

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose
mittels Biolumineszenz–Imaging und
Magnetresonanztomographie im Mausmodell**

Matthias Johannes Abenstein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Priv.-Doz. Dr. J. Chr. Stollfuss

Die Dissertation wurde am 02.07.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Zielsetzung	5
3.	Material und Methoden	7
3.1	Chemikalien und Medikamente	7
3.2	Geräte	8
3.3	Zelllinie	8
3.3.1	Plasmidkonstruktion und stabile Luciferase Transfizierung ..	9
3.3.2	Kultivierung der Zellen	10
3.4	Tierexperimente	12
3.4.1	Versuchstiere	12
3.4.2	Tierhaltung	13
3.4.3	Zeitlicher Versuchsaufbau	13
3.4.4	Tumorzellinjektion	15
3.4.5	Anästhesie	16
3.4.6	Biolumineszenz-Imaging	17
3.4.6.1	Versuchsaufbau und Vorbereitung	17
3.4.6.2	Durchführung der Aufnahmen	18
3.4.6.3	Bildbearbeitung	21
3.4.6.4	Bildbeurteilung	22
3.4.6.5	Versuch der Quantifizierung und lokalisations- bezogene Region of Interest	23
3.4.7	Magnetresonanztomographie	27
3.4.7.1	Physikalische Grundlagen	27
3.4.7.2	Versuchsaufbau und MRT-Protokoll	31
3.4.7.3	Versuchsdurchführung	32

3.4.7.4	Bildrekonstruktion	32
3.4.7.5	Klinische Bildanalyse	32
3.4.8	Tötung und Obduktion.....	33
3.4.8.1	Tötung	33
3.4.8.2	Durchführung der Obduktion	33
3.4.8.3	Lokalisationsbestimmung und Größeneinteilung der Tumorknoten	34
4.	Ergebnisse	35
4.1	Auswertung der Obduktion	35
4.2	Ergebnisauswertung des Biolumineszenz Imaging	46
4.2.1	Bildbeurteilung	46
4.2.2	Quantifizierung der Ergebnisse	54
4.2.3	Lokalisationsbezogene Regions of Interest	54
4.3	Auswertung der Magnetresonanztomographie	57
4.4	Organbezogener Tumorbefall	67
4.5	Vergleich der bildgebenden Verfahren Biolumineszenz- Imaging und MRT	68
5.	Diskussion	72
5.1	Obduktion	73
5.2	Biolumineszenz Imaging	74
5.3	Magnetresonanztomographie	78
5.4	Vergleich mit der Positronen-Emissions-Tomographie.....	84
6.	Zusammenfassung	88
7.	Literaturverzeichnis	91

1. Einleitung

“Ein Punkt nur ist es, kaum ein Schmerz,
Nur ein Gefühl, empfunden eben;
Und dennoch spricht es stets darein,
Und dennoch stört es dich zu leben.

Wenn du es andern klagen willst,
So kannst du's nicht in Worte fassen.
Du sagst dir selber: “Es ist nichts!”
Und dennoch will es dich nicht lassen.

So seltsam fremd wird dir die Welt,
Und leis verlässt dich alles Hoffen,
Bis du es endlich, endlich weisst,
Dass dich des Todes Pfeil getroffen”,

so beschrieb Theodor Storm in dem Gedicht „Beginn des Endes“ seine Beschwerden kurz bevor er im Juli 1888 an einem Magenkarzinom verstarb. Seine Darstellung der Beschwerden verdeutlicht beispielhaft die tückischen Eigenschaften dieser Erkrankung, die selbst in fortgeschrittenen Stadien keine oder nur unspezifische Beschwerden verursachen und nach der Diagnose oft nicht mehr behandelbar sind.

Maligne Tumorerkrankungen, die nach den Herz-Kreislauf Erkrankungen den zweiten Platz in der Todesursachenstatistik der westlichen Welt einnehmen, stellen noch immer große Anforderungen an die moderne Medizin. Das Robert - Koch - Institut verzeichnete für das Jahr 2006 in Deutschland 218.250 Neuerkrankungen an malignen Neoplasien bei Männern sowie 206.000 bei Frauen.

Das Magenkarzinom nimmt mit einer Inzidenz von ca. 20 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern den 5. Platz bei Männern und den 6. bei Frauen ein. Westeuropa und die USA verzeichneten in den letzten Jahrzehnten eine kontinuierliche Abnahme der Inzidenz,

1. Einleitung

wohingegen in Japan, China und Taiwan das Magenkarzinom immer noch die häufigste tumorbedingte Todesursache ist. Allein in Japan treten jährlich ca. 160.000 Neuerkrankungen auf.

Wie oben bereits angesprochen ist das frühzeitige Erkennen eines Magenkarzinoms für den Behandlungserfolg und die damit verbundene Prognose von entscheidender Bedeutung. In Japan werden daher jährlich etwa sechs Millionen Einwohner vorsorglich endoskopiert, (Kasakura et al., 2002) was zu einer drastischen Senkung der Magenkarzinomerkrankungen führte.

Das jeweilige Erkrankungsstadium ist für die Wahl des Therapiekonzeptes entscheidend. Wird der Tumor früh erkannt und besteht die Möglichkeit einer R0-Resektion (UICC-Stadium I-II), ist die primäre Resektion des Tumors zusammen mit seinen Lymphabflussgebieten die Therapie der Wahl (Siewert et al., 1993).

Aber selbst bei erfolgreicher R0-Resektion treten in 48% der Fälle Lokalrezidive auf (Bennet et al., 2005). Mit multimodalen Therapiekonzepten (Siewert et al., 1992) wie neoadjuvanter Chemotherapie oder postoperativer Radiochemotherapie konnte das Risiko für Lokalrezidive erfolgreich reduziert werden (Lordick et al., 2005, Mc Donald et al., 2001). Die Peritonealkarzinose, oft Folge der intraperitonealen Streuung, die eine besondere Form der Tumordissemination mit besonders schlechter Prognose (Nakamura et al., 1992) darstellt, tritt auch bei R0-resezierten Patienten in 34% der Fälle auf (Siewert et al., 2006). Chirurgisch ist die Peritonealkarzinose nicht behandelbar. Auch konnte durch systemische Applikation einer Chemotherapie keine positive Wirkung erzielt werden (Siewert et al., 1995). Bei Nachweis von Tumorzellen in einer peritonealen Lavage verschlechtert sich die Prognose deutlich (Rosenberg et al., 2006). Daraus

1. Einleitung

resultiert eine deutliche Reduzierung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei manifester Peritonealkarzinose auf 3-6 Monate (Sadeghi et al., 2000). Das frühzeitige Erkennen der Peritonealkarzinose sowie die Entwicklung neuer Therapienstrategien ist somit von entscheidender Bedeutung für die Patienten. Neuere Therapieansätze durch klinische Anwendung von monoklonaren Antikörpern wurden erstmals von Riehmüller 1994 beschrieben. Viel versprechende Ergebnisse wurden durch die Weiterentwicklung dieser Therapieansätze im Mausmodell mit Peritonealkarzinose durch Kopplung hochenergetischer Alphastrahler (Bi-213) an mutationsspezifischen Antikörpern (E-Cadherinmutationen d9Mab) erzielt.

So konnte Huber 2003 durch eine Therapie mit ^{213}Bi -d9Mab die Überlebenszeit gegenüber einer Kontrollgruppe deutlich verlängern. Buchhorn et al. gelang es 2007, die Peritonealkarzinose und deren Rückgang anhand einer ^{213}Bi -d9Mab Therapie mittels Biolumineszenz Imaging darzustellen (2007).

Biolumineszenz Imaging findet beim Menschen zurzeit noch keine Anwendung. Bei Verdacht auf Peritonealkarzinose ist die Laparoskopie immer noch Mittel der Wahl (Sendler et al., 2006). Umso größer sind die Erwartungen an moderne bildgebende Verfahren wie PET und MRT. Einige Studien konnten bereits eine Verbesserung der Tumordetektion bei Peritonealkarzinose verzeichnen.

Mittels ^{18}F -FDG PET konnten Turlakow et al. (2003) in einer Gruppe von 24 Patienten, bei denen eine Peritonealkarzinose vermutet wurde, in 14 Fällen einen Tumorbefall des Bauchraums präoperativ positiv diagnostizieren. Im CT hingegen konnte nur bei 10 Patienten die Peritonealkarzinose positiv dargestellt werden.

Low et al. (1997) konnte mittels Doppelkontrast MRT mit einer Sensitivität von 84% und einer Spezifität von 87% deutlich mehr

1. Einleitung

Tumorläsionen als in der Computertomographie (Sensitivität 54%, Spezifität 91%) nachweisen. Einen deutlichen Vorteil der MRT in der Darstellung und Diagnose eines Tumorbefalls des viszeralen Peritoneums konnte Ricke et al. bereits 1999 gegenüber der Computertomographie feststellen (100% vs. 32%).

Um betroffenen Patienten bessere und effizientere Behandlungen anbieten zu können, sollte in Zukunft weiterhin der Ansporn bestehen, nicht nur neue Therapien zu entwickeln, sondern auch die bereits vorhandenen Möglichkeiten der nicht - invasiven Darstellung der Peritonealkarzinose weiter zu verbessern.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Studie war die möglichst frühzeitige, nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels Biolumineszenz-Imaging und Magnetresonanztomographie sowie der Vergleich der bildgebenden Verfahren bezüglich ihrer Sensitivität der Detektion von soliden Tumorknoten in Abhängigkeit von der Größe und Lokalisation im Intraperitonealraum.

Es wurde ein Peritonealkarzinosemodell in der Nacktmaus unter Verwendung einer humanen Magenkarzinomzelllinie, die stabil mit dem Gen für Firefly Luciferase transfiziert wurde (HSC45-M2-luc) etabliert. Somit war es möglich, die Entwicklung der Peritonealkarzinose mittels Biolumineszenz-Imaging darzustellen und mit den Aufnahmen Magnetresonanztomographie zu vergleichen.

Dazu wurden weiblichen NMRI Nacktmäusen 1×10^7 humane Magenkarzinomzellen (HSC45-M2-luc) intraperitoneal injiziert.

Zu festgesetzten zeitlichen Abständen erfolgten Untersuchungen der Mäuse mittels Biolumineszenz-Imaging und Magnetresonanztomographie.

Sämtliche Aufnahmen jeder Maus wurden von drei Betrachtern unabhängig voneinander begutachtet und bewertet.

Als Standard of Reference dienten die in der Obduktion der Tiere ermittelten Ergebnisse über Lokalisation, Tumorgröße und Volumen der einzelnen Tumorknoten der Peritonealkarzinose.

Im Rahmen dieser Studie wurde in der Dissertation von Herrn Niclas Landvogt auch die Positronen-Emissions-Tomographie hinsichtlich der Spezifität der Detektion eingesetzt und mit den Ergebnissen des

2. Zielsetzung

Biolumineszenz-Imaging und der Magnetresonanztomographie verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Medikamente

Augensalbe, Vidisic®	Dr. Mann Pharma, Berlin
D-Luciferin (Na-Salz)	Synchem, Kassel
Dulbecco's MEM	C C Pro GmbH, Erlangen
Ethanol 70%	Apotheke R. d. Isar
Ether	Chinosol, Seelze
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Genetecin 50 mg/ml	Gibco, U.K.
Ketavet (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia &Upjohn
NaCl-Lösung, 0,9%	Delta-Phama, Pfullingen
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin

3. Material und Methoden

3.2 Geräte

Bildverstärker	Hamamatsu, Herrsching
CCD-Kamera (ORCAII, C4742-98)	Hamamatsu, Herrsching
Cell-Counter, CASY®	Schärfe, Reutlingen
Darkbox, Typ 4, Model 2	Unit One Electronics
Kernspintomograph Sonata (1,5 Tesla)	Siemens, Deutschland
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus, Osterode
Small Animal PET Scanner, (MOSAIC)	Philips, Niederlande

3.3 Zelllinie

Als Zelllinie wurden HSC45-M2 Zellen verwendet. Diese Magenkarzinomzellen vom Sigelringtyp wurden im Jahr 1993 aus Aszites und Pleuraerguss einer japanischen Patientin, die an einem Magenkarzinom, diffuser Typ nach Laurén, litt, isoliert und seitdem in Kultur gehalten (Yanagihara et al., 1993).

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von K. Yanagihara vom National Cancer Research Institute, Chuo-ka, Tokyo für die Versuche zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Plasmidkonstruktion und stabile Luciferase Transfizierung

Die kodierende Sequenz der Firefly Luciferase (f Luc) wurde durch Hind III und Xba I Verdau aus pGL3-basic (Promega, Mannheim, Deutschland) herausgeschnitten. Nach der Erzeugung von Blunt Enden wurde die Sequenz in die Blunt Xho I site des Plasmids pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Die Integrität der geklonten Sequenz (pcDNA3.1-fluc) konnte durch automatisiertes DANN-Sequenzieren (GATC, Konstanz, Deutschland) mit Hilfe eines ABI Prism 377 DANN Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bestätigt werden.

Für die Durchführung der Biolumineszenz-Versuche war es notwendig, das Gen für Firefly Luciferase in das Genom der HSC45-M2 Zellen stabil zu transfizieren. D. Saur, II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, implantierte in die HSC45-M2 Zellen einen Vektor mit der entsprechenden Gensequenz.

Den verwendeten HSC45-M2 luc Zellen wurde unter Kontrolle des Zytomegalievirus Promoters der Expressionsvektor pcDNA3.1-fluc stabil transfiziert. Zu diesem Zweck wurden konfluente Zellen mit 0,8g pcDNA3.1-fluc, 20 µl Effectene und 6,4 µl Enhancer pro Well entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 6-Well-Plattem inkubiert. HSC45-M2 Zellklone mit stabiler Fluc Expression wurden durch Behandlung mit 800 µl/ml Geneticin selektiert.

Nach Zugabe von Luciferin, dessen molekulare Formel $C_{11}H_8N_2O_3S_2$ lautet und dessen molekulares Gewicht 280.325 g/mol beträgt (Abb.1) emittieren die HSC45-M2 Zellen, unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP, Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm nach der Formel:

3. Material und Methoden

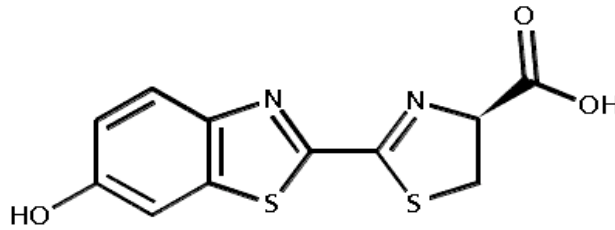
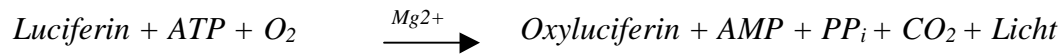


Abb.: 1

Strukturformel des D-Luciferin

3.3.2 Kultivierung der Zellen

Die HSC45-M2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²) in einem Gemisch aus 500 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM, 4,5 g/l Glucose), 50 ml FKS (fetales Kälberserum), 5ml Penicillin (91 I.E.)/Streptomycin (91 mg/ml) und Geneticin bei 37° C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Der ph-abhängige Indikator im Nährmedium zeigt durch Farbumschlag von rot nach gelb eine Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte an.

Nach durchschnittlich sechs Tagen war der gesamte Boden der Zellkulturflasche mit Zellen besetzt (entspricht ca. 1 x 10⁷ Zellen). Diese Zellen wurden je nach Bedarf auf zwei bis maximal acht neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden daraufhin mit 5 ml PBS gespült, um sie von abgestorbenen Zellen und Zellbruchstücken zu reinigen. Zum Ablösen der Zellen wurde pro Zellkulturflasche 7 ml PBS-EDTA zugegeben und 10 min im Wärmeschrank bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die neuen Zellkulturflaschen vorbereitet und mit frischem Nährmedium, das zuvor auf 37° C erwärmt wurde, gefüllt. Nach

3. Material und Methoden

Ende der Inkubationszeit wurden die noch haftenden Zellen durch Beklopfen der Zellkulturflaschen vom Flaschenboden gelöst, anschließend in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und für drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0 Haereus). Nun wurde der PBS-EDTA Überstand abgesaugt, die Zellen mit Nährmedium resuspendiert und auf die vorbereiteten frischen Zellkulturflaschen verteilt.

Zeigte das Nährmedium schon vor der normalen Passagezeit von etwa sechs Tagen durch den Farbumschlag von rot nach gelb eine Anreicherung saurer Metabolite an, so wurden die Zellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt auf neue Kulturflächen verteilt oder das alte Medium wurde abgesaugt und durch frisches ersetzt. Sollten die Zellen nicht in Passage gehalten werden, sondern Versuchstieren injiziert werden, wurden sie statt mit dem üblichen Nährmedium mit reinem, FKS- freien D-MEM resuspendiert.

Die für die in vivo Versuche benötigte Bestimmung der Zellzahl wurde mit einem Zellzählgerät (CASY1, Schärfe Systems) durchgeführt. Dafür wurden die Zellsuspensionen auf Werte zwischen 1:2000 und 1:5000 verdünnt.

Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter möglichst sterilen Bedingungen unter einer LaminAir HN 2472 flow bank (Haereus) durchgeführt. Alle hierbei verwendeten Instrumente wurden vor und nach der Benutzung mit Ethanol desinfiziert.

3.4 Tierexperimente

Das Tiermodell sollte der klinischen Problemstellung der peritonealen Tumorzeldisseminations möglichst nahe kommen. Weiter sollte es die Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren unterschiedlicher Größe und Lokalisation in den Mäusen gewährleisten, um eine möglichst aussagekräftige Beurteilung der bildgebenden Verfahren bezüglich ihrer Sensitivität bei der Detektion zu ermöglichen.

3.4.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden weibliche NMRI Nacktmäuse aus pathogenfreier Zucht (Charles River, Frankreich) verwendet. Die Mäuse waren beim Eintreffen zwischen 5 und 7 Wochen alt. Die Tiere wurden mindestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn eingestallt.

Die Nacktmäuse zeichnen sich durch Thymushypoplasie und durch konsequente Immundefizienz aus. Die humorale Immunität der Tiere ist reduziert, während die zelluläre Immunität nahezu völlig fehlt. Die Mäuse sind somit kaum in der Lage, eine ausreichende Immunantwort gegen die injizierten Tumorzellen aufzubauen und humane Tumore abzustößeln. Sie eignen sich deshalb besonders gut zur erfolgreichen Xenotransplantation humaner Tumorzellen (Rygaard, 1981).

Ein weiterer Vorteil der Nacktmäuse für unsere Studie war, dass diese sich gegenüber Fellmäusen wesentlich besser für Aufnahmen mittels Biolumineszenz-Imaging eignen. Die bei Fellmäusen häufig beobachtete Abschwächung des Biolumineszenzsignals durch das Fell fehlt bei Nacktmäusen.

3.4.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einem speziellen Tierstall in Käfigen zu je 3-6 Tieren gehalten. Der auf 26°C temperierte Tierstall hatte eine Luftfeuchtigkeit von 50-60% und war mit einem speziellen Lichtprogramm ausgestattet. Als Mäusestandardfutter wurde Altromin 1314 verwendet, zum Trinken erhielten die Mäuse Leitungswasser. Um eine mögliche Infektion der Mäuse zu vermeiden, wurde der Stall mit Einmalkitteln und Einmalhandschuhen betreten. Alle Arbeitsflächen wurden vor und nach der Benutzung mit Ethanol desinfiziert. Die Käfige wurden durchschnittlich alle 4 Tage ausgetauscht und gereinigt.

Die Haltung der Tiere erfolgte nach Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die Durchführung der Versuche wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

(Aktenzeichen 211-2531-34/02).

3.4.3 Zeitlicher Versuchsaufbau

Ziel der Studie war die Darstellung der Peritonealkarzinose mittels Biolumineszenz-Imaging und Magnetresonanztomographie, sowie die Beurteilung der einzelnen Verfahren bezüglich ihrer Sensitivität der Detektion von Tumorknoten, abhängig von deren Größe und Lokalisation. Als Standard of Reference für die Beurteilung wurde das Obduktionsergebnis herangezogen. Somit konnten die einzelnen Verfahren auch in Hinblick auf ihre Eignung zur Evaluierung von möglichen neuen Therapieansätzen in der frühen Tumorgenese und Tumorausbreitung beurteilt werden.

3. Material und Methoden

Um diese Beurteilung zu ermöglichen, musste unser Tumormodell gewährleisten, dass sich möglichst viele, unterschiedlich große und an verschiedenen Lokalisationen befindliche Tumore ausbildeten. Dies wurde zum einen durch die applizierte Zellzahl und durch die Injektionsweise, zum anderen durch Bildgebung zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorgenese erreicht.

Aus Vorversuchen war bekannt, dass sich bei der intraperitonealen Injektion von 1×10^7 HSC45-M2 Zellen bereits nach einigen Tagen multiple Tumorknoten im Bauchraum ausbildeten. Die Zeitpunkte der Aufnahmen und der Sektion mussten so gewählt werden, dass sowohl ein ausreichendes Wachstum der Tumore gewährleistet war als auch ein möglichst enger zeitlicher Abstand zwischen Aufnahmen und Sektion eingehalten wurde, um eine objektive Beurteilung der bildgebenden Verfahren zu ermöglichen.

Ausgehend von diesen Bedingungen wurden 16 Mäuse in zwei Gruppen mit jeweils 8 Tieren aufgeteilt.

Bei der ersten Gruppe erfolgten die Aufnahmen mit Biolumineszenz Imaging am Tag 3 nach Tumorzellinokulation, die MRT Aufnahmen und die sofort folgende Obduktion wurden am Tag 4 durchgeführt. Die Aufteilung der Aufnahmen auf zwei Tage verhinderte möglicherweise eine zu hohe Belastung der Mäuse durch die Narkose. Durch diesen zeitlichen Versuchsaufbau wurde gewährleistet, dass die Obduktion in zeitlich möglichst nahen Zusammenhang zur Bildgebung stand. Bei der zweiten Gruppe erfolgte die Bildgebung an Tag 6 und 7 nach Tumorzellinokulation, die Obduktion fand ebenfalls anschließend an die letzte Bildgebung statt.

3. Material und Methoden

Durch diesen Versuchsaufbau wurde garantiert, dass wir eine große Anzahl an Tumorerläsionen erhielten, die sich sowohl in ihrer GröÙe als auch in ihrer Lokalisation unterschieden.

