



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie

Klinikum Rechts der Isar

Direktor: Prof. Dr. M. R. Makowski

**Prädiktion des histopathologischen Gradings hepatozellulärer  
Karzinome durch die Kombination von  $^{18}\text{F}$ FDG-PET/CT und  
DCE-MRT in einem translationalen Rattenmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der medizinischen Fakultät der  
Technischen Universität München

vorgelegt von

Marie Sophie Elisabeth Hörl

Fakultät für Medizin

Prädiktion des histopathologischen Gradings hepatozellulärer Karzinome durch die Kombination von  $^{18}\text{F}$ FDG-PET/CT und DCE-MRT in einem translationalen Rattenmodell

Marie Sophie Elisabeth Hörl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. S. Thorban

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rickmer Braren
2. Priv.-Doz. Dr. Georgios Kaissis

Die Dissertation wurde am 17.01.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.08.2023 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Januar 2020 unter dem Titel „*Combined DCE-MRI- and FDG-PET enable histopathological grading prediction in a rat model of hepatocellular carcinoma.*“ im European Journal of Radiology publiziert.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das hepatozelluläre Karzinom</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Klassifikation .....	5
1.1.3	Diagnostik .....	5
1.1.4	Therapie .....	7
<b>1.2</b>	<b>Angewandte bildgebende Verfahren</b> .....	<b>12</b>
1.2.1	PET/CT .....	12
1.2.2	MRT.....	14
<b>1.3</b>	<b>Ziel der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Tumormodell und Tierprotokoll</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Datenakquisition und Bildrekonstruktion</b> .....	<b>18</b>
2.2.1	Ablauf PET/CT .....	18
2.2.2	Ablauf DCE-MRT .....	19
2.2.3	Einbettung Leber.....	20
<b>2.3</b>	<b>Analyse der Bildgebung</b> .....	<b>21</b>
2.3.1	Auswertung PET Bilder.....	21
2.3.2	Auswertung MRT Bilder .....	22
<b>2.4</b>	<b>Histologie</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>30</b>
4.1	Ergebnisse .....	30
4.2	Tiermodell.....	31
4.3	Tumormetabolismus .....	33
4.4	Vorteile einer nichtinvasiven Diagnostik .....	34
4.5	Limitationen.....	35
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>52</b>

<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>54</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

AUC: Area Under Curve

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer

CT: Computertomographie

DCE-MRI: Dynamic, Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging

DEN: Diethylnitrosamin

DWI: Diffusion Weighted Imaging

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

FDA: Food and Drug Administration

FDG-PET: <sup>18</sup>Fluorine-Desoxyglucose Positron Emission Tomography

FOV: Field of View

G: Grading

HBV: Hepatitis B Virus

HCC: Hepatozelluläres Karzinom

HCV: Hepatitis C Virus

L1: Euclidean Vector Norm

MRT: Magnetresonanztomographie

NAFLD: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

NASH: Nicht-alkoholische Steatohepatitis

OSEM: Ordered Subset Expectation Maximisation

PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCA: Principal Component Analysis

PFA: Paraformaldehyd

ROC: Receiver-Operator Characteristic

ROC-AUC: Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve

ROI: Region of Interest

SENSE: Sensitivity Encoding

SMOTE: Synthetic Minority Oversampling Technique

SUV: Standard Uptake Value

UICC: Union international contre le cancer

Voxel: Volume picture element

WHO: World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt einen der häufigsten Tumore weltweit dar (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2015; McGlynn et al., 2021). Trotz signifikanter Fortschritte in Bereichen der Prävention und fortschrittlicher therapeutischer Möglichkeiten, stiegen Inzidenz und Mortalität dieses Tumors zuletzt weltweit weiter an (Ayuso et al., 2018; Bray et al., 2018; Petrick et al., 2020). Vor dem Hintergrund der medizinischen und sozioökonomischen Herausforderungen gilt es unser bisheriges Verständnis über diese Krankheit stets zu hinterfragen und neue Erkenntnisse zu gewinnen (Forner et al., 2018).

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Globale Datenbanken und Register ermöglichen heutzutage den Zugang zu einer Vielzahl von krankheitsspezifischen Informationen und geben einen Überblick über weltweite Inzidenzen, Mortalitäten und Prävalenzen verschiedener Pathologien (Lemarchand et al., 2017; Sung et al., 2021). Die Globocan der WHO stellt dabei eine der umfassendsten Datenbanken zu Tumorerkrankungen dar, und enthält die epidemiologischen Informationen von 36 unterschiedlichen Karzinomen in bis zu 185 Ländern der Welt. Laut Globocan stellte das HCC im Jahre 2020 mit

ca. 830.000 von insgesamt ca. 10 Millionen Todesfällen nach dem Bronchial- und Kolorektal-  
karzinom die dritthäufigste karzinombedingte Todesursache dar (Sung et al., 2021).

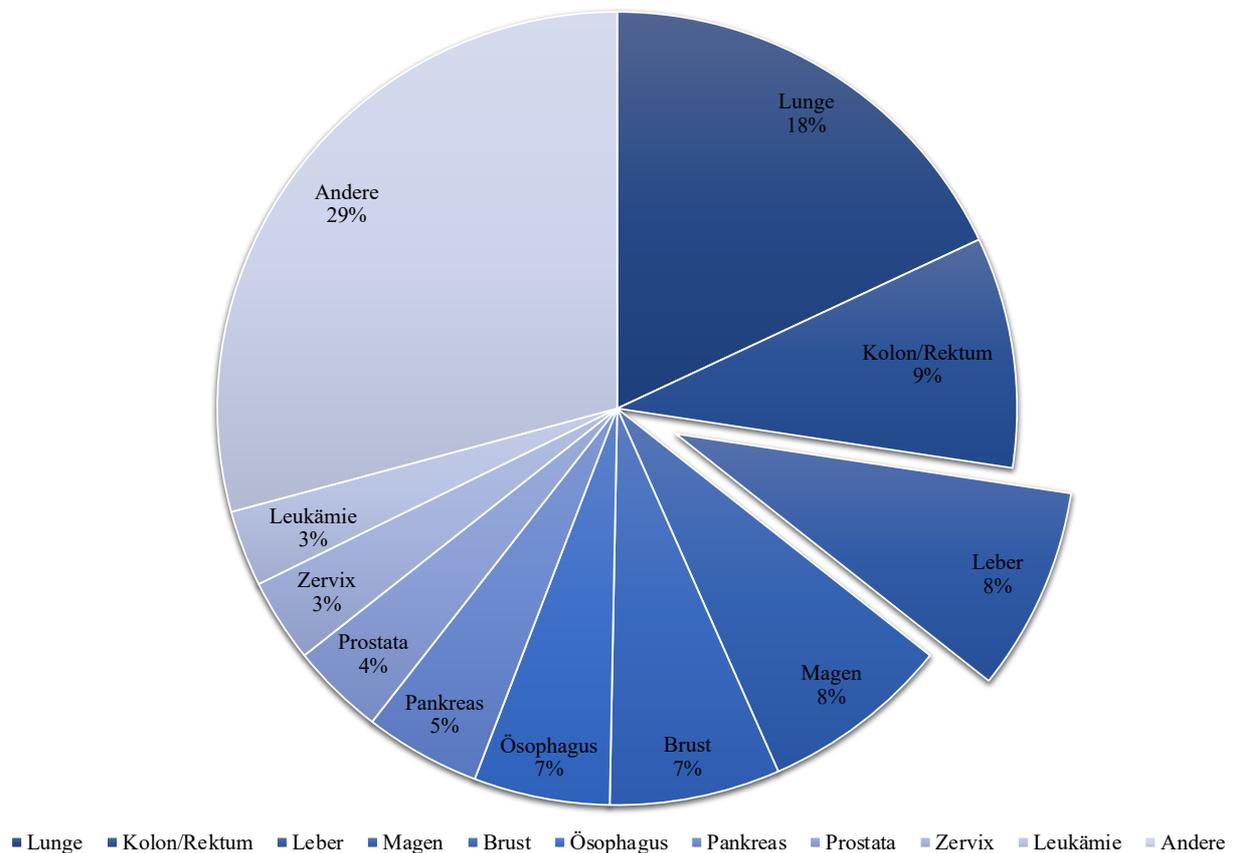


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der weltweiten karzinombedingten Todesfälle im Jahr 2020.(Sung et al., 2021)

Hinsichtlich des Auftretens des HCC zeigen sich besonders geschlechterspezifische und geografische Unterschiede. So weisen Männer ein zwei- bis dreifach höheres Risiko auf, an einem HCC zu erkranken und daran zu versterben (Bray et al., 2018). Wenngleich die Ursache hierfür nicht abschließend geklärt ist, wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Prävalenz unter Männern auf das vermehrte Auftreten verschiedener Risikofaktoren wie virale Hepatitiden, Nikotinabusus und Alkoholkonsum zurückzuführen ist (Petrick et al., 2020). Darüber hinaus wird angenommen, dass epigenetische Faktoren sowie geschlechterspezifische Unterschiede im

Hormonhaushalt einen Einfluss auf die erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit des HCC bei Männern haben (Dorak & Karpuzoglu, 2012).

Neben den geschlechterspezifischen Unterschieden bestehen zudem erhebliche geographische Unterschiede hinsichtlich des Auftretens hepatozellulärer Karzinome. So geht aus einem Artikel im New England Journal of Medicine aus dem Jahr 2011 hervor, dass eine steigende Prävalenz des HCC zuletzt vor allem in Entwicklungsländern beobachtet werden konnte (El-Serag, 2011). Generell ergeben sich Cluster für das Auftreten dieser Karzinome besonders in Nord- und Westafrika sowie in Ost- und Südostasien, wobei China mit ca. 50 % der Krankheits- und Todesfälle das weltweit am stärksten betroffene Land darstellt (Torre et al., 2015).

Die verschiedenen geographischen Verteilungsmuster lassen sich maßgeblich durch die jeweils vorherrschenden individuellen und umweltbedingten Risikofaktoren in diesen Regionen erklären. Bei den individuellen Risikofaktoren spielen besonders Erkrankungen mit dem Hepatitis Virus eine Rolle, da diese bei chronischen Verläufen und einer unzureichenden Therapie einen Risikofaktor für die Entstehung eines HCC darstellen. So sind in Teilen Asiens und Afrikas vor allem chronische Hepatitis B Virus-(HBV) und Hepatitis C Virus- (HCV) Infektionen für einen Großteil der HCC Erkrankungen verantwortlich (Mazzanti, Arena, & Tassi, 2016). Außerdem wird die Kontamination von Nahrungsmitteln mit Aflatoxin, einem natürlich vorkommendem Mykotoxin, mit dem Auftreten von Leberkarzinomen in Verbindung gebracht, wenn auch der Stellenwert bisher unbekannt ist (Torre et al., 2015). Aflatoxin wird unter anderem von dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus* gebildet und kommt in feucht warmen Klimazonen vor. Er ist häufig im Boden angesiedelt und kontaminiert somit weltweit die Ernte von beispielsweise Reis, Mais und Erdnüssen. Insbesondere in ärmeren Ländern, wo eine adäquate Lagerung von Lebensmitteln nicht durchführbar ist, kann sich der Befall mit Aflatoxin ausbreiten (Rushing & Selim, 2019). Die Bedeutung mancher dieser Risikofaktoren wird besonders am Beispiel Chinas deutlich: Hier konnte erfreulicherweise durch eine zunehmende Immunisierung der Bevölkerung gegen das HBV und durch die Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe gegen das

HCV, wie beispielsweise Sofosbuvir, dazu beigetragen werden, dass chronische Virusinfektionen in der Primärprävention verhindert, oder im Verlauf erfolgreich therapiert werden können, und somit der Entstehung von HCC entgegengewirkt werden kann. Außerdem ist davon auszugehen, dass die stete Verbesserung der hygienischen Umstände in den letzten Jahren weiter zu dem Rückgang an HCC Erkrankungen beigetragen hat (Torre et al., 2015).

Im Gegensatz zu vielen dieser Entwicklungsländern ist das Auftreten des HCC in den entwickelten Industrieländern wie Deutschland oder anderen westlichen Nationen, vordergründig mit Lebererkrankungen wie der äthyltoxischen Leberzirrhose und der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) assoziiert (Marengo et al., 2016). Während die äthyltoxische Leberzirrhose auf einen exzessiven Alkoholkonsum zurückzuführen ist, entsteht die NAFLD häufig durch Adipositas und Diabetes Mellitus Typ 2. Pathophysiologisch unterscheidet man hinsichtlich der NAFLD zwischen Steatose und nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH), wobei letztere wiederum zu einer Fibrosierung und darauffolgend zur Zirrhose führen kann.

Parallel dazu führten besonders in den USA auch der zunehmende i.v. Drogenabusus erneut zu steigenden Inzidenzen der HCV-Infektionen. In Kombination mit einer Zunahme von Adipositas und Diabetes Mellitus Typ 2 ist dort eine steigende Inzidenz des HCC zu verzeichnen (Ascha et al., 2010; Torre et al., 2015).

In Deutschland stellen der übermäßige Alkoholkonsum aber nach wie vor auch chronische HCV Infektionen die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines HCC dar. Zusätzlich rücken die NAFLD in Folge von Typ 2 Diabetes Mellitus oder einem metabolischem Syndrom bzw. Adipositas als Risikofaktoren immer mehr in den Vordergrund (*Krebs in Deutschland*, 2017). Typ 2 Diabetes Mellitus Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung zunehmend eine Insulinresistenz. Dadurch werden inflammatorische Prozesse zur Entwicklung einer NASH in Gang gesetzt, welche somit auch für die Entwicklung eines HCC von Relevanz sind. Die Steatose kann sowohl in Zusammenhang mit chronischen HCV Infektionen, als auch mit erhöhten BMI-Werten in Verbindung gebracht werden. Das Vorhandensein einer Steatose erhöht das Risiko

an HCC zu erkranken um über das Zweifache im Vergleich zu Patienten, welche keine Steatose aufweisen (Starley et al., 2010).

### 1.1.2 Klassifikation

Wie bei den meisten Tumoren üblich, erfolgt auch beim HCC die Einteilung anhand der TNM Klassifikation, respektive anhand der Klassifikation der *union internationale contre le cancer* (UICC). Wie in Tabelle 1 abgebildet, richtet sich dabei die ordinale Einstufung der Tumoren nach Größe und Anzahl der Tumorherde (T1-3/I-III), Befallsmuster der Lymphknoten (L0-1/IVA) sowie dem Vorhandensein von Metastasen (M0-1/IVB) (Brierley et al., 2016).

Tabelle 1: TNM Klassifikation (8. Version) und Stadieneinteilung nach der UICC. T: Tumorausdehnung N: Lymphknotenbefall M: Metastasierung. (Brierley et al., 2016).

