelium enabled determination of the vascular area (Fig 1). A clear separation of the different compartments is apparent. However, owing to collapse of blood vessels due to the disappearance of blood pressure, this method most likely underestimates the in vivo blood volume. The percentage of the segmented vascular area relative to the total muscle area was compared to the in vivo blood volume determined by MRI, see Table 1. Table 1 and Fig 5 present the  $v_b$  values obtained with the two histological (IHVS and MVDE) and with four different MRI techniques (BD, EqMRI, ETM, and 2CXM) in different muscle groups [46] of the pigs' hind legs.

**Table 1. Median values of the model parameter  $v_b$  with first (Q1) and third quartiles (Q3) and interquartile ranges (IQR) obtained with the different models and methods in the different skeletal muscle regions of the pigs' hind legs. Also shown are the mean values of the contrast-to-noise ratio (CNR) of the CA time courses for each muscle region. The mean CNRs of the AIFs were  $80 \pm 40$  ( $92 \pm 37$ ) for the BPCA (LMCA) measurements, respectively.**

Tissue	Technique	CNR	Method	Median [%]	Q1 [%]	Q3 [%]	IQR [%]			
Med. Thigh	Histology		IHVS	1.2	1.0	1.4	0.4			
			MVDE	2.0	1.7	2.4	0.7			
	MRI		BD	2.3	1.3	3.0	1.7			
			EqMRI	2.4	1.6	3.7	2.2			
			2CXM	2.6	1.6	5.4	3.8			
			ETM	0.4	0.4	0.7	0.3			
Cran. Thigh	Histology		IHVS	0.7	0.5	0.8	0.3			
			MVDE	1.1	1.0	1.4	0.4			
	MRI		BD	1.1	1.0	1.3	0.4			
			EqMRI	1.4	1.3	1.6	0.3			
			2CXM	1.2	0.8	2.6	1.8			
			ETM	0.1	0.1	0.3	0.2			
Lat. Thigh	Histology		IHVS	0.7	0.6	0.8	0.3			
			MVDE	1.2	1.2	1.4	0.2			
	MRI		BD	0.7	0.4	0.9	0.5			
			EqMRI	0.9	0.6	1.0	0.4			
			2CXM	1.1	0.4	2.0	1.6			
			ETM	0.1	0.1	0.1	0.1			
Lower Leg	Histology		IHVS	1.0	0.8	1.3	0.5			
			MVDE	1.5	1.5	1.7	0.2			
	MRI		BD	1.3	0.8	1.6	0.8			
			EqMRI	1.5	0.9	2.0	1.1			
			2CXM	1.4	1.1	2.8	1.7			
			ETM	0.2	0.1	0.6	0.5			
Pelvis	MRI		BD	1.7	1.4	2.3	0.9			
			EqMRI	2.2	1.5	2.7	1.1			
			2CXM	3.1	1.8	3.6	1.8			
			ETM	0.3	0.2	0.7	0.5			

doi:10.1371/journal.pone.0170841.t001



**Fig 5. Box plots of the model parameter  $v_b$  obtained with the different models and methods in the different skeletal muscle regions of the pigs' hind legs.**

doi:10.1371/journal.pone.0170841.g005

**Table 2. Spearman correlation coefficients of the individual results of the four MRI methods for the muscle groups in the hind legs of the pigs and Wilcoxon rank sum test results between the different MRI methods and between MRI and histology.**

		EqMRI-BD	BD-ETM	BD-2CXM	ETM-2CXM	2CXM-EqMRI	ETM-EqMRI	BD-MVDE	EqMRI-MVDE	ETM-MVDE	2CXM-MVDE
Med. Thigh	$r_S$ ( $p_S$ )	0.95 ( $<10^{-3}$ )	0.75 ( $<0.05$ )	0.88 ( $<10^{-2}$ )	0.88 ( $<10^{-2}$ )	0.88 ( $<10^{-2}$ )	0.83 ( $<10^{-2}$ )	–	–	–	–
	$p_W$	n.s.	$<10^{-4}$	n.s.	$<10^{-3}$	n.s.	$<10^{-4}$	n.s.	n.s.	$<0.05$	n.s.
Cran. Thigh	$r_S$ ( $p_S$ )	1.0 ( $<10^{-5}$ )	0.28(n.s.)	0.78 ( $<0.05$ )	0.58 (n.s.)	0.78 ( $<0.05$ )	0.28 (n.s.)	–	–	–	–
	$p_W$	n.s.	$<10^{-4}$	n.s.	$<10^{-3}$	n.s.	$<10^{-4}$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	n.s.
Lat. Thigh	$r_S$ ( $p_S$ )	1.0 ( $<10^{-4}$ )	-0.27 (n.s.)	0.89 ( $<10^{-2}$ )	-0.3 (n.s.)	0.89 ( $<10^{-2}$ )	-0.23 (n.s.)	–	–	–	–
	$p_W$	n.s.	$<10^{-4}$	n.s.	$<0.01$	n.s.	$<10^{-4}$	n.s.	n.s.	$<0.05$	n.s.
Lower Leg	$r_S$ ( $p_S$ )	0.99 ( $<10^{-4}$ )	0.29 (n.s.)	0.89 ( $<10^{-2}$ )	0.27 (n.s.)	0.88 ( $<10^{-2}$ )	0.28 (n.s.)	–	–	–	–
	$p_W$	n.s.	$<0.01$	n.s.	$<10^{-3}$	n.s.	$<10^{-4}$	$<0.05$	n.s.	$<0.05$	n.s.
Pelvis	$r_S$ ( $p_S$ )	0.58 (n.s.)	0.52 (n.s.)	0.82 ( $<0.05$ )	0.77 ( $<0.05$ )	0.78 ( $<0.05$ )	0.77 ( $<0.05$ )	–	–	–	–
	$p_W$	n.s.	$<0.05$	n.s.	n.s.	n.s.	$<0.01$	–	–	–	–
Combined	$r_S$ ( $p_S$ )	0.94 ( $<10^{-20}$ )	0.54 ( $<10^{-3}$ )	0.81 ( $<10^{-10}$ )	0.47 ( $<10^{-2}$ )	0.79 ( $<10^{-10}$ )	0.63 ( $<10^{-5}$ )	–	–	–	–
	$p_W$	n.s.	$<10^{-11}$	n.s.	$<10^{-9}$	n.s.	$<10^{-12}$	$<10^{-2}$	n.s.	$<10^{-6}$	n.s.

doi:10.1371/journal.pone.0170841.t002

For the respective muscle areas, the different methods yield comparable  $v_b$  values. In particular, there is good agreement between MRI and histological MVDE. One exception are the ETM results, which are in a range of only about 10-20% of the results obtained with the different MRI methods investigated. Although the 2CXM coincides in median and mean values with those of the two BPCA methods and MVDE, it yields high variances. Overall, the highest median values were found for the medial thigh muscles. The lowest values were obtained for the cranial and lateral thigh muscles.

In the medial thigh muscle, histological measurements yielded a median  $v_b^{MVDE}$  of 2% and a median  $v_b^{IHVS}$  of 1.2%. The three methods EqMRI, BD and 2CXM yielded higher volumes of 2.3%, 2.4% and 2.6%, respectively. The medians of MVDE (IHVS) were found to be at lower levels of 1.1% (0.7%) to 1.5% (1.0%) in the cranial and lateral thigh muscles and in the lower leg. For all muscle areas, much lower median values were obtained with the ETM, ranging from 0.1% (cranial and lateral thigh) to 0.4% (medial thigh). Histology yielded the lowest variance, expressed by the interquartile range (IQR), in all muscle areas. In the medial thigh, for example, MVDE (IHVS) IQR was 0.7% (0.4%) versus 1.7%, 2.2% and 3.8% for BD, EqMRI and 2CXM, respectively. In the other muscle groups, only the intravascular methods, BD and EqMRI, yielded IQRs that were partially as low as those of histology (i.e., in the cranial thigh).

Each of the four median value pairs, measured in the muscle areas of medial, cranial, lateral thigh and lower leg, were correlated for the different measuring methods. Significantly high Pearson correlation coefficients were only found for BD and EqMRI ( $r_P = 0.99$ ,  $p_P < 0.01$ ), for MVDE and 2CXM ( $r_P = 0.99$ ,  $p_P < 0.01$ ), and for IHVS and ETM ( $r_P = 0.96$ ,  $p_P < 0.05$ ).

Table 2 presents the Spearman correlation coefficients for the individual values of the 9 MRI experiments for the different muscle areas and for the comparisons of MRI methods. In medial thigh muscle, significant correlations between all methods were observed. Correlation was highest between the two BPCA methods, EqMRI and BD ( $r_S = 0.95$ ,  $p_S < 0.001$ ), and lowest

between BD and ETM ( $r_S = 0.75$ ,  $p_S < 0.05$ ). Except for the pelvis, the correlation between EqMRI and BD was very high and clearly significant for all muscle segments, with values up to  $r_S = 1.0$ . In all other muscle regions, no significant correlation was detected between the ETM and the other MRI methods. An exception was the measurement in the pelvis, where a correlation between the ETM and the 2CXM and between the ETM and EqMRI of both  $r_S = 0.77$  ( $p_S < 0.05$ ) was maintained. Between the intravascular contrast agent methods and the 2CXM, significant correlations were revealed for all muscle regions, with values of  $r_S = 0.78$  ( $p_S < 0.05$ ) to  $r_S = 0.89$  ( $p_S < 0.01$ ). The correlation between the combined  $5 \times 12$  values of all muscle areas in all experiments yielded significant correlations between all MRI methods with values of  $r_S = 0.47$  ( $p_S < 0.01$ ) between the ETM and the 2CXM and  $r_S = 0.94$  ( $p_S < 10^{-20}$ ) between BD and EqMRI.

We used the Wilcoxon rank sum test to identify significant differences between the median values for  $v_b$  of different MRI techniques ( $p_W < 0.05$  indicates that the test rejects the null hypothesis of equal medians at the 5% significance level). For the comparison of ETM results with the results of the other methods, no significant correspondence between the medians was detected with one exception: there was a match between the ETM and 2CXM in the pelvis. The last four columns in [Table 2](#) show the Wilcoxon signed rank test p-values for determination of significant matches between the median  $v_b$  results of MVDE histology and all MRI methods. Comparison of histological medians with those of the 2CXM yielded no significant differences for any of the muscle areas investigated. For the ETM, however, the medians were significantly different from those of histology for all muscle groups. Significant differences were found in the cranial thigh muscles for EqMRI and both in the cranial thigh muscles and in the lower leg for BD.

## Discussion

In the present study, we found good agreement between the results obtained with MRI and histology and between the results obtained using the different methods and models with the exception of IHVS histology and the ETM. For all techniques and methods, consistently different  $v_b$  values were found in the different muscle areas investigated. The ETM yielded unrealistic low blood volumes of less than one percent.

Very good correlations between the median blood volumes in all experiments with good conformity of absolute values in a plausible range and with low variance were obtained for the two BPCA methods, BD and EqMRI. Comparable  $v_b$  medians were obtained with MVDE histology, BD, EqMRI, and the 2CXM in the different muscle groups. Significant correlations were found for the median values measured in the four different muscle groups with MVDE (IHVS) histology and the 2CXM (ETM).

The MRI methods, however, yielded much larger  $v_b$  IQRs than histology, and the differences were especially pronounced for use of the 2CXM.

[Table 3](#) lists average blood volume values reported in the literature for different skeletal muscles in different regions and obtained with different methods of analysis. For data obtained by MRI, the contrast agents and imaging techniques used by the investigators are provided. Because some authors do not report the volume of blood but the plasma volume as a result, we calculated the missing volume for all studies using the assumptions mentioned in the present article ( $v_p = v_b(1 - \text{Hct}_t)$ , where  $\text{Hct}_t = 0.2$ ). Reported average  $v_b$  values range from 1.5% (measured by MRI in the posterior hind limb) to approx. 5% (measured by MRI in the pectoral muscle and neck of humans). Our results are consistent with the literature in that different muscle regions have different blood volumes and in that the volumes measured are also roughly comparable. In other muscle regions, e.g., in [\[48\]](#),  $v_b = 2.5\%$  was obtained in the

**Table 3. Comparison of blood and plasma volume fractions of skeletal muscle of different species reported in the literature.**

Species	Skeletal Muscle Location	$v_b$ [%]	$v_p$ [%]	Method	Contrast Agent/Tracer	Ref.
Rabbit	Anterior Leg	2.5 ± 0.7	(2.0 ± 0.6) <sup>a</sup>	SPGR, $T_1$ , Patlak model	Gadomer (17-35 kDa)	[48]
	Dorsal Leg	1.5 ± 0.4	(1.2 ± 0.3) <sup>a</sup>			
Rabbit	Soleus Muscle	(4.3 ± 1.0) <sup>a</sup>	3.4 ± 0.8	TAPIR, $\Delta R_1$ , Ext. Tofts model	Gadomer (17-35 kDa)	[51]
	Tibialis Anterior	(2.6 ± 0.9) <sup>a</sup>	2.1 ± 0.7			
Human	Pectoral	(5.0 ± 1.3) <sup>a</sup>	4.0 ± 1.0	SRTF, $T_1$ , 2CXM	Gd-DTPA (0.94 kDa)	[13]
Human	Neck	4.9 ± 1.3	(3.9 ± 1.0) <sup>a</sup>	DCE-CT, 2CXM	Iopromide	[52]
Human	Femoral Region	3.3 ± 0.1	(2.6 ± 0.1) <sup>a</sup>	PET	[ <sup>15</sup> O]CO	[50]
Human	Femoral Posterior	3.3 ± 0.7	(2.6 ± 0.6) <sup>a</sup>	PET	[ <sup>15</sup> O]CO	[49]
	Femoral Anterolateral	4.7 ± 0.6	(3.8 ± 0.5) <sup>a</sup>			
Rabbit	Leg	3.1 ± 0.3	(2.5 ± 0.2) <sup>a</sup>	PET	[ <sup>15</sup> O]CO	[53]
Rabbit	Thigh	1.8 ± 0.1	(1.4 ± 0.1) <sup>a</sup>	PET	[ <sup>15</sup> O]CO	[54]
Domestic Pig (50 kg)	Abdomen	(2.8 ± 0.5) <sup>a</sup>	2.2 ± 0.4	Nuclear Hematology	<sup>125</sup> Iodine	[55]
Piglets (5 kg)	(not specified)	3.6 ± 0.9	2.9 ± 0.7	Nuclear Hematology	<sup>99m</sup> Tc, <sup>51</sup> Cr	[56]
Guinea Pig (0.4-0.9 kg)	Soleus	2.1 ± 0.4	(1.7 ± 0.3) <sup>a</sup>	Stereology	-	[57]

<sup>a</sup> Assuming Hct<sub>t</sub> = 0.2.