3.4.4 Tumorzellinjektion

Vorstudien hatten gezeigt, dass die intraperitoneale Injektion von 1×10^7 HSC45-M2 Zellen bereits nach einigen Tagen zu teils ausgedehntem Tumor-Befall in verschiedenen Bereichen der Bauchhöhle geführt hatte (Buchhorn et al., 2007; Fischer, 2001). Von diesen Erkenntnissen ausgehend wurde diese Zellzahl für unser Tumormodell übernommen.

Die dafür benötigten Zellen wurden aus mehreren Zellkulturflaschen abgelöst. Durch dreimaliges Zentrifugieren der Zellen in FKS-freiem Medium wurden Zellbruchstücke und Reste von EDTA und FKS entfernt. Die Anzahl der Zellen wurden mit Hilfe eines Zellzählers (CASY1, Schärfe Systems) festgestellt und auf die jeweils zu injizierende Zellzahl verdünnt. Die Injektion erfolgte ohne weitere Zusätze in reinem Zellkulturmedium (D-MEN).

Ziel der Injektion war, eine möglichst homogene Verteilung der Zellen im Bauchraum zu erreichen. Die Zellen wurden in 0,5 ml reinem Medium langsam in den Intraperitonealraum injiziert. Der Einstich erfolgte dabei im Bereich der Linea alba, kaudal des Nabels in einem Winkel zwischen 30° und 45° , um die Leber und andere Bauchorgane nicht zu verletzen.

Auf diese Art wurden 16 Nacktmäusen je 1×10^7 HSC45-M2 Zellen intraperitoneal appliziert.

3.4.5 Anästhesie

Während der Aufnahmen mit den bildgebenden Verfahren mittels MRT und Biolumineszenz-Imaging waren die Mäuse narkotisiert. Für die Anästhesie wurde ein Gemisch aus 8% Rompun® (2% Xylazinhydrochlorid), 10% Ketavet (100mg/ml Ketminhydrochlorid) und 82% physiologischer Kochsalzlösung verwendet. Drei bis fünf Minuten vor Beginn der Bildgebung wurden bis zu 250 µl dieses Gemisches intraperitoneal injiziert. Die Narkotisierung der Mäuse hielt ca. 25 Minuten an. Bei längeren Untersuchungszeiten mussten bei nachlassender Narkose kleinere Mengen des Narkotikums nachgespritzt werden. Die Narkose war nicht zu antagonisieren.

Um die Nacktmäuse bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel vor dem Auskühlen zu bewahren, wurde je nach bildgebenden Verfahren eine Wärmekammer, eine Infrarotlampe oder ein körperwärmendes Wärmekissen verwendet. Aufgrund des fehlenden Lidschlussreflexes wurde zum Schutz der Augen die Augensalbe Vidisic® verwendet.

3.4.6 Biolumineszenz - Imaging

Biolumineszenz-Imaging ist ein funktionelles bildgebendes Verfahren, zur nicht-invasiven Untersuchung von intraperitonealem Tumorwachstum. Schon in mehreren Studien konnte mit dem Biolumineszenz-Imaging die Peritonealkarzinose erfolgreich dargestellt werden. Grundlage des Verfahrens stellen die mit dem Vektor für Firefly Luciferase transfizierten HSC45-M2 Zellen dar. Die Firefly Luciferase ist ein Reporter Gen, das sich gut für nicht-invasive Aufnahmen von Tumorwachstum, Metastasierung, sowie Therapiemonitoring eignet (Baggett et al., 2004; Hastings, 1996). In der Natur kommt das Enzym in der Feuerfliege (*Photinus pyralis*) vor. Das Tier gehört zur Familie der Glühwürmchen (*Lampyridae*) und ist in Mittel- und Südamerika heimisch. In der Gegenwart des Substrates Luciferin produziert das Enzym Firefly Luciferase, unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff, Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm, das Gewebe durchdringt und mit hochempfindlichen Kamerasystemen erfasst werden kann (Rice et al., 2001).

In der Studie sollte diese Eigenschaft des Biolumineszenz-Imaging bezüglich seiner Sensitivität in der Detektion mit den anderen Bildgebenden Verfahren PET und MRT verglichen werden.

3.4.6.1 Versuchsaufbau und Vorbereitung

Die Biolumineszenz-Aufnahmen wurden mit einer digitalen charge-coupled device (CCD) Kamera (Hamamatsu ORCA II-ER) mit Bildverstärker-Einheit (Hamamatsu) durchgeführt. Diese hoch auflösende Kamera (1024 x 1024 Pixel) bietet bei sehr geringem Hintergrundrauschen über das Spektrum von 350 nm bis 850 nm einen sehr hohen Quantenwirkungsgrad von bis zu 72% und ist damit für die

3. Material und Methoden

Detektion des von der Firefly Luciferase produzierten Lichts (Wellenlänge 562 nm) besonders geeignet. Die Kamera ist auf einer Dunkelkammer angebracht. Die Dunkelkammer verfügt über eine verstellbare Fläche auf welche die zu untersuchenden Tiere auf einer zuvor festgelegten Einschubhöhe gelegt wurden. Außerdem ist in der Kammer eine verstellbare Lichtquelle vorhanden, so dass Aufnahmen bei gedimmtem Licht ermöglicht werden konnten. Auch kann die Belichtungszeit der Kamera je nach Versuch und Fragestellung frei gewählt werden. Im Bildverstärker können verschiedene Verstärkungsstufen (gain) eingestellt werden. Aufgrund von Voruntersuchungen wurde für diese Studie für Aufnahmen bei gedimmtem Licht eine Verstärkung von 500, für Aufnahmen ohne externe Lichtquelle eine Verstärkung von 800 festgelegt. Die Bilder der Kamera werden auf einen Windows (Microsoft) Rechner übertragen. Zur Bearbeitung und Auswertung der Aufnahmen diente die Simple PCI Software (Hamamatsu).

Um die für die Versuche benötigte D-Luciferin Lösung herzustellen, wurden 15 mg D-Luciferin Natriumsalz (Synchem) pro Milliliter sterilem Wasser gelöst, filtersterilisiert und bei -70°C eingefroren gelagert. Die je nach Versuch benötigte Menge wurde jeweils kurz vor der Injektion aufgetaut und auf Körpertemperatur erwärmt, aber dennoch bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert.

3.4.6.2 Durchführung der Aufnahmen

Die Biolumineszenz-Aufnahmen wurden gruppenabhängig entweder an Tag 3 oder Tag 6 nach Tumorzellinokulation durchgeführt. Die

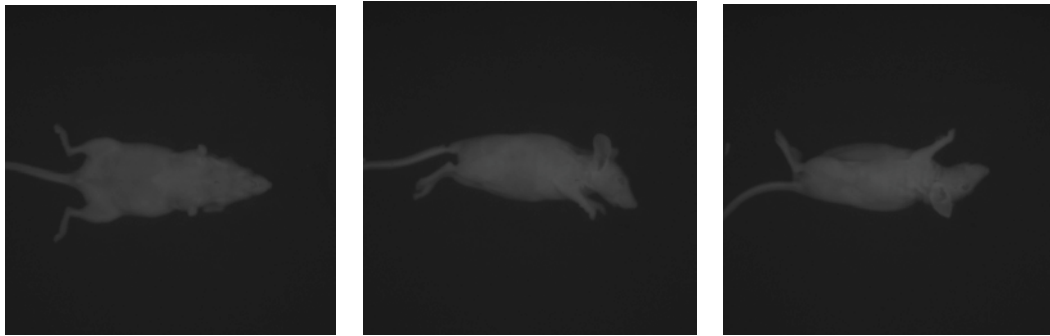
3. Material und Methoden

erhaltenen Ergebnisse dienten als Grundlage zur Beurteilung der Sensitivität im Vergleich zu den anderen bildgebenden Verfahren.

Nachdem die Versuchstiere unter möglichst sterilen Bedingungen in ihrem Käfig aus dem Stall in den Untersuchungsraum gebracht wurden, wurde der Käfig für die Dauer des Versuchs unter ebenfalls möglichst sterilen Bedingungen abgestellt. Kurz vor Beginn der Aufnahmen wurden die Mäuse einzeln entnommen und in der Wärmekammer gelagert, während die weiteren Arbeitsschritte vorbereitet wurden. Nachdem das Luciferin auf Raumtemperatur erwärmt worden war, wurden in eine Insulinspritze 300 µl der D-Luciferin Lösung (entspricht 4,5 mg D-Luciferin Natriumsalz) sowie 200µl des Rompun-Ketamin-Gemisches aufgezogen und dem zu untersuchenden Tier intraperitoneal injiziert. Die nötige Menge an D-Luciferin wurde in Vorversuchen ermittelt, hierzu verweise ich auch auf die Doktor - Arbeit von Matthias Buchhorn.

Daraufhin wurde das Tier zurück in die Wärmekammer gelegt, um die Auskühlung während der Narkose zu minimieren. Neun Minuten post injektionem wurde das Tier auf einem Gelkissen gelagert und auf einer festgelegten Position in der Dunkelkammer positioniert. Zehn Minuten nach der Injektion des Narkose-Luciferin-Gemisches wurde mit den Biolumineszenz Aufnahmen begonnen. Es wurden von jeder Maus Aufnahmen in drei verschiedenen Positionen durchgeführt: in Rückenlage, in rechter und linker Seitenlage. Bevor mit der Biolumineszenz Messung begonnen wurde, erfolgten die ersten Aufnahmen in der jeweiligen Position bei gedimmtem Licht mit einer Belichtungszeit von 0,15 s (Abb. 2).

3. Material und Methoden



Rückenlage

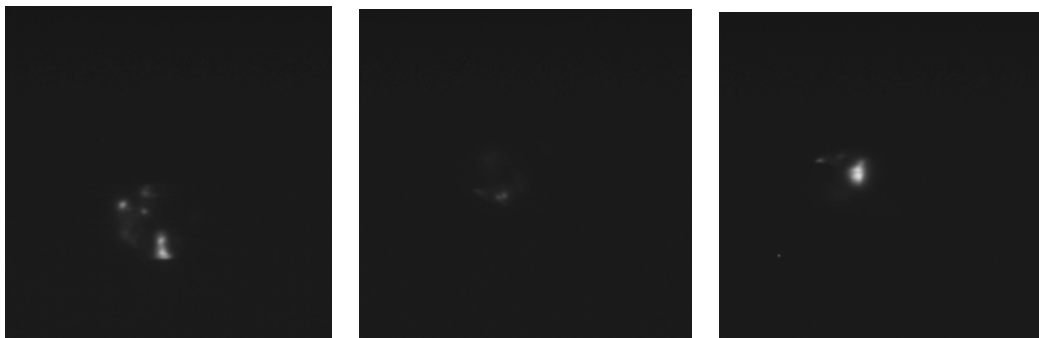
Linksseitenlage

Rechtsseitenlage

Abb.: 2

Nativ-Aufnahmen einer Maus in Rückenlage, sowie linker und rechter Seitenlage.

Direkt im Anschluss folgte die Messung des Lichtsignals. Das Licht in der Dunkelkammer wurde ausgeschaltet und die Biolumineszenz Aufnahmen mit Belichtungszeiten von 2 und 10 sec und einer Verstärkungstufe von 800 durchgeführt (Abb. 3).



Rückenlage

Linksseitenlage

Rechtsseitenlage

Abb.: 3

Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus in Rückenlage, sowie linker und rechter Seitenlage.

Nach Abschluss der Aufnahmen wurden die Mäuse bis zum Ende der Narkose wieder in die Wärmekammer gesetzt. Nachdem sich das

jeweilige Tier vollständig von der Narkose erholt hatte, wurde es zu den übrigen Tieren wieder in den Käfig gelegt. Nach Beendigung der Untersuchung wurde der Käfig wieder unter möglichst sterilen Bedingungen in den Stall zurück gebracht.

3.4.6.3 Bildbearbeitung

Die nativen Aufnahmen des Biolumineszenz-Imaging wurden im Anschluss mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms der Hamamatsu Simple PCI Software bearbeitet. Die bei gedimmtem Licht aufgenommenen Bilder werden dazu mit der zugehörigen Biolumineszenz-Aufnahme so überlagert, dass das Biolumineszenz Signal auf dem Körper der Maus lokalisiert werden kann. Dadurch können unter Berücksichtigung der Aufnahmen in verschiedenen Positionen dieser Maus bereits Aussagen über den Tumorbefall gemacht werden. Um die Lichtintensität besser zu veranschaulichen und damit auch Informationen auf die vertikale Tumordicke, beziehungsweise auf die Tumordichte ziehen zu können, wurden die nativen Bilder mit Hilfe der Hamamatsu Simple PCI Software in Pseudocolours umgewandelt (Abb. 4). Bereiche mit sehr hoher Lichtintensität, die denen mit sehr vielen Tumorzellen entsprechen, werden rot dargestellt, Bereiche mit hoher Lichtintensität grün, und Bereiche mit geringer Lichtintensität blau. Die Übergänge zwischen den Farben sind fließend, es wird das gesamte Farbspektrum von rot nach blau abgedeckt

3. Material und Methoden

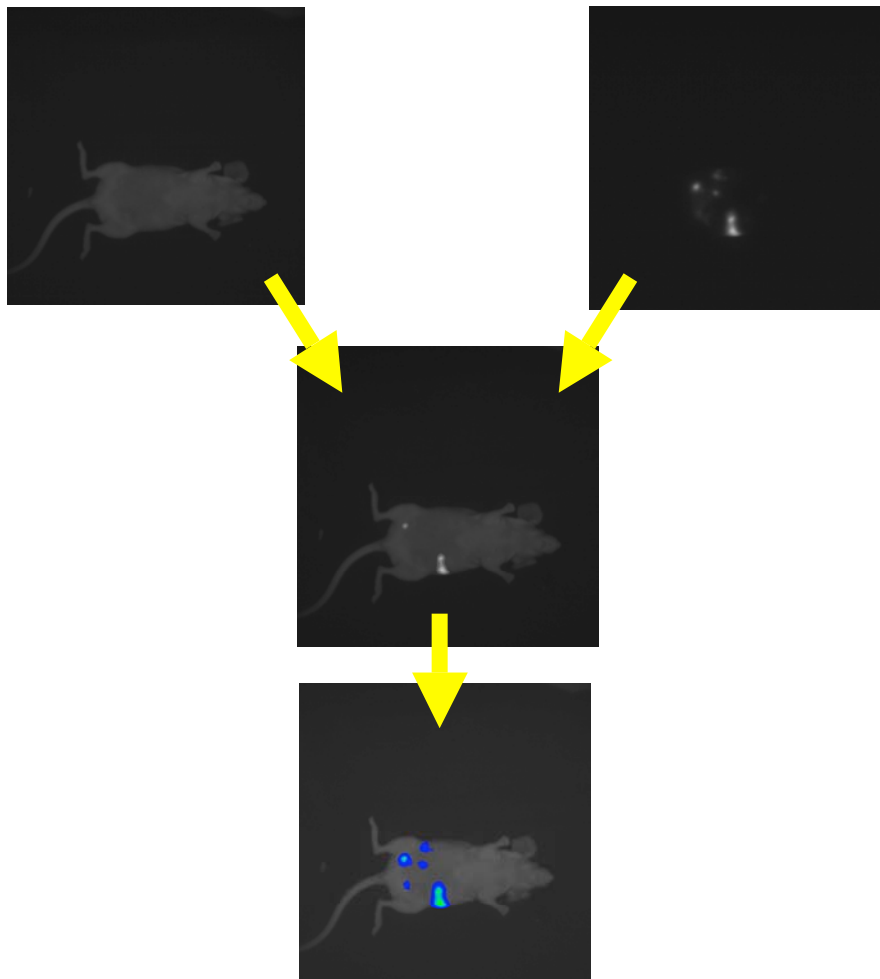


Abb.: 4

Schematische Darstellung der Schritte der Bildbearbeitung der Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus: die native Aufnahme der Maus wird mit der zugehörigen Biolumineszenz-Aufnahme überlagert. Im nächsten Schritt werden zur besseren Darstellung der Lichtintensitäten diese farblich dargestellt.

3.4.6.4 Bildbeurteilung

Ein Ziel dieser Studie war die Beurteilung der Sensitivität von Biolumineszenz-Imaging bei Peritonealkarzinose im Mausmodell. In dieser Studie wurde ein Protokoll mit 10 sec Belichtungszeit und einer Bildverstärkung (gain) von 800 für sämtliche Aufnahmen festgelegt.

3. Material und Methoden

Die Bewertung erfolgte sowohl im unbearbeiteten als auch im bearbeiteten Zustand. Es wurden sämtliche Aufnahmen jeder Maus von drei Betrachtern unabhängig voneinander, ohne Kenntnis der Obduktion begutachtet und bewertet. Die Bereiche in denen erhöhte Lichtintensitäten sichtbar waren wurden als potentiell positiver Tumorbefall dokumentiert und später mit den Ergebnissen der Obduktion verglichen. Durch den Abgleich der im Biolumineszenz Imaging erhaltenen Ergebnisse mit dem bei der Obduktion registrierten Tumorbefall war es in allen Fällen möglich, den als positiv gewerteten Lichtintensitäten die entsprechenden Tumorknoten zuzuordnen.

Auf diese Weise konnte die Sensitivität der Detektion des Biolumineszenz-Imaging für dieses Tumormodell ermittelt werden.

3.4.6.5 Versuch der Quantifizierung und lokalisationsbezogene Regions of Interest

Um weitere Rückschlüsse bezüglich der Sensitivität und der Korrelation zwischen gemessenen Signalintensitäten und der Größe der bei der Obduktion gefundenen Tumoren ziehen zu können, wurden mehrere Versuche der Quantifizierung durchgeführt.

In ausgewählten Lokalisationen wurden ROIS („Regions of Interest“) über die einzelnen Tiere gelegt. Innerhalb dieser ROIS wurde die mittlere Lichtintensität („mean grey level intensity“) sowie die totale Lichtintensität („total dose“) des Biolumineszenz-Signals mit Hilfe der Hamamatu Simple PCI Software gemessen. Ziel dieses Ansatzes war eine mögliche Korrelation zwischen den beim Biolumineszenz-Imaging gemessenen Lichtintensitäten und den bei der Obduktion tatsächlich

3. Material und Methoden

gemessenen Tumorgrößen bzw. Tumolvolumen dazustellen. Wie in der Literatur bekannt ist die Intensität des gemessenen Signals stark von der Lokalisation des Tumors im Bauchraum abhängig. Liegt der Tumor beispielsweise tief im Bauchraum und wird das gebildete Licht von darüber liegenden Geweben verdeckt, kann es zu einer Abschwächung des Signals kommen (Blasberg et al., 2003). Liegen sehr dichte Organe, wie z.B. die Leber über einer Tumorabsiedelung, kann dies vor allem bei kleineren Tumorknoten zur völligen Auslöschung des Signals führen. Deshalb wurden in dieser Studie zwei sehr typische, bei vielen Mäusen auftretende Tumorlokalisationen ausgewählt die oberflächlich lagen und die jeweils untereinander verglichen werden konnten.

Zum Einem wurde die Region um Pankreas und Magen gewählt. Bei vielen Mäusen wurde in dieser Region eine Tumorabsiedelung nachgewiesen. Aufgrund der sehr hohen Anzahl von Tumoren und der immer ähnlichen Lokalisation und Tiefe im Bauchraum konnten die gemessenen Intensitäten gut miteinander verglichen werden.

Die Größe der als Standard festgelegten Region of Interest wurde so gewählt, dass diese ROI bei jeder Maus den Tumor in der Pankreas-Magen-Region vollständig einschloss. Das gewählte ROI wurde gespeichert, um sicherzustellen, dass immer dieselbe ROI verwendet wurde. Diese Standard-ROI wurde nun über die jeweilige Magen-Pankreasregion jeder Maus gelegt und die mittlere Lichtintensität gemessen. Die gleiche ROI wurde anschließend in den Hintergrund des Bildes außerhalb der Maus gelegt, um die mittlere Lichtintensität des Hintergrundes zu messen (Abb. 5).

3. Material und Methoden



Abb. 5:

Biolumineszenz-Aufnahme einer Maus:

die roten Kreise stellen die Lage der gewählten Standard ROIS zur quantitativen Auswertung der Biolumineszenz Aufnahmen dar.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Hintergrundintensitäten vorzubeugen und um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde nun die mittlere Lichtintensität des Hintergrundes von der mittleren Lichtintensität des Tumors subtrahiert. Diese erhaltenen Ergebnisse wurden mit den in der Obduktion ausgemessenen Tumorgrößen korreliert.

Als zweite Region of Interest wurde der Mittelbauch gewählt. Dieser Bereich schloss sowohl Filiae an Dünn- und Dickdarmschlingen als auch am Mesenterium anhaftende Läsionen ein. Hier konnten bei vielen Tieren Tumorabsiedelungen nachgewiesen werden.

Identisch zum Vorgehen bei der Pankreas-ROI wurde eine Standard-ROI festgelegt, die über jede Tumorabsiedelung in den oben beschriebenen Bereichen gelegt wurde. Nach der Messung der mittleren Lichtintensität über der jeweiligen Läsion, wurde eine exakt gleich große ROI zur Ermittlung der mittleren Hintergrundlichtintensität an den Rand des

3. Material und Methoden

Bildes neben die Maus gelegt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden subtrahiert und in Korrelation mit den in der Obduktion gefundenen Tumoren und deren Größe gesetzt.

3.4.7 Magnetresonanztomographie

Dem MRT kommt in der heutigen Zeit immer größere Bedeutung zu. Nicht nur die fehlende Strahlenbelastung, sondern auch die ständige Verbesserung der Bildauflösung führen zu einer Optimierung der Voraussetzungen für effiziente und risikoarme Diagnostik. Die in vivo Darstellung von Tumorausdehnung und deren Abnahme durch Ansprechen auf verschiedene Therapien stellt den hauptsächlichen Nutzen des MRI dar. In den letzten Jahren wurden an die Magnetresonanztomographie aber auch weitere wichtige Anforderungen in der diagnostischen Onkologie gestellt. Die Früherkennung von präkanzerösen Gewebe, die detaillierte Charakterisierung von kanzerösen Geweben, die Charakterisierung der vom Tumor indizierten Angiogenese und deren Rolle in der weiteren Tumorprogression sind nur einige Beispiele dafür (Lewis et al., 2002).

