

Evaluierung des PET-Hypoxietracers
[¹⁸F]Fluoroazomycin-Arabinosid ([¹⁸F]FAZA)
im Hinblick auf das Therapieansprechen von
EMT6-Tumoren am
Mausmodell

Julia Aloisia Lebschi

München 2012

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Evaluierung des PET-Hypoxietracers
[¹⁸F]Fluoroazomycin-Arabinosid ([¹⁸F]FAZA)
im Hinblick auf das Therapieansprechen von
EMT6-Tumoren am
Mausmodell**

Julia Aloisia Lebschi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät der Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 09.01.2012 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2012
angenommen.

In großer Dankbarkeit
meinen geliebten Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
<u>1.1 Grundlagen der Tumorphypoxie</u>	<u>1</u>
1.1.1 „Januskopf“ der Tumorphypoxie	2
1.1.2 Gesteigerte Tumoraggressivität	3
1.1.3 Therapieresistenz	3
<u>1.2 Spezielle Therapieoptionen hypoxischer Tumoren</u>	<u>6</u>
1.2.1 Hypoxieadaptierte Strahlentherapie	6
1.2.2 Hypoxieadaptierte Chemotherapie am Beispiel von Tirapazamin (TPZ)	7
<u>1.3 Experimentelle Bestimmung des Oxygenierungsstatus</u>	<u>8</u>
<u>1.4 PET und PET-Hypoxietracer</u>	<u>12</u>
<u>2. Zielsetzung</u>	<u>20</u>
<u>3. Material und Methoden</u>	<u>22</u>
<u>3.1 Material</u>	<u>22</u>
3.1.1 Versuchstiere	22
3.1.2 Zelllinie	22
3.1.3 Kulturmedien und Zusätze	23
3.1.4 Radioaktive Substanzen	23
3.1.5 Medikamente	24
3.1.6 Chemikalien	24
3.1.7 Geräte	25
3.1.8 Gebrauchsmaterial	25
3.1.9 Software	26
<u>3.2 Methoden</u>	<u>26</u>
3.2.1 Kultivieren der EMT6-Zellen	26
3.2.2 Tierhaltung	27
3.2.3 Tumoranzücht und -implantation	27
3.2.4 Sonographische Bestimmung der Tumorgroße	28
3.2.5 PET-Aufnahmen	29
3.2.6 Therapie	30
3.2.7 Darstellung der Tumorperfusion in der Magnetresonanztomographie	32
3.2.8 Biodistribution	32
3.2.9 Autoradiographie	33
3.2.10 Immunhistochemie	33
<u>3.3 Statistische Auswertung</u>	<u>35</u>
<u>4. Ergebnisse</u>	<u>36</u>
<u>4.1 Aufnahme und Verteilung von [¹⁸F]FAZA</u>	<u>36</u>
4.1.1 Studienkollektiv und Therapieverträglichkeit	36
4.1.2 Biodistribution mittels γ -Counter	36
4.1.3 Distribution von [¹⁸ F]FAZA in der PET	38
4.1.4 Einfluss der Therapie auf die Tumoroxygenierung	40

<i>4.2 Tumorwachstum</i>	42
<i>4.2.1 Entwicklung des Tumolvolumens und der Tumorbinnenstruktur</i>	42
<i>4.2.2 Einfluss der Therapie auf das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Tumoroxygenierung</i>	42
<i>4.2.2.1 Wachstumsdauer</i>	42
<i>4.2.2.2 Wachstumskurven</i>	45
<i>4.3 Magnetresonanztomographie (MRT)</i>	46
<i>4.4 Autoradiographie</i>	47
<i>4.5 Immunhistochemie</i>	48
<i>5. Diskussion</i>	50
<i>5.1 [¹⁸F]FAZA-Studien</i>	50
<i>5.1.1 Distributionsstudie mittels γ-Counter</i>	50
<i>5.1.2 PET-Messungen</i>	50
<i>5.2 Tumorwachstum</i>	56
<i>5.2.1 Volumenentwicklung und Beurteilung der Tumorbinnenstruktur</i>	56
<i>5.2.2 Wachstumsverhalten unter Therapie</i>	57
<i>5.2.3 Magnetresonanztomographie</i>	60
<i>5.3 Autoradiographie mit [¹⁸F]FAZA und [¹⁸F]GalactoRGD</i>	60
<i>5.4 Immunhistochemie</i>	60
<i>5.5 Ausblick</i>	61
<i>6. Zusammenfassung</i>	63
<i>7. Literaturverzeichnis</i>	65
<i>8. Abbildungsverzeichnis</i>	80
<i>9. Tabellenverzeichnis</i>	83
<i>10. Abkürzungsverzeichnis</i>	84
<i>11. Danksagung</i>	89

1. Einleitung

An der Gesamtheit der Krebserkrankungen des Menschen macht der Anteil solider Tumoren mehr als 90 % aus (Brown, 2000). Viele solide Tumoren, besonders diejenigen des Gehirns, des Kopf-Hals-Bereichs, der Mammae, der Cervix uteri und Weichteilsarkome, haben ein kritisches Charakteristikum: Sie weisen sehr häufig hypoxische Gewebeareale auf. Während sich in gesundem Gewebe mittlere Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) im Bereich von 25 – 60 mmHg finden, zeigen sich bei mehr als der Hälfte aller soliden Tumoren Durchschnittswerte von weniger als 10 mmHg (Vaupel et al., 2007; Vaupel, 2009 b). Nachweislich sind mit niedrigen tumoralen Sauerstoffpartialdrücken eine höhere Malignität und eine höhere Therapieresistenz gegenüber den meisten bisher zu Verfügung stehenden Therapiestrategien verbunden. Das Wissen um den Oxygenierungsstatus der Tumorzellen ist daher Voraussetzung, um geeignete, speziell hypoxieadaptierte Therapieansätze anwenden zu können.

In der vorliegenden Dissertation wurde anhand des ^{18}F -markierten Hypoxietracers Fluoroazomyzinarabinosid ($[^{18}F]$ FAZA) mittels PET der Oxygenierungsstatus von murinen EMT6-Mammakarzinomen beurteilt. Anschließend wurde der prädiktive Wert von $[^{18}F]$ FAZA hinsichtlich des Effekts von Radio-, Chemo- sowie kombinierter Radiochemotherapie an hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Tumoren untersucht. Einleitend soll daher auf die Grundlagen der Tumorphypoxie eingegangen werden.

1.1 Grundlagen der Tumorphypoxie

In der vorliegenden Dissertation wird der Begriff der *Gewebehypoxie* als Vorliegen von Sauerstoffpartialdrücken ≤ 10 mmHg verwendet (Höckel und Vaupel, 2001 a, b). Dahingegen definiert die *Anoxie* das vollständige Fehlen von Sauerstoff ($pO_2 = 0$ mmHg). Der Hypoxie solider Tumoren liegt ein zellulärer Sauerstoffmangel als pathophysiologische Konsequenz einer strukturell und funktionell gestörten Mikrozirkularisation zugrunde. Die limitierte Sauerstoffdiffusion führt zu einer inadäquaten Versorgung der Zellen mit Sauerstoff, die die biologischen Funktionen auf Zell-, Gewebe- und Organebene beeinträchtigt (Vaupel et al., 1989 b, c); Höckel und Vaupel, 2001 b). Diese klinisch-physiologische Definition der mangelnden Sauerstoffverfügbarkeit im Gewebe ist abzugrenzen vom biochemischen Hypoxiebegriff, der den durch Sauerstoffmangel limitierten Elektronentransport an der Atmungskette beschreibt (Boyer et al., 1977).

Der Begriff der Gewebehypoxie lässt sich zudem untergliedern in akute und chronische Hypoxie: Der *akuten Hypoxie* als Sauerstoffmangelversorgung des Gewebes durch limitierte Perfusion liegt ein temporärer, reversibler Verschluss von Blutgefäßen zugrunde (Brown, 1979; Chaplin et al., 1986, 1987) und betrifft auch die Zellen in direkter Nachbarschaft zum Blutgefäß (Padhani, 2005).

Die *chronische Hypoxie* hingegen wird durch eine begrenzte O_2 -Diffusion vom arteriellen Ende eines Blutgefäßes ins Gewebe bis zu einer Entfernung von ca. 70 μm verursacht. Bei Distanzen > 70 μm zwischen versorgendem Blutgefäß und Gewebezelle geht die Sauerstoffspannung durch den O_2 -Verbrauch des dazwischenliegenden Gewebes gegen Null (Abb. 1).

Gewebezellen in diesem Distanzbereich können längere Zeit einem niedrigen pO_2 ausgesetzt sein und hypoxisch werden (Thomlinson und Gray; 1955; Brown, 1990; Hall und Giaccia, 2006). Diese Tatsache könnte die tumorale Proliferationshemmung in gefäßfernen Arealen erklären.

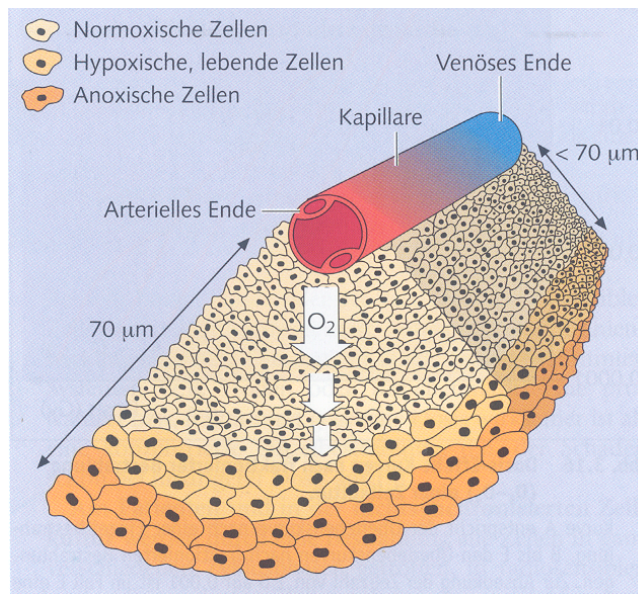


Abb. 1: Darstellung der Entstehung der chronischen Gewebhypoxie (Hall und Giaccia, 2006)

Das mögliche kombinierte Auftreten von akuter und chronischer Hypoxie erklärt auch, warum die Tumorphypoxie nicht als ein statischer Zustand, sondern vielmehr als ein dynamischer Prozess gesehen werden muss. In einem einzelnen Tumor können dabei sowohl perfusions- als auch diffusionsbedingt niedrige O_2 -Partialdrücke heterogen verteilt auftreten und dabei normoxischen Mikroregionen eng benachbart sein. Der Oxygenierungsgrad unterscheidet sich aber nicht nur intratumoral, d.h. zwischen verschiedenen Tumorarealen in einem Tumor, sondern auch intertumoral, d.h. zwischen verschiedenen Tumoren der gleichen Art.

1.1.1 ‚Januskopf‘ der Tumorphypoxie

Werden Zellen hypoxischen O_2 -Partialdrücken ausgesetzt, kommt es im Allgemeinen durch eingeschränkte Proteinsynthese zu reduzierter Zellproliferation und in der Konsequenz zum Zelltod. *In vitro*-Versuche zeigten, dass Hypoxie auch die Proliferation von Tumorzellen hemmt. Je nach Dauer und Ausmaß der Hypoxie kann die Verteilung der Zellen im Zellzyklus verändert werden. Unter anoxischen Bedingungen arretieren die meisten Zellen sogar in der aktuellen Zellzyklusphase. Zudem kann Hypoxie sowohl über den Tumorsuppressor p53 als auch unabhängig von ihm in gesunden und neoplastischen Zellen Apoptose induzieren. Hypoxie führt u.a. zu Genomveränderungen, die in Zellzyklusarrest, mangelnder Differenzierung und Apoptose mit konsekutiver Gewebenekrose resultieren. Dies könnte lange rezidivfreie Intervalle, inaktive Mikrometastasen und Wachstumsverzögerung bei großen Tumoren erklären.

Da demgegenüber ein erhöhtes malignes Potential hypoxischer Tumoren und deren Therapieresistenz stehen, sprechen Vaupel und Mayer (2007) von einem ‚Januskopf‘ der Tumorphypoxie:

1.1.2 Gesteigerte Tumoraggressivität

Nachweislich erhöht Hypoxie das maligne Potential von Tumoren (Giaccia, 1996; Höckel und Vaupel, 2001 b; Harrison et al., 2002; Vaupel, 2004; Vaupel et al., 2004):

Hypoxieinduzierte Proteom- und Genomalterationen können die Tumorprogression begünstigen, indem Tumorzellen dadurch in die Lage versetzt werden, nutritive Mangelzustände kompensieren und unkontrolliert wachsen zu können. Dies resultiert in einer gesteigerten Tendenz zu lokal-invasivem Tumorwachstum, perifokaler Streuung sowie steigender Wahrscheinlichkeit zu Regional- und Fernmetastasierung mit zunehmender Tumorphypoxie (Young et al., 1988; Höckel et al., 1996 a - c, 1999; Brizel et al., 1996, 1997; Cuvier et al., 1997; Sundfor et al., 1998, Graham et al., 1999). Persistierende Hypoxie kann zudem auf zellulärer Ebene einen klinisch aggressiveren Tumorphänotyp induzieren (Vaupel et al., 2004; Vaupel und Mayer, 2005, 2007).

1.1.3 Therapieresistenz

Dass Hypoxie die Resistenz des Tumors gegen eine Radiotherapie erhöht, wurde schon in den 1930er Jahren in Erwägung gezogen, aber erst in den 1950ern gelang es, das Auftreten von Hypoxie und Nekrosebildung am humanen Bronchuskarzinom nachzuweisen (Gray et al., 1953; Thomlinson et al., 1955). Mit niedrigem pO_2 nimmt die Resistenz gegenüber den meisten bisher zu Verfügung stehenden Therapiestrategien zu: Dies gilt sowohl für γ - und Röntgenstrahlung (Gray et al., 1953; Gatenby et al., 1988; Höckel et al., 1996 a, b); Raleigh, 1996; Harris, 2002; Nordmark et al., 2005), als auch für eine Vielzahl von Zytostatika (Sutherland, 1998; Höckel et al., 1999; Koong et al., 2000). Seit der Entdeckung dieses Zusammenhangs wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Strahlen- bzw. Chemoresistenz solider hypoxischer Tumoren zu überwinden – mit moderatem Erfolg (Urtasun et al., 1976; Dische et al., 1982; Coleman et al., 1986).

Die zugrunde liegenden Mechanismen lassen sich in direkte und indirekte Hypoxieeffekte einteilen (Abb. 2): Der *direkte* Effekt erklärt sich durch das Fehlen intrazellulären molekularen Sauerstoffs. Sauerstoff potenziert die Wirkung ionisierender Strahlung (sog. *Sauerstoffeffekt*, siehe unten) und wird zur Bildung freier Radikale benötigt, die den zytotoxischen Effekt einiger Chemotherapeutika wie z.B. Bleomycin und Doxorubicin verstärken (Erlichman und Wu, 1992).

Daneben finden sich *indirekte* Effekte, die auf Veränderungen des Transkriptom, der Genexpression, des Proteoms sowie des Genoms basieren. Dabei kommen hypoxiebedingte Alterationen aufgrund von Veränderungen des Transkriptom, der Genexpression und des Proteoms am häufigsten vor. Sie sind reversibel und treten bei einem $pO_2 < 7$ mmHg auf. Ihnen liegt eine hypoxieinduzierte Stimulation oder Inhibition der Genexpression zugrunde, was durch posttranskriptionale oder posttranslationale Effekte zu einem veränderten Proteom führt. Darunter fallen

– *Veränderungen der Zellproliferation* mit Störung des Zellzyklus, z.B. durch Arrest in der G_1 -Phase, was die Wirkung von 5-FU beeinträchtigt (Yoshida et al., 2009) oder zu einer reduzierten Fraktion an Tumorzellen führt, die sich in der für Vincaalkaloide und Methotrexat sensiblen S-Phase befinden (Chabner, 1996).

– *Veränderungen im Zellmetabolismus und vermehrte Enzymaktivität* mit Auswirkungen auf den transmembranösen Transport, die intrazelluläre Akkumulation und die Aktivierung von Chemotherapeutika sowie auf die Konzentration von Glutathion und nukleophilen Thiolen, die mit der Ziel-DNA um die Alkylierung konkurrieren.

– *erhöhte Transkription* von Membrantransportern – Vera et al. (1991) fanden beispielsweise, dass GLUT-1 den Efflux von Vinblastin erleichtert –, von DNA-Repair-Enzymen, autokrinen

und parakrinen Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , VEGF), sowie von Proteinen, die für die Abtrennung der Zellen oder das invasive Wachstum verantwortlich sind. Die Expression vieler hypoxieinduzierbarer Gene u.a. der Erythropoese, der Angiogenese, des Glykolyse-metabolismus und der Tumorinvasivität wird durch Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 und NF κ B beeinflusst (Harrison und Blackwell, 2004).

Aber auch Genalterationen und klonale Selektion können eine Therapieresistenz bedingen. Sie treten bei einem $pO_2 < 0,7$ mmHg auf und sind in der Regel irreversibel. Hypoxie begünstigt durch Punktmutationen und chromosomale Rearrangements eine Instabilität des Genoms. Die dadurch wachsende Zahl der genetischen Varianten ermöglicht eine klonale und tumorintrinsic Zellheterogenität. Die zügige Proliferation von therapieresistenten klonalen Varianten resultiert in einem malignen Zellwachstum mit Verlust der Differenzierung und Apoptose. Dadurch wiederum wird die tumorale Hypoxie stabilisiert, wenn nicht verstärkt, so dass sich ein Circulus vitiosus der malignen Progression etabliert (Vaupel und Harrison, 2004; Vaupel, 2008).

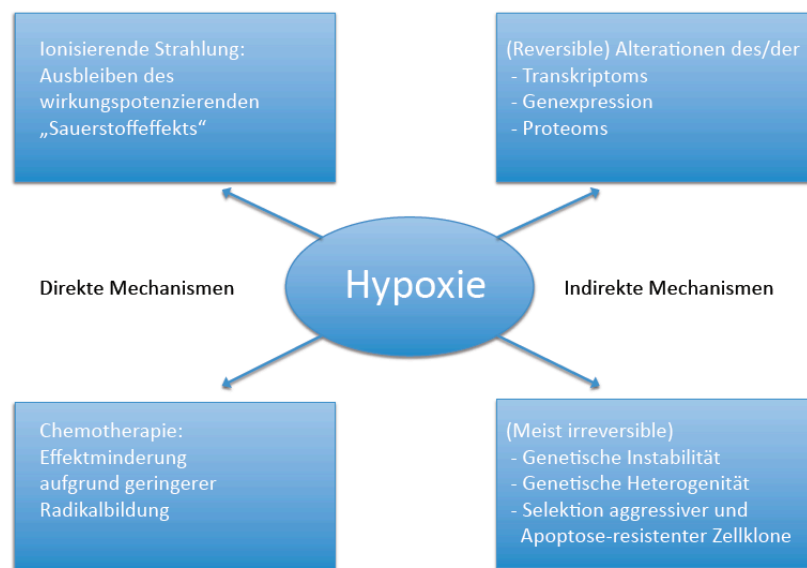


Abb. 2: Hypoxieinduzierte direkte und indirekte Mechanismen der Entwicklung einer Therapieresistenz (nach Vaupel, 2009 b)

Physiologie der Strahlenresistenz

Intrazellulärer Sauerstoff potenziert als universeller Elektronenakzeptor die Wirkung ionisierender Strahlung und wirkt damit strahlensensibilierend (sog. *Sauerstoffeffekt*) (Friedberg et al, 1995; Sauer, 2001 b; Hall und Giaccia, 2006): Durch Interaktion der ionisierenden Strahlung mit intrazellulärem Wasser entstehen die drei äußerst aktiven Primärradikale OH \cdot , H \cdot , e $^-$. Dabei ist zu beachten, dass ca. 65 % des Strahlenschadens durch diese Radikale verursacht werden und nur ca. 35 % durch direkte Ionisation (Ward, 1988). Vor allem die chemisch stark reaktiven OH \cdot -Radikale bewirken an den Doppelbindungen der DNA-Basen zu einer Protonen-Addition (80 %), an den Zuckermolekülen eine Protonen-Abstraktion (20 %). Dadurch wird die DNA zu einem DNA-Radikal (DNA \cdot). In Abwesenheit von O $_2$ wird die DNA-Radikalstelle repariert, indem von einem weiteren Molekül, meist einer Thiolverbindung, ein Proton abgegeben wird. In Anwesenheit von O $_2$ reagiert dieser schneller mit dem DNA-Radikal als die Thiolverbindung und macht es damit der chemischen DNA-Reparatur unzugänglich. Zudem erhöht der Sauerstoffeffekt die indirekte Strahlenwirkung, indem in Anwesenheit von O $_2$ die Primärradikale mit diesem reagieren und die

Sekundärradikale HO_2^\cdot und $\text{O}_2^{\cdot-}$ sowie konsekutiv das zytotoxische Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bilden. In Abwesenheit von O_2 können diese freien Radikale rekombinieren und führen in der Folge nicht zu dem gewollten zellulären Schaden (Overgaard und Horsman, 1996). Unter hypoxischen Bedingungen mit einem $\text{pO}_2 < 25 - 30$ mmHg, wenn nicht wie oben beschrieben der Sauerstoffeffekt die Strahlenwirkung potenziert, ist die Strahlensensibilität von Tumoren deutlich reduziert (Vaupel et al, 2001, Vaupel, 2009 a; Abb. 3). Im Vergleich zu normoxischen Zellen sind hypoxische Tumorzellen bis zu dreimal resistenter gegenüber ionisierender Strahlung (Gray et al., 1953). Um einen vergleichbaren Effekt der Strahlentherapie auf hypoxisches Tumorgewebe zu erzielen, müsste die Strahlendosis im Vergleich zu normoxischem Gewebe erhöht werden, was zwangsläufig auch zu mehr Nebenwirkungen führt (Fowler, 1985).

Eine Anämie kann eine tumorale Gewebhypoxie verstärken und Tumorzellen damit strahlenresistenter machen (Evans und Bergsjø, 1965; Bush, 1986; Frommhold et al., 1998; Henke et al., 1999; Kumar, 2000; Harrison et al., 2002, Harrison und Blackwell, 2004; Vaupel et al., 2005, 2006). Zudem ist gerade bei schnell wachsenden Tumoren eine ausreichende Gefäßversorgung nicht sichergestellt: Der Diffusionsweg für Sauerstoff von der Kapillare zur Tumorzelle nimmt zu. Es bilden sich hypoxische Gewebeareale, die den Erfolg einer Radiotherapie beeinträchtigen.

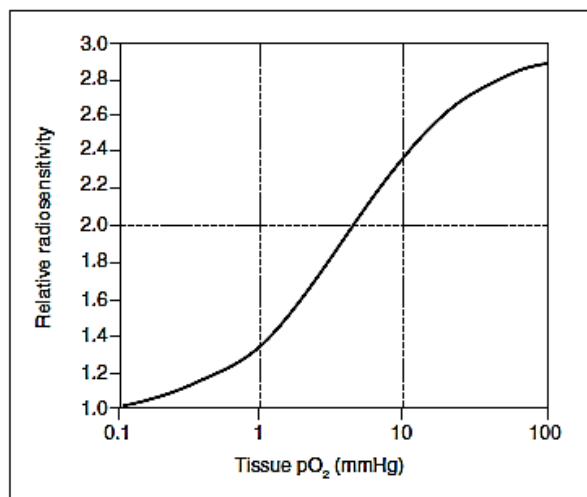


Abb. 3: Radiosensibilität von Tumorzellen als Funktion des Gewebe- pO_2 (nach Vaupel et al., 2001)

Physiologie der Chemoresistenz

Die Wirkung von Chemotherapeutika in hypoxischem Tumorgewebe wird neben den oben beschriebenen direkten und indirekten Mechanismen durch die Folgen der ungeordneten Angiogenese sowie des veränderten Zellmetabolismus herabgesetzt: Die ungeordnete tumorale Angiogenese führt infolge limitierter und heterogener Gewebepfusion sowie arteriovenöser Shuntperfusion zu einer reduzierten Zuführung und ungleichen Verteilung der Chemotherapeutika. Größere Diffusionsdistanzen bedingen einen geringeren Diffusionsfluss. Der veränderte Zellmetabolismus mit intensivierter Glykolyse und extrazellulärer Azidose beeinflusst zudem

- den Transport der Chemotherapeutika über die Zellmembran,
- die intrazelluläre Akkumulation mit
 - erhöhter Akkumulation schwacher Säuren wie Melphalan und Mitomycin C und
 - reduzierter Akkumulation schwacher Basen wie Anthrazykline und Bleomycin,
- die Aktivierung der Prodrugs sowie

- die *drug activity* mit
 - verbesserter Effektivität für Cyclophosphamide, Cisplatin, Melphalan und
 - verringerter Effektivität für Vinblastin, Doxorubicin und Bleomycin (Harrison und Blackwell, 2004).

Einige Chemotherapeutika, z.B. Cyclophosphamid, Carboplatin, Doxorubicin, zeigten sich in ihrer Wirkung *in vitro* und *in vivo* O₂-abhängig (Teicher et al., 1981, 1990 a, b, 1995; Teicher, 1994, 1995). Die Quantifizierung der „hypoxischen Grenze“ jedes einzelnen Chemotherapeutikums, d.h. bei welchem pO₂ ein Chemotherapeutikum noch wirksam ist, muss in weiterführenden Studien eruiert werden (Wouters et al., 2007, 2009).

Wie in der Radiotherapie resultiert eine Anämie auch bei der Chemotherapie in einem schlechteren tumoralen Therapieansprechen (van Belle und Cocquyt, 2003; Harrison und Blackwell, 2004; Ludwig, 2004; Prosnitz et al., 2005). Da Erythrozyten neben dem O₂-Transport auch bei der Aufnahme, dem Transport und bei der Verteilung von Chemotherapeutika eine wichtige Rolle spielen, rücken sie als biologischer Transporter in den Fokus der klinisch-onkologischen Forschung (Übersicht in Vaupel, 2009 b).

Physiologie der Radiochemoresistenz

Die kombinierte Radiochemotherapie bei hypoxischen Tumoren stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar, da hier die zytotoxische Wirkung beider Therapiestrategien verbunden wird und zudem für einige Chemotherapeutika – z.B. Platinkomplexe (Douple und Richmond, 1978; 1979) – ein radiosensibilisierender Effekt nachgewiesen werden konnte.

Koukourakis et al. (2002) fanden jedoch bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine Resistenz gegenüber Bestrahlung in Kombination mit Carboplatin, die sie auf eine hypoxieinduzierte Überexpression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α zurückführten. Trotzdem gilt die kombinierte Radiochemotherapie als bisher meistversprechende Therapieoption hypoxischer Tumoren.

1.2 Spezielle Therapieoptionen hypoxischer Tumoren

Die tumorale Gewebhypoxie stellt eine grundlegende Verschiedenheit zu gesundem normoxischen Körpergewebe dar. Dieses Charakteristikum führte zur Entwicklung von speziell auf hypoxische Tumorzellen fokussierten Therapieansätzen in der Strahlen- wie auch in der Chemotherapie.

1.2.1 Hypoxieadaptierte Strahlentherapie

In der Radioonkologie hat die *three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT)* die strukturgetreue Planung und Applikation der Strahlung deutlich verbessert. Die Entwicklung der *Intensity-modulated radiotherapy (IMRT)* ermöglicht die optimierte Adaptation der applizierten Strahlendosis an definierte Zielvolumina. Bei diesem so genannten *dose painting* oder *dose sculpting* kann somit z.B. die auf die hypoxischen Tumorareale zielende Strahlendosis erhöht und zugleich gesundes umgebendes Gewebe geschont werden (Ling et al., 2000; Didinger et al., 2002). Durch die Applikation der Strahlung aus verschiedenen Richtungen überlagern sich Strahlenbündel, die – anders als die in der konventionellen Strahlentherapie eingesetzten – in sich inhomogen sind. Aus der Summe dieser Überlagerung resultiert an einem Zielvolumen die angestrebte strukturadaptierte Dosisverteilung mit einer Auflösung der Bestrahlung in Rastern von 3 mm (van Vulpen et al., 2005).

Um die besonders therapieresistenten und aggressiven hypoxischen Tumorzellen mit der

IMRT gezielt behandeln zu können, sind neben der morphologisch-strukturellen Lokalisierung und Demarkierung dieser Tumoren bzw. Tumorareale durch die radiologische Bildgebung auch die (patho)physiologischen Informationen über Metabolismus, Funktion und den die Radiosensitivität betreffenden Geno- und Phänotyp der Tumorzellen von besonderem Interesse. In nicht-invasiven bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT) bzw. der PET können mittels Kontrastmittel bzw. Tracersubstanzen hypoxische Tumorzellen markiert und damit der IMRT zugänglich gemacht werden (Ling et al., 2000; Lin et al., 2008).

1.2.2 Hypoxieadaptierte Chemotherapie am Beispiel von Tirapazamin (TPZ)

Auch in der Chemotherapie stellen hypoxische Tumorzellen ein Problem dar, da sie gegenüber konventionellen Chemotherapeutika resistenter sind (Coleman et al., 1988). Die tumorspezifische Eigenschaft der Hypoxie wird in der Anwendung spezieller *hypoxieselektiver Zytotoxine* oder *bio-reductive drugs* genutzt. Darunter versteht man inaktive Vorstufen, so genannte *prodrugs*, die insbesondere in hypoxischen Tumorzellen von intrazellulär vorkommenden Reduktasen aktiviert werden und durch ihre dann toxischen Metabolite Zellschaden und -tod induzieren (Stratford und Workman, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde als hypoxieselektives Chemotherapeutikum das zu den Benzotriazin-di-N-oxiden gehörende Tirapazamin verwendet (TPZ = TirazoneTM = 3-amino-1,2,4-benzotri-azine-1,4-dioxid = SR4233 = WIN59075) (Zeman et al., 1986, 1988, 1990; Zeman und Brown, 1989; Brown, 1993; Siim et al., 1997, Durand und Olive, 1997).

Wirkmechanismus: Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow}) von 0,5 erlaubt TPZ die Penetration der Zellmembran (Zeman und Brown, 1989). Der exakte zelluläre Aufnahme-mechanismus ist noch nicht im Detail bekannt, Baker et al. (1988) postulierten die passive Diffusion als wahrscheinlich. Die Aktivierung von TPZ erfolgt in zwei Schritten: Im ersten Schritt wird TPZ durch cofaktorabhängige Reduktasen im Zellkern zu einem freien Radikal reduziert. Als Cofaktoren fungieren dabei Cytochrom P450, NADPH: Cytochrom P450-Reduktase, Xanthinoxidase und die DT-Diaphorase (Laderoute und Rauth, 1986; Riley und Workman, 1992; Delahoussaye, 2001).

Unter normoxischen Bedingungen reoxidiert das Radikal überwiegend mit molekularem O_2 als Elektronenakzeptor unter Bildung eines Superoxides zur Ausgangssubstanz SR4233, oder es akquiriert mit Hilfe eines Protonendonators ein zweites Elektron und reagiert weiter zum stabilen nicht-toxischen Endprodukt Mono-N-Oxid SR4317 (3-Amino-1,2,4-Benzotriazine-1-Monooxid) (Delahoussaye, 2001). Weder das Ausgangsprodukt SR4233 noch das Endprodukt SR4317 sind also toxisch. Lediglich das radikalische Intermediärprodukt, dessen intrazelluläre Überlebenszeit auch unter hypoxischen Bedingungen nur 10 ms ist, initiiert DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche sowie Chromosomenaberrationen: Steht nicht genug O_2 als Elektronenakzeptor für die Reoxidierung zu SR4233 zur Verfügung, entzieht das Radikal das benötigte zweite Elektron der DNA oder intrazellulären Makromolekülen. Obwohl TPZ nur zu dem relativ geringen Anteil von 20 % intranukleär reduziert wird und zu 80 % im Zytoplasma, ist der intranukleäre Anteil für die letalen DNA-Schäden ausschlaggebend (Zeman et al., 1986; Baker et al., 1988; Laderoute et al., 1988; Wang et al., 1992; Evans et al., 1998).

In verschiedenen Studien wurde die hypoxieselektive Zytotoxizität von TPZ an zahlreichen Zelllinien *in vitro* und *in vivo* untersucht: Die *Hypoxic Cytotoxicity Ratio*, also das Verhältnis derjenigen Substanzkonzentrationen, die unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen benötigt werden, um eine gleiche Anzahl von Zellen abzutöten, fand sich dabei typischerweise im Bereich von 50 bis 150 (Brown, 2000). Bereits 1986 fanden Zeman et al. am SCCVII Maustumor eine Hypoxic Cytotoxicity Ratio von ca. 300. Costa et al. (1989)

untersuchten *in vitro* an Rattenhepatozyten die Zytotoxizität von TPZ unter verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken. Die Zytotoxizität lag dabei 15 – 200fach höher als bei normoxischem pO_2 . Minchinton und Brown (1992 a, b) sowie Durand und Olive (1997) belegten die hypoxieselektive Zytotoxizität von TPZ, indem sie den pO_2 im Gewebe mittels unterschiedlicher O_2 -Konzentration in der Atemluft der Mäuse variierten. Dabei zeigte sich eine bis zu 10 % höhere Toxizität in hypoxischem Gewebe. Zudem wiesen Brown und Lemmon (1990) auch eine radiosensibilisierende Potenz für TPZ nach.

Dosierung: Walton und Workman (1993) sowie Graham et al. (1997 a) ermittelten *in vitro* und im Tiermodell eine Dosierung von 18 – 54 mg/kgKG als verträglich. Dabei ist das kleine therapeutische Fenster zu beachten, das sich aus der geringen Differenz zwischen der LD_{10} (294 mg/m²) und der LD_{90} (312 mg/m²) ablesen lässt. In EMT6-Tumoren fand sich im Vergleich zu anderen Tumoren in Distributionsstudien eine relativ niedrige Konzentration der Ausgangssubstanz SR4233. Dies wurde auf die verhältnismäßig hohe hypoxische Fraktion der EMT6-Tumoren von 20 – 50 % verglichen mit ca. 2 – 15 % bei murinen Sarkomen (RIF-1, KHT) zurück geführt (Walton und Workman, 1993).

Da TPZ nur in hypoxischen Zellen zu seinen zytotoxischen Metaboliten reduziert wird, schließen einige Autoren eine Wirkung auf Zellen, die nicht deutlich hypoxische pO_2 -Werte aufweisen, aus (Stratford und Workman, 1998). Eine ungezielte empirische Anwendung von TPZ an allen Tumoren, gleich welchen Oxygenierungsstatus, verbietet sich jedoch aufgrund der hohen Toxizität und dem intrinsischen kanzerogenen Potential von TPZ (Giaccia et al., 1992; Herscher et al., 1994; Elwell et al., 1997; Wouters et al., 2001).

1.3 Experimentelle Bestimmung des Oxygenierungsstatus

Bereits seit den 1960er Jahren bis in die Mitte der 1980er wurden Versuche unternommen, die tumorindividuelle Hypoxie mittels polarographischer Elektroden zu bestimmen (Cater und Silver, 1960; Kolstad, 1968). Die Renaissance der Tumorphypoxieforschung in den 1990er Jahren ist der Verbesserung der Mikroelektrodentekniken, der Erforschung anderer Messmethoden wie z.B. der Nitroimidazolbindungstest, die Hämoglobinsättigungsprobe oder die Magnetresonanzspektroskopie, und der Entwicklung hypoxiespezifischer Therapieansätze zu verdanken (Vaupel et al., Höckel et al., beide 1991; Stone et al., 1993; Adams und Stratford, 1994; Chapman et al., 1998). Klinische Parameter wie Tumorgröße oder Staginggrad zeigten keine oder nur eine tendentielle Korrelation mit der Tumorphypoxie, so dass aus ihnen kein Rückschluss auf den tumoralen Oxygenierungsstatus gezogen werden kann (Höckel et al., 1991; Brown und Wouters, 1999; Rajendran et al., 2003; Vaupel et al., 2007).

Bei den aktuell zur Verfügung stehenden Methoden zur Bestimmung des Oxygenierungsstatus werden direkte und indirekte sowie endogene und exogene Verfahren unterschieden (Abb. 4): Bei *direkten* Verfahren wird der Gewebe- pO_2 mit einer Messsonde, dem Eppendorf-Histograph, unmittelbar quantifiziert. Diese Methode ist (noch) Goldstandard und Referenz bei der Validierung neuer Messmethoden. Trotz größtmöglicher Messgenauigkeit weist die Anwendung des pO_2 -Histographen auch erhebliche Nachteile auf: Aufgrund der Gewebestruktur durch die Sonde kann diese Methode nicht beliebig oft wiederholt werden und ist damit zur Verlaufsbeobachtung ungeeignet. Zudem kann jeweils nur ein limitierter lokaler Status erhoben werden, so dass die intratumorale räumliche Heterogenität der Gewebehypoxie nicht oder nur begrenzt erfasst wird. Der technische Anspruch an den Untersucher und die nicht immer gegebene Zugänglichkeit zum Tumor zeigen weitere Grenzen des pO_2 -Histographen.

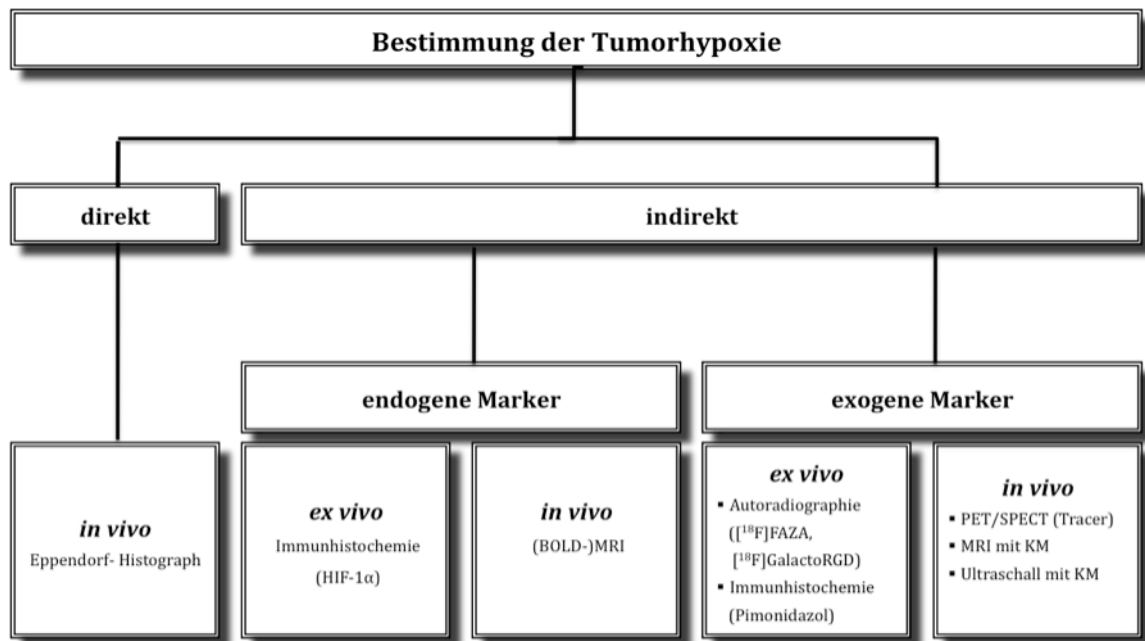


Abb. 4: Messmethoden der Gewebeoxygenierung

Indirekte Messverfahren zeigen den Status der Gewebeoxygenierung mittels *exogener* (*extrinsischer*) oder *endogener* (*intrinsischer*) Marker:

Als *endogene* Hypoxiemarker, also körpereigene Substanzen, können z.B. durch Hypoxie induzierte Proteine wie z.B. der Hypoxia Inducible Factor HIF-1 α , der Vascular Endothelial Growth Factor VEGF, der Glucosetransporter GLUT-1 oder die Carboanhydrase CA IX verwendet werden. Diese Proteine können **immunhistochemisch** mittels Antikörper detektiert werden (Mayer et al., 2006, 2008; Vaupel und Mayer, 2007). Aber auch hier ist wie bei den exogenen immunhistochemischen Markern eine Untersuchung nur am avitalen Gewebe möglich. Aufgrund der Invasivität sowie der Komplexität der Untersuchung spielt die Immunhistochemie in der klinischen Diagnostik keine relevante Rolle, in der vorliegenden Dissertation wurde in einer histologischen Untersuchung die Hypoxie auch indirekt mit Hilfe von HIF-1 α nachgewiesen. Während die β -Untereinheit von HIF-1 physiologisch in vielen Geweben intrazellulär vorkommt, findet sich eine Überexpression der α -Untereinheit fast ausschließlich in malignem Gewebe. Eine HIF-1 α -Überexpression zeigte bei Mamma-, Ovarial-, Lungen- und Gastrointestinaltraktkarzinomen sowie bei Hirntumoren, Melanomen und Mesotheliomen eine signifikante Assoziation mit Therapieversagen und gesteigerter Mortalität (Zhong et al., Feldser et al., beide 1999; Talks et al., 2000; Semenza, 2003). Bei einem ausreichenden intrazellulären pO_2 findet die sauerstoffabhängige Prolyl-Hydroxylierung von HIF-1 α an Prolin 402 und 564 statt, die die Bindung der HIF-1 α -Untereinheit an das von-Hippel-Lindau-Tumorsupressorgen (VHL) ermöglicht (Ivan et al., Jaakkola et al., Masson et al., Yu et al., alle 2001). Der Komplex aus VHL und hydroxylierter α -Untereinheit wird im Proteasom abgebaut. Unter Sauerstoffmangel kann die Prolyl-Hydroxylierung nicht ablaufen, so dass die ubiquitär vorkommende β -Untereinheit mit der α -Untereinheit dimerisiert und diese stabilisiert (Abb. 5). Intranukleär bindet der Komplex an Promotorbereiche, die *Hypoxia Response Elements (HRE)*, die die Expression von bestimmten Genen regulieren, die die Information für zahlreiche zelluläre Anpassungsvorgänge wie Hochregulierung der Angiogenese (VEGF, TGF- β etc.), Zellproliferation/Überleben (Cyclin G2, IGF 2, IGF-BP 1-3 bzw. ADM, EPO, IGF2, TGF- α etc.), Migration, Metastasierung und Invasion etc. tragen (Harris, 2002; Semenza, Begg, beide 2003).