TNM	Befund	UICC Stadium
T1a	Einzelner Tumor $\leq$ 2cm mit oder ohne Gefäßinvasion	IA
T1b	Einzelner Tumor $>$ 2cm ohne Gefäßinvasion	IB
T2	Einzelner Tumor $>$ 2cm mit Gefäßinvasion oder multiple Tumore $\leq$ 5cm	II
T3	Multiple Tumore $>$ 5cm ohne Gefäßinvasion	IIIA
T4	Tumor mit Gefäßeinbruch in die Portal- oder Lebervene und Penetration in extrahepatisches Gewebe bzw. Perforation	IIIB
N0	Kein Befall lokoregionärer Lymphknoten	
N1	Befall lokoregionärer Lymphknoten	IVA
M0	Keine Fernmetastasierung	
M1	Fernmetastasierung	IVB

### 1.1.3 Diagnostik

Der Therapieerfolg und die Prognose von HCC-Erkrankungen sind maßgeblich von dem Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängig, da nur bei einer frühzeitigen Diagnosestellung potentiell kurative Therapieverfahren wie die Lebertransplantation, Leberteileresektionen oder ablativ Verfahren angewendet werden können (Waghray et al., 2015). Dabei kommen Screening-Verfahren bei der Früherkennung dieser Tumore große Bedeutung zu. Deren Einsatz ist bei allen Patienten mit kompensierter Leberzirrhose (CHILD A und B), unabhängig von der Genese der

Zirrhose, indiziert, da das jährliche Erkrankungsrisiko für HCC bei Vorliegen einer Leberzirrhose bei 2-4% liegt. Bei fortgeschrittener Leberzirrhose (CHILD C) ist ein Screening aufgrund fehlender therapeutischer Konsequenz nicht indiziert (Frenette et al., 2019). Neben Zirrhose Patienten werden auch Patienten mit aktiver HBV-Infektion oder chronischer HCV-Infektion und Leberfibrose regelmäßige Screenings empfohlen. Ein halbjährliches Screeningintervall zeigte sich bezüglich der Früherkennung und des Überlebens in diesen Patientengruppen als besonders effektiv (Llovet et al., 2012). Das Verfahren der Wahl stellt hierbei die Sonographie dar (Abb. 2). Als nichtinvasives, kostengünstiges und gut verfügbares diagnostisches Mittel weist die Sonographie zudem eine Sensitivität zwischen 60-80 % sowie eine Spezifität von über 90% für die Erkennung eines HCC auf (Durst et al., 2015).

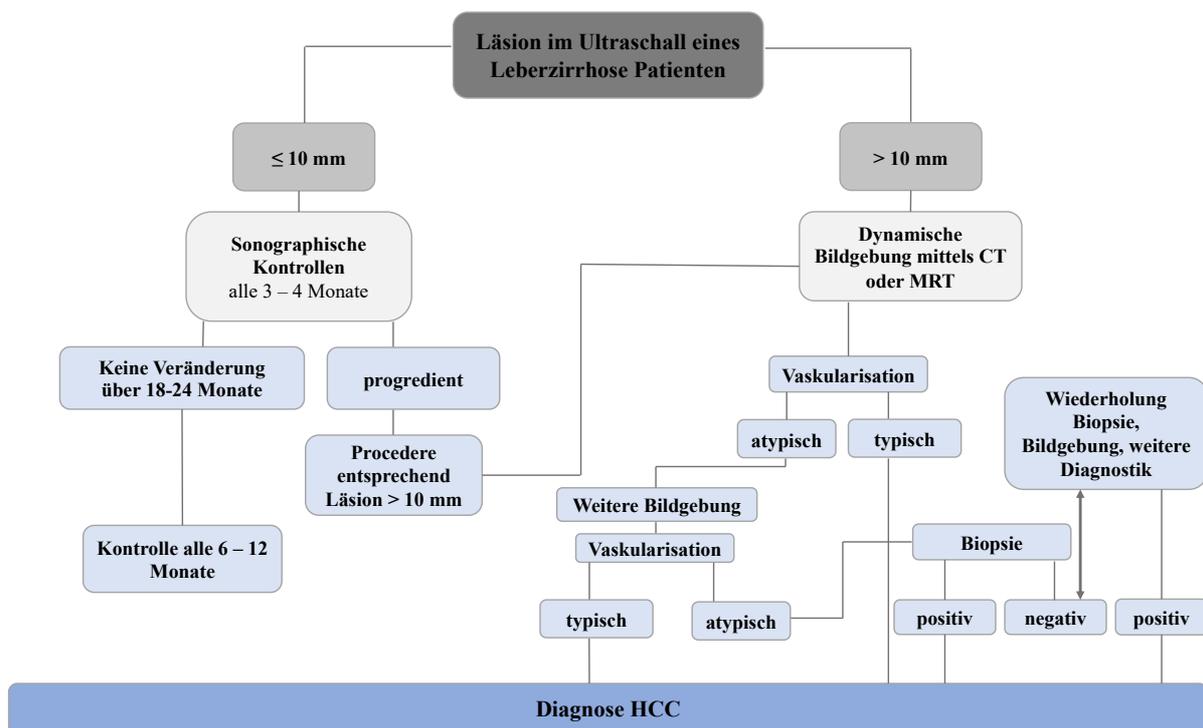


Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus bei im sonographischen Screening festgestellter Leberläsion bei Patienten mit bekannter Leberzirrhose.

Zusammengefasst sollte bei sonographisch darstellbarem Knoten bzw. unklarer Raumforderung von > 10mm eine zusätzliche Bildgebung mittels mehrphasiger, kontrastmittelverstärkter

Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen. Wenn die Läsion ein typisches Kontrastmittelverhalten zeigt (arterielle Hypervaskularisation, gefolgt von einem extrazellulärem Auswaschen in der venösen Phase), kann die Diagnose eines HCC gestellt werden (Bruix & Sherman, 2011; Song, 2008). Falls das Kontrastmittelverhalten jedoch nicht typisch für das HCC ist, sollte zunächst das jeweils andere bildgebende Verfahren veranlasst werden. Zeigen sich dabei oben genannte Kontrastmittelmuster, kann wiederum die Diagnose gestellt werden. Wenn sowohl die CT als auch die MRT kein eindeutiges Ergebnis liefern, sollte eine Biopsie zur abschließenden Sicherung der Diagnose erfolgen (Ayuso et al., 2018). Falls auch die Biopsie kein eindeutiges Ergebnis erbringt, gilt die Diagnose eines HCC als unwahrscheinlich. Bei weiterhin persistierendem Verdacht auf ein malignes Geschehen, sind allerdings weitere sonographische Verlaufskontrollen empfohlen (El-Serag, 2011). Neben diesen bildgebenden Verfahren können auch laborchemische Erhebungen wie die von Alphafetoprotein (AFP) als Screeningparameter verwendet werden, da die Bestimmung wenig invasiv und gut reproduzierbar ist. Allerdings weist dieser Laborparameter mit einer Sensitivität von 60 % und einer Spezifität von 90 % eine tendenziell geringere Aussagekraft als die Sonographie auf. AFP eignet sich daher besser ergänzend zu bildgebenden Verfahren oder als Verlaufsparemeter anstatt als alleinige Screeningmethode (Fitzmorris et al., 2015).

#### **1.1.4 Therapie**

Zur Therapiestratifikation wird am geläufigsten das Staging durch die Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Klassifikation vorgenommen (Abb. 3). Die BCLC Klassifikation berücksichtigt die Symptome und den Allgemeinzustand der Patienten nach der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), die Anzahl und Größe von Leberläsionen, die Art der Infiltration und die Leberfunktion, gemäß des Child-Pugh-Scores.

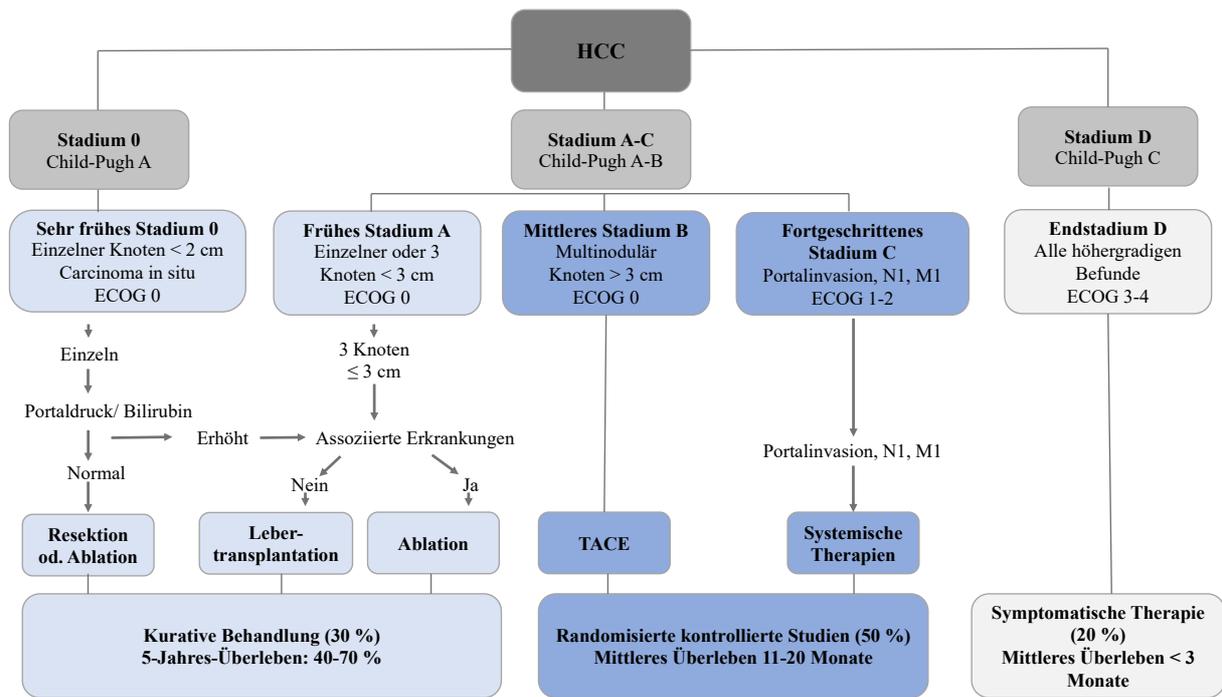


Abbildung 3: Flussdiagramm der Barcelona Clinic Liver Cancer Klassifikation. (Fornier et al., 2018; Villanueva, 2019).

Die BCLC-Klassifikation teilt die Patienten entsprechend der oben genannten Kriterien in fünf Gruppen ein, anhand derer sich wiederum unterschiedliche Therapieempfehlungen ableiten lassen. Zudem gibt die Klassifikation Auskunft über die Prognose und das damit verbundene durchschnittliche 1-Jahres-Überleben der Patienten unter der jeweils empfohlenen Therapie (Fornier et al., 2018).

Grundsätzlich werden in der Therapie des HCC zwei Ansätze unterschieden: potenziell kurative Verfahren (z.B. Transplantation, Teilresektion oder Ablation) und palliative Verfahren (z.B. systemische Therapien). Das Erkrankungsstadium zum Diagnosezeitpunkt gemäß der BCLC-Klassifikation entscheidet maßgeblich über das jeweilig anzuwendende Verfahren. Allerdings stellen kurative Behandlungen aufgrund eines oft bereits fortgeschrittenen Tumorstadiums bei Erstdiagnose aktuell nur bei ca. 15 - 35 % der Patienten eine Therapieoption dar (Mazzanti, Arena, & Tassi, 2016).

#### 1.1.4.1 Lebertransplantation

Bei der Lebertransplantation kann sowohl die Behandlung des Karzinoms als auch die Therapie der häufig zugrundeliegenden Leberzirrhose erfolgen (Mazzanti, Arena, & Tassi, 2016). Allerdings führt vor allem der Mangel an Organspenden dazu, dass Patienten auf der Transplantationsliste lange Wartezeiten haben und bei Progredienz der Erkrankung die Transplantationskriterien nicht mehr erfüllen. Auch die häufig zugrundeliegenden chronischen HBV- und HCV-Infektionen können eine Kontraindikation für eine Transplantation darstellen, da in diesen Fällen trotz Transplantation die Infektionen persistieren und gegebenenfalls erneut auftreten können. Die Voraussetzungen, die ein Patient erfüllen muss, um als Transplantationskandidat in Frage zu kommen, sind als Mailand Kriterien bekannt (Mazzaferro et al., 2009).

*Tabelle 2: Mailand Kriterien: Internationaler Maßstab für die Eignung zur Lebertransplantation. Alle Kriterien müssen erfüllt sein.*

---

#### **Mailand Kriterien**

---

- Eine Läsion  $\leq 5$  cm
  - Bis zu 3 Läsionen, jeweils  $\leq 3$ cm
  - Keine extrahepatische Manifestation
  - Keine makrovaskuläre Invasion
- 

Diese Kriterien sind sowohl in Europa als auch in den USA anerkannt. Während eine Missachtung der Kriterien zu einem erhöhten Risiko für ein erneutes Auftreten eines HCC und zu einer reduzierten Überlebenszeit führt, liegt die 5-Jahresüberlebenszeit bei Transplantationen, die entsprechend der Kriterien durchgeführt wurden, hingegen bei über 70 % (Forner et al., 2018).

#### 1.1.4.2 Leberteilresektion

Die Leberteilresektion stellt ein weiteres operatives, potenziell kuratives Verfahren dar. Es kommt bei fehlender oder gut kontrollierter Leberzirrhose sowie bei frühem HCC-Stadium zur

Anwendung, weshalb aber auch nur insgesamt ca. 5 – 10 % der Patienten mit einem HCC für dieses Verfahren in Frage kommen. Zudem stellen Gefäßinfiltration und portale Hypertension relative Kontraindikationen für eine Leberteilresektion dar, da in diesen Fällen das 5-Jahresüberleben von über 70 % auf unter 50 % sinkt. Auch Multifokalität des Tumors wird häufig als Ausschlusskriterium einer Teilresektion angesehen, da sich gezeigt hat, dass es dadurch vermehrt zu Rezidiven und zu einem schlechteren Überleben kommen kann. Die Leberteilresektion ist gegenüber der Lebertransplantation jedoch das deutlich kostengünstigere Verfahren und hat zudem den Vorteil des Organerhalts und umgeht damit die potentiell lebensgefährlichen Abstoßungsreaktionen, die im Rahmen einer Organtransplantation auftreten können. Allerdings ist zu beachten, dass es innerhalb von 3 Jahren nach einer Leberteilresektion in über 50 % der Fälle zu einem Wiederauftreten des HCC kommen kann, weshalb eine engmaschige Nachsorge unabdingbar ist (Fornier et al., 2018).

#### **1.1.4.3 Ablative Verfahren**

Neben den genannten operativen Verfahren stellen Ablationsverfahren interventionelle Therapieverfahren dar, welche teils in kurativer und teils in palliativer Absicht zum Einsatz kommen. Dabei wird durch thermische Verfahren oder durch chemische Noxen eine Nekrose bzw. Vernarbung in den Tumorherden induziert. Zum Einsatz kommen z.B. Radiofrequenz- und Mikrowellenablation sowie die transarterielle Chemoembolisation oder die perkutane Ethanolinjektion (Fornier et al., 2018). Aktuell zeigt sich die Radiofrequenzablation hinsichtlich des Outcomes und der Krankheitskontrolle gegenüber den anderen Verfahren überlegen und stellt damit die Erstlinientherapie der interventionellen Verfahren dar. Die Ergebnisse der Ablation sind bei sehr früh diagnostiziertem HCC (einzelne Läsion von < 2cm) vergleichbar mit denen der Teilresektion und zeigen zudem eine ähnliche Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (Cucchetti et al., 2013). Zudem existieren weitere vielversprechende Studien zur Mikrowellenablation mit teils vergleichbaren Ergebnissen im Vergleich zur Radiofrequenzablation (Yu et

al., 2017). Die perkutane Ethanolinjektion kommt besonders in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumorherdes zum Einsatz, da die Anwendung der Radiofrequenzablation in bestimmten Körperregionen, wie beispielsweise in Magen- oder Gallenblasennähe, nicht möglich ist (Forner et al., 2018). Bei fortgeschrittener Erkrankung kommen vor allem die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die Radioembolisation zum Einsatz (Mazzanti, Arena, & Tassi, 2016). Die transarterielle Embolisation ist ein röntgenbildgesteuertes Katheterverfahren, bei welchem ein Katheter in die den Tumor versorgende Arterie vorgeschoben wird. Durch den Katheter werden gezielt Medikamente, radioaktive Substanzen und embolisierende Partikel appliziert, welche zu einer Nekrose des nachfolgenden Gewebes führen. Von den eben genannten Verfahren zeigte bisher allerdings nur die Chemoembolisation einen Überlebensvorteil bei HCC Patienten (Forner et al., 2018). Allerdings legen neuere Erkenntnisse nahe, dass auch die Radioembolisation mit dem Betastrahler Yttrium-90 (sog. selektive interne Radiotherapie, SIRT), nahezu vergleichbare Ergebnisse wie die Chemoembolisation erzielt. Somit stellt es ein zukünftig vielversprechendes Verfahren dar (Sangro et al., 2011). Ein Nachteil aller transarteriellen Verfahren ist eine mögliche anhaltende Tumorperfusion, bedingt durch erhöhte Angiogenese des Tumors oder durch eine venöse Versorgung des Tumors über die Portalvene. Hierdurch kann es postinterventionell weiterhin zur Blutversorgung des Tumors kommen, was ein Tumorwachstum begünstigen kann. Die transarteriellen Verfahren eignen sich daher vor allem zur Überbrückung bei Patienten, die auf eine Transplantation warten oder bei bestehenden Kontraindikation für andere therapeutische Verfahren bzw. bei fortgeschrittenem Tumorleiden (Mazzanti, Arena, Tassi, et al., 2016).