3.4.7.1 Physikalische Grundlagen

Alle Atome mit einer ungeraden Protonenzahl (z.B. H, O, F, Na) sind im Prinzip für die Magnetresonanztomographie geeignet. Sie besitzen einen von Null verschiedenen Gesamtdrehimpuls (Gesamt-Spin), welcher zu einem magnetischen Dipolmoment führt. Vereinfacht kann man den Kern somit mit einem Stabmagneten vergleichen.

Für die MRT- Bildgebung ist das Wasserstoffproton von entscheidender Bedeutung, da es in gebundener Form (z.B. in Fettsäuren) in großer Menge im menschlichen Körper vorkommt und auch die größte Sensitivität auf das Magnetfeld besitzt.

3. Material und Methoden

Die Wasserstoffprotonen haben im menschlichen Körper keine geordnete Richtung. Ein von außen einwirkendes Magnetfeld richtet die Protonen entlang einer Achse entweder im parallelen oder antiparallelen Zustand aus.

Mit Hilfe einer Antennenspule werden Hochfrequenzimpulse, welche mit genau der gleichen Frequenz wie die Präzessionsfrequenz der Wasserstoffprotonen (42,5 MHz/T) besitzen, auf die Protonen ausgesandt. Diese Hochfrequenzimpulse lösen das Phänomen der Resonanz aus.

Das Einstrahlen des Hochfrequenzimpulses hat prinzipiell zwei Effekte auf die Protonen. Einerseits werden einige der parallelen ausgerichteten Protonen vom energieärmeren parallelen Zustand in den energetisch höheren antiparallelen Zustand überführt (Anregung). Zusätzlich bewirkt der Hochfrequenzimpuls eine „Gleichschaltung“ oder „Synchronisierung“ der Protonen, d.h. alle Protonen befinden sich in einer gemeinsamen Phase auf der Kreisbahn um die Hauptmagnetfeldachse.

Im Folgenden ist wichtig, dass die MRT nicht die Position und Ausrichtung der einzelnen Protonen, sondern immer nur die aus den einzelnen „Stabmagneten“ resultierenden Gesamtmagnetisierung, angegeben in der Form eines Vektors, misst.

Durch das Einstrahlen des Hochfrequenzimpulses wird der Gesamtmagnetisierungsvektor ausgelenkt. Durch das Zurückfallen der antiparallelen Protonen in den energieärmeren Zustand entsteht eine Art Antwort in Form eines deutlich schwächeren Hochfrequenzsignals. Dieses Antwortsignal stellt die Grundlage für das zu erzeugende Bild dar. Innerhalb des Antwortsignals wird zwischen der Wiederzunahme der Längsmagnetisierung entlang der Hauptmagnetfeldachse (T_1 -Relaxation)

3. Material und Methoden

und der Abnahme der Quermagnetisierung des ausgelenkten Gesamtvektors (TR-Relaxation) unterschieden. Es handelt sich hierbei um zwei völlig unabhängige, aber gleichzeitig ablaufende Prozesse, die getrennt betrachtet werden müssen.

Nach Abschalten des Hochfrequenzsignals verlieren die angeregten antiparallelen Protonen die eingestrahlte Energie wieder und kehren in den energieärmeren parallelen Zustand zurück.

Außerdem kommt es zusätzlich zu einer sog. Dephasierung der Protonen. Sie befinden sich nun nicht mehr synchron an exakt gleicher Stelle auf der Kreisbahn um das Hauptmagnetfeld, sondern verteilen sich auf der gesamten Kreisbahn. Die Protonen strahlen dabei die Energie in Form von elektromagnetischen Wellen ab. Dieser Vorgang wird Relaxation genannt und durch die Zeitkomponenten T_1 und T_2 beschrieben.

Unter T_1 (longitudinale Relaxationszeit) versteht man die Zeitkonstante, die den Wiederaufbau des Gesamtmagnetisierungs-vektors in Richtung des Hauptmagnetfeldes beschreibt. Für T_1 gilt definitionsgemäß, dass 63% der Protonen in ihre Ausgangsposition zurückgekehrt sind. Diese Zeitspanne wird hauptsächlich davon bestimmt in welcher Gewebestruktur sich die Protonen befinden und wie schnell sie abhängig davon die aufgenommene Energie an die Umgebung abgeben können. Deshalb wird die T_1 -Zeit auch als Spin- Relaxation bezeichnet.

Die T_2 -Zeit (transversale Relaxationszeit) ist die Zeitkonstante für die Abnahme des Gesamtmagnetisierungsvektors in der transversalen Richtung (Quermagnetisierung) zum Hauptmagnetfeld.

Unter Repetitionszeit (TR) versteht man die Zeitspanne zwischen zwei Hochfrequenzimpulsen. Die Echozeit (TE) ist die Zeitspanne zwischen Anregung der Protonen und der Messung des MR-Signals.

3. Material und Methoden

Bei der Aufnahme von T_1 - gewichteten Bildern sind Repetitionszeit und Echozeit kurz gewählt (z.B. TR 500ms und TE 15ms). T_2 – gewichtete Aufnahmen haben klassischerweise eine längere Repetitions- und Echozeit (meist TR 2000-9000, TE 90ms). Je nach Gewebe sind diese Zeiten sehr unterschiedlich. Durch diese unterschiedliche Signalintensität wird es im MRT möglich, zwischen den unterschiedlichen Geweben zu unterscheiden.

Gewebebeispiele	T1-gewichtete Messung	T2-gewichtete Messung
Fett	sehr hell	hell
spongiöser Knochen beim Erwachsenen	sehr hell	hell
Flüssigkeit, Ödeme	dunkel	sehr hell
Knorpel	dunkel	dunkel
fließendes Blut	sehr dunkel	sehr dunkel
Muskulatur	mittel	mittel
Luft, Knochenkompakta	sehr dunkel	sehr dunkel

3.4.7.2 Versuchsaufbau und MRT-Protokoll

Die MRT-Aufnahmen erfolgten mit einem 1,5 Tesla Siemens Sonata Scanner (Abb. 6). Das Kernstück des Tomographen ist ein 1,5 Tesla Magnet (4050 kg), der Röhrendurchmesser beträgt 60cm und das DSV (diameter spherical volume) misst 50 cm.

Alle Aufnahmen der Mäuse wurden in Bauchlage, T₂-gewichtet mit einer Repetitionszeit von 3580 ms und einer Echozeit von 92 ms durchgeführt. Die Schichtdicke betrug 2mm, das Voxel Volumen 0,18 mm³. Es wurden klassische Spin-Echo-(SE-) Sequenzen verwendet. Der Anregungswinkel (Flip-Angle) betrug 169°. Die Scanzeit pro Maus betrug 20 Minuten.

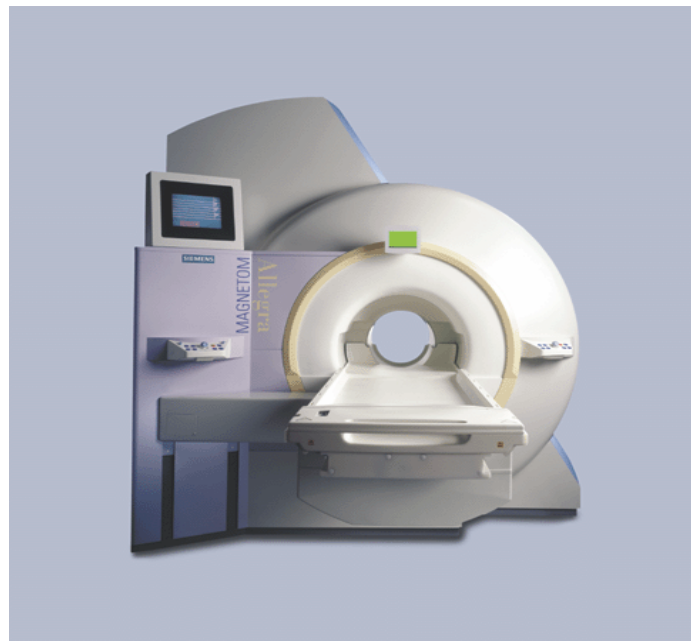


Abb.: 6

Ansicht des Siemens Sonata Scanners

3.4.7.3 Versuchsdurchführung

Um für die MRT Untersuchung eine möglichst große Sterilität gewährleisten zu können, wurden die Mäuse in einem separaten Raum aufbewahrt. Erst kurz vor dem Beginn der Untersuchung wurde das jeweilige Tier mit 250-400 µl Rompun/Ketamin intraperitoneal anästhesiert. Eine Steigerung der Anästhesie war aufgrund der längeren Untersuchungszeit von bis zu 25 Minuten bisweilen nötig, um das Risiko des frühzeitigen Erwachens aus der Narkose zu minimieren. Um die Tiere bestmöglich während der Untersuchung vor Unterkühlung zu bewahren, wurden die Mäuse zwischen mit warmen Wasser gefüllten Untersuchungshandschuhen im MRT-Scanner gelagert, fixiert und nach Ende der Untersuchung auf Wärmekissen in ihrem Käfig zurückgebracht.

3.4.7.4 Bildrekonstruktion

Die Schnittbilder der MRT-Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Syngo-Software Programm berechnet und durch Pentium 4/2,2 GHz Panoramic Recon Image Processor rekonstruiert.

3.4.7.5 Klinische Bildanalyse

Die jeweiligen Magnetresonanzschnittbilder wurden daraufhin auf makroskopisch sichtbare solide Tumoren sowie nach Anzeichen von Peritonealkarzinose kritisch begutachtet. Die Analyse der einzelnen Schnitte wurde mit Hilfe der Osirix Quick Manual (Version 1.0) Software durchgeführt. Die Begutachtung erfolgte durch drei voneinander unabhängige Betrachter ohne Kenntnis der Obduktionsergebnisse. Bei Übereinstimmung der drei Betrachter in Bezug auf eine fragliche Läsion wurde diese als positiv für einen Tumorbefall gedeutet und dokumentiert.

Die erlangten Ergebnisse wurden mit der Obduktion als Standard of Reference korreliert und entsprechend als richtig positiv, falsch positiv oder falsch negativ ausgewertet.

3.4.8 Tötung und Obduktion

Um die bei der Bildgebung erhaltenen Ergebnisse beurteilen und bewerten zu können, dienten die bei der Sektion der Mäuse gefundenen Tumore als Standard of Reference für die Auswertung der bildgebenden Verfahren. Die Obduktion erfolgte bei beiden Gruppen jeweils unmittelbar nach dem letzten Bildgebenden Verfahren.

3.4.8.1 Tötung

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Atemstillstand, verursacht durch Betäubung mit CO₂, nach Eröffnung des Brustkorbes. Die Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortenbogens führte zum Entbluten der Organe.

3.4.8.2 Durchführung der Obduktion

Nach Sternotomie wurde die Aorta durchtrennt. Nach der daraus folgenden Entblutung der Organe wurde die Bauchhaut vorsichtig vom Peritoneum abpräpariert. Die Subkutis und die nun freiliegende Seite des Peritoneums wurden auf makroskopisch sichtbare Tumordinfiltration untersucht. Anschließend erfolgte die Durchtrennung des Peritoneums. Die jetzt eröffnete Bauchhöhle wurde nun systematisch von der Leber ausgehend begutachtet. Alle Bauchorgane wurden freigelegt, mobilisiert und nach makroskopischen sichtbaren Tumorabsiedelungen durchsucht.

Die gefundenen Läsionen wurden vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden daraufhin dokumentiert.

Die Mäuse wurden ordnungsgemäß und nach den Regeln des Strahlenschutzes entsorgt.

3.4.8.3 Lokalisationsbestimmung und Größeneinteilung der Tumorknoten

Nach der Obduktion wurden die einzelnen Tumore entsprechend ihrer Größe in Gruppen eingeteilt.

Als Einteilungskriterium wurde die bei der Obduktion gemessene maximale Tumorausdehnung in Millimeter herangezogen. So entstanden 5 Gruppen, beginnend mit Gruppe 1, die Tumoren mit einer Größe von 1-2 mm enthielt, Gruppe 2 mit Tumoren zwischen 2 und 4 mm, Gruppe 3 mit Tumoren zwischen 4 und 6mm, Gruppe 4 mit Tumoren zwischen 6 und 8 mm bis hin zur Gruppe 5, die Tumoren > 8mm beinhaltete.

Als weiteres Bewertungskriterium wurde das Volumen der Tumore entsprechend der Formel Länge * Breite* Höhe * 0,5 berechnet.

Anschließend wurden die Tumore aller Mäuse den einzelnen Bauchorgane zugeordnet und in entsprechende Gruppen eingeteilt, um die Lageabhängigkeit der einzelnen bildgebenden Verfahren zu berücksichtigen und einen entsprechenden Vergleich zu ermöglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der Obduktion

Im Rahmen des Tumormodells wurden 16 NMRI Nacktmäusen jeweils 1×10^7 HSC45-M2 Zellen intraperitoneal injiziert. Um ein ausreichendes Tumorstadium zu gewährleisten, erfolgten die Aufnahmen mittels Biolumineszenz-Imaging am dritten und sechsten Tag. Die Magnetresonanz-Aufnahmen wurden vierten und am siebten Tag nach Tumorzellinokulation durchgeführt.

Die Obduktion der Versuchstiere erfolgte nach dem in Material und Methoden beschriebenen Schema je nach Gruppe entweder an Tag vier oder an Tag sieben unmittelbar anschließend an das letzte bildgebende Verfahren und diente als Standard of Reference für die Auswertung der Bildgebung. Eine Maus verstarb kurz nach Tumorzellinokulation. Somit gingen 15 Tiere in die endgültige Auswertung mit ein. Alle Tiere bildeten im Verlauf der Studie eine Peritonealkarzinose aus. Der Zeitpunkt der Obduktion wurde so gewählt, dass sich im Rahmen der Peritonealkarzinose Tumorknoten in unterschiedlicher Lage und Größe ausbilden konnten. Der Tumorbefall des Bauchraums bildete sich bei allen Tieren nach einem ähnlichen Muster mit typischer Organbeteiligung aus.

Tabelle 1 zeigt zusammenfassend eine Übersicht aller bei der Obduktion gefundener Tumorknoten, Abbildung 7 eine graphische Darstellung des organbezogenen Tumorbefalls, unabhängig von der Größe der einzelnen Tumorknoten.

4. Ergebnisse

Tabelle 1: Auswertung der Obduktion. Zusammenfassende Darstellung aller Tumorläsionen.

Anzahl	Lokalisation	Abmessung [mm]	Volumen range [mm ³]
8	Einstichstelle	1*1*0,5 - 3*3*2	0,3 - 9
2	Peritoneum (Innenseite) Höhe Proc. Xiphoideus	1,5 d - 2*1*0,5	1 - 1,8
7	Zwerchfell Lig. falciforme (6) mit Leber verwachsen(1)	2*0,5*0,5 - 3*1*0,5 1,5 d	0,1 - 0,8 1,8
13	Leber Lobus caudatus (11) Hilusregion (1) Gallenblase (1)	2*1*0,5 - 3*2*1 2*2*1,5 1,5d	0,5 - 3 3 1,8
1	Magen Mageneingang, Cardiaregion	1d	0,5
1	Duodenum	2*2*1,5	3
20	Jejunum am Jejunum und d. Mesenterium	1d - 5*2*2	0,5 - 10
6	Colon	1d - 6*2*1	0,5 - 6
19	Pankreas mit Magen u. Milz verbacken (13) Duodenalschenkel d. Pankreas(4) als Chip aufgelagert (2)	3*2*1 - 8*2*2 2*1*1 - 2*3*1 2*1*0,5 - 3*1,5*1	3 - 16 1 - 3 1 - 2,3
2	Uterus	1,5d - 3*2*1	1,8 - 3
2	Blase	1,5d - 4*2*1	1,8 - 4
81	Gesamt	1*1*0,5 - 8*2*2	0,3 - 16

4. Ergebnisse

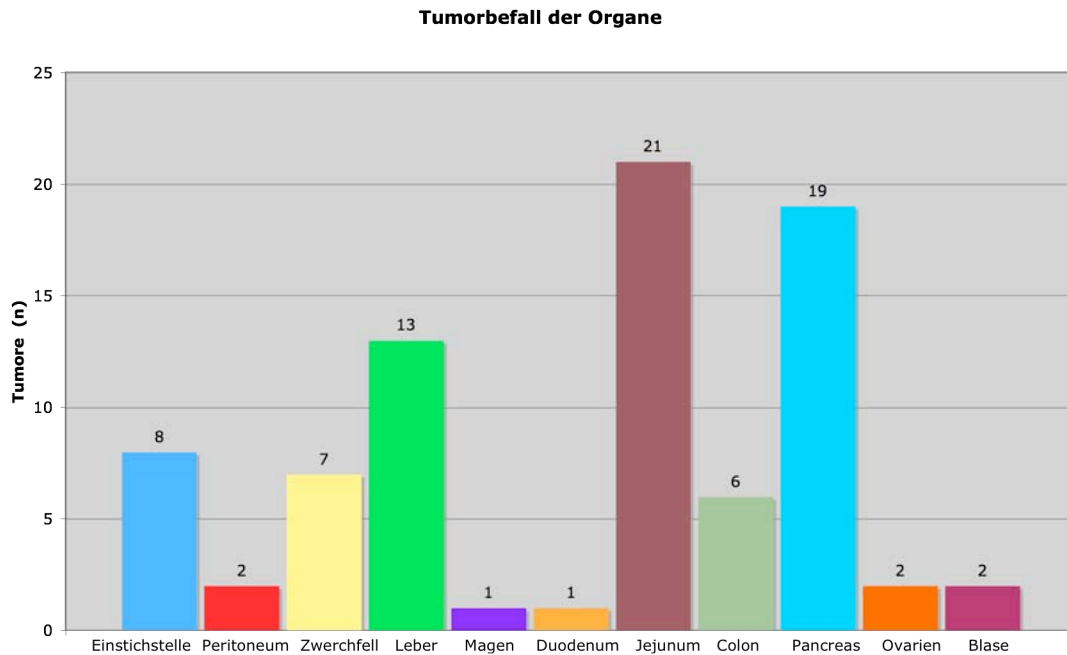


Abb.: 7

Graphische Darstellung des Tumorbefalls der einzelnen Organe unabhängig von der Größe der Tumorknoten.

Bei acht Tieren bildeten sich im Bereich der Einstichstelle Tumorabsiedelungen aus. Die Ausdehnung der meist flächig wachsenden Tumorzellansammlungen reichte von $0,5\text{mm} \times 0,5\text{mm} \times 0,2\text{mm}$ bis zu $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 2\text{mm}$. Es waren sowohl an der Innen- als auch Außenseite des Peritoneums, sowie im subkutanen Fettgewebe Tumorabsiedelungen zu finden (Abb. 8 und Abb. 9).

4. Ergebnisse

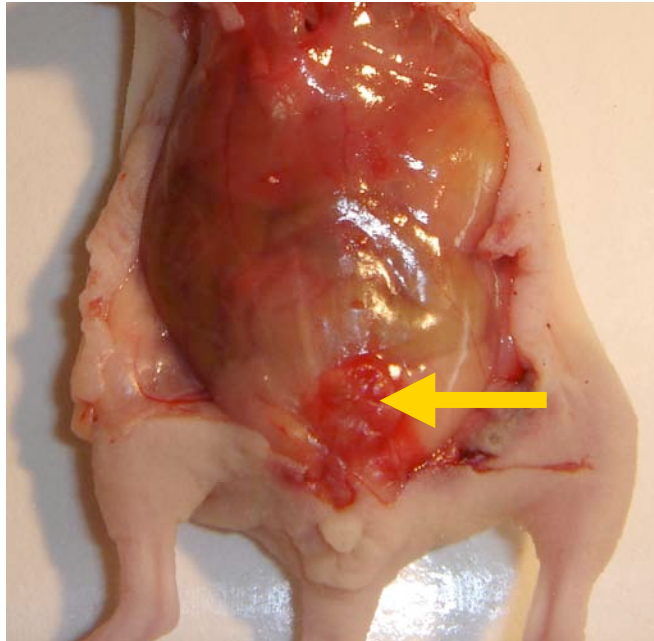


Abb.: 8

*Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:
bei ungeöffnetem Peritoneum ist ein solider Tumorzellverband an der Außenseite des
Peritoneums zu erkennen.*

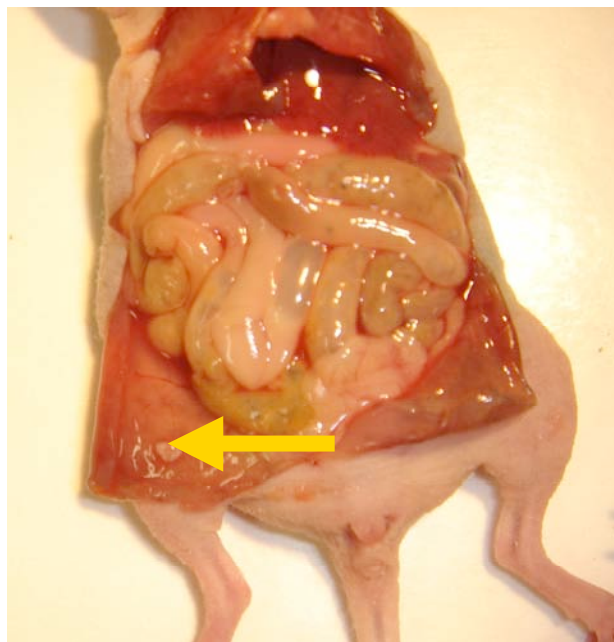


Abb.: 9

*Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:
Tumorbefall der Innenseite des Peritoneums. Das Peritoneum ist eröffnet und zur
Seite geschlagen.*

4. Ergebnisse

Der Tumorbefall im Bereich der Einstichstelle lässt sich dadurch erklären, dass an der Nadel haftende Tumorzellen während des Einstechens, wie auch beim Rückzug der Nadel sich am Peritoneum und im subcutanen Fettgewebe absiedelten und solide Tumorzellverbände bildeten.

Bei zwei Mäusen wurde die Innenseite des Peritoneums auf der Höhe des Processus xiphoideus von Tumor befallen. Zwei Tumorkläsionen mit einer Größe von 1,5 mm im Durchmesser bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm konnten durch die Obduktion nachgewiesen werden.