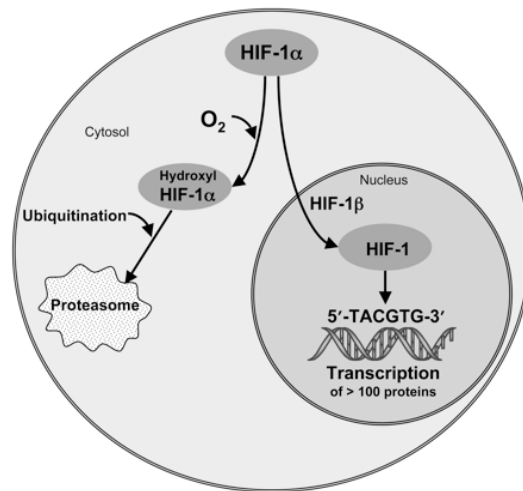


Abb. 5: Schema des proteosomalen Abbaus bzw. der Wirkung von HIF-1 α : In Anwesenheit von O₂ wird HIF-1 α abgebaut (linker Schenkel); unter hypoxischen Bedingungen (rechter Schenkel) heterodimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β und bindet an HRE-Domänen zur Transkription zahlreicher Hypoxieproteine (aus Krohn et al., 2008).

In der *Blood Oxygenation Level-Dependent (BOLD)-MRT* wird mit Hilfe von paramagnetischem Deoxyhämoglobin als endogenem Marker hypoxisches Gewebe detektiert. Diese Technik setzt allerdings eine Gewebepfusion mit Erythrozyten voraus, was aufgrund der strukturell und funktionell pathologischen Tumervaskularisation nicht immer gegeben ist (Vaupel et al., 1989 a - c; Padhani et al., 2007). Ein prognostischer Wert konnte für die BOLD-MRT bisher nur bei Nagern nachgewiesen werden (Rodrigues et al., 2004).

Exogene Hypoxiemarker werden dem vitalen Organismus zugeführt und unter hypoxischen Bedingungen metabolisiert, so dass die anreichernden hypoxischen Zellen mittels bildgebender Verfahren wie der MRT, Ultraschall, SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) oder PET bzw. postmortal mittels Autoradiographie dargestellt werden können:

In der *Autoradiographie* werden wie in der SPECT oder PET radioaktiv markierte, *in vivo* injizierte Substanzen als Tracer (s.u.) verwendet. Die Auswertung erfolgt jedoch *ex vivo* und impliziert ein invasives Vorgehen mit Tumorbiopsie oder -exzision.

Eine weitere indirekte, exogene Methode zum Hypoxienachweis *ex vivo* stellt das synthetische Peptidanalogen [¹⁸F]GalactoRGD dar. Aufgrund des schnellen Wachstums maligner Tumoren ist die Sauerstoffversorgung für Tumorzellen, die mehr als 70 μ m von einer Kapillare entfernt sind, nicht immer gewährleistet. Die Tumorzellen werden hypoxisch und sterben ab. Mit der tumoralen Neoangiogenese wird dem entgegengesteuert, um die Zellen des rasch wachsenden Tumors mit Sauerstoff versorgen zu können. Zudem werden die neu angelegten Gefäße von Tumorzellen genutzt, um in die Blutbahn zu gelangen und zu metastasieren. Zur Neoangiogenese werden von den Tumorzellen Wachstumsfaktoren, z.B. bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), TNF- α (Tumor Necrosis Factor), Angiogenin und Zytokine ausgeschüttet, die die Endothelzellen aktivieren. Die stimulierten Endothelzellen produzieren Proteasen zur Zerstörung der Basalmembran und exprimieren verstärkt Zelladhäsionsrezeptoren, insbesondere $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren, die für die Bindung an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine verantwortlich sind, so dass die Endothelzellen dem chemotaktischen Stimulus folgend zum Tumor hin in das Stroma eindringen können. $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren sind heterodimere transmembranöse Glykoproteine in der Zellmembran, so genannte Integrine, die eine Schlüsselrolle in der tumorinduzierten Angiogenese und der Tumorzellmetastasierung einnehmen. Als wichtiges „Erkennungsmotiv“ für die Bindung der

$\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren an bestimmte extrazellulären Matrixproteine dient die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin (RGD). Anhand der Bindung an diese Aminosäuresequenz kann so mittels [^{18}F]GalactoRGD eine verstärkte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen und damit eine aktive tumorale Angiogenese markiert und lokalisiert werden. Indirekt kann damit auf eine tumorale Gewebhypoxie geschlossen werden (Liotta et al., 1991; Brooks et al., 1994; Haubner, 1995; Beer et al., 2006).

Immunhistochemisch kann hypoxisches Gewebe bioptisch bzw. postmortal mit dem Nitroimidazolderivat Pimonidazol nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Färbung mittels Pimonidazol stellt den aktuellen Goldstandard der histologischen Hypoxiemarker dar. Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten HypoxyprobeTM handelt es sich um Pimonidazol-Hydrochlorid (Abb. 6), das unter hypoxischen Bedingungen ($p\text{O}_2 < 10 \text{ mmHg} = \text{O}_2\text{-Konzentration} < 14 \mu\text{mol}$) nach Reduktion in der Zelle mit den Thiol-Gruppen intrazellulärer Proteine Addukte bildet. Die Reaktion ist ansonsten unabhängig von speziellen Redox-Enzymen (z.B. P₄₅₀-Nitroreduktase) und weitestgehend von NADH- und NADPH-Schwankungen. Die gute Wasserlöslichkeit von HypoxyprobeTM erlaubt ein geringes i.p.- oder i.v.-Injektionsvolumen von 250 μl , dank des positiven K_{OW} von 8,5 zeigt es eine gute Gewebegängigkeit. Einige Autoren vermuten jedoch, dass die Anfärbung auch vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen abhängt (Raleigh et al., 1985, Raleigh, 1990; Vordermark und Brown, 2003).

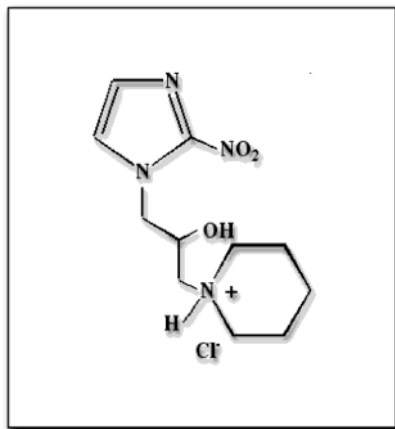


Abb. 6: Chemische Formel von Pimonidazol-Hydrochlorid (HypoxyprobeTM)

In der **Sonographie** werden als Kontrastmittel echogene gasgefüllte Mikrobläschen genutzt, die durch einen hohen Impedanzsprung an ihrer Oberfläche eine Signalverstärkung herbeiführen: Das Ultraschallkontrastmittel *Levovist*[®], ein Galactose-Palmitinsäuregranulat, trägt nach Suspension in Wasser an den Mikropartikeln adhärenste kleinste Luftbläschen, die die Rückstreuung der Ultraschallwellen erhöhen. Anhand der Farbpixeldichte (color pixel density) evaluierten Gagel et al. mit diesem Ultraschallsignalverstärker die Tumervaskularisation und die Perfusion als ausschlaggebende Faktoren für eine Gewebhypoxie. Mit dieser nichtinvasiven Methode kann der globale Oxygenierungsstatus oberflächlicher Tumoren abgeschätzt werden. Eine Quantifizierung der tumorale Gewebhypoxie ist jedoch nicht möglich (Gagel et al., 2006, 2007).

In der **Dynamic Contrast-Enhanced MRT (DCE-MRT)** kann mit Hilfe der Gadolinium-markierten Diethyltriamin-Pentaessigsäure (DTPA = Gadopentetat-Dimeglumin = z.B. *Magnevist*[®]) als Kontrastmittel Gewebhypoxie detektiert werden. Gd-DTPA ist eine paramagnetische Substanz, die über eine Relaxationszeitverkürzung zu einer starken Signalanhebung in der T₁-Wichtung führt. An Zervixkarzinomen korrelierte die Gd-DTPA-

Anreicherung im DCE-MRT mit den pO_2 -Drücken, die invasiv mittels O_2 -Sonde gemessen wurden (Cooper et al., 2000). In einer weiterführenden Studie an 50 Patientinnen mit Zervixkarzinom unter Strahlentherapie war eine geringere Gd-DTPA-Anreicherung mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert (Loncaster et al., 2002).

In der **PET** und **SPECT** werden zur Darstellung von Gewebhypoxie so genannte Tracer (engl. trace = Spur) verwendet. Diese mit einem Positronenstrahler markierte körpereigene oder körperfremde Substanzen nehmen nach Einbringen in den vitalen Organismus am Stoffwechsel teil. Die physiologischen Stoffwechselabläufe werden dabei aufgrund der minimalen Dosierung des radioaktiv markierten Stoffes nicht beeinträchtigt. Der Begründer der Tracermethode, der Ungar George de Hevesy (1885 – 1966), erhielt für seine Forschung zum Gebrauch von Isotopen als Tracer zur Untersuchung chemischer Prozesse 1934 den Nobelpreis für Chemie.

Bereits 1981 schlugen Chapman et al. eine nicht-invasive Technik zur tumoralen Hypoxiedetektion mittels bioreduzierbarer Marker vor, deren Bindung an hypoxische Tumorzellen mittels PET gemessen werden sollte. Dank des raschen Fortschritts der digitalen Bildgebung sowie Synthese und Verfügbarkeit kurzlebiger, Positronen(β^+)-emittierender Radiotracer (Positronenstrahler) erfuhr die PET in den letzten Jahren als funktionelle Bildgebungstechnologie einen immensen Bedeutungszuwachs in der Erforschung neuer, besserer Methoden zur tumoralen Hypoxiedetektion.

1.4 PET und PET-Hypoxietracer

PET-Hypoxietracer erlauben eine relativ rasche und beliebig oft wiederholbare, nicht-invasive und damit klinisch gut praktikable *in vivo*-Beurteilung des tumoralen Stoffwechsels und des lokoregionalen Oxygenierungsstatus.

Im Idealfall erfüllen diese Hypoxietracer folgende Anforderungen:

- zuverlässige Diskriminierung zwischen normoxischen und hypoxischen Gewebeanteilen in einer
- hochauflösenden Bildgebung zur Darstellung intratumoraler pO_2 -Heterogenität;
- Möglichkeit zur Quantifizierung der Hypoxie;
- Untersuchung des gesamten Tumorumfanges (dreidimensional) sowie
- des gesamten tumortragenden Organismus (Versuchstier oder Mensch);
- schnelle, einfache und möglichst schmerzarme Applikation (Krause et al., 2006)
- Möglichkeit wiederholter Messungen, z.B. zum Therapiemonitoring.

Die Verteilung des PET-Hypoxietracers im Organismus bzw. im Zielgewebe wird von zwei Faktoren determiniert: Die Traceraufnahme in die Zielzelle ist abhängig vom Verteilungskoeffizienten der Tracersubstanz, d.h. ihrer Lipophilie bzw. Hydrophilie. Eine lipophile Substanz weist dabei einen $K_{OW} > 1$ auf, eine hydrophile Substanz einen $K_{OW} < 1$. Ein lipophiler Tracer diffundiert leichter durch die Zellmembran, weist jedoch eine höhere Plasmaproteinbindung, eine niedrigere Clearance und somit eine längere Verweildauer im Organismus auf. Mit zunehmender Lipophilie steigt auch die Neurotoxizität der Tracersubstanz. Die Akkumulation der PET-Hypoxietracer wird von der hypoxiebedingten intrazellulären Tracerretention beeinflusst (Reischl et al., 2005). Das Intervall zwischen dem Zeitpunkt der Tracerinjektion und dem Zeitpunkt der optimalen Verteilung im Organismus, zu dem der PET-Scan durchgeführt wird, variiert bei den verschiedenen Tracern.

Das Isotop des in den Organismus verbrachten Hypoxietracers emittiert ein Positron (β^+), das sich abhängig von seiner Energie nahe seines Entstehungsortes mit einem Elektron (β^-) vereinigt; die Masse beider Teilchen wird in Strahlungsenergie umgewandelt, man spricht von Vernichtungsstrahlung. Die entstandene Vernichtungsenergie von 1022 keV wird in zwei

Gammaquanten von je 511 keV umgesetzt, die sich diametral auseinander bewegen (Sauer, 2001 a). Anhand des Auftreffortes und -winkels der Photonen auf einem Detektor kann der Entstehungsort der Gammastrahlung errechnet und in hochauflösenden Schnittbildern in drei Ebenen visualisiert werden. Wird die im PET gemessene Radioaktivität des Zielvolumens, z.B. des Tumors, mit derjenigen eines Referenzgewebes, z.B. Muskelgewebe, ins Verhältnis gesetzt (T/M-Quotient), kann die lokale Traceranreicherung quantifiziert werden (Chapman et al., 1998; Kubota et al., 1999). Diese semiquantitative Beurteilung der Daten hat sich im klinischen Gebrauch als praktikabel und zuverlässig etabliert (Koh et al., 1992; Yeh et al., 1996; Lehtiö et al., 2003). Mittels PET als hochsensitive, nicht-invasive Methode lässt sich so durch die Detektion subnanomolarer Konzentrationen eines geeigneten Hypoxietracer nicht nur der Status quo der intratumoralen Oxygenierung beurteilen, sondern auch deren Verlauf beobachten, z.B. zur Evaluation des Therapieansprechens (Solomon et al., 2003).

Nachfolgend wird auf Struktur, Biokinetik sowie Vor- und Nachteile einer Auswahl von PET-Hypoxietracern eingegangen. Eine vollständige Besprechung aller bisher synthetisierten und evaluierten Tracersubstanzen würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen, daher sollen hier nur die Dithiosemicarbazone (DTS-Verbindungen) und Imidazolderivate als gängigste und bestuntersuchte PET-Hypoxietracer vorgestellt werden. Darunter nimmt das Nitroimidazol [¹⁸F]Fluoromisonidazol ([¹⁸F]FMISO) als erster und bisher am umfassendsten erforschter PET-Hypoxietracer die Rolle der Referenzsubstanz in der Evaluation neuer Tracer ein.

Dithiosemicarbazone (DTS-Verbindungen)

Dithiosemicarbazone weisen aufgrund ihrer Lipophilie eine hohe Membranpermeabilität auf, die eine rasche zelluläre Aufnahme und den Zugang zu den intrazellulären Mitochondrien sowie eine schnelle Auswaschkinetik ermöglicht. Ihr wichtigster Vertreter ist der Kupfer(CuII)-gekoppelte Bisthiosemicarbazon-Komplex **Cu(II)-diacetyl-bis(N4)-methylthiosemicarbazon ([Cu]ATSM)**. Auch in der SPECT werden ^{99m}Tc-gekoppelte DTS-Komplexe als Hypoxietracer verwendet wie z.B. [^{99m}Tc]ATSM₂ [diacetyl-di-(N₄-dimethylthiosemicarbazone)].

Mit [Cu]ATSM (Abb. 7) wurde in den 1990er Jahren ein vielversprechenden PET-Tracer für tumorale und myokardiale Hypoxie entwickelt. Während die gering lipophilen Nitroimidazole eine Verteilungsdauer von 3 – 4 h p.i. für aussagekräftige PET-Bilder benötigen, zeigte [⁶²Cu]ATSM im Rattenherzmodell bereits 15 min p.i. eine deutliche Differenzierung zwischen normoxischem und hypoxischem Gewebe (Fujibayashi et al., 1997). Während Fujibayashi eine irreversible Reduktion von Cu(II)-ATSM am mitochondrialen Komplex I (NADH:Ubiquinon-Reduktase) zu [Cu(I)-ATSM]⁻ nur in hypoxischen Zellen postulierte, fanden Dearling et al. (1998, 2002) und Maurer et al. (2002) eine reversible Reaktion sowohl unter normoxischen als unter hypoxischen Bedingungen. Das instabile [Cu(I)-ATSM]⁻ verbleibt aufgrund seiner negativen Ladung intrazellulär. Unter Normoxie kann [Cu(I)-ATSM]⁻ zu neutralen Cu(II)-ATSM reoxidiert werden und aus der Zelle diffundieren. In Abwesenheit von Sauerstoff ist [Cu(I)-ATSM]⁻ reversibel intrazellulär gefangen. Über längere Zeit unter Hypoxie kann es zu einer protoneninduzierten Dissoziation und damit zu einem irreversiblen intrazellulären Trapping kommen (Padhani et al., 2007, Holland et al., Mees et al., beide 2009).

Ein Vorteil der [Cu]ATSM-Verbindungen ist, dass sie mit Kupferisotopen unterschiedlicher Halbwertszeit (HWZ) kombiniert werden können. Längere HWZ sind aus logistischen Gründen bei Anwendung in Zentren ohne hauseigenes Zyklotron notwendig. Zudem erlauben lange HWZ wie die von ⁶⁴Cu die Langzeitbeobachtung der intratumoralen Verteilung (O'Donoghue et al., Burgman et al., beide 2005). In der PET werden die β⁺-Emitter ⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu und ⁶⁴Cu verwendet, deren HWZ zwischen 9,7 min (⁶²Cu) und 12,7 h (⁶⁴Cu) liegen (Blower et al., 1996).

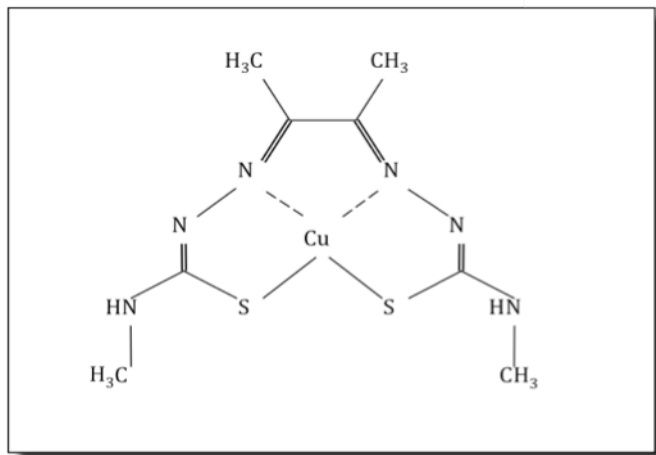


Abb. 7: Strukturformel [Cu]ATSM

Im Vergleich mit dem Referenztracer $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ kongruierten am anaplastischen Ratten-Prostataumor R3327-AT jedoch nur die $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ -Scans 4 h p.i. mit den späten $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Scans 16 – 20 h p.i. (O'Donoghue et al., 2005). Ebenso korrelierten lediglich diese späten $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Aufnahmen mit den Resultaten der pO_2 -Sondenmessung sowie der Pimonidazolfärbung. Frühe $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Scans (1 – 2 h p.i.) ergaben keine oder negative Korrelationen mit den $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ - bzw. den späten $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Scans. Die Plattenepithelkarzinomlinie FaDu zeigte hingegen keine auffallenden Unterschiede in der Biodistribution von $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ und $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$. Die Synopsis mit der Untersuchung der $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Biokinetik an anderen Zelllinien legt nahe, dass die initiale Anreicherung von $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ (0,5 – 1 h p.i.) schnell und pO_2 -abhängig, die $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Biokinetik nach dieser Anfangsphase jedoch zelllinienabhängig ist (Burgman et al., 2005). Aufgrund dieser Variabilität der $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Aufnahme sollten kurz nach Tracerinjektion aufgenommene PET-Scans mit Vorsicht interpretiert werden.

Für Padhani et al. (2007) zählten neben $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ vor allem $[^{60/64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ aufgrund seiner Praktikabilität, seiner Validität, der Möglichkeit zur Darstellung intratumoraler Hypoxieheterogenität und der generellen Verfügbarkeit zu den „*lead contenders for human application*“: In klinischen Studien zeigte sich die $[^{60}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Aufnahme *prädiktiv* für das Therapieansprechen von NSCLC (Non Small Cell Lung Cancer) sowie Zervix- und Rektumkarzinomen auf Radio- und Chemotherapie (Dehdashti et al., 2003 a, b, 2008; Dietz et al., 2008). Die $[^{60}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -Aufnahme von Zervixkarzinomen korrelierte mit der Expressierung von molekularen Gewebemarkern wie VEGF, COX-2, EGFR und CA IX sowie einer vermehrten Apoptoseeignung und einer geringen Überlebensrate (Grigsby et al., 2007). Chao et al. (2001) kombinierten die Identifizierung hypoxischer Subvolumina mittels $[^{60}\text{Cu}]\text{ATSM}$ -PET mit dem CT und demonstrierte dessen Nutzen für die IMRT-Planung am anthropomorphen Kopfmodell. In der klinischen Praxis etablierte sich jedoch aufgrund der günstigeren Pharmakokinetik und besseren Bildgebungsqualität die Kopplung von ATSM an das langsamer zerfallende ^{64}Cu vor dem kurzlebigen ^{60}Cu -Radionuklid (HWZ 23 min) (Lewis et al., 2008).

Imidazolderivate

Die Entwicklung sauerstoffimitierender Radiosensitizer in den 1970er und 1980er Jahren legte den Grundstein für die Entdeckung der Bioreduktion azomyzinhaltiger Substanzen in hypoxischen Zellen und lieferte den Ansatz, sie als Marker für Gewebe- und Tumorphoxie

einzusetzen (Varghese et al., 1976; Wong et al., 1978, Chapman et al., 1979, 1983 b, 1998). Die Arbeitsgruppe um Chapman beobachtete eine 30 – 40fach höhere Bindung des Imidazolderivats Misonidazol an Moleküle hypoxischer verglichen mit denen normoxischer Zellen und untersuchte die Verteilung von ^{14}C - und ^3H -markiertem Misonidazol an Nager- und humanen Tumoren (Chapman et al., 1981, 1983 a; Garrecht und Chapman, 1983; Urtasun et al., 1986 a, b). In einer klinischen Studie an soliden Tumoren (darunter Melanome, Sarkome und kleinzellige Bronchialkarzinome) fand sich eine im Vergleich zu Blut und Normalgewebe deutlich höhere intratumorale Anreicherung von ^3H -Misonidazol, die vielversprechend für eine Hypoxiedetektion mit nuklearmedizinischen Methoden schien (Chapman et al., 1989, Chapman, 1991). Heute stellen die Nitroimidazole, denen Imidazolring und Nitrogruppe gemeinsam ist, die wichtigste und besterforschte Gruppe der PET-Hypoxietracer dar. Zu ihnen zählen die mit dem Positronenemitter ^{18}F markierten PET-Tracer $[^{18}\text{F}]$ Fluoromisonidazol ($[^{18}\text{F}]$ FMISO), $[^{18}\text{F}]$ Fluoroazomyzinarabinosid ($[^{18}\text{F}]$ FAZA), $[^{18}\text{F}]$ Fluoroetanidazol ($[^{18}\text{F}]$ FETA), $[^{18}\text{F}]$ Fluoroerythronitroimidazol ($[^{18}\text{F}]$ FETNIM), $[^{18}\text{F}]$ 2-(2-nitro-1-H-imidazol-1-yl)-(N-2,2,3,3,3-pentfluoropropyl)azetamid ($[^{18}\text{F}]$ EF5), sowie die mit dem β^+ -emittierenden ^{124}I gekoppelten Nitroimidazol-Nukleosidanaloga $[^{124}\text{I}]$ Iodoazomyzin-Arabinosid ($[^{124}\text{I}]$ IAZA) und $[^{124}\text{I}]$ Iodoazomyzin-Galaktosid ($[^{124}\text{I}]$ IAZG).

Als lipophile Substanzen können sie durch Zellmembranen diffundieren. Intrazellulär wird die Nitrogruppe des Imidazolrings von ubiquitär vorhandenen Nitroreduktasen energieabhängig zur Radikalform reduziert (Abb. 8). Die Energieabhängigkeit dieser enzymatischen Bioreduktion setzt die Vitalität der Zelle voraus (Chapman et al., 1983 b; Rasey et al., 1987; Parliament und Urtasun, 1998). Joseph et al. (1994) identifizierten mehrere als Nitroreduktasen fungierende Enzyme, z.B. das Cytochrom P_{450} -System oder die Xanthin-Oxidasen. Da diese Nitroreduktasen sowohl in gesundem als auch in malignem Gewebe vorhanden sind, könnte eine pathologische Enzymaktivität die Akkumulation des Imidazolderivats nicht limitieren (Prekeges et al., 1991).

In einer vitalen, normoxischen Zelle ist diese Reduktion aufgrund des Redoxpotentials reversibel, da O_2 bei der Umkehrreaktion als Elektronenakzeptor fungiert; das reoxidierte Nitroimidazolderivat kann wieder aus der Zelle diffundieren. Bei einem niedrigen intrazellulären pO_2 findet jedoch keine Reoxygenierung statt, das Nitroimidazol-Anion reagiert weiter und bindet irreversibel an intrazelluläre Makromoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren: Das Nitroimidazolderivat verbleibt im reduzierten Zustand und akkumuliert in der hypoxischen Zelle. In der PET zeigte sich eine umso höhere intrazelluläre Nitroimidazol-Anreicherung, je niedriger der Gewebe- pO_2 war (Nunn et al., 1995; Piert und Machulla, 1999; Piert et al., 1999). Weiterhin kann das Nitroradikal-Anion durch Aufnahme weiterer Elektronen über die Nitrosoverbindung zu Hydroxylamin und Amin reduziert werden. Dabei werden wiederum hochreaktive radikalische Zwischenstufen gebildet, die ihrerseits stabile Bindungen mit intrazellulären Makromolekülen ausbilden.

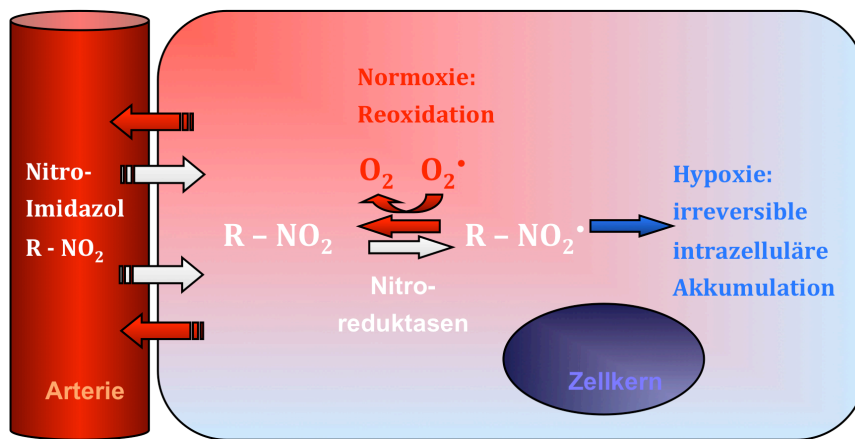
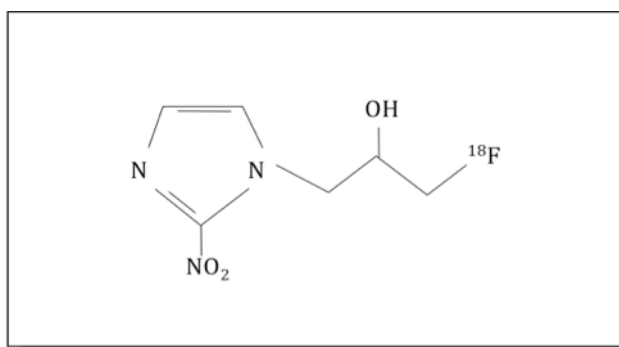


Abb. 8: Intrazellulärer Metabolismus der Nitroimidazolderivate

Im Folgenden wird auf zwei Nitroimidazoltracer näher eingegangen:

- [^{18}F]FMISO als bestuntersuchter PET-Hypoxietracer und Referenztracer (Abb. 9)
- [^{18}F]FAZA als Nitroimidazoltracer mit verbesserten Eigenschaften, dessen Erprobung im Tierversuch im Rahmen eines DFG-Projektes Inhalt der vorliegenden Dissertation ist.

[^{18}F]FMISO nimmt unter den PET-Hypoxietracern eine prominente Stellung ein: Nach seiner Validierung als Tracer für Myokardischämie und insbesondere auch für Tumorphypoxie in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien an großen Patientenpopulationen findet [^{18}F]FMISO in Forschung und Klinik weitreichende Anwendung (Workman und Brown, 1981; Jerabek et al., 1986; Rasey et al., 1987, 1989, 1990, 1996; Martin et al., 1992; Valk et al., 1992; Koh et al., 1992, 1995; Yeh et al., 1996; Bentzen et al., 2003; Bruehlmeier et al. 2004; Gagel et al., 2004, 2007; Rajendran et al., 2003, 2004; Rajendran und Krohn, 2005; Hicks et al., 2005; Thorwarth et al., 2005 a, b; Eschmann et al., 2005). [^{18}F]FMISO erfüllt dabei nicht nur hinsichtlich einfacher Synthese (Grierson et al., 1989) und praktischer Handhabung, sondern auch bezüglich Dosimetrie (Graham et al., 1997 b) und Biodistribution die Anforderungen an einen PET-Hypoxietracer nahezu optimal: Die Kopplung an ^{18}F mit einer verhältnismäßig langen physikalischen HWZ von 110 min erlaubt seine Verwendung im Satellitensystem, d.h. in räumlicher Trennung von Herstellungs- und Anwendungsort. Gleichzeitig ist die HWZ jedoch auch kurz genug, um eine übermäßige Strahlenbelastung des zu untersuchenden Organismus durch eine lange Verweildauer im Organismus zu vermeiden.

Abb. 9: Strukturformel [^{18}F]FMISO

Direkt nach intravenöser [^{18}F]FMISO-Injektion – in der Regel 3,7 MBq/kgKG – spiegelt die Tracerdistribution den Blutfluss wider. Die optimale [^{18}F]FMISO-Akkumulation im hypoxischen Gewebe ist 90 – 120 min p.i. erreicht, so dass im PET-Scan hypoxische Areale lokalisiert werden können. Im *in vitro*-Versuch fand sich eine bis zu 28fach höhere Anreicherung unter hypoxischen verglichen mit normoxischen Bedingungen. Gewebe mit einem durchschnittlichen $\text{pO}_2 > 10$ mmHg hatten dagegen so gut wie keine [^{18}F]FMISO-Akkumulation (Rasey et al., 1990). Aufgrund seiner überzeugenden Eigenschaften als PET-Hypoxietracer wurde [^{18}F]FMISO in zahlreichen Studien zur Evaluation neuer Tracer als Referenzsubstanz verwendet (Rasey et al., 1999; Sorger et al., 2003; Grönroos et al., 2004; Barthel et al., 2004; Zanzonico et al., 2004; Piert et al., 2005; O'Donoghue et al., 2005; Reischl et al., 2007).

In klinischen Studien verglichen Gagel et al. (2004, 2007) die [^{18}F]FMISO-Aufnahme von metastasierten Plattenzellkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit den Ergebnissen der polarographischen pO_2 -Messungen sowie der Farbduplexsonographie und beobachteten eine durchschnittliche bis hohe Korrelationen zwischen den T/M-Quotienten von [^{18}F]FMISO 2 h p.i. und der polarographisch bestimmten hypoxischen Fraktion. Gleichzeitig zur [^{18}F]FMISO-wurde auch die [^{18}F]FDG-Aufnahme in der PET dargestellt, um die Vitalität der Zellen zu demonstrieren. Obwohl Minn et al. (1996) zeigen konnten, dass [^{18}F]FDG eher in hypoxischen als in normoxischen Zellen akkumuliert, stellte Gagel keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der [^{18}F]FMISO- und [^{18}F]FDG-Aufnahme fest. Konkordant zur Studie von Kubota et al. (1999) zeigte sich die [^{18}F]FMISO-Anreicherung nekrosennah, während sich [^{18}F]FDG gleichmäßiger im gesamten Tumor verteilte. Zudem sah Kubota sogar eine geringere [^{18}F]FDG-Aufnahme in hypoxischen Zellen als in normoxischen Zellen. Auch Rajendran et al. (2004) stellten an den vier von ihnen untersuchten Tumorentitäten (Kopf-Hals-Tumoren, Mammakarzinom, Glioblastoma multiforme, Weichteilsarkom) bei vorhandener tumoraler Hypoxie nur eine schwache Korrelation zwischen [^{18}F]FDG- und [^{18}F]FMISO-Aufnahme fest. Yeh et al. (1996) wiesen eine signifikant höhere [^{18}F]FMISO-Anreicherung bei undifferenzierten verglichen mit höher differenzierten Nasopharynxkarzinomen nach.

Bruhlmeier et al. (2004) fanden an Hirntumoren mittels der Verteilung von ^{15}O -markiertem Wasser eine perfusionsabhängige frühe Anreicherung von [^{18}F]FMISO (5 min p.i.), während späte [^{18}F]FMISO-Scans perfusionsunabhängig schienen. Piert et al. (1999, 2000) erklärten am Tiermodell diesen Effekt dadurch, dass die [^{18}F]FMISO-Zufuhr zum Tumor größtenteils von der Tumorperfusion abhängt, und erst die Spätaufnahmen spezifisch für das Vorliegen einer Gewebhypoxie sind. Bei Rasey et al. (1996) und Eschmann et al. (2005) zeigte sich eine hohe intratumorale Heterogenität und Variabilität der [^{18}F]FMISO-Aufnahme. Die regionale Variabilität hypoxischen Gewebes spiegelte dabei die funktionelle und biochemische Variabilität wider (Höckel et al., 1999): Die Oxygenierung eines Tumors variiert entsprechend der Perfusionseffektivität, wobei eine gute Perfusion eine bessere Oxygenierung, eine schlechte Perfusion eine Hypoxie zur Folge hat. Zudem können in einem Tumor zugleich eine akute (perfusionsbedingte) neben einer chronischen (diffusionsbedingten) Hypoxie vorliegen (Marples et al., 2002 b).

Die Eignung von [^{18}F]FMISO zum *Therapiemonitoring* belegten Koh et al. (1992, 1995), indem sie mittels sequentieller [^{18}F]FMISO-PET-Scans die Traceraufnahme von Bronchialkarzinomen während eines Bestrahlungszyklus untersuchten: Über die Dauer der Therapie verringerte sich die [^{18}F]FMISO-Aufnahme kontinuierlich, was auf eine Verbesserung des Oxygenierungsstatus schließen lässt. Äquivalent dazu wurde für Weichteilsarkome und Kopf-Hals-Tumoren eine reduzierte [^{18}F]FMISO-Aufnahme nach Chemotherapie gezeigt (Rajendran et al., 2003; Hicks et al., 2005).

Eschmann et al. (2005) belegten die *prädiktive Potenz* von [^{18}F]FMISO an Kopf-Hals- und Lungentumoren hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit binnen eines Jahres.

Dem extensiven Einsatz von [^{18}F]FMISO in der klinischen Routine stehen jedoch einige Einschränkungen gegenüber (Barthel et al., 2004):

- Wegen der verhältnismäßig langsamen Tracerakkumulation liegt zwischen Injektion und PET-Scan ein Zeitintervall von bis zu 5 h (Nunn et al., 1995; Bentzen et al., 2002).
- Aufgrund seiner relativen Lipophilie ($K_{\text{OW}} = 0,43$; Workman und Brown, 1981) und der langen Plasma-Clearance von mehreren Stunden aus dem normoxischen Referenzgewebe weist [^{18}F]FMISO eine nur mäßige Mehranreicherung in hypoxischem Gewebe auf.
Daraus resultiert 90 min p.i. ein T/B (Tumor/Background)-Kontrast von weniger als 2:1, was auch bei hochauflösenden PET-Geräten die adäquate Bewertung hypoxischer Tumoren erschwert (Nunn et al., 1995).
- [^{18}F]FMISO unterliegt auch einer sauerstoffunabhängigen Verstoffwechslung: Rasey et al. (1999) fanden 2 h p.i. 50 bzw. 36 % Metabolite im Plasma bzw. im Urin. Wünschenswert für einen Hypoxietracer wäre eine Resistenz gegenüber hypoxieunabhängiger Metabolisierung.
- Bentzen et al. (2002, 2003) fanden eine mangelnde Korrelation zwischen der [^{18}F]FMISO-Aufnahme und polarographischer Sondenmessung im Tierversuch. Krause et al. (2006) führten neben den Schwierigkeiten im Einsatz der O_2 -Messsonde, insbesondere bei kleinen Größenverhältnissen des Versuchstieres, die Dauer der Akquirierung der pO_2 -Werte für diese Diskrepanz an: Während die PET die Verstoffwechslung des Tracers im Zeitraum von der Tracerinjektion bis zum Scan wiedergibt, misst die O_2 -Sonde den momentanen Oxygenierungsstatus, der z.B. von einer durch eine Anästhesie veränderten Mikrozirkulation beeinflusst sein kann.

[^{18}F]FAZA: Aufgrund der limitierenden Eigenschaften von [^{18}F]FMISO wurde nach alternativen PET-Hypoxietracern mit besseren Charakteristika gesucht (Yang et al., 1995; Grönroos et al., 2001). Mit [^{18}F]FAZA wurde ein weiteres Nitroimidazolderivat entwickelt, das aufgrund seiner höheren Hydrophilie im Vergleich zu [^{18}F]FMISO eine günstigere Pharmakokinetik aufweist: [^{18}F]FAZA (Abb. 10) diffundiert schneller in die Zelle und steht unverzüglich der spezifischen Reduktion und der intrazellulären Retention zur Verfügung (Kumar et al., 2002). Die höhere Hydrophilie resultiert in einer rascheren renalen Elimination aus Blut und normoxischem Gewebe; nur ein geringer Anteil von [^{18}F]FAZA wird hepatisch und somit langsamer metabolisiert. Dies führt in der PET zu einem schärferen T/B-Kontrast sowie zu einer insgesamt geringeren Strahlenbelastung des untersuchten Organismus.