Published blood or plasma volumes determined with different techniques and methods in different skeletal muscle areas, comp. Table 2.

doi:10.1371/journal.pone.0170841.t003

anterior leg using the Patlak model and an intermediate contrast agent (Gadomer), which roughly corresponds to the medial thigh muscle in our study, where we found  $v_b = 2.6\%$  using the 2CXM, and in the dorsal hind leg  $v_b = 1.5\%$ , which corresponds to the lateral and cranial thigh muscle in our study with  $v_b = 1.1$  or  $1.2\%$  with the 2CXM. As in the studies of Ruotsalainen and Raitakari [49, 50], we found higher  $v_b$  values in the anterior femoral region (medial thigh muscles). The higher  $v_b$  values in the anterior muscle area near the femoral artery (both in our study and those of others and for MRI and histology) might be attributable to the higher proportion of larger vessels in this area.

An element of uncertainty in the determination of  $v_p$  is already introduced with the choice of systemic or arterial hematocrit. Systemic hematocrit is typically determined in venous blood. However, in pharmacokinetic modeling, i.e., in Eq (14), the arterial hematocrit is required, which is slightly lower than venous Hct. True arterial hematocrit levels are unknown, particularly in clinical trials of humans. Moreover, although the contrast agents only enter the plasma volume, some studies did not take into account the difference of tissue hematocrit and systemic hematocrit. The impact of the ratio of tissue to arterial hematocrit is described in Eq (11) for the bolus deconvolution method and in Eq (14) for the equilibrium method. Using the same values for both parameters would yield approx. 30% lower blood volumes. Measurement of individual arterial hematocrit would be useful since individual hematocrit levels may differ even among animals of the same sex, weight and breed and thus affect MRI blood volume estimates [40]. Reference [40] (p. 44, table below, row “Deutsche Landrasse”) reports a standard deviation for Hct<sub>a</sub> levels measured in 50 individuals of 0.03, mean(±2SD) of 0.36(±0.06) and minimal (maximum) Hct<sub>a</sub> of 0.29 (0.44). To estimate the influence of the lack of knowledge about individual Hct<sub>a</sub> levels on the variability of our  $v_b$  results, we assume microvascular Hct to be independent of arterial Hct and exemplarily calculate median  $v_b$  values estimated with EqMRI to 2.3% for Hct<sub>a</sub> = 0.42 and 2.8% for Hct<sub>a</sub> = 0.3 instead of  $v_b = 2.4$  with Hct<sub>a</sub> = 0.4 (Table 1). However, omission of this measurement results in a small estimated difference of 0.5% compared to the IQRs shown in Table 1 (2.2% in the considered exemplarily case).



$Hct_a$  was chosen based on the veterinary literature for pigs of similar breed and weight [39, 40]. Since intercapillary hematocrit can be as low as 20–40% of the systemic hematocrit (see [41] and references therein), intercapillary hematocrit has a stronger influence than tissue hematocrit in determining capillary blood volume. Exact determination of capillary blood volume using DCE-MRI would require exclusion of small vessels such as venules and arterioles. In the present study, all vessels were included in the analysis because current technology does not detect noncapillary vessels of sub-voxel size. On the other hand, maximum comparability between experiments was aimed at. An average vessel diameter of 8  $\mu\text{m}$  for MVDE was used in the present study. Reports in the literature describe capillary diameters between 5 and 10  $\mu\text{m}$ .

Equating arterial and tissue hematocrit in Eqs (1) and (5) of the two-compartment model mass equations for the two LMCA methods leads to an underestimation of  $v_b$ . For clinical application of tracer kinetic methods, the problem of inserting the correct hematocrit into the equations for each voxel is even more difficult, as hematocrit in tumorous tissue is highly inhomogeneous and might differ markedly from levels in healthy tissue.

Gadofosveset trisodium was used as intravascular contrast agent for blood volume determination based on the indicator dilution theory. It is a clinically approved gadolinium-based MRI contrast agent used as a blood pool contrast agent due to its reversible binding to endogenous human serum albumin and its high longitudinal relaxivity at low magnetic field strengths [35]. At low concentrations, 90% of the agent binds to human serum [58]. Thus, most of the agent remains within the vascular space for the first minute after administration, with only a small proportion of up to 10% undergoing extravasation. However, in pigs, binding of this contrast agent to albumin is slightly lower, 83–87%, but still high compared with other animals [59]. Gadofosveset binding to albumin leads to a marked increase in the relaxation rate [35]. Therefore, extravasation of unbound gadofosveset is negligible in the determination of physiological parameters using BPCA methods in healthy tissue.

However, tumor vasculature is impaired and the endothelial wall of tumor vessels are more permeable. Although our study is motivated by tumors, the results found in healthy muscle tissue cannot be directly transferred to estimations of these parameters in tumor tissue.

Donahue et al. described the relationship between vascular proton exchange rates and the accuracy and precision of tissue blood volume estimates using intravascular T1 contrast agents [60]. To minimize blood volume underestimation in fast exchange models they propose to use spoiled gradient echo pulse sequences with short TRs, which should be much smaller than the intravascular postcontrast T1. Moreover, the flip angle should not be too small. Since in our experiments T1 was on the order of 1500 ms,  $\alpha = 30^\circ$  and TR = 2.7 ms, artifacts due to capillary-interstitial proton exchange are minimal. However, the high contrast concentration during first pass of nonextravasating intravascular CA may result in a state closer to the slow proton exchange regimen and thus lead to a flattened bolus and  $v_b$  underestimation. These theoretical predictions are in good agreement with our experimental findings. The median values obtained with BD were on average 20% below those provided by EqMRI. Another factor contributing to these results, however, might be an overcorrection for dispersion in the BD case.

Schwarzbauer et al. proposed a steady-state intravascular CA quantification method of blood volume, which basically corresponds to the method termed EqMRI in our study [47]. For blood volume determination in the myocardium of rats overestimation resulting from T1 differences between blood and extravascular space, due to exclusive proton magnetization exchange between these spaces, was taken into account [61, 62]. The resulting perfusion dependence of T1 images acquired with a 2D FLASH sequence was used to correct regional blood volume. For low perfused tissues as investigated in the present study, the perfusion dependence of magnetization alteration can be neglected because, due to the long mean transit times, magnetization is already at the arterial end of the capillaries in steady state.

Because the site where the AIF is measured is close to the edge of the field of view, degradation of measurement accuracy through inflow effects cannot be fully excluded. For AIF extraction in the aorta using a 3D spoiled gradient echo DCE-MRI sequence with frequency encoding gradient in axial direction, Roberts et al. recommend an optimal distance of the extraction location of the AIF from the edge of the outermost axial scan of at least 20–30 mm to avoid underestimation of blood volume due to blood inflow [63]. The distance of the FOV edge from the nearest voxels of the selected AIF region in our study averaged  $17 \pm 8$  mm and the selected voxels stretched over an average area of  $39 \pm 12$  mm inside the FOV. No significant systematic relationship was found between the  $v_b$  results and the corresponding distances, expansion in the FOV of the AIF voxel areas or the quotient of both. However, we did not correct our data for B1 field inhomogeneities, which may have influenced both the median MRI  $v_b$  value and the uncertainties.

There were at least 30 minutes between the MRI examinations with the two contrast agents, LMCA and BPCA. Because gadoteric acid has a half-life of approx. 1.5 hours, we may assume that the effect of ongoing degradation of gadoteric acid during the 50-second BPCA measurement is negligible.

The ETM disregards bolus dispersion of the vascular contribution, leading to significant underestimates of the blood volume. On the other hand, the 2CXM has 5 model parameters including the time delay and may therefore be prone to overfitting. This would explain the large variance of  $v_b$  obtained with this model. The BD additionally takes into account bolus dispersion, making it theoretically more prone to overestimations of  $v_b$  and to a greater variance of results. This expectation, however, was not confirmed by our results.

The duration of the image acquisition period for LMCA models influences the results of curve fitting [64, 65]. Analyzing the results of all the model parameters for different acquisition times of both, the blood and the interstitial volume, we selected an acquisition period of 10 min. This acquisition duration (AD) provided the best fit for the 2CXM and the optimal match between the functional parameters of ETM and 2CXM. For example, in medial thigh muscle, the blood volume increased by 6% at an AD of 10 min relative to the value at AD = 6 min when using the 2CXM. The IQR, however, was reduced by 16%. On the other hand, for the ETM, the relative change in blood volume between these acquisition durations was 40% for the median and minus 5% for the IQR.

Luyypaert et al. emphasize the importance of the acquisition period as well as the temporal resolution and the contrast-to-noise ratio (CNR) for the accuracy of model parameter estimation with the 2CXM [64]. They define the CNR as the ratio of the maximum tissue concentration to the standard deviation of the noise. They conclude that in order to keep the relative errors in determining the four model parameters using the 2CXM within a range of  $\pm 20\%$ , demands must be made that cannot be met by currently available technology. However, their recommendations regarding temporal resolution (5 sec) and AD (110 sec) are met by our experimental setup. In contrast, the proposed requirement of a CNR of 40 is not met by all experiments in our study, since our LMCA CNR is in the range of  $20 \pm 9$  (pelvis) to  $42 \pm 16$  (medial thigh), which might be an additional explanation for the large variations in  $v_b$ .

## Conclusion

Our results show good agreement between the median values obtained by histology and the BPCA MRI methods and the 2CXM LMCA approach. However, the ETM yielded results that were completely different from the histological  $v_b$  values. Using BPCA methods for measuring blood volume has the crucial advantage of simple implementation, very short acquisition times, and a stable and accurate measurement. While LMCA models provide excellent curve

fits and can in principle determine more physiological parameters than BPCA methods, they yield more inaccurate individual results.

## Supporting Information

### S1 File. Histological Data.

(XLSX)

**S2 File. AIF and tissue data.** The files contain the time points and the relaxation rate changes of the AIF and the five skeletal muscle regions of the pigs hind limb.

(ZIP)

## Author Contributions

**Conceptualization:** LL.

**Data curation:** AS SH LL.

**Formal analysis:** SH AS.

**Funding acquisition:** LL.

**Investigation:** LL MM AS SH DM.

**Methodology:** LL SH AS.

**Project administration:** LL.

**Resources:** WS MK HAB.

**Software:** LL SH.

**Supervision:** LL.

**Validation:** AS SH.

**Visualization:** SH AS.

**Writing – original draft:** SH.

**Writing – review & editing:** SH LL.

## References

1. Cuenod CA, Balvay D. Perfusion and vascular permeability: basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. *Diagnostic and interventional imaging*. 2013; 94(12):1187–1204. doi: [10.1016/j.diii.2013.10.010](https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.10.010) PMID: [24211260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24211260/)
2. Sourbron SP, Buckley DL. Tracer kinetic modelling in MRI: estimating perfusion and capillary permeability. *Physics in medicine and biology*. 2012; 57(2):R1–33. doi: [10.1088/0031-9155/57/2/R1](https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/2/R1) PMID: [22173205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173205/)
3. Lüdemann L, Grieger W, Wurm R, Wust P, Zimmer C. Glioma assessment using quantitative blood volume maps generated by T1-weighted dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a receiver operating characteristic study. *Acta radiologica (Stockholm, Sweden: 1987)*. 2006; 47(3):303–310. PMID: [16613313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16613313/)
4. Lüdemann L, Warmuth C, Plotkin M, Förschler A, Gutberlet M, Wust P, et al. Brain tumor perfusion: comparison of dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging using T1, T2, and T2\* contrast, pulsed arterial spin labeling, and H2(15)O positron emission tomography. *European journal of radiology*. 2009; 70(3):465–474. doi: [10.1016/j.ejrad.2008.02.012](https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.02.012) PMID: [18359598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18359598/)
5. Kremser C, Trieb T, Rudisch A, Judmaier W, de Vries A. Dynamic T(1) mapping predicts outcome of chemoradiation therapy in primary rectal carcinoma: sequence implementation and data analysis.