Der Bereich des Zwerchfells wurde insgesamt siebenmal befallen. Die in der Obduktion sichtbaren Filiae siedelten sich bei sechs Mäusen im Recessus subphrenicus zwischen Diaphragma und Leber am Lig. falciforme ab. Die Tumoren bewegten sich in der Größenordnung von 1,5mm × 0,5mm × 0,5mm (Abb. 10).

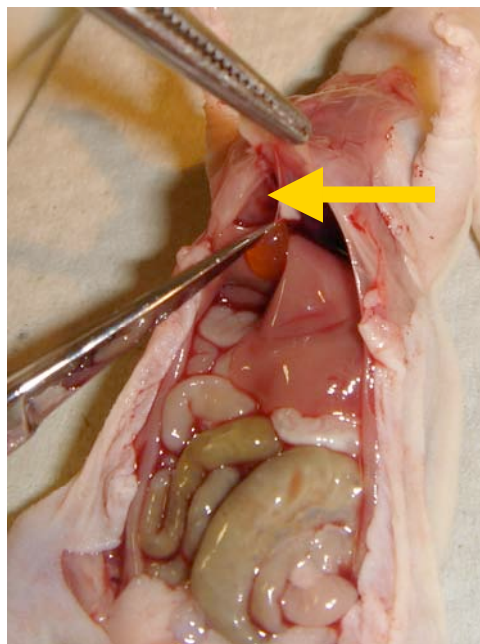


Abb.: 10

Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:

Der Pfeil markiert den Tumorbefall am Lig. falciforme zwischen Diaphragma und Leber. Das Diaphragma ist mit einer Pinzette angehoben.

4. Ergebnisse

Als typische Lokalisation der Leber war der Lobus caudatus befallen. Bei elf Tieren zeigte die Obduktion solide Tumorzellverbände in dieser Lokalisation. Die Läsionen waren in ihrer Ausdehnung meist kugelförmig mit einem Durchmesser von 1-2 mm. Abbildung 11 zeigt in einer schematischen Darstellung die anatomische Einteilung der Leber, Abbildung 12 den entsprechenden Obduktionsbefund. Auch im Bereich des Leberhilus und an der Gallenblase konnte durch die Obduktion solide Tumoren nachgewiesen werden.

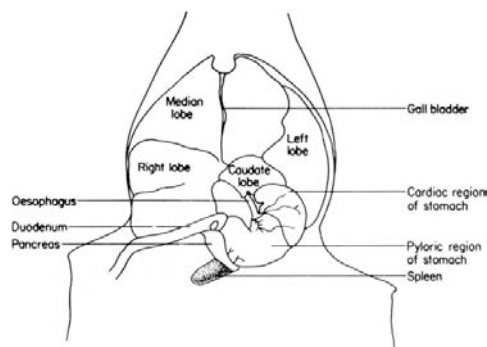


Abb.: 11

Darstellung der anatomischen Einteilung der Leberlappen bei der Maus.

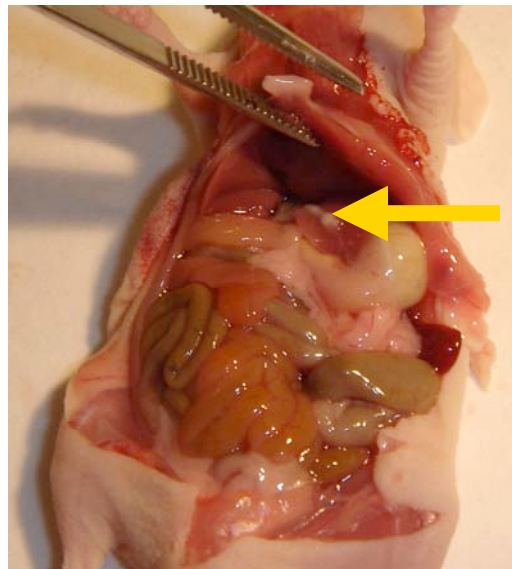


Abb.: 12

Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:

Unter dem mit einer Pinzette angehobenen linken Leberlappen markiert der Pfeil den Tumorbefall des Lobus caudatus.

4. Ergebnisse

Der Bereich des Magen und des Duodenums wurde jeweils einmal von Tumor befallen, einmal mit einem Durchmesser von 1mm, die andere Tumorabsiedelung hatte eine Größe von 2mm × 2mm × 1,5mm.

Innerhalb der Studie konnten bei 11 Mäusen Tumorknoten im Bereich des Jejunum und dessen Mesenterium festgestellt werden. Insgesamt konnten bei den Obduktionen 21 Tumorknoten am Jejunum/Mesenterium dargestellt werden. Die betroffenen Mäuse hatten zwischen einer und maximal vier Tumorabsiedelungen. 15 Läsionen stellten sich als kugelförmige Tumorknoten mit einem Durchmesser zwischen 1 und 1,5 mm dar (Abb. 13, 14), sechs Tumorzellverbände hatten eine längliche Form bis zu einer maximalen Größe von 5mm × 2mm × 2mm.

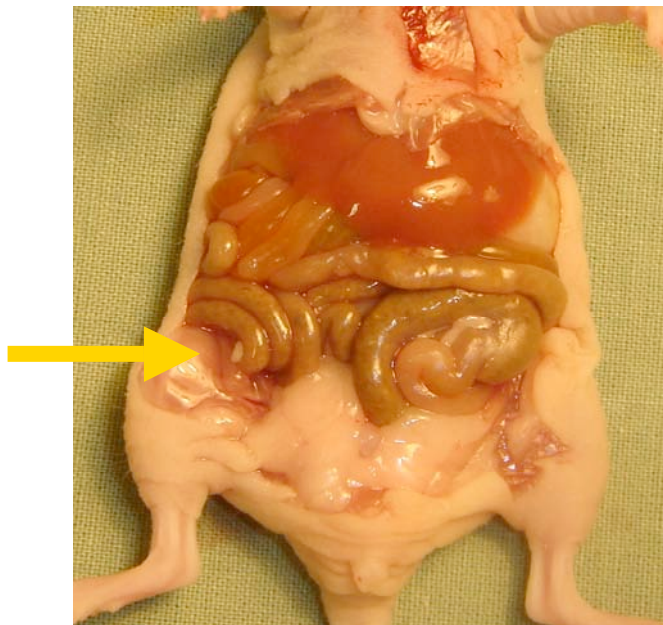


Abb.: 13

Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:

Der Pfeil markiert den Tumorbefall des Jejunums. Die Darmschlingen sind in ihrer ursprünglichen Lage belassen.

4. Ergebnisse

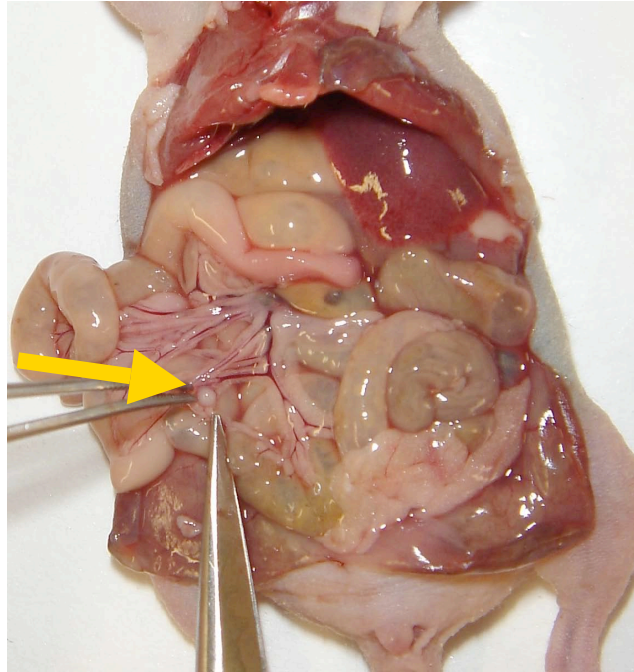


Abb.: 14

*Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:
der Pfeil markiert den Befall des Mesenterium jejunum.*

Bei sechs Mäusen infiltrierten Tumorzellverbände das Kolon und dessen Mesenterium. In drei Fällen stellten sich die Tumoren in einer kugeligen Form mit einem Durchmesser von 1-2 mm dar, die anderen drei hatten eine längliche Form mit einer Größe zwischen $2\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ bis zu $6\text{mm} \times 2\text{mm} \times 1\text{mm}$.

Als häufigste Lokalisation von soliden Tumorzellabsiedelungen in diesem Tumormodell der Peritonealkarzinose stellte sich die Pankreasregion dar. Abbildung 15 zeigt den anatomischen Aufbau der Pankreasregion. In den Obduktionen zeigten sich die Absiedelungen im Bereich um das Pankreas als aufgelagerte solide Tumorzellverbände. In mehreren Fällen infiltrierten die Primärtumoren mit Ausläufern die Milz sowie die Pylorusregion des Magens. Tumorbefall in dieser Lokalisation konnte bei 13 Mäusen durch die Obduktion nachgewiesen werden. Die

4. Ergebnisse

soliden Tumoren hatten eine Größe von minimal 3mm × 2mm × 1mm bis maximal 8mm × 2mm × 2mm (Abb. 16, 17).

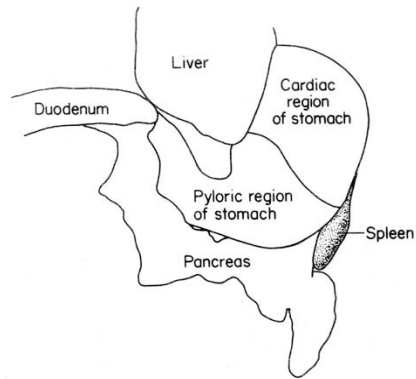


Abb.: 15

Darstellung der Anatomie der Pankreasregion

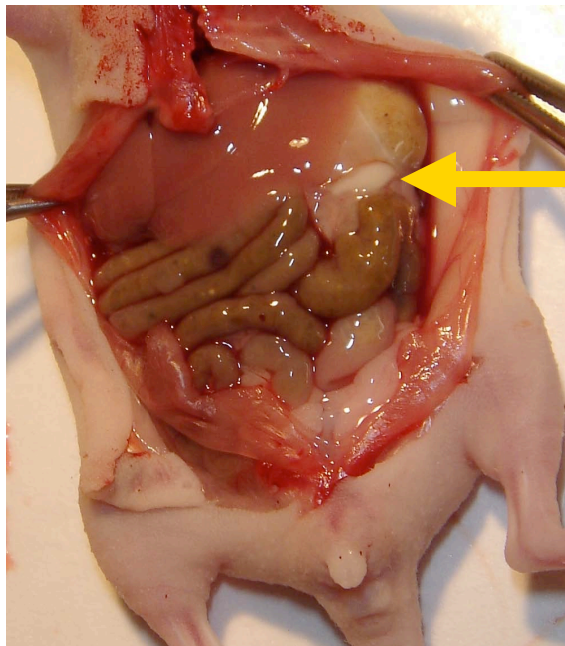


Abb.: 16

*Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:
Der Pfeil markiert den in der Pankreasregion liegenden Tumor.*

4. Ergebnisse

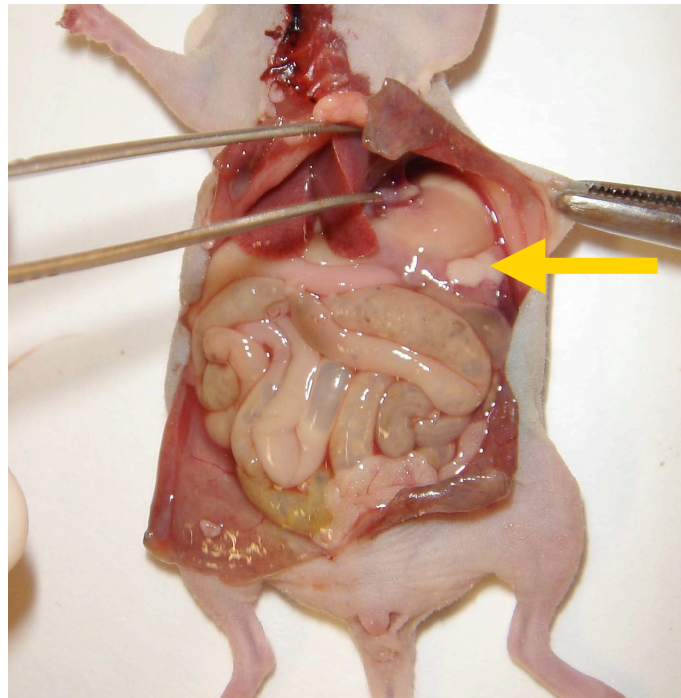


Abb.: 17

Abbildung eines Obduktionssitus einer Maus:

Durch das Anheben des linken Leberlappens mit einer Pinzette wird die vollständige Ausdehnung des Pankreasbefalls sichtbar.

Bei vier Mäusen der Studie bildeten sich Tumorabsiedelungen am Duodenalschenkel des Pankreas. Die Größe dieser Tumore variierte zwischen $2\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ und $2\text{mm} \times 3\text{mm} \times 1\text{mm}$.

In zwei Fällen konnte eine Tumorzellauflagerung im medialen Teil des Pankreas durch die Obduktion dargestellt werden. Die Messung der einzelnen Tumorzellverbände ergab eine Größe von $3\text{mm} \times 1,5\text{mm} \times 1\text{mm}$ bzw. von $2\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,5\text{mm}$. Zusammenfassend waren insgesamt 15 Mäuse durch einen Tumorbefall in Bereich des Pankreas betroffen. Durch die Obduktion konnten 19 Läsionen bei 15 Mäusen dargestellt werden.

Bei zwei Mäusen war der Uterus von soliden Tumorzellverbänden befallen. Die Tumoren einer Maus hatten eine kugelförmige Form einen

4. Ergebnisse

Durchmesser von 1mm, im anderen Fall zeigte die Obduktion einen stärker ausgedehnten Befall von 3mm × 2mm × 1mm.

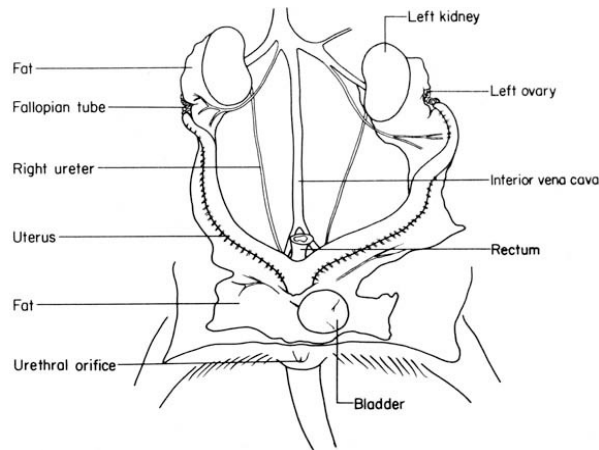


Abb.: 18

Darstellung der Anatomie des Urogenitaltraktes einer weiblichen Maus

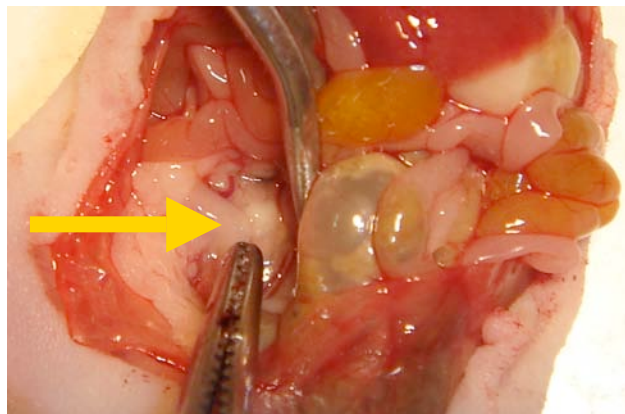


Abb.: 19

*Darstellung eines Obduktionssitus einer Maus:
Der Pfeil markiert den Tumorbefall des Uterus*

Bei zwei Mäusen war die Blasenregion betroffen. Die Tumoren besaßen eine Ausdehnung von 1,5 mm im Durchmesser bzw. 4mm × 2mm × 1mm.

Insgesamt konnten durch die Obduktion bei 15 Mäusen 82 solide Tumorzellverbände dargestellt werden. Die erhaltenen Ergebnisse dienen

4. Ergebnisse

als Grundlage der Auswertung und wurden als Standard of Reference bei der Beurteilung der Bildgebenden Verfahren verwendet.

4.2 Auswertung des Biolumineszenz Imaging

4.2.1 Bildbeurteilung

Die Biolumineszenz-Bildgebung wurde je nach Gruppe entweder an Tag 3 oder an Tag 6 durchgeführt. Aufgrund von Voruntersuchungen wurde für diese Studie ein Protokoll mit einer Belichtungszeit von 10 sec und einer Bildverstärkung (gain) von 800 gewählt.

Mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging konnten bei allen Mäusen in Rahmen der Peritonealkarzinose entstandene solide Tumorknoten diagnostiziert werden.

Tabelle 2 gibt einen Gesamtüberblick über alle durch Biolumineszenz-Imaging primär diagnostizierten Tumorknoten und stellt die erhaltenen Ergebnisse der Detektion lokalisationsbezogen dar.

4. Ergebnisse

Tabelle 2

Organbezogene Gesamtdarstellung aller durch Biolumineszenz-Imaging detektierten Tumorerläsionen.

Anzahl	Lokalisation	Größe [mm]	Volumen range [mm³]	Biolumineszenz Imaging positiv
8	Einstichstelle	1*1*0,5 - 3*3*2	0,3 - 9	8/8 (100%)
2	Peritoneum (Innenseite) Höhe Proc. Xiphoideus	1,5 d - 2*1*0,5	1 - 1,8	2/2 (100%)
7	Zwerchfell Lig. Falciforme (6) mit Leber verwachsen (1)	2*0,5*0,5 - 3*1*0,5 1,5 d	0,1 - 0,8 1,8	0/6 (0%) 0/1 (0%)
13	Leber Lobus caudatus (11) Hilusregion (1) Gallenblase (1)	2*1*0,5 - 3*2*1 2*2*1,5 1,5d	0,5 - 3 3 1,8	1/11 (9%) 0/1 (0%) 0/1 (0%)
1	Magen Mageneingang, Cardiaregion	1d	0,5	0/1 (0%)
1	Duodenum	2*2*1,5	3	0/1 (0%)
21	Jejunum am Jejunum und d. Mesenterium	1d - 5*2*2	0,5 - 10	10/21 (48%)
6	Colon	1d - 6*2*1	0,5 - 6	2/6 (33%)
19	Pankreas mit Magen u. Milz verbacken (13) Duodenalschenkel d. Pankreas(4) als Chip aufgelagert (2)	3*2*1 - 8*2*2 2*1*1 - 2*3*1 2*1*0,5 - 3*1,5*1	3 - 16 1 - 3 1 - 2,3	10/13 (77%) 3/4 (75%) 2/2 (100%)
2	Uterus	1,5d - 3*2*1	1,8 - 3	2/2 (100%)
2	Blase	1,5d - 4*2*1	1,8 - 4	0/2 (0%)
82	Gesamt	1*1*0,5 - 8*2*2	0,3 - 16	40/82 (49%)

4. Ergebnisse

Alle 8 Tumoren, die sich an der Außen- und Innenseite des Peritoneums, sowie im subcutanen Fettgewebe im Bereich der Einstichstelle der Tumorzellinjektion entwickelten, konnten im Biolumineszenz-Imaging detektiert werden. Aufgrund der Größenunterschiede der Tumoren in dieser Lokalisation unterschieden sich die gemessenen Lichtintensitäten in Biolumineszenz-Imaging erheblich. Der kleinste Tumor, mit einer Ausdehnung von 0,5mm × 0,5mm × 0,2 mm, imponierte in der Obduktion als flächige Tumorzellinfiltration, während der größte Tumor mit der Ausdehnung von 3mm × 3mm × 2mm einen soliden Tumorknoten darstellte. Die sehr oberflächigen Lage der Tumore in dieser Lokalisation und die dadurch bedingte minimale Abschwächung des produzierten Lichtes ermöglichte die Darstellung und Detektion selbst sehr kleiner, flächiger Tumorzellverbände.

Abbildung 20 zeigt das typische Biolumineszenz Signal eines an der Einstichstelle lokalisierten Tumors.

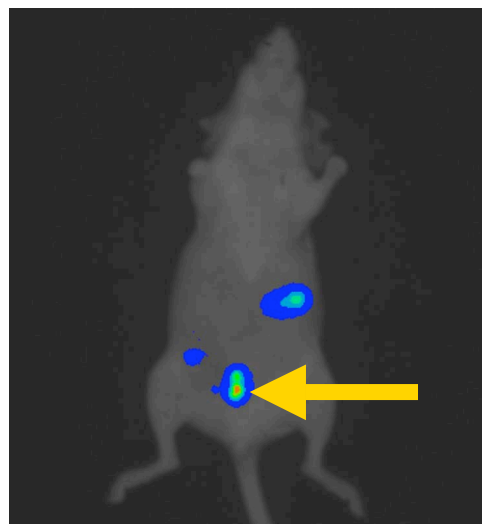


Abb.: 20

Biolumineszenz-Aufnahme einer Maus:

Der Pfeil markiert das Biolumineszenz-Signal eines Tumors an der Außenseite des Peritoneums und im subcutanen Fettgewebe.

4. Ergebnisse

Bei zwei Mäusen, bei denen ein Tumor die Innenseite des Peritoneums auf Höhe des Processus xiphoideus infiltrierte, konnte mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging die Tumorzellansammlung detektiert werden. Trotz der eher geringen Größe von 1,5 mm im Durchmesser bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm konnten die Tumoren gut dargestellt werden.

Insgesamt konnten sämtliche an der Innen- oder Außenseite des Peritoneums wachsende Tumore zu 100% detektiert werden.

Im Bereich des Zwerchfells konnte keiner der 7 Tumore mit dem Biolumineszenz-Imaging detektiert werden. Die sich dort entwickelten Tumore besaßen eine Größe von 2mm × 0,5mm × 0,5mm bis zu 3mm × 1mm × 0,5mm. Die geringe Größe dieser Tumore, sowie vor allem die Abschirmung des Biolumineszenz Signals durch die ventral des Tumors liegenden Strukturen sind die Ursachen für die Nicht-Detektierbarkeit.