#### **1.1.4.4 Systemische Therapien**

Zusätzlich zu den oben genannten lokalen Verfahren, aber auch isoliert als Erstlinientherapie, kann eine systemische Inhibitortherapie mittels Sorafenib durchgeführt werden (Mazzanti, Arena, & Tassi, 2016). Sorafenib zählt zu der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren, mit primär

antiangiogenetischer Wirkung, welche somit das Tumorwachstum verlangsamen können. In 2018 verglichen Kudo et al. Sorafenib mit Lenavatinib, einem weiteren Tyrosinkinaseinhibitor, und konnten zeigen, dass in beiden Studien ein Überlebensvorteil erzielt wurde. Unter Lenavatinib betrug das mediane Überleben 13,6 Monate und unter Sorafenib 12,3 Monate (Kudo et al., 2018). Lenavatinib ist seit 2018 von der *Food and Drug Administration* (FDA) als Erstlinientherapie neben Sorafenib zugelassen (Villanueva, 2019). In der Phase 3 Studie RESORCE konnte die Arbeitsgruppe von Bruix et al. in 2016 durch Regorafenib einen Überlebensvorteil von 10,6 vs. 7,8 Monaten in der Placebogruppe zeigen (Bruix et al., 2017). Regorafenib wird bei Patienten, welche unter Sorafenib einen Tumorprogress zeigen als Zweitlinientherapie angewandt (Vogel et al., 2018). Bei Stadium D bzw. fortgeschrittener Leberzirrhose (CHILD C) erhalten die Patienten eine rein symptomatische Therapie (*best supportive care*). Das mediane Überleben bei Vorliegen von Stadium D beträgt 3-4 Monate (Galle et al., 2018).

## **1.2 Angewandte bildgebende Verfahren**

Die in dieser Studie verwendeten diagnostischen bildgebenden Verfahren sollen im Folgenden allgemein erläutert werden um ein grundlegendes Verständnis für den Hintergrund dieser Arbeit zu vermitteln.

### **1.2.1 PET/CT**

Die Positronenemissionstomographie (PET)/CT stellt eine bildgebende Hybridmethode zur Erfassung von sowohl metabolischen als auch morphologischen Informationen in Geweben dar (Krause et al., 2007). Die physikalische Grundlage der Positronenemissionstomographie basiert auf dem Zerfall von Positronen, wobei abhängig vom Ausgangsnuklid kinetische Energie an die umliegende Materie abgegeben wird. Es kommt in Verbindung mit einem Elektron zur Anihilation (Paarvernichtung), wodurch in gegensätzlicher Richtung Gammastrahlung von 511

keV entsteht, welche von zwei gegenüberliegenden Detektoren registriert wird. Die Koinzidenzbedingung ist nur erfüllt, wenn die beiden entstandenen Gammaquanten einem einzigen Zerfall zuzuordnen sind und somit auf der Koinzidenzlinie, welche die Verbindungslinie zwischen den beiden Detektoren darstellt, liegen. Zudem werden bei modernen Systemen zusätzlich sog. Time-of-flight Messungen durchgeführt, die anhand von Zeitverschiebungen zwischen den Inzidenzen die Auflösung erhöhen. Wenn in einem PET-Scanner durch viele solcher Detektoren eine simultane Akquisition der Koinzidenzlinien in allen Winkeln stattfindet, können dreidimensional Radioaktivitätsverteilungen in Geweben räumlich erfasst, dargestellt und quantifiziert werden. So wird der Zerfall von radioaktiven Isotopen in Verbindung mit einem beliebigen Tracer mittels Gammastrahlung durch Koinzidenzdetektoren erfasst (Standke, 2002).

Häufig wird als Tracer die  $^{18}\text{F}$ -2-Fluor-2-desoxy-D-glucose, vereinfacht  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglucose, ( $^{18}\text{F}$ -FDG) verwendet, da es dem gleichen metabolischen Weg wie normale Glucose folgt und über Glucosetransporter (GLUT) in die Zelle gelangt. Dort wird  $^{18}\text{F}$ -FDG mittels Hexokinase phosphoryliert und kann so nicht weiter verstoffwechselt werden, sondern verbleibt in der Zelle (Menzel et al., 2013). Diese Methode ermöglicht eine Abgrenzung von Geweben mit erhöhtem Glucose-Stoffwechsel, wie z.B. beim HCC, zu Geweben mit normalem Glucose-Stoffwechsel (Krause et al., 2007).

Um eine semiquantitative Analyse der PET-Bilder vorzunehmen, wird in der onkologischen Diagnostik der weitverbreitete semiquantitative PET-Parameter, *standardized uptake volume* (SUV), verwendet. Somit kann die FDG-Speicherung als Aktivitätskonzentration im Tumor bestimmt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass diese bezogen auf die injizierte Aktivität und normiert auf das Körpergewicht des Patienten bzw. des Versuchstiers bestimmt wird. Die Differenz zwischen normalem Gewebe und Tumorgewebe kann durch den SUV ermittelt werden, wobei ein hoher SUV-Wert für eine hohe metabolische Aktivität steht (Standke, 2002).

Da man über die PET alleine nur geringe anatomische, jedoch gute metabolische Informationen über das Gewebe erhält, wird sie meist in Verbindung mit der Computertomographie verwendet. Wie die PET ist auch die CT ein schnittbildgebendes Verfahren und weist im Gegensatz zur PET eine hohe räumliche Auflösung auf (Blodgett et al., 2007). Im Unterschied zum PET-System befindet sich bei einem Computertomographen die Strahlungsquelle, eine Röntgenröhre, extern. Die Strahlenabschwächung durch den Körper wird von dem gegenüberliegenden Detektorfeld erfasst und das Schnittbild erzeugt (Krause et al., 2007). Durch die Kombination der beiden Systeme können sowohl metabolische als auch morphologische Informationen in einer Untersuchung gewonnen werden (Standke, 2002). Trotz der vielversprechenden Möglichkeiten die sich aus diesen technischen Verfahren ergeben, spielt die PET/CT Bildgebung in der HCC Diagnostik bisher aber nur eine untergeordnete Rolle.

### 1.2.2 MRT

Die Magnetresonanztomographie (MRT) erzeugt durch elektromagnetische Wellen und Magnetwechselfelder im Radiofrequenzbereich elektrische Signale von Wasserstoffprotonen. Verschiedene Gewebe im Körper unterscheiden sich in ihrer Wasserstoffprotonendichte sowie in den Längs- (T1) und Quer- (T2) Relaxationszeiten in der MR-Bildgebung. Teilweise unterscheidet sich der Kontrast von physiologischem Gewebe zu beispielsweise tumorös verändertem Gewebe ausreichend, so dass auch Aufnahmen ohne Kontrastmittel durchgeführt werden können. Häufig wird in der Tumordiagnostik allerdings zur besseren Darstellung Kontrastmittel eingesetzt (Yankeelov & Gore, 2009).

Ein spezielles Verfahren stellt die *dynamic contrast enhanced* (DCE)-MR-Bildgebung dar. Sie ist eine dynamische kontrastmittelverstärkte Bildgebung, welche genutzt wird, um gezielt die Perfusion von Geweben, in diesem Fall den Unterschied von Perfusion von Tumoren und normalem Gewebe, darzustellen (Taouli et al., 2013). Dafür werden zunächst Ausgangsbilder ohne

Kontrastmittel gewonnen und anschließend Serienbilder über einen gewissen Zeitraum nach intravenöser Applikation von konventionellem kleinmolekulargewichtigem Gadoliniumhaltigen Kontrastmittel (O'Connor et al., 2011). Die dabei gewonnenen Bilder zeigen eine Veränderung der Signalintensität.

Bei diesem Verfahren kommt es nach intravasaler Applikation von Kontrastmittel zum Austritt dessen in den Extravasalraum. Das Ausmaß des Kontrastmittelaustritts wird hauptsächlich durch zwei Faktoren bestimmt: die Gefäßpermeabilität und den Blutfluss. In der T1 gewichteten Bildgebung ist eine erhöhte Permeabilität als Signalverstärkung erkennbar. Diese kommt durch die Verkürzung der longitudinalen Relaxationszeit im Tumorgewebe zustande (B. Chen & Shih, 2014). So erhält man hauptsächlich Informationen über die Mikrovaskularität der Gewebe im Allgemeinen, und über die Permeabilität der Kapillarendothelien im Speziellen (Yankeelov & Gore, 2009). Aktuell wird die DCE-MR Bildgebung vor allem im Bereich der Testung neuer antiangiogenetischer Therapien eingesetzt, um Aussagen über deren Wirksamkeit treffen zu können (Van Beers et al., 2015). Zur semiquantitativen Auswertung der Bilddaten wird häufig eine Signal-Zeit Kurve oder Konzentration-Zeit Kurve gewonnen. Hierbei wird die *area under the curve* (AUC) betrachtet, da sie nicht so störanfällig gegenüber Messfehlern und gut reproduzierbar ist (O'Connor et al., 2011). Die AUC repräsentiert die Menge an Signalverstärkung über einen bestimmten Zeitraum (B. Chen & Shih, 2014). Des Weiteren kann eine diffusionsgewichtete MR-Bildgebung Informationen über die mikroskopische Bewegung von Wassermolekülen im Gewebe ermöglichen und somit Rückschlüsse über die Zellularität von Geweben geben (Boussouar et al., 2016; Granata et al., 2016; Shankar et al., 2016). Zur Gewinnung der Bilder werden häufig Eco Planar Imaging Sequenzen (EPI) verwendet. Hierbei handelt es sich um T2-W Sequenzen, die mit einer *single shot* Technik und Fettsuppression durchgeführt werden. Dabei werden mehrere Serien mit Modifikation des Gradienten aus Stärke und Größe, dem b-Wert, angefertigt. Am Ende werden mehrere b-Werte verwendet, um verschiedene Informationen über das Gewebe zu gewinnen (Granata et al., 2018). Zur Analyse

der DWI Bilder werden Karten des *apparent diffusion coefficient* (ADC) verwendet. Die Karten ermöglichen die graphische Darstellung von Signalintensitäten, wobei niedrige ADC Werte eine verminderte Diffusion und hohe ADC Werte eine freie Diffusion von Wasser im Gewebe bedeuten (Granata et al., 2018).

### **1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Trotz relevanter Fortschritte in der Diagnostik und der Behandlung des HCC ist diese Tumorart weiterhin mit einer hohen weltweiten Inzidenz und Letalität vergesellschaftet. Entscheidend für die Prognose der Erkrankung ist abgesehen von präventiven Maßnahmen und Neuerungen in der Therapie die frühzeitige Diagnose und die für die Therapie relevante Einstufung bzw. das Grading des Karzinoms. Besonders aufgrund der häufig auftretenden Multilokalität des HCC ist die Bestimmung des Differenzierungsgrades durch invasive Verfahren jedoch deutlich erschwert. Aufgrund dessen gewinnen neuere nicht-invasive Verfahren zur Vorhersage von histopathologischen Parametern zunehmend an Bedeutung.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, in einem translationalen Rattenmodell zu untersuchen, ob und inwiefern durch die Kombination von  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und DCE-MRT Rückschlüsse über das histopathologische Grading von HCC-Läsionen möglich sind.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Tumormodell und Tierprotokoll

Alle Tierexperimente wurden von der Ethikkommission der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen BXT0011 genehmigt und in Übereinstimmung damit durchgeführt.

Für die Studie wurden 20 zehn Wochen alte,  $354 \pm 35$  Gramm schwere, männliche Wistar Ratten (Harlan Laboratories) verwendet. Zur Tumorinduktion wurde den Tieren für einen Zeitraum von 10 Wochen 0,01 % Diethylnitrosaminhaltiges Wasser verabreicht. Danach fand eine zweiwöchige wash-out Periode statt. Ab Woche 10 erfolgte das Screening der Tiere, um das Wachstum der Tumore zu beobachten. (Gross et al., 2015) Das Screening wurde in einem zweiwöchigen Abstand an einem 3,0 Tesla Scanner (Philips Ingenia 3,0 T, Philips, Best, Niederlande) mittels longitudinaler T2-gewichteter Aufnahme in einer 8-Kanal-Sense-Handgelenksspule (TR: 6700 ms, TE: 90 ms, Voxelgröße: 0,7 x 0,7 x 0,7 mm, Aufnahmematrix: 160 x 128 Voxel, Sichtfeld: 80 mm) vorgenommen. Während der Bildgebung erfolgte eine Narkotisierung der Tiere. In dieser Studie waren zwei bis drei Läsionen mit einem Durchmesser von 0,5 cm nach 12 - 20 Wochen festzustellen. Sobald eine Läsion mit einem Durchmesser von mindestens 0,5 cm im Screening festgestellt wurde, erfolgte der Einschluss der Tiere in die Studie und die Durchführung der Bildgebung mittels FDG-PET/CT und DCE-MRT.

Von den ursprünglichen 20 Ratten wurden 2 Ratten aufgrund schwerer Bewegungsartefakte in der DCE-MR Bildgebung ausgeschlossen. Außerdem scheiterte bei 3 weiteren Tieren die Fixierung der Lebern, weshalb diese Tiere ausgeschlossen wurden. Dementsprechend konnten insgesamt 15 Tiere mit insgesamt 38 Tumorkläsionen für die Analyse eingeschlossen werden.

## 2.2 Datenakquisition und Bildrekonstruktion

Die Datenakquisition erfolgte nach einem zuvor festgelegten standardisierten Schema. Vor dem Beginn der Bildgebung erfolgte die finale Gewichtsmessung, sowie eine sechsstündige Nahrungskarenz-Phase der Tiere. Im Anschluss daran fand die PET/CT Bildgebung, gefolgt von der MRT-Bildgebung statt. Nach Beendigung der MRT-Aufnahmen wurden die Tiere euthanasiert und daraufhin in Formaldehyd fixiert. Am Folgetag wurden die Lebern seziiert und daraufhin endgültig für die histologische Untersuchung in Paraffin eingebettet.