- Journal of magnetic resonance imaging: JMRI. 2007; 26(3):662–671. doi: [10.1002/jmri.21034](https://doi.org/10.1002/jmri.21034) PMID: [17729365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17729365/)
6. Turetschek K, Preda A, Novikov V, Brasch RC, Weinmann HJ, Wunderbaldinger P, et al. Tumor microvascular changes in antiangiogenic treatment: assessment by magnetic resonance contrast media of different molecular weights. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2004; 20(1):138–144. doi: [10.1002/jmri.20049](https://doi.org/10.1002/jmri.20049) PMID: [15221819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15221819/)
  7. Bhujwala ZM, Artemov D, Natarajan K, Solaiyappan M, Kollars P, Kristjansen PEG. Reduction of vascular and permeable regions in solid tumors detected by macromolecular contrast magnetic resonance imaging after treatment with antiangiogenic agent TNP-470. *Clinical cancer research*. 2003; 9(1):355–362. PMID: [12538488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12538488/)
  8. Yaligar J, Thakur SB, Bokacheva L, Carlin S, Thaler HT, Rizwan A, et al. Lactate MRSI and DCE MRI as surrogate markers of prostate tumor aggressiveness. *NMR in biomedicine*. 2012; 25(1):113–122. doi: [10.1002/nbm.1723](https://doi.org/10.1002/nbm.1723) PMID: [21618306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21618306/)
  9. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp MV, et al. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 1999; 10(3):223–232. doi: [10.1002/\(SICI\)1522-2586\(199909\)10:3%3C223::AID-JMRI2%3E3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2586(199909)10:3%3C223::AID-JMRI2%3E3.0.CO;2-S) PMID: [10508281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508281/)
  10. Buckley DL. Uncertainty in the analysis of tracer kinetics using dynamic contrast-enhanced T1-weighted MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2002; 47(3):601–606. doi: [10.1002/mrm.10080](https://doi.org/10.1002/mrm.10080) PMID: [11870848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870848/)
  11. Harrer JU, Parker GJM, Haroon HA, Buckley DL, Embelton K, Roberts C, et al. Comparative study of methods for determining vascular permeability and blood volume in human gliomas. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2004; 20(5):748–757. doi: [10.1002/jmri.20182](https://doi.org/10.1002/jmri.20182) PMID: [15503330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15503330/)
  12. Henderson E, Sykes J, Drost D, Weinmann HJ, Rutt BK, Lee TY. Simultaneous MRI measurement of blood flow, blood volume, and capillary permeability in mammary tumors using two different contrast agents. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2000; 12(6):991–1003. doi: [10.1002/1522-2586\(200012\)12:6%3C991::AID-JMRI26%3E3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1522-2586(200012)12:6%3C991::AID-JMRI26%3E3.0.CO;2-1) PMID: [11105041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11105041/)
  13. Brix G, Kiessling F, Lucht R, Darai S, Wasser K, Delorme S, et al. Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magnetic resonance in medicine*. 2004; 52(2):420–429. doi: [10.1002/mrm.20161](https://doi.org/10.1002/mrm.20161) PMID: [15282828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282828/)
  14. Vaupel P, Hockel M. Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *International journal of oncology*. 2000; 17(5):869–879. PMID: [11029486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11029486/)
  15. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386(6626):671–674. doi: [10.1038/386671a0](https://doi.org/10.1038/386671a0) PMID: [9109485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9109485/)
  16. Johnson G, Wetzel SG, Cha S, Babb J, Tofts PS. Measuring blood volume and vascular transfer constant from dynamic, T(2)\*-weighted contrast-enhanced MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2004; 51(5):961–968. doi: [10.1002/mrm.20049](https://doi.org/10.1002/mrm.20049) PMID: [15122678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15122678/)
  17. Zhu X, Li K, Jackson A. Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Cerebral Tumours. In: Jackson A, Buckley D, Parker GM, editors. *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology*. Medical Radiology. Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 117–143. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26420-5\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26420-5_9)
  18. Raatschen HJ, Fu Y, Shames DM, Wendland MF, Brasch RC. Magnetic resonance imaging enhancement of normal tissues and tumors using macromolecular Gd-based cascade polymer contrast agents: preclinical evaluations. *Investigative radiology*. 2006; 41(12):860–867. doi: [10.1097/01.rii.0000246145.25993.d1](https://doi.org/10.1097/01.rii.0000246145.25993.d1) PMID: [17099424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17099424/)
  19. Ah-See ML, Padhani A. Dynamic Magnetic Resonance Imaging in Breast Cancer. In: Jackson A, Buckley D, Parker GM, editors. *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology*. Medical Radiology. Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 145–173. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26420-5\\_10](http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26420-5_10)
  20. Versluis B, Dremmen MHG, Nelemans PJ, Wildberger JE, Schurink GW, Leiner T, et al. Dynamic contrast-enhanced MRI assessment of hyperemic fractional microvascular blood plasma volume in peripheral arterial disease: initial findings. *PloS one*. 2012; 7(5):e37756. doi: [10.1371/journal.pone.0037756](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037756) PMID: [22662212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22662212/)
  21. Cao Y, Shen Z, Chenevert TL, Ewing JR. Estimate of vascular permeability and cerebral blood volume using Gd-DTPA contrast enhancement and dynamic T2\*-weighted MRI. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2006; 24(2):288–296. doi: [10.1002/jmri.20634](https://doi.org/10.1002/jmri.20634) PMID: [16795091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16795091/)
  22. Sourbron S, Ingrisch M, Siefert A, Reiser M, Herrmann K. Quantification of cerebral blood flow, cerebral blood volume, and blood-brain-barrier leakage with DCE-MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2009; 62(1):205–217. doi: [10.1002/mrm.22005](https://doi.org/10.1002/mrm.22005) PMID: [19449435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19449435/)

23. Thompson G, Mills SJ, Coope DJ, O'Connor JPB, Jackson A. Imaging biomarkers of angiogenesis and the microvascular environment in cerebral tumours. *The British journal of radiology*. 2011; 84 Spec No 2:S127–S144. doi: [10.1259/bjir/66316279](https://doi.org/10.1259/bjir/66316279) PMID: [22433824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22433824/)
24. Server A, Orheim TED, Graff BA, Josefsen R, Kumar T, Nakstad PH. Diagnostic examination performance by using microvascular leakage, cerebral blood volume, and blood flow derived from 3-T dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging in the differentiation of glioblastoma multiforme and brain metastasis. *Neuroradiology*. 2011; 53(5):319–330. PMID: [20625709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20625709/)
25. Perles-Barbacaru AT, Berger F, Lahrech H. Quantitative rapid steady state T1 magnetic resonance imaging for cerebral blood volume mapping in mice: Lengthened measurement time window with intraperitoneal Gd-DOTA injection. *Magnetic resonance in medicine*. 2013; 69(5):1451–1456. doi: [10.1002/mrm.24365](https://doi.org/10.1002/mrm.24365) PMID: [22760854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22760854/)
26. Arevalo-Perez J, Kebede AA, Peck KK, Diamond E, Holodny AI, Rosenblum M, et al. Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Low-Grade Versus Anaplastic Oligodendrogliomas. *Journal of neuroimaging*. 2015; doi: [10.1111/jon.12320](https://doi.org/10.1111/jon.12320) PMID: [26707628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26707628/)
27. Abe T, Mizobuchi Y, Nakajima K, Otomi Y, Irahara S, Obama Y, et al. Diagnosis of brain tumors using dynamic contrast-enhanced perfusion imaging with a short acquisition time. *SpringerPlus*. 2015; 4:88. doi: [10.1186/s40064-015-0861-6](https://doi.org/10.1186/s40064-015-0861-6) PMID: [25793147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25793147/)
28. Fournier L, Brasch R. The Role of Blood Pool Contrast Media in the Study of Tumor Pathophysiology. In: Jackson A, Buckley D, Parker GM, editors. *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology*. Medical Radiology. Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 39–52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26420-5\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26420-5_3)
29. Bode G, Clausing P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Noguez V, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2010; 62(3):196–220. doi: [10.1016/j.vasch.2010.05.009](https://doi.org/10.1016/j.vasch.2010.05.009) PMID: [20685310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685310/)
30. Stanton HC. *Swine in cardiovascular research*. Bd. 1. CRC Press; 1986. Available from: <https://books.google.de/books?id=7hXgrQEACAAJ>
31. Sauerbrey A, Hindel S, Maaß M, Krüger C, Wissmann A, Kramer M, et al. Establishment of a swine model for validation of perfusion measurement by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *BioMed research international*. 2014; 2014:390506. doi: [10.1155/2014/390506](https://doi.org/10.1155/2014/390506) PMID: [24719859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24719859/)
32. Hindel S, Söhner A, Maa M, Sauerwein W, Baba HA, Kramer M, et al. Validation of Interstitial Fractional Volume Quantification by Using Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscles. *Investigative radiology*. 2017; 52(1):66–73. doi: [10.1097/RLI.0000000000000309](https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000309) PMID: [27482651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27482651/)
33. Mulisch M, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. Springer-Verlag; 2010. doi: [10.1007/978-3-642-55190-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55190-1)
34. Maxie MG, Jubb KVF. *Pathology of domestic animals*. Elsevier Saunders; 2007. Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.library.uq.edu.au/science/book/9780702028236>
35. Richardson OC, Scott MLJ, Tanner SF, Waterton JC, Buckley DL. Overcoming the low relaxivity of gadofosveset at high field with spin locking. *Magnetic resonance in medicine*. 2012; 68(4):1234–1238. doi: [10.1002/mrm.23316](https://doi.org/10.1002/mrm.23316) PMID: [22161901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22161901/)
36. Barrett T, Kobayashi H, Brechbiel M, Choyke PL. Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis. *European journal of radiology*. 2006; 60(3):353–366. doi: [10.1016/j.ejrad.2006.06.025](https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2006.06.025) PMID: [16930905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16930905/)
37. Li KL, Zhu XP, Waterton J, Jackson A. Improved 3D quantitative mapping of blood volume and endothelial permeability in brain tumors. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2000; 12(2):347–357. doi: [10.1002/1522-2586\(200008\)12:2%3C347::AID-JMRI19%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2586(200008)12:2%3C347::AID-JMRI19%3E3.0.CO;2-7) PMID: [10931600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931600/)
38. Sourbron SP, Buckley DL. On the scope and interpretation of the Tofts models for DCE-MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2011; 66(3):735–745. doi: [10.1002/mrm.22861](https://doi.org/10.1002/mrm.22861) PMID: [21384424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21384424/)
39. Nerbas E. *Aktualisierung von Blutparametern beim Schwein [dissertation]*. Tierärztliche Hochschule Hannover; 2008.
40. Kixmüller M. *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; 2004.
41. Keller MW, Damon DN, Duling BR. Determination of capillary tube hematocrit during arteriolar microperfusion. *The American journal of physiology*. 1994; 266(6 Pt 2):H2229–H2238. PMID: [7517645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7517645/)
42. Østergaard L, Weisskoff RM, Chesler DA, Gyldensted C, Rosen BR. High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. Part I: Mathematical approach and

- statistical analysis. *Magnetic resonance in medicine*. 1996; 36(5):715–725. doi: [10.1002/mrm.1910360510](https://doi.org/10.1002/mrm.1910360510) PMID: [8916022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8916022/)
43. Calamante F, Gadian DG, Connelly A. Delay and dispersion effects in dynamic susceptibility contrast MRI: simulations using singular value decomposition. *Magnetic resonance in medicine*. 2000; 44(3):466–473. doi: [10.1002/1522-2594\(200009\)44:3%3C466::AID-MRM18%3E3.3.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200009)44:3%3C466::AID-MRM18%3E3.3.CO;2-D) PMID: [10975900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10975900/)
  44. Calamante F. Bolus dispersion issues related to the quantification of perfusion MRI data. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2005; 22(6):718–722. doi: [10.1002/jmri.20454](https://doi.org/10.1002/jmri.20454) PMID: [16261569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16261569/)
  45. Calamante F, Willats L, Gadian DG, Connelly A. Bolus delay and dispersion in perfusion MRI: implications for tissue predictor models in stroke. *Magnetic resonance in medicine*. 2006; 55(5):1180–1185. doi: [10.1002/mrm.20873](https://doi.org/10.1002/mrm.20873) PMID: [16598717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16598717/)
  46. Hindel S, Sauerbrey A, Maaß M, Maderwald S, Schlamann M, Lüdemann L. Validation of Perfusion Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Using a Blood Pool Contrast Agent in Skeletal Swine Muscle. *PloS one*. 2015; 10(6):e0128060. doi: [10.1371/journal.pone.0128060](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128060) PMID: [26061498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061498/)
  47. Schwarzbauer C, Syha J, Haase A. Quantification of regional blood volumes by rapid T1 mapping. *Magnetic resonance in medicine*. 1993; 29(5):709–712. doi: [10.1002/mrm.1910290521](https://doi.org/10.1002/mrm.1910290521) PMID: [8505910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8505910/)
  48. Cheng HLM. T1 measurement of flowing blood and arterial input function determination for quantitative 3D T1-weighted DCE-MRI. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2007; 25(5):1073–1078. doi: [10.1002/jmri.20898](https://doi.org/10.1002/jmri.20898) PMID: [17410576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17410576/)
  49. Ruotsalainen U, Raitakari M, Nuutila P, Oikonen V, Sipilä H, Teräs M, et al. Quantitative blood flow measurement of skeletal muscle using oxygen-15-water and PET. *Journal of nuclear medicine*. 1997; 38(2):314–319. PMID: [9025761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9025761/)
  50. Raitakari M, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Laine H, Mäkeä P, Teräs M, et al. Insulin increases blood volume in human skeletal muscle: studies using [15O]CO and positron emission tomography. *The American journal of physiology*. 1995; 269(6 Pt 1):E1000–E1005. PMID: [8572189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8572189/)
  51. Faranesh AZ, Kraitchman DL, McVeigh ER. Measurement of kinetic parameters in skeletal muscle by magnetic resonance imaging with an intravascular agent. *Magnetic resonance in medicine*. 2006; 55(5):1114–1123. doi: [10.1002/mrm.20884](https://doi.org/10.1002/mrm.20884) PMID: [16598733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16598733/)
  52. Brix G, Bahner ML, Hoffmann U, Horvath A, Schreiber W. Regional blood flow, capillary permeability, and compartmental volumes: measurement with dynamic CT—initial experience. *Radiology*. 1999; 210(1):269–276. doi: [10.1148/radiology.210.1.r99ja46269](https://doi.org/10.1148/radiology.210.1.r99ja46269) PMID: [9885619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9885619/)
  53. Kairento AL, Brownell GL, Schluenderberg J, Elmaleh DR. Regional blood-flow measurement in rabbit soft-tissue tumor with positron imaging using the C15O2 steady-state and labeled microspheres. *Journal of nuclear medicine*. 1983; 24(12):1135–1142. PMID: [6417285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6417285/)
  54. Senda M, Fishman AJ, Weise S, Alpert NM, Correia JA, Rubin RH, et al. Regional perfusion, oxygen metabolism, blood volume and immunoglobulin G accumulation at focal sites of infection in rabbits. *European journal of nuclear medicine*. 1992; 19(3):166–172. doi: [10.1007/BF00173276](https://doi.org/10.1007/BF00173276) PMID: [1572379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1572379/)
  55. Hjortdal VE, Hansen ES, Henriksen TB, Kjølhøst D, Søballe K, Djurhuus JC. The microcirculation of myocutaneous island flaps in pigs studied with radioactive blood volume tracers and microspheres of different sizes. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992; 89(1):116–22; discussion 123–4. doi: [10.1097/00006534-199289010-00024](https://doi.org/10.1097/00006534-199289010-00024) PMID: [1727241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1727241/)
  56. Linderkamp O, Berg D, Betke K, Köferl F, Kriegel H, Riegel KP. Blood volume and hematocrit in various organs in newborn piglets. *Pediatric research*. 1980; 14(12):1324–1327. doi: [10.1203/00006450-198012000-00010](https://doi.org/10.1203/00006450-198012000-00010) PMID: [7208148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7208148/)
  57. Eisenberg BR, Kuda AM, Peter JB. Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. I. Soleus muscle of the adult guinea pig. *The Journal of cell biology*. 1974; 60(3):732–754. doi: [10.1083/jcb.60.3.732](https://doi.org/10.1083/jcb.60.3.732) PMID: [4824293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4824293/)
  58. Lauffer RB, Parmelee DJ, Dunham SU, Ouellet HS, Dolan RP, Witte S, et al. MS-325: albumin-targeted contrast agent for MR angiography. *Radiology*. 1998; 207(2):529–538. doi: [10.1148/radiology.207.2.9577506](https://doi.org/10.1148/radiology.207.2.9577506) PMID: [9577506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9577506/)
  59. Eldredge HB, Spiller M, Chasse JM, Greenwood MT, Caravan P. Species dependence on plasma protein binding and relaxivity of the gadolinium-based MRI contrast agent MS-325. *Investigative radiology*. 2006; 41(3):229–243. doi: [10.1097/01.rii.0000199293.86956.48](https://doi.org/10.1097/01.rii.0000199293.86956.48) PMID: [16481905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16481905/)
  60. Donahue KM, Weisskoff RM, Chesler DA, Kwong KK, Bogdanov AA, Mandeville JB, et al. Improving MR quantification of regional blood volume with intravascular T1 contrast agents: accuracy, precision, and water exchange. *Magnetic resonance in medicine*. 1996; 36(6):858–867. doi: [10.1002/mrm.1910360608](https://doi.org/10.1002/mrm.1910360608) PMID: [8946351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8946351/)