Im Bereich der Leber wurden 13 Tumore gefunden. Die Größe dieser Tumore reichte von kleinen, punktförmigen Metastasen (2mm × 1mm × 0,5mm) bis hin zu größeren (3mm × 2mm × 1mm), soliden Tumorknoten. Von diesen 13 Tumoren konnte im Biolumineszenz-Imaging nur ein Tumor detektiert werden.

Sämtliche Tumore wurden durch den linken und den medialen Leberlappen verdeckt, was größtenteils zur völligen Auslöschung des Biolumineszenz-Signals führte. Der detektierbare Knoten besaß eine Ausdehnung von 3mm × 1,5mm × 1mm.

Im Bereich des Magens und des Duodenums konnte weder der Tumor im Bereich der Kardia des Magens (1mm Durchmesser) noch der Tumor am Duodenum (2mm × 2mm × 1,5mm) detektiert werden.

Im Bereich des Jejunums ergab die Obduktion 21 solide Tumorzellabsiedelungen. Die Größe der Tumorzellverbände reichte von einem 1mm Durchmesser bis zu einer Ausdehnung von 5mm × 2mm ×

4. Ergebnisse

2mm. Von den 21 Tumoren konnten 10 mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging dargestellt werden. Die Detektierbarkeit im Bereich des Jejunums erwies sich als sehr stark lageabhängig und bedingt größenabhängig. So konnten Tumore mit einem Durchmesser von 1 mm dargestellt werden, wenn sie sehr oberflächlich lagen. Lagen sie jedoch tiefer in der Bauchhöhle oder wurden von Darmschlingen verdeckt, konnten selbst Knoten mit einer Größe von 4mm × 2,5mm × 1mm nicht detektiert werden. Abbildung 21 zeigt die unbearbeiteten und bearbeiteten Aufnahmen eines 5mm × 2mm × 2mm großen Knotens.

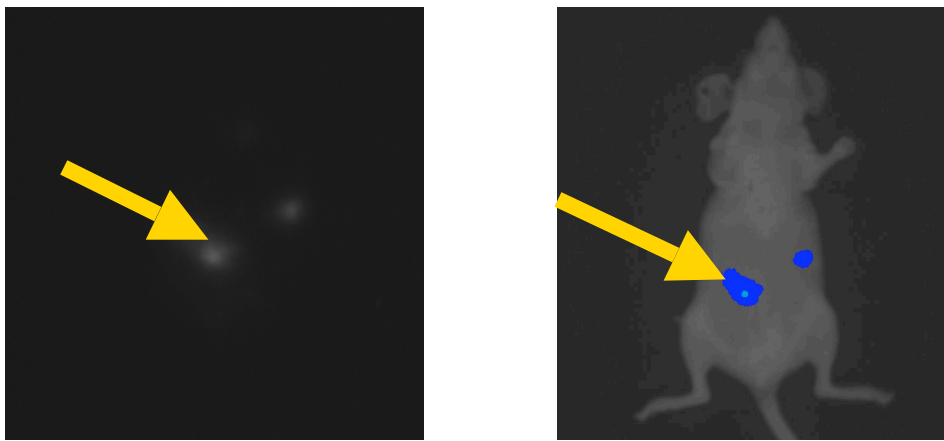


Abb.: 21

Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus in unbearbeitetem (links) und bearbeiteten Zustand (rechts). Der Pfeil markiert das Biolumineszenz-Signal eines Tumors im Bereich des Jejunums.

Im Bereich des Kolons wurden zwei von sechs vorhandenen Tumorknoten detektiert. Die Detektierbarkeit erwies sich ebenso wie im Bereich des Jejunums als stark lageabhängig und bedingt größenabhängig. Die beiden detektierten Tumoren hatten eine Größe von 2mm × 1mm × 1mm bzw. 6mm × 2mm × 1mm.

Im Bereich des Pankreas konnten 15 der 19 vorhandenen Tumore detektiert werden. Die sich in der für diese Studie typischen Lokalisation

4. Ergebnisse

zwischen Pankreas, Magen und Milz entwickelten Tumore konnten in 10 von 13 Fällen detektiert werden. Sie besaßen eine Größe von 3mm × 2mm × 1mm bis hin zu 8mm × 2mm × 2mm. Abbildung 22 zeigt die typische Darstellung eines Pankreastumors im Biolumineszenz-Imaging. Der Tumor liegt kaudal der Leber. Somit wird das Biolumineszenz-Signal nur durch das ventral gelegene Peritoneum und die Haut abgeschwächt.

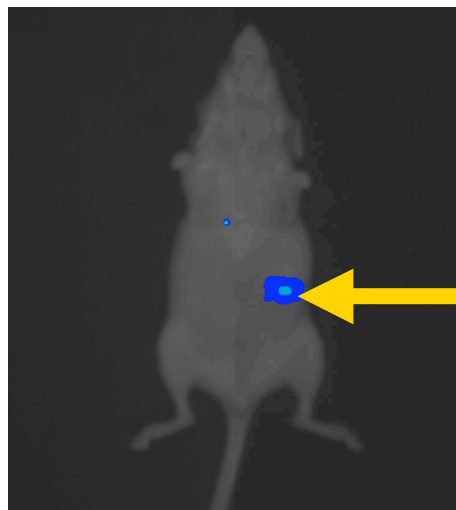


Abb.: 22

*Biolumineszenz-Aufnahme einer Maus:
der Pfeil markiert das Biolumineszenz-Signal eines Pankreastumors.*

In einem Fall der Nicht-Detektierbarkeit wurde der Tumor in seiner gesamten Ausdehnung vom vergrößerten linken Leberlappen verdeckt, so dass das Biolumineszenz-Signal vollständig ausgelöscht wurde (Abbildung 23).

4. Ergebnisse

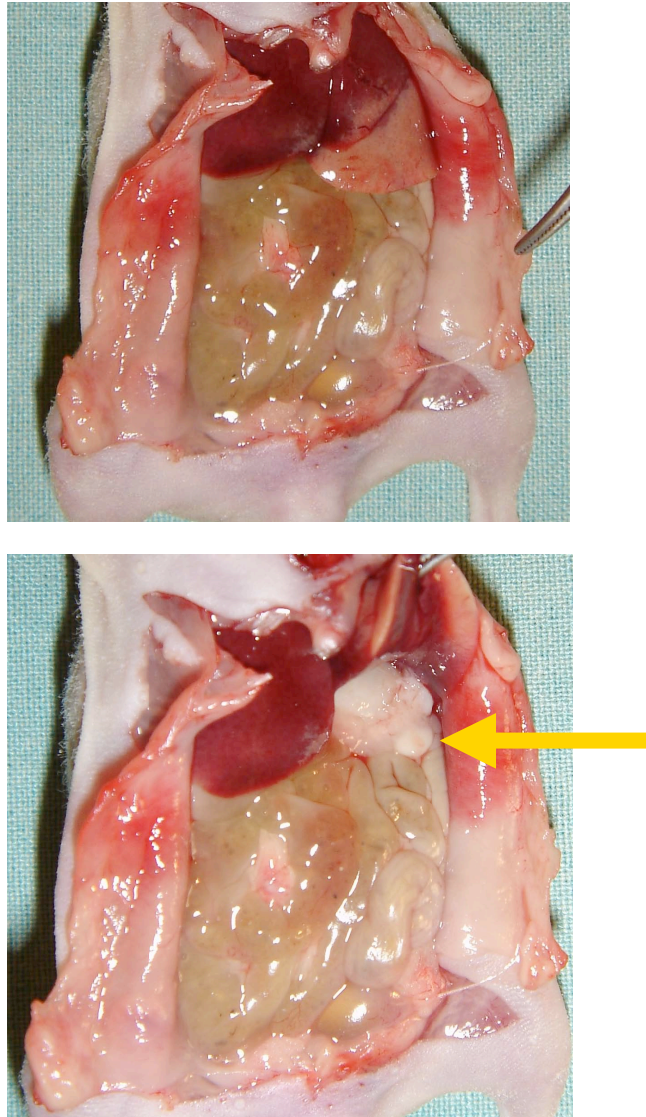


Abb.: 23

Darstellung eines Obduktionssitus einer Maus:

Die obere Abbildung zeigt Abdominalregion einer Maus bei geöffnetem Peritoneum. Auf der unteren Abbildung wird der linke Leberlappen mit einer Pinzette angehoben und der mit einem Pfeil markierte Pankreastumor wird sichtbar.

In den beiden anderen Fällen, in denen der Tumor in diesem Bereich nicht detektiert werden konnte, bildeten sich am Pankreas jeweils zwei kleine, in nächster Nähe liegende, aber noch klar voneinander abgrenzbare Tumore, die sich jedoch im Biolumineszenz-Imaging als ein einziges Signal darstellten (Abb. 24).

4. Ergebnisse

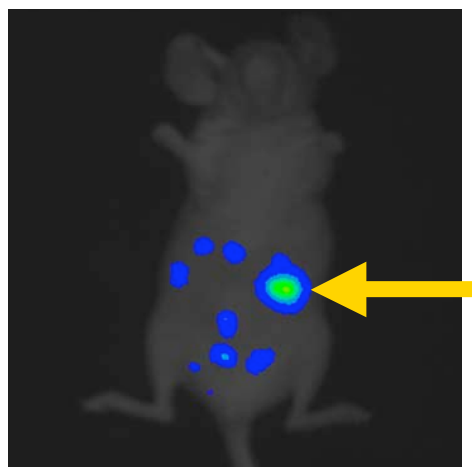
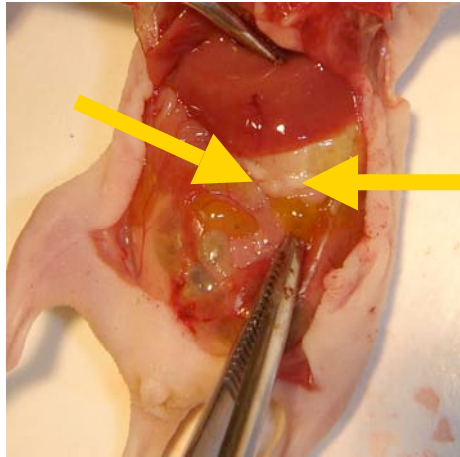


Abb.: 24

Darstellung eines Obduktionssitus einer Maus und die entsprechende Biolumineszenz-Aufnahme: die Pfeile markieren die Tumoren im Bereich des Pankreas und das dazugehörige Biolumineszenz-Signal.

Von vier Tumoren, die am Duodenalschenkel des Pankreas gefunden wurden, konnten drei detektiert werden. Beide dem medialen Teil des Pankreas aufgelagerte Tumorzellverbände konnten dargestellt werden. Beide Tumore, die im Bereich des Uterus gefunden wurden (1,5mm im Durchmesser bzw. 3mm × 2mm × 1mm), konnten im Biolumineszenz-Imaging detektiert werden.

4. Ergebnisse

Von zwei Tumoren, die im Bereich der Blase gefunden wurden (1,5 mm im Durchmesser bzw. 4mm × 2mm × 1mm), konnte keiner dargestellt werden.

Insgesamt konnten mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging 40 von 82 Tumoren dargestellt werden, wobei die Detektion sehr stark lageabhängig war. Tumore, die am Peritoneum oder sehr oberflächlich lagen, wurden zu 100% detektiert. Lagen die Tumore jedoch tiefer in der Bauchhöhle oder wurden von Organen wie die Leber oder von Darmschlingen verdeckt, ließen sie sich nur schwer oder gar nicht darstellen.

4.2.2 Quantifizierung der Ergebnisse

Neben der qualitativen klinischen Beurteilung der gewonnenen Bilder des Biolumineszenz Imaging und der damit verbundenen Beurteilung der Sensitivität der Detektion von Tumorerläsionen der Peritonealkarzinose, wurde mit verschiedenen Ansätzen versucht, die Ergebnisse in der Tumordetektion quantitativ zu erfassen.

4.2.3 Lokalisationsbezogene Regions of Interest

Grundlage dieses Auswertungsansatzes war die Prüfung einer möglichen Korrelation zwischen den durch die Tumorzellen produzierten Lichtintensitäten und dem bei der Obduktion tatsächlich gefundenen Tumolvolumen. Aufgrund des häufigen Auftretens von solider Tumorbildung im Bereich des Pankreas und des Jejunums und dessen Mesenteriums wurden diese Lokalisationen für diesen Ansatz ausgewählt.

Abbildung 25 stellt die gewonnenen Ergebnisse der Korrelation zwischen den gemessenen Signalintensitäten und dem tatsächlichen Tumolvolumen

4. Ergebnisse

für Tumore im Bereich des Pankreas dar, Abbildung 26 zeigt die Korrelation für die Läsionen im Bereich des Jejunums.

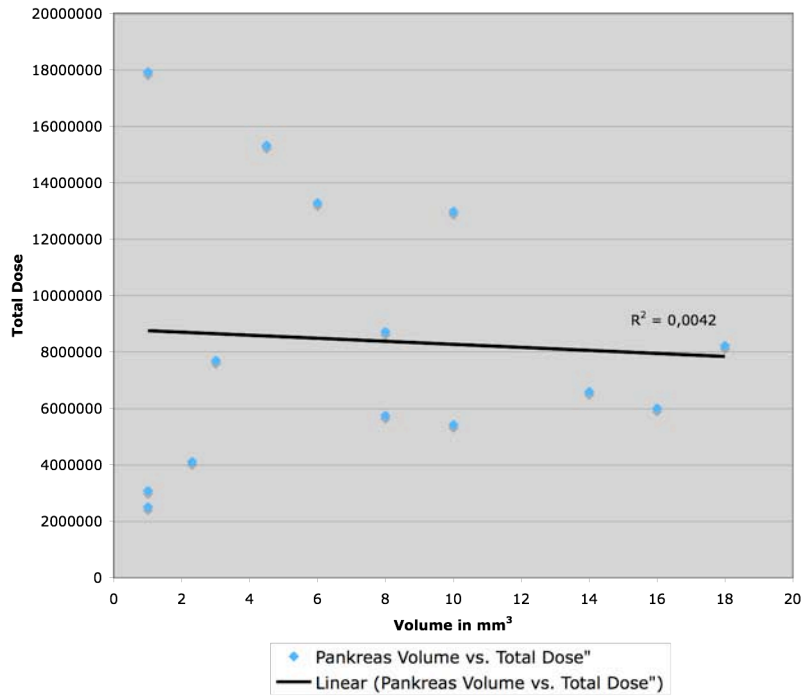


Abb.: 25

Graphische Darstellung der Korrelationen von Tumorgöße und gemessenen Lichtintensitäten im Pankreasbereich.

4. Ergebnisse

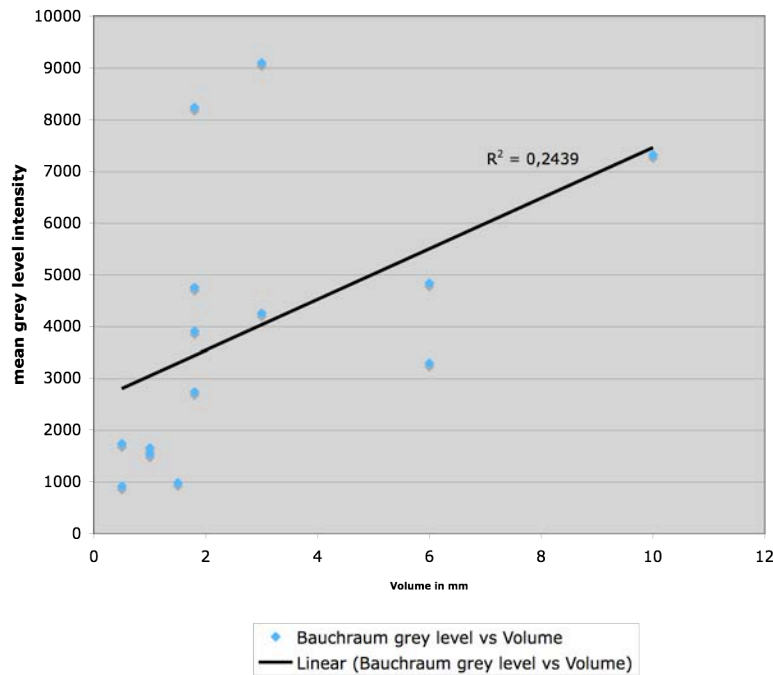


Abb.: 26

Graphische Darstellung der Korrelation von TumorgroÙe und gemessenen Lichtintensitäten im Bereich des Jejunums.

Die Darstellung setzt die auf der Abszisse aufgetragenen Tumolvolumina mit der auf der Ordinate aufgetragenen gemessenen mittleren Lichtintensität (mean grey level intensity) der jeweiligen Läsionen in Korrelation.

Für die Tumorknoten im Bereich des Pankreas ergibt sich kein linearer Zusammenhang, R^2 beträgt 0,0042.

Auch für die im Bereich des Jejunums gefundenen Tumorknoten ergibt sich keine Korrelation der gemessenen Lichtintensitäten mit dem tatsächlichen Tumolvolumen, R^2 beträgt in diesem Fall 0,2439.

4.3 Auswertung der Magnetresonanztomographie

Die MRT-Aufnahmen der Mäuse wurden am vierten und siebten Tag, nach Tumorinjektion durchgeführt. Die Magnetresonanztomographie von 14 Mäusen konnte für die Auswertung verwendet werden. Die slices einer Maus konnten aufgrund von Artefakten in den Aufnahmen nicht ausreichend beurteilt werden und somit nicht in die Bewertung eingehen. Wie in Punkt 3.4.7.5 beschrieben erfolgte die Auswertung der Magnetresonanztomographie durch klinische Beurteilung der Aufnahmen durch drei voneinander unabhängige Betrachter jeweils ohne Kenntnis der Ergebnisse aus Obduktion und Biolumineszenz-Imaging. Insgesamt konnten 18 tumorsuspekte Läsionen bei der Beurteilung der MRT-Bildgebung diagnostiziert werden. In 17 Fällen bestätigte die Obduktion den Verdacht auf Tumordinfiltration dieser verdächtigen Läsionen. Ein als solider Tumorbefall gedeutete Struktur stellte sich als falsch positiv heraus und konnte in der Obduktion nicht als Tumorbefall bestätigt werden.

Tabelle 3 gibt einen Gesamtüberblick über alle durch MRT primär diagnostizierten Tumorknoten und stellt die erhaltenen Ergebnisse der Detektion lokalisationsbezogen dar.

Tabelle 3

Organbezogene Gesamtdarstellung aller durch MRT detektierten Tumorknoten.

4. Ergebnisse

Anzahl	Lokalisation	Größe [mm]	Volumen range [mm ³]	Magnetresonanz Imaging positiv
8	Einstichstelle	1*1*0,5 - 3*3*2	0,3 - 9	3/8 (38%)
2	Peritoneum (Innenseite) Höhe Proc. Xiphoideus	1,5 d - 2*1*0,5	1 - 1,8	0/2 (0%)
7	Zwerchfell Lig. Falciforme (5) mit Leber verwachsen (1)	2*0,5*0,5 - 3*1*0,5 1,5 d	0,1 - 0,8 1,8	0/5 (0%) 0/1 (0%)
13	Leber Lobus caudatus (10) Hilusregion (1) Gallenblase (1)	2*1*0,5 - 3*2*1 2*2*1,5 1,5d	0,5 - 3 3 1,8	0/10 (0%) 0/1 (0%) 0/1 (0%)
1	Magen Mageneingang, Cardiaregion	1d	0,5	0/1 (0%)
1	Duodenum	2*2*1,5	3	0/1 (0%)
21	Jejunum am Jejunum und d. Mesenterium	1d - 5*2*2	0,5 - 10	5/20 (25%)
6	Colon	1d - 6*2*1	0,5 - 6	2/5 (4%)
19	Pankreas mit Magen u. Milz verbacken (12) Duodenalschenkel d. Pankreas (4) als Chip aufgelagert (2)	3*2*1 - 8*2*2 2*1*1 - 2*3*1 2*1*0,5 - 3*1,5*1	3 - 16 1 - 3 1 - 2,3	4/12 (33%) 1/4 (25%) 0/2 (0%)
2	Uterus	1,5d - 3*2*1	1,8 - 3	1/2 (5%)
2	Blase	1,5d - 4*2*1	1,8 - 4	1/2 (5%)
82	Gesamt	1*1*0,5 - 8*2*2	0,3 - 16	17/76 (22%)

Insgesamt konnten drei der acht Tumore, die sich im Bereich der Einstichstelle im subcutanen Fettgewebe bzw. an der Innenseite des Peritoneums entwickelten, primär als solche identifiziert werden. Die

4. Ergebnisse

Größe der detektierten Tumore betrug 3mm x 3mm x 0,5mm, 3mm x 3mm x 2mm bis minimal 2mm x 2mm x 0,5mm. Die Abbildung 27 zeigt den typischen Befund einer solchen Läsion in der Magnetresonanztomographie.



Abb.: 27

MRT-Abbildung einer Maus:

Der Pfeil markiert eine Tumorkäsion im Bereich der Einstichstelle.

In den 5 weiteren Fällen in denen der Bereich um die Einstichstelle von Tumor befallen wurde, konnte durch die Beurteilung der MRT-Aufnahmen kein eindeutiger Tumorbefall nachgewiesen werden. Bei der Obduktion zeigte sich, dass die nicht detektierten Läsionen bei einer Maus einen Größendurchmesser von 1mm, in den weiteren Fällen eine Ausdehnung von 1mm x 1mm x 0,5mm und 2mm x 1mm x 0,5mm zeigten.

Bei zwei Mäusen konnte durch die Obduktion ein Tumorbefall des Peritoneums in Höhe des Processus xiphoideus diagnostiziert werden. Beide Filiae wurden bei einer Größe von 2mm x 0,5mm x 0,5mm

4. Ergebnisse

beziehungsweise einem Durchmesser von 1,5mm in die Gruppe der 1-2mm großen Tumoren eingeteilt. Keine der Läsionen konnte durch die MRT-Bildgebung primär als solche identifiziert werden.

In sieben Fällen wurde das Zwerchfell im Bereich Recessus subphrenicus das Ligamentum falciforme von solidem Tumor infiltriert. Sechs betroffene Tiere bildeten Absiedlungen am Lig. falciforme mit einer Größe von 2mm x 0,5mm x 0,5mm bis 3mm x 1mm x 0,5mm und einem Volumen von 0,1–0,8 mm³ aus. Bei keinem der betroffenen Tiere konnte durch die Beurteilung der MRT-Aufnahmen eine tumorverdächtige Struktur diagnostiziert werden. Bei einer Maus war die solide Läsion im Rec. subphrenicus mit der Leberkapsel verwachsen, auch in diesem Fall war eine Detektion mittels MRT nicht möglich.

