

**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik der Technischen
Universität München**

Klinikum rechts der Isar

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

**Nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose
im Mausmodell mittels PET und Biolumineszenz – Imaging
sowie Bewertung der beiden Methoden hinsichtlich ihrer
Sensitivität**

Niclas Landvogt

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. Stofffuss

Die Dissertation wurde am 23.07.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2009 angenommen.

Meinen Eltern Carina Landvogt und Karl Landvogt sowie
meiner Schwester Maren Landvogt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	05
2. Zielsetzung	09
3. Material und Methoden	10
3.1 Chemikalien und Medikamente	10
3.2 Geräte	10
3.3 Zelllinie	11
3.3.1 Luciferase Transfizierung	11
3.3.1.1 Plasmid Konstruktion	11
3.3.1.2 Stabile Transfizierung der HSC-Zellen	12
3.3.2 Kultivierung der Zellen	13
3.4 Versuchstiere und Tierhaltung	15
3.5 Tumormodell	15
3.5.1 Tumorzellinjektion	15
3.5.2 Versuchsaufbau	16
3.5.3 Anästhesie	17
3.5.4 Tötung	17
3.6 Obduktion als Standard of Reference	17
3.6.1 Vorgehensweise bei der Obduktion	18
3.6.2 Einteilung der Tumore nach Lokalisation und Größe	18
3.7 Biolumineszenz Imaging	19
3.7.1 Versuchsaufbau und Vorbereitungen	19
3.7.2 Durchführung der Aufnahmen	20
3.7.3 Bildbearbeitung	24
3.7.4 Bildbeurteilung	26
3.7.5 Versuch der Quantifizierung	26

3.8	Positronen-Emissions-Tomographie	28
3.8.1	Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie	28
3.8.2	^{18}F -Fluordesoxyglukose	29
3.8.3	Versuchsaufbau und Vorbereitungen	30
3.8.4	PET-Protokoll	32
3.8.5	Bildbeurteilung	33
3.8.6	Quantitative Bild-Analyse	34
3.9	Vergleich der 3 bildgebenden Verfahren BLI, PET und MRT	35
3.10	Exemplarische Fusion von PET- und MRT-Aufnahmen	35
4.	Ergebnisse	36
4.1	Obduktionsergebnisse	36
4.2	Sensitivität der Detektion von BLI und PET in Abhängigkeit der Lage	38
4.3	Sensitivität der Detektion von BLI und PET in Abhängigkeit der Größe	56
4.4	Versuch der Quantifizierung des BLI	57
4.5	Quantitative Auswertung der PET	59
4.6	Vergleich der bildgebenden Verfahren BLI, PET und MRT	60
4.6.1	Lokalisationsbezogene Auswertung	60
4.6.2	Größenabhängige Auswertung	62
4.7	Exemplarische Gegenüberstellung von PET, BLI und MRT	63
4.8	Fusion von PET- und MRT-Aufnahmen	68
5.	Diskussion	70
5.1	Versuchsaufbau	70
5.2	Obduktionsergebnisse	71
5.3	Biolumineszenz Imaging	72
5.3.1	Lokalisationsbezogene Detektion	74
5.3.2	Größenabhängige Detektion	75
5.3.3	Korrelation zwischen Tumolvolumen und BLI-Signal	75
5.3.4	Wertung	76

5.4	Positronenemissionstomographie	77
5.4.1	Lokalisationsabhängige und größenabhängige Auswertung	78
5.4.2	Wertung	81
5.5	Limitationen der Studie	81
5.6	Multimodality Imaging	82
6.	Zusammenfassung	83
7.	Literaturverzeichnis	85
8.	Danksagung	97

Verwendete Abkürzungen

^{18}F -FDG	^{18}F -Flourdesoxyglukose
BLI	Biolumineszenz Imaging
CCD-Kamera	charge-coupled-device-Kamera
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
FKS	Fetales Kälberserum
HCL	Salzsäure
HSC	Human Signetringcell Carcinoma
i.p.	intraperitoneal
keV	Kiloelektronenvolt
MBq	Megabequerel
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
min	Minute
PBS	Phosphatpuffer
PET	Positronenemissionstomographie
sec	Sekunde
U/min	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Tumorerkrankungen stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Im Jahre 2006 traten alleine in Europa 3,2 Millionen neue Fälle von Krebserkrankungen auf und 1,7 Millionen Menschen verstarben als Folge ihrer Krebserkrankung (Ferlay et al., 2007). Nach Lungenkrebs, Brustkrebs und den kolorektalen Karzinomen stellt das Magenkarzinom mit 900.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die vierthäufigste Tumorerkrankung dar. Mit 700.000 Krebstoten jährlich belegt das Magenkarzinom sogar Rang zwei in der Mortalitätsstatistik (Parkin et al., 2005).

Seit dem Anfang der siebziger Jahre hat sich die Inzidenz des Magenkarzinoms in Deutschland ebenso wie in anderen Industrienationen in etwa halbiert. Trotzdem erkranken in Deutschland jährlich circa 19.400 Menschen an einem Magenkarzinom, davon 11.200 Männer und 8200 Frauen. Mit diesen Zahlen stellt das Magenkarzinom in Deutschland die fünfhäufigste Tumorerkrankung bei den Männern und die sechshäufigste bei den Frauen dar. Trotz rückläufiger Neuerkrankungsraten gehört das Magenkarzinom immer noch zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen. Die derzeitige relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland ist weiterhin schlecht und beträgt bei Männern 27 %, bei Frauen 29 % (RKI, 2006).

Voraussetzungen für eine gute Prognose bei allen Tumorerkrankungen sind das frühe Erkennen der Erkrankung sowie eine effektive Therapie. Beim Magenkarzinom sind diese beiden Voraussetzungen nur ungenügend gegeben und für die schlechte Prognose verantwortlich. Bei etwa der Hälfte aller Patienten befindet sich der Tumor bei Diagnosestellung aufgrund von sehr uncharakteristischen Frühsymptomen bereits in fortgeschrittenen Stadien, d.h. der Tumor hat bereits benachbarte Gewebe infiltriert und ein kurativer Therapieansatz ist nicht mehr möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass sogar in frühen Stadien bereits eine lymphogene und hämatogene Streuung vorliegt (Lordick et al., 2005). Heutzutage werden Magenkarzinome durch Stadien angepasste Therapieansätze wie neoadjuvante Chemotherapie oder postoperative Radiochemotherapie behandelt (Sendler et al., 2003).

Im Vergleich zu Brustkrebs oder den kolorektalen Karzinomen konnte über die letzten

Jahrzehnte trotz zahlreicher Studien jedoch noch kein durchschlagendes adjuvantes Therapiekonzept für die optimale Behandlung des Magenkarzinoms gefunden werden (Lim et al., 2005). Selbst bei kurativem Therapieansatz und nach erfolgreicher R₀-Resektion beobachtet man häufig das Auftreten von Lokalrezidiven (Lim et al., 2005). Laut Bennet et al. (2005) beträgt das Rezidivrisiko nach stadiengerechter R₀-Resektion 48%. D'Angelica et al. (2004) fanden bei 29% der wegen eines Rezidivs behandelten Patienten eine Peritonealkarzinose. Nashimoto et al. (2007) stellten bei 32,5% der wegen eines Rezidivs behandelten Patienten nach primär kurativer R₀-Resektion eine Peritonealkarzinose fest. Siewert et al. (2006) ermittelten nach R₀-Resektion und neoadjuvanter Chemotherapie ein Rezidiv mit Peritonealkarzinose bei 34% der Patienten.

Die Peritonealkarzinose stellt eine besonders schwerwiegende Form des Rezidivs dar. Aus ihr folgt eine erhebliche Verschlechterung der Überlebenschancen eines Patienten. Sadeghi et al. (2000) fanden eine mittlere Überlebensrate von 3,1 Monaten bei Patienten mit durch Magenkarzinom bedingter Peritonealkarzinose. Eine manifeste Peritonealkarzinose ist chirurgisch nicht mehr behandelbar. Somit besitzt das Verhindern einer Peritonealkarzinose höchste Priorität. Hierzu existieren mehrere verschiedene Therapieansätze. Neben konventionellen Ansätzen wie Chemotherapie und Radiotherapie stellen Immuntherapien eine vielversprechende Therapieoption der Zukunft dar. So können laut Heiss et al. (2005) Patienten mit einer Peritonealkarzinose und/oder malignem Aszites von einer Immuntherapie mit trifunktionalen Antikörpern profitieren. Die therapeutische Effizienz von Immuntherapien kann durch die Koppelung von Radionukliden an monoklonale Antikörper noch erhöht werden (Couturnier et al., 2005).

Viele dieser Therapieansätze sind jedoch nur im Frühstadium der peritonealen Metastasierung wirksam und erfordern die Diagnosestellung zu einem möglichst frühen Zeitpunkt. Die Bildgebung und damit das Auffinden einer Peritonealkarzinose gestaltet sich jedoch als äußerst schwierig. Herkömmliche bildgebende Verfahren wie die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie oder der Ultraschall werden bei der Diagnostik eingesetzt, jedoch nur mit mäßigem Erfolg. Die

Computertomographie, die aktuell den Goldstandard für die präoperative Diagnose der Peritonealkarzinose darstellt, besitzt je nach Studie eine diagnostische Sensitivität zwischen 17% und 91% (Suzuki et al., 2004). Sie erweist sich als abhängig von Faktoren wie Größe, Lokalisation und Morphologie des Tumors sowie dem Vorhandensein von intraabdominellem Fett. Vor allem beim Vorliegen von Metastasen im Bereich von wenigen Millimetern stößt die Bildgebung an ihre Grenzen. So lag die von De Bree et al. (2004) ermittelte Sensitivität bei der Detektion einer Peritonealkarzinose mit Hilfe der Computertomographie für Tumorknoten <1cm nur bei 9,1% bzw. 24,3%.

Die Positronenemissionstomographie stellt im Gegensatz zu den morphologischen bildgebenden Verfahren wie MRT und CT ein funktionelles Verfahren dar. Das Glukose-Analogon ^{18}F -FDG, das als Tracer bei PET-Aufnahmen verwendet wird, reichert sich in Tumorzellen an und ermöglicht so deren Detektion. ^{18}F -FDG wird bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen eingesetzt und dient zum Staging und Restaging der Erkrankung, zur Therapieplanung sowie zur Erfassung eines frühen Therapieerfolges (Oriuchi et al., 2006). So konnte in mehreren Studien der zusätzliche Nutzen von ^{18}F -FDG-PET-Aufnahmen auch in Hinblick auf die Detektion einer Peritonealkarzinose ermittelt werden (Turlakow et al., 2003, Tanaka et al., 2002). Driessens et al. (2003) ermittelten eine klar höhere Spezifität des ^{18}F -FDG-PET gegenüber dem CT vor allem bei Patienten mit Rezidiven.

Biolumineszenz Imaging ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, das innerhalb der letzten Dekade entwickelt wurde und im Tierversuch bereits in vielen Studien zum Einsatz kommt (Sadikot et al., 2005). Das Verfahren basiert auf der Detektion von Lichtemissionen, die von Zellen, die zuvor mit dem Gen für Luciferase transfiziert wurden, nach der Zugabe des Substrats Luciferin produziert werden. Die Lichtemissionen werden mit einer CCD-Kamera sichtbar gemacht. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, die Ausbildung und Entwicklung von Tumorwachstum nicht-invasiv zu verfolgen. Vor allem in experimentellen Longitudinalstudien kann die Entwicklung einer Erkrankung visualisiert werden, ohne die Tiere zu bestimmten Zeitpunkten zu obduzieren. Ebenso kann der Erfolg von neuartigen Therapiekonzepten

1. Einleitung

mit dieser schnellen und kostengünstigen Methode sehr anschaulich dargestellt werden (Saur et al., 2005, Jenkins et al., 2003). So konnten Buchhorn et al. (2007) mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging die therapeutische Wirksamkeit eines an einen monoklonalen Antikörper gekoppelten α -Emitters bei Peritonealkarzinose zeigen.