61. Bauer WR, Hiller KH, Roder F, Rommel E, Ertl G, Haase A. Magnetization exchange in capillaries by microcirculation affects diffusion-controlled spin-relaxation: a model which describes the effect of perfusion on relaxation enhancement by intravascular contrast agents. *Magnetic resonance in medicine*. 1996; 35(1):43–55. doi: [10.1002/mrm.1910350107](https://doi.org/10.1002/mrm.1910350107) PMID: [8771021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8771021/)
62. Waller C, Kahler E, Hiller KH, Hu K, Nahrendorf M, Voll S, et al. Myocardial perfusion and intracapillary blood volume in rats at rest and with coronary dilatation: MR imaging in vivo with use of a spin-labeling technique. *Radiology*. 2000; 215(1):189–197. doi: [10.1148/radiology.215.1.r00ap07189](https://doi.org/10.1148/radiology.215.1.r00ap07189) PMID: [10751486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10751486/)
63. Roberts C, Little R, Watson Y, Zhao S, Buckley DL, Parker GJM. The effect of blood inflow and B(1)-field inhomogeneity on measurement of the arterial input function in axial 3D spoiled gradient echo dynamic contrast-enhanced MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2011; 65(1):108–119. doi: [10.1002/mrm.22593](https://doi.org/10.1002/mrm.22593) PMID: [20928889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20928889/)
64. Luybaert R, Sourbron S, de Mey J. Validity of perfusion parameters obtained using the modified Tofts model: a simulation study. *Magnetic resonance in medicine*. 2011; 65(5):1491–1497. doi: [10.1002/mrm.22728](https://doi.org/10.1002/mrm.22728) PMID: [21500273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21500273/)
65. Luybaert R, Sourbron S, Makkat S, de Mey J. Error estimation for perfusion parameters obtained using the two-compartment exchange model in dynamic contrast-enhanced MRI: a simulation study. *Physics in medicine and biology*. 2010; 55(21):6431–6443. doi: [10.1088/0031-9155/55/21/006](https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/21/006) PMID: [20952813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20952813/)





## 4.4 Perfusionsmessung mit LMCA

Der Inhalt dieses Abschnitts wurde veröffentlicht in:

Hindel, Stefan; Papanastasiou, Giorgos; Wust, Peter; Maaß, Marc; Söhner, Anika; Lüdemann, Lutz. Evaluation of Pharmacokinetic Models for Perfusion Imaging with Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Porcine Skeletal Muscle Using Low-Molecular-Weight Contrast Agents. *Magnetic Resonance in Medicine*. Nov 2017.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrm.26983/epdf>

**DOI:10.1002/mrm.26983**

Aus urheberrechtlichen Gründen ist dieser Artikel in der Dissertationsschrift nicht enthalten.

### Zusammenfassung des Inhalts der Studie

Ziel dieser Studie war es, verschiedene pharmakokinetische Modelle für die Verteilung von niedermolekularen, schnell extravasierenden MRT-Kontrastmitteln in Gewebe hinsichtlich ihrer Eignung zur Perfusionsquantifizierung zu evaluieren. Es wurden dafür die LMCA- und BPCA-Daten derselben Messungen derselben Tierexperimente in den identischen Hinterlaufgeweberegionen verwendet wie in Studie Nr.1 (Abschnitt 4.1). Die durch Adenosingabe erhöhten und mit einer Dopplerultraschallflusssonde an der Femoralarterie gegemessenen Blutflüsse wurden für jeweils ein Paar einer LMCA- und BPCA-Messung konstant gehalten. Die Gewebepfusion wurde basierend auf den BPCA-Daten mit den gleichen Modellen bestimmt wie in der ersten Studie, mit dem Unterschied, dass diesmal die Korrektur der in der abdominalen Aorta gemessenen arteriellen Eingangsfunktion hinsichtlich ihrer Bolusdispersion bis zum Messbereich im Hinterlaufgewebe vernachlässigt wurde. Die LMCA-Daten wurden mit den in Abschnitt ?? beschriebenen Modellen, also dem 2CXM, dem THM und dem DPM ausgewertet und die Gesamtgewebepfusion des untersuchten Hinterlaufes des Schweins sowohl mit den Zwei-Kompartiment-BPCA-Modellblutflussergebnissen (2CBPM) verglichen als auch mit den Flusssondenreferenzdaten. Außerdem wurden diese drei in der Literatur zur Bestimmung der kapillären, d.h. nutritiven, Perfusion als auch zur Messung der Gefäßwandpermeabilität empfohlenen LMCA-Modelle analog zu dem Zwei-Kompartiment-BPCA-Modell um ein parallel zum Kapillarbett verlaufendes nicht-nutritives AVA-Kompartiment erwei-

tert (E2CXM, ETHM, EDPM). Für das zusätzliche AVA-Kompartiment wurden die Perfusionsschätzungen aus dem 2CBPM mit nur geringer Anpassungsfreiheit verwendet. Die Gesamtflussergebnisse dieser Modelle, bestehend aus AVA- und kapillärem Perfusionsanteil, wurden ebenfalls mit den Ergebnissen des 2CBPM und der Sonde verglichen. Da die Messungen mit intravasculärem Kontrastmittel zur Bestimmung der Perfusion im Vergleich zu den LMCA-Messungen zuverlässiger sind und somit als Referenz betrachtet werden können, wurden die kapillären Perfusionswerte der einfachen und erweiterten LMCA-Modelle mit den kapillären Perfusionsergebnissen des 2CBPM verglichen. Von allen LMCA-Modellen zeigte das E2CXM die beste Anpassungsqualität und die beste Übereinstimmung mit den Dopplerultraschallflussmessungen. Die beste Übereinstimmung der kapillären Perfusionswerte mit jenen des 2CBPM wurde ebenfalls mit diesem Model erhalten. Eine exemplarische Auswertung von DCE-MRT-Daten in einem menschlichen Unterschenkelsarkom zeigte gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Tierstudie. Es konnte weiterhin deutlich nachgewiesen werden, dass die pfropfenstromartigen Verteilungsmodelle, insbesondere in niedrig perfundiertem Gewebe mit geringem interstitiellem Volumen, unnatürliche Verläufe zeigen. Dementsprechend sind Modelle kompartmenteller Natur für eine verlässliche Bestimmung der Gewebepfusion zu bevorzugen.

## 4.5 Darstellung der Eigenleistung

Von Herrn PD Dr. Lutz Lüdemann und Herrn PD Dr. Benno Nafz stammt die Idee und das Gesamtkonzept des gesamten Forschungsprojektes. Herr Professor Wolfgang Sauerwein stellte uns Laborräumlichkeiten und Materialien zur Verfügung und half uns bei der praktischen Konzipierung und Umsetzung der medizinischen und histologischen Anteile der Tierexperimente. Herr Professor Martin Kramer beriet uns bei der Planung und Umsetzung der Tierexperimente, insbesondere in Bezug auf die histologische Auswertung. Professor Peter Wust beriet uns in Bezug auf die Durchführung der Studie an einem menschlichen Patienten und half uns bei deren Umsetzung. Herr Dr. Stefan Maderwald half mir bei der Gestaltung des technischen Aufbaus für die MRT-Bildgebung und durch Beratung bei der Erstellung des ersten und zweiten Manuskriptes. Herr Professor Schlamann half durch seinen Rat und als Ideengeber bei der radiologischen Umsetzung der MRT-Experimente. Die MRT-Messungen wurden von mir unter Beratung von Herrn Dr. Lüdemann durchgeführt. Frau Dr. Söhner (geb. Sauerbrey) und Herr Dr. Maaß führten die chirurgische Präparation des Schweines durch. Frau Dr. Söhner nahm weiterhin die Anästhesie und die Überwachung der Vitalparameter des Versuchstieres während der Experimente vor. Sie führte gemeinsam mit Herrn Dr. Maaß die Entnahme der Gewebebiopsien am Ende der Experimente durch und erstellte alle histologischen Analysen. Dabei und bei der Verarbeitung der Gewebebiopsien half ihr Frau Dorothe Möllmann. Herr Professor Hideo Andreas Baba stellte uns Laborarbeitsplätze und Gerätschaften im Institut für Pathologie zur Verfügung und beriet Frau Dr. Söhner bei den histologischen Studien. Die Entwicklung und Implementierung der pharmakokinetischen Auswertungsmethoden und Modelle in der Bildanalysesoftware Amira und in MATLAB wurden von mir durchgeführt. Herr Dr. Giorgios Papanastasiou beriet mich bei der für die numerische Auswertung der Parameterverteilungsmodelle notwendigen Implementierung der Modellentfaltungstechniken in der Laplacedomäne. Die Aufbereitung der Bilddaten auf Grundlage anatomischer Informationen zur Analyse für die pharmakokinetische Modellierung wurde von Frau Dr. Söhner und mir vorgenommen. Die statistische Analyse der pharmakokinetischen Modellierungsergebnisse wurde von mir durchgeführt. Bei der Erstellung aller Manuskripte half Herr Dr. Lüdemann durch Beratung und Korrektur. Die tierexperiment- und histologiebezogenen Anteile der Manuskripte der zweiten und dritten Studie wurden von Frau Dr. Söhner erstellt. Die Entwicklung der um ein AVA-Kompartiment erweiterten Modelle wurde von mir auf Grundlage der zitierten Literatur vorgenommen. Die

Anteile aller Artikel, welche die MRT und die Kontrastmittelmodellanalysen betreffen, wurden von mir erstellt.

## Kapitel 5

# Diskussion

Ein wesentliches Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Studien war es, die klinische Realisierbarkeit der verwendeten Quantifizierungsmethoden mit einem Aufbau und einer Konfiguration zu evaluieren, die der klinischen Untersuchung eines Patienten möglichst entsprechen. Die für die Experimente gewählten Einstellungen der  $k$ -Raum-Unterabtastung, Parallelbildgebung und Partial-Fourier-Technik führten zu sehr gut auswertbaren Daten. Die Ergebnisse der physiologischen Parameter, wie Blutperfusion, Blutvolumen und nichtvaskulärem Zwischenzellvolumen, waren in guter Übereinstimmung mit den histologischen und sonographischen Messungen als auch mit den in der wissenschaftlichen Literatur angegebenen Werten. Da in einem klinischen Rahmen gewöhnlicherweise wesentlich geringere Sichtfelder und Volumina zur Bildgebung der Tumoren gewählt werden, ist auch bei voxelweiser Parametermessung im Patienten ein ausreichend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erwarten. Dies wurde auch in einem voxelbezogenen Modelanpassungsbeispiel der vierten Studie demonstriert.

Im Vergleich zu den in der klinischen Routine momentan üblicherweise verwendeten semiquantitativen Kety- beziehungsweise Toftsmodellen führte – bei Verwendung schnell extravasierender Kontrastmittel – das physiologisch realistischere und auf physikalisch sinnvollen Parametern beruhende Zwei-Kompartiment-Austauschmodell zu stabileren Messungen und besseren Übereinstimmungen mit Vergleichswerten des Blutvolumens und des interstitiellen Volumens aus Literatur und Histologie. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für verlässliche und gleichzeitig messzeitsparende Bestimmungen der Vaskularparameter wie Blutvolumen und Blutperfusion intravaskuläre Kontrastmittel wesentlich besser geeignet sind.

Unsere Studien zeigten deutlich, dass die aktuell in der Klinik routinemäßig übliche ausschließliche Verwendung schnell extravasierender, nie-

dermolekularer Kontrastmittel eine defizitäre Informationsgrundlage verursacht, die der Komplexität der tatsächlich zugrundeliegenden mikrophysiologischen Gewebesituation nicht gerecht wird. Die Bereitstellung strukturell und funktionell getrennter Eingangsinformationen durch die Verwendung von Kontrastmitteln, die sich auf unterschiedliche Weise im Gewebe verteilen, ermöglichen die Auswertung komplexerer, physiologisch realistischerer pharmakokinetischer Modelle und somit die Generierung quantitativer, physikalisch sinnvoller Ausgabeinformationen.

Die Kurvenanpassungen der beiden Pfropfenstrommodelle an die LMCA-Daten ergaben schlechte Anpassungsqualitäten aufgrund artifiziell verlaufender Ergebnisse der Modellkontrastzeitkurven. Der unnatürliche Verlauf der berechneten Gewebekurven kann mit der fehlerhaften Annahme dieser Modelle einer gleichförmigen Länge aller Kapillargefäße im jeweils untersuchten ROI bei gleichzeitig für das Muskelgewebe gerechtfertigter Annahme gleichförmiger Geschwindigkeit des konvektiven Perfusionstransports im Blutplasma erklärt werden. Die Grundannahme des E2CXM einer instantan homogenen Verteilung des Kontrastmittels ohne Ortsabhängigkeit der Kontrastmittelkonzentration, ist zwar prinzipiell weniger realistisch, führt jedoch aufgrund der Nichtunterscheidung zwischen den beiden möglichen Ursachen für die Kontrastmittelmolekütilgung aufgrund von unterschiedlichen Transportgeschwindigkeiten beziehungsweise unterschiedlichen Weglängen bei identischen Geschwindigkeiten zu besseren Perfusionsbestimmungsergebnissen.