Die Leber wurde in unserer Studie insgesamt in 13 Fällen direkt von soliden Absiedelungen betroffen, vor allem der Lobus caudatus war in elf Fällen von Tumorabsiedelungen befallen. Jeweils einmal waren die Hilusregion und die Gallenblase von Tumorgewebe befallen. Die Größe der Absiedelungen betrug zwischen 2mm x 1mm x 0,5mm und 3mm x 2mm x 1mm bei einem Volumen von 0,5 – 3 mm³. In keinem der Fälle wurde bei der Beurteilung in dem MRT-Aufnahmen eine verdächtige Läsion vermutet.

Insgesamt konnten durch die Obduktion 21 den Dünndarm befallende Tumorkläsionen dargestellt werden. Durch die Beurteilung der MRT-Aufnahmen wurden primär fünf Raumforderungen als Tumorkläsionen diagnostiziert und konnten später auch durch die Obduktion als solche identifiziert werden. Die erkannten Läsionen wurden später in der Obduktion vermessen und hatten eine Größe von 2mm x 1,5mm x 2mm bis maximal 5mm x 2mm x 2mm, bei einem Volumen von 2,5-10 mm³. In den übrigen 16 Fällen hatten die Läsionen bei einem Volumen von 0,5-2 mm³ eine kleinere Ausdehnung und konnten mittels MRT nicht als

4. Ergebnisse

solche erkannt werden. Abbildung 28 zeigt exemplarisch die MRT-Aufnahme eines das Jejunum befallenden soliden Tumors.

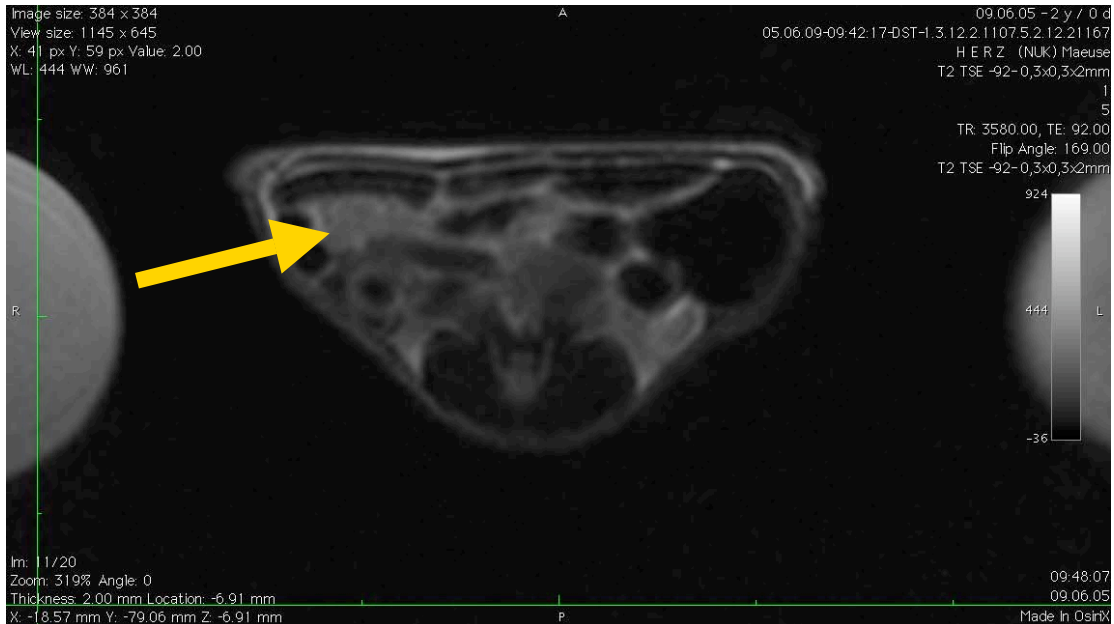


Abb.: 28

MRT-Abbildung einer Maus:

Der Pfeil markiert eine Tumorknötchen-Läsion im Bereich des Jejunums.

Im Bereich des Kolons konnten zwei der sechs das Kolon infiltrierende Tumoren primär als solche gedeutet werden. Der eine detektierte Tumorknoten hatte bei einem Durchmesser von 2mm ein Volumen von $4,2 \text{ mm}^3$, die andere Tumorknötchen-Läsion bei einer Größe von $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ ein Volumen von 9 mm^3 . Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die mit Pfeilen markierten Tumorknoten in der MRT. Die übrigen nicht-detektierbaren Tumorknötchen-Läsionen waren bei einem Durchmesser von 0,5-1 mm und einem Volumen von $0,5-1 \text{ mm}^3$ primär nicht zu erkennen.

4. Ergebnisse

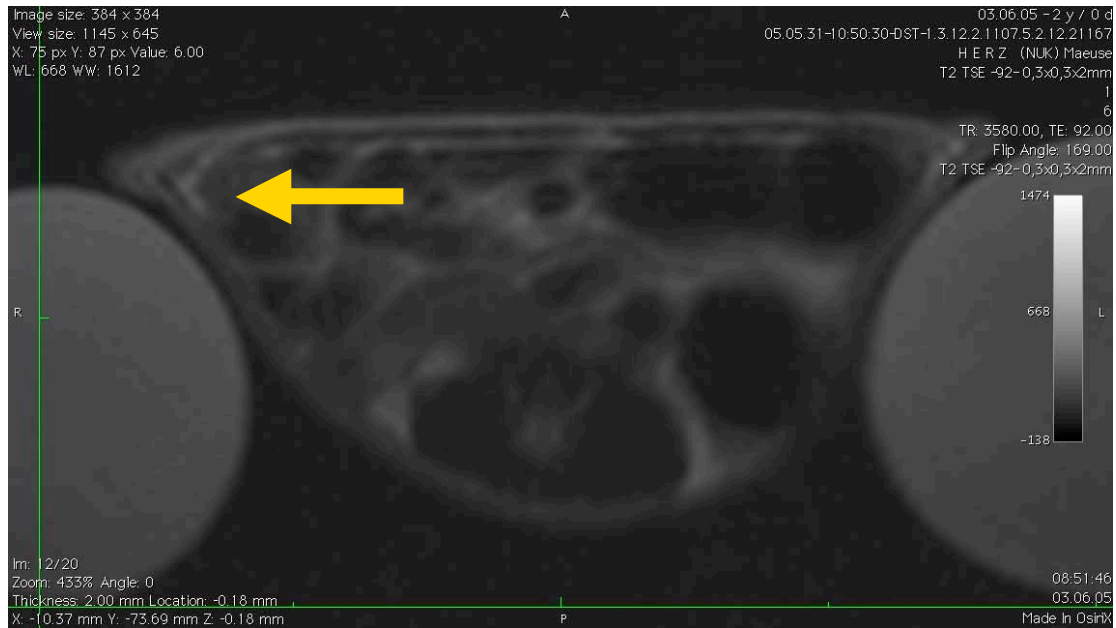


Abb.: 29 und 30

MRT-Abbildungen einer Maus:

Die Pfeile markieren jeweils Tumorkläsionen des Kolons.

Am zweit häufigsten wurde der Bereich des Pankreas von Tumorkläsiedelungen betroffen. Bei der Obduktion wurden 19 Tumorkläsiedelungen identifiziert, in 13 Fällen war der Tumor bei einer Größe von 3mm x 2mm x 1mm – maximal 8mm x 2mm x 2mm

4. Ergebnisse

(Volumen $3\text{-}16\text{mm}^3$) mit Magen und Milz verwachsen. Mittels MRT-Bildgebung konnten 5 der Tumore als solche diagnostiziert werden. Die zuvor als positiv gewerteten Filiae besaßen eine Größe von $4\text{mm} \times 2\text{mm} \times 2\text{mm}$ bis $8\text{mm} \times 2\text{mm} \times 2\text{mm}$. Abbildung 31 zeigt ein Schnittbild der MRT mit einem typischen Befund eines Befalls dieser Region.



Abb.: 31

MRT-Abbildung einer Maus:

Der Pfeil markiert den Tumorbefall in der Pankreas-Magen-Milz Region.

Der Uterus wurde in unserem Mausmodell bei zwei Mäusen von soliden Tumor befallen. In der klinischen Beurteilung der MRT-Bildgebung wurde eine der beiden Läsionen erkannt und während der Obduktion später als solche positiv bestätigt. Abbildung 32 zeigt die MRT Bildgebung der Läsion. Die Größe der Läsion betrug in der Obduktion $3\text{mm} \times 2\text{mm} \times 1\text{mm}$. Die nicht detektierte Metastase war bei einem Durchmesser von $1,5\text{mm}$ und einem Volumen von $1,8\text{mm}^3$ in der MRT nicht nachweisbar.

4. Ergebnisse

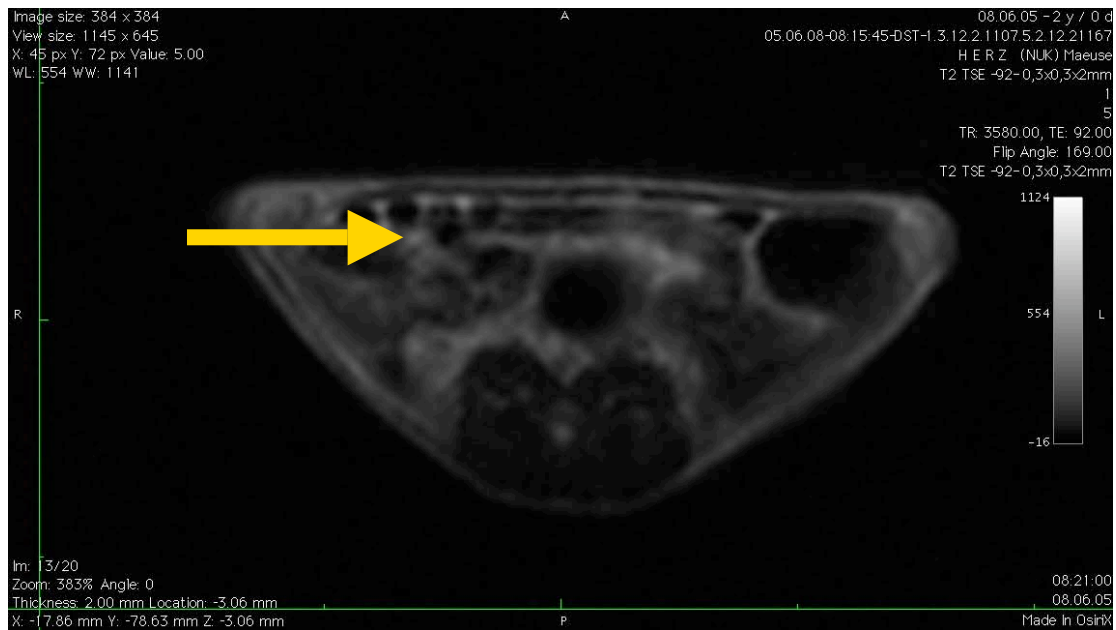


Abb.: 32

MRT-Aufnahme einer Maus:

Der Pfeil markiert den Tumorbefall im Bereich des Uterus.

Im Bereich der Harnblase konnten durch die Obduktion in zwei Fällen Tumorabsiedelungen nachgewiesen werden. Mittels MRT konnte eine Tumorerkrankung (Größe: 3mm x 3mm x 2mm, Volumen: 9mm³) diagnostiziert werden (Abbildung 33).

4. Ergebnisse



Abb.: 33

MRT-Aufnahme einer Maus:

der Pfeil markiert den Tumorbefall im Bereich der Blase.

Der andere Tumor in der Blasenregion hatte bei einem Durchmesser von 1,5mm ein Volumen von $1,8\text{mm}^3$. Es war nicht möglich diese Läsion im MRT primär nachzuweisen.

In einem Fall wurde bei der Beurteilung der MRT-Aufnahmen ein Tumorknoten im rechten Oberbauch diagnostiziert. Die Annahme einer Tumordinfiltration konnte durch die folgende Obduktion nicht bestätigt werden und ging als falsch positive Detektion in die Bewertung ein. Abbildung 34 zeigt den Befund der MRT Bildgebung für diesen Fall.

4. Ergebnisse

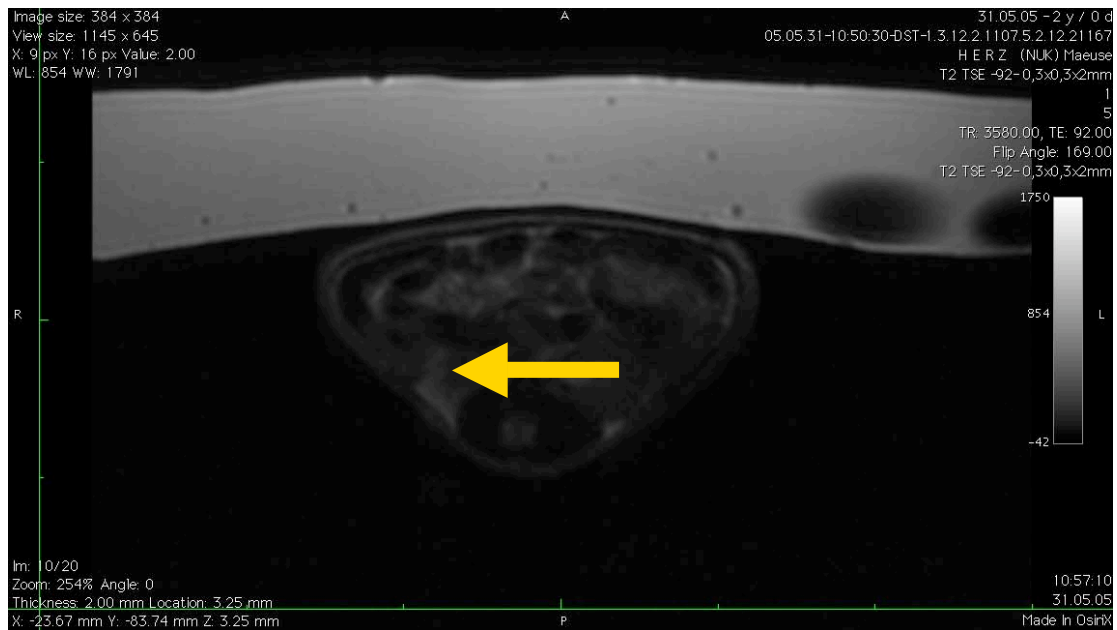


Abb.: 34

MRT-Abbildung einer Maus:

der Pfeil markiert die fälschlicherweise als Tumorbefall gedeutete Struktur ventral der Niere.

4. Ergebnisse

4.4 Organbezogener Tumorbefall

Tabelle 4 zeigt eine organbezogene Übersicht aller bei der Obduktion nachgewiesenen Tumorabsiedelungen und eine prozentuale Angabe der in der jeweiligen Bildgebung nachgewiesenen Tumoren unabhängig von ihrer Größe.

Tabelle 4

Organbezogene Übersicht des Tumorbefalls und Darstellung mittels Biolumineszenz-Imaging und MRT.

Läsionen				
n	Lokalisation	Volumen range in mm³	BLI pos	MRT pos
8	Einstichstelle	0,3-9	8/8 (100%)	3/8 (38%)
2	Peritoneum (Innenseite)	1-1,8	2/2 (100%)	0/2 (0%)
7	Zwerchfell	0,1-1,8	0/7 (0%)	0/6 (0%)
13	Leber	0,5 - 3	1/13 (8%)	0/12 (0%)
1	Magen	0,5	0/1 (0%)	0/1 (0%)
1	Duodenum	3	0/1 (0%)	0/1 (0%)
21	Jejunum	0,5-10	10/21 (48%)	5/20 (25%)
6	Colon	0,5-6	2/6 (33%)	2/5 (40%)
19	Pankreas	1-18	15/19 (79%)	5/17 (29%)
2	Ovarien	1,8-3	2/2 (100%)	1/2 (50%)
2	Blase	1,8-4	0/2 (0%)	1/2 (50%)
82	Gesamt	0,1 - 18	40/82 (49%)	17/76 (22%)

4. Ergebnisse

4.5 Vergleich der bildgebenden Verfahren Biolumineszenz-Imaging und MRT

Nach Abschluss der bildgebenden Verfahren und deren Auswertung nach dem in Punkt 3.9.5 beschriebenen Schema, erfolgte die Korrelation mit den durch die Obduktion erlangten Ergebnissen. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Sensitivität der bildgebenden Verfahren in Bezug auf die Größenausdehnung der einzelnen Tumorabsiedelungen, unabhängig von der jeweiligen Lage.

Tabelle 5:

Zusammenfassende Darstellung der Sensitivitäten der bildgebenden Verfahren in Prozent.

Läsionen			
Größe	Obduktion	BLI pos	MRT pos
1-2mm	50	20/50 (40%)	2/47 (4%)
2-4mm	18	8/18 (44%)	4/16 (25%)
4-6mm	7	6/7 (86%)	6/7 (86%)
6-8mm	3	3/3 (100%)	2/3 (67%)
8-10mm	4	3/4 (75%)	3/3 (100%)
Gesamt	82	40/82 (49%)	17/76 (22%)

4. Ergebnisse

Nachdem die Ergebnisse der Untersuchungen nach dem in Material und Methoden beschriebenen Schema von drei voneinander unabhängigen Betrachtern beurteilt wurden, konnten die Verfahren untereinander miteinander verglichen werden. Die in der Obduktion bestätigten Läsionen wurden abhängig von ihrer Größe miteinander verglichen. Abbildung 35 zeigt eine Tumordinfiltration des Jejunums. Die Läsion, mit einem Durchmesser von 1mm, konnte in keinem der bildgebenden Verfahren detektiert werden. Insgesamt konnten in der Gruppe der 1-2 mm großen Tumore 40% mit Biolumineszenz-Imaging und 4% mit MRT diagnostiziert werden.

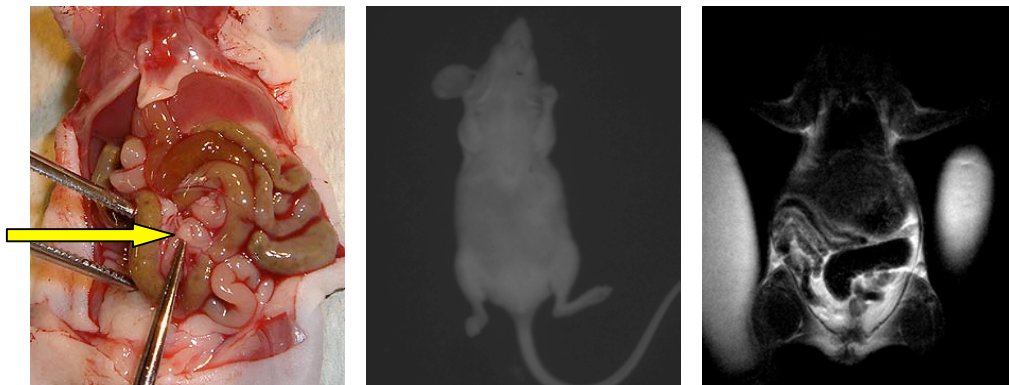


Abb.:35

Gegenüberstellung des Obduktionssitus einer Maus mit den entsprechenden Aufnahmen mit Biolumineszenz-Imaging und MRT. Der Pfeil markiert eine Tumorkläsion des Jejunums.

In der Gruppe von 2-4 mm großen Tumorkläsionen konnten 44% aller Läsionen mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging und 25% mittels MRT nachgewiesen werden, Abbildung 36 zeigt eine Gegenüberstellung der Modalitäten (koronare Darstellung der MRT Aufnahmen durch Rekonstruktion) bei einer 2 mm großen Tumorkläsion des Pankreas.

4. Ergebnisse

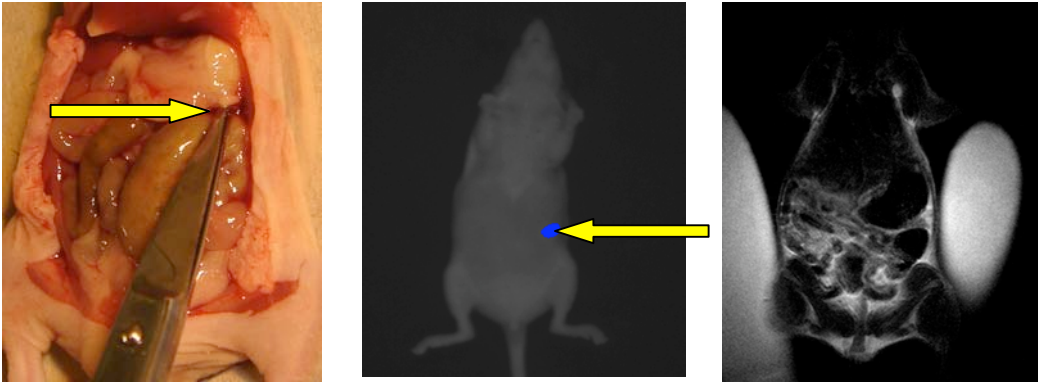


Abb.:36

Gegenüberstellung des Obduktionssitus einer Maus mit den entsprechenden Aufnahmen mit Biolumineszenz-Imaging und MRT. Die Pfeile markieren die Tumorkläsion des Pankreas und das Biolumineszenz-Signal des Tumors.

Abbildung 37 zeigt einen Tumor der Größenordnung 4-6 mm. Die das Colon befallende Metastase konnte durch Biolumineszenz-Imaging nachgewiesen werden. Insgesamt konnten mittels MRI und BLI jeweils 86% aller Kläsionen dieser Größenordnung diagnostiziert werden.