Aufgrund dieser Tatsachen wird es offensichtlich, dass die Positronenemissionstomographie und das Biolumineszenz Imaging vielversprechende Verfahren bei der Detektion einer Peritonealkarzinose im frühen Stadium darstellen.

2. Zielsetzung:

Ziel dieser Studie war die möglichst frühzeitige, nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels Positronenemissionstomographie und Biolumineszenz Imaging sowie der Vergleich der beiden Methoden in Hinblick auf ihre Sensitivität bei der Detektion von Läsionen in Abhängigkeit von ihrer Größe und Lokalisation.

Für diese Studie wurden mit dem Gen für Firefly-Luciferase stabil transfizierte Magenkarzinomzellen (HSC45-M2-luc) intraperitoneal injiziert und somit eine Peritonealkarzinose erzeugt.

Es erfolgten Aufnahmen mit beiden bildgebenden Verfahren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorzellinokulation. Die erhaltenen Aufnahmen wurden von 3 unabhängigen Betrachtern mit den als Standard of Reference geltenden Obduktionsergebnissen evaluiert.

So konnte die Sensitivität beider Verfahren in Abhängigkeit von Größe und Lokalisation der Tumorknoten ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden ebenfalls MRT-Aufnahmen durchgeführt und beurteilt. Hierzu verweise ich auf die Doktorarbeit von Matthias Abenstein.

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, Neustadt Erlangen
Ethanol 70%	Apotheke R. d. Isar
Ether	Chinosol, Seelze
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Genetecin 50 mg/ml	Gibco, U.K.
Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
NaCl-Lösung, 0,9%	Delta-Phama, Pfullingen
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin
Fluor-18-Desoxyglucose	Klinikum r. d. Isar

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, Dänemark
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus, Osterode
Small Animal PET Scanner, MOSAIC	Philips, Niederlande

3.3 Zelllinie

HSC45-M2 Zellen sind Magenkarzinomzellen vom Siegelringtyp. Die Karzinomzelllinie wurde 1993 aus Aszites und Pleuraerguss einer japanischen Patientin, die an einem diffusem Magenkarzinom erkrankt war, isoliert und wird 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 Luciferase Transfizierung

Um mit den HSC45-M2 Zellen Biolumineszenz-Versuche durchführen zu können, mussten diese zuvor stabil mit dem Gen für Firefly Luciferase transfiziert werden. Dieses wurde freundlicherweise von D. Saur, II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, übernommen.

3.3.1.1 Plasmid Konstruktion

Die kodierende Sequenz der Firefly Luciferase (fLuc) wurde durch Hind III und Xba I Verdau aus pGL3-basic (Promega, Mannheim, Deutschland) herausgeschnitten. Es wurden Blunt Enden erzeugt und die Sequenz wurde in die Blunt Xho I site des Plasmids pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Die Integrität der geklonten Sequenz (pcDNA3.1-fluc) wurde durch automatisiertes DANN-

Sequenzieren (GATC, Konstanz, Deutschland) mit Hilfe eines ABI Prism 377 DANN Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bestätigt.

3.3.1.2 Stabile Transfizierung der HSC-Zellen

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

Die Luciferase tranfzierten HSC45-M2 Zellen emittieren nach Zugabe von Luciferin (Abb.1) und unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP, Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm nach der Formel:

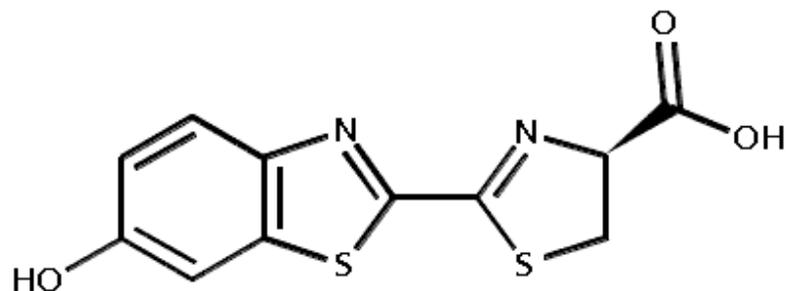
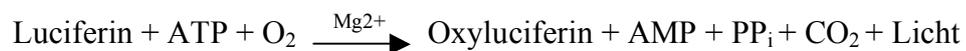


Abb. 1

Strukturformel von D-Luciferin. Die molekulare Formel lautet $C_{11}H_8N_2O_3S_2$. Das molekulare Gewicht beträgt 280.325 g/mol

3.3.2 Kultivierung der Zellen

Die HSC45-M2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²), gefüllt mit 500 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM, 4,5 g/l Glucose), 50 ml FKS (fetales Kälberserum), 5 ml 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 etwa 6 Tagen war der gesamte Boden der Zellkulturflasche mit Zellen besetzt (entspricht ca. 1×10^7 Zellen). Diese Zellen wurden je nach Bedarf auf zwei bis maximal acht neue Zellkulturflaschen aufgesplittet. 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 für 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 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). Anschließend 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, wurden die Zellen bereits zu einem früherem Zeitpunkt gesplittet oder das alte Medium wurde abgesaugt und durch frisches ersetzt.

Wenn die Zellen Versuchstieren injiziert werden sollten, wurden sie anstatt 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.

3.4 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Tierexperimente wurden weibliche NMRI Nacktmäuse verwendet. Die Mäuse wurden aus pathogenfreier Zucht (Charles River, Frankreich) bezogen und besaßen beim Eintreffen ein Alter zwischen 5 und 7 Wochen. Die Versuche mit den Tieren begannen frühestens zwei Wochen nach Einstellung der Tiere.

Die Nacktmäuse zeichnen sich durch Thymushypoplasie und konsequenter Immundefizienz aus. Dabei ist die humorale Immunität reduziert und die zelluläre Immunität fehlt nahezu völlig. Aus diesem Grund sind diese Mäuse kaum in der Lage, humane Tumore abzustößen und eignen sich deshalb besonders gut zur erfolgreichen Etablierung eines Tumormodells. Ein weiterer Vorteil der Nacktmäuse für unsere Studie war, dass diese sich gegenüber Fellmäusen wesentlich besser für Biolumineszenz-Aufnahmen eignen. Bei Fellmäusen kommt es durch die Behaarung zu einer starken Reduktion des Biolumineszenz-Signals, so dass diese vor den Biolumineszenz-Aufnahmen rasiert werden müssen.

Die Mäuse wurden in Käfigen zu je 3-6 Tieren gehalten, in einem auf 26°C temperierten Tierstall mit speziellem Lichtprogramm sowie 50-60% Luftfeuchtigkeit. Als Futter wurde Mäusestandardfutter Altromin 1314 verwendet, zum Trinken erhielten die Mäuse Leitungswasser nach Belieben.

Um eine Infektion der Mäuse zu vermeiden, wurde der Stall mit Einmalkitteln, -handschuhen, -mundschutz, -füßlingen und -OP-Hauben betreten. Alle Arbeitsflächen wurden vor und nach Benutzung mit Ethanol desinfiziert. Die Käfige wurden im Mittel alle 4 Tage ausgetauscht und gereinigt. Die Haltung der Tiere erfolgte nach Richtlinien

des Tierschutzgesetzes. Die Versuche wurden mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern Nr. AZ 2531-35/2006 und AZ 2531-52/2007 durchgeführt.

3.5 Tumormodell

Das Tiermodell sollte der klinischen Problemstellung der peritonealen Tumorzell dissemination möglichst nahe kommen. Weiter sollte es gewährleisten, dass sich eine Vielzahl von Läsionen unterschiedlicher Größe und Lokalisation in den Mäusen entwickeln könne, um eine möglichst aussagekräftige Beurteilung der bildgebenden Verfahren bzgl. ihrer Sensitivität bei der Detektion zu ermöglichen.

3.5.1 Tumorzellinjektion

In Vorstudien hatte sich 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 führte. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde diese Zellzahl für dieses 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 Zellen wurden mit Hilfe eines Zellzählers (CASY, Schärfe Systems) gezählt und auf die jeweils zu injizierende Zellzahl verdünnt. Die Injektion erfolgte in reinem Zellkulturmedium (D-MEN), ohne weitere Zusätze.

Ziel der Injektion war es, eine möglichst homogene Verteilung der Zellen im Bauchraum zu erreichen. Die Zellen wurden in 0,5 ml reinem Medium langsam in die Peritonealhöhle injiziert. Der Einstich erfolgte dabei auf 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.

3.5.2 Versuchsaufbau

Ziel der Studie war die Darstellung der Peritonealkarzinose mittels PET und Biolumineszenz Imaging, 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.

Um eine Beurteilung dieser Fragestellung zu ermöglichen, musste das Tumormodell gewährleisten, dass sich möglichst viele, unterschiedlich große und an verschiedenen Lokalisationen befindliche Tumorzellabsiedelungen ausbilden konnten. Das wurde durch die applizierte Zellzahl, durch die Injektionsweise sowie durch die Bildgebung zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorgenese sichergestellt.

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 werden konnte, um eine objektive Beurteilung der bildgebenden Verfahren zuzulassen.

Ausgehend von diesen Bedingungen wurden 16 Mäuse in zwei Gruppen mit jeweils 8 Tieren aufgeteilt. Bei der ersten Gruppe erfolgten die Aufnahmen mit BLI und PET am Tag 3 nach Tumorzellinokulation, die MRT Aufnahmen (siehe Doktorarbeit von Matthias Abenstein) und die anschließend folgende Obduktion wurden am Tag 4 durchgeführt. Die Aufteilung der Aufnahmen auf zwei Tage verhinderte eine möglicherweise zu hohe Belastung der Mäuse durch die Narkose. Durch diesen zeitlichen Versuchsaufbau war gewährleistet, dass die als Standard of Reference gewählte Obduktion in engstmöglichem zeitlichen Zusammenhang zur Bildgebung stand, um eine objektive Beurteilung zu ermöglichen. Bei der zweiten Gruppe erfolgte die Bildgebung an Tag 6 und 7 nach Tumorzellinokulation, die Obduktion fand ebenfalls anschließend an die letzte Bildgebung statt. Durch diesen Versuchsaufbau war garantiert, dass wir eine große Anzahl an Tumorerläsionen erhielten, die sich sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Lokalisation unterschieden.

3.5.3 Anästhesie

Für die Aufnahmen mit den bildgebenden Verfahren Positronenemissionstomographie und Biolumineszenz Imaging mussten die Mäuse narkotisiert werden. Hierzu wurde ein Gemisch aus 8% Rompun® (2% Xylazinhydrochlorid), 10% Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid) und 82% physiologischer Kochsalzlösung verwendet. Pro Narkose wurden bis zu 250 µl dieses Gemisches intraperitoneal injiziert. In Einzelfällen mussten bei nachlassender Narkose kleine Mengen des Gemisches nachgespritzt werden. Die Wirkung der Narkose trat nach einer bis drei Minuten ein und hielt im Mittel für 25 Minuten an. Die Narkose war nicht antagonisierbar. Ein rasches Auskühlen der Nacktmäuse bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel wurde je nach bildgebendem Verfahren mit einer Wärmekammer, einer Infrarotlampe oder einem körperwarmen Wärmekissen vermindert. Die Augensalbe Vidisic® wurde zum Schutz der Augen vor Austrocknung während der Narkose verwendet.