Die in der Literatur vorgeschlagenen Residuenkurven für die Pfropfenstrommodelle (Abb. 8) sind aufgrund ihres diskontinuierlichen Verlaufs insbesondere in dem für das Skelettmuskulaturgewebe zu erwartenden und von uns in den ersten drei Studien gemessenen Parameterbereichen hochgradig unnatürlich. Im jetzigen Entwicklungszustand pharmakokinetischer Modellgebung sollten in der klinischen Anwendung kompartmentelle Austauschmodelle, unter Einbezug von mit intravaskulärem Kontrastmitteln generierten Daten, verwendet werden und in diesen von einer Nichtberücksichtigung nicht-nutritiver AVM-Blutflüsse abgesehen werden.

Die in den Studien 1 und 4 neu eingeführten pharmakokinetischen Modelle zur Perfusionsbestimmung orientieren sich in ihren Annahmen über die Blutflussregelung als Reaktion auf exogene Adenosinadministration an der gängigen Lehrbuchmeinung. Es gibt jedoch auch Studien, die hinsichtlich der in Abschnitt 2.1 beschriebenen mikrozirkulatorischen Regulationsmechanismen und insbesondere bezüglich der Existenz paralleler Flusswege durch nicht-nutritive arteriovenöse Anastomosen und Metarteriolen und der kapillären Perfusionssteuerung durch präkapilläre Sphinktere anderer Mei-

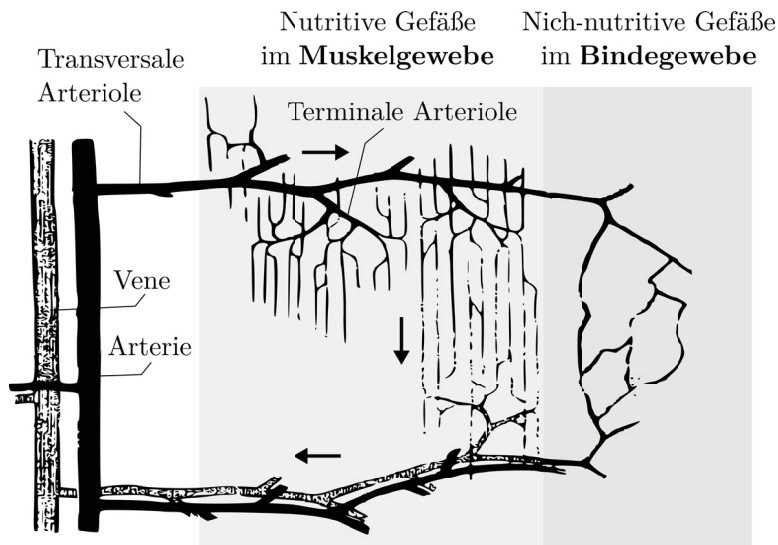
nung sind. Diese sollen im Folgenden diskutiert werden.

Heinonen et al. sprechen nicht von der Höherperfusion von eigentlichen arteriovenösen Anastomosen als Antwort auf arterielle Adenosinadministration, sondern lediglich von dem Ansprechen nicht-nutritiver „Shunts“ insbesondere in den tiefer liegenden Muskelschichten<sup>25</sup>. Sie stellen in Übereinstimmung mit anderen Autoren<sup>29</sup> explizit fest, dass nicht-nutritive Gefäße in der Skelettmuskulatur zum Großteil keine direkten arteriovenösen Anastomosen sind, sondern kapillarartige Gefäße, die auf einen bis zu doppelten Gefäßdurchmesser<sup>107</sup> weit gestellt werden und dann eine bis zu 16-fache Perfusion normaler Kapillaren tragen können. Auch wenn die behauptete Weitstellung von Kapillaren und ihre Nicht-Nutritivität der eigentlichen Definition von Kapillaren zuwider läuft, findet die Behauptung des Nichtvorhandenseins der eigentlichen AVAs in einem gewissen Teil der Physiologieliteratur Unterstützung<sup>108–110</sup>. In einem einflussreichen physiologischen Artikel<sup>110</sup> wird aufgrund einer Studie mit Mikrosphären im Skelettmuskelgewebe von Schweinen<sup>111</sup> sowohl die Existenz der AVAs, als auch der Metarteriolen und präkapillären Sphinktere in der Skelettmuskulatur angezweifelt.

Andere Studien beschreiben jedoch die Möglichkeit, dass kapillarartige, nicht-nutritive Gefäße außerhalb des Kapillarbetts verlaufen und einen zusätzlich rekrutierbaren Reservefluss tragen<sup>112</sup>. Andere Autoren äußerten zudem die Vermutung, die Vaskulatur der Sehnen könnte als nicht-nutritives Netzwerk innerhalb der Skelettmuskulatur fungieren (siehe Abb. 9), um den Ruheenergiemetabolismus zu regulieren und als Blutflussreserve zur Nährstoffversorgung während erhöhter Beanspruchung der Muskeln zu dienen<sup>28,113,114</sup>.

Die Beobachtung einer zu erwartenden, aber nicht vorhandenen Reperfusion bei ischämischen Infarkten wurde ebenfalls mit der Existenz *kapillärer* Vorzugskanäle (engl. *preferential capillary channels*) in der Mikrozirkulation erklärt, die während der Reperfusionsphase einen Anteil des notwendigen Flusses für Gewebe mit erhöhtem Bedarf auf Pfaden mit geringerem Flusswiderstand abzweigen<sup>115</sup>. Dass die Perfusion der Skelettmuskelmikrovaskulatur nicht in jedem Fall in direkter Beziehung zu dem Gesamtfluss in den Muskeln steht, wurde auch in Studien der Hinterlaufmuskulatur von Ratten gezeigt, in denen gemessen wurde, dass sowohl nutritive kapilläre als auch nicht-nutritive, im Bindegewebe verlaufende mikrovaskuläre Flusspfade durch vasokonstriktive Substanzen gesteuert werden und dass je nach metabolischem Bedarf des Gewebes die Perfusion zwischen diesen Pfadsystemen umverteilt werden<sup>30,31</sup>.

Pries et al. weisen darauf hin, dass in Modellen des Vaskularbettsystems, und insbesondere der Endstrombahn, die Mikrozirkulation oft zu vereinfacht

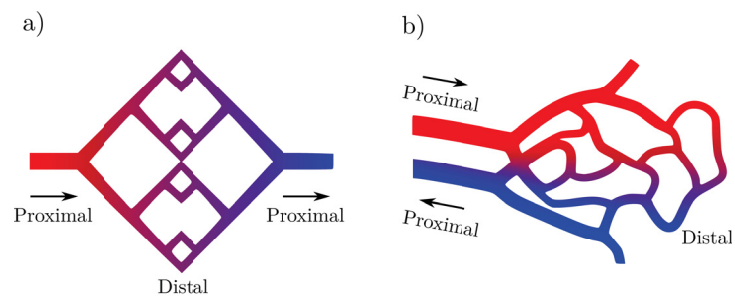


**Abbildung 9.** Eine Arteriole im Tenuissimusmuskel des Unterschenkels eines Hasen, die sowohl die Kapillaren im Muskelgewebe versorgt als auch eine alternative nicht-nutritive Flussroute im weiter entfernt liegenden Bindegewebe<sup>28,113</sup>.

als symmetrische Anordnung von Gefäßsegmenten dargestellt wird. In diesen Modellen werden alle Flusspfade hinsichtlich ihrer Flusseigenschaften als mehr oder weniger äquivalent betrachtet (Abb. 10a)<sup>62,116–119</sup>. In Wirklichkeit sind die vaskulären Netzsysteme jedoch geprägt von einem großen Grad an topologischer und struktureller Heterogenität und beinhalten sowohl lange als auch kurze Blutflusswege (Abb. 10b)<sup>62,63,117,118,120,121</sup>. Diese Heterogenität tritt auch schon im rein kapillären Gefäßsystem auf.

Ein Grund für die kapilläre Flusspfadheterogenität ist, dass die Kapillaren das gesamte Gewebe versorgen müssen, egal ob in weiter Entfernung zu den Hauptzufuhrgefäßen oder in deren direkter Umgebung<sup>62,63,72,119</sup>. Zudem ist die angiogenetische Erzeugung der Vaskulärnetzwerkuntereinheiten getrieben von stochastischen Ereignissen, was zu einer Zufallsstruktur deren topologischer Anordnung führt<sup>62,119,122</sup>. Reduktionsprozesse während der Reifung des Vaskularbettsystems verringern diese Form der Irregularitäten zwar, jedoch verbleibt ein substanzieller Anteil an vaskulärer Heterogenität<sup>62</sup>. Diese Heterogenität hat einerseits einen wichtigen Einfluss auf die Blutflussverteilung in gesundem Gewebe<sup>62,117–121</sup>. Zudem entsteht durch sie das fundamentale tumorbiologische Problem der potentiellen Ausformung funktioneller AVM-Gefäße von geringer Länge und Widerstand und hohem konvektivem Blutfluss, für die bedarfsgerechte Versor-





**Abbildung 10.** In a) ist eine vereinfachte Darstellung des mikrovaskulären Netzwerkes gezeigt, wie es in der Literatur oftmals angenommen wird und in dem alle Flusspfade äquivalent sind. Abbildung b) zeigt hingegen eine realistischere Konfiguration, bei der die Flusspfade heterogen sind und stark variierende Längen besitzen. Die Pfeile zeigen die Blutflussrichtung in den zuführenden und ableitenden Gefäßen an. Sie deuten außerdem die unterschiedliche Bedeutung der Begriffe ‚proximal‘ und ‚distal‘ in Bezug auf die Konfiguration des Mikrozykulationssystems an. Die Farbdarstellungen bezeichnen die Änderung im Blutsauerstoffgehalt während des Blutflusses durch die Kapillaren von hoch (rot) zu gering (blau).<sup>62</sup>

gung des Gewebes mit Nährstoffen oder Medikamenten notwendige Blutflusspfade umgeht<sup>62</sup>.

Diese abweichenden Erklärungen der Blutflussregelungsmechanismen und der strukturellen Gegebenheiten hinsichtlich des parallelen, nicht-nutritiven Blutflusses spielen für die grundsätzlichen Schlussfolgerungen unserer Studien keine entscheidende Rolle. Ob es sich bei der Kurzschlussdurchblutung um „nicht-nutritiven kapillären“ Fluss oder Fluss durch arteriolare Gefäße handelt, ist letztlich eine Frage der Nomenklatur, da es einzig auf die nicht vorhandene Nutritivität der parallelen Flusswege ankommt. Die Ergebnisse der ersten<sup>100</sup> und vierten Studie<sup>101</sup> zeigen zudem, dass die Flusswerte in durch Adenosin gegeben erhöht perfundierten Geweben sehr klar getrennt in zwei Klassen zerfallen: in wesentlich erhöhte Flüsse und in einen kaum erhöhten Grundfluss. Es ist zwischen diesen beiden Flussklassen kein kontinuierlicher Übergang der Transitzeiten nachweisbar, wie es ein kontinuierlicher Anstieg des Flusses durch die Rekrutierung immer kürzerer und weiterer Kapillargefäßwege nahelegen würde.



## Kapitel 6

# Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von MRT-Methoden zur Generierung von quantitativen Bilddaten zur voxelweise individualisierten Bestrahlungsplanung (*dose painting*). Die gängigsten heutzutage in der klinischen Routine verwendeten pharmakokinetischen Modelle lassen ausschließlich die Berechnung von Gewebeparametern zu, die keine klare physikalische Bedeutung haben. Die Auswertung physiologisch realistischer, quantitativer pharmakokinetischer Modelle war in den Studien der vorliegenden Arbeit möglich aufgrund der in den letzten Jahren stattgefundenen Entwicklung und durch die von den MRT-Scannerherstellern bereitgestellten leistungsfähigen MRT-Scanner-Hardwareeinheiten und innovativen Bildgebungssequenzen. Durch Optimierungseinstellungen einer Gradientenechosequenz wie  $k$ -Raum-Teilung (Schlüssellochtechnik), Parallelbildgebung und Partial-Fourier-Technik konnten hohe Zeitaufösungen der dynamischen MRT-Bildsequenzen von etwa 1,5 Sekunden erreicht werden. Gleichzeitig konnte eine ausreichend hohe Ortsauflösung und Gewebeabdeckung erreicht werden. Als Grundlage zur pharmakokinetischen Gewebemodellanalyse wurden Daten mit zwei Arten von gadoliniumbasierten MRT-Kontrastmitteln generiert. Dies waren ein niedermolekulares, schnell extravasierendes Kontrastmittel zur Bestimmung von Extravasationsparametern wie dem interstitiellen Volumen und der Gefäßwandpermeabilität und ein an Serumalbumin bindendes Kontrastmittel, das sich während der ersten Minute nach der Injektion näherungsweise intravasal im Gewebe ausbreitet. Dieser auch als Blood-Pool-Kontrastmittel bezeichneter Indikator wurde als besonders gut geeignet betrachtet, mikrovaskuläre Parameter wie Blutvolumen und Blutperfusion zu bestimmen.

Die Skelettmuskulatur wurde als zu untersuchendes Organ gewählt, da sie im Ruhezustand sehr niedrig perfundiert ist und deshalb einerseits in

ihr potentiell gezeigt werden kann, dass Gewebeparameterquantifizierungen auch in Organen wie Brust und Muskel trotz eines im Vergleich zu hochperfundierten Organen wie Herz, Gehirn und Niere niedrigen Kontrast-zu-Rausch-Verhältnisses möglich sind. Andererseits können in ihr ebenfalls Messmöglichkeiten für krankhaft niedrig perfundierte Zustände eigentlich höher durchbluteter Organe evaluiert werden. Eine insbesondere hinsichtlich der Evaluation von Methoden zur Blutperfluationsquantifizierung hervorstechende Eigenschaft der Skelettmuskulatur ist ihre hohe Blutflussreserve und somit die Möglichkeit einer signifikanten Steigerung des Blutflusses. Die Blutflusssteigerung wurden durch lokale Administration des Vasodilators Adenosin in die Femoralarterie des untersuchten Schweinehinterlaufes erreicht. Die Kontrastmitteldynamik und die von ihr abgeleiteten Gewebeparameter wurden in dem in sieben Geweberegionen unterteilten gesamten Hinterlauf gemessen. Die Kontrastmitteldynamiken aller Voxel innerhalb jedes dieser sieben Regionen wurden zu einem effektiven Signal gemittelt, um für die Modellanalysen ein ausreichend hohes Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis der Gewebekurven zu erhalten.