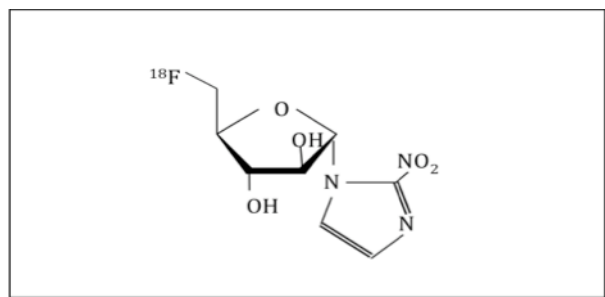


Abb. 10: Strukturformel [^{18}F]FAZA

Präklinisch wurden Eigenschaften und Eignung von [^{18}F]FAZA als Hypoxietracer bereits an mehreren Tumormodellen untersucht: Sorger et al. (2003), Piert et al. (2005) und Reischl et al. (2007) verglichen *in vitro* und *in vivo* an verschiedenen murinen Tumorzelllinien die

Detektion tumoraler Hypoxie durch [¹⁸F]FAZA mit den Messungen mittels pO₂-Feinnadelelektrode und [¹⁸F]FMISO. Am Walker 256-Karzinom, einer murinen Mammakarzinomzelllinie, fanden Sorger et al. (2003) beim *in vitro*-Versuch eine identische Aufnahme von [¹⁸F]FAZA und [¹⁸F]FMISO. Im Tierversuch zeigte sich jeweils 1 h nach [¹⁸F]FAZA- bzw. [¹⁸F]FMISO-Injektion ein äquivalentes T/B-Verhältnis bei beiden Imidazolderivaten, jedoch trotz deutlich schnellerer Elimination von [¹⁸F]FAZA ein geringfügig kleineres T/B-Verhältnis 3 h p.i. bei [¹⁸F]FAZA verglichen mit [¹⁸F]FMISO.

Piert und Reischl beschrieben eine günstigere Biokinetik von [¹⁸F]FAZA gegenüber [¹⁸F]FMISO: An allen von ihnen untersuchten Tumoren (AR42J, A431, EMT6) fand sich zu jedem Messzeitpunkt ein höherer T/B- und T/M-Quotient verglichen mit [¹⁸F]FMISO, was sie auf die schnellere Elimination von [¹⁸F]FAZA aus Blut und normoxischem Gewebe zurückführten. Sorger sah in den intra- und interindividuell verschiedenen hypoxischen Fraktionen der Tumorzelllinien eine mögliche Erklärung für die diskrepante Bewertung von [¹⁸F]FAZA gegenüber [¹⁸F]FMISO der beiden Arbeitsgruppen (Brown, 1979; Moulder und Rockwell, 1984). Nach Krause et al. (2006) sollte die Aufnahme von [¹⁸F]FAZA und [¹⁸F]FMISO jedoch nicht von der hypoxischen Fraktion der einzelnen Tumorarten beeinflusst werden, vielmehr sieht er tierspeziesassoziierte Unterschiede und verschiedene Nekrosefraktionen der Tumoren als Grund für die divergierenden Ergebnisse der oben genannten Arbeitsgruppen.

Busk et al. (2008 b) bestätigten [¹⁸F]FAZA im *in vitro*-Experiment im Vergleich zu Messungen mit Eppendorf-Histograph und Pimonidazol sowie *in vivo* anhand der Tracerdistribution in hypoxischen und nicht-hypoxischen Tumorarealen an vier humanen Xenotransplantaten (FaDudd, UT-SCC-33, SiHa, HeLa) als exzellenten Marker für Tumorhypoxie.

Die Verwendbarkeit von [¹⁸F]FAZA zum *Therapiemonitoring* dokumentierten Solomon et al. (2003): Anhand der im [¹⁸F]FAZA-PET visualisierten Hypoxie wurde die Reduktion der Tumorhypoxie durch den Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib an murinen Tumoren beobachtet.

Die Frage nach einem *prädiktiven Wert* von [¹⁸F]FAZA hinsichtlich des Therapieansprechens auf Radio-, Chemo- und kombinierter Radiochemotherapie war Ziel der Studie, in deren Rahmen die vorliegende Dissertation entstand.

2. Zielsetzung

Nachweislich sind Tumoren, in deren Gewebe einen niedriger Sauerstoffpartialdruck gemessen wurde, aggressiver. Dies zeigt sich in einer rascheren Tumorwachstum und erhöhten Metastasierungstendenz im Vergleich zu normoxischen Tumoren. Zudem sind hypoxische Tumorzellen resistenter gegenüber den konventionellen Therapieansätzen sowohl in der Strahlen- als auch in der Chemotherapie.

Diese hypoxischen Tumoren müssen rasch und zuverlässig selektioniert werden, um sie der adäquaten, hypoxiespezifischen Therapie zuführen zu können und damit in der Konsequenz das Therapieergebnis und die Gesamtprognose zu verbessern. Dies setzt eine wenig invasive, im klinischen Alltag gut praktikable sowie wiederholbaren Methode zur Bestimmung des tumoralen Oxygenierungsstatus voraus. Die PET mit speziellen Hypoxietracern ist dabei zur detaillierten Darstellung der intratumoralen Verteilung hypoxischer Gewebeareale bewährt. [¹⁸F]FAZA stellt einen neuen PET-Hypoxietracer mit optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften dar, mit dem tumorale Hypoxie nicht nur nachgewiesen und identifiziert, sondern deren räumliche Verteilung in der PET nicht nur visualisiert, sondern sogar auch quantitativ beurteilt werden kann.

Das Wissen um das Vorliegen einer tumoralen Gewebhypoxie, um ihre Lokalisation, intratumorale Verteilung und Quantifizierung ermöglicht eine gezielte und dosisadaptierte Tumorbehandlung mittels Chemo- und Strahlentherapie. In der Strahlentherapie können so z.B. hypoxische Areale gezielt mit einer höheren Strahlendosis therapiert werden, während umliegendes Weichteilgewebe geschont werden kann. In der Chemotherapie können hypoxiespezifische Substanzen eingesetzt werden, die in normoxischen, gesunden Zellen keinen zelltoxischen ‚Kollateralschaden‘ entwickeln. Auch der deutlich höhere Kostenaufwand in der Anwendung zielgerichteter, optimierter Therapieansätze wie z.B. hypoxieadressierter Chemotherapeutika oder hypoxieadaptierter Bestrahlungsplanung und -durchführung macht auch aus gesundheitsökonomischer Sicht eine zuverlässige prätherapeutische Detektion und Selektion hypoxischer Tumoren unabdingbar.

Im Idealfall unterliegen die Tumoren zudem während der Therapie einer monitorisierenden Bildgebung, anhand deren sich der Therapieeffekt hinsichtlich der Hypoxie im Behandlungsverlauf überprüfen lässt.

Hauptziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Eignung von [¹⁸F]FAZA zum Monitoring des tumoralen Oxygenierungsstatus unter Radio-, Chemo- und kombinierter Radiochemotherapie am Mausmodell zu prüfen und eine prädiktive Potenz der prätherapeutischen tumoralen [¹⁸F]FAZA-Anreicherung hinsichtlich der Wirkung der Radio-, Chemo- und kombinierten Radiochemotherapie zu evaluieren. Dazu wurde regelmäßig sonographisch das Tumorwachstum vor, während und nach der jeweiligen Therapie gemessen und der Verlauf der Tumoroxygenierung in wiederholten [¹⁸F]FAZA-PET-Scans bestimmt.

Vor Therapiebeginn sollte eine Diskriminierungsschwelle der [¹⁸F]FAZA-Akkumulation für Tumor- und Hintergrundgewebe (T/B-Verhältnis) gefunden werden, anhand derer zuverlässig zwischen normoxischen, d.h. gering [¹⁸F]FAZA-anreichernden Tumoren und hypoxischen, d.h. stark [¹⁸F]FAZA-anreichernden Tumoren, unterschieden werden kann.

Die Validität der PET-Messungen zur Bestimmung des Oxygenierungsstatus sollte in ihrer Reproduzierbarkeit anhand zweier sequentieller PET-Scans an den EMT6-tragenden Mäusen binnen drei Tagen geprüft werden.

Zudem wurde die [^{18}F]FAZA-Verteilung im Organismus in einer Biodistributionsstudie an zwölf Mäusen untersucht. Post mortem wurde nach Entnahme des EMT6-Tumoren die intratumorale Tracerverteilung zusätzlich autoradiographisch mittels [^{18}F]FAZA und [^{18}F]GalactoRGD sowie immunhistochemisch mittels Pimonidazol und HIF-1 α untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Swiss nu/nu-Mäuse

Charles River Laboratories/Iffa Credo,
Lyon, Frankreich

Thymushypoplasie und Immundefizienz dieser Nacktmäuse mit reduzierter humoraler und nahezu fehlender zellulärer Immunität stellten die Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Xenotransplantationen dar. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.1.2 Zelllinie

Murine Mammaadenokarzinom-Zelllinie EMT6

Nuklearmedizinische Klinik und
Poliklinik, Klinikum Rechts der Isar,
TU München, Deutschland

Die adhärente EMT6-Zelllinie (Abb. 11) entstammt einer frühen Passage der KHJJ-Linie (Mamma-Tumor) und ist sowohl in der Kultur *in vitro* als auch als Tumor *in vivo* anzüchtbar. Tumoren der murinen Mammaadenokarzinom-Zelllinie EMT6 eignen sich aufgrund ihrer hohen hypoxischen Fraktion (im Mittel 5,4 – 61 %) sehr gut für Studien zur tumoralen Hypoxie (Moulder und Rockwell, 1984). EMT6-Zellen weisen in der exponentiellen Wachstumsphase eine Verdopplungszeit von ca. 17 h auf. EMT6-Zellen konnten *in vitro* in verschiedenen Kulturmedien erfolgreich angezüchtet werden, die höchste Wachstumsrate und Zelldichte fand sich für Waymouth's Medium mit 15 % FKS (Rockwell et al., 1972).

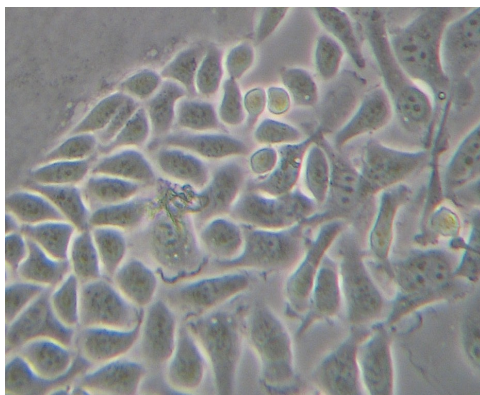


Abb. 11: Mikroskopische Nativaufnahme der langen, spindelförmigen, in Faszikeln liegenden EMT6-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular).

3.1.3 Kulturmedien und Zusätze

Zusammensetzung des Kulturmediums für die EMT6-Zellen:

Waymouth's Zellmedium + L-Glutamin	invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Fetales Kälberserum (10 %)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (1 %) 10.000 µg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland

Passage und Einfrieren:

EDTA (Versen) 1 % in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)-Einfriermedium	BioVeris, Gaithersburg, MD, USA
PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , low endotoxin	Biochrom, Berlin, Deutschland

3.1.4 Radioaktive Substanzen

[¹⁸ F]FAZA	Interdisziplinäres PET-Zentrum, Radiopharmazie, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
Transport von [¹⁸ F]FAZA	Firma Keller-Nill, Gefahrguttransporte, Tübingen, Deutschland

[¹⁸F]FAZA wurde von der Radiopharmazie der Universität Tübingen synthetisiert (Abb. 12). Dazu wurden 5 mg des FAZA-Precursors 1-(2,3-diacetyl-5-tosyl- α -D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazol in 1 ml DMSO für 5 min bei 100 °C mit [¹⁸F]Fluorid, 15 mg Kryptofix 2.2.2[®] (Merck) und 3,5 mg K₂CO₃ in Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung wurde mit 1 ml 0,1 N NaOH hydrolysiert, bei 30 °C für die Dauer von 2 min durchmischt und anschließend mit 0,5 ml 0,4 N NaH₂PO₄ neutralisiert. Nach Reinigung und Flüssigchromatographie wurde eine radiochemische Ausbeute von 20,7 ± 3,5 % bei einer durchschnittlichen radiochemischen Reinheit von über 95 % erzielt (Kumar et al., Reischl et al., beide 2002). In der hier beschriebenen Studie wurde die α -Form verwendet (FAZA- α), die durch passive Diffusion in die Zelle aufgenommen wird; die β -Form (FAZA- β) wird aktiv über einen Nucleosidtransporter über die Zellmembran transportiert.

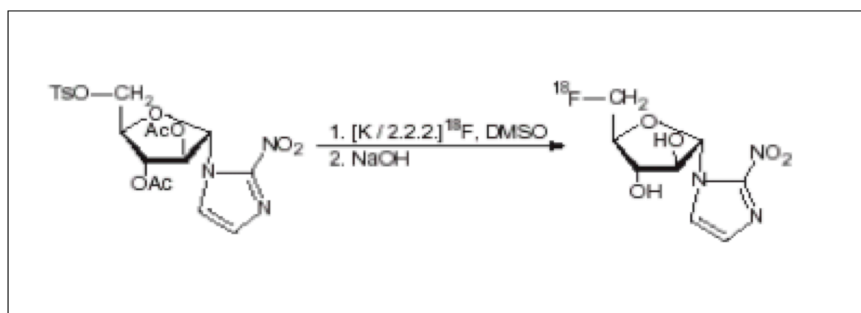


Abb. 12: Darstellung der Reaktion zur Synthese von 1-(5-[¹⁸F]luoro-5-deoxy- α -D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazol ([¹⁸F]FAZA) durch nukleophile Substitution und anschließender Hydrolyse (Reischl et al., 2002).

[¹⁸ F]GalactoRGD	Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum Rechts der Isar, TU München, Deutschland
------------------------------	--

3.1.5 Medikamente

Anästhesie:

Äther „Aether zur Narkose“	Chinosolfabrik, Seelze, Deutschland
Augensalbe Vidisic [®]	Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland
Isotonische Kochsalz-Lösung 0,9 %	DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland
Ketavet [®] (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn, Bridgewater, NJ, USA
Rimadyl [®] Injektionslösung (Carprofen)	Pfizer, New York, NY, USA
Rompun [®] (2 % Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Domitor [®] (Medetomidin)	Pfizer, New York, NY, USA
Dormicum [®] (Midazolam)	Roche, Basel, Schweiz
Durogesic [®] (Fentanyl)	Johnson & Johnson, Neuss, Deutschland
Antisedan [®] (Atipamezol)	Pfizer, New York, NY, USA
Anexate [®] (Flumazenil)	Roche, Basel, Schweiz
Narcanti [®] (Naloxon)	Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA

Zusammensetzung der Ketavet/Rompun-Narkose:

10 % Ketavet[®], 8 % Rompun[®], 82 % physiologische NaCl-Lösung 0,9 %

Tab. 1: Zusammensetzung der antagonisierbaren Narkose

	<i>Wirkstoff (Markenname)</i>	<i>Menge [µg/kgKG]</i>	<i>Konzentration [mg/ml]</i>
Narkotika:	Medetomidin (Domitor [®])	500	1
	Midazolam (Dormicum [®])	5	5
	Fentanyl (Durogesic [®])	50	0,05
Antagonisten:	Atipamezol (Antisedan [®])	2,5	5
	Flumazenil (Anexate [®])	0,5	0,1
	Naloxon (Narcanti [®])	1,2	0,4

Therapie:

Tirapazamin	Sanofi-Aventis, Paris, Frankreich
-------------	-----------------------------------

3.1.6 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Camon, UK
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Camon, UK
Einbettmedium Tissue-Tek [®] O.C.T.Compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL
Einbettmedium Kaisers Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %, 96 %, 70 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 4 %	Hausapotheke Klinikum München rechts der Isar, TU München, Deutschland
Horse Serum	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
MAB5382 (HIF-1α-Antikörper)	Chemicon International, CA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

3. MATERIAL UND METHODEN

Paraffin	Hausapotheke Klinikum München rechts der Isar, TU München, Deutschland
PBS (Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline)	invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Pimonidazol (Hypoxyprobe™)	Chemicon International, CA, USA
Saures Hämalalaun nach Mayer	Hausapotheke Klinikum München rechts der Isar, TU München, Deutschland
Solidofix®-Kältespray	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vector M.O.M Immunodetection Kit	Vector Laboratories, Camon, UK
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.7 Geräte

Aktivimeter Typ CRC 15R	Capintec, Ramsey, NJ, USA
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cell Counter, CASY®1	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Gamma-Counter Typ 1480 Wizard™ 3''	Wallac, Finnland
Gefrierschränke	Robert Bosch, Gerlingen, Deutschland
Magnetom Sonata 1,5 Tesla	Siemens, München, Deutschland
Kleintier-PET MOSAIC™	Philips, Amsterdam, Niederlande
Kryostat Microm, Typ HM 500	Microm, Walldorf, Deutschland
Laborwaage Typ LA 230 S bzw. BL 1500 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Laminar Flow-Arbeitsbank LaminAir® HB 2472	Heraeus, Hanau, Deutschland
Megafuge 1,0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Typ ID 03	Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland
Nahbestrahlungsgerät RT 100	Philips, Amsterdam, Niederlande
Ofen	Memmert, Schwabach, Deutschland
PhosphorImager™ 445 SI	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Reinwassersystem Milli-Q ^{UF Plus}	membraPure, Bodenheim, Deutschland
Stickstoffbehälter Arpege 70 bzw. GT 40	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Ultraschallgerät Logiq 500	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Vortex-Genie	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad Typ 1083 bzw. 1092	GFL, Burgwedel, Deutschland

3.1.8 Gebrauchsmaterial

Eppendorf Tubes 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gewebekleber Histoacryl®	Braun Vet Care, Tuttlingen, Deutschland
Gewebekulturflaschen Cellstar® 550 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cryo Tubes 1,8 ml	Heraeus, Hanau, Deutschland
Objektträger SuperFrost Ultra Plus®	Nunc Intermed, Wiesbaden, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen Omnitip™ 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenröhrchen Falcon® (10 ml, 25 ml)	abimed, Langenfeld, Deutschland
	abimed, Langenfeld, Deutschland
	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Zentrifugenröhrchen Cellstar® 15 ml

Greiner Bio-One, Frickenhausen,
Deutschland

3.1.9 Software

ImageQuant™

SPSS für Windows (Version 15.1)

Windows Office 1998

GE Healthcare, Solingen, Deutschland

IBM, Ehningen, Deutschland

Microsoft, Redmond, WA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivieren der EMT6-Zellen

Einfrieren: Die Langzeitaufbewahrung der EMT6-Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff in jeweils 1,8 ml Kryoröhrchen. Dazu wurden die Zellen nach Ablösen mit EDTA und PBS jeweils in einem Zentrifugenröhrchen bei 1000 U/min 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit DMSO-Einfriermedium resuspendiert (ca. 5×10^6 Zellen/ml). Die Suspension wurde anschließend auf eine entsprechende Anzahl von 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt und zunächst für 24 – 48 h im Gefrierschrank bei -70 °C , dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Auftauen: Zum Auftauen der EMT6-Zellen wurden die Röhrchen dem Stickstoffbehälter entnommen und unter fließendes handwarmes Wasser gehalten, bis sich der Röhrcheninhalt von der Gefäßwand löste. Zum vollständigen Auftauen wurde der Röhrcheninhalt in 50 ml Zentrifugenröhrchen verbracht, das zu 40 ml mit Zellmedium gefüllt war. Das Zellmedium wurde hierfür vorher im 37 °C warmen Wasserbad angewärmt. Zellmedium und aufgetaute Zellen wurden dann bei 25 °C für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension im Kulturmedium wurde das Pellet auf vier mit jeweils 25 ml Zellmedium gefüllte Kulturflaschen verteilt und im Brutschrank bei 37 °C , 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert und das Kulturmedium alle 4 Tage gewechselt, wobei ein im Medium enthaltener pH-abhängiger Indikator durch Farbumschlag von rot in gelb die Anreicherung saurer Metabolite anzeigte.

Passagieren: Am Ende einer exponentiellen Wachstumsphase hatten die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet, entsprechend einer Zelldichte von ca. 10^7 Zellen/Kulturflasche (183 cm^2); jetzt wurden die Zellen unter aseptischen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Arbeitsbank passagiert. Dazu wurde das Nährmedium vorsichtig abpipettiert, verbliebene Mediumreste und Zelldetritus wurden anschließend durch Zupipettieren von 10 ml PBS (Phosphate-buffered saline) auf die EMT6-Zellmonolayer sowie vorsichtiges Schwenken der Kulturflaschen gelöst und abgesaugt; dieser Reinigungsschritt erhöhte die Effizienz des Zellablösens durch den Ca^{2+} -Komplexbildner. Nach Zugabe von jeweils 7 ml 1mM EDTA in PBS wurden die Kulturflaschen für 10 min im Wärmeschrank inkubiert. Durch sanftes Beklopfen des Bodens ließen sich die Tumorzellen gut vom Kulturflaschenboden lösen, in je ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführen und bei 1500 U/min für 5 min zentrifugieren. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Pellets zur Verteilung auf neue sterile Kulturflaschen mit 5 ml FKS-haltigem Zellmedium resuspendiert und auf jeweils vier neue Kulturflaschen verteilt. Zur Injektion der Zellen zur Tumorzucht in der Maus wurden die Zellen in FKS-freiem Nährmedium resuspendiert.

3.2.2 Tierhaltung

Haltung der Versuchstiere: Die insgesamt 87 vier- bis sechs Wochen alten, weiblichen Swiss nu/nu-Mäuse wurden nacheinander in vier Kohorten von jeweils 20 bis 25 Tieren aus spezifiziert pathogenfreier Zucht bezogen und dem Studienprotokoll zugeführt.

Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden sie in Käfigen zu je 4 – 5 Tieren im Tierstall der Nuklearmedizinischen Klinik mit speziellem Lichtprogramm bei 23 °C sowie 50 – 60 % Luftfeuchtigkeit eingestellt. Das Mäuse-Standardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser waren ad libitum zugänglich.

Anästhesie und Tötung: Die i.v.-Injektion des Radionuklids wurde in Äther-Kurzarkose durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse in ein verschließbares Glasgefäß, das ein mit Äther getränktes Papiertuch enthielt, verbracht. Zur Narkose während der wiederholten zwölfminütigen PET-Scans wurde den Tieren die gewichtsadaptierte Menge der antagonistischen Narkotikakombination subkutan injiziert. Zusätzlich wurde den Tieren aus einer 1 ml-Spritze 0,05 ml des nichtsteroidalen Antirheumatikums Rimadyl[®] per os verabreicht, das nach Antagonisierung des atemdepressiven Fentanyls eine anhaltende Analgesie sicherstellte. Für Tumorimplantation und MRT wurden 250 µl des im Vergleich kreislaufdepressiveren, aber kostengünstigeren Rompun-Ketamin-Gemisches intraperitoneal appliziert. Aufgrund des unter Anästhesie fehlenden Lidschlussreflexes wurde die Kornea mit Augensalbe (Vidisc[®]) benetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Dem raschen Abkühlen der Körpertemperatur der empfindlichen Nacktmäuse bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel wurde mittels Infrarotlampe und körperwarmen Wasserkissen entgegen gesteuert.

Zur Tötung wurden die Tiere zunächst in einen Kunststoffbehälter, in den CO₂ mit 2 – 4 l/min insuffliert wurde, verbracht. Nach dem Eintreten des CO₂-induzierten Atemstillstands wurden die Tiere durch Eröffnen des Brustkorbs und Durchtrennen des Aortenbogens durch Entbluten getötet.

3.2.3 Tumoranzucht und -implantation

Aus der EMT6-Zellsuspension (s. Kapitel 3.2.1.) wurde mittels Cell Counter CASY[®]-1, das nach dem Widerstandsmessprinzip funktioniert, eine Zelldichte von 10⁷ intakter Zellen pro ml der zu injizierenden Suspension eingestellt. Das Gerät berechnet dazu aus der Pulsfläche, dem Integral des Widerstandsmesssignals, die durchmesserlineare Größenverteilung der Zellen in der Suspension.

Die vorliegende Studie wurde sequentiell in vier Versuchsreihen mit jeweils 19 bis 25 Mäusen durchgeführt. Unter Ätherkurznarkose wurde in jeder Versuchsreihe jeweils einer Maus am rechten Hinterlauf ein Depot von 1 ml der Tumorzellsuspension subkutan injiziert. Nach ca. 10 Tagen hatte sich aus den injizierten Tumorzellen ein solider subkutaner Tumor („Muttertumor“) entwickelt. Nach Tötung der Mäuse wurde der Tumor umgehend mit Schere und Pinzette vorsichtig in toto entfernt und anschließend in gleichmäßige Stücke von ca. 1 µl Volumen zerteilt, die den übrigen Mäusen derselben Versuchsreihe implantiert wurden. Die Implantation der Tumorstücke erfolgte unter Ketamin/Rompun-Narkose. Durch einen 3 mm langen Hautschnitt am rechten Hinterlauf wurde mittels Scherenschlag eine Hauttasche subkutan angelegt, in die jeweils ein Tumorstück eingebettet wurde. Der Hautschnitt wurde nach der Tumorimplantation mittels Histoacryl[®]-Gewebekleber verschlossen.

3.2.4 Sonographische Bestimmung der Tumorgröße

Nach der Tumorimplantation an den Hinterlauf der Swiss nu/nu-Mäuse wurde das Tumorwachstum jeden zweiten Tag (montags/mittwochs/freitags) sonographisch bestimmt. Dazu wurde der Tumor mit einem 11 MHz-Linearschallkopf im B-mode dreidimensional vermessen und sein Volumen mittels der Formel für ellipsoide Körper

$$V = (a \times b \times c)\pi/6$$

errechnet (Dorie et al., 1991). Dabei stehen a, b und c für die orthogonalen Tumordurchmesser. Das Auftragen einer ausreichenden Menge an Kontaktgel auf den Tumor und den rechten Hinterlauf garantierte einerseits den optimalen Kontakt zwischen planem Schallkopf und konvexem Tumor. Andererseits wurde dadurch ein direkter Kontakt des Schallkopfes mit dem Tumor vermieden, was potentiellen Messfehlern durch Kompression der Tumors durch den Schallkopf vorbeugte. Messungenauigkeiten durch Bewegung der wachen Tiere wurden durch manuelles Fixieren der Tiere verhindert: Dazu wurden die Tiere von einem Assistenten mit der linken Hand an der Nackenhaut gefasst, auf den Rücken gedreht und der rechte Hinterlauf mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand festgehalten. Hohe Frequenzen wie die verwendeten 11 MHz zeigen zwar nur eine geringe Eindringtiefe in das Gewebe, sind aber aufgrund ihres guten Auflösungsvermögens an oberflächlich liegenden Gewebestrukturen ideal zur Beurteilung der exakten Tumormaße und der Tumorbinnenstruktur. Aufgrund ihrer hohen Präzision ist die hochauflösende Sonographie anderen Messmethoden wie der Schublehre mit hoher inter- und intraindividuellem Messungenauigkeit deutlich überlegen.

Ab einem sonographisch gemessenen Tumormindestvolumen von 70 μl wurden die Mäuse nach initialer Evaluation des Tumoroxygenierungsstatus mittels [^{18}F]FAZA-PET einer der Therapiegruppen, d.h. einer Behandlung mit Chemotherapie, mit Radiotherapie oder mit kombinierter Radiochemotherapie, bzw. der Kontrollgruppe zugeordnet. Das zu erreichende Tumolvolumen wurde auf 500 μl festgelegt. Der Erfolg der verschiedenen Therapiestrategien wurde anhand der sonographisch bestimmten Wachstumsverzögerung der therapierten Tumoren (absolute growth delay = aGD) im Vergleich zur Größenzunahme der Tumoren des Kontrollkollektivs evaluiert. Dabei wurde die Formel

$$aGD = T - C$$

mit T = Dauer des Tumorwachstums von der Eingangsgröße von 70 μl bis zum Erreichen des Zielvolumens von 500 μl in Tagen in der jeweiligen Therapiegruppe und C = mittlere Dauer des Tumorwachstums von 70 μl bis 500 μl am Kontrollkollektiv in Tagen verwendet. Der aGD wurde für normoxische und hypoxische Tumoren getrennt berechnet.

Der korrespondierende *log cell kill*, ein Maß für die Anzahl proliferierender Tumorzellen, die durch die Applikation einer definierten Therapie theoretisch abgetötet werden (Angabe in Zehnerpotenzen), wurde mit der Formel

$$\log \text{ cell kill} = 0,301 \times aGD/Td$$

berechnet (Plowman et al., 1997). Die mittlere Verdopplungszeit (doubling time Td) beschreibt dabei die benötigte Zeit der Größenverdopplung des Tumors von 200 μl auf 400 μl am nichttherapierten Tumor. In der Volumenzunahme von 200 μl auf 400 μl unterliegt die tumorale Wachstumskurve im Allgemeinen einem exponentiellen Verlauf.

3.2.5 PET-Aufnahmen

Nach Erreichen eines sonographischen Tumolvolumens von 70 µl wurde ein erster [¹⁸F]FAZA-PET-Scan durchgeführt, nach dem die Tiere entweder dem normoxischen oder hypoxischen Studienkollektiv zugeordnet und einer viertägigen Therapie bzw. Scheintherapie unterzogen wurden. Die meisten Tumoren erreichten das Therapieeingangsvolumen zum zweiten [¹⁸F]FAZA-PET-Scan (FAZA II) und wurden nach Therapieabschluss nochmals gescannt (FAZA III) (Abb. 13). Bei schnell wachsenden Tumoren, die bereits zum Termin des ersten [¹⁸F]FAZA-PET-Scans (FAZA I) ein Volumen > 70 µl aufwiesen, wurde bereits nach FAZA I mit der Therapie begonnen; hier konnten dann die Tumoren dreimal, d.h. vor, während und nach Therapie gescannt werden. Da [¹⁸F]FAZA nicht in der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum Rechts der Isar hergestellt, sondern vom Uniklinikum Tübingen bezogen wurde, war die Frequenz der [¹⁸F]FAZA-PET-Scans aus organisatorischen und ökonomischen Gründen limitiert. Pro Versuchsreihe standen drei [¹⁸F]FAZA-Lieferungen zur Verfügung. Da die Tumoren jedoch unterschiedlich schnell das Therapieeingangsvolumen von 70 µl erreichten, wurden die [¹⁸F]FAZA-PET-Scans standartisiert jeweils an den Tagen 8, 12 und 22 nach Tumorimplantation durchgeführt. Wenn die Tumoren ein Volumen von 500 µl erreicht hatten, im Durchschnitt 28 Tage nach Implantation, wurden die Mäuse euthanasiert.

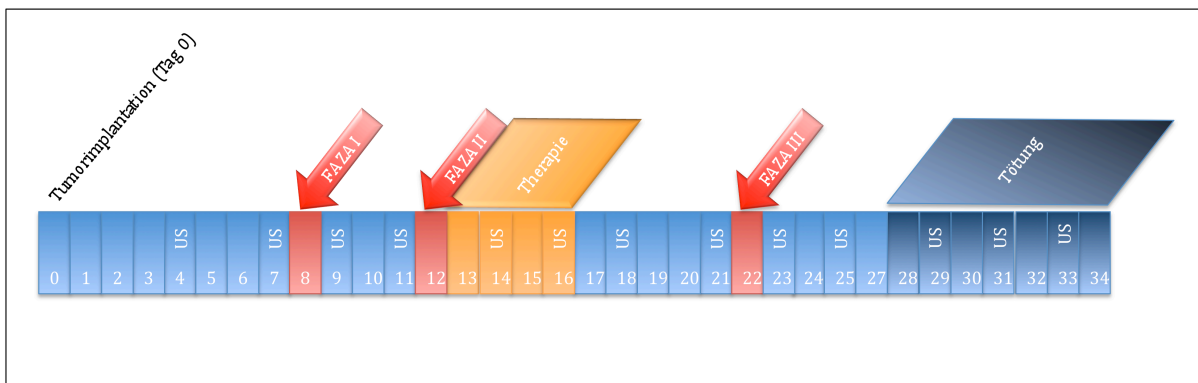


Abb. 13: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Für die [¹⁸F]FAZA-PET-Aufnahmen wurden den Mäusen unter Ätherkurznarkose 13 MBq [¹⁸F]FAZA in eine laterale Schwanzvene injiziert. Das Eintauchen des Schwanzes in handwarmes Wasser führte zur Vasodilatation der Schwanzvenen, was ihre Punktion mittels 27 G-Kanüle zur zügigen i.v.-Injektion erleichterte. Im dreistündigen Intervall zwischen [¹⁸F]FAZA-Injektion und PET-Aufnahme waren die Tiere wach bei freiem Zugang zu Nahrung und Trinkwasser und atmeten Raumluft (O₂ = 21 %). Vor dem zwölfminütigen PET-Scan wurden die Tiere narkotisiert und auf einer Laborwaage gewogen. Unmittelbar vor der Lagerung im PET-Scanner wurde die Harnblase katheterisiert, um die Abbildung der [¹⁸F]FAZA-Anreicherung in den ableitenden Harnwegen bei renaler Tracer-Elimination zu reduzieren. Die Mäuse wurden im Kleintier-PET-Scanner MOSAIC™ auf einer Papierunterlage fixiert, um Bewegungsartefakte zu minimieren (Abb. 14).

Der Prototyp des Kleintier-PET-Scanner MOSAIC™ mit guter Auflösung (2 mm) und hoher Sensitivität wurde an der University of Pennsylvania entwickelt (Surti et al., 2005). Die Größe des axialen und transversalen Field of View (FOV) von 11,9 cm bzw. 12,8 cm sowie der Röhrendurchmesser von 19,7 cm ermöglichen Ganzkörperaufnahmen auch größerer Tiere. Der Scanner umfasst 14.456 Germanium-Oxyorthosilikat(GSO)-Kristalle der Größe 2 mm x 2 mm x 10 mm, die bei einem Koinzidenzfenster von 12 ns die Photonenenergie im

Bereich zwischen 410 und 665 keV aufnehmen. Von 288 hexagonal angeordneten Photomultipliern wird das von den GSO-Kristallen ausgesandte sichtbare Licht verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt, aus denen digital Sinogramme bzw. Schichtbilder in drei orthogonalen Ebenen rekonstruiert werden. Dazu wurde der 3D Row Action Maximum Likelihood Algorithm (3D-RAMLA) und ein Filter (2 mm Full Width at Half Maximum (FWHM)) für die Gauß'sche Normalverteilungskurve verwendet (Daube-Witherspoon et al., 2001). Die Daten wurden iterativ rekonstruiert ohne Streuungs-, Schwächungs- und Partialvolumeneffekt-Korrektur.

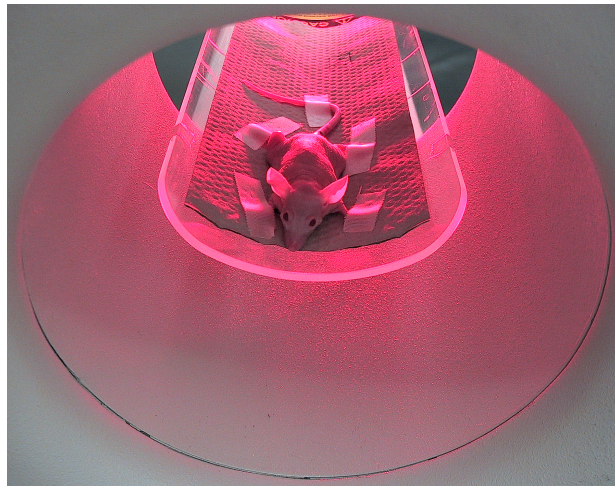


Abb. 14: Lagerung einer Swiss nu/nu-Maus im MOSAIC™-Kleintier-PET.

Die PET-Datensätze wurden semiquantitativ analysiert, indem für jedes Tier die [^{18}F]FAZA-Anreicherung im Tumor (T) mit der eines Referenz- oder Hintergrundgewebes (B für background) in Relation gesetzt wurde (T/B-Verhältnis). Dazu wurde die [^{18}F]FAZA-Anreicherung des normoxygenierten Referenzgewebes durch die Demarkierung einer ellipsoiden ROI (region of interest) im Thoraxbereich definiert. Lungengewebe, das den Großteil des Thorax einnimmt, war als Hintergrundgewebe ideal, da es zum einen gut oxyniert und sich damit von hypoxischem Gewebe deutlich abhebt, zum anderen, da es bei den kleinen Dimensionen der Versuchsmäuse ein relativ großflächiges homogenes Referenzgewebe darstellt. Reines Muskelgewebe war bei den kleinen Dimensionen nicht zuverlässig determinierbar.

Der Mittelwert (MW) der gezählten Zerfälle pro Pixel in diesem Areal plus eine Standardabweichung (standard deviation, SD) ergab den Schwellenwert für die *isocontour-ROI*, anhand der die [^{18}F]FAZA-Akkumulation des Tumors am rechten Hinterlauf bestimmt wurde: Zerfälle pro Pixel über diesem Wert ($\text{MW}_B + 1\text{SD}$) wurden als tumorale Tracer-Anreicherung gewertet.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde einmalig separat anhand von zwei aufeinanderfolgenden [^{18}F]FAZA-PET-Scans binnen 72 h an insgesamt zwölf der EMT6-tragenden Mäuse getestet.

3.2.6 Therapie

Die Klassifizierung der EMT6-Tumoren als normoxisch oder hypoxisch erfolgte anhand des individuellen T/B-Verhältnisses bei der prätherapeutischen [^{18}F]FAZA-PET-Aufnahme. Dabei variierte das T/B-Verhältnis bei den 67 in die Studie eingeschlossenen Tieren zwischen 1,0 und 3,17. Der Median von 1,97 wurde empirisch als Diskriminator für den

3. MATERIAL UND METHODEN

Oxygenierungszustand der Tumoren festgesetzt: Tumoren mit einem T/B-Verhältnis kleiner als der Median wurden als normoxisch, Tumoren mit einem T/B-Verhältnis größer als der Median als hypoxisch bezeichnet.

Im Anschluss an die Einteilung ins normoxische oder hypoxische Kollektiv wurden die Tiere einer der drei Therapiegruppen – Radiotherapie (RT), Chemotherapie (CT), kombinierter Radiochemotherapie (RCT) – oder der Kontrollgruppe zugeordnet:

Radiotherapie (RT): Nach standardisiertem Protokoll wurden 36 Gy fraktioniert in acht Bestrahlungseinheiten à 4,5 Gy binnen vier Tagen in zwölfstündigen Abständen appliziert, ähnlich einer Palliativtherapie beim Tumorpatienten. Frühere Studien ergaben, dass dieses Zeitintervall am effektivsten hinsichtlich der Radiosensibilisierung der Tumorzellen ist (Papadopoulou et al., 2001). Zur Bestrahlung wurden die Mäuse in einen transparenten Zylinder verbracht, aus dem der tumortragende rechte Hinterlauf herausragte und mittels einer gepolsterten Klemme fixiert wurde (Abb. 15 A). Die Strahlendosis wurde mit dem 70 kV-Nahbestrahlungsgerät Philips RT 100 mit einer Dosisleistung von 8,2 Gy/min über einen im Durchmesser 1,1 cm messenden tumorfokussierten Tubus aus einem Abstand von 10 mm zwischen Strahlenquelle und Haut appliziert (Abb. 15 B). Um alle Tiere dem gleichen Stresslevel auszusetzen, wurde den Mäusen der RT-Gruppe zusätzlich 30 min vor der Bestrahlung 0,5 ml NaCl 0,9 % intraperitoneal injiziert. Umgekehrt erhielten die Mäuse der CT-Gruppe 30 min nach Chemotherapie-Applikation eine Scheinbestrahlung.