3.5.4 Tötung

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

Die Sektion erfolgte nach dem unter 3.6 beschriebenen Protokoll. Die toten Tiere wurden ordnungsgemäß und nach den Regeln des Strahlenschutzes entsorgt.

3.6 Obduktion als Standard of Reference

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. Die Obduktion erfolgte bei beiden Gruppen jeweils unmittelbar nach dem letzten bildgebenden Verfahren.

3.6.1 Vorgehensweise bei der Obduktion

Die Mäuse wurden wie unter 3.4.3 beschrieben getötet. Nach der Durchtrennung der Aorta und der daraus folgenden Entblutung der Organe wurde die Bauchdecke unter vorsichtiger Präparation vom Peritoneum gelöst. Die ventrale Seite des Peritoneums wurde auf makroskopisch sichtbare Tumorfunktion untersucht. Anschließend wurde das Peritoneum durchtrennt und der gesamte Bauchraum nach Tumorfunktion durchsucht. Ausgehend von der Leber wurden sämtliche Organe des Bauchraums freipräpariert, mobilisiert und begutachtet. Jede makroskopisch sichtbare Tumorfunktion wurde dokumentiert, mit einer Digitalkamera festgehalten und vermessen.

3.6.2 Einteilung der Tumore nach Lokalisation und Größe

Nach abgeschlossener Obduktion wurden die einzelnen Tumore entsprechend ihrer Größe in Gruppen eingeteilt. Als Bewertungskriterium wurde die maximale Ausdehnung des Tumors in Millimeter herangezogen. Es entstanden 5 Gruppen: Gruppe 1: Tumoren von 1 bis 2 mm, Gruppe 2: Tumoren von 2 bis 4 mm, Gruppe 3: Tumoren von 4 bis 6 mm, Gruppe 4: Tumoren von 6 bis 8 mm und Gruppe 5: Tumoren > 8 mm.

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

Anschließend wurden die Tumore aller Mäuse organspezifischen Gruppen zugeordnet, um den Vergleich in stark lageabhängigen Verfahren, wie dem Biolumineszenz Imaging zu ermöglichen.

3.7 Biolumineszenz Imaging

Als erstes bildgebendes Verfahren wurde in dieser Studie das Biolumineszenz Imaging bezüglich seiner Sensitivität bei der Detektion von Tumorknoten im Bauchraum beurteilt.

Biolumineszenz Imaging ist ein bildgebendes Verfahren, das auf der Detektion von Lichtemissionen basiert und in der experimentellen Forschung immer größere Verwendung findet. Tumorzellen werden speziell mit dem Gen für Luciferase transfiziert und können Versuchstieren inokuliert werden. Nach der Zugabe des Substrates Luciferin produzieren selektiv diese transfizierten Zellen Lichtemissionen, die mit Hilfe einer sehr sensitiven CCD-Kamera detektiert werden können. Somit können zum Beispiel in Longitudinalstudien genaue Aussagen über die Tumorentwicklung getroffen werden.

3.7.1 Versuchsaufbau und Vorbereitungen

Für die Biolumineszenz Aufnahmen wurde eine auf -70°C gekühlte, digitale, schwarz-weiß CCD-Kamera (Hamamatsu ORCA II-ER) mit Bildverstärker-Einheit (Hamamatsu) verwendet. Diese hoch auflösende Kamera (1024×1024 Pixel) bietet über das Spektrum von 350 nm bis 850 nm einen sehr hohen Quantenwirkungsgrad von bis zu 72%, bei sehr geringem Hintergrundrauschen und ist damit für Firefly Luciferase Biolumineszenz Imaging bestens geeignet. Die Kamera ist auf einer Dunkelkammer angebracht, in die die zu untersuchenden Tiere auf einer zuvor festgelegten Einschubhöhe gelegt wurden. Die Dunkelkammer ist mit einer verstellbaren Lichtquelle ausgestattet. Diese Anordnung lässt Aufnahmen bei gedimmtem Licht zu. Die Kamera ermöglicht Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten, die je nach Versuch und Fragestellung variiert werden können. Bei dem Bildverstärker kann zwischen verschiedenen Verstärkungsstufen (gain) gewählt werden. Bei dieser Studie wurde für Aufnahmen mit gedimmtem Licht eine Verstärkung von 500, für Aufnahmen ohne externe Lichtquelle eine Verstärkung von

800 festgelegt. Zur Bildbearbeitung ist die Kamera mit einem Windows-(Microsoft)-Rechner verbunden. Zur Bearbeitung und Auswertung der Aufnahmen wurde die Simple PCI Software (Hamamatsu) verwendet.

Das für die Versuche benötigte D-Luciferin Natriumsalz (Synchem) wurde auf 15 mg/ml in sterilem Wasser gelöst, filtersterilisiert, portioniert, eingefroren und bei -70° C gelagert. Die je nach Versuch benötigte Menge wurde jeweils kurz vor dem Versuch aufgetaut und auf Körpertemperatur erwärmt. Die aufgetaute D-Luciferin Lösung wurde bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert.

3.7.2 Durchführung der Aufnahmen

Um die Sensitivität des Biolumineszenz Imaging bei der Detektion von Tumorknoten beurteilen zu können, wurden je nach Gruppe entweder an Tag 3 oder Tag 6 nach Tumorzellinokulation Aufnahmen der Nacktmäuse durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden dazu unter möglichst sterilen Bedingungen in den Kameraraum gebracht. Für die Aufnahmen wurden die Mäuse einzeln aus dem Käfig entnommen. In eine Insulinspritze wurden 300 µl der D-Luciferin Lösung sowie 200 µl des Rompun-Ketamin-Gemisches aufgezogen und der Maus intraperitoneal injiziert. Daraufhin wurde das Tier in eine Wärmekammer gelegt um eine Auskühlung während der Narkose zu verhindern. Neun Minuten nach Injektion wurde das Tier auf einem Gelkissen gelagert und auf einer festgelegten Einschubhöhe in festgelegter Position in die Dunkelkammer gelegt. Zehn Minuten nach der Injektion des Narkose-Luciferin-Gemisches wurde mit den Biolumineszenz Aufnahmen begonnen. Die Tiere wurden in Rückenlage, sowie in rechter und linker Seitenlage aufgenommen. In jeder dieser Positionen wurde zunächst eine Aufnahme bei gedimmtem Licht und mit einer Belichtungszeit von 0,15 sec gemacht (Abb. 2).

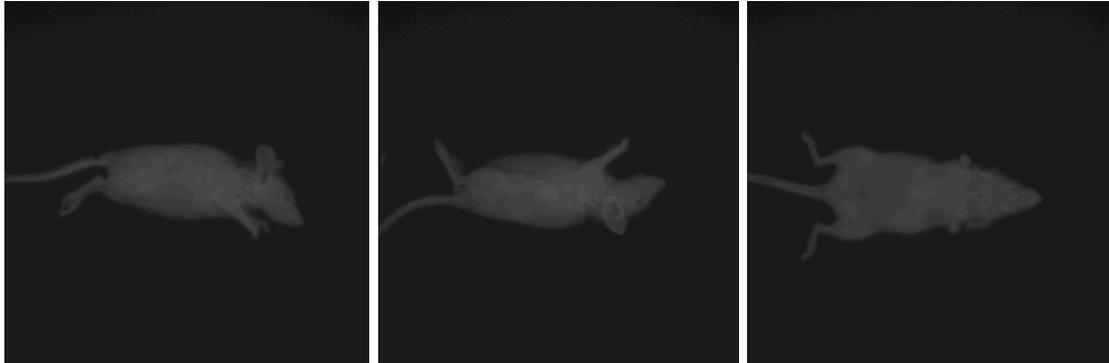


Abb. 2

Von links nach rechts: Fotografische Aufnahmen einer Maus in linker und rechter Seitenlage sowie in Rückenlage bei gedimmtem Licht und einer Belichtungszeit von 0,15 sec. Diese Aufnahmen dienten als Grundlage für die anschließende Überlagerung mit den eigentlichen Biolumineszenz Aufnahmen.

3. Material und Methoden

Direkt im Anschluß an diese erste Aufnahme wurde das Licht in der Dunkelkammer ausgeschaltet und Biolumineszenz Aufnahmen mit Belichtungszeiten von 2 sec und 10 sec durchgeführt. Bei diesen Aufnahmen wurde das Lichtsignal der transfizierten Zellen detektiert.

Abbildung 3 zeigt eine Gegenüberstellung von Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus in Rückenlage, linker und rechter Seitenlage mit Belichtungszeiten von 2 und 10 sec. Man erkennt die Lichtemissionen der transfizierten Tumorzellen als weiße Flecken unterschiedlich starker Intensität. Die unterschiedliche Intensität ist bedingt durch die drei verschiedenen Positionen der Maus, sowie durch Ausdehnung und Lage der Tumore. Die Aufnahmen in der oberen Reihe sind mit einer Belichtungszeit von 2 sec durchgeführt, die der unteren Reihe mit 10 sec. Der Unterschied ist deutlich sichtbar. Mit der längeren Belichtungszeit war es möglich, selbst kleine Tumorknoten zu detektieren. Aus diesen Gründen wurde für diese Studie eine Belichtungszeit von 10 sec als Standard festgesetzt.

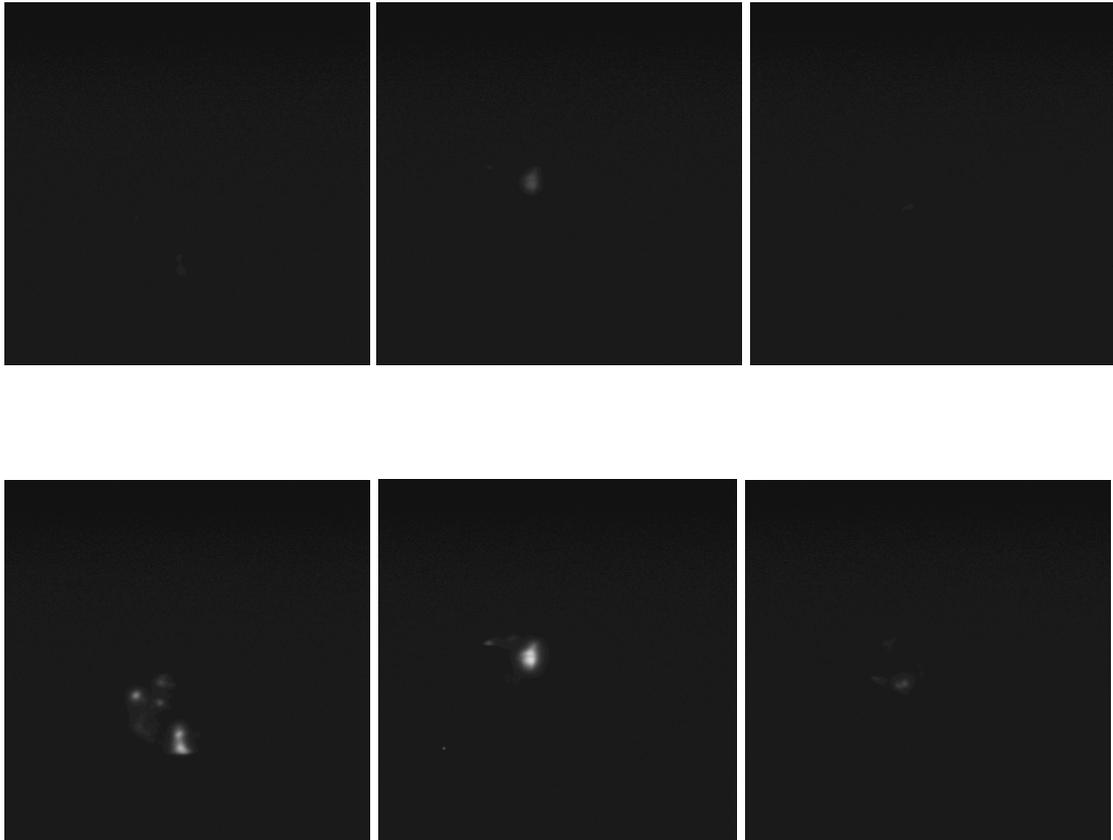


Abb. 3

Oben: Biolumineszenzaufnahmen einer Maus mit einer Belichtungszeit von 2 sec.