Zur Validierung der Ergebnisse von Studien zur MRT-Messung des interstitiellen Volumens und des Blutvolumens wurden diese mit histologischen Mikroskopiemessungen von Gewebebiopsien verglichen. Es wurde gezeigt, dass die zuverlässigste pharmakokinetische DCE-MRT-Methode zur Messung des interstitiellen Volumens ein Zwei-Kompartiment-Austauschmodell für niedermolekulares Kontrastmittel ist. Dieses Modell setzt einen symmetrischen Austausch des Kontrastmittels zwischen dem jeweils als Kompartiment modellierten intravasalen und interstitiellen Raum über die physikalisch sinnvolle Größe der Kapillarwandpermeabilität voraus. Im Gegensatz zu den in der klinischen Routine üblicherweise verwendeten DCE-MRT-Modellen nach Tofts, die die Permeabilität und die Perfusion physikalisch unklar in einem effektiven Volumentransferparameter zusammenfassen, wurde für das Zwei-Kompartiment-Austauschmodell keine signifikante Abhängigkeit der Messparameter von der DCE-MRT-Datenakquisitionsdauer festgestellt. Das Blutvolumen konnte mit diesem Modell im Mittel ebenfalls wesentlich zuverlässiger bestimmt werden als mit den herkömmlicherweise klinisch verwendeten Modellen. Eine zuverlässigere Methoden, mit wesentlich geringerer Varianz, war jedoch eine einfache Verhältnisbildung der intravasalen Kontrastmitteldynamiken im Gleichgewichtsbereich des untersuchten Gewebes und einer Vollblutkontrastmittelkonzentrationsdynamik. Vergleichbar genau war eine Bolusentfaltungstechnik, ebenfalls auf Grundlage von Intravasalkontrastmitteldaten. Die histologischen und MRT-Ergebnisse deckten sich außerdem gut mit Messresultaten anderer Autoren.

Für die Validierung der DCE-MRT-Blutperfusionsmessungen wurde als Goldstandardreferenzmethode mit einer an der Femoralarterie platzierten Dopplerultraschallsonde der gesamte den bildgebungstechnisch analysierten Hinterlaufsgewebereich versorgende Fluss gemessen. In einer ersten Studie auf alleiniger Grundlage der Intravasalkontrastmitteldaten wurde ein Zwei-Kompartiment-Intravasalkontrastmittelmodell entwickelt, das von der Annahme eines parallel zum Kapillarbett stattfindenden nicht-nutritiven arteriovenösen Flusses ausgeht. Unter Einbezug der Bolusdispersionskorrektur für die arteriellen Eingangsfunktion wurde bei Modellselektion mittels eines statistischen Tests (F-Test) zwischen einem einfachen, ausschließlich das Kapillarbett einbeziehenden Ein-Kompartimentmodell, und dem parallel strukturierten Zwei-Kompartimentmodell gute Übereinstimmungen zwischen den DCE-MRT-Flusserhöhungen und den Sondenflussanstiegen beobachtet. Bei der Auswertung von Modellen zur Gewebepfusionsquantifizierung für die Dynamik von schnell extravasierenden, niedermolekularen Kontrastmitteln wurden die besten Übereinstimmungen mit den Sondenreferenzflüssen mit einem um ein nicht-nutritives Kompartiment erweitertes Zwei-Kompartiment-Austauschmodell erhalten. Für das zusätzliche, nicht-nutritive Flusskompartiment wurden die Ergebnisse des zuvor beschriebenen Zwei-Kompartiment-Intravasalkontrastmittelmodells verwendet. Es ergaben sich besonders stabile Modellanpassungen mit hervorragender Absolutwertübereinstimmung und guter Korrelation mit den Sondenwerten, wenn die Bolusdispersion vernachlässigt wurde. Die im Vergleich zu kompartimentellen Modellen mathematisch komplizierter strukturierten Parameterverteilungsmodelle (Pfropfenstrommodelle) konnten aufgrund ihrer für den Fall des Skelettmuskelgewebes unnatürlichen Ergebnisse weder die Perfusionsheterogenität noch den niedrig perfundierten Zustand korrekt beschreiben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Zwei-Kompartiment-Austauschmodell und seine um ein nicht-nutritives Kompartiment erweiterte Version für die Anwendung in der klinischen Routine von allen gängigen Modellen für umfassende quantitative DCE-MRT-Messungen am besten geeignet sind. Des Weiteren wurde für komplexe quantitative Kontrastmitteldynamikmodelle die Notwendigkeit der Generierung einer größeren Menge an Modelleingangsinformationen auf Grundlage von intravasalen Kontrastmitteln demonstriert.



# Kapitel 7

## Summary

The aim of this thesis was to establish magnetic resonance imaging (MRI) methods for the generation of quantitative image data for voxel-wise individualized irradiation planning (*dose painting*). The most common pharmacokinetic models currently used in clinical routine allow the calculation of tissue parameters which are not of well-defined physical relevance. In the studies that make up the present work, the evaluation of physiologically meaningful, quantitative pharmacokinetic models was possible due to the development of powerful MRI scanner hardware units and innovative imaging sequences provided by MRI scanner manufacturers in recent years. By optimizing the settings of a gradient echo sequence, such as *k*-space sharing (keyhole technique), parallel imaging, and the partial-Fourier technique it became possible to acquire dynamic MRI pulse sequences with high temporal resolution of about 1.5 s. At the same time, these sequence settings allowed a sufficiently high spatial resolution and tissue coverage. Data generated with two types of gadolinium-based MRI contrast agents were used as a basis for pharmacokinetic tissue model analysis: a low-molecular-weight, fast extravasating contrast agent for the determination of extravasation parameters such as interstitial volume and vascular wall permeability, and a contrast agent binding to serum albumin, which during the first minute after injection shows approximately intravascular distribution in biological tissue. This indicator, also referred to as a blood pool contrast agent, was considered to be particularly well suited to determine microvascular parameters such as blood volume and blood perfusion.

The skeletal muscle has been chosen as an organ for investigation because it has low perfusion at rest. Therefore, in skeletal muscle, it is potentially possible to demonstrate that tissue parameter quantification is also feasible in low-perfused organs such as breast and muscle despite their low contrast-

to-noise ratio compared with highly perfused organs such as heart, brain and kidney. On the other hand, investigations in skeletal muscle can be used to assess the potential for identifying abnormally low perfusion states of normally higher-perfused organs. An outstanding feature of the skeletal muscle, particularly in the evaluation of methods for blood perfusion quantification, is its high blood flow reserve, which allows artificial induction of significantly higher blood flows. Blood flow enhancement was achieved by local administration of the vasodilator adenosine into the femoral artery of the investigated hind leg region of the pig. The contrast agent dynamics and the tissue parameters derived from it were measured in the entire hind leg, which was subdivided into seven tissue regions. The contrast agent dynamics of all voxels within each of these seven regions were averaged to an effective signal to obtain a sufficiently high contrast-to-noise ratio of the tissue curves for model analysis.

To validate the results of MRI measurement of interstitial and blood volumes, comparisons with histological microscopy measurements of tissue biopsies were performed. The most reliable pharmacokinetic dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) method for interstitial volume measurement has been shown to be a two-compartment exchange model for low-molecular-weight contrast agent. This purely compartmental model presupposes a symmetrical exchange of the contrast agent between the intravascular and interstitial space via the physically meaningful quantity known as capillary wall permeability. The Toft's DCE-MRI models, commonly used in clinical routine, measure the physically ill-defined effective volume transfer parameter instead of permeability and perfusion. For these kinds of models, a significant dependence of the measurement parameters on data acquisition duration of contrast agent dynamics was identified. In contrast, for the two-compartment exchange model, results were found to be independent of DCE-MRI data acquisition duration. The measured average blood volume was also significantly more reliable with this model than with the models typically used in the clinical setting. However, an even more reliable method, with much lower variance, was a simple calculation of the ratio between intravascular contrast agent dynamics in the region of the examined tissue and arterial whole-blood contrast agent concentration dynamics. A bolus deconvolution technique, also based on intravascular contrast data, showed similar accuracy. The histological and MRI results also showed good agreement with the results reported by other authors.

To validate the DCE-MRI blood perfusion measurements, the entire flow of the tissue region analyzed by imaging was measured with the gold standard reference technique of a Doppler ultrasound probe placed on the fe-



moral artery. In a first study, based solely on intravascular contrast agent data, a two-compartment intravascular contrast agent model was developed which assumes nonnutritive arteriovenous blood flow parallel to the capillary bed. When the correction for bolus dispersion of the arterial input function was included, good correspondences between DCE-MRI blood flow increases and those measured with the probe were observed during model selection by means of a statistical test (F-test) for a simple one-compartment model including only the capillary bed and the parallel-structured two-compartment model. In the evaluation of models for tissue perfusion quantification for the dynamics of fast-extravasating low-molecular-weight contrast agents, the best matches with the Doppler probe reference flow were obtained with a two-compartment exchange model extended by a nonnutritive compartment. For the additional nonnutritive flow compartment, the results of the previously described two-compartment intravascular contrast agent model were used. In particular, stable model fits with excellent absolute-value matches and good correlation with Doppler probe flow were obtained when bolus dispersion was neglected. Unlike the compartment model, mathematically sophisticated parameter distribution models yielded unnatural results in skeletal muscle tissue, precluding correct description of both perfusion heterogeneity and the low-perfused state.

The results of this work demonstrate that, of all current models for comprehensive and quantitative DCE-MRI measurement, the two-compartment exchange model and its version extended by a nonnutritive compartment are best suited for use in clinical routine. Furthermore, it has been demonstrated that a larger amount of model input information from intravascular contrast agent measurements is needed for complex and quantitative models of contrast agent dynamics.



## Kapitel 8

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lutz Lüdemann, der meine Dissertation betreut und begutachtet hat. Ich danke ihm für seine umfassenden Vorarbeiten zu dem Forschungsprojekt, für die Bereitstellung einer exzellenten Arbeitsumgebung und dass er mir die Arbeit in diesem hochspannenden interdisziplinären Thema anvertraut hat. Außerdem danke ich ihm herzlich für sein positives Beispiel an Geduld, Arbeitseifer und Offenheit für neue Ideen und dass er sowohl fachlich als auch menschlich ein herausragendes Vorbild war.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Professor Dr. Thomas Heinzel für seine Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Für ihre professionelle Durchführung der Tierexperimente und die exzellente Zusammenarbeit bei der Erstellung der Datenanalysen und Studien möchte ich Frau Dr. Anika Söhner und Herrn Dr. Marc Maaß danken. In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank auch den vielen uns freundlich unterstützenden Personen im Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen. Insbesondere danke ich Frau Dr. Christine Krüger und Herrn Dr. Andreas Wissmann für ihre Unterstützung beim operativen Teil der Tierexperimente und bei der Überwachung während der Bildgebung. Allen Mitarbeitern an unseren interdisziplinären Studien, insbesondere Herrn Professor Hideo Andreas Baba, Frau Bettina Herwig, Herrn Professor Martin Kramer, Frau Dorothe Möllmann, Herr Dr. Benno Nafz, Herrn Dr. Giorgos Papanastasiou, Herrn Professor Wolfgang Sauerwein, Herrn Professor Marc Schlammann, Herrn Professor Peter Wust bin ich für ihre erstklassigen Beiträge zum erfolgreichen Abschluss unserer Studien und deren Veröffentlichung dankbar.

Herrn Professor Michael Forsting und dem gesamten Team des Instituts für Radiologie möchte ich meinen Dank aussprechen für ihre Unterstützung unseres Projektes, für die Bereitstellung der MRT-Scanner und ihre freundliche Beratung und praktischen Hilfestellungen. Herrn Dr. Stefan Maderwald und allen Mitarbeitern des Erwin L. Hahn Instituts für Magnetresonanz danke ich herzlich für ihre engagierte Unterstützung, die zu einem erfolgreichen Verlauf unseres Projektes geführt hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Forschungsgruppe, insbesondere bei Frau Ivana Alerić, Frau Janine Egert, Herrn Klaus Eickel, Herrn Raphael Kalender, Herrn Dimitri Kessler, Frau Finya Reichardt, Frau Olga Schimpf, Herrn Tom Schobert, Herrn Nico Verbeek und Herrn Patrick Zylka danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, für eine ergiebige Zusammenarbeit und fruchtbare Diskussionen sowie für die vielen netten Gespräche über Physik und viele andere Themen.

Für seine Unterstützung unseres Forschungsprojektes und für eine schöne und lehrreiche Zeit während meiner Tätigkeit in der Bestrahlungsplanung der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Essen möchte ich Herrn Professor Martin Stuschke danken. Ich danke außerdem allen Mitarbeitern der Strahlenklinik, insbesondere Herrn Dr. Jehad Abu Jawad, Herrn Wolfgang Deya, Herrn Ingo Haase, Herrn Martin Heinz, Herrn Frank Indenkämper, Frau Dr. Andrea Kessler, Herrn Holger Kranke, Herrn Dr. Wolfgang Lübke, Herrn Dr. Christoph Pöttgen, Frau Heike Röttgers, Frau Andrea Saemisch, Frau Catharina Schamberg, Herrn Dr. Manfred Wiencierz und Herrn Patrick Zylka danke ich für ein angenehmes Betriebsklima, eine professionelle Zusammenarbeit und wertvolle berufliche sowie menschliche Erfahrungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung unseres Projektes.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Isabelle für ihren emotionalen Rückhalt und die Unterstützung während des gesamten Zeitraums der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Ich danke besonders meinen Eltern, Gudrun und Heinz Hindel, dafür, meine Faszination für Wissenschaft gefördert und mir das Studium der Physik ermöglicht zu haben.