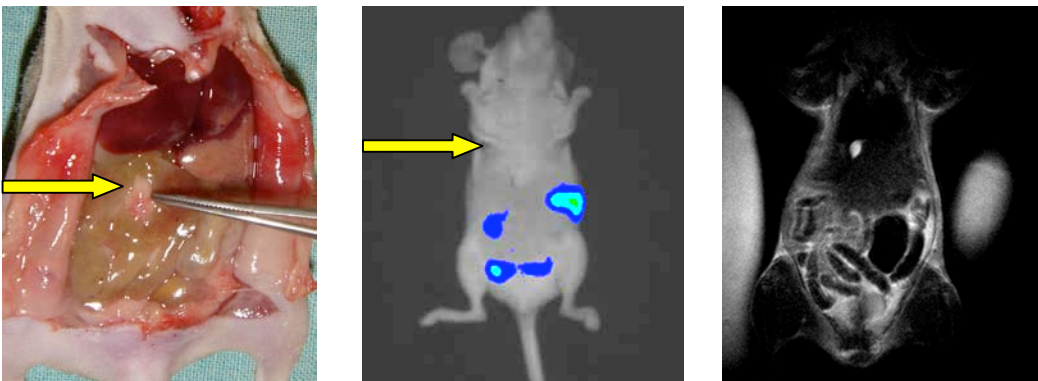


Abb.: 37

Gegenüberstellung des Obduktionssitus einer Maus mit den entsprechenden Aufnahmen mit Biolumineszenz-Imaging und MRT. Die Pfeile markieren die Tumorkläsion des Jejunums und das Biolumineszenz-Signal des Tumors.

4. Ergebnisse

In der Gruppe der Tumorknoten von > 8 mm konnten mittels Biolumineszenz-Imaging sämtliche Läsionen in der Bildgebung als solche identifiziert werden. MRT konnte mit einer Sensitivität von 67% nicht alle als Tumorknoten diagnostizieren. Abbildung 38 zeigt eine typische Läsion dieser Ausdehnung. Der Tumor infiltriert in diesem Fall das Pankreas.

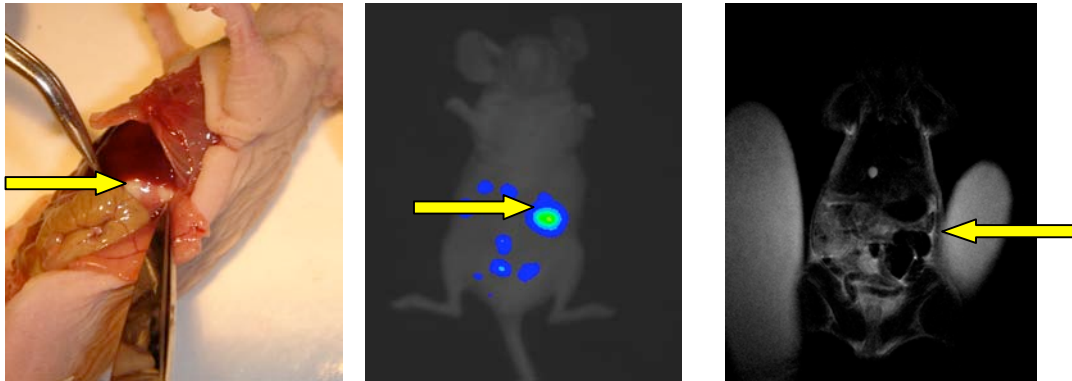


Abb.: 38

Gegenüberstellung des Obduktionssitus einer Maus mit den entsprechenden Aufnahmen mit Biolumineszenz-Imaging und MRT. Die Pfeile markieren die Tumorkläsion im Bereich des Pankreas, das zugehörige Biolumineszenz-Signal des Tumors und die Darstellung mittels MRT.

5. Diskussion

Maligne Tumorerkrankungen stellen noch immer eine der größten Herausforderungen an die moderne Medizin. Für viele Jahre stellte die Biopsie sowie die chirurgische, intraoperative Darstellung die einzige Möglichkeit dar, bösartige Tumoren zu diagnostizieren oder ihr Wachstum zu beurteilen. Die Entwicklung nicht-invasiver bildgebender Verfahren wie CT, MRI, PET, BLI und Ultraschall haben die Diagnostik und das Monitoring von Krebserkrankungen revolutioniert. Trotz aller Verbesserungen in den bildgebenden Verfahren ist die Detektion von Tumoren in frühen Stadien und die Beurteilung der Metastasierung in vielen Fällen noch limitiert. Das gilt besonders für den Fall der Peritonealkarzinose. Die Visualisierung der intraabdominellen Metastasierung und die Überwachung von Therapieverläufen sind in den meisten Fällen noch unzureichend.

Obwohl die meisten der bildgebenden Verfahren für die Anwendung am Menschen konzipiert wurden, finden sie immer häufiger auch Anwendung in Tierversuchen (Weissleder, 2001). Ziel der Studie war die nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell, in der Studie waren 16 Nacktmäuse beteiligt, denen zum Beginn 10^7 Magenkarzinomzellen intraperitoneal injiziert wurden.

Im Rahmen dieser Studie wurde auch die Sensitivität der Detektion mittels Positronen-Emissions-Tomographie untersucht. Die Ergebnisse werden in der Doktor-Arbeit von Niclas Landvogt vorgestellt und diskutiert.

5.1 Obduktion

Die Obduktion stellt in unserer Studie den Standart of Reference in der Bewertung der Detektionssensitivität von soliden Tumorabsiedelungen im Rahmen der Peritonealkarzinose dar. Insgesamt wurden 15 Mäuse in dieser Studie eingeschlossen. Bei allen Tieren konnte in der Obduktion die Entwicklung einer Peritonealkarzinose beobachtet werden und insgesamt konnten 82 solide Tumorknoten in unterschiedlichen Lokalisationen und verschiedenen Progressionsstadien in den durchgeführten Obduktionen gefunden werden.

Der Ansatz die Obduktionen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung durchzuführen, um Tumorknoten und deren Sensitivität der Detektion in den verschiedenen Wachstumsstadien der Progression beurteilen zu können, stellte sich als richtig heraus und so konnten sowohl kleine Tumoren von minimal 1mm Durchmesser, als auch größere Tumoren vom maximal 8mm x 2mm x 2mm in die Bewertung eingehen.

Wie schon frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben (Buchhorn et al., 2007; Huber), konnte ein typisches Befallsmuster der Peritonealkarzinose in den Mäusen beobachtet werden. Der Pankreas-Magen-Milz Bereich wurde in fast allen Tieren befallen und auch die Leber und das Jejunums wurden überproportional häufig von Tumor infiltriert. Aufgrund der kurzen Krankheitsdauer von maximal 7 Tagen kam es bei keiner Maus zu Aszitesbildung.

Eine Einschränkung in der durchgeführten Studie stellt das Fehlen histologischer Absicherung der gefundenen Tumorknoten als Gold Standard dar. Da die in der Obduktion freigelegten Organe nicht histologisch untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass kleinere Tumordinfiltrationen nicht in die Bewertung der Tumorlast der einzelnen

Tiere einbezogen wurden. Da in unserer Studie aber die Sensitivität der bildgebenden Verfahren in Bezug auf solide Tumormetastasen der Peritonealkarzinose im Millimeterbereich untersucht werden sollten und makroskopisch nicht sichtbare Tumorkläsionen durch die verwendeten Verfahren nicht darstellbar waren, wurde diese Tatsache vernachlässigt.

5.2 Biolumineszenz - Imaging

In unserem Versuchsmodell wurden HSC45-M2-luc Zellen verwendet, einer mit Luciferase transfizierter Magenkarzinomzelllinie vom Sigelringtyp. Die Verwendung dieser Zellen ermöglichte uns die Einbeziehung des Biolumineszenz-Imaging, einem nicht-invasiven bildgebenden Verfahren für die in vivo Darstellung und Beobachtung von Tumoren im Tiermodell. Das zeitsparende und kostengünstige Verfahren hat schon in vielen Studien aussichtsreiche Ergebnisse in der Beobachtung von Tumorwachstum und Therapiemonitoring geliefert (Zeamari et al., 2004; Paroo et al., 2004; Edinger et al., 2003; Edinger et al., 1999; Sweeney et al., 1999).

Aufgrund der aus Vorversuchen bekannten Ergebnisse, dass die maximale Lichtintensität der von der Luciferase produzierten Photonen ungefähr zehn Minuten nach Injektion erreicht wird wurde das Anästhesie / Luciferin Gemisch zehn Minuten vor Beginn der Aufnahmen intraperitoneal injiziert. Da die Narkose der Mäuse nur für ca. 20 Minuten angehalten hat und um ein Nachspritzen von Anästhetika zu vermeiden, mussten die Aufnahmen in einem Zeitfenster von zehn Minuten durchgeführt werden. Da die Tiere durch die verschiedenen, fast täglich aufeinander folgenden bildgebenden Verfahren einer großen Belastung ausgesetzt waren, wollten wir eine zusätzliche Belastung durch

5. Diskussion

eine längere Narkose und Auskühlung und die damit verbundene Stoffwechselbelastung der Tiere möglichst vermeiden. Da sich eine erhöhte Stoffwechselbelastung auch auf die Tumorzellen und somit auch auf die Bildqualität auswirken könnte wurden die Belichtungszeiten daher mit 10 Sekunden relativ kurz gewählt.

Da das BLI nur planare Abbildungen liefert, was eine 3-dimensionale Zuordnung der Tumore erschwert (Deroose et al., 2006), wurden um eine möglichst optimale Darstellung der Tumorlokalisation der Tiere zu bekommen die Mäuse in Rückenlage und in rechter und linker Seitenlage aufgenommen. Die Aufnahmen in den unterschiedlichen Lagerungen ermöglicht eine genauere Lokalisation und Größenbeurteilung der einzelnen Tumoren.

Insgesamt konnten von den 82 vorhandenen Tumorknoten 40 mittels Biolumineszenz Imaging detektiert werden. Die 8 oberflächigen Tumorknoten, die sich im Bereich der Einstichstelle, dem umgebenden subcutanen Fettgewebe und die zwei das Peritoneum in Höhe des Processus xiphoideus infiltrierenden Tumorknoten konnten alle mittels BLI primär dargestellt werden. Für die sehr gute Sensitivität der Detektion waren die oberflächige Lage und die damit nur minimale Abschwächung der Lichtintensität ausschlaggebend. Dementsprechend hatten selbst minimale Größenunterschiede der Läsionen, erhebliche Differenzen in den gemessenen Lichtintensitäten zur Folge. Die Lageabhängigkeit des Biolumineszenzsignals stellt wie schon in vielen Studien beschrieben den größten Nachteil des Verfahrens dar (Deroose et al., 2006, Rudin et al., 2005). In unserer Studie konnten diese Erfahrungen bestätigt werden.

In gut durchbluteten Organen, die eine Große Menge oxygeniertes und desoxygeniertes Hämoglobin beinhalten, wird das Lichtsignal ungefähr 10 mal stärker absorbiert (Koo et al., 2006). Beispielsweise konnte von

5. Diskussion

den 13 die Leber befallenden Tumoren nur ein Tumor durch das BLI dargestellt werden. Auch die Tumoren die Magen, Duodenum und Jejunums infiltrierte waren nur nachweisbar, wenn sie nicht durch ventral gelegene Strukturen bedeckt wurden. Die Tumorknoten, die sich im Bereich des Pankreas-Magen-Milz Gebietes bildeten, konnten aufgrund der oberflächigen Lage und dem relativ großen Volumen mit einer Sensitivität von 84% gut dargestellt werden.

Aufgrund des häufigen Auftretens von solider Tumorbildung im Bereich des Pankreas überprüften wir, wie in Punkt 4.2.3 beschrieben, eine mögliche Korrelation zwischen den durch die Tumorzellen produzierten Lichtintensitäten und dem bei der Obduktion tatsächlichen Tumolvolumen. Für die im BLI detektierten Tumorknoten ergab sich kein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Lichtintensität und dem tatsächlichen Tumolvolumen, R^2 beträgt 0,0042. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Anstieg der Lichtintensität bei größeren Tumoren in dieser Lokalisation kann in der Minderung des Lichtsignals durch die Organe in der Umgebung gefunden werden. Bei steigender Größe infiltrierte die Läsionen verstärkt Magen und Milz und in einigen Fällen konnte in den Obduktionen eine Tumorausbreitung unter die Leber beobachtet werden, was eine Abschwächung des Signals zur Folge hatte. Dieser Ansatz wurde auch für die Metastasen des Jejunums und dessen Mesenteriums durchgeführt. Auch für die Tumorknoten im Bereich des Jejunums ergibt sich keine Korrelation der gemessenen Lichtintensitäten mit dem tatsächlichen Tumolvolumen, R^2 beträgt in diesem Fall 0,2439. Auch im Bereich des Jejunums wurde das Lichtsignal durch die unterschiedliche Lage der Läsionen das Biolumineszenz-Signal von tiefer liegenden Tumoren abgeschwächt, wodurch sich keine Korrelation der Ergebnisse ergab.

5. Diskussion

Es muss zu den Ergebnissen der beiden Korrelationen hinzugefügt werden, dass ein solcher Ansatz normalerweise als longitudinale Studie verwendet wird, um das Wachstum eines bestimmten Tumors und dessen Volumen mit den dazugehörigen Lichtintensitäten in Verbindung zu setzen. Für unsere Gegenüberstellung verwendeten wir jedoch die Tumorknoten verschiedener Mäuse, die unterschiedliche Strukturen in einem bestimmten Bereich befallen hatten. Zusätzlich muss man davon ausgehen, dass sich die einzelnen Tumoren in unterschiedlichen Stadien in ihrer Progression befunden haben. Durch das Fehlen einer histologischen Kontrolle ist nicht auszuschließen, dass einige der Tumorknoten bereits zentrale Nekrosen ausbildeten und somit einige Faktoren die Korrelation zwischen Volumen und gemessener Lichtintensität negativ beeinflussen.

Insgesamt erwies sich die Sensitivität der Detektion als lageabhängig (Tab. 4). Wie schon angesprochen ist die Detektion von tief in Körper der Maus liegenden Tumoren schwieriger als die Detektion von oberflächlich wachsenden Tumoren. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsverhältnisse der einzelnen Gewebe ist im Bezug auf die Peritonealkarzinose keine Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Sensitivität der Detektion zu erkennen. So konnte beispielsweise von den 20 relativ oberflächlich wachsenden Tumorknoten, die sich im Bereich der Leber bildeten, mittels BLI nur in einem Fall der Tumor erfolgreich detektiert werden.

In einem weiteren Ansatz sollte geprüft werden, in welchem Maße die Sensitivität der Detektion mit der Größe der Tumoren korreliert. Hierzu wurden alle Tumoren entsprechend ihrer Größe in 5 Gruppen eingeteilt (Tab.5).

Man muss davon ausgehen, dass das unterschiedliche Absorptionsverhalten der Bauchorgane auch der Grund ist, dass die Sensitivität der Detektion nicht mit der Größe der einzelnen Tumoren korreliert werden kann. So konnten in der Gruppe der 1-2mm großen Läsionen nur 40% abgebildet werden.

In der Gruppe der 6-8 mm großen Metastasen wurden alle (3/3) durch BLI erfasst, der Abfall der Sensitivität auf 75% (3/4) in der Gruppe der 8-10mm großen Filiae lässt sich durch die geringe Anzahl von nur 4 gefundenen Tumoren und durch die Lokalisation des nicht detektierten Tumors im Bereich der Leber erklären.

Auf den ersten Blick vermutet man eine Größenabhängigkeit der Detektion. Berücksichtigt man aber die Ergebnisse der lokalisationsabhängigen Auswertung, muss man davon ausgehen, dass die Sensitivität der Detektion nicht mit der Größe der einzelnen Tumoren korreliert werden kann.

5.3 Magnetresonanztomographie

Mit einem weiteren Verfahren sollte in dieser Studie die Sensitivität der Detektion von soliden Metastasen der Peritonealkarzinose mittels Magnetresonanztomographie untersucht werden. Primär wurde das Verfahren für die klinische Anwendung entwickelt, in den letzten Jahren fand die MRT durch technische Weiterentwicklungen aber auch immer häufigere Anwendung im Tiermodell. Der Nutzen und die Anwendungsmöglichkeiten der MRT in der Visualisierung verschiedenster Krankheiten wurden in der Vergangenheit intensiv diskutiert (Budinger et al., 1999). Der hohe Stellenwert, der das Verfahren mittlerweile in der Krebsforschung bei Diagnostik und Therapieüberwachung in Tiermodell einnimmt, zeigt sich in der häufigen

5. Diskussion

Anwendung der MRT in longitudinal Studien bei Tieren (Koo et al., 2006). So wurde die MRT bereits zur Darstellung von Lungenkarzinomen (Vertrees et al., 2000) verwendet, wobei mit Hilfe der Magnetresonanztomographie bei intubierten Mäusen Raumforderungen im Bereich der Lunge dargestellt und in den folgenden Obduktionen als Lungenkarzinom bestätigt werden konnten. He et al. gelang es im Jahr 2000 in ihrer Studie mit Hilfe T2-gewichteter MRT - Aufnahmen implantierte menschliche Pankreastumore von gesunden Pankreasgewebe der Mäuse zu unterscheiden und in Rahmen einer Therapie mit Auristatin PE das Ansprechen der Tumoren darzustellen.

Auch die mittels Magnetresonanztomographie nachgewiesenen Auffälligkeiten in einer von Xiao et al., 1999 durchgeführten Studie über Blasenkarzinomen von weiblichen Ratten, korrelierten in hohem Maße mit den in der darauf folgenden Obduktion erhaltenen Ergebnissen.

Des Weiteren wurde die Magnetresonanztomographie mit ähnlich guten Ergebnissen in der Darstellung von Nieren- (Pulkkanen et al., 2000), Prostata- (Abdulkadir et al., 2001), Colon- (Beauregard et al., 2002), Leberkarzinomen (Cordel et al., 1998) und zur postoperativen Kontrolle nach laparoskopischen tumorchirurgischen Eingriffen verwendet (Lewis et al., 2002).

Weitere Anwendung fand das Verfahren auch in der Verlaufskontrolle und Beurteilung von Tumorbehandlungen mit Chemotherapieverfahren (Jennings et al., 2002), Ross et al. verwendete 2002 die Magnetresonanztomographie zur Darstellung therapeutisch - induzierter makroskopischer Veränderungen bei Gehirntumoren von Ratten nach Behandlung der Tiere mit Chemo- und Gentherapie.

Die MRT bietet aufgrund des Fehlens von ionisierender Strahlung Vorteile gegenüber anderen bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise

5. Diskussion

gegenüber der Computertomographie. Trotz der Entwicklung moderner Geräte, bedeutet eine Untersuchung immer noch eine nicht unerhebliche Strahlenbelastung für den Patienten (Koo et al., 2006; Lewis et al, 2002).

In vielen Fällen ist es möglich mittels MRT wichtige physiologische, molekulare und genaue anatomische Informationen über erkrankte Gewebe zu liefern. Beispielsweise konnten Preda et al, 2004 den therapeutischen Effekt von anti-VEGF Antikörpern auf kleine Gefäße von Tumoren mittels MRT darstellen.

Nachteilig für die Magnetresonanztomographie wirkt sich aus, dass es ein vergleichsweise teures und zeitaufwendiges Verfahren ist. So sollte in bestimmten Situationen, wie z.B. bei Tumorerkrankungen der Lunge oder der Knochen die Darstellung mittels CT der MRT vorgezogen werden (Weissleder, 2002). In diesem Fall ist die Bildgebung bei besserer Auflösung deutlich zeitsparender.

Ausschlaggebend für die erfolgreiche Detektion ist die Optimierung des Signalintensitätsunterschiedes zwischen gesundem und krankem Gewebe. In mehreren Studien konnten durch Applikation eines Kontrastmittels die betroffenen Strukturen mit einem erhöhten Intensitätsunterschied dargestellt werden. (Fonchy et al., 2000; Shahbazi-Gahrouei et al., 2001). Leider existiert bislang noch kein ideales gastrointestinales Kontrastmittel, auch der Versuch von Chung-Kuao et al. unter Verwendung von Luft als gastrointestinales Kontrastmedium die Sensitivität in der Detektion von Tumorknoten der Peritonealkarzinose zu erhöhen, scheiterte.

In der von uns durchgeführten Studie der Peritonealkarzinose konnten wir in durchgeführten Probeaufnahmen durch die Gabe des Kontrastmittels, Gadolinium (Magnevist®), keine Verbesserung der Bildqualität gegenüber der nativen Bildgebung erreichen.

5. Diskussion

In mehreren Voruntersuchungen vor Beginn der Studie wurden die für den von uns verwendeten 1,5 Tesla Siemens Sonata Scanner optimalen Einstellungen getestet. Die gewählten T₂-gewichteten Aufnahmen mit klassischen Spin-Echo-(SE-) Sequenzen wurden mit einer Repetitionszeit von 3580 ms und einer Echozeit von 92 ms durchgeführt, die gewählten Einstellungen lieferten bei einer Untersuchungszeit von ungefähr 20 Minuten pro Maus, die vergleichsweise beste Auflösung der Organe und Strukturen des Bauchraums. Die gewählte Schichtdicke betrug 2 mm, eine Minimierung der Schichtdicke hätte zwar eine genauere klinische Begutachtung der Aufnahmen ermöglicht und wäre prinzipiell auch möglich gewesen, aber die damit verbundene deutliche Verlängerung der Untersuchungszeit und eine verlängerte Narkotisierung hätte eine zu große Kreislaufbelastung für die Mäuse bedeutet. Um eine zu starke Auskühlung des zu untersuchen Tieres zu verhindern, wurden die Tiere im Tomographen auf mit warmen Wasser gefüllten Untersuchungshandschuhen gelagert. Die Verwendung einer Infrarotlampe, wie wir sie während der PET Aufnahmen verwendeten, wäre zwar effektiver gewesen, konnte aber aufgrund des im Untersuchungsraum herrschenden Magnetfeldes nicht realisiert werden.

Insgesamt konnten 17 der 76 (22%) Tumoren mittels MRT dargestellt werden.