Von links nach rechts: Rückenlage, Seitenlage rechts und Seitenlage links

Unten: Biolumineszenzaufnahmen derselben Maus mit einer Belichtungszeit von 10 sec.

Von links nach rechts: Rückenlage, Seitenlage rechts und Seitenlage links.

Bei einer Belichtungszeit von 10 sec konnten selbst kleine Tumorzellabsiedlungen nachgewiesen werden.

Nach Beendigung der Aufnahmen wurden die Tiere in die Wärmekammer gelegt, bis sie sich vollständig von der Narkose erholt hatten. Danach wurden sie in ihren Käfig gesetzt und nach Beendigung des Versuchs wieder in ihren Stall gebracht.

3.7.3 Bildbearbeitung

Nach Beendigung der Aufnahmen wurden die erhaltenen Bilder bearbeitet. Die Bearbeitung der Aufnahmen trägt wesentlich zur Veranschaulichung des Tumorbefalls bei.

Zur Bearbeitung wurden mit Hilfe der Hamamatsu Simple PCI Software die bei gedimmtem Licht aufgenommenen Bilder mit der zugehörigen Biolumineszenz Aufnahme überlagert, so dass das Biolumineszenz Signal exakt lokalisiert auf dem Körper der Maus sichtbar ist. Dadurch können unter Berücksichtigung der Aufnahmen in verschiedenen Positionen dieser Maus bereits Aussagen über den Tumorbefall getroffen werden. Um die Lichtintensität besser zu veranschaulichen und damit auch Informationen über die vertikale Tumordicke, beziehungsweise über die Tumordichte erhalten zu können, wurden die Bilder mit Hilfe der Hamamatsu Simple PCI Software in Pseudocolors umgewandelt (Abb. 4). Bereiche mit sehr hoher Lichtintensität, also sehr vielen Tumorzellen, 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.

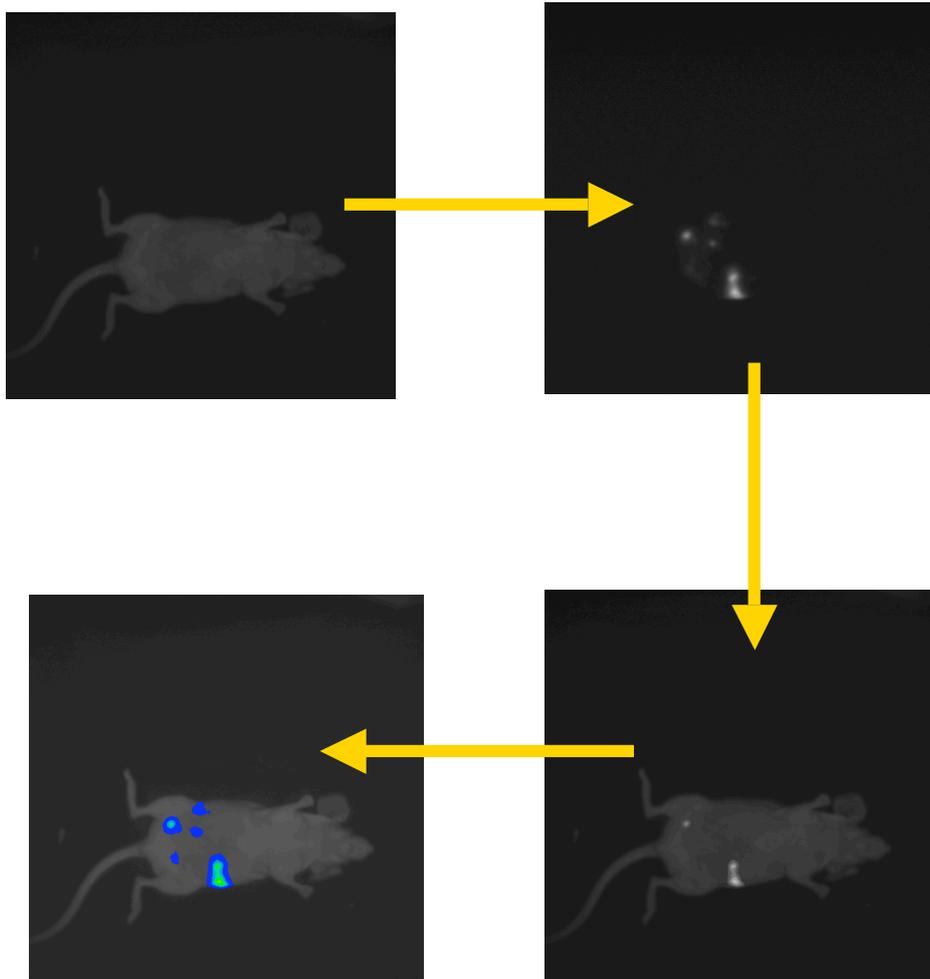


Abb. 4

Überlagerung des photographischen Bildes einer Maus (oben links) mit der dazugehörigen Biolumineszenz-Aufnahme (oben rechts). Das entstandene Bild (unten rechts) wird weiterverarbeitet und das Biolumineszenz-Signal je nach Intensität in Pseudocolors umgewandelt (unten links).

3.7.4 Bildbeurteilung

In dieser Studie wurde ein Protokoll mit 10 sec Belichtungszeit und einer Bildverstärkung (gain) von 800 für sämtliche Aufnahmen festgelegt. Die Aufnahmen in Rückenlage, sowie in rechter und linker Seitenlage jeder Maus wurden sowohl im unbearbeiteten als auch im bearbeiteten Zustand von 3 Betrachtern unabhängig voneinander, ohne Kenntnis des Obduktionsergebnisses bewertet. Die von den Betrachtern als eindeutige Tumorknoten gewerteten Lokalisationen wurden als potentiell positive Detektion vermerkt und später mit den Ergebnissen der Obduktion verglichen. Durch den Vergleich des fotografisch festgehaltenen Situs sowie genauer Dokumentation der Obduktion war es in allen Fällen möglich, den als positiv gewerteten Lichtintensitäten die entsprechenden Tumorknoten zuzuordnen.

3.7.5 Versuch der Quantifizierung

Um zusätzlich zur qualitativen Evaluierung der Detektionsmöglichkeit des Biolumineszenz Imaging weitere Rückschlüsse auf die Sensitivität und die Korrelation zwischen Signalintensitäten und den bei der Obduktion gefundenen Tumoren ziehen zu können, wurden mehrere Versuche der Quantifizierung durchgeführt.

Dazu wurde die mittlere Lichtintensität („mean grey level intensity“) des Biolumineszenzsignals in ROIs („Region of Interest“) über den Mäusen mit Hilfe der Hamamatu Simple PCI Software gemessen.

Ziel dieses Auswertungsansatzes war die Prüfung der Korrelation zwischen den beim Biolumineszenz Imaging gemessenen Lichtintensitäten und den bei der Obduktion tatsächlich gemessenen Tumorgrößen bzw. Tumolvolumen. Es ist hinreichend bekannt, dass das gemessene Signal stark von der Lage des Tumors bzw. von den darüber liegenden, das Signal potenziell abschwächenden oder fast vollständig auslöschenden Geweben abhängt (Blasberg, 2003). Werden Tumore von dichten Organen wie z.B. der Leber verdeckt, führt dies vor allem bei kleineren Tumorknoten zur völligen Auslöschung des Signals.

3. Material und Methoden

Deshalb wurden in dieser Studie zwei sehr typische, häufig auftretende Tumorlokalisationen ausgewählt, die jeweils miteinander verglichen werden konnten.

Als erste häufig auftretende Lokalisation wurde die Region um Pankreas und Magen gewählt. Ein Tumor in dieser Region trat bei fast allen Mäusen auf und konnte somit aufgrund der sehr hohen Anzahl von Tumoren und der immer ähnlichen Lokalisation und Tiefe im Bauchraum gut miteinander verglichen werden. Eine als Standard festgelegte Region of Interest wurde so gewählt, dass diese ROI bei jeder Maus den Tumor in der Pankreas-Magen-Region vollständig einschloss. Form und Größe der ROI wurde gespeichert, um sicherzustellen, dass immer dieselbe ROI verwendet wurde. Diese Standard-Pankreas-ROI wurde nun über den Tumor jeder Maus gelegt und die mittlere Lichtintensität gemessen. Anschließend wurde eine exakt gleich große ROI in den Hintergrund des Bildes außerhalb der Maus gelegt, um die mittlere Lichtintensität des Hintergrundes zu messen (Abb. 5).

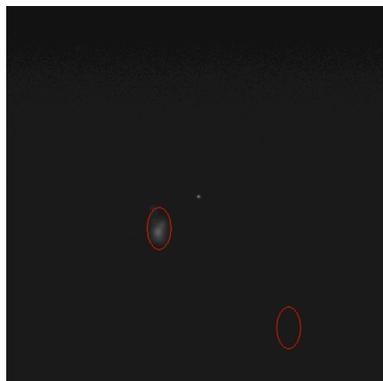


Abb. 5

*Plazierung der Standard-ROI über dem Tumor in den unbearbeiteten Aufnahmen.
Plazierung einer weiteren, exakt gleich großen ROI im Bildhintergrund der Aufnahme
zur Messung der Lichtintensität des Hintergrundes.*

Zur Auswertung wurde die mittlere Lichtintensität des Hintergrundes von der mittleren Lichtintensität des Tumors subtrahiert, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Diese Ergebnisse wurden ins Verhältnis zu den in der Obduktion gefundenen Tumorgrößen gesetzt.

Als zweite, häufig auftretende Lokalisation wurden Tumorknoten im Bereich der Dünn- und Dickdarmschlingen sowie am Mesenterium anhaftende Tumore gewählt.

Identisch zum Vorgehen bei der Pankreas-ROI wurde eine Standard-ROI festgelegt, die über jeden sich an oben beschriebenen Lokalisationen befindenden Tumor gelegt wurde. Es wurde ebenfalls die mittlere Lichtintensität gemessen, sowie eine exakt gleich große ROI zur Ermittlung der mittleren Lichtintensität des Hintergrundes in den Hintergrund des Bildes gelegt. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls ins Verhältnis zu den in der Obduktion gefundenen Tumorgrößen gesetzt.