### 2.2.1 Ablauf PET/CT

Die Tiere wurden zunächst mittels Inhalationsnarkose mit 2,5 % Isofluran in reinem Sauerstoff betäubt und in Bauchlage positioniert und es erfolgte die Anlage eines Schwanzvenenkatheters. Danach erfolgte die Applikation von  $20 \pm 6$  MBq  $^{18}\text{F}$ -FDG (Miltenyi Biotec Exitron nano 12000) über den zuvor gelegten Katheter (1ml/kg Körpergewicht). Während der gesamten Untersuchungsdauer wurde die Atemfrequenz und Körpertemperatur der Tiere am Monitor überwacht. Es erfolgte eine 25-minütige statische Bilderfassung 60 Minuten nach i.v. Kontrastmittelinjektion in den Schwanzvenenkatheter. Die Tiere wurden hierfür in den PET/CT-Scanner (Siemens Inveon Micro PET-CT, Simens, Texas, USA) gelegt. Außerdem wurde eine kontrastfreie Phase zur Schwächungskorrektur durchgeführt. Die zerfallskorrigierten Daten wurden mit einem iterativen Rekonstruktionsalgorithmus mit *ordered subset expectation maximisation* (OSEM) 3D rekonstruiert und mit dem Inveon Research Workplace (Siemens Inveon, Simens, Texas, USA) betrachtet (Kaissis et al., 2020).

### 2.2.2 Ablauf DCE-MRT

Die Tiere erhielten eine Inhalationsnarkose mit 2,5 % Isofluran in reinem Sauerstoff und wurden erneut in Bauchlage positioniert. Für die MR-Bildgebung wurde eine humane Handgelenksspule benutzt. Die funktionellen DCE-MR-Aufnahmen wurden an einem 7 Tesla MR-Scanner (Discovery MR901, GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA und Agilent Technologies, Oxford, UK) durchgeführt. Parallel zur CT-Bildgebung erfolgte auch während der MR-Bildgebung ein Monitoring mittels Atemfrequenz- und Körpertemperaturüberwachung.

Dazu wurden zunächst *fast imaging employing steady state acquisition* (FIESTA) Aufnahmen vorgenommen, um einen Überblick über die Anatomie und damit vor allem die Tumordetektion und Tumorausbreitung für die weiteren Sequenzen zu erlangen. Im Anschluss wurden folgende Bildsequenzen aufgenommen: Spectral Attenuation Inversion Recovery T2w Fast-Spin-Echo-Bilder bei einer Aufnahmematrix von 160 x 160 Voxel, einer Rekonstruktionsmatrixgröße von 256 x 256, Pixelabmessungen von 0,25 x 0,25 x 1,0 mm (xyz) und einem Sichtfeld von 60 mm; Fast Gradient Recall Echo (FLASH) T1w kontrastverstärkte, dynamische, stationäre, freie Präzessionssequenz mit einem Flipwinkel von 10°, einer Wiederholungszeit von 2 ms, einer Echozeit von 1 ms, einem Sichtfeld von 60 mm, einer Erfassungsmatrix von 96 x 96 Pixeln, einer Rekonstruktionsmatrixgröße von 256 x 256, Pixelabmessungen von 0,25 x 0,25 x 1,0 mm (xyz) und einem Sichtfeld von 60 mm. Es wurde ein Kontrastmittel auf Gadoliniumbasis (0,15 mmol/kg Gadoterinsäure (Dotarem, Guerbet, Princeton, NJ, USA)) verwendet. Für die dynamische Bildgebung wurde nach dem zehnten Scan/Frame eine Gadolinium Injektion in den Schwanzvenenkatheter ( $0,4 \times \text{Körpergewicht in g} = \text{Gd in } \mu\text{L}$ ) mit 2,5 ml/min Flussrate gefolgt von 500  $\mu\text{L}$  Kochsalzlösung durchgeführt.

### 2.2.3 Einbettung Leber

Nach Ablauf der MRT-Aufnahmen wurden die Tiere mit Phenobarbital eingeschläfert und anschließend eine Perfusionsfixierung durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit 20 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) das Blut aus den Gefäßen gespült und danach wurden 200 ml 1 % Paraformaldehyd (PFA) infundiert. Im Anschluss wurden die Tiere für 24 Stunden in 4 % PFA fixiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere in drei Teile zerteilt und in Supermegakassetten eingebettet (Abbildung 4). Des Weiteren erfolgte direkt danach die Dehydrierung der Tiere in der Pathologie. Im Anschluss wurden die Lebern entnommen und in normalen Kassetten nach dem in Abbildung 4 ersichtlichen Schema angeordnet, in Paraffin eingebettet und für die weitere histologische Untersuchung aufbewahrt. Hierbei wurde darauf geachtet die räumliche Orientierung und das Verhältnis der Leberlappen zueinander zu erhalten.

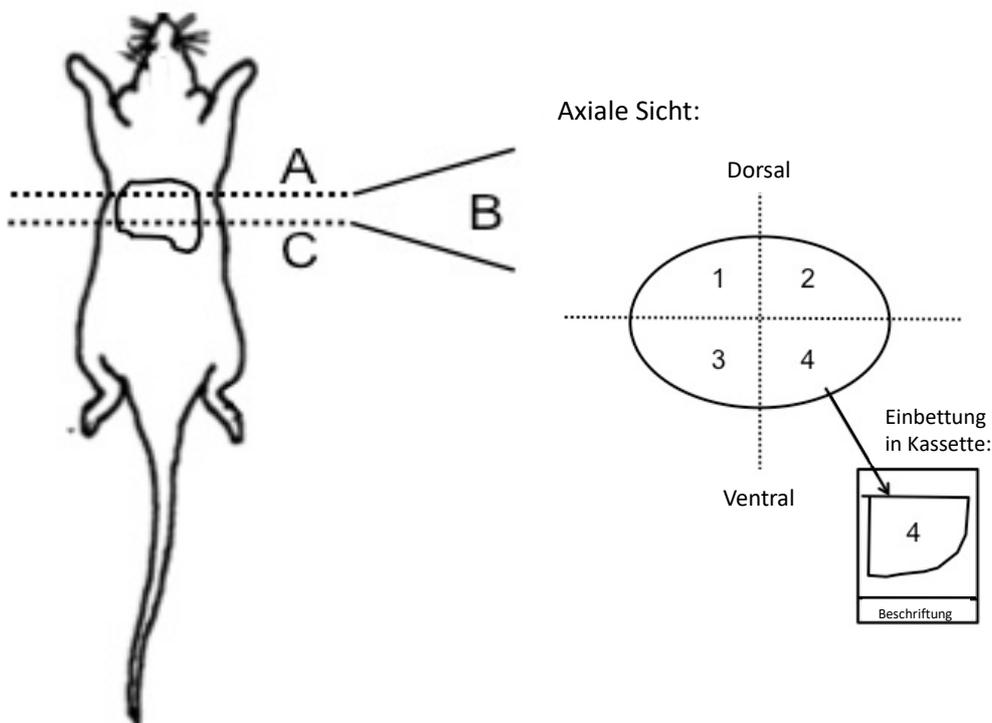


Abbildung 4: Veranschaulichung des Vorgehens zur Präparation der Ratten und anschließenden Einbettung der Lebern zur histologischen Auswertung.

## 2.3 Analyse der Bildgebung

Zur Analyse wurden die Tumore in allen bildgebenden Verfahren identifiziert und das dreidimensionale Tumolvolumen manuell vermessen. Abbildung 5 zeigt zwei repräsentative Tumore in der PET/CT und MRT.

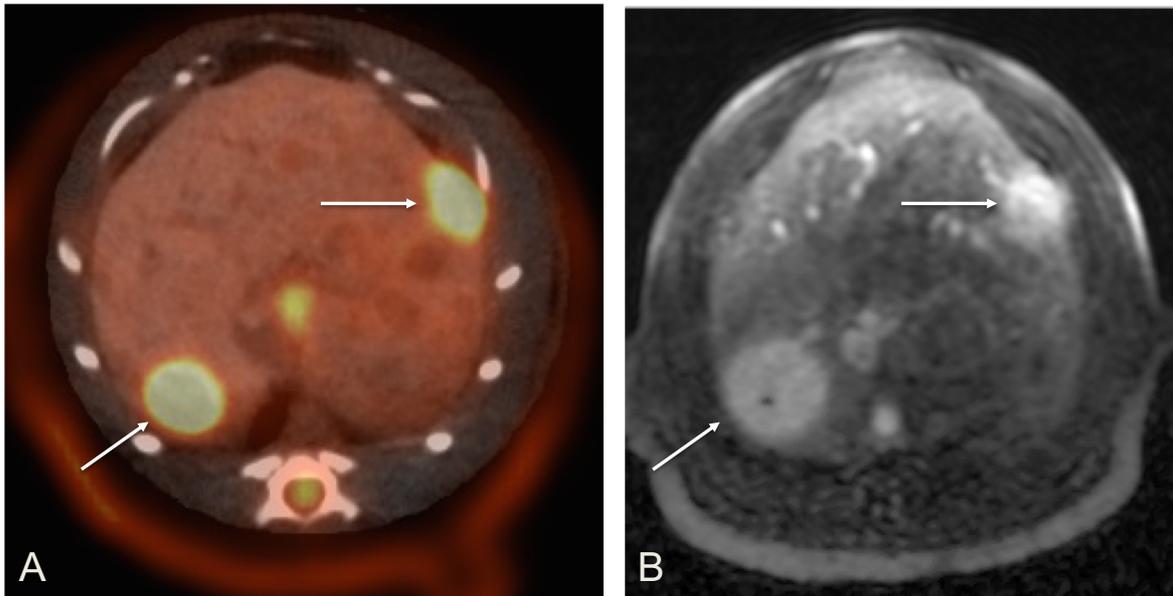


Abbildung 5: Darstellung zweier HCC Läsionen (mit Pfeilen gekennzeichnet) in der Bildgebung. A: Signalverstärkung beider Tumore in der  $^{18}\text{F}$ FDG-PET/CT Aufnahme. B: Erhöhte Kontrastmittelaufnahme beider Tumore in der arteriellen Phase der DCE-MRT Aufnahme. (Kaissis et al., 2020)

### 2.3.1 Auswertung PET Bilder

Für die Analyse der PET/CT Bilder wurde der SUV bestimmt. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$SUV = \frac{\text{Aktivitätskonzentration} \left[ \frac{\text{Bq}}{\text{ml}} \right] \times \text{Normierungswert (Gewicht des Tieres in g)}}{\text{applizierte Aktivität [Bq]}}$$

Dabei wurden Mittelwert, Minimum, Maximum und Standardabweichung der SUV-Werte berechnet. Die Werte wurden sowohl für die einzelnen Tumore als auch für eine gleich große

Region im Psoasmuskel beidseits (Referenzgewebe) berechnet. Die endgültigen SUV-Verhältnisse wurden dann wie folgt berechnet:

$$SUV\ ratio = \frac{SUV\ mean\ tumor}{SUV\ mean\ muscle}$$

### 2.3.2 Auswertung MRT Bilder

Die Auswertung der MR Bildsequenzen erfolgte mittels der Auswertungsplattform OsiriX (Pixmeo, Bern, Schweiz) mittels ROI Enhancement Plugin. Hierzu wurden die 7 T DCE-MR Bilddaten sowohl in der FIESTA (T2 Sequenz) als auch in der FLASH Dynamik (T1 und Kontrastmittel Sequenz) verwendet.

In Übereinstimmung mit den PET/CT Daten wurden die entsprechenden Tumore in allen Sequenzen der MR Bildgebung aufgesucht. Sobald die passende Läsion in der T2 Sequenz lokalisiert worden war, wurde zum Zeitpunkt der stärksten Kontrastmittelaufnahme eine *region of interest* (ROI) in der dynamischen kontrastverstärkten T1 Sequenz (FLASH Dynamic) gezeichnet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Bereich möglichst randständig festgelegt war, gleichzeitig aber dennoch innerhalb des Tumors lag um mögliche Störfaktoren zu vermeiden. Daraufhin wurde die jeweilige ROI exportiert, im 4D Viewer Modus geöffnet und die Kontrastmittelaufnahme über die gesamte Zeit innerhalb der Region unter Verwendung eines DCE-tools gemessen. Zusätzlich wurde zu jedem Tumor eine weitere ROI gewählt, welche auf gleicher Schichthöhe als auch auf gleicher Höhe in ventral-dorsaler Richtung lag und nach Möglichkeit ausschließlich physiologisches Lebergewebe ohne große Gefäßstrukturen enthielt. Dadurch wurde sichergestellt, dass im Anschluss lediglich die zusätzliche Kontrastmittelaufnahme im Tumorgewebe ermittelt wurde und somit die AUC Ratio berechnet werden konnte. Als Basislinie diente in jeder Messung der Zeitpunkt 10 Frames vor Kontrastmittelinjektion. Es wurden Verhältniswerte zwischen Tumor- und Leberwerten für die AUC von 60, 90 und 180

Sekunden sowie für die gesamte Zeit nach Kontrastmittelanflutung bestimmt. Hierfür wurde folgendes für den jeweiligen Zeitpunkt berechnet:  $AUC \text{ ratio} = AUC \text{ Tumor} - AUC \text{ Referenzgewebe}$ . Außerdem wurde die Voxelgröße zwischen 50 – 200 % variiert und ein Konkordanzindex zwischen den Messungen berechnet, um eine Unabhängigkeit zwischen den berechneten und bildgebenden Parametern zu gewährleisten (Kaissis et al., 2020).

## 2.4 Histologie

Zur pathologischen Beurteilung wurden wie in 2.3 beschrieben die Paraffinblöcke in 2  $\mu\text{m}$  mikrotomiert, auf Objektträgern fixiert, getrocknet und anschließend mit Hämatoxylin/Eosin (H&E) Färbung eingefärbt. Die mikroskopische Betrachtung der Lebern und histopathologische Analyse erfolgte durch eine Veterinärpathologin. Es erfolgte eine Einteilung der Tumore nach Grading und Wachstumsmuster (solid, sinusoidal oder trabekulär). Das Grading erfolgte entsprechend der WHO Kriterien für HCC beim Menschen, was bedeutet, dass die Ratten mit 1, 2 und 3 beziffert wurden. Außerdem wurde der Anteil an intratumoraler extrazellulärer Matrix, der Fibrose des umliegenden Lebergewebes, der intratumoralen Nekrose und Entzündungszellinfiltration bestimmt. Hierfür erfolgte die ordinale Einteilung in kein = 0, wenig = 1, mäßig = 2 und viel = 3. Abbildung 6 zeigt beispielhaft zwei der identifizierten Tumore in H&E Färbung.