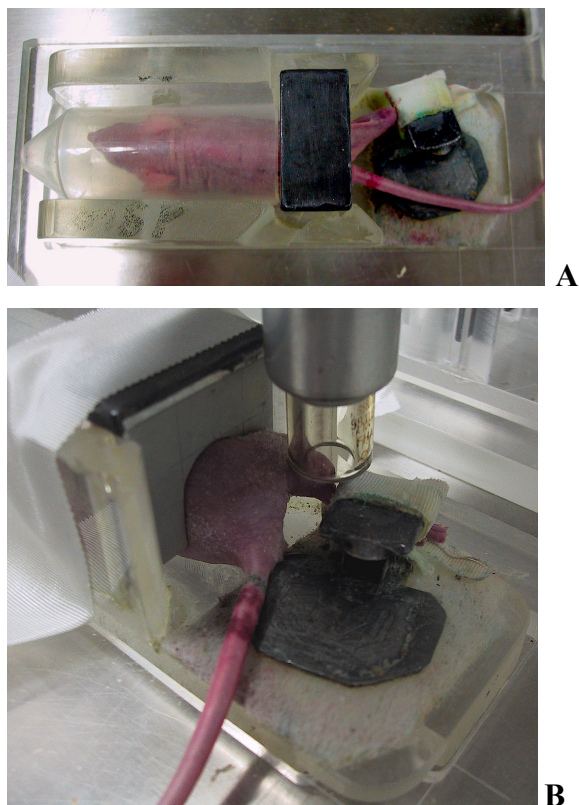


Abb. 15: Positionierung der Mäuse zur Bestrahlung bzw. Scheinbestrahlung.

Die **Chemotherapie (CT)** bestand aus insgesamt acht intraperitonealen TPZ-Injektionen à 14,2 mg/kgKG in ebenfalls zwölfstündigen Intervallen. Brown und Lemmon (1990) ermittelten an C₃H/Km- und BALB/c-Mäusen die größte Effizienz der kombinierten Radiochemotherapie für eine TPZ-Dosis von 0,08 mmol/kgKG, entsprechend einem Volumen von 0,02 ml/gKG bei einer Konzentration von 0,71 mg/ml. Angelehnt an dieses Protokoll

wurde in der vorliegenden Studie bei den chemotherapierten und kombiniert radiochemotherapierten Tieren bei einem Körpergewicht der Mäuse von ca. 20 – 25 g jeweils 0,5 ml TPZ (0,02 ml/kgKG x 25 gKG) intraperitoneal injiziert.

Zur **kombinierten Radiochemotherapie (RCT)** wurden die Tiere 30 min nach der intraperitonealen TPZ-Injektion analog dem Protokoll der radiotherapierten Tiere mit 4,5 Gy bestrahlt.

Die **Kontrollgruppe (Ko)** diente der Darstellung des natürlichen Verlaufs der Tumorentwicklung ohne therapeutische Intervention in Form von antitumoralen Substanzen oder Bestrahlung. Zu bedenken ist jedoch, dass allein die Prozedur der intraperitonealen Injektionen und der Positionierung zur Bestrahlung für die Tiere der Therapiegruppen ein beachtliches Maß an Stress bedeutete, der die intrinsischen Abwehrfunktionen zusätzlich beeinträchtigen konnte. Um diesen Faktor zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe zu nivellieren, wurden die Tiere der Kontrollgruppe ebenfalls in der gleichen Frequenz wie in den oben beschriebenen Therapieprotokollen einer intraperitonealen Injektion mit 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung sowie 30 min p.i. einer Scheinbestrahlung unterzogen. Dazu wurden die Tiere in gleicher Weise am Nahbestrahlungsgerät positioniert, das Gerät wurde jedoch nicht in Betrieb genommen.

3.2.7 Darstellung der Tumorperfusion in der Magnetresonanztomographie

In einer kleinen Pilotstudie wurde anhand des vorliegenden Tumormodells untersucht, inwieweit die in der MRT gemessene Tumorperfusion und das Tumorblutvolumen Einfluss auf die [¹⁸F]FAZA-Akkumulation haben. Gut perfundierte Tumorareale gehen mit einer hohen Protonendichte des Gewebes einher und können somit aufgrund der langen Spin-Spin-Relaxationszeiten besonders gut in T₂-gewichteten Aufnahmen dargestellt werden.

Aufgrund des hohen logistischen Aufwands konnten die Vorteile der MRT wie die geringe Invasivität sowie die Möglichkeit zur Evaluation der Tumorbinnenstruktur nicht seriell genutzt werden. Für exemplarische Aufnahmen lagen die narkotisierten tumortragenden Mäuse in einer Flex S-Spule des Magnetresonanztomographen auf dem Bauch. Die Aufnahmezeit mit dem 2D Turbospin Echo T₂-Programm betrug zwölf Minuten mit 3 Mittlungen bei einer Repetitionszeit TR von 3470 ms. Die Schichtdicke lag bei 2 mm.

3.2.8 Biodistribution

Unter Biodistribution wird die Verteilung einer interessierenden Substanz, z.B. eines PET-Tracers, in einem vitalen Organismus im Verlauf eines definierten Zeitabschnitts verstanden. In den Maus-Versuchen von Piert et al. (2005) zeigte sich im Mittel das größte T/B-Verhältnis 180 min nach [¹⁸F]FAZA-Injektion.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sechs EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Mäusen 7 MBq [¹⁸F]FAZA in eine laterale Schwanzvene injiziert. Nach 5, 60 und 120 min wurden jeweils zwei Tiere euthanasiert und die [¹⁸F]FAZA-Verteilung im Organismus untersucht. Dazu wurden die Kadaver vollständig seziiert und Haut, Muskel, Knochen, Fett, Tumor, Herz, Lunge, Galle, Gallenblase, Pankreas, Milz, Leber, Magen, Mageninhalt, Caecum, Caecuminhalt, Dünndarm, Dünndarminhalt, Dickdarm, Dickdarminhalt, Nieren, Nebennieren, Uterus mit Adnexen, Schilddrüse, Augen, Gehirn, Blut, Urin, Schwanz und der Restkadaver in Probenröhrchen eingebracht. Die Masse der zu untersuchenden Gewebe und Flüssigkeiten (Blut, Urin) wurde mit einer Analysenwaage (Einteilung = 0,0001 g; Messfehler = 0,0002 g) bestimmt. Aus Magen, Dün- und Dickdarm wurde jeweils der Inhalt ausgestrichen. Anschließend wurde im γ -Counter (Wallac) jeweils über den Zeitraum einer Minute die Aktivität in *counts per minute (cpm)* gemessen. Zur Auswertung wurden nur solche Zählraten

herangezogen, die innerhalb des linearen Messbereichs des γ -Counters (1.000-1.000.000 cpm) lagen. Die cpm-Werte der Gewebeproben wurden auf Prozent der injizierten Aktivität pro g Gewebe normiert (%ID/g). Der 1%-Referenz-Wert wurde wie folgt bestimmt: Die pro Tier injizierte Aktivität wurde ad 100 ml in PBS verdünnt und 1 ml davon im γ -Counter gemessen (5fach-Bestimmung).

3.2.9 Autoradiographie

Die Autoradiographie ist eine *ex vivo*-Methode zum Nachweis und Lokalisation von Radioaktivität in Gewebeschnitten. Die Autoradiographie diente somit zur Ergänzung und Bestätigung der [^{18}F]FAZA-PET-Messungen. Prämortale wurden dazu insgesamt 11 bzw. 16 Mäusen jeweils 13 MBq [^{18}F]FAZA bzw. [^{18}F]GalactoRGD in eine laterale Schwanzvene injiziert. Nach einem PET-Scan 3 h p.i. wurden die Mäuse getötet, der Tumor sowie der Musculus quadriceps femoris als Kontrollgewebe entnommen und in PBS gereinigt. Im Anschluss wurden die Tumoren mit zugehörigem Kontrollgewebe unverzüglich in flüssigen Stickstoff bei $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ verbracht, auf einem Kryostat-Objektteller mittels Tissue-Tek[®] fixiert und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 15 μm dicke Schnitte angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden auf gereinigte und silanisierte Objektträger aufgelegt und für den Zeitraum von 9,17 h entsprechend fünf HWZ von ^{18}F à 110 min im PhosphorImager[™] positioniert. Im PhosphorImager[™] lässt sich mittels photostimulierter Lumineszenz von Europium(II)-gekoppeltem Bariumfluorobromid (BaFBr:Eu^{2+}) radioaktive Strahlung nachweisen. Die Intensität der Lumineszenz wird anhand der Relation zu einem scannenden Laserstrahl gemessen und digital auf Phosphorspeicherplatten abgebildet (Johnston et al., 1990). Mittels der Computersoftware ImageQuant[™] wurden diese „Abbildungen“ analysiert und quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-Test für jeweils zwei unverbundene Stichproben verwendet.

3.2.10 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Validierung der tumoralen [^{18}F]FAZA-Verteilung und Korrelation der funktionellen PET-Aufnahmen mit der morphologischen Tumorbinnenstruktur auf zellulärer Ebene wurde als exogener Marker das Nitroimidazol-Derivat **Pimonidazol (Hypoxyprobe[™])** verwendet. Dazu wurde den Tieren zeitgleich mit [^{18}F]FAZA bzw. [^{18}F]GalactoRGD 180 min vor Tötung Hypoxyprobe[™] in einer Dosierung von 60 mg/kgKG intraperitoneal appliziert. An 15 μm dicken Kryoschnitten der post mortem entnommenen Tumoren wurde nach Absättigen der unspezifischen endogenen Immunglobuline im Mausgewebe mittels M.O.M.[™] Mouse Ig Blocking Reagent die Pimonidazol-Addukte in den hypoxischen Zellen mittels sogenannter „Sandwich-Methode“ detektiert: Nach der Bindung des monoklonalen IgG-Primärantikörpers (Hypoxyprobe[™]-1 Mab1) an das spezifische Antigen wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (biotinylated anti-Mouse IgG) an die C-Kette des Primärantikörpers gekoppelt. Das zugefügte Avidin-Biotin-Enzymkonjugat (Vectastain Elite ABC Reagent A und B) führte aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin zu Biotin zu einem Verstärkungseffekt auf die anschließende Färbung mit dem Chromogen: Als Chromogene wurden 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet. Die mit dem Chromogen zugegebene Peroxidase oxidiert das als Substrat angebotene H_2O_2 . Die dabei frei werdenden Protonen oxidierten das vorher nahezu farblose Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt (AEC rot, DAB braun) unter Bildung von H_2O . Bei den Pimonidazol-Färbungen mit AEC als Chromogen resultierte eine rote Zellplasmafärbung. Die Verdünnung des Primärantikörpers wurde mit 1:100 als optimal befunden, ansonsten orientierten wir uns am Protokoll der

3. MATERIAL UND METHODEN

Herstellerempfehlung (Kennedy et al., 1996; Raleigh et al., 1998; Tab. 2). Bei den Kontrollschnitten wurde kein Primärantikörper aufgetragen.

Tab. 2: Protokoll des immunhistochemischen Nachweises von Pimonidazol

Prozedur	Reagentien	Zeit	Temp.
1. Fixieren der Kryoschnitte	Aceton	10 min	- 20 °C
2. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
3. Absättigen der endogenen Peroxidase	50µl 30 % H ₂ O ₂ /450 µl Aqua dest./2000 µl Methanol	10 min	RT
4. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
5. Inaktivieren der endogenen Gewebeeimmunglobuline	M.O.M. TM Mouse Ig Blocking Reagent	60 min	RT
6. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
7. Inkubieren	M.O.M. TM Diluent	30 min	RT
8. Abgießen			RT
9. Inkubieren mit PrimärAK	M.O.M. TM Diluent mit Hypoxyprobe TM -1 Mab1 (1:100)	60 min	RT
10. Spülen (Kontrolle immer zuerst und/oder separat)	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
11. Inkubieren mit SekundärAK	M.O.M. TM Biotinylated anti-Mouse IgG Reagent (1:100)	15 min	RT
12. Spülen	PBS, 0,2% Brij 35	3 x 3 min	RT
13. Inkubieren mit ABC-Peroxidase-Komplex	Vectastain Elite ABC Reagent (30 min vorher herstellen)	10 min	RT
14. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
15. Inkubieren mit Chromogen	AEC Substrate Kit for Peroxidase (rote Färbung)	30 min	RT
16. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35 Aqua dest.	3 x 3 min 2 min	RT RT
17. Gegenfärben	Hämalaun	45 s	RT
18. Spülen	Leitungswasser in der Standkuvette	5 min	RT
19. Trocknen		10 min	40 °C
20. Einbetten Zudecken mit Deckglas	Kaisers Glyceringelatine (Merck)		

Hypoxia inducible Factor-1α (HIF-1α): Im Gegensatz zu Pimonidazol, das Gewebhypoxie direkt markiert, da es nur unter hypoxischen Bedingungen mit zytoplasmatischen Proteinen Addukte bildet, zählt HIF-1α zu den biologischen Hypoxiemarkern, die nicht die Hypoxie an sich, sondern eine zelluläre Reaktion als Konsequenz einer chronischen Hypoxie nachweisen. Zum immunhistochemischen Nachweis von HIF-1α an EMT6-Paraffinschnitten wurde gemäß Herstellerempfehlung ebenfalls die Streptavidin-Biotin-Methode verwendet wie bei HypoxyprobeTM, diesmal jedoch mit DAB als Chromogen (Picchio et al., 2008; Tab. 3). Während HypoxyprobeTM Pimonidazol im Zytoplasma nachweist, lässt sich HIF-1α ausschließlich intranukleär lokalisieren mit dem Resultat einer braunen Kernfärbung (Vordermark und Brown, 2003).

3. MATERIAL UND METHODEN

Tab. 3: Protokoll des immunhistochemischen Nachweises von HIF-1 α

Prozedur	Reagentien	Zeit	Temp.
1. Trocknen im Ofen		über Nacht	37 °C
2. Klären	Xylol	20 min	RT
3. Entwässern	In absteigender Alkoholreihe: 2x 100 % Alkohol 2x 96 % Alkohol 1x 70 % Alkohol	je 5 min	RT
4. Spülen	Aqua dest.	5 min	RT
5. Inkubieren Erwärmen in Mikrowelle	Citratpufferlösung (pH = 6,0)	2 x 8 min	RT 60 °C
6. Abkühlen		20 min	RT
7. Absättigen der endogenen Peroxidase	50 μ l 30 % H ₂ O ₂ /450 μ l Aqua dest./ 2000 μ l Methanol	15 min	RT
8. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
9. Inaktivieren der endogenen Gewebeimmunglobuline	M.O.M. TM Mouse Ig Blocking Reagent	60 min	RT
10. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
11. Inkubieren	M.O.M. TM Diluent	30 min	RT
12. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	1 min	RT
13. Inkubieren	Horse Serum (pur)	30 min	RT
14. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35 (3x Eintauchen)		RT
15. Inkubieren mit PrimärAK	M.O.M. TM Diluent mit MAB5382 (1:100)	90 – 120 min	RT
16. Spülen (Kontrolle immer zuerst und/oder separat)	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
17. Inkubieren mit SekundärAK	M.O.M. TM Biotinylated anti-Mouse IgG Reagent (1:100)	45 min	RT
18. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
19. Inkubieren mit ABC- Peroxidase-Komplex	Vectastain Elite ABC Reagent (30 min vorher herstellen)	20 min	RT
20. Spülen	PBS, 0,2 % Brij 35	3 x 3 min	RT
21. Inkubieren mit Chromogen	DAB Substrate Kit for Peroxidase (braune Färbung) für HIF-1 α	maximal 5 min	RT
22. Spülen	Aqua dest.	3 x 3 min	RT
23. Gegenfärben	Hämalaun	45 s	RT
24. Spülen	Leitungswasser in der Standküvette	5 min	RT
25. Trocknen		10 min	40 °C
26. Einbetten Zudecken mit Deckglas	Kaisers Glyceringelatine (Merck)		RT RT

3.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Tests wurden mit SPSS für Windows (Version 15.1) gerechnet. Da für die Beobachtungen der Wachstumszeit von 70 – 500 μ l, des T/B-Verhältnisses und des Therapieeingangsvolumens keine Normalverteilung vorlag, wurde der Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben angewandt, gefolgt vom Mann-Whitney-Test für zwei unverbundene Stichproben. Die Homogenität der Gruppeneinteilung hinsichtlich prätherapeutischer [¹⁸F]FAZA-Aufnahme und sonographisch gemessenem Therapieeingangsvolumen wurde mittels ANOVA (analysis of variance) und Kruskal-Wallis-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde für p = 0,05 festgelegt. Soweit nicht anders vermerkt, sind Ergebnisse als MW (\pm SD) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Aufnahme und Verteilung von [¹⁸F]FAZA

4.1.1 Studienkollektiv und Therapieverträglichkeit

Mit insgesamt 87 weiblichen EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Nacktmäusen wurde das vorliegende Tierexperiment begonnen. Fünf Tiere starben vor Therapiebeginn, weitere zwölf vor Erreichen des Tumorzielvolumens von 500 µl und wurden daher in der Auswertung der Studie nicht berücksichtigt. Zu den Todesursachen zählten Komplikationen aufgrund wiederholter Narkosen, intraperitonealer Injektionen sowie Tumorkachexie. Aufgrund inadäquaten Tumorumens bei der Durchführung der initialen [¹⁸F]FAZA-PET-Aufnahmen wurden drei weitere Mäuse aus der Studie ausgeschlossen. Abzüglich der zensierten Tiere bildete eine Anzahl von 67 Tieren das definitive Studienkollektiv.

Die Therapieprotokolle wurden im Allgemeinen von den Tieren gut vertragen. Abgesehen von einer abdominalen Dermatonekrose durch akzidentiell intrakutane TPZ-Injektion wurde keine direkte Toxizität weder der Radio- noch der Chemotherapie beobachtet. Aufgrund der Verlegung des Blut- und Lymphabflusses durch den am rechten Hinterlauf transplantierten, wachsenden Tumor bildeten sich häufig periphere Fußödeme an der entsprechenden Extremität.

4.1.2 Biodistribution mittels γ -Counter

Die Ergebnisse der [¹⁸F]FAZA-Biodistributionsstudie an sechs EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Mäusen deckten sich mit den früheren Studien an AR42J-tragenden Swiss nu/nu und EMT6-tragenden BALB/c-Mäusen (Piert et al., 2005): In Blut, Muskel, Knochen, Herz, Lunge, Leber, Pankreas und Niere zeigte sich im Verlauf von 120 min eine Abnahme der Radioaktivität. Sowohl die renale als auch die hepatobiliäre Tracerelimination ließ sich gut nachverfolgen: Zum Messzeitpunkt 5 min p.i. war insbesondere in den Nieren im Gegensatz zu den späteren Messzeitpunkten 60 bzw. 120 min p.i. eine hohe Aktivität (11,20 (\pm 0,48) %ID/g) zu beobachten, während sich zu diesem Zeitpunkt nur eine minimale Aktivität (0,02 (\pm 0,01) %ID/g) im Urin fand. Zu den späteren Messzeitpunkten sank dagegen die renale Aktivität, wohingegen sehr große Tracerkonzentrationen im Urin festgestellt wurden (Abb. 16, Tab. 4). Analog dazu konnte auch der Verlauf der hepatobiliären Tracerelimination mit zunächst hoher Aktivität 5 min p.i. in der Leber (5,18 (\pm 0,92) %ID/g) und konsekutiv zu den beiden späteren Messzeitpunkten 60 und 120 min p.i. in Gallenblase (11,21 (\pm 14,50) %ID/g), Dünn- (7,33 (\pm 6,18) %ID/g) und Dickdarminhalt (5,62 (\pm 5,60) %ID/g) beobachtet werden. Im Gehirn fand sich zu allen drei Messzeitpunkten nur eine zu vernachlässigende Aktivität. Im Tumorgewebe war zum Messzeitpunkt 120 min p.i. im Vergleich zu den Messzeitpunkten 5 und 60 min p.i. ein Anstieg der Aktivität zu verzeichnen. Das Lungengewebe hingegen, das einen Großteil des als Hintergrund gewählten Gewebes im Thorax ausmacht, erfuhr im Zeitverlauf einen deutlichen Abfall der Aktivität. Folglich vergrößerte sich das T/B-Verhältnis zu späteren Messzeitpunkten, was einem verbesserten Kontrast in der PET-

4. ERGEBNISSE

Bildgebung entsprach. Zu den Messzeitpunkten 5 und 60 min p.i. unterschied sich die Aktivität der jeweiligen zwei Tumoren nicht wesentlich (5 min p.i. 1,03 bzw. 1,20 %ID/g; 60 min p.i. 0,98 bzw. 1,23 %ID/g). Zum Messzeitpunkt 120 min p.i. hingegen zeigten die zwei untersuchten Tumoren eine sehr unterschiedliche Aktivitätskonzentration (0,71 bzw. 2,96 %ID/g), so dass bei einer ähnlicher Aktivität im zugehörigen Lungengewebe (0,72 bzw. 0,55 %ID/g 120 min p.i.) das T/B-Verhältnis zwischen 0,99 und 5,38 variierte. Damit wies der eine der beiden Tumoren des Messzeitpunktes 120 min mit einem T/B-Verhältnis < 1 keine Mehranreicherung im Tumor verglichen mit dem Referenzgewebe auf und wurde somit als normoxisch eingestuft, während der zweite Tumor mit einem T/B-Verhältnis > 1 als [¹⁸F]FAZA-anreichernd, also hypoxisch, klassifiziert wurde.

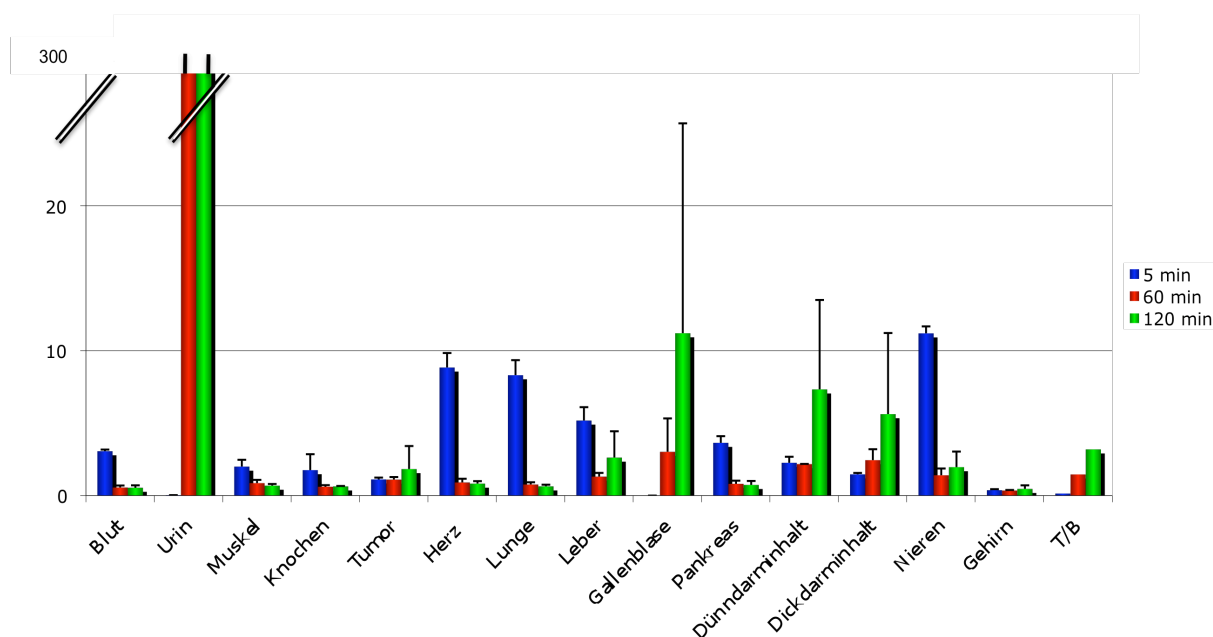


Abb. 16: Biodistribution (% ID/g) von [¹⁸F]FAZA zu den Zeitpunkten 5, 60 und 120 min p.i. an EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Mäusen (n = 2 pro Zeitpunkt).

Tab. 4: Biodistribution von [¹⁸F]FAZA in %ID/g Gewebe (± SD) zu den Zeitpunkten 5, 60 und 120 min p.i. (n = 2 pro Zeitpunkt)

Gewebe	5 min	60 min	120 min
Blut	3,06 (±0,11)	0,56 (± 0,14)	0,54 (±0,17)
Urin	0,02 (±0,01)	188,91 (± 217,56)	278,20 (±136,54)
Haut	1,21 (±0,25)	0,85 (±0,25)	0,71 (±0,04)
Muskel	2,00 (±0,47)	0,86 (±0,23)	0,68 (±0,11)
Knochen	1,76 (±1,00)	0,61 (±0,11)	0,63 (±0,03)
Fett	0,46 (±0,09)	0,32 (±0,14)	0,25 (±0,09)
Tumor	1,12 (±0,13)	1,10 (±0,18)	1,83 (±1,59)
Herz	8,85 (±1,00)	0,90 (±0,26)	0,83 (±0,17)
Lunge	8,31 (±1,04)	0,76 (±0,16)	0,64 (±0,12)
Gallenblase	-----	3,02 (±2,31)	11,21 (±14,50)
Pankreas	3,64 (±0,46)	0,81 (±0,22)	0,74 (±0,27)
Milz	2,29 (±0,10)	0,74 (±0,18)	0,60 (±0,16)
Leber	5,18 (±0,92)	1,31 (±0,26)	2,62 (±1,82)
Magen	2,57 (±0,08)	0,80 (±0,15)	0,99 (±0,32)
Mageninhalt	0,05 (±0,01)	0,20 (±0,02)	0,34 (±0,11)
Caecum	3,96 (±0,42)	1,08 (±0,18)	2,16 (±1,44)

4. ERGEBNISSE

Caecuminhalt	1,11 (\pm 1,14)	1,81 (\pm 0,14)	5,07 (\pm 5,19)
Dünndarm	4,46 (\pm 0,63)	1,49 (\pm 0,27)	2,32 (\pm 1,41)
Dünndarminhalt	2,26 (\pm 0,42)	2,17 (\pm 0,01)	7,33 (\pm 6,18)
Dickdarm	3,42 (\pm 0,02)	1,21 (\pm 0,28)	1,95 (\pm 0,58)
Dickdarminhalt	1,47 (\pm 0,10)	1,21 (\pm 0,28)	5,62 (\pm 5,60)
Niere	11,20 (\pm 0,48)	1,40 (\pm 0,47)	1,96 (\pm 1,08)
Gehirn	0,37 (\pm 0,07)	0,35 (\pm 0,04)	0,46 (\pm 0,25)
T/B-Verhältnis	0,14	1,46	3,19

4.1.3 Distribution von [^{18}F]FAZA in der PET

Drei Stunden nach Injektion von 13 MBq [^{18}F]FAZA in die laterale Schwanzvene zeigte sich in der PET-Aufnahme entsprechend der unter Kapitel 4.1.2. beschriebenen Distribution eine Tracerverteilung mit extratumoraler Anreicherung in Leber und Darm aufgrund der hepatobiliären Metabolisierung von [^{18}F]FAZA (Abb. 17). In Herz, Lunge, Mediastinum, Muskel und Hirn fand sich erwartungsgemäß nur eine geringe [^{18}F]FAZA-Anreicherung. Da die Harnblase unmittelbar vor der PET-Aufnahme katheterisiert wurde, ließ sich an der topographisch-anatomischen Lokalisation der Harnblase keine bzw. nur eine minimale Radioaktivität nachweisen. Die Tumormasse ließ sich je nach Oxygenierungsstatus anhand der [^{18}F]FAZA-Aufnahme vom umgebenden Weichteilgewebe abgrenzen.

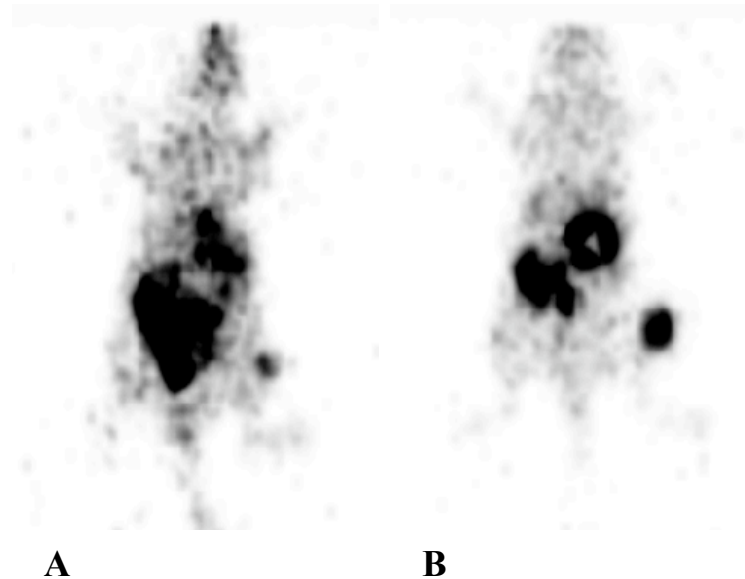


Abb. 17: Zwei [^{18}F]FAZA-PET-Scans im Abstand von 10 Tagen: Typische [^{18}F]FAZA-Verteilung in einer Swiss nu/nu-Maus mit EMT6-Tumor am rechten Hinterlauf (Pfeile). In Bild B ist der Tumor deutlich gewachsen und akkumuliert [^{18}F]FAZA. Aufgrund der hepatobiliären Elimination von [^{18}F]FAZA zeigt sich neben der tumoralen [^{18}F]FAZA-Akkumulation auch eine deutliche Anreicherung im Bereich der Leber und des Darms.

Einteilung in Therapiegruppen: Innerhalb der beiden Kollektive (normoxisch und hypoxisch) wurden die Tiere möglichst homogen einer der drei Therapiegruppen bzw. der Kontrollgruppe zugeordnet (Tab. 5). Numerisch verteilten sich die Tiere folgendermaßen auf die Kollektive und Therapie- bzw. Kontrollgruppen:

4. ERGEBNISSE

Tab. 5: Größen der Kontroll-, CT-, RT-, RCT-Gruppe

	<i>T/B < 1,97 (normoxisch)</i>	<i>T/B > 1,97 (hypoxisch)</i>
Kontrolle	n = 9	n = 9
CT	n = 7	n = 9
RT	n = 10	n = 7
RCT	n = 8	n = 8

Reproduzierbarkeit: Die Reproduzierbarkeit der [¹⁸F]FAZA-PET-Messungen wurde anhand zweier aufeinander folgender, separater [¹⁸F]FAZA-PET-Scans im Abstand von drei Tagen belegt. Abb. 18 zeigt das T/B-Verhältnis dieser beiden PET-Scans von insgesamt zwölf EMT6-tragenden Mäusen. Fünf der zwölf Tiere zählten gemäß initialem, hier nicht mit eingerechnetem und abgebildetem [¹⁸F]FAZA-PET-Scan zum normoxischen, sieben zum hypoxischen Kollektiv. Zum Zeitpunkt des ersten zusätzlichen [¹⁸F]FAZA-PET-Scans (Tag 0) lag das T/B-Verhältnis von nur noch zwei Tumoren unterhalb der Diskriminierungsschwelle von 1,97. Die Volumina der einzelnen Tumoren lagen beim ersten dieser beiden separaten [¹⁸F]FAZA-PET-Scans (Tag 0) zwischen 14 µl und 458 µl. Die Größenzunahme innerhalb der drei Tage variierte zwischen 3 µl und 191 µl (Median 38,5 µl). Im Diagramm sind die Wertepaare nach der Tumorgöße am Tag 0 geordnet.

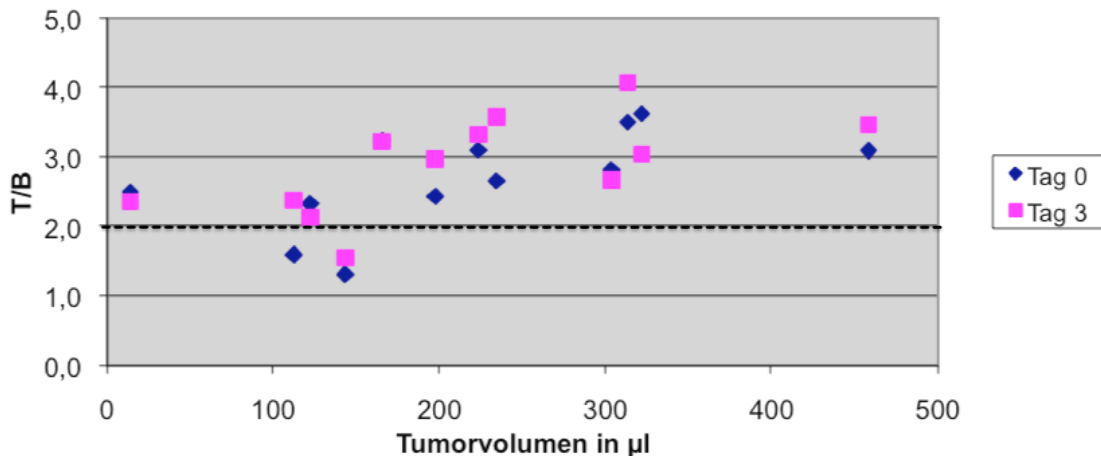


Abb. 18: T/B-Quotienten der zwei separaten [¹⁸F]FAZA-PET-Messungen: Jeweils ein übereinander liegendes Wertepaar mit einer blauen Raute (Tag 0) und einem violetten Quadrat (Tag 3) bezeichnet das T/B-Verhältnis an zwei separaten sequentiellen [¹⁸F]FAZA-PET-Scans binnen drei Tage an insgesamt zwölf untersuchten Mäusen mit EMT6-Tumoren. Die Diskriminierungsschwelle von 1,97 ist gestrichelt eingezeichnet.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,82 zeigte eine positive Korrelation zwischen den T/B-Quotienten an Tag 0 und Tag 3. Die lineare Regression als Funktion der Abhängigkeit der jeweils zusammen gehörenden T/B-Quotienten ergab die Funktionsformel $y = 0,7691x + 0,7277$ (Abb. 19). Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r als Bestimmtheitsmaß zeigte mit dem Wert 0,67 eine akzeptable Streuung um die Regressionsgerade (ideal = 1,0).

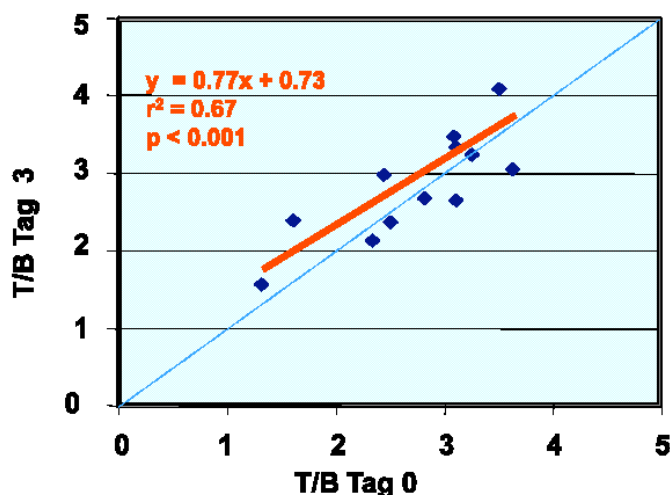


Abb. 19: Korrelation der T/B-Verhältnisse an Messtag 0 und 3: Eine geringfügige Tendenz zu höheren T/B-Quotienten an Tag 3 war zu erkennen, die sich jedoch mit größeren T/B-Werten verminderte. Ein Zusammenhang zwischen höheren T/B-Werten mit der Kollektiv- bzw. Gruppenzugehörigkeit oder dem Tumorgewicht konnte nicht gefunden werden.

4.1.4 Einfluss der Therapie auf die Tumoroxygenierung

Anhand des im PET gemessenen T/B-Verhältnisses wurde die Tumoroxygenierung im Therapieverlauf in den einzelnen Therapiegruppen verglichen. Dabei wurde die relative Änderung der Tumoroxygenierung ausgehend vom mittleren Messwert vor Therapiebeginn (100 %) zu dem Oxygenierungsstatus nach der Therapie ermittelt. Das Zeitintervall zwischen initialem [^{18}F]FAZA-PET-Scan und Therapiebeginn lag bei durchschnittlich 1,3 Tagen. Der [^{18}F]FAZA-PET-Scan nach Therapie fand im Schnitt 6,8 Tage nach Therapiebeginn statt. Dieses Zeitintervall von 6,8 Tagen beinhaltet die Therapiedauer von insgesamt vier Tagen.

Im *normoxischen* Tumorkollektiv fand sich im Therapieverlauf in allen Therapiegruppen wie in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere [^{18}F]FAZA-Aufnahme, d.h. eine geringere Gewebeoxygenierung (alle T/B vor/nach Therapie $p < 0,001$). Den größten Unterschied im T/B-Verhältnis vor und nach Therapie bzw. Scheintherapie wiesen dabei die Kontrollgruppe und die CT-Gruppe auf. Der T/B-Quotient der CT-Gruppe nach Therapie unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe ($p = 0,536$). Der posttherapeutische T/B-Quotient der RT- und RCT-Gruppe war deutlich geringer als der der Kontrollgruppe ($p = 0,013$ bzw. $p = 0,002$) (Tab. 6).

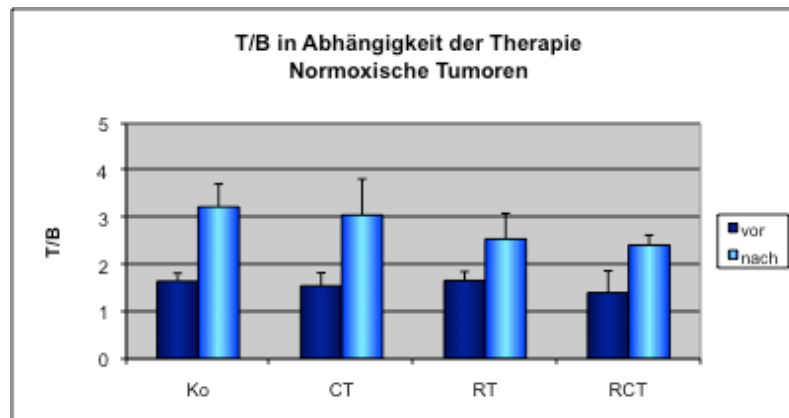
[^{18}F]FAZA-anreichernde, *hypoxische* Tumoren aller drei Therapiegruppen und der Kontrollgruppe zeigten ebenfalls posttherapeutisch eine niedrigere Gewebeoxygenierung, d.h. eine höhere [^{18}F]FAZA-Anreicherung als vor Therapiebeginn. Dabei fand sich bei den mit TPZ behandelten Gruppen (CT bzw. RCT) im Therapieverlauf eine deutliche Zunahme der [^{18}F]FAZA-Anreicherung auf 154 % bzw. 138 % (beide $p < 0,001$), während die RT-Gruppe posttherapeutisch wie die Kontrollgruppe einen ähnlichen Oxygenierungsgrad wie prätherapeutisch aufwies (120 % bzw. 118 % des jeweiligen Ausgangswertes; $p = 0,209$ bzw. $p = 0,498$). Im Vergleich der posttherapeutischen T/B-Quotienten der Therapiegruppen mit dem der Kontrollgruppe fand sich kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich der hypoxischen Kontroll- und Therapiegruppen mit ihren normoxischen Äquivalenzgruppen zeigte nur die RCT-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p = 0,015$; Abb. 20).

4. ERGEBNISSE

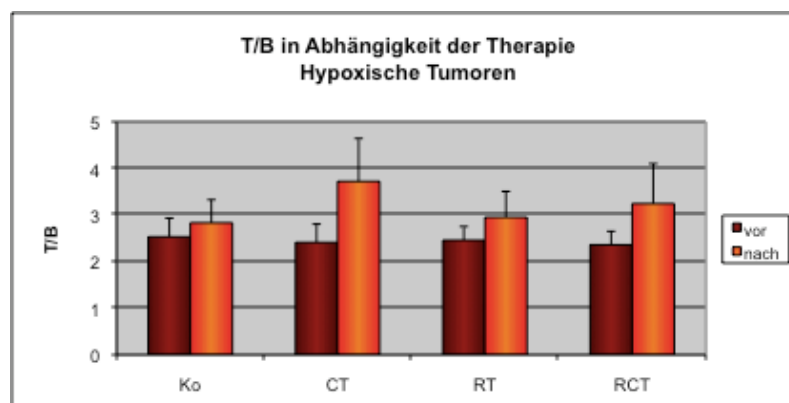
Tab. 6: Verlauf des T/B-Verhältnisses unter der jeweiligen Therapie bzw. Scheintherapie. Für die Prozentangabe wurde der jeweilige Gruppenmittelwert der prätherapeutischen T/B-Quotienten mit dem posttherapeutischen T/B-Gruppenmittelwert ins Verhältnis gesetzt.