# Literaturverzeichnis

1. Gerabek, W. E.; Haage, B. D.; Keil, G.; Wegner, W.: Enzyklopädie Medizingeschichte. Berlin/New York: De Gruyter, 2005.
2. Haase, A.; Frahm, J.; Matthaei, D.; Hänicke, W.; Merboldt, K.-D.: FLASH imaging: rapid NMR imaging using low flip-angle pulses. 1986. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* 213 (2011), Dez, Nr. 2, S. 533–541.
3. Taylor, J. S.; Reddick, W. E.: Dynamic Contrast-Enhanced MR Imaging in Musculoskeletal Tumors. Jackson, A. (Hrsg.); Buckley, D. L. (Hrsg.); Parker, G. J. (Hrsg.): *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology*. Springer Berlin Heidelberg, 2005 (Medical Radiology), S. 215-237.
4. Gribbestad, I. S.; Gjesdal, K. I.; Nilsen, G.; Lundgren, S.; Hjelstuen, M. H.; Jackson, A.: An Introduction to Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Oncology. Jackson, A. (Hrsg.); Buckley, D. L. (Hrsg.); Parker, G. J. (Hrsg.): *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology*. Springer Berlin Heidelberg, 2005 (Medical Radiology), S. 1-22.
5. Kety, S. S.: The theory and applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues. *Pharmacological reviews* 3 (1951), März, Nr. 1, S. 1–41.
6. Tofts, P. S.; Brix, G.; Buckley, D. L.; Evelhoch, J. L.; Henderson, E.; Knopp, M. V.; Larsson, H. B.; Lee, T. Y.; Mayr, N. A.; Parker, G. J.; Port, R. E.; Taylor, J.; Weisskoff, R. M.: Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols. *Journal of magnetic resonance imaging* 10 (1999), Sep, Nr. 3, S. 223–232.
7. Sourbron, S. P.; Buckley, D. L.: Tracer kinetic modelling in MRI:

- estimating perfusion and capillary permeability. *Physics in medicine and biology* 57 (2012), Jan, Nr. 2, S. 1–33.
8. van der Heide, U. A.; Houweling, A. C.; Groenendaal, G.; Beets-Tan, R. G. H.; Lambin, P.: Functional MRI for radiotherapy dose painting. *Magnetic resonance imaging* 30 (2012), Nov, Nr. 9, S. 1216–1223.
  9. Vaupel, P.: Pathophysiology of solid tumors. *The impact of tumor biology on cancer treatment and multidisciplinary strategies*. Springer, 2009, S. 51–92.
  10. Thews, G.; Vaupel, P.: Vegetative Physiologie. Fünfte Auflage. Heidelberg: Springer Verlag, 2005.
  11. Hall, J.: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book. 12. Auflage. Elsevier Health Sciences, 2010.
  12. College, O.: Physiology. OpenStax College. Rice University. Textbook Equity, 25. April 2013.
  13. Housh, T. J.; Housh, D. J.; deVries, H. A.: Applied Exercise and Sport Physiology, With Labs. 4. Auflage. Routledge, 2016.
  14. Benninghoff, A.; Drenckhahn, D.: Anatomie. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Bd. 2. 16. Auflage. München: Urban und Fischer, 2004.
  15. Welsch, T. D.: Lehrbuch Histologie. 4. Auflage. München: Urban und Fischer, 2010.
  16. Segal, S. S.: Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 12 (2005), Jan/Feb, Nr. 1, S. 33–45.
  17. Berne, R. M.; Knabb, R. M.; Ely, S. W.; Rubio, R.: Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Federation proceedings* 42 (1983), Dez, Nr. 15, S. 3136–3142.
  18. Vaupel, P.; Multhoff, G.: Commentary: A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology* 7 (2016), Aug, S. 332.
  19. Ohta, A.: A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology* 7 (2016), März, S. 109.

20. Barcroft, H.; Dornhorst, A. C.: The blood flow through the human calf during rhythmic exercise. *The journal of physiology* 109 (1949), Sep, Nr. 3-4, S. 402–411.
21. Joyner, M. J.; Dietz, N. M.: Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta physiologica Scandinavica* 177 (2003), März, Nr. 3, S. 329–336.
22. Koch, L. G.; Britton, S. L.; Metting, P. J.: Adenosine is not essential for exercise hyperaemia in the hindlimb in conscious dogs. *The journal of physiology* 429 (1990), Okt, S. 63–75.
23. Maaß, M.: Evaluierung der Perfusionsbildgebung mittels dynamisch kontrastmittelverstärkter Magnetresonanztomographie im Bereich der Extremitätenmuskulatur am narkotisierten Schwein., Universität Duisburg-Essen, Dissertation, 2016.
24. Poucher, S. M.; Nowell, C. G.; Collis, M. G.: The role of adenosine in exercise hyperaemia of the gracilis muscle in anaesthetized cats. *The journal of physiology* 427 (1990), Aug, S. 19–29.
25. Heinonen, I.; Kemppainen, J.; Kaskinoro, K.; Peltonen, J. E.; Borra, R.; Lindroos, M. M.; Oikonen, V.; Nuutila, P.; Knuuti, J.; Hellsten, Y.; Boushel, R.; Kalliokoski, K. K.: Comparison of exogenous adenosine and voluntary exercise on human skeletal muscle perfusion and perfusion heterogeneity. *Journal of applied physiology* 108 (2010), Feb, Nr. 2, S. 378–386.
26. Rådegran, G.; Calbet, J. A.: Role of adenosine in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. *Acta physiologica Scandinavica* 171 (2001), Feb, Nr. 2, S. 177–185.
27. Natali, A.; Bonadonna, R.; Santoro, D.; Galvan, A. Q.; Baldi, S.; Frascerra, S.; Palombo, C.; Ghione, S.; Ferrannini, E.: Insulin resistance and vasodilation in essential hypertension. Studies with adenosine. *The journal of clinical investigation* 94 (1994), Okt, Nr. 4, S. 1570–1576.
28. Clark, M. G.; Clerk, L. H.; Newman, J. M.; Rattigan, S.: Interaction between metabolism and flow in tendon and muscle. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 10 (2000), Dez, Nr. 6, S. 338–345.

29. Clark, M. G.; Rattigan, S.; Barrett, E. J.: Nutritive blood flow as an essential element supporting muscle anabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 9 (2006), Mai, Nr. 3, S. 185–189.
30. Newman, J. M. B.; Ross, R. M.; Richards, S. M.; Clark, M. G.; Rattigan, S.: Insulin and contraction increase nutritive blood flow in rat muscle in vivo determined by microdialysis of L-[14C]glucose. *The journal of physiology* 585 (2007), Nov, Nr. 1, S. 217–229.
31. Zhang, L.; Newman, J. M. B.; Richards, S. M.; Rattigan, S.; Clark, M. G.: Microvascular flow routes in muscle controlled by vasoconstrictors. *Microvascular research* 70 (2005), Jul, Nr. 1-2, S. 7–16.
32. Heinonen, I. H.; Kemppainen, J.; Kaskinoro, K.; Peltonen, J. E.; Borra, R.; Lindroos, M.; Oikonen, V.; Nuutila, P.; Knuuti, J.; Boushel, R.; Kalliokoski, K. K.: Regulation of human skeletal muscle perfusion and its heterogeneity during exercise in moderate hypoxia. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 299 (2010), Jul, Nr. 1, S. 72–79.
33. Lüdemann, L.; Wust, P.; Gellermann, J.: Perfusion measurement using DCE-MRI: implications for hyperthermia. *International journal of hyperthermia* 24 (2008), Feb, Nr. 1, S. 91–96.
34. Cho, C.-H.; Sreenivasa, G.; Plotkin, M.; Pietsch, H.; Wust, P.; Lüdemann, L.: Tumour perfusion assessment during regional hyperthermia treatment: comparison of temperature probe measurement with H(2)(15)O-PET perfusion. *International journal of hyperthermia* 26 (2010), Nr. 4, S. 404–411.
35. Gille, U.: Anatomie für die Tiermedizin. Stuttgart: Enke-Verlag, 2004.
36. Harrison, D. K.; Birkenhake, S.; Knauf, S. K.; Kessler, M.: Local oxygen supply and blood flow regulation in contracting muscle in dogs and rabbits. *The journal of physiology* 422 (1990), März, S. 227–243.
37. Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M.: Physiologie des Menschen. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010.
38. Rhoades, R.; Bell, D.: Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine. 14. Auflage. Wolters Kluwer Health, 2012.



39. Kiselev, M. A.; Gryzunov, I. A.; Dobretsov, G. E.; Komarova, M. N.: Size of a human serum albumin molecule in solution. *Biofizika* 46 (2001), Mai/Jun, Nr. 3, S. 423–427.
40. Brix, G.; Kiessling, F.; Lucht, R.; Darai, S.; Wasser, K.; Delorme, S.; Griebel, J.: Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magnetic resonance in medicine* 52 (2004), Aug, Nr. 2, S. 420–429.
41. Vaupel, P.; Hockel, M.: Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *International journal of oncology* 17 (2000), Nov, Nr. 5, S. 869–879.
42. Risau, W.: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386 (1997), Apr, Nr. 6626, S. 671–674.
43. 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 (2017), Jan, Nr. 1, S. e0170841.
44. Lüdemann, L.; Warmuth, C.; Plotkin, M.; Förschler, A.; Gutberlet, M.; Wust, P.; Amthauer, H.: Brain tumor perfusion: comparison of dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging using T1, T2, and T2\* contrast, pulsed arterial spin labeling, and H2(15)O positron emission tomography. *European journal of radiology* 70 (2009), Jun, Nr. 3, S. 465–474.
45. Kremser, C.; Trieb, T.; Rudisch, A.; Judmaier, W.; Vries, A. de: Dynamic T(1) mapping predicts outcome of chemoradiation therapy in primary rectal carcinoma: sequence implementation and data analysis. *Journal of magnetic resonance imaging* 26 (2007), Sep, Nr. 3, S. 662–671.
46. Aronen, H. J.; Pardo, F. S.; Kennedy, D. N.; Belliveau, J. W.; Packard, S. D.; Hsu, D. W.; Hochberg, F. H.; Fischman, A. J.; Rosen, B. R.: High microvascular blood volume is associated with high glucose uptake and tumor angiogenesis in human gliomas. *Clinical cancer research* 6 (2000), Jun, Nr. 6, S. 2189–2200.
47. Le Duc, G.; Péoc'h, M.; Rémy, C.; Charpy, O.; Muller, R. N.; Le Bas, J. F.; Décorps, M.: Use of T(2)-weighted susceptibility contrast MRI

- for mapping the blood volume in the glioma-bearing rat brain. *Magnetic resonance in medicine* 42 (1999), Okt, Nr. 4, S. 754–761.
48. Thompson, G.; Mills, S. J.; Coope, D. J.; O'Connor, J. P. B.; Jackson, A.: Imaging biomarkers of angiogenesis and the microvascular environment in cerebral tumours. *The British journal of radiology* 84 Spec No 2 (2011), Dez, S. S127–S144.
49. Server, A.; Orheim, T. E. D.; Graff, B. A.; Josefsen, R.; Kumar, T.; Nakstad, P. H.: Diagnostic examination performance by using microvascular leakage, cerebral blood volume, and blood flow derived from 3-T dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging in the differentiation of glioblastoma multiforme and brain metastasis. *Neuroradiology* 53 (2011), Mai, Nr. 5, S. 319–330.
50. Perles-Barbacaru, A. T.; Berger, F.; Lahrech, H.: Quantitative rapid steady state T1 magnetic resonance imaging for cerebral blood volume mapping in mice: Lengthened measurement time window with intraperitoneal Gd-DOTA injection. *Magnetic resonance in medicine* 69 (2013), Mai, Nr. 5, S. 1451–1456.
51. Abe, T.; Mizobuchi, Y.; Nakajima, K.; Otomi, Y.; Irahara, S.; Obama, Y.; Majigsuren, M.; Khashbat, D.; Kageji, T.; Nagahiro, S.; Harada, M.: Diagnosis of brain tumors using dynamic contrast-enhanced perfusion imaging with a short acquisition time. *SpringerPlus* 4 (2015), Feb, S. 88.
52. Raatschen, H.-J.; Fu, Y.; Shames, D. M.; Wendland, M. F.; Brasch, R. C.: Magnetic resonance imaging enhancement of normal tissues and tumors using macromolecular Gd-based cascade polymer contrast agents: preclinical evaluations. *Investigative radiology* 41 (2006), Dez, Nr. 12, S. 860–867.
53. Ah-See, M.-L.; Padhani, A.: Dynamic Magnetic Resonance Imaging in Breast Cancer. Jackson, A. (Hrsg.); Buckley, D. L. (Hrsg.); Parker, G. J. (Hrsg.): *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology*. Springer Berlin Heidelberg, 2005 (Medical Radiology), S. 145-173.
54. Versluis, B.; Dremmen, M. H. G.; Nelemans, P. J.; Wildberger, J. E.; Schurink, G.-W.; Leiner, T.; Backes, W. H.: Dynamic contrast-enhanced MRI assessment of hyperemic fractional microvascular

- blood plasma volume in peripheral arterial disease: initial findings. *PLoS one* 7 (2012), Mai, Nr. 5, S. e37756.
55. 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* 52 (2017), Jan, Nr. 1, S. 66–73.
56. Benjaminsen, I. C.; Brurberg, K. G.; Ruud, E.-B. M.; Rofstad, E. K.: Assessment of extravascular extracellular space fraction in human melanoma xenografts by DCE-MRI and kinetic modeling. *Magnetic resonance imaging* 26 (2008), Feb, Nr. 2, S. 160–170.
57. Kallehauge, J. F.; Tanderup, K.; Duan, C.; Haack, S.; Pedersen, E. M.; Lindegaard, J. C.; Fokdal, L. U.; Mohamed, S. M. I.; Nielsen, T.: Tracer Kinetic Model Selection for Dynamic Contrast-enhanced Magnetic Resonance Imaging of locally advanced Cervical Cancer. *Acta Oncologica* 53 (2014), Nr. 8, S. S. 1064–1072.
58. Li, L.; Wang, K.; Sun, X.; Wang, K.; Sun, Y.; Zhang, G.; Shen, B.: Parameters of dynamic contrast-enhanced MRI as imaging markers for angiogenesis and proliferation in human breast cancer. *Medical science monitor* 21 (2015), Feb, S. 376–382.
59. Lüdemann, L.; Wurm, R.; Zimmer, C.: Pharmacokinetic modeling of Gd-DTPA extravasation in brain tumors. *Investigative radiology* 37 (2002), Okt, Nr. 10, S. 562–570.
60. Jain, R. K.: Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer research* 47 (1987), Jun, Nr. 12, S. 3039–3051.
61. Franiel, T.; Lüdemann, L.; Taupitz, M.; Bohmer, D.; Beyersdorff, D.: MRI before and after external beam intensity-modulated radiotherapy of patients with prostate cancer: the feasibility of monitoring of radiation-induced tissue changes using a dynamic contrast-enhanced inversion-prepared dual-contrast gradient echo sequence. *Radiother Oncol* 93 (2009), Nov, Nr. 2, S. S. 241–245.
62. Pries, A. R.; Höpfner, M.; Noble, F. le; Dewhirst, M. W.; Secomb, T. W.: The shunt problem: control of functional shunting in normal and tumour vasculature. *Nature reviews Cancer* 10 (2010), Aug, Nr. 8, S. 587–593.