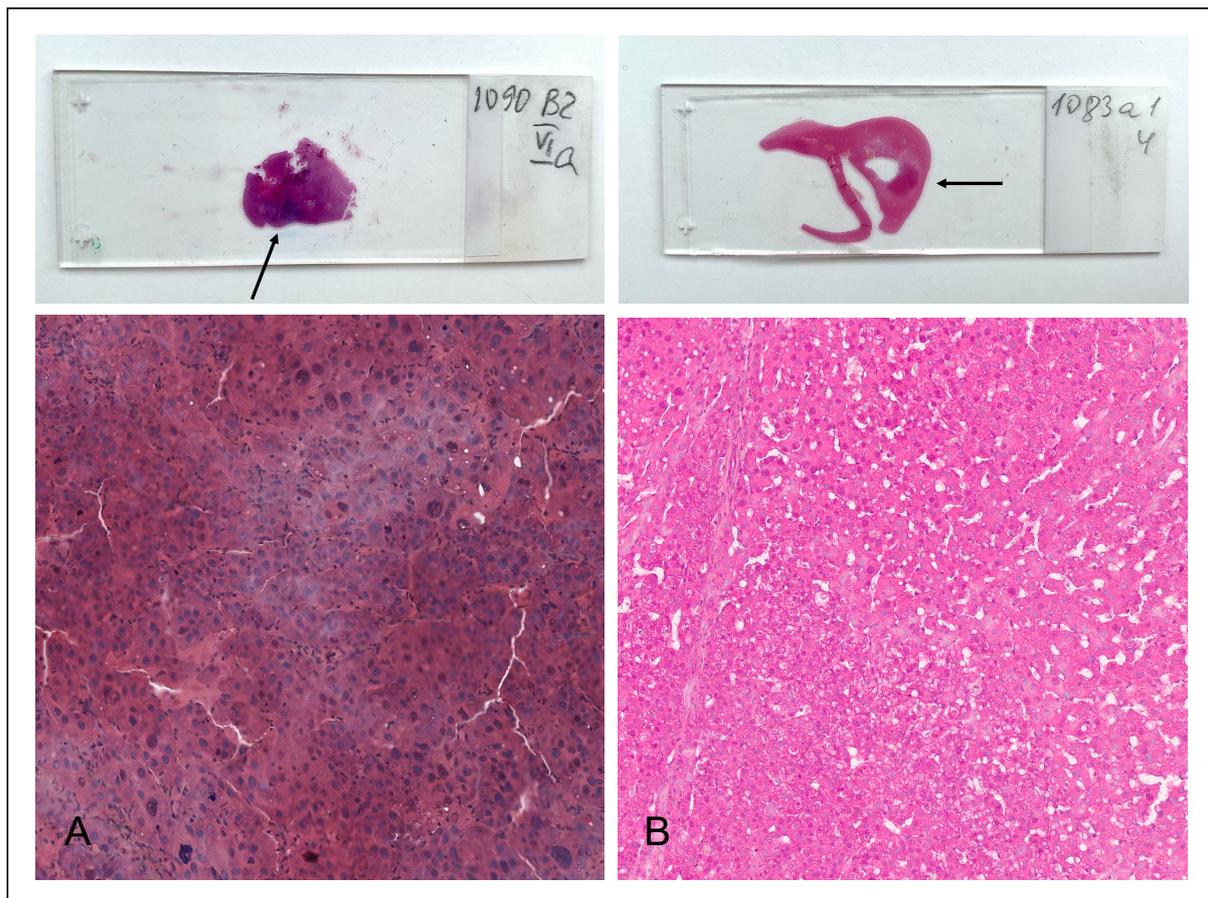


Abbildung 6: Histologische Schnitte zweier Tumore in H&E Färbung. Pfeile kennzeichnen die Tumorknoten. Oben: auf Objektträger fixiert. Unten: Mikroskopische Darstellung in 20-facher Vergrößerung. A: Grading G2 (schlecht differenziert), solides Wachstumsmuster. B: Grading G1 (gut differenziert), trabekuläres Wachstumsmuster.

## 2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Programmiersprache Python verwendet. Die Parameter wurden auf das (0, 1) Intervall normiert. Das histopathologische Grading wurde als Zielvariable binär kodiert, indem Tumore des Gradings 1 als "gut differenziert" und Tumore des Gradings 2 und 3 als "schlecht differenziert" zusammengefasst wurden. Die weiteren histopathologischen Merkmale (Wachstumsmuster, Anteil an intratumoraler extrazellulärer Matrix, Fibrose des umliegenden Lebergewebes, intratumoraler Nekrose, und Entzündungszellinfiltration) wurden als kategoriale Variablen einstufig kodiert und ihre Assoziation mit dem Grading mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests getestet. Zur Behebung des Klassenungleichgewichts wurde SMOTE (Synthetic Minority Oversampling Technique) angewandt (Kovács et al., 2020). Zur Beurteilung

der Kollinearität zwischen den Variablen in den Gruppen wurde eine hierarchische Clusterbildung unter Verwendung einer durchschnittlichen Verknüpfung und einer euklidischen Abstandsmetrik an die Spearman-Korrelationsmatrix der Parameter angepasst. Variablen innerhalb desselben Clusters (bestimmt durch einen Korrelationskoeffizienten  $\geq 0,5$ ) wurden mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse mit dem Ziel verarbeitet eine 99 prozentige Varianz beizubehalten. Ein L1-regularisiertes logistisches Regressions-Maschinen-Lernmodell mit einer Regularisierungsstärke von  $C = 0,5$  wurde unter Verwendung von 5 randomisierten Shuffle-Splits mit einer geschichteten Teststichprobe von 10 Beobachtungen kreuzvalidiert. Es wurden mehrere Modelle erstellt und verglichen. Einerseits wurde ein Modell erstellt, das alle erhobenen Bildparameter (PET/CT, DCE-MRT und Volumen) beinhaltet und andererseits wurden jeweils getrennte Modelle für die einzelnen Parameter erstellt. Sensitivität, Spezifität und Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (engl. ROC-AUC) wurden für die Testdaten erhoben und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Kaassis et al., 2020).

### 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 38 HCC Läsionen analysiert (Grading 1: N = 14 und Grading 2/3: N = 24). Zunächst wurden die histopathologischen Merkmale Wachstumsmuster (solid, sinusoidal oder trabekulär), Anteil an intratumoraler extrazellulärer Matrix, Fibrose des umliegenden Lebergewebes, intratumorale Nekrose, und Entzündungszellinfiltration in den zwei Grading-Gruppen (gut vs. schlecht differenziert) erhoben und die beiden Gruppen bezüglich dieser Merkmale verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Tumormorphologie (solid, sinusoidal oder trabekulär) festgestellt werden ( $p = 0,25$ ). Ebenso haben sich die intratumorale extrazelluläre Matrix ( $p = 0,55$ ), die Fibrosierung der Leber ( $p = 0,55$ ), die intratumorale Nekrose ( $p = 0,79$ ), und die Entzündungszellinfiltration ( $p = 0,68$ ) in den zwei Gruppen nicht signifikant unterschieden. Bei mehreren Tumoren im selben Tier wurde darüber hinaus untersucht, ob innerhalb desselben Tieres Tumore mit identischem Grading häufiger auftraten. Dies konnte nicht bestätigt werden ( $p = 0,71$ ). Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der einstufig kodierten kategorialen Variablen und ihrer Korrelation mit dem Grading zusammen.

*Tabelle 3: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests der erhobenen histopathologischen Merkmale im Vergleich zum Tumorigrad. (Kaissis et al., 2020)*

<b>Histopathologische Parameter</b>	<b>p-Wert</b>
Morphologie	0,25
Nekrose	0,79
Extrazelluläre Matrix	0,55
Immunzellinfiltration	0,68
Im selben Tier	0,71
Leberfibrose	0,55

Bei allen untersuchten Bildmerkmalen zeigte sich eine Unabhängigkeit von der Größe des Rekonstruktionsvoxels, mit Konkordanzindizes von  $< 0,8$ . In der Clustering-Analyse fanden sich drei unabhängige Variablen bzw. Merkmalscluster, welche in Abbildung 7 veranschaulicht

sind: FDG-PET-, DCE-MRT-abgeleitete Parameter und Tumervolumen. Die diesen Gruppen entsprechenden Merkmale wurden zur Dimensionsreduktion in den Algorithmus der Principal Component Analysis (PCA) eingegeben und separat transformiert.

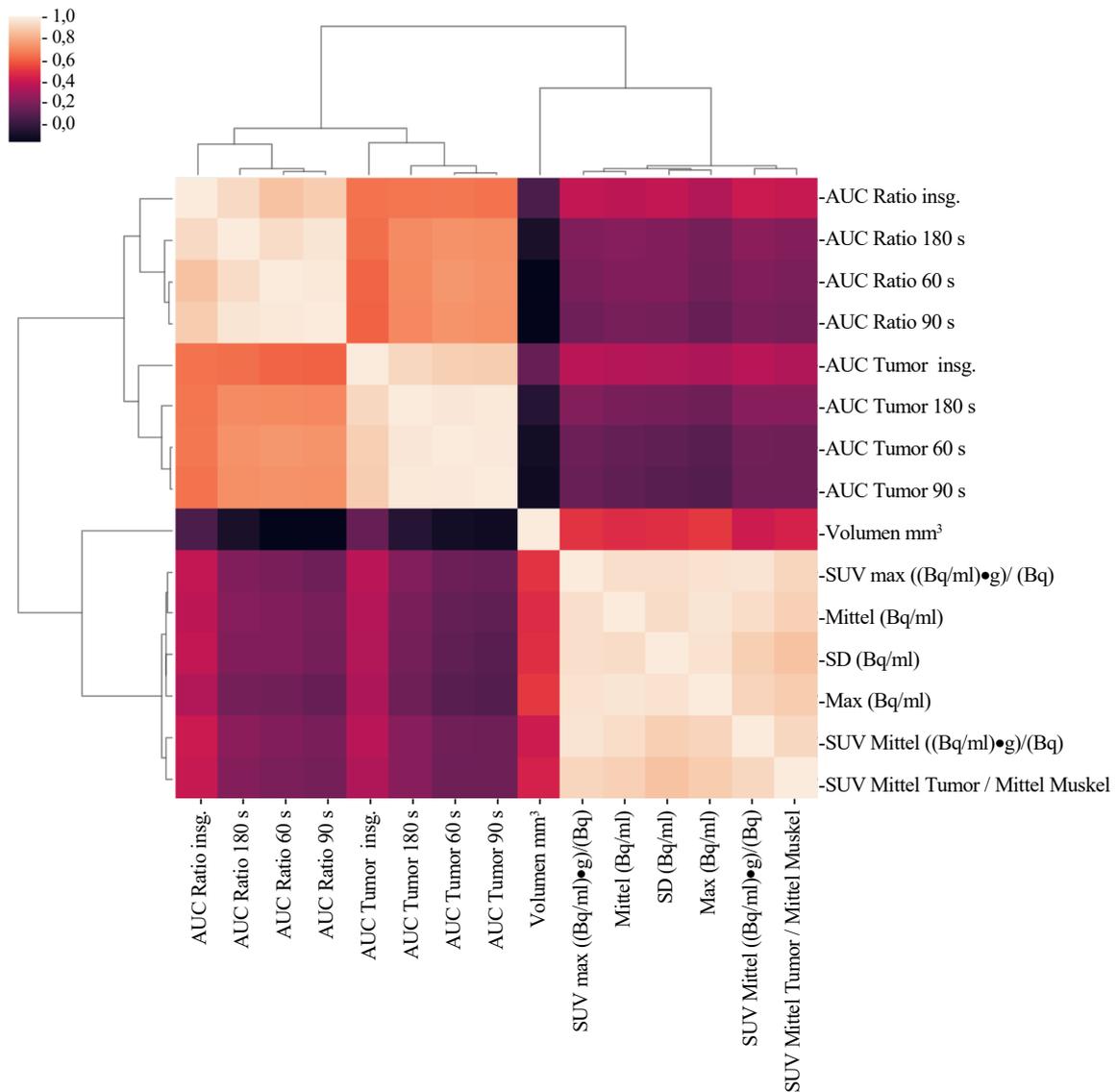


Abbildung 7: Cluster Karte zur Visualisierung der drei unabhängigen Merkmalscluster (FDG-PET/CT Parameter, DCE-MRT Parameter und Tumervolumen) und deren Korrelation (Korrelationskoeffizient  $\geq 0,5$ ). (Kaissis et al., 2020)

Der Algorithmus der logistischen Regression erreichte eine kreuzvalidierte Sensitivität von  $0,88 \pm 0,16$ , eine Spezifität von  $0,70 \pm 0,20$  und eine AUC von  $0,90 \pm 0,03$  unter Verwendung

der Hauptkomponenten, die aus FDG-PET, DCE-MRT und Volumen abgeleitet wurden (Abbildung 8).

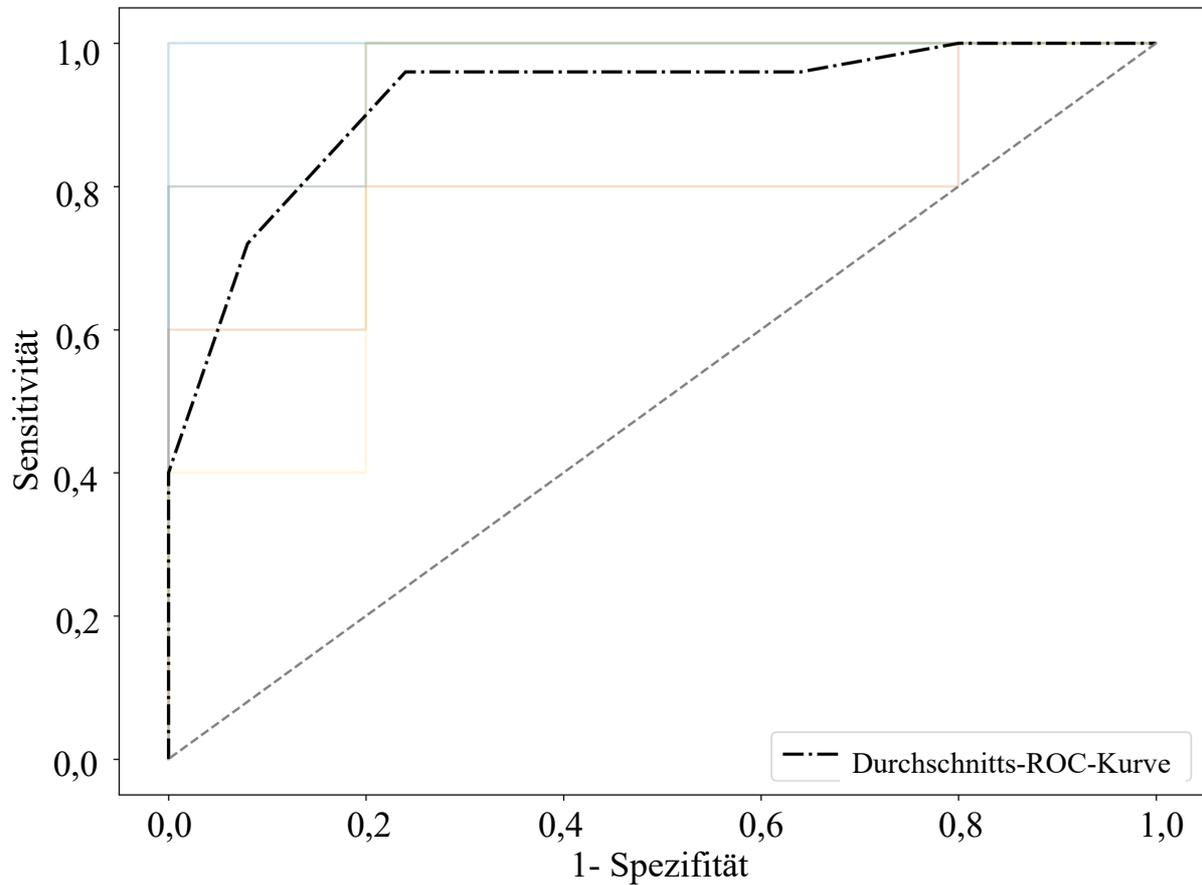


Abbildung 8: Durchschnitts-ROC-Kurve (schwarz gestrichelt) mit AUC 0,90 neben den ROC-Kurven (farbig) des 10-Stichproben-Validierungs-Holdout-Sets für jeden der 5 stratifizierten Shuffle-Splits. ROC, receiver operator characteristic; AUC, area under curve. (Kaissis et al., 2020)

Eine alleinige Betrachtung der FDG-PET abgeleiteten Parameter ergab eine Sensitivität von  $0,88 \pm 0,16$ , eine Spezifität von  $0,68 \pm 0,20$  und eine AUC von  $0,90 \pm 0,03$ . DCE-MRT-abgeleitete Parameter allein erzielten eine Sensitivität von  $0,56 \pm 0,16$ , eine Spezifität von  $0,92 \pm 0,16$  und eine AUC von  $0,77 \pm 0,21$ . Die logistischen Regressionskoeffizienten für FDG-PET und für DCE-MRT abgeleitete Merkmale betragen 1,71 bzw. 1,0. Das Tumervolumen hatte einen Koeffizienten von 0 und die Klassifikation allein aufgrund des Tumervolumens ergab einen ROC-AUC-Wert von 0,5, so dass eine Klassifikation des Gradings alleine aufgrund des

Volumens nicht möglich war. Abbildung 9 visualisiert, wie durch logistische Regressionsmodellierung der Hauptkomponenten, die Einordnung der Tumore entlang der Entscheidungsgrenze erfolgte.