Gruppe	n	vor (Schein-)Therapie		nach (Schein-)Therapie		p1	p2	p3	p4	p5
		absolut (\pm SD)	in %	absolut (\pm SD)	in %					
<i>Normoxische Tumoren</i>										
Ko	9	1,65 (\pm 0,17)	100	3,23 (\pm 0,49)	196	< 0,001				
CT	7	1,55 (\pm 0,28)	100	3,06 (\pm 0,77)	197	< 0,001	0,536	0,021	0,193	
RT	10	1,66 (\pm 0,19)	100	2,55 (\pm 0,55)	153	< 0,001	0,013	0,633		
RCT	8	1,40 (\pm 0,47)	100	2,42 (\pm 0,21)	172	< 0,001	0,002			
<i>Hypoxische Tumoren</i>										
Ko	9	2,66 (\pm 0,36)	100	3,13 (\pm 0,30)	118	0,498				0,515
CT	9	2,41 (\pm 0,39)	100	3,72 (\pm 0,92)	154	< 0,001	0,091	0,167	0,023	0,142
RT	7	2,46 (\pm 0,29)	100	2,95 (\pm 0,56)	120	0,209	0,710	0,867		0,133
RCT	8	2,36 (\pm 0,29)	100	3,24 (\pm 0,86)	138	< 0,001	0,955			0,015

p1 = Signifikanz zwischen prä- und posttherapeutisch in der Therapiegruppe bzw. Kontrollgruppe des Kollektivs
p2 = Signifikanz zwischen jeweiliger Therapiegruppe und Kontrollgruppe des Kollektivs
p3 = Signifikanz zwischen RCT und RT bzw. CT im Kollektiv
p4 = Signifikanz zwischen RT und CT im Kollektiv
p5 = Signifikanz zwischen normoxischen und hypoxischen Therapie- bzw. Kontrollgruppen



A



B

Abb. 20: T/B-Verhältnis im [18 F]FAZA-PET vor und nach Therapie bzw. im natürlichen Verlauf bei der Kontrollgruppe an normoxischen (A) und hypoxischen (B) Tumoren.

4.2 Tumorwachstum

4.2.1 Entwicklung des Tumolvolumens und der Tumorbinnenstruktur

Die sonographische Volumetrie ergab im Beobachtungsintervall der Größenzunahme von 70 auf 500 μl bei allen Tumoren ein annähernd exponentielles Tumorwachstum. Für das Wachstum maligner Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ist die Gompertz-Kurve typisch, die durch ein anfänglich exponentielles Wachstum gefolgt von einer geringer werdenden Volumenzunahme aufgrund von Nekrosebildung und Zellverlust charakterisiert ist (Sauer, 2001 (b)). Im Ultraschall konnten bei größeren EMT6-Tumoren echoarme nekrotische Tumoreareale deutlich von vitalem Tumorgewebe abgegrenzt werden (Abb. 21). Während bei Tumorgrößen zwischen 1 und 140 μl in knapp 75 % der insgesamt 588 Messungen keine oder nur minimale Nekroseareale zu finden waren, zeigten sich im Größenbereich zwischen 280 und 560 μl in 90 % minimale bis extensive Nekrosen. Die Kenntnis der Tumorbinnenstruktur ist wichtig zur Bewertung des [^{18}F]FAZA-Aufnahmeverhaltens, da [^{18}F]FAZA nur in vitalen Zellen angereichert wird.



Abb. 21: Sonographische Darstellung eines EMT6-Tumors am rechten Hinterlauf einer Swiss nu/nu-Maus (B-mode). Die Tumorgrenzen sind sehr gut erkennbar, im Unterschied zur alternativen Messung mittels Schublehre konnte die den Tumor umgebende Haut und Weichteilgewebe in der Volumenbestimmung abgegrenzt werden. Zentral ist deutlich eine echoarme Nekrose zu erkennen.

4.2.2 Einfluss der Therapie auf das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Tumoroxygenierung

4.2.2.1 Wachstumsdauer

Betrachtete man die Wachstumsdauer **unbehandelter Tumoren** von 70 auf 500 μl differenziert für normoxische und hypoxische Tumoren, wiesen die normoxischen Tumoren eine mittlere Wachstumsdauer von 15,6 (\pm 4,9) Tagen auf, während die hypoxischen Tumoren mit 11,0 (\pm 2,0) Tagen signifikant schneller das Zielvolumen von 500 μl erreichten ($p = 0,031$) (Abb. 22).

Unter **Chemotherapie** zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen normoxischen und hypoxischen Tumoren: Im Durchschnitt wuchsen die Tumoren in 13,1 (\pm 2,2) bzw. 14,6 (\pm 4,3) Tagen von 70 μl auf 500 μl .

4. ERGEBNISSE

Bei den **bestrahlten** normoxischen Tumoren wurde eine mittlere Wachstumsdauer von 22,3 (\pm 4,0) Tagen, bei bestrahlten hypoxischen Tumoren von 19,6 (\pm 2,9) Tagen errechnet. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen normoxischem und hypoxischem Kollektiv hinsichtlich des Tumorwachstums fand sich nicht ($p = 0,193$).

Die längsten Wachstumszeiten zeigten sich unter kombinierter **Radiochemotherapie**: Hier wurde bei den normoxischen Tumoren das Zielvolumen nach durchschnittlich 19,9 (\pm 6,6), bei den hypoxischen Tumoren nach 25,3 (\pm 6,0) Tagen gemessen. Auch hier bestand statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven ($p = 0,105$).

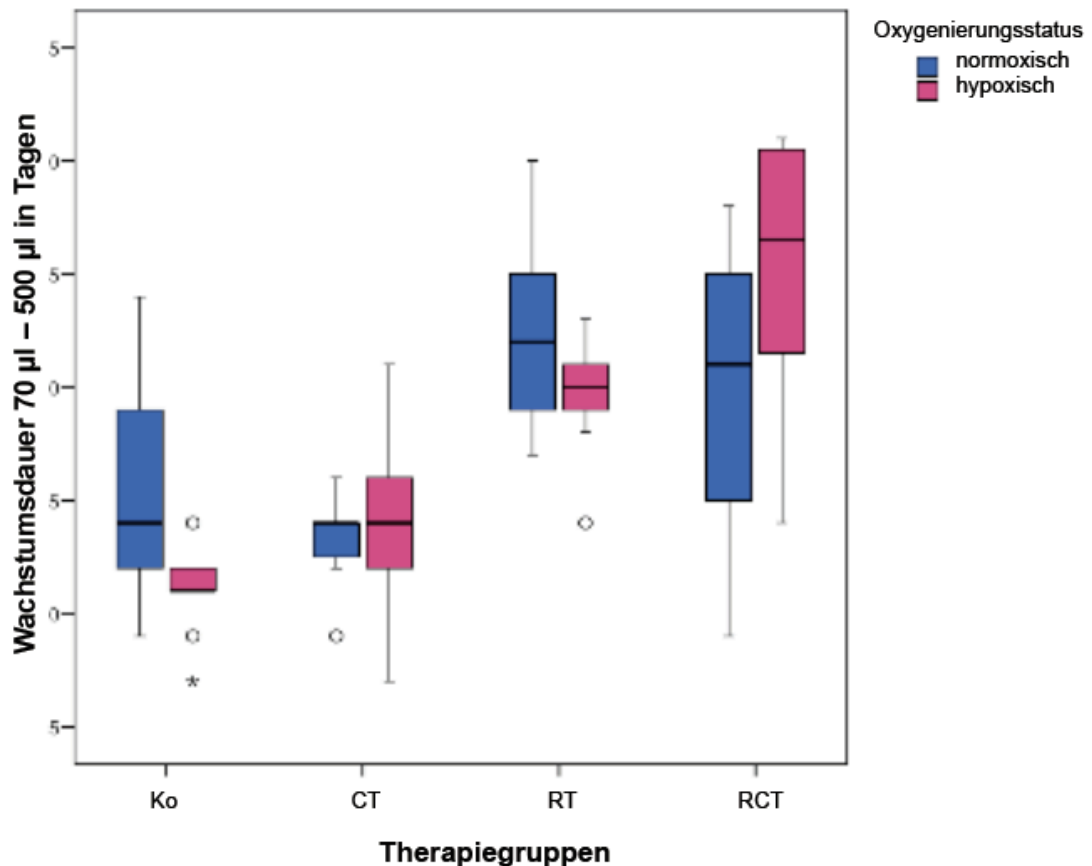


Abb. 22: Wachstumsdauer von 70 µl bis 500 µl in Tagen geordnet nach Therapiegruppen und prätherapeutischem Oxygenierungsstatus gemäß [¹⁸F]FAZA-Aufnahme. Der Interquartilsabstand zwischen Unter- (1. Quartil) und Obergrenze (3. Quartil) der Box entspricht den mittleren 50 % der Wachstumszeit. Die Antennen stellen den Minimal- bzw. Maximalwert dar. Ausreißer, definiert als Werte zwischen 1,5 und 3 Boxlängen unter- bzw. oberhalb der Unter- bzw. Obergrenze der Box, und Extremwerte, definiert als Werte > 3 Boxlängen unter- bzw. oberhalb der Unter- bzw. Obergrenze der Box, sind mit „o“ bzw. „*“ gekennzeichnet. Der Median (schwarze Linie) teilt das Kollektiv so, dass sich je 50 % der Beobachtungen oberhalb und unterhalb des Wertes befinden.

Im **normoxischen Kollektiv** zeigte sich in den mit TPZ behandelten Therapiegruppen (CT bzw. RCT) keine deutliche Verlängerung der Wachstumszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die nur chemotherapierten Tumoren erreichten sogar schneller das Endvolumen von 500 µl als die Kontrolltumoren. In der mit RT behandelten Gruppe hingegen

4. ERGEBNISSE

ließ sich eine signifikant längere Wachstumszeit im Vergleich zur Kontroll- sowie zur CT-Gruppe beobachten ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,001$). Während die kombinierte RCT gegenüber der alleinigen CT einen deutlich besseren Therapieeffekt erzielte, fand sich zwischen der kombinierten RCT und alleiniger RT kein Vorteil einer der beiden Therapieformen. Das negative aGD ($-2,5 \pm 2,2$ d) und log cell kill ($-0,20 \pm 0,25$) der CT-Gruppe resultierte aus dem schnelleren Wachstum verglichen mit der Kontrollgruppe. RT und RCT bewirkten jeweils ein aGD von $6,7 (\pm 4,0$ d) bzw. $4,3 (\pm 6,6$ d) (log cell kill $0,14 \pm 0,20$ bzw. $0,01 \pm 0,33$).

Im *hypoxischen Kollektiv* bewirkten alle drei Therapien – CT, RT und RCT – eine signifikante Verlängerung der Wachstumszeit im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p = 0,02$, $p = 0,001$, $p = 0,001$) (Abb. 23, Tab. 7). Die RCT erwies sich dabei auch gegenüber alleiniger Chemo- und Radiotherapie effizienter ($p = 0,004$ und $p = 0,048$). Die bestrahlten Tumoren wuchsen verglichen mit chemotherapierten Tumoren deutlich langsamer ($p = 0,028$).

Das aGD hypoxischer Tumoren lag bei alleiniger CT bei $3,6 (\pm 4,3$; log cell kill $0,03 \pm 0,32$). Im Vergleich zu den anderen hypoxischen Therapiegruppen war dies das kleinste *Growth Delay*. Gegenüber der normoxischen CT-Gruppe zeigte sich jedoch eine signifikante Differenz, da unter CT normoxische Tumoren schneller wuchsen. Bemerkenswert war, dass das aGD der RCT-Gruppe von $14,3 (\pm 6,0$ d; log cell kill $0,71 \pm 0,45$) größer war als die Summe der aGDs durch die jeweils alleinige Behandlung mit RT (8,6 d) und CT (3,6 d).

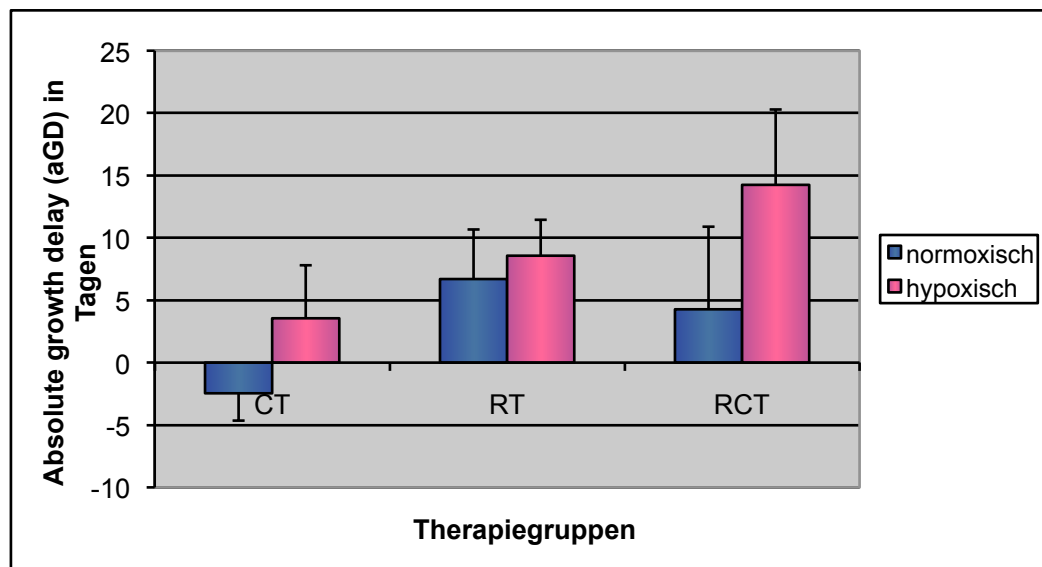


Abb. 23: Wachstumsverzögernder Effekt (Growth Delay) der Therapie mit CT und/oder Radiotherapie auf das normoxische bzw. hypoxische Tumorkollektiv; dargestellt ist der Mittelwert (\pm SD) des *absolute Growth Delay* (aGD) durch Therapie mit CT, RT bzw. RCT.

4. ERGEBNISSE

Tab. 7: Übersicht über das Tumorwachstum von 70 – 500 µl in Tagen, *aGD* und *log cell kill* im normoxischen und hypoxischen Kollektiv

Therapiegruppe	n	Wachstumszeit 70 – 500 µl		aGD			log cell kill			
		Tage	p ₁	p ₂	Tage	p ₁	p ₂	p ₁	p ₂	
<u>Normoxische Tumoren</u>										
Kontrolle	9	15,6 (±4,9)			-0,1 (±4,9)			-0,20 (±0,25)		
CT	7	13,1 (±2,2)	0,389		-2,5 (±2,2)	0,408		-0,32 (±0,11)	0,408	
RT	10	22,3 (±4,0)	0,010		6,7 (±4,0)	0,008		0,14 (±0,20)	0,008	
RCT	8	19,9 (±6,6)	0,146		4,3 (±6,6)	0,167		0,01 (±0,33)	0,167	
<u>Hypoxische Tumoren</u>										
Kontrolle	9	11,0 (±2,0)		0,032	0,00 (±2,0)		0,796	-0,30 (±0,15)		0,436
CT	9	14,6 (±4,3)	0,020	0,450	3,56 (±4,3)	0,019	0,050	-0,03 (±0,32)	0,019	0,016
RT	7	19,6 (±2,9)	0,001	0,183	8,57 (±2,9)	0,000	0,315	0,34 (±0,22)	0,000	0,055
RCT	8	25,3 (±6,0)	0,001	0,102	14,25 (±6,0)	0,000	0,015	0,71 (±0,45)	0,000	0,014

p₁ = Signifikanzen zwischen jeweiliger Therapiegruppe und Kontrolle des Kollektivs
p₂ = Signifikanzen zwischen normoxischen und hypoxischen Therapiegruppen

4.2.2.2 Wachstumskurven

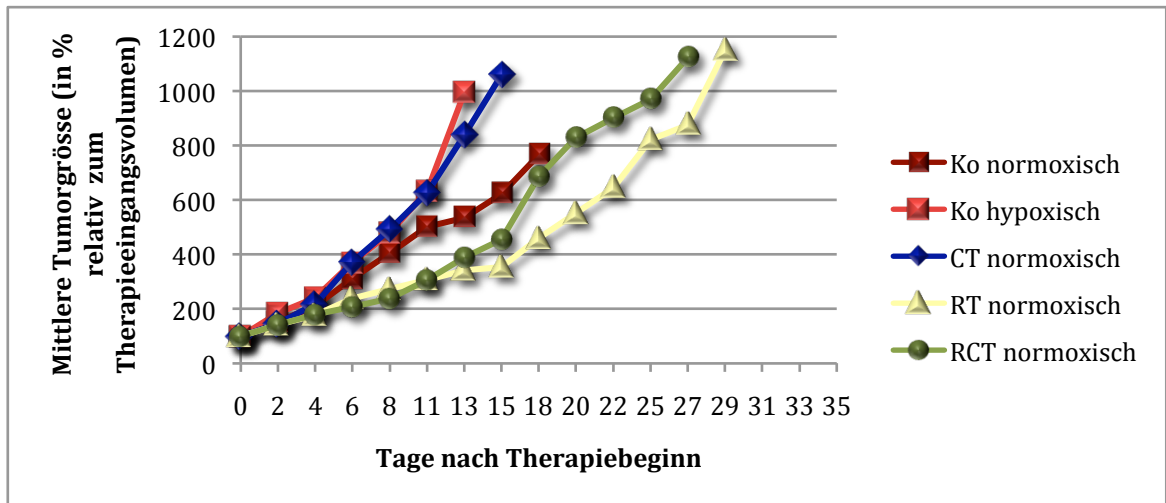
Im Beobachtungsintervall zwischen 70 µl und 500 µl unterlagen die EMT6-Tumoren einem annähernd exponentiellen Wachstum. Die Wachstumskurven der hypoxischen RT- und Kontrollgruppe stiegen steiler an als die des normoxischen Vergleichskollektivs (Abb. 24). Unter Chemotherapie (CT, RCT) hingegen wiesen die Wachstumskurven hypoxischer Tumoren eine geringere Steigung auf als die normoxischen Äquivalente. Den besten therapeutischen Effekt erzielte dabei die RCT bei hypoxischen Tumoren. Der Effekt der ionisierenden Strahlung in beiden RT- und RCT-Gruppen zeigte sich ca. sechs Tage nach Therapiebeginn in der Abnahme der Steigung der Wachstumskurven der RT und RCT-Gruppen verglichen mit den Kurven der jeweiligen Kontrollgruppen. Ein wachstumsverzögernder Effekt durch eine Monotherapie mit TPZ war nicht zu beobachten.

Betrachtete man die Wachstumskurven des **normoxischen Kollektivs** hinsichtlich des Einflusses der Therapien auf ihre Steigung, wies die Kurve der chemotherapierten Tumoren die höchste Steigung auf: Während zu Beginn der Therapie die Kurve noch parallel zu der der Kontrollgruppe verlief, unterlag die CT-Kurve im weiteren Verlauf einer stärkeren Steigung. Die Steigung der Wachstumskurven der nur bestrahlten sowie der radiochemotherapierten Tumoren verlief flacher als die der Kontrollgruppe. Die beiden Kurven stiegen anfangs parallel an, die Wachstumskurve der RT-Gruppe wies im Vergleich der normoxischen Tumoren die geringste Steigung auf.

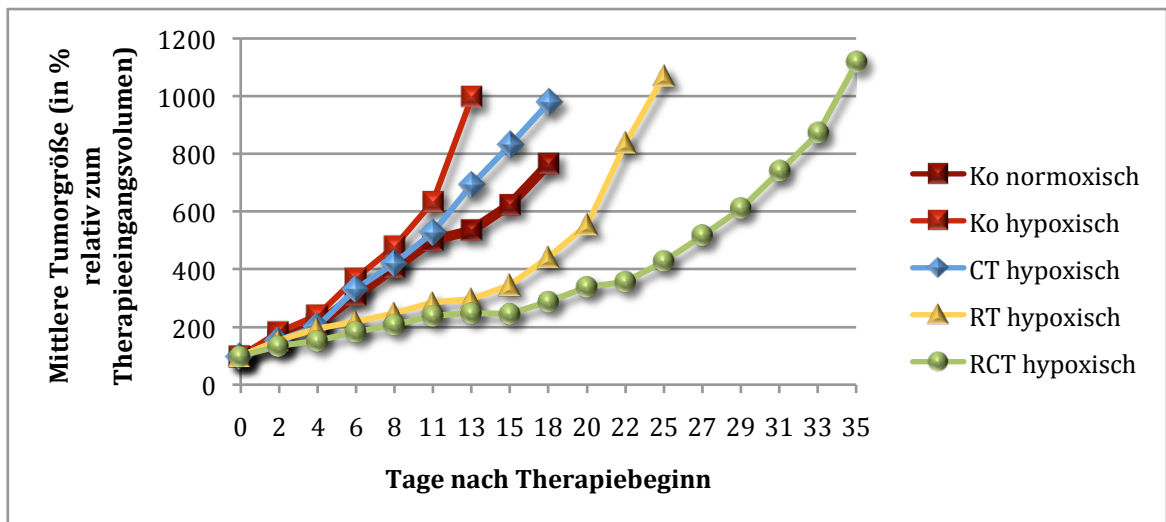
Im **hypoxischen Kollektiv** zeigte die Wachstumskurve der Kontrollgruppe die höchste Steigung, die Kurve der CT-Gruppe verlief zunächst parallel zur Kontrollgruppe, dann flachte sie im Vergleich zur Kontrollgruppen geringfügig ab. Deutlich flachere Wachstumskurven wiesen dagegen die radio- und vor allem die radiochemotherapierten Tumoren auf: Von Therapiebeginn an zeigten sie eine geringere Steigung der Wachstumskurve als die Tumoren der CT- und Kontrollgruppe. Etwa eine Woche nach Therapiebeginn zeigten beide Kurven eine Verlangsamung bzw. Stagnation des Wachstums, welche den Effekt der ionisierenden Strahlung demonstrierte. Die beste Wirkung entfaltete die RCT bei den hypoxischen

4. ERGEBNISSE

Tumoren: Die Wachstumskurve der radiochemotherapierten Tumoren wies bis 22 Tage nach Therapiebeginn nur eine geringe Steigung auf.



A



B

Abb. 24: Wachstumskurven der normoxischen (A) und hypoxischen (B) EMT6-Tumoren für die drei verschiedenen Therapieformen und ohne Therapie. Aufgetragen ist der Mittelwert der Volumenzunahme relativ zum Therapieeingangsvolumen (= 100 %) als eine Funktion der Zeit (in Tagen) nach Therapiebeginn geordnet nach Therapiegruppen. Zur besseren Orientierung sind die Wachstumskurven der unbehandelten Tumoren des jeweils anderen Kollektivs ebenfalls eingezeichnet.

4.3 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Pilotstudie zur MRT-Bildgebung hatte die Bestimmung der Tumervolumina, der Tumorbinnenstruktur sowie der tumoralen Perfusion und des Tumorblutvolumens zum Vergleich und zur Korrelation mit der tumoralen [^{18}F]FAZA-Aufnahme zum Ziel. In den jeweiligen transversalen, coronalen und sagittalen Schnittbildern der T₂-Wichtung war der Tumor am rechten Oberschenkel klar vom Muskelgewebe und verhältnismäßig gut vom Fettgewebe abzugrenzen (Abb. 25). Eine zufrieden stellende Beurteilung der Tumorbinnenstruktur sowie der tumoralen Perfusion war aufgrund des mangelnden Auflösungsvermögens der für die Dimensionen des menschlichen Körpers ausgelegten Computersoftware des

Magnetresonanztomographen nicht möglich. Da die Aufnahmen aufgrund des hohen logistischen Aufwands nicht seriell durchgeführt werden konnten und in der Sonographie eine zuverlässige, leicht verfügbare, unkompliziert zu handhabende und zudem hinsichtlich des technischen, ökonomischen, personellen sowie zeitlichen Aufwands der MRT überlegene Methode zur kontinuierlichen Volumetrie zur Verfügung stand, wurde auf die Volumetrie anhand der MR-Schnittbilder verzichtet.

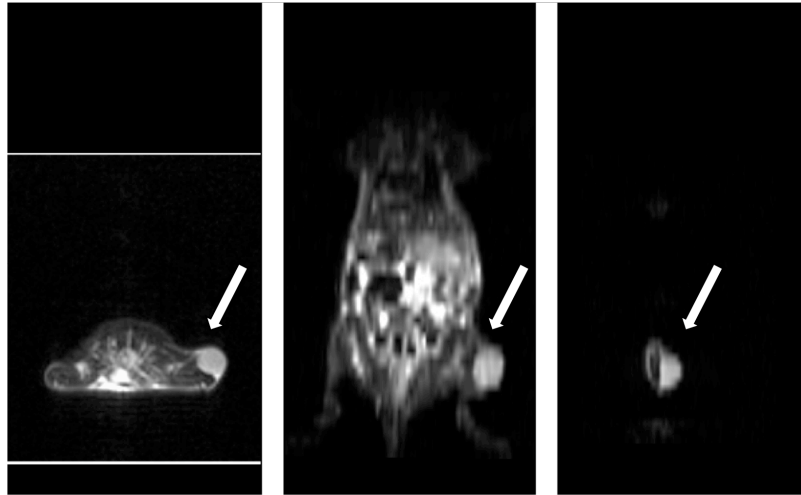


Abb. 25: MRT einer EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Maus im transversalen, coronalen und sagittalen Schnitt. In den T₂-gewichteten Aufnahmen ist der Tumor am rechten Hinterlauf gut vom umgebenden stark hyperintensiven Unterhautfettgewebe sowie der anliegenden hypointensen Muskulatur abzugrenzen. Flüssiger Darminhalt stellte sich in der T₂-Wichtung hyperintens, luftgefüllte Darmschlingen dagegen hypointens dar.

4.4 Autoradiographie

Die [¹⁸F]FAZA-Autoradiographie sollte der histologischen Verifizierung der im PET ermittelten [¹⁸F]FAZA-Anreicherung dienen und darüber hinaus durch die bessere Auflösung gegenüber der PET Auskunft geben über die Heterogenität der intratumoralen [¹⁸F]FAZA-Anreicherung. Von den 11 Tumoren, bei denen eine [¹⁸F]FAZA-Autoradiographie durchgeführt wurde, waren gemäß initialem [¹⁸F]FAZA-PET-Scan fünf als normoxisch und sechs als hypoxisch klassifiziert worden. Zum Zeitpunkt, an dem die Tumoren für die Autoradiographie entnommen wurden, lag der in der PET gemessene T/B-Quotient jedoch bei allen Tumoren über dem Schwellenwert von 1,97, so dass dementsprechend alle Tumoren hinsichtlich dieser Autoradiographiemessung als hypoxisch klassifiziert waren. Dabei fand sich bei den untersuchten Tumorschnitten (Abb. 26 A) im Vergleich zum zugehörigen Muskelgewebe eine signifikant erhöhte [¹⁸F]FAZA-Anreicherung ($p < 0,001$).

Auch bei den 16 Tumoren der [¹⁸F]GalactoRGD-Autoradiographie waren im initialen [¹⁸F]FAZA-PET-Scan 8 Tumoren als normoxisch, 8 als hypoxisch klassifiziert worden. Zum Zeitpunkt der Tumorentnahme waren alle Tumoren gemäß T/B-Ratio im [¹⁸F]FAZA-PET-Scan als hypoxisch klassifiziert. Die [¹⁸F]GalactoRGD-Autoradiographie ergab eine signifikant erhöhte Peptidanreicherung im Tumorgewebe verglichen mit dem Muskelgewebe ($p < 0,001$) (Abb. 26 B).

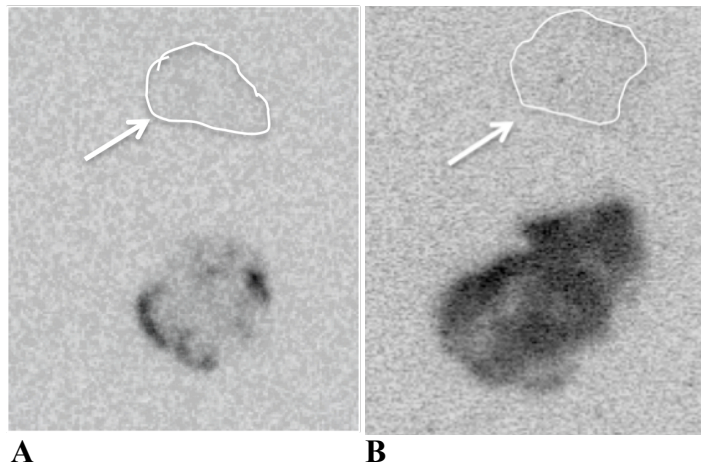


Abb. 26: Die Autoradiographie von Tumor- und Muskelschnitten mit jeweils $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ (A) und $[^{18}\text{F}]\text{GalactoRGD}$ (B). Die Tumorschnitte visualisieren die intratumorale Heterogenität der Tracerverteilung: Während $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ in den hypoxischen Randbereichen des Tumors angereichert hat, findet sich die $[^{18}\text{F}]\text{GalactoRGD}$ -Akkumulation im gesamten Tumorschnitt. Jeweils direkt über dem $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ - (A) bzw. $[^{18}\text{F}]\text{GalactoRGD}$ - (B) anreichernden Tumor ist das jeweils zugehörige Muskelgewebe (weiße Pfeile) abgebildet: Darin zeigt sich fast keine Traceraufnahme.

4.5 Immunhistochemie

Hypoxia inducible Factor-1 α (HIF-1 α): Im Vergleich sequentieller Gewebeschnitte eines hypoxischen Tumors imponierte bei einer hohen $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -Anreicherung ebenso eine starke HIF-1 α -Expression mit brauner Kernfärbung. Tumoren mit geringer $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -Anreicherung wiesen auch eine schwache HIF-1 α -Färbung auf (Abb. 27). Die $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -aufnehmenden Gewebезonen waren dabei größer als die Areale mit HIF-1 α -exprimierenden Zellen.

Pimonidazol (HypoxyprobeTM): Als Nitroimidazol-Derivat zeigte Pimonidazol eine ähnliche Verteilung wie $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$. Dies unterstrich die Eignung von $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ als sensiblen Hypoxietracer. Insbesondere in direkter Nachbarschaft zu nekrotischen Arealen fand sich eine starke rote Zellplasmafärbung durch Pimonidazol.

Dass die $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -Aufnahme sich über extensivere Tumorareale erstreckte als die gefärbten HIF-1 α -exprimierenden Zellareale, spiegelte sich auch im Vergleich der Färbemuster des Nitroimidazols Pimonidazol und der HIF-1 α -Färbung wider: Pimonidazol sowie HIF-1 α ließen sich in den Randbereichen nekrotischer Areale nachweisen (Abb. 28).

4. ERGEBNISSE

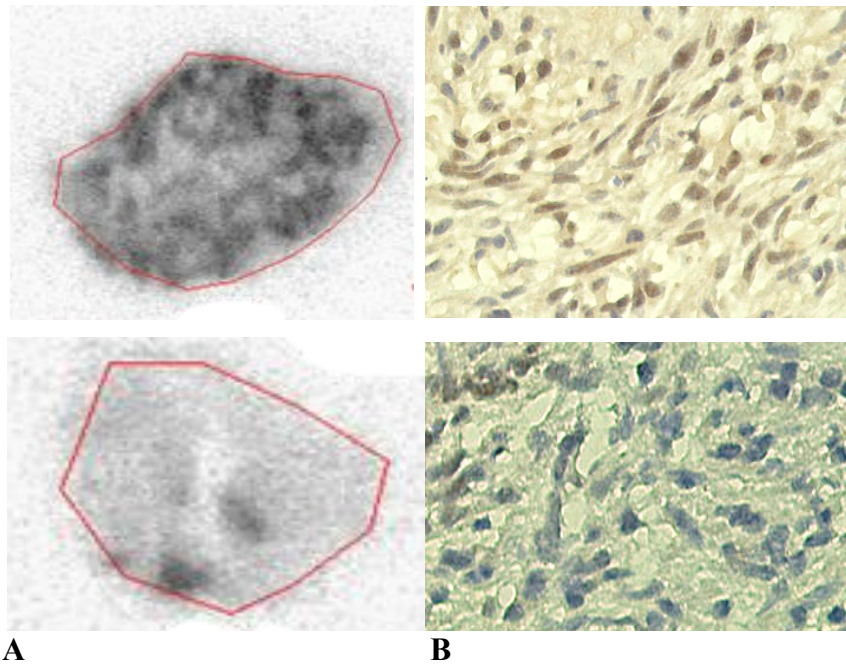


Abb. 27: $[^{18}\text{F}]$ FAZA-Audiographie (A) und immunhistochemische HIF-1 α -Färbung (braune Kernfärbung) (B) (in 100facher Vergrößerung, Okular x Objektiv) an einem hypoxischen (obere Reihe) und normoxischen EMT6-Tumor (untere Reihe).

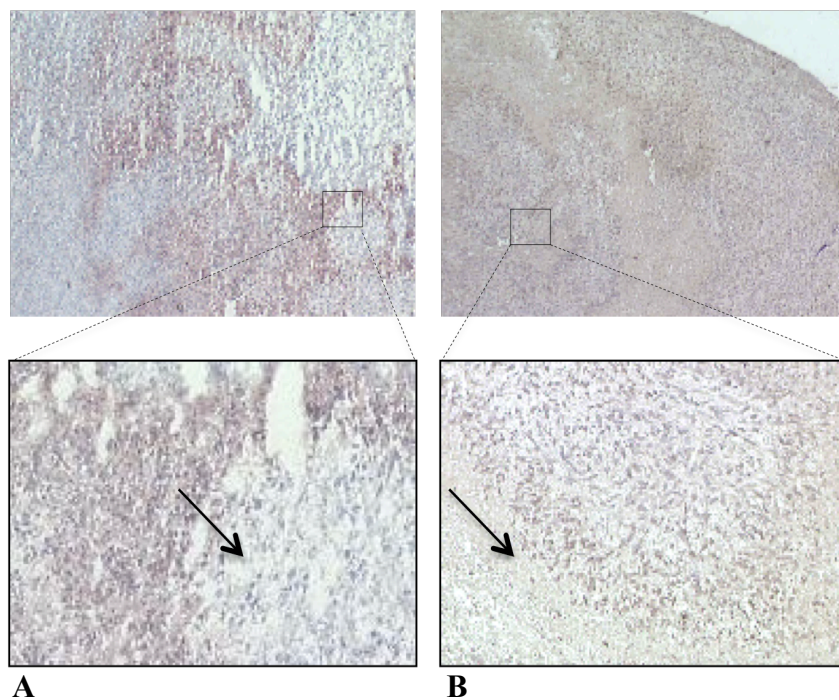


Abb. 28: Pimonidazol- (A) und HIF-1 α - (B) Färbung an zwei EMT6-Tumoren (in 20facher bzw. 10facher (obere Reihe) bzw. 40facher (untere Reihe) Vergrößerung, Okular x Objektiv): Die rote Pimonidazol-Plasmafärbung wie auch die braune HIF-1 α -Kernfärbung fand sich vornehmlich in den hypoxischen Zellen, die an Nekrosezonen (Pfeile) angrenzten.

5. Diskussion

5.1 [¹⁸F]FAZA-Studien

5.1.1 Distributionsstudie mittels γ -Counter

Da bereits 2005 umfangreiche Biodistributionsstudien zur [¹⁸F]FAZA-Verteilung im EMT6-Nacktmausmodell durchgeführt wurden (Piert et al, 2005), sollten in der vorliegenden Studie diese Werte exemplarisch an sechs Tieren verifiziert werden. Die daraus erlangten Messwerte können und wollen keinen Anspruch auf statistische Betrachtung erheben.

Die auffallend hohe Aktivität 5 min p.i. in Herz und Lunge reflektiert die gute Perfusion dieser Organe. Erwartungsgemäß ließ sich in den an der hepatobiliären und renalen Ausscheidung beteiligten Organen zu späteren Messzeitpunkten eine höhere Aktivität nachweisen. Urin konnte nur in minimalen Mengen (1,6 – 10,7 mg; Median 4,2 mg) asserviert werden, was sich durch den Verlust durch die präterminale unwillkürliche Blasenentleerung erklärt.

Die Zuverlässigkeit von [¹⁸F]FAZA als Hypoxietracer und der intertumoral unterschiedliche Oxygenierungsstatus konnte gut in der unterschiedlichen Tracer-Anreicherung in den zwei Tumoren zum Messzeitpunkt 120 min p.i. gezeigt werden: Mit einem T/B-Verhältnis von 0,99 fand sich im ersten, normoxischen Tumor ebenso wenig [¹⁸F]FAZA wie im Hintergrundgewebe, während im zweiten, hypoxischen Tumor des Messpunktes 120 min p.i. [¹⁸F]FAZA deutlich mehr akkumulierte als im entsprechenden Hintergrundgewebe. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass eine makroskopische Gewebeanreicherung wie in einer Distributionsstudie mit γ -Counter gemessen, nicht per se als Maß für die Zuverlässigkeit und Spezifität eines Hypoxietracers verwendet werden kann: Eine hohe Traceranreicherung kann auch auf andere Retentionsmechanismen als hypoxieinduzierte Reduktion zurückzuführen sein (Busk et al., 2008 a). O'Donoghue et al. (2005) fanden beispielsweise für den von ihnen untersuchten Hypoxietracer Cu-ATSM an Ratten mit Prostatakarzinom die Traceranreicherung korrelierend mit Tumortyp und Perfusion und damit von der Tracer-Verfügbarkeit im Gewebe, und nicht abhängig vom tumoralen Oxygenierungsstatus. Die Ergebnisse der vorliegenden Biodistributionsstudie können daher zusätzlich zu der kleinen Fallzahl nur in Synopsis mit anderen Nachweisverfahren gewertet werden.

5.1.2 PET-Messungen

Mit der PET steht ein ausreichend auflösendes Bildgebungsverfahren zur Verfügung, anhand dessen durch nicht-invasive Tumorcharakterisierung Therapiestrategien sowohl geplant als auch ihre Wirksamkeit über den Therapieverlauf überwacht werden können.

Methodik: Die für die PET-Aufnahmen injizierte [¹⁸F]FAZA-Aktivitätsmenge von 13 MBq wurde in früheren Versuchen als optimal für Aufnahmen 3 h p.i. evaluiert: In diesem Zeitraum nimmt das T/B-Verhältnis im normoxischen Gewebe deutlich ab, während im hypoxischen Gewebe der Quotient kontinuierlich steigt (Piert et al., 2005). Im dreistündigen Intervall zwischen Ätherkurznarkose zur [¹⁸F]FAZA-Injektion und Ketamin-Narkose zum

PET-Scan waren die Tiere wach und atmeten Raumluft. Dadurch konnte zum einen ein potentieller narkosebedingter Abfall des O₂-Partialdrucks im Normalgewebe und damit eine Verfälschung der [¹⁸F]FAZA-Distribution mit einer konsekutiven Reduktion des T/B-Quotienten vermieden werden. Zum anderen hatten Piert et al. (2005) in vorhergehenden Versuchen bei Raumluftatmung ein signifikant höheres T/B-Verhältnis gefunden im Vergleich z.B. zu Carbogen-Atmung (T/B 7,3 (± 2,3) vs. 4,2 (± 1,2); p < 0,001).

PET-Datenauswertung: Das Optimum der Datenauswertung stellt eine absolute Quantifikation der Traceraufnahme im Tumorgewebe dar. Da aufgrund der fehlenden Streuungs- und Schwächungskorrektur des MOSAIC™ Kleintier-PET eine absolute quantitative Auswertung nicht möglich ist, wurde die tumorale [¹⁸F]FAZA-Aufnahme semiquantitativ anhand des T/B-Verhältnisses analysiert. Die Vorteile dieser Methode liegen in dem geringeren Einfluss interindividueller Unterschiede des renalen und hepatobiliären [¹⁸F]FAZA-Metabolismus auf das T/B-Verhältnis sowie der Unabhängigkeit des T/B-Verhältnisses von Menge und evtl. unterschiedlicher spezifischer Aktivität des injizierten [¹⁸F]FAZA, hervorgerufen z.B. durch Parainjektion oder zeitlicher Verzögerung der Injektion. In vorangehenden [¹⁸F]FAZA-Versuchen hatte sich diese semiquantitative Datenauswertung anhand des T/B-Verhältnis gut bewährt, vorausgesetzt, die Tiere waren im dreistündigen Intervall zwischen [¹⁸F]FAZA-Injektion und PET wach und konnten sich frei bewegen (Piert et al., 2005).