3.8 Positronen-Emissions-Tomographie

Als weiteres bildgebendes Verfahren wurde in dieser Studie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bezüglich ihrer Sensitivität bei der Detektion von Tumorerkrankungen im Bauchraum beurteilt. Durch die Verwendung von spezifischen, radioaktiv-markierten Substanzen ermöglicht die PET die in-vivo Darstellung von Stoffwechselfvorgängen sowie biologischen Gewebeeigenschaften.

3.8.1 Prinzip der Positronen-Emissions Tomographie

Positronen entstehen beim radioaktiven β^+ -Zerfall von Atomkernen. Dabei handelt es sich um den Zerfall eines Protons in ein Neutron, ein Positron und ein Neutrino. Nach dem Zerfall kollidiert das Positron mit umliegenden Elektronen und verliert an Geschwindigkeit. Nach Abgabe der kinetischen Energie vereinigt sich das Positron mit einem Elektron. Die Ruhemasse beider Teilchen wird in Gammastrahlung umgewandelt. Es entstehen zwei Photonen, die nach der Einsteinschen Beziehung

$E=mc^2$ je 511 keV besitzen und die unter einem Winkel von fast genau 180° ausgestrahlt werden. Diese Gammastrahlung wird bei der PET mit einem Detektorringssystem, in dem jeweils zwei gegenüber angeordnete Detektoren in Koinzidenz geschaltet sind, nachgewiesen. Somit kann der Entstehungsort der beiden Photonen bestimmt werden. Dies ist möglich, da die Gammaquanten nur dann weiterverarbeitet werden, wenn sie zur exakt gleichen Zeit (zeitliche Koinzidenz) an zwei genau entgegengesetzten Strahlungsdetektoren auftreffen (elektronische Kollimation). Die Empfindlichkeit einer PET-Kamera ist etwa um den Faktor 100 höher als die einer kollimierten Gamma-Kamera (Ostertag, 1989, Links, 1998).

3.8.2 ^{18}F -Fluordesoxyglukose

Als Positronenstrahler werden für die Markierung von Radiopharmazeutika vorwiegend die kurzlebigen Nuklide ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O sowie ^{18}F verwendet. Das in der PET-Tumordiagnostik weltweit am häufigsten eingesetzte Radiopharmakon, das auch in dieser Studie verwendet wurde, ist ^{18}F -Fluordesoxyglucose. Die Markierung des Zuckermoleküls Desoxyglucose erfolgt dabei mit dem Positronen-emittierenden Radionuklid ^{18}F , das eine Halbwertszeit von 109.8 Minuten aufweist (Czech, 2000).

Die Verteilung von ^{18}F -FDG im Körper erlaubt Rückschlüsse auf den Glukosestoffwechsel verschiedener Gewebe. Bereits vor über 70 Jahren beschrieb Warburg ansteigende Glycolyseraten im Vergleich zu gesundem Gewebe in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad des Tumors (Warburg, 1930). Warburgs Theorie besagt, dass Tumorzellen Glucose auch unter aeroben Bedingungen anaerob zu Laktat verstoffwechseln ("Warburg-Effekt"). Diese Besonderheit des Stoffwechsels von Tumorzellen spielt heute eine große Rolle in der klinischen Diagnostik maligner Tumore und ist Grundlage der Positronen-Emissionstomographie.

Mit ^{18}F -FDG ist es gelungen, ein radioaktives Glukose-Analogon für den Einsatz im Rahmen der PET herzustellen. Somit ist eine regionale Quantifizierung der

Glukoseutilisation *in vivo* und die Erfassung des Glukosestoffwechsels von Tumorzellen möglich.

Das Glukoseanalogon ^{18}F -FDG wird über das gleiche Transportsystem wie Glukose in die Zelle aufgenommen und mittels des Enzyms Hexokinase zu FDG-6-Phosphat phosphoryliert. Da FDG-6-Phosphat kein passendes Substrat für die Glukose-6-Isomerase darstellt, ist der weitere Abbau von FDG-6-Phosphat blockiert und es kann im Rahmen der Glykolyse oder Glykogensynthese nicht weiter verstoffwechselt werden. Die einzige Möglichkeit besteht in der Dephosphorylierung von FDG-6-Phosphat in FDG, doch die Aktivität des hierfür benötigten Enzyms Glukose-6-Phosphatase ist in den meisten Geweben bis auf Leber, Niere, Darm und Muskel sehr gering (Fischmann et al., 1993, Hughes, 1996, Kuwabara, 1991). Zudem kann FDG-6-Phosphat als stark polares Molekül die Zellmembran nicht mehr penetrieren (Fischmann et al., 1993) und bleibt folglich in der Zelle gefangen. Dieser Vorgang wird als 'metabolic trapping' bezeichnet. Die Glucoseaufnahme von Tumorzellen ist oft um mehr als das zehnfache gegenüber dem Normalgewebe gesteigert. Diese gesteigerte Aufnahme liegt einerseits an der erhöhten Dichte und Aktivität der GLUT-Transportproteinen (Wahl, 1996), andererseits an der gesteigerten Aktivität der Hexokinase (Hughes, 1996). Dieser erhöhte Glucosestoffwechsel in Tumoren führt zu einer vermehrten Aufnahme und einem konsekutiven Trapping von ^{18}F -FDG in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen. Damit eignet sich ^{18}F -FDG prinzipiell zur Frühdiagnostik, Stadieneinteilung und Therapiekontrolle von malignen Tumoren (Delbeke, 1999, Weber 1999).

3.8.3 Versuchsaufbau und Vorbereitungen

Die PET-Aufnahmen erfolgten mit dem Philips MOSAIC small animal PET scanner (Abb. 6). Das System basiert auf 14456 GSO Kristallen mit den Maßen $2 \times 2 \times 10 \text{ mm}^3$, die in 52 Ringen mit jeweils 278 Kristallen angeordnet sind. Der Öffnung des Ringes beträgt 19,7 cm, das axiale field of view 12 cm, das transverse field of view 12,8 cm.

3. Material und Methoden

Das Koinzidenzfenster beträgt 12 ns und das Standardenergiefenster liegt zwischen 410 und 665 keV. Die räumliche Auflösung des PET-scanners beträgt 2,5 mm. Für weitere technische Daten wird auf die Veröffentlichung von Huisman et al. (2007) verwiesen.

Das benötigte ^{18}F -FDG erhielten wir aus dem hauseigenen Zyklotron des Klinikums rechts der Isar.



Abb. 6

Photo des MOSAIC Small Animal Pet Scanner von Philips

3.8.4 PET-Protokoll

Die PET- Aufnahmen erfolgten je nach Gruppe der Mäuse entweder an Tag 3 oder an Tag 6 nach Tumorzellinokulation. Die Mäuse wurden zur Durchführung der Aufnahmen in ihrem Käfig in den Raum des PET-Scanners gebracht.

Jeder Maus wurden 13 MBq ^{18}F -FDG intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Mäuse wieder in ihre Käfige gesetzt. Aus dynamischen Vorversuchen war bekannt, dass 3 Stunden nach Injektion des ^{18}F -FDG aufgrund eines guten Tumor-Hintergrund-Verhältnisses der bestmögliche Zeitpunkt für die Aufnahmen war. Dies ermöglichte die beste Beurteilung der Bilder.

Etwa 10 Minuten vor Aufnahmebeginn wurde den Mäusen 200 μl des Rompun-Ketamin-Gemisches intraperitoneal injiziert. Während der Narkose wurden die Tiere mit einer Infrarot-Lampe vor Auskühlung geschützt. Da ^{18}F -FDG über die Blase ausgeschieden wird, wurde die Blase der Mäuse nach dem Einsetzen der Narkose kurz vor den Aufnahmen mit Hilfe eines Venenverweilkatheters (BD Vasculon™ Plus, 26 GA) katheterisiert. So konnte der noch in der Blase verbliebene Restharn abfließen. Dieses Vorgehen verhinderte eine Fehlinterpretation der PET-Aufnahmen. Die Fixierung der Mäuse erfolgte in Bauchlage auf einem dünnen Kissen mit ausgestreckten Extremitäten, um etwaige Artefakte durch Bewegungen der Mäuse zu verhindern. Sobald die Aufnahmen beendet waren, wurden die Tiere auf ein Wärmekissen gebettet und wieder in ihren Stall gesetzt.

Die Scanzeit betrug 15 Minuten, die Aufnahmen wurde mit Hilfe eines 3-dimensionalen iterative reconstruction algorithm (3D-Ramla) rekonstruiert. Es wurden 4 Iterationen durchgeführt. Die Pixelgröße betrug 1 mm \times 1 mm \times 1 mm in einer 128 \times 128 \times 120 Matrix, die räumliche Auflösung lag bei \sim 2,5 mm.

3.8.5 Bildbeurteilung

Ziel dieser Studie war die Beurteilung der Sensivität der Detektion von Tumorerkrankungen nach der intraperitonealen Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-Zellen. Die PET-Aufnahmen wurden ebenfalls von drei Betrachtern unabhängig voneinander und ohne Kenntnis der Obduktionsergebnisse beurteilt. Jede Aufnahme wurde hinsichtlich möglicher Tumorerkrankungen sorgfältig begutachtet, um die diagnostische Genauigkeit des FDG-PET mit der diagnostischen Genauigkeit der anderen bildgebenden Verfahren zu vergleichen. Bei Übereinstimmung der drei Betrachter bzgl. einer potentiell positiven Läsion wurde diese als positiv dokumentiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Obduktion als Standard of Reference korreliert und als richtig positiv, falsch positiv oder falsch negativ dokumentiert.

Abbildung 7 zeigt PET-Aufnahmen einer physiologischen ^{18}F -FDG-Verteilung mit dem in dieser Studie verwendeten PET-Protokoll.

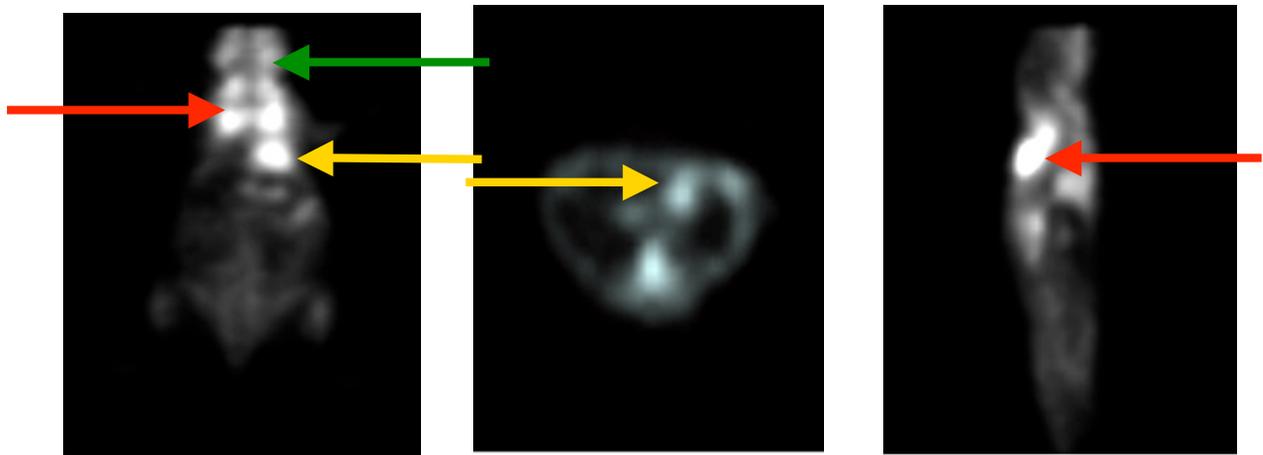


Abb. 7

Exemplarische PET-Aufnahmen der physiologischen ^{18}F -FDG-Verteilung in einer gesunden Maus. Von links nach rechts: Koronare Ansicht, transversale Ansicht und sagittale Ansicht. Man erkennt die für ^{18}F -FDG typische Mehraufnahme des Tracers in Herz (gelber Pfeil), braunem Fettgewebe (roter Pfeil) und Gehirn (grüner Pfeil).