Von den acht Tumoren, die sich im Bereich der Einstichstelle und dem angrenzenden subcutanen Fettgewebe bildeten, konnten drei durch die klinische Beurteilung primär identifiziert werden. Die nicht detektierten Metastasen hatten eine so geringe Größe, dass die Möglichkeit besteht, dass die Tumore zwischen den beiden dargestellten Schichten lokalisiert waren. Sowohl von den 13 Tumoren an der Leber, als auch von den 7 das Zwerchfell infiltrierenden Tumoren konnte keine Läsion durch die

5. Diskussion

klinische Beurteilung identifiziert werden. Die Unterschiede in der Signalintensität zwischen Lebergewebe und dem angrenzenden Zwerchfell im Vergleich zur Intensität des Tumorgewebes konnten mit den gewählten Einstellungen nicht ausreichend genug hervorgehoben werden, so dass keiner der Tumorknoten in dieser Lokalisation diagnostiziert werden konnte. In dem häufig von soliden Tumorabsiedelungen befallenen Jejunum, wurden in der Obduktion 21 Läsionen gefunden. Die fünf Metastasen die mittels MRT-Diagnostik dargestellt werden konnten hatten, im Vergleich zu den nicht darstellbaren, alle eine deutlich größere Ausdehnung. Erschwerend für die Tumorsuche kommt hinzu dass im Bereich des Dünndarms die optimale Darstellung und Beurteilung des Dünndarms durch Peristaltik induzierte Artefakte erschwert wird (Chung-Khuao et al., 1992). Eine in Vorversuchen durchgeführte peristaltikhemmende Behandlung der Mäuse mit Butylscopolamin erbrachte keine wesentliche Verbesserung der Bildqualität und wurde daher im Folgenden nicht standardmäßig durchgeführt.

Die Tumore im Bereich des Kolons konnten mit einer Sensitivität von 40% (2/5) detektiert werden. Beide diagnostizierten Läsionen hatten eine größere Ausdehnung als die nicht darstellbaren. Diese waren mit einem Durchmesser von maximal 1mm mit der gewählten Auflösung nicht zu erkennen.

Die am zweit häufigsten betroffene Lokalisation, war der Bereich des Pankreas. In 13 Fällen war der Tumor mit Magen und Milz verwachsen. Mittels MRT konnten fünf dieser Läsionen primär dargestellt werden, aufgrund der geringeren Größe der nicht detektierten Tumore, sowie des geringen Signalintensitätsunterschiedes zwischen Tumorgewebe und Pankreas, Magen und Milz konnten die restlichen acht, wie auch die, den

5. Diskussion

Duodenalschenkel des Pankreas und dessen Korpus befallenden Tumorknoten, nicht primär diagnostiziert werden.

Von den zwei Tumoren, die den Bereich der Blase und des Uterus infiltrierten, konnte jeweils eine der Läsionen erkannt werden. Beide detektierten Tumorknoten hatten eine deutlich größere Ausdehnung als die nicht detektierbaren Läsionen, die beide mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einem Volumen von $1,8 \text{ mm}^3$ nicht darstellbar waren.

In einem Fall wurde in der Beurteilung der MRT-Bilder eine Läsion als Tumor identifiziert, welche in der Obduktion nicht als solcher bestätigt werden konnte. In der MRT zeigte sich ventral der Niere eine Raumforderung mit tumorähnlicher Signalintensität. In der Obduktion konnte ein solider Tumor in dieser Lokalisation definitiv ausgeschlossen werden.

Betrachtet man die Sensitivität der Detektion mittels MRT bezüglich der organbezogenen Lokalisation ist auffällig, dass alle Läsionen die den Bereich der Leber, des Zwerchfells sowie auch den des Magens und Duodenum infiltrierten primär nicht detektiert werden konnten. Eine mögliche Ursache könnte der unzureichende Signalintensitätsunterschied zwischen gesundem und befallenem Gewebe sein, der die klinische Bildbeurteilung erschwerte.

Wie erwartet zeigt sich in der Betrachtung der größenabhängigen Sensitivitäten ein von der Ausdehnung der Tumorknoten abhängiger kontinuierlicher Anstieg der Detektionswahrscheinlichkeit. Die nicht darstellbaren Tumorknoten in der Gruppe der 6-8mm großen Tumore, zeigten sich in der Obduktion mit Pankreas, Magen und Milz verwachsen und hatten eine Ausdehnung von 5mm x 2mm x 2mm. Die Tumorknoten waren zwischen den beiden dargestellten Schichten lokalisiert, so dass

die ausreichende Beurteilung des Tumorgewebes schwierig war und die sichere Detektion verhinderte.

5.4 Vergleich mit der Positronen-Emissions-Tomographie

Im Rahmen dieser Studie wurde auch die Positronen-Emissions-Tomographie im Hinblick auf die Sensitivität der Detektion von Tumorknoten der Peritonealkarzinose untersucht. Hierzu verweise ich auf die Dissertation von Niclas Landvogt.

Im Vergleich zu den anderen bildgebenden Verfahren erwies sich die Positronen-Emissions-Tomographie als das sensitivste Verfahren dieser Studie. Insgesamt konnten 58 von 78 Tumorknoten detektiert werden, was einer Sensitivität von 74% entspricht. Tabelle 6 zeigt eine größenabhängige Gegenüberstellung der Sensitivitäten der drei bildgebenden Verfahren dieser Studie.

Tabelle 6:

Zusammenfassende Darstellung der Sensitivitäten des Biolumineszenz-Imaging, der Magnetresonanztomographie und der Positronen-Emissions-Tomographie.

Läsionen				
Größe	Obduktion	BLI pos	MRT pos	PET pos
1-2mm	50	20/50 (40%)	2/47 (4%)	29/47 (61%)
2-4mm	18	8/18 (44%)	4/16 (25%)	16/18 (89%)
4-6mm	7	6/7 (86%)	6/7 (86%)	6/6 (100%)
6-8mm	3	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
8-10mm	4	3/4 (75%)	3/3 (100%)	4/4 (100%)
Gesamt	82	40/82 (49%)	17/76 (22%)	58/78 (74%)

5. Diskussion

Bei der Detektion von Tumorknoten im Bereich von 1-4mm hat die Positronen-Emissions-Tomographie deutliche Vorteile. In der Gruppe der 1-2 mm großen Tumoren konnte die Positronen-Emissions-Tomographie mit einer Detektionssensitivität von 61% deutlich mehr Tumorknoten nachweisen als die Magnetresonanztomographie, die nur 4% der Tumoren dieser Größenordnung diagnostizieren konnte.

Tabelle 7 zeigt einen Vergleich der organbezogenen Sensitivitäten der Positronen-Emissions-Tomographie mit denen der anderen bildgebenden Verfahren.

Tabelle 7:

*Organbezogene Übersicht des Tumorbefalls und Darstellung mittels PET,
Biolumineszenz-Imaging und MRT.*

5. Diskussion

Läsionen

n	Lokalisation	Volumen range in mm ³	BLI pos	MRT pos	PET pos
8	Einstichstelle	0,3-9	8/8 (100%)	3/8 (38%)	5/8 (63%)
2	Peritoneum (Innenseite)	1-1,8	2/2 (100%)	0/2 (0%)	1/2 (0,5%)
7	Zwerchfell	0,1-1,8	0/7 (0%)	0/6 (0%)	1/7 (14%)
13	Leber	0,5 - 3	1/13 (8%)	0/12 (0%)	11/13 (85%)
1	Magen	0,5	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
1	Duodenum	3	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
21	Jejunum	0,5-10	10/21 (48%)	5/20 (25%)	16/19 (84%)
6	Colon	0,5-6	2/6 (33%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)
19	Pankreas	1-18	15/19 (79%)	5/17 (29%)	15/18 (83%)
2	Ovarien	1,8-3	2/2 (100%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)
2	Blase	1,8-4	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
82	Gesamt	0,1 - 18	40/82 (49%)	17/76 (22%)	58/78 (74%)

Die Gegenüberstellung macht beispielsweise anhand der Tumorknoten in Bereich der Leber deutlich, dass die Positronen-Emissions-Tomographie unabhängig von der Gewebetiefe der Tumorknoten eine sehr hohe Sensitivität besitzt (Lyons, 2005), was sich vor allem im Vergleich mit dem Biolumineszenz-Imaging als Vorteil erweist.

Allerdings ist die anatomische Zuordnung der mittels PET detektierten Tumorknoten ist aufgrund des Fehlens von anatomischen Landmarks oft erschwert.

5. Diskussion

Die gute Bildauflösung und die exakte anatomische Darstellung des mittels MRT, die bei entsprechenden Untersuchungszeiten in den Mikrometerbereich fällt, kann unabhängig von ihrer Lokalisation, auch sehr tief im Körper liegende Tumorknoten gut darstellen.

Leider war es in unserer Studie, aufgrund der zum Schutz der Mäuse gewählten kürzeren Untersuchungszeit nicht möglich, die vollen Kapazitäten der Auflösung auszureizen.

Insgesamt erreicht die MRT mit den gewählten Einstellungen mit 22% nachgewiesenen Tumorknoten eine geringere Sensitivität gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie PET mit 74% oder Biolumineszenz-Imaging mit 49%.

6. Zusammenfassung

Die frühzeitige, nicht-invasive Darstellung einer Peritonealkarzinose ist auch heute noch ein Problem und stellt eine große Herausforderung an die bildgebenden Verfahren der modernen Medizin.

Das Ziel dieser Studie war die möglichst frühzeitige Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels Biolumineszenz-Imaging und Magnetresonanztomographie, sowie der Vergleich der bildgebenden Verfahren bezüglich ihrer Sensitivität der Detektion von soliden Tumorknoten in Abhängigkeit von der Größe und Lokalisation im Intraperitonealraum.

Für das verwendete Mausmodell wurden weiblichen NMRI Nacktmäusen 1×10^7 humane Magenkarzinomzellen (HSC45-M2-luc), intraperitoneal injiziert.

Die Verwendung dieser speziellen humanen Sigelringkarzinomzelllinie, welche zuvor mit dem Gen für Firefly Luciferase transfiziert worden war, ermöglichte die Verwendung des Biolumineszenz-Imaging zum Nachweis der Peritonealkarzinose und den Vergleich mit den entsprechenden Ergebnissen aus der Magnetresonanztomographie.

Die Untersuchungen zur Entstehung der Peritonealkarzinose erfolgten mittels Biolumineszenz-Imaging am Tag 3 und 6, die durch Magnetresonanztomographie am Tag 4 und 7 nach intraperitonealer Injektion der HSC45-M2-luc-Zellen.

Die Auswertung erfolgte durch drei Betrachter, die unabhängig voneinander die Aufnahmen begutachteten und die Darstellung des Tumorbefalls bewerteten.

Als Standard of Reference diente die in der Obduktion der Tiere erhaltenen Ergebnisse über Lokalisation, Tumorgröße und Volumen der einzelnen Tumorknoten im Intraperitonealraum der Mäuse.

7. Literaturverzeichnis

Mittels Biolumineszenz-Imaging konnten 40 von 82 Tumorknoten dargestellt werden, wobei deren Detektion stark lageabhängig war. So konnten oberflächige gelegene Tumorknoten zu 100% detektiert werden, tiefer gelegene Tumoren konnten, selbst wenn sie vergleichsweise groß waren, nicht dargestellt werden. Insbesondere waren Knoten, die von der Leber überdeckt wurden, nicht darstellbar.

Durch die Beurteilung der Magnetresonanztomographie-Aufnahmen konnten 17 von 76 Tumorknoten sicher diagnostiziert werden, wobei die Sensitivität größenabhängig war.

In der Gruppe der 1-2 mm großen Tumore konnten 40% mit Biolumineszenz-Imaging und 4% mit MRT diagnostiziert werden.

Von den 2-4 mm großen Tumorknoten konnten 44% aller Läsionen mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging und 25% mittels MRT nachgewiesen werden,

Tumore der Größenordnung 4-6 mm konnten mittels MRI und BLI mit einer Sensitivität von 86% diagnostiziert werden.

Alle (3/3) der 6-8 mm großen Tumore wurden durch BLI erfasst, der Abfall der Sensitivität auf 75% (3/4) in der Gruppe der 8-10mm großen Filiae lässt sich durch die geringe Anzahl von nur 4 gefundenen Tumoren und durch die Lokalisation des nicht detektierten Tumors im Bereich der Leber erklären.

In der Gruppe der Tumorknoten von > 8 mm konnten mittels Biolumineszenz-Imaging sämtliche Läsionen diagnostizieren werden. Die MRT konnte mit einer Sensitivität von 67% nicht alle Tumorknoten als solche identifizieren.

Insgesamt konnte das Biolumineszenz-Imaging Tumorknoten mit einer Sensitivität von 49% nachweisen, 22% der durch die Obduktion

7. Literaturverzeichnis

nachgewiesenen Tumorknoten wurden primär durch die Magnetresonanztomographie dargestellt.

Damit ergibt sich im Tiermodell eine Überlegenheit des Biolumineszenz-Imaging im Vergleich zur Magnetresonanztomographie hinsichtlich der Darstellung von Tumorknoten einer Peritonealkarzinose.

Im Rahmen dieser Studie wurde auch die Positronen-Emissions-Tomographie bezüglich ihrer Sensitivität in der Detektion der Tumorknoten untersucht. Die Positronen-Emissions-Tomographie erreichte in der Studie eine Sensitivität von 74% und war damit das sensitivste Verfahren.

Hierzu verweise ich auf die Dissertation von Niclas Landvogt.

7. Literaturverzeichnis

- Abdulkadir SA, Qu Z, Garabedian E, , Song SK, Peters TJ, Svaren J, Carbone JM, Naughton CK, Catalona WJ, Ackerman JJ, Gordon JI, Humphrey PA, Milbrandt J.

Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice.

Nature Med. 2001, 7, 101-107

- Beaugard DA, Pedley R, Barbara H, Sally A, Brindle KM
Differential sensitivity of two adenocarcinoma xenografts to the anti-vascular drugs combretastatin A4 phosphate and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, assessed using MRI and MRS.
NMR Biomed 2002, 15, 99-105

- Bennet JJ, Gonen M, D'Angelica M., Jaques DP, Brennan MF, Coit DG;
Is detection of asymptomatic recurrence after curative resection associated with improved survival in patients with gastric cancer.
J Am Coll Surg. 2005 Oct; 201(4):503-10

- Blasberg R.
In vivo molecular-genetic imaging: multi-modality nuclear and optical combinations
Nuclear Medicine and Biology 30 (2003) 879-888

- Buchhorn HM, Seidl C, Beck R, Saur D, Apostolidis C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R.
Non-invasive visualisation of the development of peritoneal

7. Literaturverzeichnis

carcinomatosis and tumour regression after (213)Bi-radioimmunotherapy using bioluminescence imaging. [Eur J Nucl Med Mol Imaging](#). 2007 Jun;34(6):841-9

- Budinger TF, Benaron DA, Koretsky AP
Imaging transgenic animals.
Annu. Rev. Biomed. Eng. 1999. 01: 611-648
- Chung-Kuao C, Gin-Chung L, Li-Tzong C, Twei-Shiiun J
MRI manifestations of peritoneal carcinomatosis
Gastrointestinal Radiology 17: 336-338 (1992)
- Cordel S, Dupas B, Douillard JY, Meflah K.
Interleukin-2/sodium butyrate treatment cures rats bearing liver tumors after acquired 5-flourouracil resistance.
Int J Cancer 1998, 78, 735-739
- Derosé CM, De A, Loening AM, Chow PL, Ray P, Chatziioannou AF, Gambhir SS
Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging
The journal of nuclear medicine, Vol. 48, No. 2, Februar 2007
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models.
Neoplasia 1999; 1:303-10.

7. Literaturverzeichnis

- Hastings JW.
Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review.
Gene 1996; 173:5-11.
- He Z, Evelhoch JL, Mohammad RM, Adsay NV, Pettit GR, Vaitkevicius VK, Sarkar FH.
Magnetic resonance imaging to measure therapeutic response using an orthotopic model of human pancreatic cancer
Pancreas 2000, 21, 69-76
- Huber R.
Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ²¹³Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell
Dissertation der tierärztlichen Fakultät der LMU München, 2003
- Jennings D, Hatton BN, Guo J et al., Galons JP, Trouard TP, Raghunand N, Marshall J, Gillies RJ
Early response of prostatic carcinoma xenografts to docetaxel chemotherapy monitored with diffusion MRI.
Neoplasia 2002, 4, 255-262
- Kauffmann GW, Moser E, Sauer R
Radiologie
2. Auflage, Springer Verlag 2001, 102-118
- Kasakura Y, Phan A, Ajani J.
Adjuvant therapy for resected gastric carcinoma.

7. Literaturverzeichnis

Surg Oncol Clin N Am. 2002; 11:431-44, XII-XIII

- Koo V, Hamilton PW and Williamson K
Non-invasive in vivo imaging in small animal research
Cellular Onco., IOS Press, 8 (2006), 127-139
- Lewis JS, Achilefu S, Garbow JR, Laforest R, Welch MJ
Small animal imaging: current technology and perspectives for
oncological imaging
European journal of cancer 38(2002) 2173-2188
- Lewis JS, Connett JM, Garbow JR, Buettner TL, Fujibayashi Y,
Fleshman JW, Welch MJ.
Cu-64-pyruvaldehyde-bis (N⁴-methylthiosemicarbazone) for
prevention of tumor growth at wound sites following laparoscopic
surgery: monitoring therapy response with microPET and magnetic
resonance imaging.
Cancer Res 2002, 64, 445-449
- Lordick F., Siewert JR, Recent advances in multimodal treatment
for gastric cancer: a review, Gastric Cancer. 2005;8(2):78-85
- Low RN, Barone RM, Lacey C, Sigeti JS, Alzate GD, Sebrechts
CP.
Peritoneal tumor: MR imaging with dilute oral barium and
intravenous gadolinium-containing contrast agents compared with
unenhanced MR and CT.
Radiology. 1997 Aug; 204(2): 513-20

7. Literaturverzeichnis

- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA
Chemotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction, N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):725-30
- Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, Yakeishi Y, Matsukuma A, Enjoji M.
Pathology and prognosis of gastric carcinoma, findings in 10 000 patients who underwent gastrectomy.
Cancer 70, 1030-1037, 1992
- Pulkkanen KJ, Parkkinen JJ, Kettunen MI, Kauppinen RA, Lappalainen M, Ala-Opas MY, Yla-Herttuala S.
Characterization of a new animal model for human renal cell carcinoma.
In vivo 2000, 14, 393-358
- Preda A, Novikov M, Moglich M, Turetschek K, Shames DM, Brasch RC, Cavagna FM, Roberts TP
MRI monitoring of avastin antiangiogenesis therapy using B22956/1, a new blood pool contrast agent, in a experimental model of human cancer.
Journal of Magnetic Resonance Imaging 20 (2004), 865-873
- Ricke J, Sehouli J, Hosten N, Stroszczynski C, Athauer H, Rieger J, Buchmann E, Felix R
Fat saturated, contrast-enhanced spin-echo sequences in the

7. Literaturverzeichnis

magnetic resonance tomographic diagnosis of peritoneal carcinosis.

Rofo. 1999 Dec; 171(6):461-7.

- Riethmüller G, Schneider-Gaedicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayer R.
Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Duke`C colorectal carcinoma.
German cancer aid 17-1A study group. Lancet. 343: 1177-83, 1994
- Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P, Schenck U, Hoefler H, Siewert JR. Free peritoneal tumor cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma.
Br J Surg. 2006 Mar; 93(3): 325-31
- Ross BD, Chenevert TL, Rehemtulla A
Magnetic resonance imaging in cancer research
European journal of cancer 38 (2002) 2147-2156
- Rudin M, Rausch M, Stoeckli M
Molecular imaging in drug discovery and development: potential and limitations of nonnuclear methods
Academy of molecular Imaging (2005) 7:5-13
- Rygaard J.
Immunodeficiency in nude mice. In: Bastert GBA. Thymusaplastic nude mice and rats in clinical oncology.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York. 1981, 3-13

7. Literaturverzeichnis

- Sadehi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Faum JL, Percheron J, Peix JL, Francoise Y, Vignal J, Gilly FN.
Peritoneal corcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study.
Cancer 2000 Jan15; 88(2): 358-63
- Siewert JR, Böttcher K, Roder JD, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ.
Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma.
German Gastric Carcinoma Study Group.
Br J Surg 80:1015-1018, 1993
- Siewert JR, Lordick F., Ott K., Brucher BL, Rosenberg R.
Curative vs. palliative strategies in locoregional recurrence of gastrointestinal malignancies.
Chirurg 2006 Mar; 77(3): 227-235
- Siewert JR, Fink U.
Multimodale Therapiekonzepte bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes
Chirurg 63: 242-250, 1992
- Siewert JR, Sandler A, Dittler HJ, Fink U, Höfler H.
Staging gastrointestinal cancer as a precondition for multimodal treatment.
World J Surg. 19: 168-177, 1995

7. Literaturverzeichnis

- Turlakow A, Yeung HW, Salmon AS, Macapinlac HA, Larson SM.
Peritoneal carcinomatosis: Role of ^{18}F -FDG PET.
Journal of nuclear medicine Vol. 44 No. 9 1407-1412, 2003
- Vertrees RA, Deyo DJ, Quast M, Lightfoot KM, Boor PJ, Zwischenberger JB
Development of a human to murine orthotopic xenotransplanted lung cancer model
J Invest Surgery 2000, 13, 349-358
- Weihaupt D, Köchli VD, Marincek B
Wie funktioniert MRI ?, Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung.
2.Auflage, Berlin. Springer Verlag 2001
- Weissleder R
Scaling down imaging: Molecular mapping of cancer in mice
Nature reviews, cancer, Volume 2, January 2002
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M
Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract.
Cancer Res. 1993; 53:5815-21
- Xiao Z, McCallum TJ, Brown KM, Miller GG, Halls SB, Parney I, Moore RB.
Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder

7. Literaturverzeichnis

transitional cell tumour model

British Journal of cancer 1999, 81, 638-646

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke für die Bereitstellung meines Themas und die liebenswürdige Unterstützung in allen Bereichen meiner Arbeit. Herrn Dr. Christoph Seidl danke ich herzlichst für die Betreuung meiner Arbeit, die Einarbeitung im Umgang mit Zellkulturen, die konstruktive Kritik und für die geduldige Hilfestellung bei allen Problemen.

Frau Roswitha Beck möchte ich für die Hilfestellung bei den Tierexperimenten und den Obduktionen danken.

Herrn Matthias Buchhorn danke ich herzlichst für die Einarbeitung in das Thema und für die Unterstützung und Hilfestellung bei meinen Versuchen.

Den Mitarbeitern der Forschergruppe Nuklearmedizin von Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, bin ich dankbar für ein freundschaftliches und jederzeit hilfsbereites Umfeld.

Des Weiteren bedanke ich mich bei PD Dr. J. Stollfuss für die Hilfestellung bei der Durchführung und der Auswertung der Magnetresonanztomographie.