Nachteile des T/B-Verhältnisses wie die Störanfälligkeit gegenüber einer passageren Änderung der Atemluftzusammensetzung oder Narkotisierung müssen in der Versuchsplanung bedacht werden. Durch die Auswertung mittels isocontour-ROI wird eine [¹⁸F]FAZA-Akkumulation unterhalb eines definierten Schwellenwerts nicht als tumorale hypoxiebedingte Traceraufnahme beurteilt. Dadurch können Tumoren, die nur wenig mehr [¹⁸F]FAZA anreichern als das Hintergrundgewebe und vermutlich ebenfalls eine – wenn auch nur geringe – Gewebhypoxie aufweisen, einer korrekten Bewertung entgehen.

Das T/B-Verhältnis ist abhängig von der in der ROI gemessenen [¹⁸F]FAZA-Anreicherung, die sowohl aus der Anzahl der vitalen traceraufnehmenden Zellen als auch aus der Anreicherung der jeweiligen Zelle resultiert. Mit [¹⁸F]FAZA als erwiesenem hypoxiespezifischem PET-Tracer konnte davon ausgegangen werden, dass ein Tumor mit einer großen hypoxischen Fraktion auch durch ein hohes T/B-Verhältnis charakterisiert wird. Ein genauere Zusammenhang zwischen hypoxischer Fraktion und dem T/B-Verhältnis kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden.

Da reines Muskelgewebe als Hintergrund in den PET-Schichtbildern nicht sicher und homogen abzugrenzen war, wurde als Referenzgewebe der Thoraxbereich herangezogen. Die physiologisch besonders gute Oxygenierung des den Großteil des Thoraxinhaltes ausmachenden Lungengewebes und die daraus resultierende niedrige [¹⁸F]FAZA-Anreicherung könnte theoretisch zu einem verbesserten Kontrast (T/B-Verhältnis) beigetragen haben. Potentielle Lungenfrühmetastasen, die zu einer pathologischen Mehranreicherung des Tracers im Lungengewebe geführt haben könnten, lassen sich aufgrund der dazu zu geringen räumlichen Auflösung des MOSAIC™ Kleintier-PET von 25 µl weder beweisen noch ausschließen (Huisman et al., 2007).

Die PET-Daten wurden nicht hinsichtlich des Partialvolumeneffekts (PVE) korrigiert. Der PVE ist ein Artefakt, der aufgrund der relativ niedrigen Auflösung der PET zu einer quantitativen Unter- oder Überschätzung der tatsächlichen lokalen Radioaktivität führen kann. Dem PVE liegt zum einen der so genannte „Tissue fraction“-Effekt zugrunde, bei dem in einem Voxel die Radioaktivität mehrerer übereinanderliegender, ggf. in der Traceraufnahme heterogener Gewebe, gemessen werden (Mazziotta et al., 1981, Kessler et al, 1984; Aston et al., 2002; Soret et al., 2007); zum anderen führt die begrenzte Auflösung zum „Point-spread“-Effekt. Dabei kommt es insbesondere bei kleinen, dünnen, unregelmäßig begrenzten

Messvolumina mit einer hohen Konzentration aufgenommener Radioaktivität in einer wenig oder nicht anreichernden Umgebung zu einer Signalstreuung auf die angrenzenden Pixel. Der gemessene Maximalwert im Tumor ist dann geringer als der tatsächliche Maximalwert. Auf dem rekonstruierten Bild wirkt daher ein kleiner Tumor größer, aber schwächer anreichernd als er eigentlich ist. Der PVE tritt typischerweise bei gemessenen Aktivitätsvolumina auf, die kleiner sind als das sensitive Volumen des Scanners. Damit entstand für die ersten Messungen wahrscheinlich ein PVE. Da jedoch Tiergruppen mit jeweils ähnlichen Tumorgößen verglichen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der PVE keinen wesentlichen Einfluss auf die beobachteten Unterschiede in der [¹⁸F]FAZA-Aufnahme zwischen den Gruppen hatte. Da die Tumorumina über einen Wachstumszeitraum zwischen 70 µl und 500 µl kontinuierlich beobachtet und vermessen worden sind, ist eine einheitliche Auswertungsmethodik für alle Tumorgößen sinnvoll. Zudem ist besonders bei sehr kleinen Messvolumina mit einer erwartungsgemäß inhomogenen intratumorale Traceranreicherung aufgrund der fehlenden zusätzlichen strukturellen Information des Tumors (CT, MRT) eine tatsächlich geringe Radioaktivitätskonzentration von einem PVE nicht adäquat zu unterscheiden. Durch die Korrektur des PVE könnten kleine Tumoren mit tatsächlich wenig Radioaktivitätsanreicherung falsch positiv als hypoxisch gewertet werden.

Ein Ansatz zur absoluten Quantifizierung der Tumorphypoxie stellt die Auswertung der in der dynamischen PET gemessenen Tracerverteilung mit Hilfe eines 2- oder 3-Kompartiment-Modells dar (Lethiö et al., 2003; Bruhlmeier et al., 2004; Thorwarth et al., 2005 a). Hierbei muss jedoch auch die lokal-strukturelle Verteilung der Gewebhypoxie und die tumortypspezifische Heterogenität in der Tracerverteilungskinetik in Betracht gezogen werden, um die tumoralen Pathomorphologie und Pathophysiologie realistisch und valide abzubilden (Busk et al., 2010).

Besonderes zur Planung und Durchführung einer intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) ist neben der biologisch-funktionellen Visualisierung des Tumors in der PET eine korrelierende anatomisch-morphologische Darstellung zur exakten Beurteilung und Lokalisierung der Hypoxieverteilung notwendig. Dazu würde sich neben FDG-PET- und CT-Aufnahmen insbesondere das kombinierte PET/CT eignen. Das PET/CT bietet die Möglichkeit, gleichzeitig das exakte anatomische Tumorumina zu messen und durch pixel-by-pixel-Analyse im Vergleich mit der PET-Darstellung hochsensitiv hypoxische Areale zu identifizieren. Diese Analyse ist der semiquantitativen Auswertung über den T/B-Quotienten an Genauigkeit überlegen.

Die tumorale Strahlendosis bei einem Kleintier-CT-Scan wurde je nach Aufnahmeprotokoll zwischen 17 – 112 mGy angegeben (Carlson et al., 2007), wobei eine Ganzkörperdosis von 6 Gy als tödlich für eine Maus angesehen wird (Ritman, 2004). Von einer den Therapieeffekt möglicherweise verzerrenden Wirkung der wiederholten ionisierenden Röntgenstrahlung auf Tumorumwachstum und Überleben der Mäuse in seriellen CT-Scans ist aufgrund der niedrigen Strahlendosen nicht auszugehen (Cavanaugh et al., 2004), wird aber kontrovers diskutiert (Paulus et al., 2000; Ford et al., 2003; Taschereau et al., 2006).

Aufgrund der limitierten Auflösung der Weichteilkontraste im CT und der zusätzlichen Strahlenbelastung durch die Röntgenstrahlung bei Therapieplanung und -monitoring wäre die Kombination aus PET und MRT das Optimum der biologisch-funktionellen und gleichzeitig anatomisch-morphologische Bildgebung in einem. Im November 2010 startete am Klinikum rechts der Isar München der klinische Anwendungstest für den ersten PET/MRT-Hybrid-Ganzkörperscanner.

Prinzipiell muss bei der Auswertung und Interpretation von PET-Daten jedoch berücksichtigt werden, dass ein PET-Scan mit einem Hypoxietracer nur eine Momentaufnahme der Gewebeoxygenierung liefert. Die Oxygenierung eines Tumors ist aber nicht konstant,

vielmehr ist die tumorale Sauerstoffversorgung ein dynamischer Prozess, in dessen Verlauf die Zellen Phasen von intermittierender Hypoxie und (Re-)Oxygenierung unterliegen (Brown, 1979 und 1990; Chaplin et al., 1986). Dieser Form der akuten Hypoxie durch passagere Gefäßverschlüsse kann die Momentaufnahme der PET nicht Rechnung tragen. Durch die relativ lange Distributionszeit von 3 h wurde aber in der vorliegenden Studie versucht, diesem Problem zu begegnen.

Reproduzierbarkeit: Die seriellen [^{18}F]-FAZA-PET-Scans binnen 72 h zeigten eine signifikant positive Korrelation zwischen den jeweiligen T/B-Werten der beiden Messungen. Dies belegte die Reproduzierbarkeit und Stabilität der T/B-Verhältnisse innerhalb der kurzen Zeitspanne von drei Tagen. Die relative Stabilität des T/B-Verhältnisses über den beschriebenen Zeitraum legte nahe, dass die diffusionsabhängige chronische Hypoxie einen gewichtigeren Stellenwert für den Oxygenierungsstatus der EMT6-Tumoren einnimmt als die perfusionsabhängige akute Hypoxie. Zudem erwies sich das T/B-Verhältnis als eine zuverlässige, stabile und wenig störanfällige Messgröße gegenüber endogenen und exogenen Einflüssen wie Perfusionsalterationen oder der Narkosetiefe mit konsekutiven Veränderungen der regionalen O_2 -Verfügbarkeit. Lediglich die beschriebene geringfügige Tendenz zu höheren T/B-Quotienten an Tag 3 könnte auf das relativ schnelle Wachstum der EMT6-Tumoren zurückzuführen sein.

Die untersuchten 12 Tumoren waren relativ homogen aus dem normoxischen ($n = 5$) und hypoxischen ($n = 7$) Kollektiv sowie aus den Therapiegruppen (Ko $n = 2$, CT $n = 2$, RT $n = 3$, RCT $n = 5$) zusammengesetzt. Ein Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Kollektiv oder einer Gruppe und dem T/B-Verhältnis konnte nicht gesehen werden. Trotzdem kann eine Therapie das T/B-Verhältnis auch innerhalb eines relativ kleinen Zeitrahmens von 72 h beeinflussen. Aufgrund dessen wurden weitere 8 unbehandelte Tiere mit insgesamt 12 EMT6-Tumoren mit Volumina zwischen $47 \mu\text{l}$ und $343 \mu\text{l}$ zweimal binnen 24 h einer [^{18}F]-FAZA-PET-Messung unterzogen. Diese Messsequenz an unbehandelten Tumoren verifiziert durch eine ebenfalls signifikante lineare Korrelation der beiden Messungen mit einer linearen Regression $y = 1,03 (\pm 0,19) x + 0,32 (\pm 0,61)$ und einem Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,72$ die Reproduzierbarkeit des [^{18}F]-FAZA-T/B-Verhältnisses.

Kollektiv- und Gruppeneinteilung: Die Einteilung der Tumoren in ein normoxisches und hypoxisches Kollektiv erfolgte durch [^{18}F]-FAZA-PET-Scans vor Therapiebeginn. Bei den 67 in die Studie aufgenommenen Tieren variierte in diesen initialen PET-Aufnahmen das T/B-Verhältnis im Bereich von 1,0 bis 3,17 (Median 1,97). Aus der Biokinetik der Nitroimidazole geht hervor, dass – genau genommen – alle [^{18}F]-FAZA-anreichernden Tumoren mit einem T/B-Verhältnis > 1 hypoxische Zellen haben. Einzelnen hypoxischen Tumorzellen wird jedoch noch kein erhöhtes malignes Potential zugemessen bzw. kann ihr Therapieansprechen durch die Applikation hypoxieselektiver Therapiestrategien nicht verbessert werden. Ein allgemeingültiger Schwellenwert, ab dem ein Tumor mit einem bestimmten Anteil hypoxischer Zellen als *hypoxisch* definiert wird und der ein Ansprechen auf hypoxieselektive Therapiestrategien vorhersagt, ist noch nicht gefunden. Dieser Schwellenwert muss bisher für jede Tumorart und jeden Hypoxietracer neu definiert werden und wurde in der vorliegenden Studie für EMT6-Tumoren und den untersuchten Hypoxietracer [^{18}F]-FAZA empirisch beim T/B-Median von 1,97 festgelegt. Dabei ist zu beachten, dass in dem für die Einteilung relevanten prätherapeutischen PET-Scan kurzfristige perfusionsbedingte Alterationen der Oxygenierung im Verlauf der Tracerdistribution im Organismus nicht berücksichtigt werden (s.o.). Dadurch wird im vorliegenden Studienmodell die Detektion der Gewebhypoxie auf die der chronischen, diffusionsbedingten Hypoxie reduziert. Eine *quantitative* Aussage über den Grad der Gewebeoxygenierung lässt sich aus dem Median ebenso wenig ableiten wie die

genaue räumliche Verteilung der Hypoxie im Tumor, die sich sehr inhomogen darstellen kann, wie die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Studie belegen.

Nur bei 67 Mäusen von initial 87 erfüllten Tier und Tumor die Voraussetzungen, um in die definitive Auswertung der Messergebnisse einbezogen zu werden. Da diese Anzahl auf insgesamt 8 Therapiegruppen (jeweils vier für das normoxische und hypoxische Kollektiv) aufgeteilt wurde, ergaben sich relativ kleine Gruppengrößen von sieben bis maximal zehn Tieren pro Gruppe. Für die Zuverlässigkeit statistischer Auswertungen wären noch größere Gruppen sowie häufigere [^{18}F]FAZA-PET-Messungen wünschenswert gewesen. Dem standen zeitliche und personelle Limite und in erster Linie die begrenzte Verfügbarkeit von [^{18}F]FAZA entgegen.

Einfluss der Therapie auf die Tumoroxygenierung: Im Vergleich der Tumoroxygenierung unter Einfluss der verschiedenen Therapieregime wie auch der Kontrollgruppe fällt auf, dass alle Tumoren - unabhängig von der initialen Klassifizierung als normoxisch oder hypoxisch - im post(schein)therapeutischen PET eine höhere [^{18}F]FAZA-Aufnahme und damit eine schlechtere Gewebeoxygenierung aufweisen als vor Therapiebeginn. EMT6-Tumoren sind bekannt für ein aggressives, schnelles Wachstum mit einer starken Tendenz zur Ausbildung von hypoxischen Gewebearealen und Nekrosen.

Bei den ***nicht therapierten Tumoren*** sowohl des normoxischen als auch des hypoxischen Kollektivs konnten sich die hypoxischen Tumorzellen ungehindert vermehren, was bei den normoxischen Kontrolltumoren zu einer Verdopplung der [^{18}F]FAZA-Aufnahme nach Scheintherapie führte (196 %). In der hypoxischen Kontrollgruppe zeigte sich im Vergleich dazu nach Scheintherapie nur eine verhältnismäßig geringe [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung (118 %); das T/B-Verhältnis hypoxischer und normoxischer Kontrolltumoren (nach der Scheintherapie) unterschied sich jedoch nicht signifikant ($p = 0,515$).

Eine geringeres Größenwachstum wäre eine mögliche Erklärung für eine im Verhältnis geringere [^{18}F]FAZA-Aufnahme der hypoxischen Kontrolltumoren; hypoxische und normoxische Kontrolltumoren zeigten jedoch annähernd gleiche Durchschnittsvolumina (245 μl hypoxische vs. 243 μl normoxische Tumoren). Die niedrigen Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,23 bzw. 0,61 (normoxisches bzw. hypoxisches Kollektiv) widerlegen einen linearen Zusammenhang zwischen tumoraler [^{18}F]FAZA-Aufnahme und sonographischem Tumolvolumen.

Einen weiteren Grund für die verhältnismäßig geringere [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung hypoxischer im Vergleich zu normoxischen Tumoren stellt das schnelle Tumorwachstum dar: Die Gefäßversorgung kann dem schnellen Wachstum nicht Schritt halten, die Gewebepfusion und damit die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen verschlechtert sich. Mit zunehmendem Diffusionsabstand zum versorgenden Gefäß werden die Tumorzellen hypoxisch bzw. nekrotisch. Da sich [^{18}F]FAZA jedoch nur in vitalen Zellen anreichern kann, sinkt bei zunehmendem Anteil nekrotischen Tumorgewebes die [^{18}F]FAZA-Akkumulation. Eine tumorale Neoangiogenese mit dem Ziel der Verbesserung der Gewebepfusion wäre möglich, für einen in der [^{18}F]FAZA-PET messbaren Effekt auf die Gewebeoxygenierung ist jedoch der Beobachtungszeitraum von wenigen Tagen zu kurz.

Bei den ***chemotherapierten Tumoren*** fand sich posttherapeutisch verglichen mit prätherapeutisch sowohl im normoxischen als auch im hypoxischen Kollektiv jeweils eine signifikante [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung (197 % bzw. 154 %; jeweils $p < 0,001$). Da TPZ selektiv an hypoxischen Tumorzellen zelltoxisch wirkt und damit an normoxischen Tumoren ineffektiv bleibt, zeigte die CT-Gruppe auch hinsichtlich des posttherapeutischen tumoralen Oxygenierungsstatus keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (197 % bzw. 196 %, $p = 0,536$). Das im Vergleich zu den normoxischen Tumoren geringere posttherapeutische T/B-Verhältnis der hypoxischen Tumoren der CT-Gruppe kann zum einen auf die

hypoxieselektive zelltoxische Wirkung von TPZ zurückgeführt werden, zum anderen ist davon auszugehen, dass hypoxische Gewebeanteile anoxisch wurden und nekrotisierten und somit kein [^{18}F]FAZA mehr anreicherten.

Auch die **bestrahlten Tumoren** zeigten nach Therapie eine schlechtere Gewebeoxygenierung als prätherapeutisch. Während die normoxischen Tumoren nach Radiotherapie im Vergleich zu prätherapeutisch eine signifikante [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung verzeichneten, fand sich bei den hypoxischen Tumoren posttherapeutisch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,209$). Dies könnte neben der oben beschriebenen Nekrotisierungsneigung hypoxischer Tumoren mit konsekutiv geringerer [^{18}F]FAZA-Anreicherung auch auf die Reoxygenierung zurückzuführen sein: Ionisierende Strahlung tötet aufgrund der 2–3fach höheren Strahlensensibilität vornehmlich die normoxischen Zellen eines Tumors ab. Direkt posttherapeutisch ist der Tumor daher weitgehend hypoxisch. In der Reoxygenierung werden einerseits konstringierte Gefäße reperfundiert und versorgen Tumorzellen, die in akuter Hypoxie waren (schnelle Komponente der Reoxygenierung), andererseits schrumpft durch den Zelltod normoxischer Zellen der Tumor, die relative Gefäßdichte im Tumor nimmt zu und der Sauerstoffgradient vom versorgendem Blutgefäß zu den hypoxischen Zellen nimmt ab (langsame Komponente der Reoxygenierung) (Sauer, 2001 b). So stellt die Reoxygenierung das prätherapeutische Verhältnis zwischen normoxischen und hypoxischen Tumorzellen wieder her, was in der fraktionierten Strahlentherapie genutzt wird.

Desweiteren könnte möglicherweise auch ein radiosensibilisierender Effekt von [^{18}F]FAZA – ähnlich den bekannten Azomycin-basierten Nitroimidazolen Misonidazol und Metronidazol (Chapman et al., 1990, 1998; Dische et al., 1982; Urtasun et al., 1976; Sauer, 2001 b) – als Grund einer relativ geringeren [^{18}F]FAZA-Aufnahme überlegt werden: [^{18}F]FAZA als Radiosensitizer könnte den zytotoxischen Effekt der Bestrahlung auf hypoxische Tumorzellen verbessern und damit den Anteil hypoxischer Zellen bzw. der [^{18}F]FAZA-Aufnahme verringern.

In der **kombinierten Radiochemotherapie** wurde für die Chemotherapie mit TPZ u.a. bei EMT6-Zellen sowohl bei einzelner als auch bei fraktionierter Applikation ein radiosensibilisierender Effekt nachgewiesen (Zeman et al., 1986, 1988, 1989, 1990; Brown und Lemmon, 1990; Brown, 1993; Siim et al., 1997). Zur Evaluation des Erfolges der Kombination zweier oder mehrerer Behandlungsverfahren werden die jeweiligen Einzeleffekte zum so genannten additiven Effekt zusammengezählt. Dieser additive Effekt gilt als Referenzgröße: Erzielt die Kombination der Therapeutika ein besseres Ergebnis als den additiven Effekt, geht man von einem superadditiven oder synergistischen Effekt der betreffenden Therapiearten aus. Verläuft zusätzlich zum superadditiven Effekt die Dosis-Effekt-Kurve steiler als die reine Parallelverschiebung durch Überaddition, spricht man von einer Radiosensibilisierung.

Erwartungsgemäß zeigten die normoxischen Tumoren posttherapeutisch eine signifikant geringere [^{18}F]FAZA-Aufnahme im Vergleich zur Kontroll- und zur CT-Gruppe ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,021$). Verglichen mit der RT fand sich bei der RCT ebenfalls eine – wenn auch nicht signifikant ($p = 0,633$) – niedrigere [^{18}F]FAZA-Aufnahme. Dies könnte Hinweis auf eine doppelte Radiosensibilisierung durch [^{18}F]FAZA und TPZ sein.

Bei den hypoxischen Tumoren ließ sich jedoch ein radiosensibilisierender Effekt durch [^{18}F]FAZA und TPZ beim Vergleich der RCT-Gruppe mit den beiden Monotherapiegruppen (CT, RT) kein signifikant niedrigerer posttherapeutischer T/B-Quotient und damit keine erfolgreichere Elimination hypoxischer Tumorzellen nachweisen. Gegenüber den nur chemotherapierten Tumoren fand sich zwar nach RCT eine geringere [^{18}F]FAZA-Aufnahme, was den radiosensibilisierenden Effekt von TPZ in hypoxischen Zellen untermauern würde. Zwischen alleiniger RT und RCT ließ sich kein Unterschied feststellen, was gegen einen

wesentlichen radiosensibilisierenden Effekt von [^{18}F]FAZA spräche. Um zu klären, ob und inwieweit [^{18}F]FAZA tatsächlich eine Rolle als Radiosensitizer zukommt und die hohe Effizienz der RCT bei den hypoxischen Tumoren nicht nur auf einen synergistischen Effekt von Radiatio und TPZ, sondern zusätzlich auch auf einer Radiosensibilisierung durch das ebenfalls hypoxiespezifische [^{18}F]FAZA beruhte, wären weitere Vergleichstherapien ohne [^{18}F]FAZA-Anwendungen in weiterführenden Studien notwendig.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Beobachtungszeitraum zwischen prä- und posttherapeutischem [^{18}F]FAZA PET-Scan von durchschnittlich 9,6 Tagen (SD \pm 3,5) verhältnismäßig kurz war bzw. in seiner Länge stark variierte: So war das kürzeste Zeitintervall nur 5, das längste 16 Tage. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von [^{18}F]FAZA bei Tracersynthese außer Haus konnten die PET-Termine jedoch nicht günstiger disponiert werden. Eine dreimalige Messung – vor, während und nach Therapie – würde genauere Einblicke in das Oxygenierungsverhalten unter Therapie liefern. Dies konnte jedoch nur bei 2 – 3 Tumoren der jeweiligen Therapiegruppe bewerkstelligt werden. Ein Vergleich bei so kleiner Vergleichsgruppengröße ist nicht aussagekräftig.

Bei den Ergebnissen sowohl der Strahlen- als auch der Chemotherapie gilt, dass sie auf einer vor Versuchsbeginn festgelegten Dosierung beruhen. Andere Dosierungen erzielen möglicherweise andere Therapieeffekte.

5.2 Tumorwachstum

5.2.1 Volumenentwicklung und Beurteilung der Tumorbinnenstruktur

Die Ultraschallmessungen wurden stets nur von *einem* erfahrenen Untersucher (Frau Dr. med. Barbara Röper, Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Klinikum München rechts der Isar) vorgenommen. Das bedeutete zwar einen großen zeitlichen Aufwand für den Untersucher. Nur so konnten jedoch interindividuelle Messunterschiede vermieden werden. Intraindividuelle Messdifferenzen können generell nicht gänzlich eliminiert werden. Es ist aber davon auszugehen, dass diese in dieser Studie aufgrund der Vielzahl der Messungen nivelliert wurden.

Ein wichtiger Aspekt in der Beurteilung der Studienergebnisse ist die Abhängigkeit der Tumorphoxie von der Tumorgöße. Je schneller die Volumenzunahme, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass mehr Tumorzellen von Blutgefäßen weiter als die O_2 -Diffusionsdistanz entfernt liegen und hypoxisch werden. Die tumorale Neoangiogenese wird erst durch Hypoxie induziert (über die Expression von VEGF, $\alpha_v\beta_3$ etc.) und beginnt daher mit Verzögerung zur Größenzunahme.

Kann der Sauerstoffbedarf der hypoxischen Tumorzellen durch die Neoangiogenese nicht adäquat gedeckt werden, d.h. der Tumor wächst „zu schnell“ für die Blut- und Sauerstoffversorgung, sterben die Zellen ab. Daher finden sich hypoxische Areale besonders in Nachbarschaft zu Nekrosezonen (Picchio et al., 2008). Im zeitlichen Verlauf des tumoralen Größenwachstums findet sich also eine kontinuierliche Umwandlung von hypoxischen über anoxischen zu nekrotischen Tumoranteilen. Dabei muss bedacht werden, dass [^{18}F]FAZA nur in vitalen Zellen anreichert und damit die Nekrosebildung die [^{18}F]FAZA-Aufnahme sehr stark beeinflusst: Ein Tumor, der zum Messzeitpunkt X eine starke Anreicherung zeigte und als hypoxisch klassifiziert wurde, konnte beim nächsten Messzeitpunkt Y ein verhältnismäßig kleines T/B-Verhältnis aufweisen. Diesem Effekt kann sowohl eine Gewebe-Reoxygenierung durch Reperfusion von Gefäßen bzw. durch effiziente tumorale Neoangiogenese oder eben die Nekrotisierung vorher hypoxischer Areale zugrunde liegen. Dieser Gesichtspunkt unterstreicht die Notwendigkeit der Ultraschalluntersuchungen nicht nur zur Volumenbestimmung, sondern auch zur Beurteilung der Tumorbinnenstruktur auf potentielle echoarme Nekroseareale als Ursache für Alterationen des T/B-Verhältnisses während des

Beobachtungszeitraumes. Ab einer bestimmten Tumorgröße sind intratumorale Nekrosen somit nicht zu vermeiden, weshalb das Endvolumen im Studiendesign sehr sorgfältig ausgewählt wurde. Zum Zeitpunkt des festgelegten Endpunktes von 500 μ l wiesen nahezu alle Tumoren kleine zentrale Nekrosen auf, in der Wachstumsphase zwischen 280 μ l und 500 μ l waren es bereits ca. 90 % der Tumoren. Dabei machte jedoch das vitale Tumorgewebe bei fast allen Tumoren den Großteil des gemessenen Volumens aus.

Aufgrund der Abhängigkeit der hypoxischen Fraktion von der Tumorgröße war es wichtig, die Tumoren hinsichtlich der Größe gleichmäßig auf die einzelnen Therapiegruppen zu verteilen. Die Varianzanalyse auf Homogenität der Therapiegruppen (ANOVA) und der Kruskal-Wallis-Test ergaben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der sonographisch bestimmten Therapieeingangsvolumina zwischen den Therapiegruppen.

5.2.2 Wachstumsverhalten unter Therapie

Es muss berücksichtigt werden, dass die Klassifizierung der Tumoren in normoxisch und hypoxisch von uns experimentell anhand des T/B-Medians der initialen prätherapeutischen [18 F]FAZA-PET-Aufnahmen festgesetzt wurde. Ob dieser Wert als Schwellenwert zur Unterteilung zwischen normoxischen und hypoxischen Tumoren gerechtfertigt ist, muss noch durch weitere Studien an anderen Tumorarten und vor allem auch an Tumoren des Menschen verifiziert werden.

Vergleich des Tumorwachstums im normoxischen versus hypoxischen Kollektiv: Das signifikant schnellere Erreichen des Endvolumens der *nicht-therapierten* hypoxischen Tumoren im Vergleich zu den normoxischen belegt die gesteigerte Aggressivität hypoxischer Tumoren. Ausserdem lässt sich davon ableiten, dass – zumindest in der vorliegenden Studie – der Median der prätherapeutischen [18 F]FAZA-Aufnahme als gewählte Schwelle tatsächlich hypoxische, aggressiv wachsende Tumoren von normoxischen, weniger schnell wachsenden Tumoren abgrenzen kann. Von einer erhöhten [18 F]FAZA-Aufnahme könnte daher auf eine ungünstige Prognose geschlossen werden. Für andere PET-Hypoxietracer wie [18 F]FMISO und Cu-ATSM wurde bereits an humanen Lungen-, Zervix- und Kopf-Hals-Tumoren die prognostische Bedeutung der tumoralen Traceranreicherung für das Therapieergebnis beschrieben (Dehdashti et al., 2003; Eschmann et al., 2005; Rischin et al., 2006).

Überraschend zeigte **TPZ** trotz seiner Eigenschaft als hypoxieselektives Chemotherapeutikum keinen signifikant besseren Effekt auf hypoxische Tumoren gegenüber den normoxischen Vergleichstumoren. Eine mögliche Erklärung könnte in der tendenziell niedrigen Dosierung (17 % der LD₅₀) gesucht werden: In der vorliegenden Arbeit wurde TPZ in einer Dosis von 14,2 mg/kgKG zweimal täglich über 4 Tage verabreicht. Brown (2002) stellte unter dieser Dosierung von TPZ an SCCVII-, RIF-1- und KHT-Tumoren eine deutliche Wachstumsverzögerung fest. Walton und Workman (1993) hingegen verwendeten in ihrer Pharmakokinetikstudie Einzeldosierungen von 18 – 54 mg/kgKG; diese wurden gut toleriert und zeigten eine den *in vitro*-Versuchen vergleichbare Toxizität (Graham et al., 1997 a). Papadopoulou et al. (2002) applizierten mehrere Dosen von 23 – 30 mg/kgKG (entsprechend 28 – 38 % der LD₅₀).

Die **Radiotherapie** wurde nach einem fraktionierten Schema von 8 Bestrahlungseinheiten à 4,5 Gy durchgeführt. Dieses Bestrahlungsprotokoll imitierte eine palliative Radiotherapie. Erwartungsgemäß ließ sich durch die höhere Strahlensensitivität oxygenierter Zellen ein – wenn auch nur geringer – Vorteil der normoxischen gegenüber den hypoxischen Tumoren der RT-Gruppe feststellen. Der im Vergleich zum hypoxischen Kollektiv nur mäßige Vorteil des normoxischen Kollektivs (kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden

Kollektiven) ließe sich jedoch auch allein durch die gesteigerte Aggressivität hypoxischer Tumoren erklären, die sich in der Größenverdopplungszeit T_d zwischen 200 – 400 μl von nur 4 Tagen für hypoxische, verglichen mit 6 Tagen für normoxische Tumoren dieser Therapiegruppe widerspiegelt.

Zudem könnte die gewählte Strahlendosis aufgrund der großen hypoxischen Fraktion der EMT6-Tumoren und der damit verbundenen Strahlenresistenz für diese Tumorart für einen deutlicheren Therapieeffekt zu niedrig gewesen sein. Greer et al. (1995) konnten sogar für eine Gesamtdosis von 60 Gy (appliziert in 15 Einzelbestrahlungen à 4 Gy) an EMT6-tragenden BALB/c-Mäusen keinen sicheren therapeutischen Effekt bei Tumoren der Größe 300 – 400 μl beobachten. Die im Vergleich dazu geringe Gesamtdosis von 36 Gy wurde in der vorliegenden Studie aufgrund der relativ kleinen Tumorgröße von 70 μl zu Therapiebeginn gewählt. Zudem wurde für die RCT ein zusätzlicher Effekt durch TPZ einkalkuliert.

Die **kombinierte Radiochemotherapie** wurde angelehnt an das Therapieprotokoll von Brown und Lemmon (1990) durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe sowie Papadopoulou et al. (2001) fanden für die TPZ-Injektion jeweils 30 min vor der Bestrahlung den höchsten radiosensitivierenden Effekt für TPZ. Obwohl sich der Therapieeffekt in einer Verlängerung der Wachstumszeit der hypoxischen gegenüber den normoxischen Tumoren von durchschnittlich 5 Tagen zeigte, war der Unterschied zwischen den beiden Kollektiven nicht signifikant. Da sich jedoch eine deutliche Tendenz zum Vorteil des hypoxischen Kollektivs zeigte, scheinen am ehesten die Gruppen zu klein gewesen zu sein, um das Signifikanzniveau zu erreichen (je $n = 8$).

Vergleich des Therapieerfolgs innerhalb des normoxischen Kollektivs: Anhand der Wachstumskurven lässt sich der Effekt der drei Therapiestrategien auf normoxische Tumoren gut vergleichen: Auffallend ist, dass sich das hypoxieselektive TPZ auf normoxische Tumoren nicht nur nicht verzögernd, sondern sogar tendentiell beschleunigend auf das Wachstum auswirkt, was sich neben der steilen Wachstumskurve auch im negativen aGD zeigt. Obwohl mehrere Autoren (Elwell et al., 1997; Wouters et al., 2001; Herscher et al., 1994; Giaccia et al., 1992) TPZ auch eine aerobe Toxizität zuschreiben, widerspräche diese Beobachtung einem therapeutischen Effekt auf normoxische Zellen. Aufgrund der kleinen Gruppengröße ($n = 7$) lässt sich jedoch keine allgemeingültige Aussage ableiten.

Als ein theoretischer Erklärungsversuch für das schnellere Wachstum der chemotherapierten Tumoren im Vergleich zur nicht-therapierten Gruppe wäre ein wachstumsstimulierender Effekt niedrig dosierter Chemotherapeutika analog zur Hormesis ionisierender Strahlung. Unter Hormesis wird die Anregung von Zellfunktionen durch niedrig dosierte ionisierende Strahlung verstanden, die therapeutischen Entzündungs- und Reizbestrahlungen zugrunde liegt. Dieser Effekt wird durch regulatorische Überkompensation sowie durch Anregung von Reparatur- und Anpassungsprozessen erklärt (Sauer, 2001 c). Obwohl Brown (1993) TPZ die Eigenschaft eines Radiosensitizers zuschrieb, konnte für TPZ auch in der Kombination mit Radiotherapie kein potenzierender Effekt der Strahlung beobachtet werden: Die Wachstumskurve der rein bestrahlten Tumoren steigt deutlich langsamer an als die der kombiniert radiochemotherapierten Tumoren.

Der ca. 5 – 7 Tage nach Therapiebeginn einsetzende Effekt der ionisierenden Strahlung an den Tumoren der RT- und RCT-Gruppe resultierte in einer deutlich geringeren Steigung der Wachstumskurven dieser beiden Gruppen verglichen mit den Kurven der chemo- und scheintherapierten Tumoren. Diesem Intervall zwischen Strahlenapplikation und messbarem Effekt auf das Tumolvolumen liegen multiple, komplexe und miteinander interagierende Prozesse zu Grunde, die auf drei Ebenen ablaufen: Radiochemische Vorgänge wie die Bildung von Primär- und Bioradikalen laufen binnen weniger Mikrosekunden nach

Strahleneinwirkung ab und induzieren Sekunden bis Minuten andauernde *biochemische Reaktionen* wie Veränderungen von Biomolekülen (DNA, Membranen). *Biologische Folgen* wie Genmutationen und Stoffwechseleränderungen können Minuten bis Jahre in Anspruch nehmen und auf zellulärer Ebene den Zelltod zur Folge haben, der in Wachstumsverlangsamung, -stagnation bzw. Volumenverlust messbar ist (Sauer, 2001 b).

In der Kontroll- bzw. RT-Gruppe zeigt sich am 11. bzw. 15. Tag nach (Schein-) Therapiebeginn eine Stagnation des Wachstums. Da zumindest im Fall der scheintherapierten Tumoren ein Therapieeffekt a priori auszuschließen ist, kann es sich dabei nur um eine „intrinsische“ Wachstumsverlangsamung handeln. Dem könnte möglicherweise eine insuffiziente Blutversorgung des Tumorgewebes zugrunde liegen, d.h. der Tumor wüchse „zu schnell“ für eine adäquate tumorale Neoangiogenese, so dass Tumorgewebe abstürbe und in der Konsequenz eine Volumenkonstanz oder einen -verlust bedingte. Tatsächlich findet sich in beiden Therapiegruppen jeweils ein Tumor, dessen Volumen an den gegebenen Messtagen leicht rückläufig war (z.B. Maus (Ko) 433 μ l verglichen zu 440 μ l in der vorangegangenen Ultraschallmessung bzw. Maus (RT) 305 μ l verglichen zu 308 μ l). Auch hier zeigt sich der Nachteil der kleinen Gruppengrößen (Ko n = 9; RT n = 10), dass einzelne Ausreißer das Gruppenergebnis erheblich beeinflussen und leicht zu Fehlinterpretationen (z.B. Wachstumsstagnation als Therapieeffekt) führen können.

Vergleich des Therapieerfolgs innerhalb des hypoxischen Kollektivs: Wie schon im Diagramm der normoxischen Tumorwachstumskurven beobachtet, zeigte sich auch beim hypoxischen Kollektiv der therapeutische Effekt der ionisierenden Strahlung nach 5 – 7 Tagen in Form einer konstant geringen Steigung der RT- und RCT-Kurven, während ab diesem Zeitpunkt die Kurven der Kontroll- und CT-Gruppe deutlich steiler anstiegen. Bis zum Ablauf dieser einwöchigen Zeitspanne verliefen die Wachstumskurven aller vier Therapiegruppen annähernd parallel. Das hypoxieselektive TPZ führte bei den hypoxischen Tumoren erwartungsgemäß zu einer verlängerten Wachstumszeit im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Kombination aus CT und RT erzielte bei den hypoxischen Tumoren die deutlichste Wachstumsverzögerung. Ein superadditiver, also synergistischer Therapieeffekt von CT und RT ist aufgrund des aGD der RCT-Gruppe anzunehmen, das mit 14,3 Tagen größer ist als die Summe der aGDs ihrer Einzelkomponenten CT (3,6 Tage) und RT (8,6 Tage). Diese Beobachtung spricht für einen radiosensibilisierenden Effekt von TPZ, den die Arbeitsgruppe um Zeman und Brown in den 1980er und 1990er Jahren beobachteten (Brown, 1993).

Im Zusammenhang mit einer potentiellen Rolle von [18 F]FAZA als Radiosensitizer fiel auf, dass in der Gruppe der rein bestrahlten Tumoren der Unterschied zwischen normoxischem und hypoxischem Kollektiv nicht signifikant war und sich ihre Wachstumskurven größtenteils glichen. Während die Frage nach der Signifikanz mit dem Hinweis auf die kleinen Gruppengrößen (n = 10 bzw. n = 7 für normoxische bzw. hypoxische Tumoren) beantwortet werden kann, müsste die Wachstumskurve der hypoxischen radiotherapierten Tumoren aufgrund ihrer durch die Hypoxie herabgesetzten Strahlensensibilität einen steileren Verlauf als die Kurve der normoxischen Vergleichsgruppe nehmen. Im Falle eines strahlensensibilisierenden Effektes könnte [18 F]FAZA durch Akkumulation in hypoxischen Zellen den Strahleneffekt auf hypoxische Tumoren potenzieren und somit eine ähnliche Strahlenwirkung ermöglichen wie auf normoxischen Tumoren, die zwar wegen ihrer besseren Oxygenierung strahlensensibler wären, denen aber die Strahlensensibilisierung durch [18 F]FAZA aufgrund ihrer niedrigen [18 F]FAZA-Akkumulation fehlte.