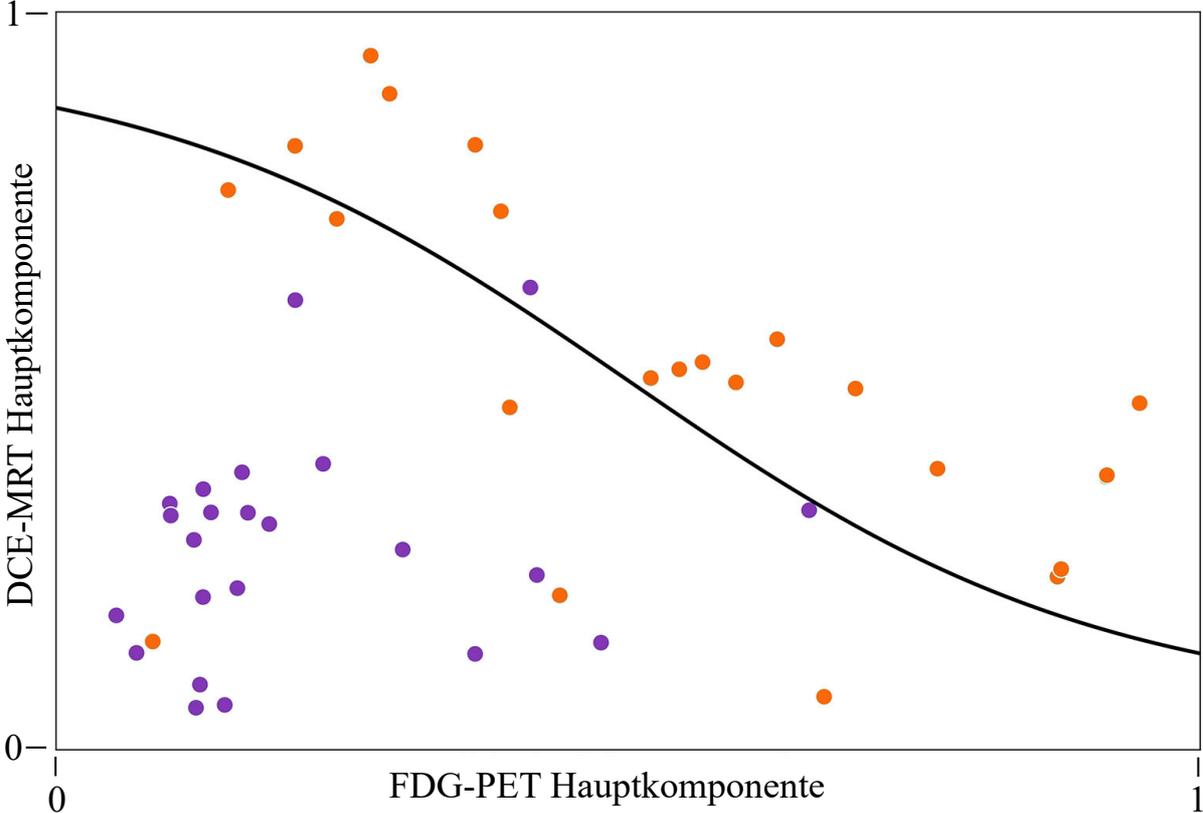


Abbildung 9: Punktdiagramm der logistischen Regression der Hauptkomponenten entlang der Entscheidungsgrenze (schwarz). Lila: gut differenzierte Tumore. Orange: schlecht differenzierte Tumore. (Kaissis et al., 2020)

# 4 Diskussion

## 4.1 Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob durch die Kombination zweier nicht-invasiver, schnittbildgebender Verfahren (PET/CT und DCE-MRT) in einem translationalen Tiermodell Rückschlüsse auf das histologische Grading von HCC getroffen werden kann. Als Grundlage dieser Arbeit diente ein Rattenmodell mit 15 Tieren, bei welchem multifokales HCC durch orale Verabreichung von Diethylnitrosamin induziert wurde. Nach einer Beobachtungsperiode von 12 Wochen erfolgte die multiparametrische, multimodale Schnittbildgebung mittels FDG-PET/CT und DCE-MRT. Im Anschluss daran wurden die Lebern der Tiere eingebettet, mikrotomiert, in H&E eingefärbt und zuletzt die Tumorerkrankungen histopathologisch befundet und anhand des Differenzierungsgrades binär verglichen (gut differenziert vs. schlecht differenziert). Auch die histopathologischen Parameter wie die Morphologie, intratumorale Nekrose oder der Fibrosierungsgrad unterschieden sich nicht signifikant zwischen Tieren mit Grading 1 und Grading 2/3. Die erhobenen Bilddaten wurden mittels eines logistischen Regressions-Maschinen-Lernmodell ausgewertet. Dabei wurden die Daten zunächst durch eine hierarchische Clusteranalyse und Principal Component Analyse zu drei unkorrelierenden Merkmalen (FDG-PET/CT, DCE-MRT und Volumen) zusammengefasst. Anhand des Tumorzvolumens allein konnte kein Rückschluss auf das entsprechende Grading getroffen werden. In dem Modell konnte jedoch durch die Kombination der beiden angewandten bildgebenden Verfahren mit einer Sensitivität von  $0,88 \pm 0,16$ , einer Spezifität von  $0,70 \pm 0,20$  und einer AUC von  $0,90 \pm 0,03$  die richtige Einordnung in die entsprechende Grading-Gruppe erreicht werden. Mit dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Kombination von DCE-MRT und FDG-PET/CT in diesem präklinischen Rattenmodell ein genaues nicht-invasives Verfahren für die histopathologische Einstufung von Lebertumoren darstellt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung nicht-

invasiver Verfahren zur Erkennung und Klassifizierung von HCC. Perspektivisch könnte durch eine solche hybride Bildgebung eine genaue Vorhersage über den Differenzierungsgrad des HCC ermöglicht und darauf basierend risikoadjustierte Therapieentscheidungen getroffen werden.

## 4.2 Tiermodell

Insgesamt werden Nagetiermodelle häufig als präklinische Modelle genutzt, (Thoolen et al., 2012) da sie im Vergleich zu anderen Tiermodellen relativ geringe Kosten und eine einfache Handhabung aufweisen. Im Vergleich zu murinen Modellsystemen bieten Rattenmodelle die Möglichkeit interventionelle Therapien und chirurgische Eingriffe durchzuführen (Martins & Neuhaus, 2007). Generell wird bei der Tumorinduktion zwischen autochthonen Modellen und Xenograft-Modellen unterschieden. Bei Xenograft-Modellen entsprechen die transplantierten Zellen einer anderen biologischen Spezies als der der Empfänger. Autochthone Modelle zeichnen sich dadurch aus, dass die Tumorentwicklung, entweder chemisch-induziert oder durch genetische Modifikation, im entsprechenden Organ selbst erfolgt. Xenograft-Modelle werden weiter unterteilt in das orthotopische Modell, bei welchem Tumorzellen in das Zielorgan injiziert werden und das ektope Modell, bei welchem Tumorzellen subkutan injiziert werden (De Minicis et al., 2013). Xenograft-Modelle sind insbesondere aufgrund der kürzeren Beobachtungszeit und der exakten Positionierung der Tumore von Vorteil. Jedoch kommt es durch die Tumorimplantation häufiger zu einer nicht physiologischen Metastasierung durch Tumorzellverschleppung (Gade et al., 2015),(Yang et al., 1992). Beim DEN-induzierten HCC Modell handelt es sich um ein chemisch induziertes, autochthones Modell von Leberkarzinomen. Chemisch induzierte Modelle zeigen mehr Parallelen zur humanen Tumorbiologie (beispielsweise in Bezug auf Durchblutung, Immunologie, Phänotypie und Genetik) als Xenograft-Modelle (Becher & Holland, 2006). Das DEN-induzierte HCC-Modell ist ein seit Langem etabliertes

Tiermodell (Rajewsky et al., 1966), das viele Parallelen zur humanen Pathophysiologie des HCC aufweist (Mitchell et al., 2017). Thoolen et al. haben gezeigt, dass chemisch induzierte Modelle vor allem histomorphologisch dem humanen HCC ähneln (Thoolen et al., 2012). Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen von Connor et al., welche in einem DEN-induzierten Mausmodell gezeigt haben, dass die histologischen Merkmale denen in humanen Tumoren ähneln, wohingegen sich die Mutationsereignisse grundlegend davon unterscheiden. Im Gegensatz zum humanen HCC, wo es durch chronische Entzündungsprozesse zum sukzessiven Umbau der Leber zur Fibrose, Zirrhose und im Verlauf zur HCC Entstehung kommt, zeichnet sich die Tumorgenese des DEN-Modells durch eine DNA Schädigung durch das Karzinogen DEN selbst aus. Diese ist durch mehrere unabhängige Mutationsereignisse im Genom der Hepatozyten gekennzeichnet (Connor et al., 2018). Von großem Interesse sind auch die Parallelen im genetischen Expressionsmuster. Lee et al. verglichen das genetische Expressionsmuster von HCC in 7 unterschiedlichen Mausmodellen (darunter DEN-induziertes HCC) mit dem Expressionsmuster in humanem HCC. Dabei konnte festgestellt werden, dass DEN vom genetischen Expressionsmuster vor allem fortgeschrittenem HCC in Menschen ähnelt (Lee et al., 2004). Lee et al. konnten zeigen, dass das Genexpressionsmuster von DEN-induziertem HCC dem humanen HCC Expressionsmuster mit schlechter Prognose ähnelt (Lee et al., 2004). Des Weiteren ähnelt auch die Angiogenese im DEN Modell der humanen HCC-Angiogenese (Gade et al., 2015). Da Tiermodelle die humane Pathophysiologie aber immer nur bedingt abbilden können, ist es wichtig ein möglichst etabliertes und standardisiertes Modell zu benutzen. Das in dieser Arbeit verwendete DEN Modell stellt ein solches Modell dar, welches wichtige Parallelen zu humanen Leberzelltumoren aufweist und somit ein geeignetes Tiermodell bei der Erforschung des HCC darstellt.

### 4.3 Tumormetabolismus

Als Grundlage der Tumorgenese finden sich neben der unkontrollierten Zellproliferation auch Veränderungen im Zellmetabolismus – bekannt als Warburg-Effekt (Xu et al., 2015). Dabei wird von Tumorzellen trotz aerober Konditionen Glykolyse betrieben. Hierdurch erreichen sie eine vermehrte Glucoseaufnahme in die Zellen und bieten damit mehrere diagnostisch und prognostisch relevante Angriffspunkte (Hanahan & Weinberg, 2011). In einer Metabolomics-Studie konnte gezeigt werden, dass in HCC Gewebe von mitochondrialer Oxydation auf Glykolyse umgestellt wird und dadurch ein erhöhter Glucoseabbau im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Lebergewebe stattfindet (Beyoğlu et al., 2013). Den veränderten Glucosestoffwechsel mit einer erhöhten intrazellulären Glucoseaufnahme macht sich die PET-Bildgebung mit dem Tracer  $^{18}\text{F}$ -FDG zu Nutzen (Hanahan & Weinberg, 2011). Eine frühere präklinische Studie konnte in einem murinen DEN-induziertem HCC Modell zeigen, dass gut differenzierte HCCs eine geringere  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme haben als schlecht differenzierte HCCs (Park et al., 2015). Außerdem konnte bereits in einem DEN-Modell bei Ratten eine intertumorale Heterogenität und Unterschiede bei der Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG gezeigt werden (Gross et al., 2015). Ahn et al. konnten zudem zeigen, dass fortgeschrittene HCCs einen höheren Glucosemetabolismus haben als Tumore im Frühstadium (Ahn et al., 2013). Des Weiteren konnte eine Korrelation des von dem abgeleiteten maximalen Standardaufnahmewertes (SUVmax) im PET/CT mit den Rezidivraten und dem Patientenüberleben beim HCC nachgewiesen werden (Cho et al., 2017), welches PET - insbesondere in Kombination mit der hohen Nachweisempfindlichkeit von DCE-MRT- in den Fokus rückt. Chen et al. konnten in einer retrospektiven humanen HCC-Studie zeigen, dass es eine positive Korrelation zwischen der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme und dem Grading gab (R. Chen et al., 2017). Bisher konnte jedoch noch keine Vorhersage über das Grading anhand bildgebender Verfahren getroffen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass dies in einem DEN-induzierten Rattenmodell möglich ist. Insbesondere die Kombination aus verschiedenen bildgebenden Verfahren, wie der PET/CT und der DCE-MRT,

könnten zukünftig zum einen Grundlage für die weitere Forschung zum allgemeinen Tumormetabolismus sein und darüber hinaus dazu beitragen Erkenntnisse über das menschliche Tumorigradung zu gewinnen und somit Aussagen über die Therapiemöglichkeiten und die Prognose der Erkrankung zu machen.

#### **4.4 Vorteile einer nichtinvasiven Diagnostik**

Patienten mit HCC entwickeln im Verlauf der Erkrankung durch tumorbedingte Destruktion von normalem Lebergewebe häufig eine Leberfunktionsstörung, womit unter anderem eine verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren einhergeht. Dies wiederum führt zu einem erhöhten Blutungsrisiko. Insbesondere problematisch kann dies bei einer invasiven Tumorbiopsie sein. Vor allem die Unterscheidung zwischen einem Regeneratknoten und einem gut differenzierten HCC ist komplex und benötigt eine relativ große Stanze zur erfolgreichen Differenzierung (Sparchez & Mocan, 2018). Oftmals sind mehrere Stanzen empfohlen, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Hierdurch steigt jedoch das Komplikationsrisiko einer Blutung (Huang et al., 1996), (Durand et al., 2001). Hinzu kommt, dass das HCC eine heterogene Tumorentität ist und sich oft multifokal manifestiert und teils auch eine intratumorale Heterogenität aufweist. Bei entsprechender Lage eines Tumorherds kann somit eine Biopsie deutlich erschwert bzw. unmöglich sein (Sparchez & Mocan, 2018). Dies stellt ein großes Hindernis sowohl in der Diagnostik als auch in der gezielten Therapie des HCC dar (Friemel et al., 2015). Da der Zeitpunkt der Tumordetektion und das damit vorliegende Stadium ein starker Prädiktor für die Prognose der Patienten ist, ist die Früherkennung der Tumorerkrankung entscheidend (Singal et al., 2014). Deshalb sind nichtinvasive bildgebende Verfahren mehr und mehr in den Fokus gerückt (Jiang et al., 2018). Yoon et al. konnten zeigen, dass mittels FDG-PET bei Primärläsionen der Leber mit einer Größe von  $>5$  cm signifikant mehr Fernmetastasen im Vergleich zu konventionellen Bildgebungen (CT/MRT) detektiert werden konnten und dadurch eine Neueinstufung

des Stagings und dadurch eine Therapieänderung erfolgte (Yoon et al., 2007). Durch Gross et al. konnte in der Vergangenheit in einem DEN-induziertem HCC Rattenmodell ein Zusammenhang zwischen der darin angewandten PET/CT Bildgebung, der Kontrastmittel- und diffusionsverstärkten MRT Bildgebung und bestimmten histopathologischen Merkmalen hergestellt werden (Gross et al., 2015). Ziel der vorliegenden Studie war es zu testen, ob durch die Kombination mehrerer bildgebender Verfahren eine Vorhersage über den HCC Differenzierungsgrad getroffen werden kann. Im klinischen Alltag könnte hierdurch die am schlechtesten differenzierte Läsion bei multifokal auftretendem HCC identifiziert werden, ohne dass Patienten eine Biopsie oder ein anderes invasives Verfahren zur Bestimmung des Gradings benötigen, was zu einer Minimierung des postinterventionellen Komplikationsrisiko führen und sich positiv auf das Patientenüberleben auswirken könnte.