63. Pries, A. R.; Reglin, B.: Coronary microcirculatory pathophysiology: can we afford it to remain a black box? *European heart journal* 38 (2017), Feb, Nr. 7, S. 478–488.
64. Collins, D. M.; McCullough, W. T.; Ellsworth, M. L.: Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. *Microvascular research* 56 (1998), Jul, Nr. 1, S. 43–53.
65. Yaligar, J.; Thakur, S. B.; Bokacheva, L.; Carlin, S.; Thaler, H. T.; Rizwan, A.; Lupu, M. E.; Wang, Y.; Matei, C. C.; Zakian, K. L.; Koutcher, J. A.: Lactate MRSI and DCE MRI as surrogate markers of prostate tumor aggressiveness. *NMR in biomedicine* 25 (2012), Jan, Nr. 1, S. 113–122.
66. Brizel, D. M.; Albers, M. E.; Fisher, S. R.; Scher, R. L.; Richtsmeier, W. J.; Hars, V.; George, S. L.; Huang, A. T.; Prosnitz, L. R.: Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 338 (1998), Jun, Nr. 25, S. 1798–1804.
67. Budach, V.; Stuschke, M.; Budach, W.; Baumann, M.; Geismar, D.; Grabenbauer, G.; Lammert, I.; Jahnke, K.; Stueben, G.; Herrmann, T.; Bamberg, M.; Wust, P.; Hinkelbein, W.; Wernecke, K. D.: Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. *J Clin Oncol* 23 (2005), Feb, Nr. 6, S. 1125–1135.
68. Gillies, R. J.; Schornack, P. A.; Secomb, T. W.; Raghunand, N.: Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 1 (1999), Aug, Nr. 3, S. 197–207.
69. Honig, C. R.; Feldstein, M. L.; Frierson, J. L.: Capillary lengths, anastomoses, and estimated capillary transit times in skeletal muscle. *The American journal of physiology* 233 (1977), Jul, Nr. 1, S. 122–129.
70. Angleys, H.; Østergaard, L.; Jespersen, S. N.: The effects of capillary transit time heterogeneity (CTH) on brain oxygenation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 35 (2015), Mai, Nr. 5, S. 806–817.

71. Tietze, A.; Mouridsen, K.; Lassen-Ramshad, Y.; Østergaard, L.: Perfusion MRI derived indices of microvascular shunting and flow control correlate with tumor grade and outcome in patients with cerebral glioma. *PloS one* 10 (2015), Apr, Nr. 4, S. e0123044.
72. Pries, A. R.; Badimon, L.; Bugiardini, R.; Camici, P. G.; Dorobantu, M.; Duncker, D. J.; Escaned, J.; Koller, A.; Piek, J. J.; Wit, C. de: Coronary vascular regulation, remodelling, and collateralization: mechanisms and clinical implications on behalf of the working group on coronary pathophysiology and microcirculation. *European heart journal* 36 (2015), Dez, Nr. 45, S. 3134–3146.
73. Gilkes, D. M.; Semenza, G. L.: Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future oncology (London, England)* 9 (2013), Nov, Nr. 11, S. 1623–1636.
74. Vaupel, P.; Kelleher, D. K.: Blood flow and oxygenation status of prostate cancers. *Advances in experimental medicine and biology* 765 (2013), S. 299–305.
75. Vaupel, P.: Oxygenation of human tumors. *Strahlentherapie und Onkologie* 166 (1990), June, Nr. 6, S. 377–386.
76. Höckel, M.; Vaupel, P.: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93 (2001), Feb, Nr. 4, S. 266–276.
77. Jordan, B. F.; Sonveaux, P.: Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Frontiers in pharmacology* 3 (2012), Mai, S. 94.
78. Nahum, A. E.; Movsas, B.; Horwitz, E. M.; Stobbe, C. C.; Chapman, J. D.: Incorporating clinical measurements of hypoxia into tumor local control modeling of prostate cancer: implications for the alpha/beta ratio. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57 (2003), Oct, Nr. 2, S. 391–401.
79. Stewart, B.; Wild, C.: World Cancer Report 2014. World Health Organization, 2014.
80. Chaudary, N.; Hill, R. P.: Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast disease* 26 (2006), 2007, S. 55–64.

81. Gray, L. H.; Conger, A. D.; Ebert, M.; Hornsey, S.; Scott, O. C.: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology* 26 (1953), Dez, Nr. 312, S. 638–648.
82. Dertinger, H.; Jung, H.: Molekulare Strahlenbiologie: Vorlesungen über die Wirkung ionisierender Strahlen auf elementare biologische Objekte. Springer Berlin Heidelberg, 1969.
83. Hill, R. P.; Bush, R. S.; Yeung, P.: The effect of anaemia on the fraction of hypoxic cells in an experimental tumour. *The British Institute of Radiology* 44 (1971), Jan, Nr. 520, S. 299.
84. Thorwarth, D.; Soukup, M.; Alber, M.: Dose painting with IMPT, helical tomotherapy and IMXT: a dosimetric comparison. *Radiother Oncol* 86 (2008), Nr. 1, S. S. 30–34.
85. Thorwarth, D.; Notohamiprodjo, M.; Zips, D.; Müller, A.-C.: Personalized precision radiotherapy by integration of multi-parametric functional and biological imaging in prostate cancer: A feasibility study. *Zeitschrift für medizinische Physik* 27 (2017), Mar, Nr. 1, S. 21–30.
86. Baumann, R.; Depping, R.; Delaperriere, M.; Dunst, J.: Targeting hypoxia to overcome radiation resistance in head & neck cancers: real challenge or clinical fairytale? *Expert review of anticancer therapy* 16 (2016), Jul, Nr. 7, S. 751–758.
87. Meier, P.; Zierler, K. L.: On the theory of the indicator-dilution method for measurement of blood flow and volume. *Journal of applied physiology* 6 (1954), Jun, Nr. 12, S. 731–744.
88. Østergaard, L.; Weisskoff, R. M.; Chesler, D. A.; Gyldensted, C.; Rosen, B. R.: High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. Part I: Mathematical approach and statistical analysis. *Magnetic resonance in medicine* 36 (1996), Nov, Nr. 5, S. 715–725.
89. Richardson, O. C.; Scott, M. L. J.; Tanner, S. F.; Waterton, J. C.; Buckley, D. L.: Overcoming the low relaxivity of gadofosveset at high field with spin locking. *Magnetic resonance in medicine* 68 (2012), Okt, Nr. 4, S. 1234–1238.

90. Barrett, T.; Kobayashi, H.; Brechbiel, M.; Choyke, P. L.: Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis. *European journal of radiology* 60 (2006), Dez, Nr. 3, S. 353–366.
91. Lauffer, R. B.; Parmelee, D. J.; Dunham, S. U.; Ouellet, H. S.; Dolan, R. P.; Witte, S.; McMurry, T. J.; Walovitch, R. C.: MS-325: albumin-targeted contrast agent for MR angiography. *Radiology* 207 (1998), Mai, Nr. 2, S. 529–538.
92. Eldredge, H. B.; Spiller, M.; Chasse, J. M.; Greenwood, M. T.; Caravan, P.: Species dependence on plasma protein binding and relaxivity of the gadolinium-based MRI contrast agent MS-325. *Investigative radiology* 41 (2006), März, Nr. 3, S. 229–243.
93. Rohrer, M.; Bauer, H.; Mintorovitch, J.; Requardt, M.; Weinmann, H. J.: Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol* 40 (2005), Nov, Nr. 11, S. S. 715–724.
94. Tartaro, A.; Maccarone, M.: The utility of gadoteric acid in contrast-enhanced MRI: a review. *Reports in Medical Imaging* 2015 (2015), Feb, Nr. 8, S. 25–35.
95. Reinländer, C.: MRT-Kontrastmittel für das Knochenmark: Vergleichende experimentelle Untersuchungen von USPIO, SPIO und Gd-DOTA., Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Dissertation, 2003.
96. Hager, H. H. J.; Bruchhausen, F. von: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 4: Stoffe A-K. Fünfte Auflage. Heidelberg: Springer Verlag, 2013.
97. Higgins, C.; Roos, A. de: MRI and CT of the Cardiovascular System. Zweite Auflage. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
98. Le Mignon, M. M.; Chambon, C.; Warrington, S.; Davies, R.; Bonnemain, B.: Gd-DOTA. Pharmacokinetics and tolerability after intravenous injection into healthy volunteers. *Investigative radiology* 25 (1990), Aug, Nr. 8, S. 933–937.
99. Jacquez, J. A.: Compartmental Analysis in Biology and Medicine. Zweite Auflage. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press, 1985.

100. Hindel, S.; Sauerbrey, A.; Maaß, M.; Maderwald, S.; Schlamann, M.; Lüdemann, L.: Validation of Perfusion Quantification with 3D Gradient Echo Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Using a Blood Pool Contrast Agent in Skeletal Swine Muscle. *PLoS one* 10 (2015), Jun, Nr. 6, S. e0128060.
101. Hindel, S.; Papanastasiou, G.; Wust, P.; Maaß, M.; Söhner, A.; Lüdemann, L.: Evaluation of pharmacokinetic models for perfusion imaging with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in porcine skeletal muscle using low-molecular-weight contrast agents. *Magnetic resonance in medicine* (2017), Nov. Online-Version des vor der Aufnahme in eine Ausgabe veröffentlichten Artikels.
102. Johnson, J. A.; Wilson, T. A.: A model for capillary exchange. *The American journal of physiology* 210 (1966), Jun, Nr. 6, S. 1299–1303.
103. Sangren, W. C.; Sheppard, C. W.: A mathematical derivation of the exchange of a labeled substance between a liquid flowing in a vessel and an external compartment. *The bulletin of mathematical biophysics* 15 (1953), Dez, Nr. 4, S. 387–394.
104. 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 (2014), Feb, S. 390506.
105. Bode, G.; Clausing, P.; Gervais, F.; Loegsted, J.; Luft, J.; Nogues, V.; Sims, J.; Steering Group of the RETHINK Project: The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 62 (2010), Nov/Dez, Nr. 3, S. 196–220.
106. Stanton, H.: Swine in cardiovascular research. 8. Auflage. CRC Press, 1986.
107. Grant, R. T.; Wright, H. P.: Anatomical basis for non-nutritive circulation in skeletal muscle exemplified by blood vessels of rat biceps femoris tendon. *Journal of anatomy* 106 (1970), Jan, Nr. 1, S. 125–133.
108. Hammersen, F.: On the fine structure of peculiar inclusion bodies in vascular adventitial cells. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 109 (1970), Nr. 3, S. 380–383.



109. Hudlicka, O.: Microcirculation in skeletal muscle. *Muscles, ligaments and tendons journal* 1 (2011), Jan, Nr. 1, S. 3–11.
110. Sakai, T.; Hosoyamada, Y.: Are the precapillary sphincters and metarterioles universal components of the microcirculation? An historical review. *The journal of physiological sciences* 63 (2013), Sep, Nr. 5, S. 319–331.
111. Saxena, P. R.; Verdouw, P. D.: Tissue blood flow and localization of arteriovenous anastomoses in pigs with microspheres of four different sizes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 403 (1985), Feb, Nr. 2, S. 128–135.
112. Zweifach, B. W.; Metz, D. B.: Selective distribution of blood through the terminal vascular bed of mesenteric structures and skeletal muscle. *Angiology* 6 (1955), Aug, Nr. 4, S. 282–290.
113. Borgström, P.; Lindbom, L.; Arfors, K. E.; Intaglietta, M.: Beta-adrenergic control of resistance in individual vessels in rabbit tenuissimus muscle. *The American journal of physiology* 254 (1988), Apr, Nr. 4 Pt 2, S. 631–635.
114. Clark, M. G.; Rattigan, S.; Clerk, L. H.; Vincent, M. A.; Clark, A. D.; Youd, J. M.; Newman, J. M.: Nutritive and non-nutritive blood flow: rest and exercise. *Acta physiologica Scandinavica* 168 (2000), Apr, Nr. 4, S. 519–530.
115. Saltzman, D. J.; Cazzoli, L.; Cabrales, P.; Tsai, A. G.; Thompson, J. E.; Intaglietta, M.: Preferential capillary channels exist in the microcirculation. *Journal of the American College of Surgeons* 209 (2009), Nr. 3, S. 39.
116. Duling, B. R.; Damon, D. H.: An examination of the measurement of flow heterogeneity in striated muscle. *Circulation research* 60 (1987), Jan, Nr. 1, S. 1–13.
117. Pries, A. R.; Secomb, T. W.; Gaehtgens, P.: Structure and hemodynamics of microvascular networks: heterogeneity and correlations. *The American journal of physiology* 269 (1995), Nov, Nr. 5 Pt 2, S. 1713–1722.
118. Decking, U. K. M.: Spatial heterogeneity in the heart: recent insights and open questions. *News in physiological sciences* 17 (2002), Dez, S. 246–250.

119. Pries, A. R.; Secomb, T. W.: Origins of heterogeneity in tissue perfusion and metabolism. *Cardiovascular research* 81 (2009), Feb, Nr. 2, S. 328–335.
120. Gewirtz, H.; Tawakol, A.; Bacharach, S. L.: Heterogeneity of myocardial blood flow and metabolism: review of physiologic principles and implications for radionuclide imaging of the heart. *Journal of nuclear cardiology* 9 (2002), Sep/Oct, Nr. 5, S. 534–541.
121. Bassingthwaite, J. B.; King, R. B.; Roger, S. A.: Fractal nature of regional myocardial blood flow heterogeneity. *Circulation research* 65 (1989), Sep, Nr. 3, S. 578–590.
122. Carmeliet, P.: Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438 (2005), Dez, Nr. 7070, S. 932–936.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Düsseldorf, 22. November 2017

---

Stefan Hindel