3.8.6 Quantitative Bildanalyse

Die quantitative Bildanalyse wurde mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogrammes AMIDE (Loening et al., 2003) durchgeführt. Regions of Interest wurden manuell über die Tumor-Region gelegt, und sämtliche Voxel, deren Wert über 40% des Maximums innerhalb dieser ROI lagen, wurden für die Berechnung verwendet (Abb. 8). Um interindividuelle Unterschiede in der ^{18}F -FDG Biodistribution auszugleichen, wurde eine weitere ROI in eine nicht-pathologische, tumorfreie Abdominalregion gelegt. Der Uptake dieser Hintergrund-ROI wurde über die gesamte ROI gemittelt. Der ^{18}F -FDG-Tumor-Uptake wurde als das Verhältnis der mittleren Aktivität des Tumors geteilt durch die mittlere Aktivität der tumorfreien Abdominalregion angegeben.

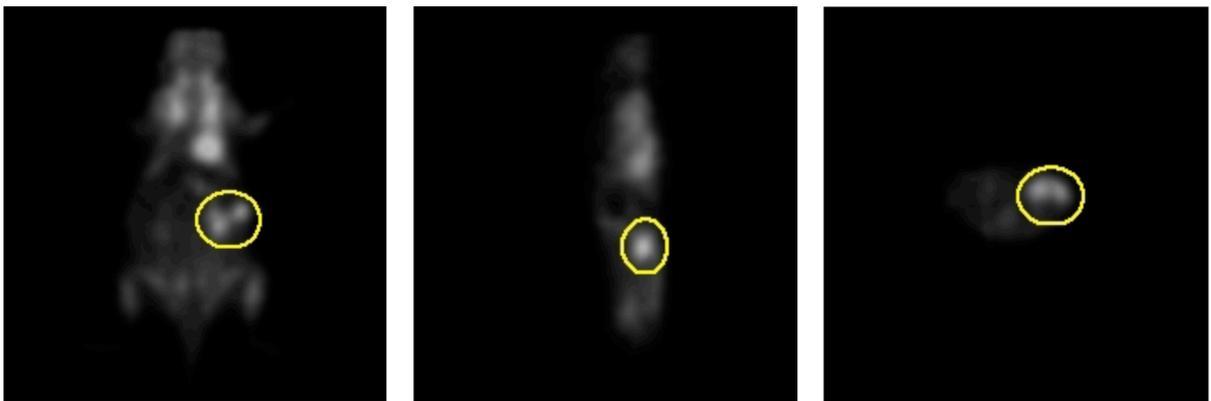


Abb. 8

PET-Aufnahmen einer Maus. Von links nach rechts: Koronare Ansicht, sagittale Ansicht und transversale Ansicht

Mit dem Datenverarbeitungsprogramm AMIDE wurde eine dreidimensionale ROI (Kreis) über den Tumor gelegt und deren Tumouruptake bestimmt.

3.9 Vergleich der Bildgebenden Verfahren BLI, PET und MRT

Ziel dieser Studie war die Ermittlung der Sensitivität von Biolumineszenz Imaging und PET bei der Detektion von Tumorknoten im Millimeterbereich im Bauchraum von Mäusen. Zeitgleich fanden im Rahmen dieser Studie zusätzlich MRT-Aufnahmen an den gleichen Mäusen statt, so dass ein Vergleich aller drei bildgebenden Verfahren möglich wurde. Zur Methodik und Vorgehensweise der MRT-Aufnahmen verweise ich auf die Doktorarbeit von Matthias Abenstein.

Die bei der Obduktion gefundenen Tumore wurden entsprechend ihrer Lokalisation aufgeschlüsselt und mit der Auswertung aller 3 Verfahren verglichen. So konnte die Sensitivität der einzelnen Verfahren in Abhängigkeit der Lage der Tumore ermittelt werden. Weiter wurden die Tumore, wie bereits in 3.6.2 beschrieben, entsprechend ihrer Größe eingeteilt und wiederum mit den Ergebnissen der bildgebenden Verfahren verglichen. So konnten zusätzlich Aussagen über die Größenabhängigkeit bei der Detektion getroffen werden.

3.10 Exemplarische Fusion von MRT- und PET Aufnahmen

Die computer-basierte Fusion der MRT- und PET-Aufnahmen wurde mit Hilfe freier Software [ITK] realisiert. Die Implementierung wurde freundlicherweise vom Lehrstuhl für Informatikanwendungen in der Medizin an der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Die automatische Registrierung basiert auf einem Intensitäts-basierten Ansatz, bei dem eine Ähnlichkeitsfunktion über die Eingabebilder ausgewertet und optimiert wird. Dadurch wird eine bestmögliche Überlagerung der beiden Modalitäten errechnet.

Durch diese Überlagerung war eine genaue Zuordnung der fokalen Mehranreicherungen im FDG-PET zu anatomischen Strukturen im MRT möglich. Diese Bildfusion wurde an den Aufnahmen von 2 Mäusen durchgeführt (Hajnal et al., 2001).

4. Ergebnisse

4.1 Obduktionsergebnisse

16 NMRI Nacktmäusen wurden jeweils 1×10^7 HSC45-M2 Zellen intraperitoneal injiziert. Wie in Material und Methoden beschrieben, erfolgte die Obduktion der Tiere je nach Gruppe entweder an Tag 4 oder an Tag 7 nach Tumorzellinokulation unmittelbar anschließend an das letzte bildgebende Verfahren und diente als Standard of Reference für die Beurteilung der bildgebenden Verfahren.

15 Tiere gingen in die Statistik der Beurteilung ein, da ein Tier kurz nach Tumorzellinokulation verstarb. Bei allen Tieren konnte bei Obduktion die Ausbildung einer Peritonealkarzinose beobachtet werden. Durch den Zeitpunkt der Obduktion war gewährleistet, dass sich Tumorknoten in unterschiedlicher Lage und in unterschiedlichen Größen ausbildeten. Die Ausbildung der Peritonealkarzinose zeigte bei allen Tieren ein ähnliches Muster mit typischer Organbeteiligung. So fand sich bei jedem Tier eine parapankreatische Läsion und auch die Leber war überproportional häufig betroffen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht aller bei der Obduktion gefundener Tumorknoten.

4. Ergebnisse

Tabelle 1: Anzahl, Lokalisation, Abmessungen, Volumen der Läsionen bei Obduktion

Anzahl	Lokalisation	Abmessung in mm	Volumen in mm³
8	Einstichstelle	1×1×0,5 – 3×3×2	0,3 - 9
2	Peritoneum Höhe Proc. Xiphoideus	1,5 d - 2×1×5	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
21	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
82	Gesamt	1×1×0,5 - 8×2×2	0,3 - 16

4.2 Sensitivität der Detektion von BLI und PET in Abhängigkeit der Lage

Die Biolumineszenz Aufnahmen wurden je nach Gruppe entweder an Tag 3 oder an Tag 6 nach Tumorzellinokulation durchgeführt. Für diese Studie wurde ein Protokoll mit einer Belichtungszeit von 10 sec und einer Bildverstärkung (gain) von 800 festgelegt. Bei allen Mäusen konnte die Entwicklung einer Peritonealkarzinose mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging beobachtet werden.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Detektierbarkeit aller bei der Obduktion gefundener Tumore, abhängig von ihrer Lage, mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging.

4. Ergebnisse

Tabelle 2: Anzahl, Lokalisation, Abmessungen, Volumen der Läsionen bei Obduktion sowie Sensitivität der Detektion im BLI

Anzahl	Lokalisation	Abmessung in mm	Volumen in mm³	Sensitivität im BLI
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

PET-Aufnahmen wurden je nach Gruppe entweder an Tag 3 oder an Tag 6 nach Tumorzellinokulation durchgeführt. 14 Mäuse gingen in die Statistik der Beurteilung ein, da sich die PET-Aufnahmen bei einer Maus als nicht auswertbar herausstellten.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden die Aufnahmen von drei Betrachtern unabhängig voneinander und ohne Kenntnis der Obduktion ausgewertet.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Detektierbarkeit aller bei der Obduktion gefundenen Tumore mit Hilfe der PET, abhängig von ihrer Lage.

4. Ergebnisse

Tabelle 3: Anzahl, Lokalisation, Abmessungen, Volumen der Läsionen bei Obduktion sowie Sensitivität der Detektion im PET

Anzahl	Lokalisation	Abmessung in mm	Volumen in mm³	Sensitivität im PET
8	Einstichstelle	1×1×0,5 - 3×3×2	0,3 - 9	5/8 = 63%
2	Peritoneum (Innenseite) Höhe Proc. Xiphoideus	1,5 d - 2×1×0,5	1 - 1,8	1/2 = 50%
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% 1/1 = 100%
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	10/11 = 91% 1/1 = 100% 0/1 = 0%
1	Magen Mageneingang, Cardiaregion	1d	0,5	1/1 = 100%
1	Duodenum	2×2×1,5	3	1/1 = 100%
19	Jejunum am Jejunum und d. Mesenterium	1d - 5×2×2	0,5 - 10	16/19 = 84%
5	Colon	1d - 6×2×1	0,5 - 6	4/5 = 80%
18	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	11/12 = 92% 2/4 = 50% 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	1/2 = 50%
78	Gesamt	1×1×0,5 - 8×2×2	0,3 - 16	58/78 = 74%

4. Ergebnisse

Bei 8 Tieren zeigten sich bei Obduktion weißliche, solide, meist flächige Tumorzellansammlungen sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite des Peritoneums im Bereich der Einstichstelle der Tumorzellinokulation in unterschiedlicher Ausdehnung. Der kleinste Tumor stellte mit einer Ausdehnung von 0,5mm × 0,5mm × 0,2mm einen sehr dünnen, eher flächigen Bewuchs mit Tumorzellen dar, während der größte Tumor mit der Ausdehnung von 3mm × 3mm × 2mm einen soliden Tumorknoten darstellte. Die Ausbildung dieser Tumorknoten lassen sich dadurch erklären, dass beim Zurückziehen der Nadel bei der Tumorzellinokulation Tumorzellen am Peritoneum haften blieben und sich dort schnell zu einer soliden Tumorzellabsiedelung entwickeln konnten.

Alle diese Läsionen, die sich an der Außen- und Innenseite des Peritoneums im Bereich der Einstichstelle der Tumorzellinokulation entwickelten, konnten im Biolumineszenz Imaging detektiert werden. Aufgrund der sehr oberflächigen Lage dieser Tumore und der dadurch bedingten nur minimalen Abschwächung des Biolumineszenz Signales war es möglich, selbst sehr kleine, flächige Tumorzellablagerungen sicher zu detektieren und gut darzustellen.