5.2.3 Magnetresonanztomographie

In der Onkologie nimmt die MRT aufgrund zahlreicher Vorteile im Vergleich zu anderen Bildgebungsmethoden wie Röntgen, CT oder PET eine herausragende Stellung in der Diagnostik ein. Aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung können die Untersuchungen schmerzfrei beliebig oft wiederholt werden. Bei entsprechendem Auflösungsvermögen lässt sich sowohl die Tumorbinnenstruktur als auch das umgebende Weichteilgewebe zum prätherapeutischen Staging und Therapiemonitoring beurteilen. Die weitere Entwicklung der MRT fokussiert die Idee des „one stop shoppings“ mit einer einzeitigen umfassenden, detaillierten Datenakquisition mit Darstellung der Binnenstruktur, Gefäßanatomie und -pathologie des Tumors sowie des umgebenden Gewebes z.B. zur virtuellen 3D-Simulation des Operationssitus (Sauer, 2001 c).

Das Auflösungsvermögen des für den Menschen ausgelegten Magnetoms Sonata erwies sich für die Fragestellungen dieses Mausexperiments als nicht ausreichend. Zudem stellte die zu den MRT-Aufnahmen nötige Narkose eine zusätzliche Belastung für die Tiere dar, so dass zugunsten der für die vorliegende Studie vorrangigen, notwendigen Narkosen für die [¹⁸F]FAZA-PET-Aufnahmen von einer seriellen MRT-Bildakquisition abgesehen wurde.

5.3 Autoradiographie mit [¹⁸F]FAZA und [¹⁸F]GalactoRGD

Erwartungsgemäß zeigte sich eine signifikant vermehrte Aufnahme sowohl von [¹⁸F]FAZA als auch von [¹⁸F]GalactoRGD im Tumor- verglichen zum Muskelgewebe. In früheren Versuchen wurde bereits eine komplementäre Anreicherung von [¹⁸F]FAZA und [¹²⁵I]-markiertem GlucoRGD gefunden (Picchio et al., 2008). Im Gegensatz zu GlucoRGD reicherte [¹⁸F]FAZA in Tumorarealen mit verminderter $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren-Exprimierung und ohne Angiogenese an, die also mangels Blutgefäßen chronisch sauerstoffunterversorgt sind. Dank der unterschiedlichen HWZ von ¹⁸F (110 min) und ¹²⁵I (59,2 d) konnte somit die Verteilung von FAZA und GlucoRGD an denselben Gewebeschnitten autoradiographisch untersucht werden. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation der $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor-Verteilung und der mit [¹⁸F]FAZA markierten intratumoralen Hypoxie. Im vorliegenden Versuch waren sowohl FAZA als auch GalactoRGD ¹⁸F-markiert, so dass die sequentielle Autoradiographie bzw. Darstellung der komplementären Anreicherung von [¹⁸F]FAZA und GalactoRGD an denselben Gewebeschnitten nicht möglich war. Um die [¹⁸F]FAZA- und GalactoRGD-Aufnahme in komplementären Tumorarealen und damit das Auftreten tumoraler Tumorphoxie in Gewebearealen mit verminderter $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor-Exprimierung nachzuweisen, wäre die Untersuchung eine größeren Anzahl sequentieller Tumorschnitte wünschenswert gewesen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden aus Zeitgründen nur einige Autoradiographien durchgeführt.

Die autoradiographisch untersuchten Tumoren waren zum Messzeitpunkt alle als hypoxisch klassifiziert. Um die Varianz der Anreicherung zwischen normoxischen und hypoxischen Tumoren darzustellen, hätten Mäuse mit normoxischen Tumoren zur autoradiographischen Untersuchung ggf. vor Erreichen des Tumolvolumenziels euthanasiert werden müssen, was dem vorliegenden Studiendesign nicht entsprochen hätte.

5.4. Immunhistochemie

In der immunhistochemischen Färbung zeigte sich, dass Pimonidazol – wie auch [¹⁸F]FAZA in der Autoradiographie – hypoxische Gewebeareale darstellte, die größer waren als die mit HIF-1 α angefärbten. Dies belegt die Eignung der Nitroimidazole als besonders sensitive

Hypoxiemarker. Chaplin et al. (1992) fanden an murinen Plattenepithel- (SCCVII) und Mamma-Tumoren (C₃H) einen um 30 – 40 % reduzierten tumoralen Blutfluss nach intravenöser Applikation von 500 mg/kgKG Pimonidazol. Dieser unerwünschte Effekt kann die tumorale Gewebeoxygenierung verfälschen, sollte bei der hier verwendeten, deutlich geringeren Dosierung von 60 mg/kgKG jedoch keine Rolle spielen.

Eine systematische, synchrone autoradiographische und immunhistochemische Evaluation der Gewebehypoxie mit [¹⁸F]FAZA, Galacto-RGD sowie Pimonidazol und HIF-1 α wäre optimal, hätte den Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch gesprengt. Die Spezifität und Sensitivität der [¹⁸F]FAZA-Anreicherung, der Pimonidazol-Anreicherung und der HIF-1 α -Expression sollen in auf die vorliegende Arbeit aufbauenden Studien untersucht werden.

5.5. Ausblick

Nach Abschluss der experimentellen Phase dieser Dissertation bestätigten weitere präklinische Studien am Mausmodell die [¹⁸F]FAZA-PET als präzise quantitative Nachweismethode einer Gewebehypoxie entsprechend der mikroskopischen Realität im Vergleich mit immunhistochemischer Pimonidazol-Färbung und Autoradiographie (Busk et al., 2008 b). Eine neuere präklinische Studie der dänischen Gruppe um Overgaard und Horsman an Mäusen mit murinem Mammatumor C₃H untermauerte den prädiktiven Wert der mit [¹⁸F]FAZA-PET nachgewiesenen prätherapeutischen Tumorphypoxie für das Therapieansprechen auf Radiotherapie (Mortensen et al., 2011).

In einer klinischen Studie an der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum Rechts der Isar München wurde an insgesamt elf Patienten mit unbehandeltem Plattenepithelzellkarzinom der Kopf-Hals-Region die klinische Anwendbarkeit von [¹⁸F]FAZA evaluiert und der optimale Scan-Zeitpunkt 2 h p.i. ermittelt (Souvatzoglou et al., 2007). Plattenepithelzellkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs gelten dabei unter den soliden Tumoren als besonders hypoxisch und aggressiv (Brizel et al., 1999; Lehtiö et al., 2004). Postema et al. (2009) untersuchten die Hypoxiedetektion mittels [¹⁸F]FAZA an insgesamt 50 Tumorpatienten mit Plattenepithelzellkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC), Bronchialkarzinomen (SCLC, NSCLC), malignen Lymphomen oder Gliomen und fanden gute Bildgebungseigenschaften sowie insbesondere bei Gliomen eine hohe Tracerakkumulation.

In einer klinischen Studie der Klinik für Strahlentherapie, ebenfalls am Klinikum Rechts der Isar München, wurde an 18 Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelzellkarzinom im Kopf-Hals-Bereich die gute Eignung der [¹⁸F]FAZA-PET zur Planung der IMRT aufgezeigt (Grosu et al., 2007).

Im Gegensatz dazu zeigte sich am lokalen, primären Prostatakarzinom kein relevanter Hypoxienachweis im [¹⁸F]FAZA-PET/CT verglichen mit immunhistochemischer Färbung mit CA IX und HIF-1 α , so dass [¹⁸F]FAZA hierfür ungeeignet scheint. Da die untersuchten Tumoren chirurgisch exzidiert wurden, konnte jedoch der Verlauf der tumoralen Gewebehypoxie am fortgeschrittenen lokalen oder metastasierenden Prostatakarzinom nicht verfolgt werden (Garcia-Parra et al., 2011).

[¹⁸F]FMISO gilt in der Klinik immer noch als Goldstandard der PET-Hypoxietracer. Für [¹⁸F]FAZA liegt bisher nur eine begrenzte Anzahl von Studien vor. Der großflächige klinische Vergleich der beiden Tracer steht noch aus, wobei [¹⁸F]FAZA aufgrund der besseren Biokinetik einen Vorteil haben dürfte. Anhand weiterführender tumorspezifischer Studien mit größeren Fallzahlen könnten

- die Abhängigkeit der [¹⁸F]FAZA-Akkumulation von der Tumorperfusion,
- die exakte Katabolisierungskinetik,
- die Spezifität und Sensitivität der [¹⁸F]FAZA-Akkumulation,

- die Korrelation zwischen prätherapeutischer [^{18}F]FAZA-Akkumulation und einem progressfreien Überleben unter CT, RT oder kombinierter RCT sowie
 - ein möglicher radiosensibilisierender Effekt von [^{18}F]FAZA
- untersucht werden. Dazu könnte die Kombination der PET mit einer anatomisch-morphologischen Bildgebung, z.B. PET/CT oder PET/MRT, die Präzision der Bildgebung erhöhen und damit die Therapieplanung und -überwachung verbessern.

6. Zusammenfassung

Hypoxische Tumoren sind bekannt für ihre Aggressivität hinsichtlich Wachstum und Metastasierung sowie für ihr schlechtes Ansprechen auf die konventionellen antitumoralen Therapien. Ihre erfolgreiche Behandlung setzt daher spezielle, hypoxieadaptierte Therapieansätze voraus. Grundlegend für die Wahl der richtigen Therapiestrategie ist die Selektion hypoxischer Tumoren bzw. die präzise intratumorale Lokalisierung hypoxischer Gewebeareale, um genau diese Tumoren bzw. Gewebeareale einer hypoxieadressierten Chemotherapie, z.B. mit Tirapazamin, oder einer zielgenauen intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) zuführen zu können. Die höhere Toxizität hypoxieadressierter Chemotherapeutika und der deutlich höhere Kostenaufwand hypoxieadressierter Chemo- und Radiotherapie machen eine zielgerichtete Anwendung unerlässlich. Die bisher gängigen invasiven Messungen zur Selektion hypoxischer Tumoren mittels Eppendorf-Histogrammen sind für diesen Zweck zu ungenau. Mittels Hypoxietracer kann in der PET in ausreichender Auflösung der Oxygenierungsstatus solider Tumoren wenig invasiv und damit wenn nötig wiederholt dargestellt werden. Pharmakokinetische Grenzen der bisher zur Verfügung stehenden PET-Hypoxietracer (z.B. [¹⁸F]FMISO) führten zur Entwicklung von [¹⁸F]Fluoroazomycinarabinosid ([¹⁸F]FAZA), einem Nitroimidazol-Hypoxietracer mit optimierter Biokinetik.

In der vorliegenden Dissertation wurden Eignung und Zuverlässigkeit von [¹⁸F]FAZA als präzisen und klinisch gut anwendbaren PET-Hypoxiedetektor sowie seine prädiktive Potenz hinsichtlich Therapieansprechen auf drei antitumorale Therapien – Chemotherapie, Radiotherapie und kombinierte Radiochemotherapie – im Mausmodell untersucht.

Dazu wurden immundefizienten Swiss nu/nu-Mäusen je ein muriner EMT6-Mammatumor, der für seine Hypoxieneigung bekannt ist, am rechten Oberschenkel implantiert. Das Tumorstadium wurde mittels Ultraschall in zweitägigen Abständen, die Tumoroxygenierung anhand von regelmäßigen [¹⁸F]FAZA-PET-Aufnahmen beobachtet. Nach Erreichen eines sonographisch gemessenen Mindestvolumens von 70 µl wurde ein initialer [¹⁸F]FAZA-PET-Scan durchgeführt und die Tumoroxygenierung semiquantitativ bestimmt, indem die [¹⁸F]FAZA-Akkumulation im EMT6-Tumor mit der des als Hintergrund gewählten Lungengewebes in Verhältnis gesetzt wurde (T/B-Verhältnis). Der Median der T/B-Verhältnisse der initialen [¹⁸F]FAZA-PET-Aufnahme von 1,97 wurde empirisch als Diskriminierungsschwelle zwischen deutlich [¹⁸F]FAZA-anreichernden, also hypoxischen, und nicht bzw. wenig [¹⁸F]FAZA-anreichernden, also normoxischen Tumoren festgesetzt. Anhand derer wurden die EMT6-tragenden Mäuse dem normoxischen bzw. hypoxischen Kollektiv und anschließend einer der drei Therapiegruppen – hypoxieadressierte Chemotherapie mit Tirapazamin, Radiotherapie oder kombinierter Radiochemotherapie – oder der Kontrollgruppe zugeordnet. Die geringe Invasivität der [¹⁸F]FAZA-PET-Untersuchung ermöglichte die Überwachung des tumoralen Oxygenierungsstatus nicht nur vor, sondern auch während und nach Therapie. Nach Erreichen eines Tumorstadiums von 500 µl wurden die Mäuse getötet und die Tumoren zur Autoradiographie mit dem zuvor injizierten [¹⁸F]FAZA bzw. [¹⁸F]GalactoRGD sowie zum immunhistochemischen Hypoxienachweis explantiert.

In der vorliegenden Studie korrelierte ein hypoxischer tumoraler Oxygenierungsstatus und damit konsekutiv hoher tumoraler [^{18}F]FAZA-Aufnahme mit einem aggressiven Tumorwachstum. Hinsichtlich der Wirksamkeit der drei verglichenen Therapiekonzepte zeigte sich, dass im normoxischen Kollektiv nur die Radiotherapie und die kombinierte Radiochemotherapie das Tumorwachstum verzögern konnten. Aufgrund der hypoxieselektiven Wirkung konnte die Monotherapie mit Tirapazamin an normoxischen Tumoren keinen wachstumsverzögernden Effekt erzielen.

Im hypoxischen Kollektiv wirkten im Vergleich zur Kontrollgruppe alle drei Therapien signifikant wachstumsverzögernd. Verglichen mit dem normoxischen Kollektiv bewirkte jedoch nur die kombinierte Radiochemotherapie eine signifikante Wachstumsverzögerung der hypoxischen Tumoren. Dies belegt den positiv prädiktiven Wert für [^{18}F]FAZA als Hypoxietracer hinsichtlich der Erfolgsaussichten einer kombinierten Radiochemotherapie mit Tirapazamin.

Die generelle [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung in den späteren PET-Scans sowohl nach Therapie als auch im Spontanverlauf der Kontrollgruppe zeigte die Tendenz der EMT6-Tumoren zur Ausbildung hypoxischer Gewebearale. Bei den bestrahlten (Radiotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie) normoxischen Tumoren war die [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung im Vergleich zu prätherapeutisch signifikant. Bei den hypoxischen Tumoren hingegen unterschied sich die posttherapeutische [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung im Vergleich zu prätherapeutisch nicht signifikant. Dafür werden drei mögliche Erklärungen gesehen: Neben der Nekrotisierungsneigung hypoxischer Tumoren mit konsekutiv geringerer [^{18}F]FAZA-Aufnahme und dem Reoxygenierungseffekt bei fraktionierter Radiotherapie könnte gegebenenfalls auch ein radiosensibilisierender Effekt von [^{18}F]FAZA die relativ geringere [^{18}F]FAZA-Mehranreicherung begründen. Zur Bestätigung dieses vermuteten radiosensibilisierenden Effekts von [^{18}F]FAZA sind weitere Untersuchungen notwendig.

In der Autoradiographie mit [^{18}F]FAZA zeigte sich eine deutliche tumorale Mehranreicherung verglichen mit dem Muskelgewebe. In den immunhistochemischen Zellfärbungen mit Pimonidazol und HIF-1 α konnten hypoxische Tumorareale sehr präzise detektiert werden. Im Vergleich stellten die Nitroimidazole – [^{18}F]FAZA in der Autoradiographie und Pimonidazol in der Immunhistochemie – extensivere Areale dar als die HIF-1 α -Färbung. Dies belegt die sehr gute Sensitivität der Nitroimidazole zum Nachweis einer Zellhypoxie.

Zusammenfassend eignet sich [^{18}F]FAZA auf Grund seiner im Vergleich zu anderen PET-Hypoxietracern günstigeren Biokinetik ausgezeichnet, um im Mausmodell hypoxische EMT6-Tumoren zu detektieren, die von einer hypoxieselektiven Chemo- und/oder Radiotherapie profitieren können. Diese Therapien können in regelmäßigen [^{18}F]FAZA-PET-Scans auf Grund der geringen Invasivität praktikabel monitorisiert werden. Die vorliegende Studie konnte zudem am Mausmodell einen prädiktiven Wert von [^{18}F]FAZA für das Ansprechen einer kombinierten Radiochemotherapie mit Tirapazamin bestätigen.

7. Literaturverzeichnis

- Adams GE, Stratford IJ. Bioreductive drugs for cancer therapy: the search for tumor specificity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 15 1994;29(2):231-238.
- Aston JA, Cunningham VJ, Asselin MC, Hammers A, Evans AC, Gunn RN. Positron emission tomography partial volume correction: estimation and algorithms. *J Cereb Blood Flow Metab*. Aug 2002;22(8):1019-1034.
- Baker MA, Zeman EM, Hirst VK, Brown JM. Metabolism of SR 4233 by Chinese hamster ovary cells: basis of selective hypoxic cytotoxicity. *Cancer Res*. Nov 1988;48(21):5947-5952.
- Barthel H, Wilson H, Collingridge DR, Brown G, Osman S, Luthra SK, Brady F, Workman P, Price PM, Aboagye EO. In vivo evaluation of [¹⁸F]fluoroetanidazole as a new marker for imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. *Br J Cancer*. Jun 2004;90(11):2232-2242.
- Beer AJ, Haubner R, Sarbia M, Goebel M, Luderschmidt S, Grosu AL, Schnell O, Niemeyer M, Kessler H, Wester HJ, Weber WA, Schwaiger M. Positron emission tomography using [¹⁸F]Galacto-RGD identifies the level of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in man. *Clin Cancer Res*. Jul 2006;12(13):3942-3949.
- Begg AC. Is HIF-1 α a good marker for tumor hypoxia? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Jul 2003;56(4):917-919.
- Bentzen L, Keiding S, Horsman MR, Gronroos T, Hansen SB, Overgaard J. Assessment of hypoxia in experimental mice tumours by [¹⁸F]fluoromisonidazole PET and pO₂ electrode measurements. Influence of tumour volume and carbogen breathing. *Acta Oncol*. 2002;41(3):304-312.
- Bentzen L, Keiding S, Nordmark M, Falborg L, Hansen SB, Keller J, Nielsen OS, Overgaard J. Tumour oxygenation assessed by ¹⁸F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours. *Radiother Oncol*. Jun 2003;67(3):339-344.
- Blower PJ, Lewis JS, Zweit J. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nucl Med Biol*. Nov 1996;23(8):957-980.
- Boyer PD, Chance B, Ernster L, Mitchell P, Racker E, Slater EC. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1977;46:955-966.
- Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol*. Nov 1999;53(2):113-117.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*. Mar 1996;56(5):941-943.
- Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 1997;38(2):285-289.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science*. Apr 1994;264(5158):569-571.

- Brown JM. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol.* Aug 1979;52(620):650-656.
- Brown JM. Tumor hypoxia, drug resistance, and metastases. *J Natl Cancer Inst.* Mar 1990;82(5):338-339.
- Brown JM. SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br J Cancer.* Jun 1993;67(6):1163-1170.
- Brown JM. Hypoxic cytotoxic agents: a new approach to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* Feb 2000;3(1):7-13.
- Brown JM. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther.* Sep-Oct 2002;1(5):453-458.
- Brown JM, Lemmon MJ. Potentiation by the hypoxic cytotoxin SR 4233 of cell killing produced by fractionated irradiation of mouse tumors. *Cancer Res.* Dec 1990;50(24):7745-7749.
- Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* Apr 1999;59(7):1391-1399.
- Bruehlmeier M, Roelcke U, Schubiger PA, Ametamey SM. Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with 18F-fluoromisonidazole and 15O-H₂O. *J Nucl Med.* Nov 2004;45(11):1851-1859.
- Burgman P, O'Donoghue JA, Lewis JS, Welch MJ, Humm JL, Ling CC. Cell line-dependent differences in uptake and retention of the hypoxia-selective nuclear imaging agent Cu-ATSM. *Nucl Med Biol.* Aug 2005;32(6):623-630.
- Bush RS. The significance of anemia in clinical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Nov 1986;12(11):2047-2050.
- Busk M, Horsman MR, Jakobsen S, Bussink J, van der Kogel A, Overgaard J. Cellular uptake of PET tracers of glucose metabolism and hypoxia and their linkage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Dec 2008;35(12):2294-2303. (a)
- Busk M, Horsman MR, Jakobsen S, Keiding S, van der Kogel AJ, Bussink J, Overgaard J. Imaging hypoxia in xenografted and murine tumors with 18F-fluoroazomycin arabinoside: a comparative study involving microPET, autoradiography, PO₂-polarography, and fluorescence microscopy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 2008;70(4):1202-1212. (b)
- Busk M, Munk OL, Jakobsen S, Wang T, Skals M, Steiniche T, Horsman MR, Overgaard J. Assessing hypoxia in animal tumor models based on pharmacokinetic analysis of dynamic FAZA PET. *Acta Oncol.* Oct 2010;49(7):922-933.
- Carlson SK, Classic KL, Bender CE, Russell SJ. Small animal absorbed radiation dose from serial micro-computed tomography imaging. *Mol Imaging Biol.* Mar-Apr 2007;9(2):78-82.
- Cater DB, Silver IA. Quantitative measurements of oxygen tension in normal tissues and in the tumours of patients before and after radiotherapy. *Acta radiol.* Mar 1960;53:233-256.
- Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging.* Jan 2004;3(1):55-62.
- Chabner BA. Back to the Future for Clinical Oncology. *Oncologist.* 1996;1(1&2):I.
- Chao KS, Bosch WR, Mutic S, Lewis JS, Dehdashti F, Mintun MA, Dempsey JF, Perez CA, Purdy JA, Welch MJ. A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance: Cu-ATSM-guided intensity-modulated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 2001;49(4):1171-1182.
- Chaplin DJ, Durand RE, Olive PL. Acute hypoxia in tumors: implications for modifiers of radiation effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Aug 1986;12(8):1279-1282.

- Chaplin DJ, Horsman MR. Tumor blood flow changes induced by chemical modifiers of radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;22(3):459-462.
- Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res.* Jan 1987;47(2):597-601.
- Chapman JD. Hypoxic sensitizers--implications for radiation therapy. *N Engl J Med.* Dec 1979;301(26):1429-1432.
- Chapman JD. Measurement of tumor hypoxia by invasive and non-invasive procedures: a review of recent clinical studies. *Radiother Oncol.* 1991;20 Suppl 1:13-19.
- Chapman JD, Baer K, Lee J. Characteristics of the metabolism-induced binding of miso-nidazole to hypoxic mammalian cells. *Cancer Res.* Apr 1983;43(4):1523-1528. (a)
- Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, Schneider RF, Hanks GE. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. *Radiother Oncol.* Mar 1998;46(3):229-237.
- Chapman JD, Franko AJ, Sharplin J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *Br J Cancer.* Apr 1981;43(4):546-550.
- Chapman JD, Lee J, Meeker BE. Keynote address: cellular reduction of nitroimidazole drugs: potential for selective chemotherapy and diagnosis of hypoxic cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Apr 1989;16(4):911-917.
- Chapman JD, Lee J, Meeker BE. Adduct formation by 2-nitroimidazole drugs in mammalian cells: optimization of markers for tissue oxygenation. In: *Selective Activation of Drugs by Redox Processes*, pp. 313-323. Editors: Adams GE, Breccia A, Fielden AM, Wardman P. Plenum Press, New York, 1990.
- Chapman JD, Ngan-Lee J, Stobbe CC and Meeker BE. Radiation-induced and metabolism-induced reactions of hypoxic sensitizers with cellular molecules. In: *Advanced Topics on Radiosensitizers of Hypoxic Cells*, pp. 91-103. Editors: A. Breccia, C. Rimondi and G.E. Adams. Plenum Press, New York, 1983. (b)
- Coleman CN, Wasserman TH, Urtasun RC, Halsey J, Hirst VK, Hancock S, Phillips TL. Phase I trial of the hypoxic cell radiosensitizer SR-2508: the results of the five to six week drug schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jul 1986;12(7):1105-1108.
- Cooper RA, Carrington BM, Loncaster JA, Todd SM, Davidson SE, Logue JP, Luthra AD, Jones AP, Stratford I, Hunter RD, West CM. Tumour oxygenation levels correlate with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging parameters in carcinoma of the cervix. *Radiother Oncol.* Oct 2000;57(1):53-59.
- Costa AK, Baker MA, Brown JM, Trudell JR. In vitro hepatotoxicity of SR 4233 (3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide), a hypoxic cytotoxin and potential antitumor agent. *Cancer Res.* Feb 1989;49(4):925-929.
- Cuvier C, Jang A, Hill RP. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L + B) secretion. *Clin Exp Metastasis.* Jan 1997;15(1):19-25.
- Daube-Witherspoon ME, Matej S, Karp JS, Lewitt RM. Application of the row action maximum likelihood algorithm with spherical basis functions to clinical PET imaging. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2001;48:24-30.
- Dearling JL, Lewis JS, Mullen GE, Rae MT, Zweit J, Blower PJ. Design of hypoxia-targeting radiopharmaceuticals: selective uptake of copper-64 complexes in hypoxic cells in vitro. *Eur J Nucl Med.* Jul 1998;25(7):788-792.
- Dearling JL, Lewis JS, Mullen GE, Welch MJ, Blower PJ. Copper bis(thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents: structure-activity relationships. *J Biol Inorg Chem.* Mar 2002;7(3):249-259.
- Dehdashti F, Grigsby PW, Lewis JS, Laforest R, Siegel BA, Welch MJ. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by PET with 60Cu-labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med.* Feb 2008;49(2):201-205.

- Dehdashti F, Grigsby PW, Mintun MA, Lewis JS, Siegel BA, Welch MJ. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with ⁶⁰Cu-ATSM: relationship to therapeutic response-a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Apr 2003;55(5):1233-1238. (a)
- Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, Bradley J, Govindan R, Laforest R, Welch MJ, Siegel BA. In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with ⁶⁰Cu-ATSM. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Jun 2003;30(6):844-850. (b)
- Delahoussaye YM, Evans JW, Brown JM. Metabolism of tirapazamine by multiple reductases in the nucleus. *Biochem Pharmacol*. Nov 2001;62(9):1201-1209.
- Didinger BH, Schlegel W, Debus J. Intensity-modulated radiotherapy - technology and clinical applications. *Onkologie*. Jun 2002;25(3):233-238.
- Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, Malyapa RS, Myerson RJ, Picus J, Ritter J, Lewis JS, Welch MJ, Siegel BA. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with ⁶⁰Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis Colon Rectum*. Nov 2008;51(11):1641-1648.
- Dische S, Saunders MI, Anderson P, Stratford MR, Minchinton A. Clinical experience with nitroimidazoles as radiosensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar-Apr 1982;8(3-4):335-338.
- Dorie MJ, Kallman RF, Cebulska-Wasilewska A. Interleukin-1 modification of the effects of cyclophosphamide and fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Feb 1991;20(2):311-314.
- Double EB, Richmond RC. Platinum complexes as radiosensitizers of hypoxic mammalian cells. *Br J Cancer Suppl*. Jun 1978;3:98-102.
- Double EB, Richmond RC. Radiosensitization of hypoxic tumor cells by cis- and trans-dichlorodiammineplatinum (II). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Aug 1979;5(8):1369-1372.
- Durand RE, Olive PL. Physiologic and cytotoxic effects of tirapazamine in tumor-bearing mice. *Radiat Oncol Investig*. 1997;5(5):213-219.
- Elwell JH, Siim BG, Evans JW, Brown JM. Adaptation of human tumor cells to tirapazamine under aerobic conditions: implications of increased antioxidant enzyme activity to mechanism of aerobic cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*. Jul 1997;54(2):249-257.
- Erlichman C, Wu A. Resistance of MGH-U1 bladder cancer spheroids to vincristine. *Anticancer Res*. Jul-Aug 1992;12(4):1233-1236.
- Eschmann SM, Paulsen F, Reimold M, Dittmann H, Welz S, Reischl G, Machulla HJ, Bares R. Prognostic impact of hypoxia imaging with ¹⁸F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med*. Feb 2005;46(2):253-260.
- Evans JC, Bergsjö P. The Influence of Anemia on the Results of Radiotherapy in Carcinoma of the Cervix. *Radiology*. Apr 1965;84:709-717.
- Evans JW, Yudoh K, Delahoussaye YM, Brown JM. Tirapazamine is metabolized to its DNA-damaging radical by intranuclear enzymes. *Cancer Res*. May 1998;58(10):2098-2101.
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. Aug 1999;59(16):3915-3918.
- Ford NL, Thornton MM, Holdsworth DW. Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med Phys*. Nov 2003;30(11):2869-2877.
- Fowler JF. Eighth annual Juan del Regato lecture. Chemical modifiers of radiosensitivity-- theory and reality: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Apr 1985;11(4):665-674.

- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington DC. 1995; 1. Auflage: 14-24.
- Frommhold H, Guttenberger R, Henke M. The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy. The Freiburg experience. *Strahlenther Onkol*. Dec 1998;174 Suppl 4:31-34.
- Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, Ohtani H, Konishi J, Yokoyama A. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med*. Jul 1997;38(7):1155-1160.
- Gagel B, DiMartino E, Schramm O, Pinkawa M, Piroth M, Demirel C, Maneschi P, Stanzel S, Asadpour B, Westhofen M, Eble MJ. Contrast-enhanced color duplex sonography (CDS): an alternative for the evaluation of therapy-relevant tumor oxygenation? *Strahlenther Onkol*. Oct 2006;182(10):604-609.
- Gagel B, Piroth M, Pinkawa M, Reinartz P, Zimny M, Kaiser HJ, Stanzel S, Asadpour B, Demirel C, Hamacher K, Coenen HH, Scholbach T, Maneschi P, DiMartino E, Eble MJ. pO polarography, contrast enhanced color duplex sonography (CDS), [18F] fluoromisonidazole and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography: validated methods for the evaluation of therapy-relevant tumor oxygenation or only bricks in the puzzle of tumor hypoxia? *BMC Cancer*. 2007;7:113.
- Gagel B, Reinartz P, Dimartino E, Zimny M, Pinkawa M, Maneschi P, Stanzel S, Hamacher K, Coenen HH, Westhofen M, Bull U, Eble MJ. pO(2) Polarography versus positron emission tomography ([18F] fluoromisonidazole, [(18F)-2-fluoro-2'-deoxyglucose). An appraisal of radiotherapeutically relevant hypoxia. *Strahlenther Onkol*. Oct 2004;180(10):616-622.
- Garcia-Parra R, Wood D, Shah RB, Siddiqui J, Hussain H, Park H, Desmond T, Meyer C, Piert M. Investigation on tumor hypoxia in resectable primary prostate cancer as demonstrated by 18F-FAZA PET/CT utilizing multimodality fusion techniques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Oct 2011;38(10):1816-1823.
- Garrecht BM, Chapman JD. The labelling of EMT-6 tumours in BALB/C mice with 14C-misonidazole. *Br J Radiol*. Oct 1983;56(670):745-753.
- Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 1988;14(5):831-838.
- Giaccia AJ. Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol*. Jan 1996;6(1):46-58.
- Giaccia AJ, Biedermann KA, Tosto LM, Minchinton AI, Kovacs MS, Brown JM. Characterization of a CHO cell line resistant to killing by the hypoxic cell cytotoxin SR 4233. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;22(4):681-684.
- Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer*. Feb 1999;80(4):617-623.
- Graham MA, Senan S, Robin H, Jr., Eckhardt N, Lendrem D, Hincks J, Greenslade D, Rampling R, Kaye SB, von Roemeling R, Workman P. Pharmacokinetics of the hypoxic cell cytotoxic agent tirapazamine and its major bioreductive metabolites in mice and humans: retrospective analysis of a pharmacokinetically guided dose-escalation strategy in a phase I trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;40(1):1-10. (a)
- Graham MM, Peterson LM, Link JM, Evans ML, Rasey JS, Koh WJ, Caldwell JH, Krohn KA. Fluorine-18-fluoromisonidazole radiation dosimetry in imaging studies. *J Nucl Med*. Oct 1997;38(10):1631-1636. (b)

- Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol.* Dec 1953;26(312):638-648.
- Greer S, Schwade J, Marion HS. Five-chlorodeoxycytidine and biomodulators of its metabolism result in fifty to eighty percent cures of advanced EMT-6 tumors when used with fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jul 1995;32(4):1059-1069.
- Grierson JR, Link JM, Mathis CA, Rasey JS, Krohn KA. A radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. *J Nucl Med.* Mar 1989;30(3):343-350.
- Grigsby PW, Malyapa RS, Higashikubo R, Schwarz JK, Welch MJ, Huettner PC, Dehdashti F. Comparison of molecular markers of hypoxia and imaging with (60)Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix. *Mol Imaging Biol.* Sep-Oct 2007;9(5):278-283.
- Grönroos T, Bentzen L, Marjamaki P, Murata R, Horsman MR, Keiding S, Eskola O, Haaparanta M, Minn H, Solin O. Comparison of the biodistribution of two hypoxia markers [18F]FETNIM and [18F]FMISO in an experimental mammary carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Apr 2004;31(4):513-520.
- Grönroos T, Eskola O, Lehtiö K, Minn H, Marjamaki P, Bergman J, Haaparanta M, Forsback S, Solin O. Pharmacokinetics of [18F]FETNIM: a potential marker for PET. *J Nucl Med.* Sep 2001;42(9):1397-1404.
- Grosu AL, Souvatzoglou M, Röper B, Dobritz M, Wiedenmann N, Jacob V, Wester HJ, Reischl G, Machulla HJ, Schwaiger M, Molls M, Piert M. Hypoxia imaging with FAZA-PET and theoretical considerations with regard to dose painting for individualization of radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Oct 2007;69(2):541-551.
- Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist.* Lippincott Williams&Wilkins, 2006, Sixth Edition.
- Harris AL. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* Jan 2002;2(1):38-47.
- Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:31-40.
- Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* 2002;7(6):492-508.
- Haubner R. Design, Synthese und Konformationsanalyse biologisch aktiver und selektiver $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten. Dissertation am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München. 1995.
- Henke M, Guttenberger R, Barke A, Pajonk F, Potter R, Frommhold H. Erythropoietin for patients undergoing radiotherapy: a pilot study. *Radiother Oncol.* Feb 1999;50(2):185-190.
- Herscher LL, Krishna MC, Cook JA, Coleman CN, Biaglow JE, Tuttle SW, Gonzalez FJ, Mitchell JB. Protection against SR 4233 (Tirapazamine) aerobic cytotoxicity by the metal chelators desferrioxamine and tiron. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Nov 1994;30(4):879-885.
- Hicks RJ, Rischin D, Fisher R, Binns D, Scott AM, Peters LJ. Utility of FMISO PET in advanced head and neck cancer treated with chemoradiation incorporating a hypoxia-targeting chemotherapy agent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Dec 2005;32(12):1384-1391.
- Höckel M, Schlenger K, Knoop C, Vaupel P. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* Nov 1991;51(22):6098-6102.
- Höckel M, Schlenger K, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Semin Radiat Oncol.* Jan 1996;6(1):3-9. (a)

- Höckel M, Schlenger K, Hamm H, Knapstein PG, Hohenfellner R, Rosler HP. Five-year experience with combined operative and radiotherapeutic treatment of recurrent gynecologic tumors infiltrating the pelvic wall. *Cancer*. May 1996;77(9):1918-1933. (b)
- Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*. Oct 1996;56(19):4509-4515. (c)
- Höckel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res*. Sep 1999;59(18):4525-4528.
- Höckel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol*. Apr 2001;28(2 Suppl 8):36-41.(a)
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. Feb 2001;93(4):266-276.(b)
- Holland JP, Lewis JS, Dehdashti F. Assessing tumor hypoxia by positron emission tomography with Cu-ATSM. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. Apr 2009;53(2):193-200.
- Huisman MC, Reder S, Weber AW, Ziegler SI, Schwaiger M. Performance evaluation of the Philips MOSAIC small animal PET scanner. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Apr 2007;34(4):532-540.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*. Apr 2001;292(5516):464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. Apr 2001;292(5516):468-472.
- Jerabek PA, Patrick TB, Kilbourn MR, Dischino DD, Welch MJ. Synthesis and biodistribution of 18F-labeled fluoronitroimidazoles: potential in vivo markers of hypoxic tissue. *Int J Rad Appl Instrum A*. 1986;37(7):599-605.
- Johnston RF, Pickett SC, Barker DL. Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis*. May 1990;11(5):355-360.
- Joseph P, Jaiswal AK, Stobbe CC, Chapman JD. The role of specific reductases in the intracellular activation and binding of 2-nitroimidazoles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 1994;29(2):351-355.
- Kennedy AS, Raleigh JA, Perez GM, Calkins DP, Thrall DE, Novotny DB, Varia MA. Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. Sept. 1996;37(4): 897-905.
- Kessler RM, Ellis JR, Jr., Eden M. Analysis of emission tomographic scan data: limitations imposed by resolution and background. *J Comput Assist Tomogr*. Jun 1984;8(3):514-522.
- Koh WJ, Rasey JS, Evans ML, Grierson JR, Lewellen TK, Graham MM, Krohn KA, Griffin TW. Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;22(1):199-212.
- Koh WJ, Bergman KS, Rasey JS, Peterson LM, Evans ML, Graham MM, Grierson JR, Lindsley KL, Lewellen TK, Krohn KA. Evaluation of oxygenation status during fractionated radiotherapy in human nonsmall cell lung cancers using [F-18]fluoromisonidazole positron emission tomography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Sep 1995;33(2):391-398.
- Kolstad P. Intercapillary distance, oxygen tension and local recurrence in cervix cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;106:145-157.

- Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 2000;60(4):883-887.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;53(5):1192-1202.
- Krause BJ, Beck R, Souvatzoglou M, Piert M. PET and PET/CT studies of tumor tissue oxygenation. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* Mar 2006;50(1):28-43.
- Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med.* Jun 2008;49 Suppl 2:129S-148S.
- Kubota K, Tada M, Yamada S, Hori K, Saito S, Iwata R, Sato K, Fukuda H, Ido T. Comparison of the distribution of fluorine-18 fluoromisonidazole, deoxyglucose and methionine in tumour tissue. *Eur J Nucl Med.* Jul 1999;26(7):750-757.
- Kumar P. Tumor hypoxia and anemia: impact on the efficacy of radiation therapy. *Semin Hematol.* Oct 2000;37(4 Suppl 6):4-8.
- Kumar P, Wiebe LI, Asikoglu M, Tandon M, McEwan AJ. Microwave-assisted (radio)halogenation of nitroimidazole-based hypoxia markers. *Appl Radiat Isot.* Nov 2002;57(5):697-703.
- Laderoute K, Wardman P, Rauth AM. Molecular mechanisms for the hypoxia-dependent activation of 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide (SR 4233). *Biochem Pharmacol.* Apr 1988;37(8):1487-1495.
- Laderoute KR, Rauth AM. Identification of two major reduction products of the hypoxic cell toxin 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide. *Biochem Pharmacol.* Oct 1986;35(19):3417-3420.
- Lehtiö K, Oikonen V, Nyman S, Gronroos T, Roivainen A, Eskola O, Minn H. Quantifying tumour hypoxia with fluorine-18 fluoroerythronitroimidazole ([¹⁸F]FETNIM) and PET using the tumour to plasma ratio. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Jan 2003;30(1):101-108.
- Lehtiö K, Eskola O, Viljanen T, Oikonen V, Gronroos T, Sillanmaki L, Grenman R, Minn H. Imaging perfusion and hypoxia with PET to predict radiotherapy response in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jul 2004;59(4):971-982.
- Lewis JS, Laforest R, Dehdashti F, Grigsby PW, Welch MJ, Siegel BA. An imaging comparison of ⁶⁴Cu-ATSM and ⁶⁰Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix. *J Nucl Med.* Jul 2008;49(7):1177-1182.
- Lin Z, Mechalakos J, Nehmeh S, Schoder H, Lee N, Humm J, Ling CC. The influence of changes in tumor hypoxia on dose-painting treatment plans based on ¹⁸F-FMISO positron emission tomography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 2008;70(4):1219-1228.
- Ling CC, Humm J, Larson S, Amols H, Fuks Z, Leibel S, Koutcher JA. Towards multidimensional radiotherapy (MD-CRT): biological imaging and biological conformality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jun 2000;47(3):551-560.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* Jan 1991;64(2):327-336.
- Loncaster JA, Carrington BM, Sykes JR, Jones AP, Todd SM, Cooper R, Buckley DL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, West CM. Prediction of radiotherapy outcome using dynamic contrast enhanced MRI of carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Nov 2002;54(3):759-767.
- Ludwig H. rHuEPO and treatment outcomes: the preclinical experience. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:48-54.