## **4.5 Limitationen**

Eine Limitation dieser Arbeit stellt die relativ kleine Kohorte von 15 Ratten und insgesamt 38 Tumoren dar. Diese ist dadurch begründet, dass die Bildgebung und die histopathologische Analyse bei Kleintieren sehr teuer und außerdem zunehmend Tierschutzbedenken zu berücksichtigen sind. Insbesondere die MR-Bildgebung ist aufwendig, da atmungsbedingte Bewegungsartefakte die Auswertung der Daten erschweren. In dieser Arbeit wurden zwei Tiere aufgrund von Bewegungsartefakten in der Bildgebung ausgeschlossen. Wir erwarten hierdurch keine Auswirkung auf die Ergebnisse.

Außerdem handelt es sich bei der vorliegenden Studie um ein präklinisches Tiermodell, welches nicht direkt auf den Menschen übertragen werden kann. Zwar ist das DEN-Modell ein seit Jahren etabliertes Modell zur präklinischen Erforschung von Leberkarzinomen, jedoch kann kein Tiermodell alle Aspekte der humanen Tumorgenese abbilden (Connor et al., 2018). Das

DEN Modell stellt durch seine Parallelen zum humanen HCC ein klinisch hoch relevantes Modell dar und ist somit auch für zukünftige Folgestudien geeignet.

Eine weitere Limitation der Studie ist die Verwendung eines einzelnen 7T-MRT-Geräts. Andere Feldstärken wurden aufgrund des hohen Aufwands nicht eingesetzt. Die erhobenen Daten aus der DCE-MR-Bildgebung sollten dadurch nicht weniger aussagekräftig sein, allerdings sind weitere Studien mit anderen Feldstärken sicherlich notwendig, um eine Reproduzierbarkeit und klinische Anwendbarkeit zu prüfen (Kaissis et al., 2020).

Die PET-Bildgebung spielt im klinischen Alltag aktuell in der Diagnostik von HCC Patienten nur eine untergeordnete Rolle. Dies liegt unter anderem daran, dass die PET-Bildgebung einerseits kostspielig ist und andererseits den Nachteil der Strahlenbelastung mit sich bringt. Eine PET/CT Untersuchung hat eine durchschnittliche effektive Strahlendosis von  $21,64 \pm 5,14$  mSv (Li et al., 2019). Im Vergleich dazu liegt die durchschnittliche effektive natürliche Strahlendosis in Deutschland bei 2,1 mSv (Bundesamt für Strahlenschutz, 2019). Trotz dieses Nachteils stellt die PET-Bildgebung insbesondere in Kombination mit der DCE-MR-Bildgebung einen vielversprechenden Ansatz dar, wodurch neue Erkenntnisgewinne in der Diagnostik von HCC erreicht werden konnten und damit translational eingesetzt werden könnten.

## 5 Ausblick

Die Diagnose des HCC kann aufgrund ihres pathognomonischen Kontrastmittel-Washout-Phänomens in der arteriellen Phase rein bildgebend gestellt werden (Vogel et al., 2018). Biopsien werden deshalb, im Gegensatz zu den meisten anderen soliden Tumoren, nicht standardmäßig zur Diagnosestellung benötigt. Hierdurch können Risiken der invasiven Diagnostik vermieden werden, jedoch gehen auch wertvolle Informationen über die Tumorbiologie verloren. Wie jüngste Studien zeigen, konnten histopathologische Erkenntnisse Therapieentscheidungen ändern und das Wiederauftreten der Erkrankung sowie das Patientenüberleben vorhersagen (Herden et al., 2019; Roberts et al., 2018). Im klinischen Alltag finden somit auch bei der Diagnosestellung von HCC weiterhin häufig Biopsien zur histopathologischen Einordnung des Tumors statt. Die Beobachtungen dieser Arbeit legen nahe, dass der Implementierung nicht-invasiver Verfahren zur Vorhersage von histopathologischen Merkmalen große Bedeutung zukommen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von DCE-MRT- und FDG-PET/CT-basierten Parametern Rückschlüsse über histopathologische Eigenschaften von HCC in diesem präklinischen translationalen Tumormodell erbringt und sich hieraus zukünftig vielversprechende Ansätze für die weitere Forschung sowie potentiell den klinischen Alltag ergeben.

## 6 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom stellt weltweit eines der häufigsten Karzinome mit einer hohen Letalität dar. Die Diagnose eines HCC kann prinzipiell aufgrund des pathognomonischen arteriellen Washout-Phänomens bildgebend gestellt werden. Jedoch konnten so bisher keine Rückschlüsse über das histopathologische Grading, welches in der Regel über Biopsien erfolgt, getroffen werden. Die Erkenntnisse über die Tumorbilogie rücken mehr und mehr in den Fokus der HCC Forschung, da sie vielversprechende Ansätze für weitere Studien und Entwicklung von Therapieoptionen bieten. Nichtinvasive Verfahren zur Vorhersage des histopathologischen Gradings bieten insbesondere für eine bereits fortgeschrittene Tumorerkrankung Vorteile, wie beispielsweise die Minimierung eines postinterventionellen Risikos. Ziel der Arbeit war es somit Parameter der dynamischen kontrastmittelverstärkten Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) und der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) zur Vorhersage der histopathologischen Einstufung in einem Diethylnitrosamin-induzierten hepatozellulären Karzinom Modell der Ratte zu überprüfen. In die Studie aufgenommen wurden 15 männliche Wistar-Ratten im Alter von 10 Wochen, welchen 0,01% DEN-haltiges Wasser für 12-20 Wochen verabreicht wurde. Währenddessen erfolgte ein regelmäßiges Screening mittels MR-Bildgebung bis HCC Läsionen  $\geq 0,5$  cm nachweisbar waren. Anschließend erfolgte die Durchführung der eigentlichen Bildgebung mittels PET/CT und DCE-MRT. Insgesamt wurden 38 Tumore analysiert. Für die Auswertung der PET/CT Daten wurde das SUV berechnet. Die Auswertung der MRT Daten erfolgte durch Bestimmung der AUC. Zusätzlich wurden die Lebern seziiert und histopathologisch nach Grading, Volumen, Morphologie, Nekrose, Extrazelluläre Matrix, Immunzellinfiltration und Fibrose befundet. Es fanden sich 14 Tumore mit Grading 1 (gut differenziert) und 24 Tumore mit Grading 2/3 (schlecht differenziert). Sämtliche erhobene Parameter wurden zwischen den beiden Grading Gruppen verglichen. Durch Anwendung von SMOTE

konnte die Ungleichheit der Gruppen behoben werden. Die Kollinearität zwischen den Variablen in den Gruppen wurde mittels hierarchischer Clusterbildung und Hauptkomponentenanalyse beseitigt. Ein logistisches Regressions-Maschinen-Lernmodell wurde für alle erhobenen Bildparameter (DCE-MRT, PET/CT und Volumen) zusammen und für die jeweiligen Parameter einzeln angepasst. Anhand des kombinierten Lernmodells konnte eine mittlere Sensitivität von  $0,88 \pm 0,16$ , eine Spezifität von  $0,70 \pm 0,20$  und eine AUC von  $0,90 \pm 0,03$  bezüglich der Vorhersage des Gradings erreicht werden. Es konnte keine Korrelation zwischen Tumorgrading und den anderen histopathologischen Merkmalen gezeigt werden. Zusammenfassend war somit durch die Kombination von DCE-MRT- und  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-abgeleiteten Parametern eine Vorhersage über die histopathologische Einstufung des Leberzellkarzinoms in einem translationalen Tiermodell möglich. Die Erkenntnisse dieser Arbeit stellen einen Ansatz zur nichtinvasiven Beurteilung histopathologischer Merkmale im HCC dar, wodurch zukünftig ein genaues Grading des Tumors ohne die Nachteile eines invasiven Eingriffs ermöglicht werden könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahn, S. J., Park, M. S., Kim, K. A., Park, J. Y., Kim, I., Kang, W. J., Lee, S. K., & Kim, M. J. (2013). 18F-FDG PET Metabolic Parameters and MRI Perfusion and Diffusion Parameters in Hepatocellular Carcinoma: A Preliminary Study. *PLoS ONE*, 8(8), 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071571>
- Ascha, M. S., Hanouneh, I. A., Lopez, R., Tamimi, T. A.-R., Feldstein, A. F., & Zein, N. N. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 51(6), 1972–1978. <https://doi.org/10.1002/hep.23527>
- Ayuso, C., Rimola, J., Vilana, R., Burrel, M., Darnell, A., García-criado, Á., Bianchi, L., Belmonte, E., Caparroz, C., Barrufet, M., Bruix, J., & Brú, C. (2018). Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma ( HCC ): current guidelines. *European Journal of Radiology*, 101(February 2017), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.01.025>
- Becher, O. J., & Holland, E. C. (2006). Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Research*, 66(7), 3355–3358. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3827>
- Beyoğlu, D., Imbeaud, S., Maurhofer, O., Bioulac-Sage, P., Zucman-Rossi, J., Dufour, J. F., & Idle, J. R. (2013). Tissue metabolomics of hepatocellular carcinoma: Tumor energy metabolism and the role of transcriptomic classification. *Hepatology*, 58(1), 229–238. <https://doi.org/10.1002/hep.26350>
- Blodgett, T. M., Meltzer, C. C., & Townsend, D. W. (2007). PET/CT: Form and function. *Radiology*, 242(2), 360–385. <https://doi.org/10.1148/radiol.2422051113>
- Boussouar, S., Itti, E., Lin, S. J., Decaens, T., Evangelista, E., Chiaradia, M., Chalaye, J., Baranes, L., Calderaro, J., Laurent, A., Pigneur, F., Duvoux, C., Azoulay, D., Costentin, C., Rahmouni, A., & Luciani, A. (2016). Functional imaging of hepatocellular carcinoma

- using diffusion-weighted MRI and 18F-FDG PET/CT in patients on waiting-list for liver transplantation. *Cancer Imaging*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40644-016-0062-8>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (n.d.). *TNM Classification of Malignant Tumours* (8th ed.). John Wiley and Sons.
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y. H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P. J., Song, T., Bronowicki, J. P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A. L., Llovet, J. M., ... Han, G. (2017). Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 389(10064), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9)
- Bruix, J., & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*, 53(3), 1020–1022. <https://doi.org/10.1002/hep.24199>
- Bundesamt für Strahlenschutz. (2019). Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung Jahresbericht 2018. *Bundesministerium Für Umwelt, Naturschutz Und Nukleare Sicherheit (BMU)*, 315.
- Chen, B., & Shih, T. T.-F. (2014). DCE-MRI in hepatocellular carcinoma-clinical and therapeutic image biomarker. *World Journal of Gastroenterology*, 20(12), 3125–3134. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3125>
- Chen, R., Li, J., Zhou, X., Liu, J., & Huang, G. (2017). Fructose-1,6-bisphosphatase 1 reduces 18F FDG uptake in hepatocellular carcinoma. *Radiology*, 284(3), 844–853. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017161607>
- Cho, K. J., Choi, N. K., Shin, M. H., & Chong, A. R. (2017). Clinical usefulness of FDG-PET

- in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical resection. *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 21(4), 194.  
<https://doi.org/10.14701/ahbps.2017.21.4.194>
- Connor, F., Rayner, T. F., Aitken, S. J., Feig, C., Lukk, M., Santoyo-Lopez, J., & Odom, D. T. (2018). Mutational landscape of a chemically-induced mouse model of liver cancer. *Journal of Hepatology*, 69(4), 840–850. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.009>
- Cucchetti, A., Piscaglia, F., Cescon, M., Colecchia, A., Ercolani, G., Bolondi, L., & Pinna, A. D. (2013). Cost-effectiveness of hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 59(2), 300–307.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.009>
- De Minicis, S., Kisseleva, T., Francis, H., Baroni, G. S., Benedetti, A., Brenner, D., Alvaro, D., Alpini, G., & Marzioni, M. (2013). Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 45(6), 450–459. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2012.10.008>
- Dorak, M. T., & Karpuzoglu, E. (2012). Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Frontiers in Genetics*, 3(NOV), 268.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00268>
- Durand, F., Regimbeau, J. M., Belghiti, J., Sauvanet, A., Vilgrain, V., Terris, B., Moutardier, V., Farges, O., & Valla, D. (2001). Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 35(2), 254–258. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00108-8)
- Durst, M., Koellisch, U., Frank, A., Rancan, G., Gringeri, C. V, Karas, V., Wiesinger, F., Menzel, M. I., Schwaiger, M., Haase, A., & Schulte, R. F. (2015). Comparison of acquisition schemes for hyperpolarised <sup>13</sup>C imaging. *NMR in Biomedicine*, 28(6), 715–725. <https://doi.org/10.1002/nbm.3301>

- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 365(12), 1118–1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001683>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fitzmorris, P., Shoreibah, M., Anand, B. S., & Singal, A. K. (2015). Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(5), 861–876. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1806-0>
- Forner, A., Reig, M., & Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet (London, England)*, 391(10127), 1301–1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2)
- Frenette, C. T., Isaacson, A. J., Bargellini, I., Saab, S., & Singal, A. G. (2019). A Practical Guideline for Hepatocellular Carcinoma Screening in Patients at Risk. *Mayo Clinic Proceedings. Innovations, Quality & Outcomes*, 3(3), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2019.04.005>
- Friemel, J., Rechsteiner, M., Frick, L., Böhm, F., Struckmann, K., Egger, M., Moch, H., Heikenwalder, M., & Weber, A. (2015). Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 21(8), 1951–1961. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0122>
- Gade, T. P. F., Hunt, S. J., Harrison, N., Nadolski, G. J., Weber, C., Pickup, S., Furth, E. E., Schnall, M. D., Soulen, M. C., & Simon, M. C. (2015). Segmental Transarterial Embolization in a Translational Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. *J Vasc Interv Radiol.*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jde.2016.03.011>
- Galle, P. R., Forner, A., Llovet, J. M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J. L., Schirmacher, P., & Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 69(1), 182–236.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>

- Granata, V., Fusco, R., Catalano, O., Guarino, B., Granata, F., Tatangelo, F., Avallone, A., Piccirillo, M., Palaia, R., Izzo, F., Petrillo, A., Granata, V., Fusco, R., Catalano, O., Guarino, B., Granata, F., Tatangelo, F., Avallone, A., Piccirillo, M., ... Petrillo, A. (2016). Intravoxel incoherent motion (IVIM) in diffusion-weighted imaging (DWI) for Hepatocellular carcinoma: correlation with histologic grade. *Oncotarget*, 7(48), 79357–79364. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12689>
- Granata, V., Fusco, R., Filice, S., Catalano, O., Piccirillo, M., Palaia, R., Izzo, F., & Petrillo, A. (2018). The current role and future perspectives of functional parameters by diffusion weighted imaging in the assessment of histologic grade of HCC. *Infectious Agents and Cancer*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0194-5>
- Gross, C., Steiger, K., Sayyed, S., Heid, I., Feuchtinger, A., Walch, A., He??, J., Unger, K., Zitzelsberger, H., Settles, M., Schlitter, A. M., Dworniczak, J., Altomonte, J., Ebert, O., Schwaiger, M., Rummeny, E., Steing??tter, A., Esposito, I., & Braren, R. (2015). Model matters: Differences in orthotopic rat hepatocellular carcinoma physiology determine therapy response to sorafenib. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4440–4450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2018>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Herden, U., Schoening, W., Pratschke, J., Manekeller, S., Paul, A., Linke, R., Lorf, T., Lehner, F., Braun, F., Stippel, D. L., Sucher, R., Schmidt, H., Strassburg, C. P., Guba, M., Van Rosmalen, M., Rogiers, X., Samuel, U., Schön, G. Ms., & Nashan, B. (2019). Accuracy of pretransplant imaging diagnostic for hepatocellular carcinoma: A retrospective German multicenter study. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8747438>
- Huang, G. T., Sheu, J. C., Yang, P. M., Lee, H. S., Wang, T. H., & Chen, D. S. (1996).