In den PET-Aufnahmen konnten von diesen 8 Tumoren, die sich an der Außen- und Innenseite des Peritoneums im Bereich der Einstichstelle entwickelt hatten, 5 Tumore sicher detektiert werden. Die kleinsten detektierten Tumore besaßen Abmessungen von 1mm Durchmesser bei kugeliger Gestalt, die größten detektierten Tumoren besaßen eine Ausdehnung von 3mm × 3mm × 2mm. Die nichtdetektierten Tumore besaßen Abmessungen von 1mm im Durchmesser, 1mm × 1mm × 0,5mm bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm.

Abbildung 9 zeigt einen exemplarischen Tumorknoten an der Außenseite des Peritoneums am Obduktionsitus sowie dessen Darstellung im Biolumineszenz Imaging und PET.

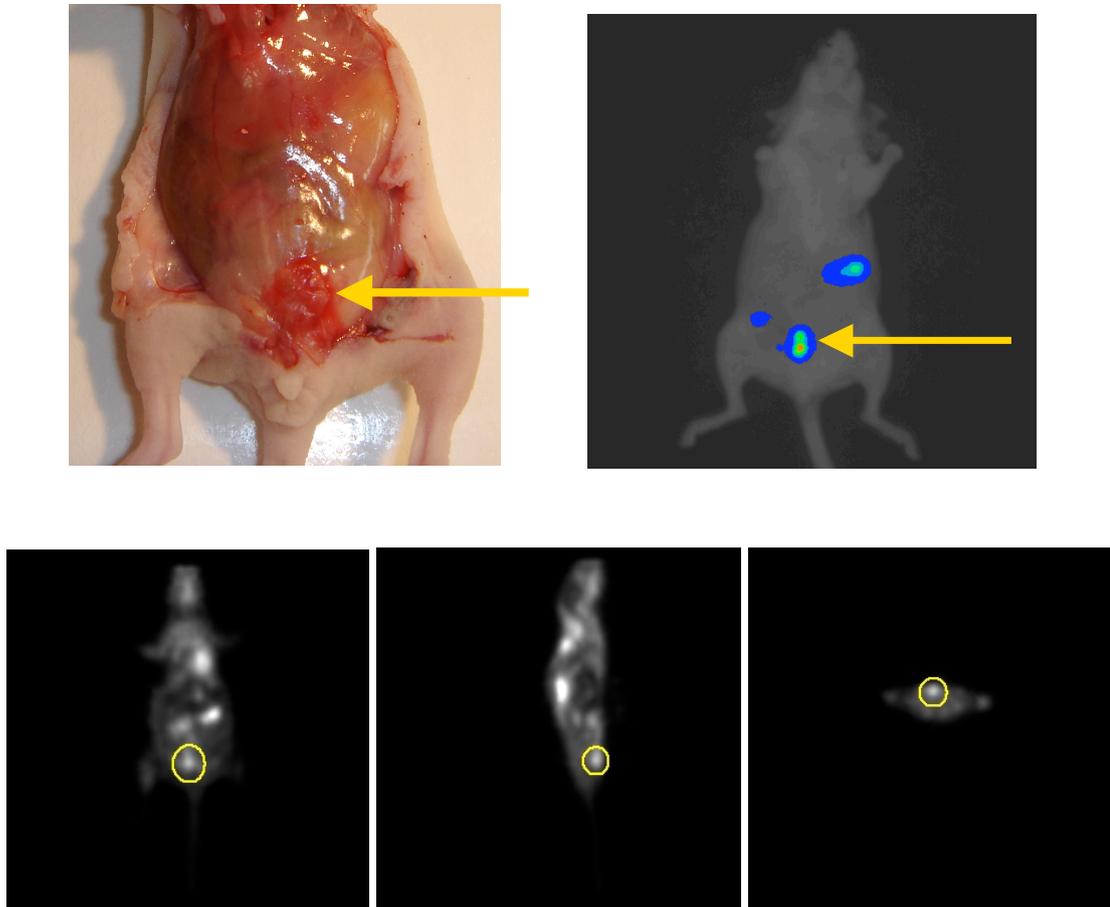


Abb. 9

Oben links: Obduktionssitus einer Maus mit eröffneter Bauchdecke. Die Tumorzellabsiedelung an der Außenseite des Peritoneums ist gut erkennbar (Pfeil). Oben rechts: Biolumineszenz Aufnahme dieser Maus. Die hohe Lichtintensität des sehr oberflächigen Tumors ist gut sichtbar (Pfeil). Unten (von links nach rechts): PET-Aufnahmen dieser Maus (koronare, sagittale und transversale Ansicht) . Der Tumor stellt sich als starke, fokale FDG-Anreicherung dar (Kreis).

4. Ergebnisse

Bei zwei Tieren wurde bei der Obduktion je eine Tumorkläsion an der Innenseite des Peritoneums auf der H6he des Proc. Xiphoideus gefunden. Sie besaßen eine Abmessung von 1,5mm im Durchmesser bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm.

Mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging konnten diese beiden Tumore detektiert werden. Trotz der geringen Ausmaße waren die Kläsionen gut darstellbar.

Im PET konnte einer (1,5mm Durchmesser) dieser zwei Tumoren dargestellt werden.

Im Bereich des Zwerchfells wurden bei Obduktion insgesamt 7 Tumorkläsionen entdeckt. Als typische Lokalisation im Bereich des Diaphragmas wurde bei 6 Tieren eine streifenf6rmige Tumorzellabsiedelung am Lig. Falciforme zwischen Diaphragma und Leber in der Gr6ßenordnung von 1,5mm × 0,5mm × 0,5mm gefunden. Eine weitere Kläsion war mit der Leber verwachsen und besaß einen Durchmesser von 1,5 mm.

Im Biolumineszenz Imaging konnte keiner der 7 Tumore detektiert werden. Die geringe Gr6ße bzw. die kleinen Zellzahlen dieser Kläsionen sowie vor allem die Abschirmung des Biolumineszenz Signals durch die ventral des Tumors liegenden Strukturen sind die Ursachen f6ur die Nicht-Detektierbarkeit.

Im PET konnte eine von 7 Kläsionen detektiert werden. Es handelte sich hierbei um die gr6ßte Kläsion (1,8 mm³). Kläsionen, die sich am Lig. Falciforme gebildet hatten (n=6), konnten nicht detektiert werden. Sämtliche Tumore am Lig. Falciforme waren klein und besaßen ein geringes Volumen (0,1mm³ - 0,8 mm³).

Im Bereich der Leber wurden insgesamt 13 Tumorknoten gefunden. Die typische Lokalisation stellte der Lobus caudatus dar, auf dem bei 11 Tieren stippchenartige Kläsionen gefunden wurden. Die Kläsionen besaßen meist punktf6rmige Gestalt mit 1-2mm Durchmesser. In einem Fall konnte eine 3mm × 2mm × 1mm gr6ße Metastase festgestellt werden. Jeweils ein weiterer Tumor konnte im Bereich des Hilus bzw. an der Gallenblase gefunden werden.

Im Biolumineszenz Imaging konnte von diesen 13 Tumoren nur ein Tumor detektiert werden. Sämtliche Tumore wurden durch den linken und den medialen Leberlappen

4. Ergebnisse

verdeckt, was größtenteils zur völligen Auslöschung des Biolumineszenz Signals führte. Der detektierbare Knoten besaß eine Ausdehnung von 3mm × 1,5mm × 1mm.

Im PET konnten von 13 Tumoren im Bereich der Leber 11 detektiert werden. Von den 11 Tumoren auf dem Lobus caudatus konnten 10 im PET detektiert werden. Da die Leber verhältnismäßig wenig FDG anreichert, ließen sich auch kleine Tumore darstellen. Der Tumor am Leberhilus (2mm × 2mm × 1,5mm) konnte detektiert werden. Der Tumor an den Gallenblase (1,5mm Durchmesser) konnte nicht dargestellt werden.

Abbildung 10 zeigt das typische Bild einer Läsion am Lobus Caudatus sowie dessen Darstellung im PET. Im Biolumineszenz Imaging war dieser Knoten aufgrund der Auslöschung durch den linken Leberlappen nicht darstellbar.

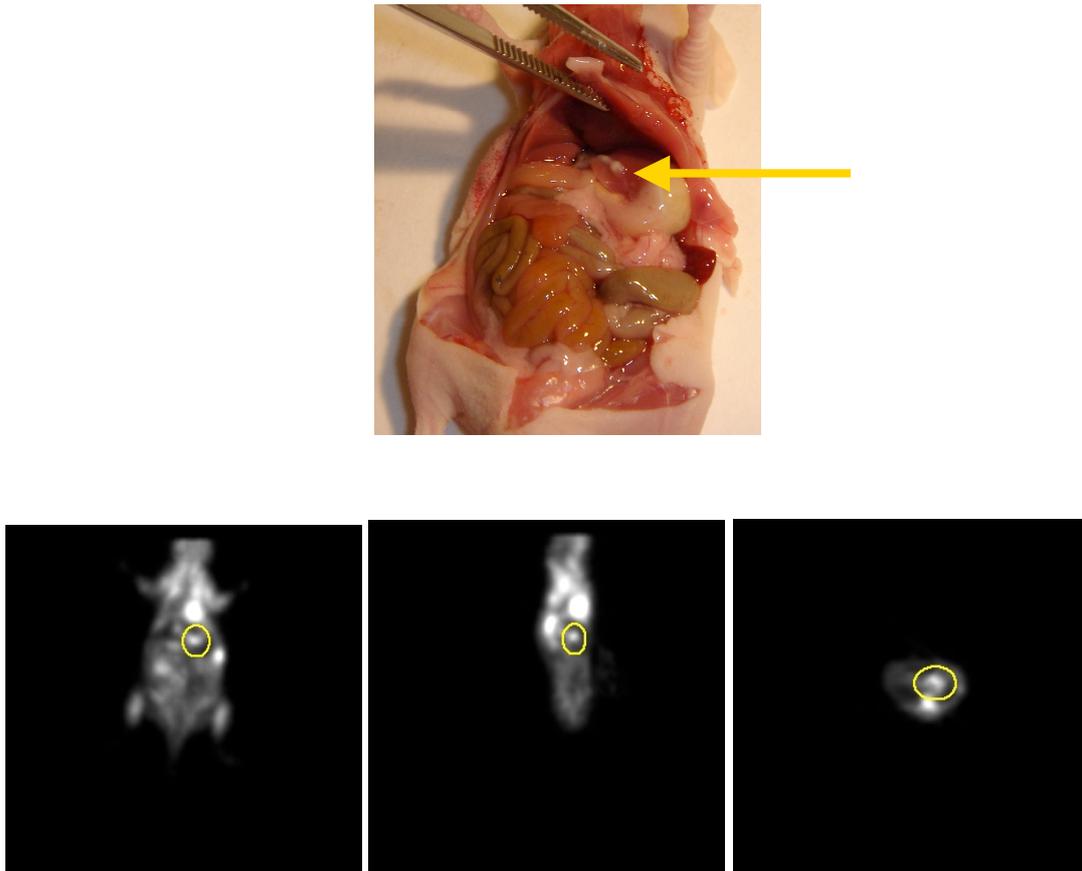


Abb. 10

Oben: Obduktionssitus einer Maus. Der linke Leberlappen wird mit einer Pinzette angehoben, auf dem darunter liegenden Lobus Caudatus wird eine streifenförmige Metastase (Pfeil) in einer Größe von 2mm × 0,5mm × 0,5mm sichtbar. Unten (von links nach rechts): PET-Aufnahmen dieser Maus (koronare, sagittale und transversale Ansicht): Der Tumor ist in den PET-Aufnahmen aufgrund des erhöhten FDG Uptake gut zu erkennen (Kreis). Im BLI konnte diese Läsion nicht detektiert werden.