- Marples B, Greco O, Joiner MC, Scott SD. Molecular approaches to chemo-radiotherapy. *Eur J Cancer*. Jan 2002;38(2):231-239. (b)
- Martin GV, Caldwell JH, Graham MM, Grierson JR, Kroll K, Cowan MJ, Lewellen TK, Rasey JS, Casciari JJ, Krohn KA. Noninvasive detection of hypoxic myocardium using fluorine-18-fluoromisonidazole and positron emission tomography. *J Nucl Med*. Dec 1992;33(12):2202-2208.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. Sep 2001;20(18):5197-5206.
- Maurer RI, Blower PJ, Dilworth JR, Reynolds CA, Zheng Y, Mullen GE. Studies on the mechanism of hypoxic selectivity in copper bis(thiosemicarbazone) radiopharmaceuticals. *J Med Chem*. Mar 2002;45(7):1420-1431.
- Mayer A, Höckel M, Vaupel P. Endogenous hypoxia markers in locally advanced cancers of the uterine cervix: reality or wishful thinking? *Strahlenther Onkol*. Sep 2006;182(9):501-510.
- Mayer A, Höckel M, Vaupel P. Endogenous hypoxia markers: case not proven! *Adv Exp Med Biol*. 2008;614:127-136.
- Mazziotta JC, Phelps ME, Plummer D, Kuhl DE. Quantitation in positron emission computed tomography: 5. Physical--anatomical effects. *J Comput Assist Tomogr*. Oct 1981;5(5):734-743.
- Mees G, Dierckx R, Vangestel C, Van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Oct 2009;36(10):1674-1686.
- Minchinton AI, Brown JM. Enhancement of the cytotoxicity of SR 4233 to normal and malignant tissues by hypoxic breathing. *Br J Cancer*. Dec 1992;66(6):1053-1058.(a)
- Minchinton AI, Brown JM. Improving the effectiveness of the bioreductive antitumor agent SR 4233 by induced hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 1992;317:177-181.(b)
- Minn H, Clavo AC, Wahl RL. Influence of hypoxia on tracer accumulation in squamous-cell carcinoma: in vitro evaluation for PET imaging. *Nucl Med Biol*. Nov 1996;23(8):941-946.
- Mortensen LS, Busk M, Nordmark M, Jakobsen S, Theil J, Overgaard J, Horsman MR. Accessing radiation response using hypoxia PET imaging and oxygen sensitive electrodes: a preclinical study. *Radiother Oncol*. Jun 2011;99(3):418-423.
- Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 1984;10(5):695-712.
- Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol*. Oct 2005;77(1):18-24.
- Nunn A, Linder K, Strauss HW. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med*. Mar 1995;22(3):265-280.
- O'Donoghue JA, Zanzonico P, Pugachev A, Wen B, Smith-Jones P, Cai S, Burnazi E, Finn RD, Burgman P, Ruan S, Lewis JS, Welch MJ, Ling CC, Humm JL. Assessment of regional tumor hypoxia using 18F-fluoromisonidazole and 64Cu(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) positron emission tomography: Comparative study featuring microPET imaging, Po2 probe measurement, autoradiography, and fluorescent microscopy in the R3327-AT and FaDu rat tumor models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Apr 2005;61(5):1493-1502.
- Overgaard J, Horsman MR. Modification of Hypoxia-Induced Radioresistance in Tumors by the Use of Oxygen and Sensitizers. *Semin Radiat Oncol*. Jan 1996;6(1):10-21.

- Padhani AR. Where are we with imaging oxygenation in human tumours? *Cancer Imaging*. 2005;5:128-130.
- Padhani AR, Krohn KA, Lewis JS, Alber M. Imaging oxygenation of human tumours. *Eur Radiol*. Apr 2007;17(4):861-872.
- Papadopoulou MV, Ji M, Bloomer WD. Schedule-dependent potentiation of chemotherapeutic drugs by the bioreductive compounds NLCQ-1 and tirapazamine against EMT6 tumors in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. Aug 2001;48(2):160-168.
- Papadopoulou MV, Ji M, Bloomer WD, Hollingshead MG. Enhancement of the antitumor effect of cyclophosphamide with the hypoxia-selective cytotoxin NLCQ-1 against murine tumors and human xenografts. *J Exp Ther Oncol*. Sep-Oct 2002;2(5):298-305.
- Parliament M, Urtasun R. Misonidazole labeling as a marker of cellular hypoxia. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Implications for clinical radiooncology*. Springer Verlag, 1998.
- Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*. Jan-Apr 2000;2(1-2):62-70.
- Picchio M, Beck R, Haubner R, Seidl S, Machulla HJ, Johnson TD, Wester HJ, Reischl G, Schwaiger M, Piert M. Intratumoral spatial distribution of hypoxia and angiogenesis assessed by 18F-FAZA and 125I-Gluco-RGD autoradiography. *J Nucl Med*. Apr 2008;49(4):597-605.
- Piert M, Machulla H, Becker G, Stahlschmidt A, Patt M, Aldinger P, Dissmann PD, Fischer H, Bares R, Becker HD, Lauchart W. Introducing fluorine-18 fluoromisonidazole positron emission tomography for the localisation and quantification of pig liver hypoxia. *Eur J Nucl Med*. Feb 1999;26(2):95-109.
- Piert M, Machulla HJ, Becker G, Aldinger P, Winter E, Bares R. Dependency of the [18F]fluoromisonidazole uptake on oxygen delivery and tissue oxygenation in the porcine liver. *Nucl Med Biol*. Nov 2000;27(8):693-700.
- Piert M, Machulla HJ, Picchio M, Reischl G, Ziegler S, Kumar P, Wester HJ, Beck R, McEwan AJ, Wiebe LI, Schwaiger M. Hypoxia-specific tumor imaging with 18F-fluoroazomycin arabinoside. *J Nucl Med*. Jan 2005;46(1):106-113.
- Plowman J, Dykes DJ, Hollingshead M, Simpson-Herren L, Alley MC. Human tumor xenograft models in NCI drug development. In: Teicher B, ed. *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*. Totowa, NJ: Humana Press. 1997:101-125.
- Postema EJ, McEwan AJ, Riauka TA, Kumar P, Richmond DA, Abrams DN, Wiebe LI. Initial results of hypoxia imaging using 1-alpha-D: -(5-deoxy-5-[18F]-fluoroarabinofuranosyl)-2-nitroimidazole ([18F]FAZA). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Oct 2009;36(10):1565-1573.
- Prekeges JL, Rasey JS, Grunbaum Z, Krohn KH. Reduction of fluoromisonidazole, a new imaging agent for hypoxia. *Biochem Pharmacol*. Nov 1991;42(12):2387-2395.
- Prosnitz RG, Yao B, Farrell CL, Clough R, Brizel DM. Pretreatment anemia is correlated with the reduced effectiveness of radiation and concurrent chemotherapy in advanced head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 2005;61(4):1087-1095.
- Rajendran JG, Krohn KA. Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiol Clin North Am*. Jan 2005;43(1):169-187.
- Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, Peterson LM, Schwartz DL, Conrad EU, Spence AM, Muzi M, Farwell DG, Krohn KA. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*. Apr 2004;10(7):2245-2252.

- Rajendran JG, Wilson DC, Conrad EU, Peterson LM, Bruckner JD, Rasey JS, Chin LK, Hofstrand PD, Grierson JR, Eary JF, Krohn KA. [18F]FMISO and [18F]FDG PET imaging in soft tissue sarcomas: correlation of hypoxia, metabolism and VEGF expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. May 2003;30(5):695-704.
- Raleigh JA, Franko AJ, Koch CJ, Born JL. Binding of misonidazole to hypoxic cells in monolayer and spheroid culture: evidence that a side-chain label is bound as efficiently as a ring label. *Br J Cancer*. Feb 1985;51(2):229-235.
- Raleigh JA, Koch CJ. Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol*. Dec 1990;40(11):2457-2464.
- Raleigh JA, Dewhirst MW, Thrall DE. Measuring Tumor Hypoxia. *Semin Radiat Oncol*. Jan 1996;6(1):37-45.
- Raleigh JA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Ballenger CA, Weissler MC, Fowler WC, Jr., Novotny DB, Varia MA. Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res*. Sep 1998;58(17):3765-3768.
- Rasey JS, Grunbaum Z, Magee S, Nelson NJ, Olive PL, Durand RE, Krohn KA. Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiat Res*. Aug 1987;111(2):292-304.
- Rasey JS, Hofstrand PD, Chin LK, Tewson TJ. Characterization of [18F]fluoroetanidazole, a new radiopharmaceutical for detecting tumor hypoxia. *J Nucl Med*. Jun 1999;40(6):1072-1079.
- Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, Peterson LM, Lewellen TK, Graham MM, Krohn KA. Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [18F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Sep 1996;36(2):417-428.
- Rasey JS, Koh WJ, Grierson JR, Grunbaum Z, Krohn KA. Radiolabelled fluoromisonidazole as an imaging agent for tumor hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Nov 1989;17(5):985-991.
- Rasey JS, Nelson NJ, Chin L, Evans ML, Grunbaum Z. Characteristics of the binding of labeled fluoromisonidazole in cells in vitro. *Radiat Res*. Jun 1990;122(3):301-308.
- Reischl G, Dorow DS, Cullinane C, Katsifis A, Roselt P, Binns D, Hicks RJ. Imaging of tumor hypoxia with [124I]IAZA in comparison with [18F]FMISO and [18F]FAZA--first small animal PET results. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10(2):203-211.
- Reischl G, Ehrlichmann W, Bieg C, Kumar P, Wiebe LI, Machulla H-J. Synthesis of 18F-FAZA, a new tracer for hypoxia [abstract]. *J Nucl Med*. 2002;43(suppl):364.
- Reischl G, Ehrlichmann W, Bieg C, Solbach C, Kumar P, Wiebe LI, Machulla HJ. Preparation of the hypoxia imaging PET tracer [18F]FAZA: reaction parameters and automation. *Appl Radiat Isot*. Jun 2005;62(6):897-901.
- Riley RJ, Workman P. Enzymology of the reduction of the potent benzotriazine-di-N-oxide hypoxic cell cytotoxin SR 4233 (WIN 59075) by NAD(P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase (EC 1.6.99.2) purified from Walker 256 rat tumour cells. *Biochem Pharmacol*. Jan 1992;43(2):167-174.
- Rischin D, Hicks RJ, Fisher R, Binns D, Corry J, Porceddu S, Peters LJ. Prognostic significance of [18F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. *J Clin Oncol*. May 2006;24(13):2098-2104.
- Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:185-208.

- Rockwell SC, Kallman RF, Fajardo LF. Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue-culture-adapted derivative. *J Natl Cancer Inst.* Sep 1972;49(3):735-749.
- Rodrigues LM, Howe FA, Griffiths JR, Robinson SP. Tumor R2* is a prognostic indicator of acute radiotherapeutic response in rodent tumors. *J Magn Reson Imaging.* Apr 2004;19(4):482-488.
- Sauer R. Strahlenphysik. In: Kauffmann, Moser, Sauer. *Radiologie.* Verlag Urban und Fischer. 2001; 2. Auflage:7-30. (a)
- Sauer R. Strahlenbiologie. In: Kauffmann, Moser, Sauer. *Radiologie.* Verlag Urban und Fischer. 2001; 2. Auflage:31-58. (b)
- Sauer R. Strahlenpathologie. In: Kauffmann, Moser, Sauer. *Radiologie.* Verlag Urban und Fischer, 2001; 2. Auflage:59-84. (c)
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* Oct 2003;3(10):721-732.
- Siim BG, Menke DR, Dorie MJ, Brown JM. Tirapazamine-induced cytotoxicity and DNA damage in transplanted tumors: relationship to tumor hypoxia. *Cancer Res.* Jul 1997;57(14):2922-2928.
- Solomon B, McArthur G, Cullinane C, Zalberg J, Hicks R. Applications of positron emission tomography in the development of molecular targeted cancer therapeutics. *BioDrugs.* 2003;17(5):339-354.
- Soret M, Bacharach SL, Buvat I. Partial-volume effect in PET tumor imaging. *J Nucl Med.* Jun 2007;48(6):932-945.
- Sorger D, Patt M, Kumar P, Wiebe LI, Barthel H, Seese A, Dannenberg C, Tannapfel A, Kluge R, Sabri O. [18F]Fluoroazomycinarabinofuranoside (18FAZA) and [18F]Fluoromisonidazole (18FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumors. *Nucl Med Biol.* Apr 2003;30(3):317-326.
- Souvatoglou M, Grosu AL, Röper B, Krause BJ, Beck R, Reischl G, Picchio M, Machulla HJ, Wester HJ, Piert M. Tumour hypoxia imaging with [18F]FAZA PET in head and neck cancer patients: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Oct 2007;34(10):1566-1575.
- Stone HB, Brown JM, Phillips TL, Sutherland RM. Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. Summary of a workshop held November 19-20, 1992, at the National Cancer Institute, Bethesda, Maryland. *Radiat Res.* Dec 1993;136(3):422-434.
- Stratford IJ, Workman P. Bioreductive drugs into the next millennium. *Anticancer Drug Des.* Sep 1998;13(6):519-528.
- Sundfor K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer.* Sep 1998;78(6):822-827.
- Surti S, Karp JS, Perkins AE, Cardi CA, Daube-Witherspoon ME, Kuhn A, Muehllehner G. Imaging performance of A-PET: a small animal PET camera. *IEEE Trans Med Imaging.* Jul 2005;24(7):844-852.
- Sutherland RM. Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy. *Acta Oncol.* 1998;37(6):567-574.
- Taschereau R, Chow PL, Chatziioannou AF. Monte carlo simulations of dose from microCT imaging procedures in a realistic mouse phantom. *Med Phys.* Jan 2006;33(1):216-224.
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* Aug 2000;157(2):411-421.
- Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* Jun 1994;13(2):139-168.

- Teicher BA. Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematol Oncol Clin North Am.* Apr 1995;9(2):475-506.
- Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW, Frei E, 3rd. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science.* Mar 1990;247(4949):1457-1461. (a)
- Teicher BA, Herman TS, Kaufmann ME. Cytotoxicity, radiosensitization, and DNA interaction of platinum complexes of thiazin and xanthene dyes. *Radiat Res.* Feb 1990;121(2):187-195. (b)
- Teicher BA, Holden SA, Ara G, Dupuis NP, Liu F, Yuan J, Ikebe M, Kakeji Y. Influence of an anti-angiogenic treatment on 9L gliosarcoma: oxygenation and response to cytotoxic therapy. *Int J Cancer.* May 1995;61(5):732-737.
- Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* Jan 1981;41(1):73-81.
- Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* Dec 1955;9(4):539-549.
- Thorwarth D, Eschmann SM, Paulsen F, Alber M. A kinetic model for dynamic [18F]-Fmiso PET data to analyse tumour hypoxia. *Phys Med Biol.* May 2005;50(10):2209-2224. (a)
- Thorwarth D, Eschmann SM, Scheiderbauer J, Paulsen F, Alber M. Kinetic analysis of dynamic 18F-fluoromisonidazole PET correlates with radiation treatment outcome in head-and-neck cancer. *BMC Cancer.* 2005;5:152. (b)
- Urtasun R, Band P, Chapman JD, Feldstein ML, Mielke B, Fryer C. Radiation and high-dose metronidazole in supratentorial glioblastomas. *N Engl J Med.* Jun 1976;294(25):1364-1367.
- Urtasun RC, Chapman JD, Raleigh JA, Franko AJ, Koch CJ. Binding of 3H-misonidazole to solid human tumors as a measure of tumor hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jul 1986;12(7):1263-1267. (a)
- Urtasun RC, Koch CJ, Franko AJ, Raleigh JA, Chapman JD. A novel technique for measuring human tissue pO₂ at the cellular level. *Br J Cancer.* Sep 1986;54(3):453-457. (b)
- Valk PE, Mathis CA, Prados MD, Gilbert JC, Budinger TF. Hypoxia in human gliomas: demonstration by PET with fluorine-18-fluoromisonidazole. *J Nucl Med.* Dec 1992;33(12):2133-2137.
- Van Belle SJ, Cocquyt V. Impact of haemoglobin levels on the outcome of cancers treated with chemotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* Jul 2003;47(1):1-11.
- Van Vulpen M, Field C, Raaijmakers CP, Parliament MB, Terhaard CH, MacKenzie MA, Scrimger R, Lagendijk JJ, Fallone BG. Comparing step-and-shoot IMRT with dynamic helical tomotherapy IMRT plans for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Aug 2005;62(5):1535-1539.
- Varghese AJ, Gulyas S, Mohindra JK. Hypoxia-dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by Chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* Oct 1976;36(10):3761-3765.
- Vaupel P, Okunieff P, Kluge M. Response of tumour red blood cell flux to hyperthermia and/or hyperglycaemia. *Int J Hyperthermia.* Mar-Apr 1989;5(2):199-210. (a)
- Vaupel P, Okunieff P, Neuringer LJ. Blood flow, tissue oxygenation, pH distribution, and energy metabolism of murine mammary adenocarcinomas during growth. *Adv Exp Med Biol.* 1989;248:835-845. (b)
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* Dec 1989;49(23):6449-6465. (c)

- Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* Jun 15 1991;51(12):3316-3322.
- Vaupel P, Thews O, Höckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18:243-259.
- Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:10-17.
- Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:4-9.
- Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol.* 2004;381:335-354.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol.* Feb 2005;12(1):5-10.
- Vaupel P, Mayer A, Briest S, Höckel M. Hypoxia in breast cancer: role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion. *Adv Exp Med Biol.* 2005;566:333-342.
- Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Impact of hemoglobin levels on tumor oxygenation: the higher, the better? *Strahlenther Onkol.* Feb 2006;182(2):63-71.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* Jun 2007;26(2):225-239.
- Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal.* Aug 2007;9(8):1221-1235.
- Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist.* 2008;13 Suppl 3:21-26.
- Vaupel P. Prognostic potential of the pre-therapeutic tumor oxygenation status. *Adv Exp Med Biol.* 2009;645:241-246.(a)
- Vaupel P. Physiological Mechanisms of Treatment Resistance. In: Molls M, Vaupel P, Nieder C, Anscher MS, editors. *The Impact of Tumor Biology on Cancer Treatment and Multidisciplinary Strategies.* Springer Verlag Heidelberg. 2009:273-290. (b)
- Vera JC, Castillo GR, Rosen OM. A possible role for a mammalian facilitative hexose transporter in the development of resistance to drugs. *Mol Cell Biol.* Jul 1991;11(7):3407-3418.
- Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol.* Dec 2003;179(12):801-811.
- Walton MI, Workman P. Pharmacokinetics and bioreductive metabolism of the novel benzotriazine di-N-oxide hypoxic cell cytotoxin tirapazamine (WIN 59075; SR 4233; NSC 130181) in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* May 1993;265(2):938-947.
- Wang J, Biedermann KA, Brown JM. Repair of DNA and chromosome breaks in cells exposed to SR 4233 under hypoxia or to ionizing radiation. *Cancer Res.* Aug 1992;52(16):4473-4477.
- Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988;35:95-125.
- Wong TW, Whitmore GF, Gulyas S. Studies on the toxicity and radiosensitizing ability of misonidazole under conditions of prolonged incubation. *Radiat Res.* Sep 1978;75(3):541-555.
- Workman P, Brown JM. Structure-pharmacokinetic relationships for misonidazole analogues in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1981;6(1):39-49.

- Wouters A, Pauwels B, Lambrechts HA, Pattyn GG, Ides J, Baay M, Meijnders P, Dewilde S, Vermorcken JB, Lardon F. Chemoradiation interactions under reduced oxygen conditions: Cellular characteristics of an in vitro model. *Cancer Lett.* Dec 2009;286(2):180-188.
- Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorcken JB. Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions. *Oncologist.* Jun 2007;12(6):690-712.
- Wouters BG, Delahoussaye YM, Evans JW, Birrell GW, Dorie MJ, Wang J, MacDermed D, Chiu RK, Brown JM. Mitochondrial dysfunction after aerobic exposure to the hypoxic cytotoxin tirapazamine. *Cancer Res.* Jan 2001;61(1):145-152.
- Yang DJ, Wallace S, Cherif A, Li C, Gretzer MB, Kim EE, Podoloff DA. Development of F-18-labeled fluoroerythronitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia. *Radiology.* 1995;194:795-800.
- Yeh SH, Liu RS, Wu LC, Yang DJ, Yen SH, Chang CW, Yu TW, Chou KL, Chen KY. Fluorine-18 fluoromisonidazole tumour to muscle retention ratio for the detection of hypoxia in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Nucl Med.* 1996; 23:1378-1383.
- Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol.* Feb 2009;45(2):109-115.
- Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* Dec 1988;85(24):9533-9537.
- Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* Aug 2001;98(17):9630-9635.
- Zanzonico P, O'Donoghue J, Chapman JD, Schneider R, Cai S, Larson S, Wen B, Chen Y, Finn R, Ruan S, Gerweck L, Humm J, Ling C. Iodine-124-labeled iodo-azomycin-galactoside imaging of tumor hypoxia in mice with serial microPET scanning. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Jan 2004;31(1):117-128.
- Zeman EM, Brown JM. Pre- and post-irradiation radiosensitization by SR 4233. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Apr 1989;16(4):967-971.
- Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, Hirst VK, Lee WW. SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jul 1986;12(7):1239-1242.
- Zeman EM, Hirst VK, Lemmon MJ, Brown JM. Enhancement of radiation-induced tumor cell killing by the hypoxic cell toxin SR 4233. *Radiother Oncol.* Jul 1988;12(3):209-218.
- Zeman EM, Lemmon MJ, Brown JM. Aerobic radiosensitization by SR 4233 in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jan 1990;18(1):125-132.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* Nov 1999;59(22):5830-5835.

8. *Abbildungsverzeichnis*

- Abb. 1: Darstellung der Entstehung einer chronischen Gewebehypoxie (Hall und Giaccia, 2006)
- Abb. 2: Hypoxieinduzierte direkte und indirekte Mechanismen der Entwicklung einer Therapieresistenz (nach Vaupel, 2009 (b))
- Abb. 3: Radiosensibilität von Tumorzellen als Funktion des Gewebe-pO₂ (nach Vaupel)
- Abb. 4: Messmethoden der Gewebeoxygenierung
- Abb. 5: Schema des proteosomalen Abbaus bzw. der Wirkung von HIF-1 α : In Anwesenheit von O₂ wird HIF-1 α abgebaut (linker Schenkel); unter hypoxischen Bedingungen (rechter Schenkel) heterodimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β und bindet an HRE-Domänen zur Transkription zahlreicher Hypoxieproteine (aus Krohn et al., 2008).
- Abb. 6: Chemische Formel von Pimonidazol-Hydrochlorid (Hypoxyprobe™)
- Abb. 7: Strukturformel [Cu]ATSM
- Abb. 8: Intrazellulärer Metabolismus der Nitroimidazolderivate
- Abb. 9: Strukturformel [¹⁸F]FMISO
- Abb. 10: Strukturformel [¹⁸F]FAZA
- Abb. 11: Mikroskopische Nativaufnahme der langen, spindelförmigen, in Faszikeln liegenden EMT6-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular).
- Abb. 12: Darstellung der Reaktion zur Synthese von 1-(5-[¹⁸F]luoro-5-deoxy- α -D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazol ([¹⁸F]FAZA) durch nukleophile Substitution und anschließender Hydrolyse (Reischl et al., 2002).
- Abb. 13: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs
- Abb. 14: Lagerung einer Swiss nu/nu-Maus im MOSAIC™-Kleintier-PET.
- Abb. 15: Positionierung der Mäuse zur Bestrahlung bzw. Scheinbestrahlung.
- Abb. 16: Biodistribution (% ID/g) von [¹⁸F]FAZA zu den Zeitpunkten 5, 60 und 120 min p.i. an EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Mäusen (n = 2 pro Zeitpunkt).

- Abb. 17: Zwei [¹⁸F]FAZA-PET-Scans im Abstand von 10 Tagen: Typische [¹⁸F]FAZA-Verteilung in einer Swiss nu/nu-Maus mit EMT6-Tumor am rechten Hinterlauf (Pfeile). In Bild B findet sich ein deutlich gewachsener Tumor, der [¹⁸F]FAZA akkumuliert. Aufgrund der hepatobiliären Elimination von [¹⁸F]FAZA zeigt sich neben der tumoralen [¹⁸F]FAZA-Akkumulation auch eine deutliche Anreicherung im Bereich der Leber und des Darms.
- Abb. 18: T/B-Quotienten der zwei separaten [¹⁸F]FAZA-PET-Messungen: Jeweils ein übereinander liegendes Wertepaar mit einer blauen Raute (Tag 0) und einem violetten Quadrat (Tag 3) bezeichnet das T/B-Verhältnis an zwei separaten sequentiellen [¹⁸F]FAZA-PET-Scans binnen drei Tage an insgesamt zwölf untersuchten Mäusen mit EMT6-Tumoren. Die Diskriminierungsschwelle von 1,97 ist gestrichelt eingezeichnet.
- Abb. 19: Korrelation der T/B-Verhältnisse an Messtag 0 und 3: Eine geringfügige Tendenz zu höheren T/B-Quotienten an Tag 3 war zu erkennen, die sich jedoch mit größeren T/B-Werten verminderte. Ein Zusammenhang zwischen höheren T/B-Werten mit der Kollektiv- bzw. Gruppenzugehörigkeit oder dem Tumorgewicht konnte nicht gefunden werden.
- Abb. 20: T/B-Verhältnis im [¹⁸F]FAZA-PET vor und nach Therapie bzw. im natürlichen Verlauf bei der Kontrollgruppe an normoxischen (A) und hypoxischen (B) Tumoren.
- Abb. 21: Sonographische Darstellung eines EMT6-Tumors am rechten Hinterlauf einer Swiss nu/nu-Maus (B-mode). Die Tumorgrenzen sind sehr gut erkennbar, im Unterschied zur alternativen Messung mittels Schublehre konnte die den Tumor umgebende Haut und Weichteilgewebe in der Volumenbestimmung abgegrenzt werden. Zentral ist deutlich eine echoarme Nekrose zu erkennen.
- Abb. 22: Wachstumsdauer von 70 µl bis 500 µl in Tagen geordnet nach Therapiegruppen und prätherapeutischem Oxygenierungsstatus gemäß [¹⁸F]FAZA-Aufnahme. Der Interquartilsabstand zwischen Unter- (1. Quartil) und Obergrenze (3. Quartil) der Box entspricht den mittleren 50 % der Wachstumszeit. Die Antennen stellen den Minimal- bzw. Maximalwert dar. Ausreißer, definiert als Werte zwischen 1,5 und 3 Boxlängen unter- bzw. oberhalb der Unter- bzw. Obergrenze der Box, und Extremwerte, definiert als Werte > 3 Boxlängen unter- bzw. oberhalb der Unter- bzw. Obergrenze der Box, sind mit „o“ bzw. „*“ gekennzeichnet. Der Median (schwarze Linie) teilt das Kollektiv so, dass sich je 50 % der Beobachtungen oberhalb und unterhalb des Wertes befinden.
- Abb. 23: Wachstumsverzögernder Effekt (Growth Delay) der Therapie mit CT und/oder Radiotherapie auf das normoxische bzw. hypoxische Tumorkollektiv; dargestellt ist der Mittelwert (± SD) des *absolute Growth Delay (aGD)* durch Therapie mit CT, RT bzw. RCT.
- Abb. 24: Wachstumskurven der normoxischen (A) und hypoxischen (B) EMT6-Tumoren für die drei verschiedenen Therapieformen und ohne Therapie. Aufgetragen ist der Mittelwert der Volumenzunahme relativ zum Therapieeingangsvolumen (= 100 %) als eine Funktion der Zeit (in Tagen)

nach Therapiebeginn geordnet nach Therapiegruppen. Zur besseren Orientierung sind die Wachstumskurven der unbehandelten Tumoren des jeweils anderen Kollektivs ebenfalls eingezeichnet.

- Abb. 25: MRT einer EMT6-tragenden Swiss nu/nu-Maus im transversalen, coronalen und sagittalen Schnitt. In den T₂-gewichteten Aufnahmen ist der Tumor am rechten Hinterlauf gut vom umgebenden stark hyperintensiven Unterhautfettgewebe sowie der anliegenden hypointensen Muskulatur abzugrenzen. Flüssiger Darminhalt stellte sich in der T₂-Wichtung hyperintens, luftgefüllte Darmschlingen dagegen hypointens dar.
- Abb. 26: Die Autoradiographie von Tumor- und Muskelschnitten mit jeweils [¹⁸F]FAZA (A) und [¹⁸F]GalactoRGD (B). Die Tumorschnitte visualisieren die intratumorale Heterogenität der Tracerverteilung: Während [¹⁸F]FAZA in den hypoxischen Randbereichen des Tumors angereichert hat, findet sich die [¹⁸F]GalactoRGD-Akkumulation im gesamten Tumorschnitt. Jeweils direkt über dem [¹⁸F]FAZA- (A) bzw. [¹⁸F]GalactoRGD- (B) anreichernden Tumor ist das jeweils zugehörige Muskelgewebe (weiße Pfeile) abgebildet: Darin zeigt sich fast keine Traceraufnahme.
- Abb. 27: [¹⁸F]FAZA-Autoradiographie (A) und immunhistochemische HIF-1 α -Färbung (braune Kernfärbung) (B) (in 100facher Vergrößerung, Okular x Objektiv) an einem hypoxischen (obere Reihe) und normoxischen EMT6-Tumor (untere Reihe).
- Abb. 28: Pimonidazol- (A) und HIF-1 α - (B) Färbung an zwei EMT6-Tumoren (in 20facher bzw. 10facher (obere Reihe) bzw. 60facher (untere Reihe) Vergrößerung, Okular x Objektiv): Die rote Pimonidazol-Plasmafärbung wie auch die braune HIF-1 α -Kernfärbung fand sich vornehmlich in den hypoxischen Zellen, die an Nekrosezonen (Pfeile) angrenzten.

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung der antagonisierbaren Narkose	12
Tab. 2:	Protokoll des immunhistochemischen Nachweises von Pimonidazol	13
Tab. 3:	Protokoll des immunhistochemischen Nachweises von HIF-1 α	14
Tab. 4:	Biodistribution von [^{18}F]FAZA in %ID/g Gewebe (\pm SD) zu den Zeitpunkten 5, 60 und 120 min p.i. (n = 2 pro Zeitpunkt)	15
Tab. 5:	Größen der Kontroll-, CT-, RT-, RCT-Gruppe	16
Tab. 6:	Verlauf des T/B-Verhältnisses unter der jeweiligen Therapie bzw. Scheintherapie. Für die Prozentangabe wurde der jeweilige Gruppenmittelwert der prätherapeutischen T/B-Quotienten mit dem posttherapeutischen T/B-Gruppenmittelwert ins Verhältnis gesetzt.	17
Tab. 7:	Übersicht über das Tumorwachstum von 70 – 500 μl in Tagen, <i>aGD</i> und <i>log cell kill</i> im normoxischen und hypoxischen Kollektiv	18

10. Abkürzungsverzeichnis

%ID/g	Prozent der injizierten Aktivität (injected dose) pro Gramm Gewebe
°C	Grad Celsius
10T1/2	Tumorzelllinie muriner embryonaler Fibroblasten
2-DG	2-Deoxy-Glukose, Glukoseanalogon
2D/3D	zwei-/dreidimensional
3D-CRT	three-dimensional conformal radiotherapy
5-FU	5-Fluorouracil
A549	Tumorzelllinie eines humanen Adenocarcinoms alveolärer Epithelzellen
Abb.	Abbildung
ADM	Adrenomedullin (Peptid der Angiogenese)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AG	Aktiengesellschaft
Ag	Silber
AG1522	Tumorzelllinie humaner Hautfibroblasten
aGD	absolute Growth Delay
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata
AR42J	Pankreaskarzinom-Zelllinie der Ratte
ATSM	Diacetyl-bis(N4)-methylthiosemicarbazol
B	background (Referenz- oder Hintergrundgewebe)
BALB/c	Bagg Albino: Mauszuchtlinie zu Forschungszwecken
bFGF	basic fibroblast growth factor
BOLD-MRT	Blood oxygenation level-dependent MRT
Bq	Becquerel (1 Bq = 1 radioaktiver Zerfall pro Sekunde)
Br	Brom
C	Kohlenstoff
C	mittlere Dauer des Tumorwachstums
C ₃ H	muriner Mammatumor
Ca	Calcium-Ionen
CA	State of California
CA IX	Carboanhydrase IX
CDS	color pixel density
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	counts per minute (= Zählrate pro Minute)
CT	Computertomographie/Computertomogramm
CT	Chemotherapie
Cu	Kupfer
d	Tag

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCE-MRT	dynamic contrast-enhanced Magnetresonanztomographie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid, Einfriermedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT-Diaphorase	NAD(P)H:Quinon-Oxidoreduktase
DTPA	Diethylenetriamin-Pentaessigsäure = Gadopentetat-Dimeglumin
DTS	Dithiosemicarbazone
e ⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF5	2(2-nitro-1-H-imidazol-1-yl)-(N-2,2,3,3,3-pentfluoropropyl)azetamid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT6	Tumorzelllinie eines murinen Mammaadenokarzinoms
EPO	Erythropoetin
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
F	Fluor
FaDud	Tumorzelllinie eines humanen Kopf-Hals-Tumors
FAZA	Fluoroazomyzin-Arabinosid
FDG	Fluorodeoxyglucose
FETA	Fluoroetanidazol
FETNIM	Fluoroerythronitroimidazol
FKS	fetales Kälberserum
FMISO	Fluoromisonidazol
FOV	Field of View
FWHM	full width at half maximum
G	Gauge
g	Gramm
GalactoRGD	Galaktose-gekoppelte Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin
GBq	Giga-Becquerel
Gd	Gadolinium
ggf.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLUT-1	glucose transporter type 1
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
GSO	Germanium-Oxyorthosilikat
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA-1	Tumorzelllinie eine murinen Hepatomas A
HBO	hyperbaric oxygen: Hyperbare Sauerstoff-Therapie
HCT-8	Tumorzelllinie eines humanen intestinalen Adenokarzinoms
HeLa	Tumorzelllinie eines humanen Zervixkarzinoms
HIF-1(α/β)	hypoxia inducible factor (Untereinheiten α und β)
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma; Tumorzelllinie
HO ₂ [·]	Peroxidradikale
HO ₂ [·]	Hydroperoxyl-Radikal
HRE	hypoxia response elements

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HWZ	physikalische Halbwertszeit
I	Jod
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IAZA	Iodoazomyzin-Arabinosid
IAZG	Iodoazomyzin-Galaktosid
IGF-2	insulin-like growth factor 2
IGF-BP 1-3	insulin-like growth factor binding protein
IgG	Immunglobulin G
IMRT	intensity-modulated radiotherapy
K ₂ CO ₃	Kaliumkarbonat
keV	Kiloelektronenvolt
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KHJJ	Tumorzelllinie des murinen Mammasarkoms
KHT	Kopf-Hals-Tumor
KHT/Ro	Tumorzelllinie eines murinen Sarkoms
km	Kilometer
Ko	Kontrollgruppe
K _{ow}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
kV	Kilovolt
LD ₁₀ /LD ₅₀ /LD ₉₀	Letale Dosis: Statistisch errechnete Einzeldosis einer Substanz, die bei 10/50/90% einer Prüfgruppe von Testorganismen tödlich wirkt
m	Meter
M.O.M. TM	Mouse Ig Blocking Reagent
M/B-Verhältnis	Muskel/Blut-Verhältnis
Mab	monoklonal antibody: monoklonaler Antikörper
MBq	Mega-Becquerel
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MRT/MRI	Magnetresonanztomographie/Magnetic Resonance Imaging
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ns	Nanosekunde
NSCLC	Non small cell Lung Cancer; Bronchialkarzinom
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{·-}	Peroxid-Anion

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

OH [·]	Hydroxyl-Radikal
p	p-Wert (Signifikanzwert; von engl. <i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit)
p.i.	post iniectionem
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate-buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie/-gramm
PET/CT	kombiniertes PET- und CT-Gerät
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PTSM	Pyruvaldehyde-di-(N ₄ -methylthiosemicarbazone)
PVE	Patialvolumeneffekt
r ²	Bestimmtheitsmaß
R3327-AT	Tumorzelllinie eines anaplastischen Ratten-Prostatakarzinoms
RAMLA	Row Action Maximum Likelihood Algorithm
RCT	kombinierte Radiochemotherapie
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin
RIF-1	Tumorzelllinie eines murinen Fibrosarkoms
ROI	region of interest
RT	Radiotherapie
RT	Raumtemperatur
SCCVII	Tumorzelllinie des murinen squamous cell carcinoma VII
SCLC	Small Cell Lung Cancer; Bronchialkarzinom
SD	standard deviation/Standardabweichung
sGD	spezific growth delay
SiHa	Tumorzelllinie des humanen Zervixkarzinoms
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPSS	Superior Performing Software System
SR 4233	siehe TPZ
Std.Dev.	standard deviation/Standardabweichung
SUV	standardized uptake value
Swiss nu/nu	athyme nackte Mauszuchtlinie zu Forschungszwecken
T	Dauer (time) des Tumorwachstums
T/B	Tumor zu Hintergrund (background)-Verhältnis
T/M	Tumor zu Muskel-Verhältnis
T ₁	Spin-Gitter-Relaxationszeit der MRT
T ₂	Spin-Spin-Relaxationszeit der MRT
Tab.	Tabelle
Tc	Technetium
Td	doubling time: mittlere Verdopplungszeit
TGF- α/β	transforming growth factor α/β
TNM	tumor node metastases (Tumor-Staging-Klassifikation)
TPZ	Tirapazamin (= Tirazone TM = 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxid = SR4233 = WIN59075)
TR	Repetitionszeit bei der MRT
TUM	Technische Universität München
U/min	Umdrehungen pro Minute
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UT-SCC-33	Tumorzelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle
V	Volt

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen
$\alpha_v\beta_3$	Zelladhäsionsmolekül Integrin
β^-	Elektron
β^+	Positron
μA	Mikroampere (10^{-6} Ampere)
μg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
μm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
μmol	Mikromol (10^{-6} mol)

11. Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Begleitung meiner Dissertation in ihrem Labor, für ihre Begeisterung und Begeisterungsfähigkeit für die Nuklearmedizin, für ihre Unterstützung und die Möglichkeit, unsere Resultate auf internationalen Kongressen vorzustellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Roswitha Beck und meiner Teamkollegin Frau Dr. Janette Maria Carlsen für die fruchtbare Zusammenarbeit, die fruchtbaren Diskussionen und die Ermutigungen, für ihren Einsatz und für ihre Loyalität.

Ebenso danke ich

- Herrn PD Dr. Morand Piert für die Ideen und die motivierenden Diskussionen über die Distanz hinweg,
- Frau PD Dr. Barbara Röper und Herrn PD Dr. Nikolaus Andratschke für die kollegiale Zusammenarbeit,
- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Herrn Dr. Christof Seidl und Frau Dr. Birgit Pfof für ihre offene und freundliche Aufnahme, für ihre Hilfsbereitschaft und ihr stets offene Ohr für alle Fragen, die in der Laborarbeit auftauchen,
- Herrn Dr. Marc Huisman und Herrn Dr. Axel Weber für die Unterstützung bei der PET,
- Frau Sybille Reder für ihren Einsatz und ihre Flexibilität bei unseren [¹⁸F]FAZA-Nachtschichten und
- Herrn Professor Dr. Fridtjof Nüsslin und Herrn Professor Dr. Peter Vaupel für die interessanten und weiterführenden Gespräche und Ideen, die mir Einblick in das große faszinierende Feld der Hypoxie eröffnet haben.

Von Herzen danke ich meinem Freund Dr. Sebastian Müller und meiner Familie, die mich immer unterstützt und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.