- Ultrasound-guided cutting biopsy for the diagnosis of hepatocellular carcinoma - A study based on 420 patients. *Journal of Hepatology*, 25(3), 334–338. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80120-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80120-6)
- Jiang, H. Y., Chen, J., Xia, C. C., Cao, L. K., Duan, T., & Song, B. (2018). Noninvasive imaging of hepatocellular carcinoma: From diagnosis to prognosis. *World Journal of Gastroenterology*, 24(22), 2348–2362. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i22.2348>
- Kaissis, G. A., Lohöfer, F. K., Hörl, M., Heid, I., Steiger, K., Munoz-Alvarez, K. A., Schwaiger, M., Rummeny, E. J., Weichert, W., Paprottka, P., & Braren, R. (2020). Combined DCE-MRI- and FDG-PET enable histopathological grading prediction in a rat model of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Radiology*, 124(October 2019), 108848. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2020.108848>
- Kovács, B., Tinya, F., Németh, C., & Ódor, P. (2020). SMOTE: Synthetic Minority Over-sampling Technique Nitesh. *Ecological Applications*, 30(2), 321–357.
- Krause, B. J., Beyer, T., Bockisch, A., Delbeke, D., Kotzerke, J., Minkov, V., Reiser, M., & Willich, N. (2007). [FDG-PET/CT in oncology. German Guideline]. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine*, 46(6), 291–301. <https://doi.org/10.3413/nukmed-282>
- Krebs in Deutschland*. (2017). [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c22\\_leber.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c22_leber.pdf?__blob=publicationFile)
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., ... Cheng, A. L. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, 391(10126), 1163–1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30207-1)
- Lee, J.-S. S., Chu, I.-S. S., Mikaelyan, A., Calvisi, D. F., Heo, J., Reddy, J. K., & Thorgeirsson,

- S. S. (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature Genetics*, 36(12), 1306–1311. <https://doi.org/10.1038/ng1481>
- Lemarchand, C., Tual, S., Levêque-Morlais, N., Perrier, S., Belot, A., Velten, M., Guizard, A.-V., Marcotullio, E., Monnereau, A., Clin, B., Baldi, I., & Lebailly, P. (2017). Cancer incidence in the AGRICAN cohort study (2005-2011) Europe PMC Funders Group. *Cancer Epidemiol*, 49, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2017.06.003>. Cancer
- Li, Y., Jiang, L., Wang, H., Cai, H., Xiang, Y., & Li, L. (2019). Effective Radiation Dose of 18F-Fdg Pet/Ct: How Much Does Diagnostic Ct Contribute? *Radiation Protection Dosimetry*, 187(2), 183–190. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncz153>
- Llovet, J. M., Ducreux, M., Lencioni, R., Di Bisceglie, A. M., Galle, P. R., Dufour, J. F., Greten, T. F., Raymond, E., Roskams, T., De Baere, T., Ducreux, M., Mazzaferro, V., Bernardi, M., Bruix, J., Colombo, M., & Zhu, A. (2012). EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56(4), 908–943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- Marengo, A., Rosso, C., & Bugianesi, E. (2016). Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annual Review of Medicine*, 67(1), 103–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-090514-013832>
- Martins, P. N. A., & Neuhaus, P. (2007). Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver International*, 27(3), 384–392. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01414.x>
- Mazzaferro, V., Llovet, J. M., Miceli, R., Bhoori, S., Schiavo, M., Mariani, L., Camerini, T., Roayaie, S., Schwartz, M. E., Grazi, G. L., Adam, R., Neuhaus, P., Salizzoni, M., Bruix, J., Forner, A., De Carlis, L., Cillo, U., Burroughs, A. K., Troisi, R., ... Majno, P. (2009). Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *The Lancet Oncology*,

10(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70284-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70284-5)

Mazzanti, R., Arena, U., & Tassi, R. (2016). Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World Journal of Experimental Medicine*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.5493/wjem.v6.i1.21>

Mazzanti, R., Arena, U., Tassi, R., Mazzanti, R., Arena, U., & Tassi, R. (2016). *Hepatocellular carcinoma: Where are we?* 6(1), 21–37. <https://doi.org/10.5493/wjem.v6.i1.21>

McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & El-Serag, H. B. (2021). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 73 Suppl 1(Suppl 1), 4–13. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>

Menzel, M. I., Farrell, E. V., Janich, M. A., Khegai, O., Wiesinger, F., Nekolla, S., Otto, A. M., Haase, A., Schulte, R. F., & Schwaiger, M. (2013). Multimodal assessment of in vivo metabolism with hyperpolarized [1- <sup>13</sup>C]MR spectroscopy and <sup>18</sup>F-FDG PET imaging in hepatocellular carcinoma tumor-bearing rats. *Journal of Nuclear Medicine*, 54(7), 1113–1119. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.110825>

Mitchell, J., Tinkey, P. T., Rony, A., Carolyn, V. P., Eskandari, G., George, S. K., Xiao, L., Cressman, E., Morris, J. S., Rashid, A., Kaseb, A. O., Amin, H. M., & Uthamantil, R. (2017). Validation of a preclinical model of diethylnitrosamine-induced hepatic neoplasia in Yucatan miniature pig. *Oncology*, 47(3), 549–562. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823da96d>. Hydrogen

O'Connor, J. P. B., Tofts, P. S., Miles, K. A., Parkes, L. M., Thompson, G., & Jackson, A. (2011). Dynamic contrast-enhanced imaging techniques: CT and MRI. *The British Journal of Radiology*, 84 Spec No(Spec Iss 2), S112-20. <https://doi.org/10.1259/bjr/55166688>

Park, J. H., Kang, J. H., Lee, Y. J., Kim, K. Il, Lee, T. S., Kim, K. M., Park, J. A., Ko, Y. O., Yu, D. Y., Nahm, S. S., Jeon, T. J., Park, Y. S., & Lim, S. M. (2015). Evaluation of diethylnitrosamine-or hepatitis B virus X gene-induced hepatocellular carcinoma with <sup>18</sup>F-FDG PET/CT: A preclinical study. *Oncology Reports*, 33(1), 347–353. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3575>

- Petrick, J. L., Florio, A. A., Znaor, A., Ruggieri, D., Laversanne, M., Alvarez, C. S., Ferlay, J., Valery, P. C., Bray, F., & McGlynn, K. A. (2020). International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978–2012. *International Journal of Cancer*, *147*(2), 317–330. <https://doi.org/10.1002/ijc.32723>
- Rajewsky, M. F., Dauber, W., & Frankenberg, H. (1966). Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science (New York, N.Y.)*, *152*(Table 2), 83–85. <https://doi.org/10.1126/science.152.3718.83>
- Roberts, D. E., Kakar, S., Mehta, N., & Gill, R. M. (2018). A Point-based Histologic Scoring System for Hepatocellular Carcinoma Can Stratify Risk of Posttransplant Tumor Recurrence. *The American Journal of Surgical Pathology*, *42*(7), 855–865. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001053>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Sangro, B., Carpanese, L., Cianni, R., Golfieri, R., Gasparini, D., Ezziddin, S., Paprottka, P. M., Fiore, F., Van Buskirk, M., Bilbao, J. I., Ettorre, G. M., Salvatori, R., Giampalma, E., Geatti, O., Wilhelm, K., Hoffmann, R. T., Izzo, F., Iñarrairaegui, M., Maini, C. L., ... Lastoria, S. (2011). Survival after yttrium-90 resin microsphere radioembolization of hepatocellular carcinoma across Barcelona clinic liver cancer stages: a European evaluation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *54*(3), 868–878. <https://doi.org/10.1002/hep.24451>
- Shankar, S., Kalra, N., Bhatia, A., Srinivasan, R., Singh, P., Dhiman, R. K., Khandelwal, N., & Chawla, Y. (2016). Role of Diffusion Weighted Imaging (DWI) for Hepatocellular Carcinoma (HCC) Detection and its Grading on 3T MRI: A Prospective Study. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, *6*(4), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2016.08.012>

- Singal, A. G., Pillai, A., & Tiro, J. (2014). Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-analysis. *PLoS Medicine*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001624>
- Song, Z. Z. (2008). Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. In *Hepatology* (Vol. 47, Issue 6, pp. 2145–2146). <https://doi.org/10.1002/hep.22356>
- Sparchez, Z., & Mocan, T. (2018). Contemporary role of liver biopsy in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, *10*(7), 452–461. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i7.452>
- Standke, R. (2002). [Basic principles of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography]. *Acta medica Austriaca*, *29*(5), 149–155. <https://doi.org/10.1046/j.1563-2571.2002.02040.x>
- Starley, B. Q., Calcagno, C. J., & Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology*, *51*(5), 1820–1832. <https://doi.org/10.1002/hep.23594>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taouli, B., Johnson, R. S., Hajdu, C. H., Oei, M. T. H., Merad, M., Yee, H., Rusinek, H., Taouli, B., Rs, J., & Ch, H. (2013). Hepatocellular Carcinoma : Perfusion Quantification With Dynamic Contrast-Enhanced MRI. *Gastrointestinal Imaging*, *October*, 795–800. <https://doi.org/10.2214/AJR.12.9798>
- Thoolen, B., ten Kate, F. J. W., van Diest, P. J., Malarkey, D. E., Elmore, S. A., & Maronpot, R. R. (2012). Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions. *Journal of Toxicologic Pathology*, *25*(3), 189–199.

<https://doi.org/10.1293/tox.25.189>

- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians.*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Van Beers, B. E., Daire, J. L., & Garteiser, P. (2015). New imaging techniques for liver diseases. *Journal of Hepatology*, 62(3), 690–700. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.014>
- Villanueva, A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 380(15), 1450–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263>
- Vogel, A., Cervantes, A., Chau, I., Daniele, B., Llovet, J., Meyer, T., Nault, J. C., Neumann, U., Ricke, J., Sangro, B., Schirmacher, P., Verslype, C., Zech, C. J., Arnold, D., & Martinelli, E. (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 29(Supplement 4), iv238–iv255. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy308>
- Waghray, A., Murali, A. R., & Menon, K. N. (2015). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *World Journal of Hepatology*, 7(8), 1020–1029. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i8.1020>
- Xu, X. D., Shao, S. X., Jiang, H. P., Cao, Y. W., Wang, Y. H., Yang, X. C., Wang, Y. L., Wang, X. S., & Niu, H. T. (2015). Warburg Effect or Reverse Warburg Effect? A Review of Cancer Metabolism. *Oncology Research and Treatment*, 38(3), 117–122. <https://doi.org/10.1159/000375435>
- Yang, R., Rescorla, F. J., Reilly, C. R., Faught, P. R., Sanghvi, N. T., Lumeng, L., Franklin, T. D. J., & Grosfeld, J. L. (1992). A reproducible rat liver cancer model for experimental therapy: introducing a technique of intrahepatic tumor implantation. *The Journal of Surgical Research*, 52(3), 193–198. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(92\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0022-4804(92)90072-8)
- Yankeelov, T. E., & Gore, J. C. (2009). Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance

Imaging in Oncology: Theory, Data Acquisition, Analysis, and Examples. *Current Medical Imaging Reviews*, 3(2), 91–107. <https://doi.org/10.2174/157340507780619179>

Yoon, K. T., Kim, J. K., Kim, D. Y., Ahn, S. H., Lee, J. D., Yun, M., Rha, S. Y., Chon, C. Y., & Han, K. H. (2007). Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in detecting extrahepatic metastasis in pretreatment staging of hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 72(SUPPL. 1), 104–110. <https://doi.org/10.1159/000111715>

Yu, J., Yu, X.-L. L., Han, Z.-Y. Y., Cheng, Z.-G. G., Liu, F.-Y. Y., Zhai, H.-Y. Y., Mu, M.-J. J., Liu, Y.-M. M., & Liang, P. (2017). Percutaneous cooled-probe microwave versus radiofrequency ablation in early-stage hepatocellular carcinoma: A phase III randomised controlled trial. *Gut*, 66(6), 1172–1173. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312629>

# 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der weltweiten karzinombedingten Todesfälle im Jahr 2020.(Sung et al., 2021) .....	2
Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus bei im sonographischen Screening festgestellter Leberläsion bei Patienten mit bekannter Leberzirrhose. ....	6
Abbildung 3: Flussdiagramm der Barcelona Clinic Liver Cancer Klassifikation.(Fornier et al., 2018; Villanueva, 2019).....	8
Abbildung 4: Veranschaulichung des Vorgehens zur Präparation der Ratten und anschließenden Einbettung der Lebern zur histologischen Auswertung. ....	20
Abbildung 5: Darstellung zweier HCC Läsionen (mit Pfeilen gekennzeichnet) in der Bildgebung. A: Signalverstärkung beider Tumore in der <sup>18</sup> FDG-PET/CT Aufnahme. B: Erhöhte Kontrastmittelaufnahme beider Tumore in der arteriellen Phase der DCE-MRT Aufnahme.(Kaissis et al., 2020) .....	21
Abbildung 6: Histologische Schnitte zweier Tumore in H&E Färbung. Pfeile kennzeichnen die Tumorkläsionen. Oben: auf Objektträger fixiert. Unten: Mikroskopische Darstellung in 20-facher Vergrößerung. A: Grading G2 (schlecht differenziert), solides Wachstumsmuster. B: Grading G1 (gut differenziert), trabekuläres Wachstumsmuster. ....	24
Abbildung 7: Cluster Karte zur Visualisierung der drei unabhängigen Merkmalscluster (FDG-PET/CT Parameter, DCE-MRT Parameter und Tumolvolumen) und deren Korrelation (Korrelationskoeffizient $\geq 0,5$ ). (Kaissis et al., 2020).....	27
Abbildung 8: Durchschnitts-ROC-Kurve (schwarz gestrichelt) mit AUC 0,90 neben den ROC-Kurven (farbig) des 10-Stichproben-Validierungs-Holdout-Sets für jeden der 5 stratifizierten Shuffle-Splits. ROC, receiver operator characteristic; AUC, area under curve.(Kaissis et al., 2020).....	28
Abbildung 9: Punktdiagramm der logistischen Regression der Hauptkomponenten entlang der Entscheidungsgrenze (schwarz). Lila: gut differenzierte Tumore. Orange: schlecht differenzierte Tumore.(Kaissis et al., 2020).....	29

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation (8. Version) und Stadieneinteilung nach der UICC. T: Tumorausdehnung N: Lymphknotenbefall M: Metastasierung.(Brierley et al.,2016).....	5
Tabelle 2: Mailand Kriterien: Internationaler Maßstab für die Eignung zur Lebertransplantation. Alle Kriterien müssen erfüllt sein. ....	9
Tabelle 3: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests der erhobenen histopathologischen Merkmale im Vergleich zum Tumorgrading.(Kaissis et al., 2020) .....	26

## 10 Danksagung

Größter Dank gilt meiner Familie für ihre ausnahmslose Unterstützung. Insbesondere möchte ich meinen Eltern, Dr. med. Elisabeth Hörl und Dr. med. Thomas Hörl, danken - ohne euch stünde ich heute nicht an dieser Stelle.

Außerdem danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rickmer Braren, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Zudem möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer PD Dr. med. Georgios Kaissis für sein Feedback und seine stete Unterstützung bedanken.