4. Ergebnisse

Im Bereich des Magens und des Duodenums wurde bei Obduktion jeweils eine Läsion entdeckt (1mm Durchmesser bzw. 2mm × 2mm × 1,5mm).

Mit dem Biolumineszenz Imaging konnte weder der Tumor im Bereich der Kardia (1mm Durchmesser) noch der Tumor am Duodenum (2mm × 2mm × 1,5mm) detektiert werden.

Im PET konnte sowohl der Tumor an der Kardia als auch der Tumor am Duodenum detektiert werden.

Im Bereich des Jejunum und dessen Mesenterium wurden bei Obduktion insgesamt 21 Tumorknoten bei 11 Mäusen gefunden. Der Befall der einzelnen Maus lag hierbei zwischen einer und vier Läsionen. Die Mehrzahl der Läsionen (n=15) stellte sich als kugelförmiger Tumorknoten mit einem Durchmesser zwischen 1 und 1,5 mm dar, der Rest der Läsionen (n=6) besaß längliche Form bis zu einer maximalen Abmessung von 5mm × 2mm × 2mm.

Im Biolumineszenz Imaging konnten von diesen 21 Tumorknoten 10 dargestellt werden. Die Detektierbarkeit im Bereich des Jejunums erwies sich als sehr stark lageabhängig und bedingt größenabhängig. So konnten Läsionen mit einem Durchmesser von 1mm dargestellt werden, falls sie sehr oberflächlich lagen. Lagen sie jedoch tiefer in der Bauchhöhle oder wurden von Darmschlingen verdeckt, konnten selbst Knoten mit einer Abmessung von 4mm × 2,5mm × 1mm nicht detektiert werden.

Bei der Obduktion von Tieren, deren PET- Aufnahmen ausgewertet wurden (n=14), wurden am Jejunum und dessen Mesenterium insgesamt 19 Tumore in einer Größe von 1mm Durchmesser bis zu einer Ausdehnung von 5mm × 2mm × 2mm gefunden. Von diesen 19 Tumoren konnten 16 mittels PET detektiert werden. Die Tumore stellten sich als fokale, runde Anreicherungen unterschiedlicher Größe im Abdominalraum der Mäuse dar. Die detektierten Tumore besaßen eine Abmessung zwischen 1mm Durchmesser und 5mm × 2mm × 2mm. Die nichtdetektierten Tumore maßen 1,5mm Durchmesser (n=1) bzw. 1mm Durchmesser (n=2).

4. Ergebnisse

Abbildung 11 zeigt eine Gegenüberstellung eines Tumors im Obduktionssitus sowie im Biolumineszenz Imaging als auch im PET.

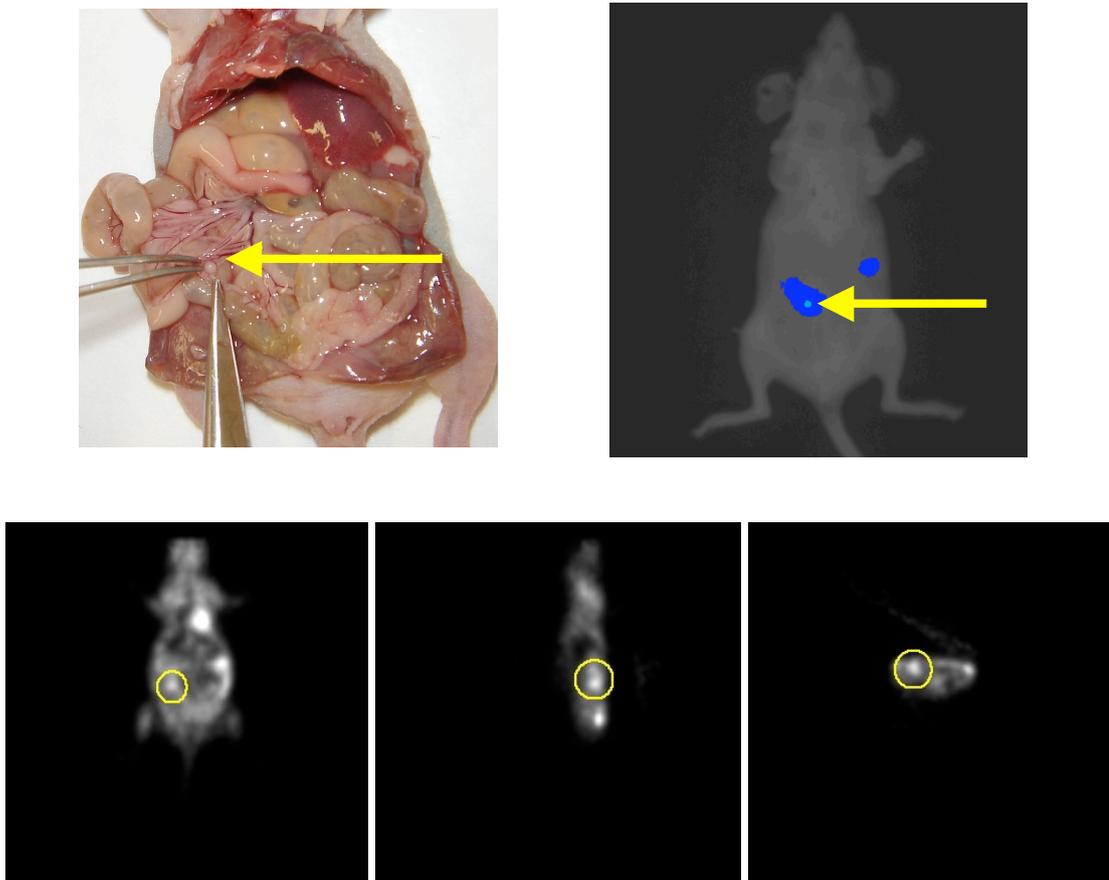


Abb. 11

Oben links: Aufnahme des Obduktionssitus einer Maus. Die Darmschlingen wurden zur Seite gelegt und ein kugelförmiger Tumor im Mesenterium des Jejunums wird dargestellt. Oben rechts: Biolumineszenzaufnahme des Tumors (Pfeil) im Bereich des Jejunum. Unten (von links nach rechts): PET-Aufnahmen dieser Maus (koronare, sagittale und transversale Ansicht):. Die Aufnahme zeigt eine intensive, fokale Anreicherung von FDG in dem Tumorknoten der Abdominalregion (Kreis).

4. Ergebnisse

Bei 6 Mäusen wurde bei Obduktion eine Läsion am Kolon sowie dessen Mesenterium gefunden. Ein Teil dieser Tumore (n=3) besaß kugelige Gestalt mit einem Durchmesser von 1-2mm, der andere Teil (n=3) besaß längliche Form zwischen 2mm × 1mm × 1mm bis zu 6mm × 2mm × 1mm.

Mittels des Biolumineszenz Imaging wurden 2 von 6 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 Abmessung von 2mm × 1mm × 1mm bzw. 6mm × 2mm × 1mm.

Im PET konnten 4 von 5 Tumoren am Kolon detektiert werden. Die detektierten Tumore hatten eine Größe zwischen 1mm im Durchmesser und 6mm × 2mm × 1mm. Der nichtdetektierte Tumor besaß eine Größe von 2mm × 1mm × 1mm.

Die am häufigsten in diesem Modell auftretenden Tumoren wurden im Bereich des Pankreas gefunden. Diese typische Läsion stellte sich als solide, schollige Tumorzellansammlung auf dem Pankreas dar, die mit ihren Ausläufern die Milz sowie die Pylorusregion des Magens infiltrierte. Tumoren in dieser Lokalisation wurden bei 13 Mäusen gefunden. Die Größe variierte von 3mm × 2mm × 1mm bis hin zu 8mm × 2mm × 2mm.

Bei vier Mäusen wurden Tumorknoten am Duodenalschenkel des Pankreas gefunden. Die Abmessung dieser Tumore lag zwischen 2mm × 1mm × 1mm und 2mm × 3mm × 1mm.

Bei zwei Mäusen wurde jeweils eine Tumorzellauflagerung im medialen Teil des Pankreas gefunden, deren Abmessung 3mm × 1,5mm × 1mm bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm betrug. Insgesamt wurden bei der Obduktion im Bereich des Pankreas bei 15 Mäusen 19 Tumorknoten gefunden.

Mittels Biolumineszenz Imaging konnten im Bereich des Pankreas 15 der 19 vorhandenen Tumore detektiert werden. Die sich in der für diese Studie typischen Lokalisation zwischen Pankreas, Magen und Milz entwickelten Tumore konnten in 10

4. Ergebnisse

von 13 Fällen detektiert werden. Sie besaßen eine Abmessung von 3mm × 2mm × 1mm bis hin zu 8mm × 2mm × 2mm.

Abbildung 12 zeigt die typische Darstellung eines Pankreastumors im Biolumineszenz Imaging und das entsprechende Obduktionsfoto. Der Tumor liegt kaudal der Leber. Somit wird das Biolumineszenzsignal nur durch das ventral gelegene Peritoneum und die Haut abgeschwächt.

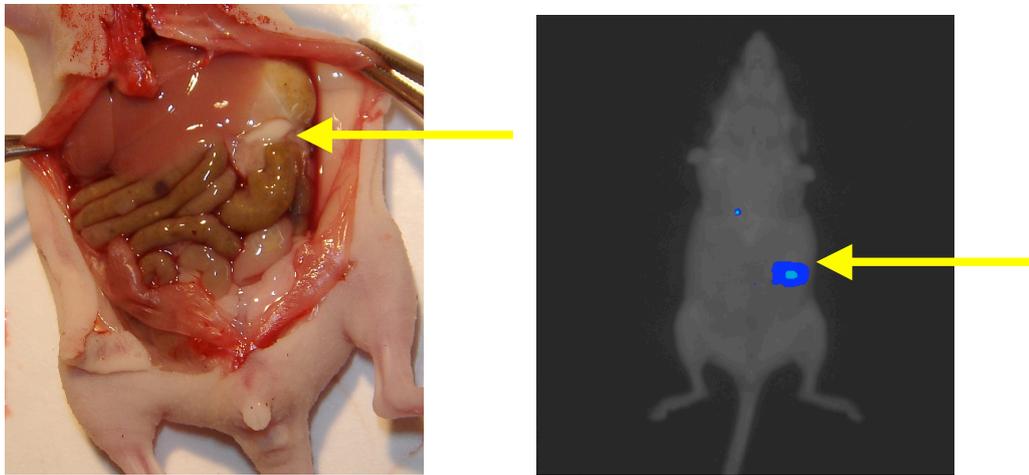


Abb. 12

Links: Aufnahmen des Obduktionssitus einer Maus. Der Pfeil markiert einen Pankreastumor, der in dieser Lokalisation bei 13 Mäusen gefunden wurde. Rechts: Biolumineszenz Aufnahme der gleichen Maus. Der Pankreastumor (mit Pfeil markiert) liegt kaudal der Leber. Der Tumor ist daher in der Biolumineszenz Aufnahme gut zu erkennen.

4. Ergebnisse

In einem Fall der Nicht-Detektierbarkeit im Biolumineszenz Imaging wurde der Tumor in seiner gesamten Ausdehnung vom vergrößerten linken Leberlappen verdeckt, so dass das Biolumineszenz Signal vollständig ausgelöscht wurde (Abb. 13).

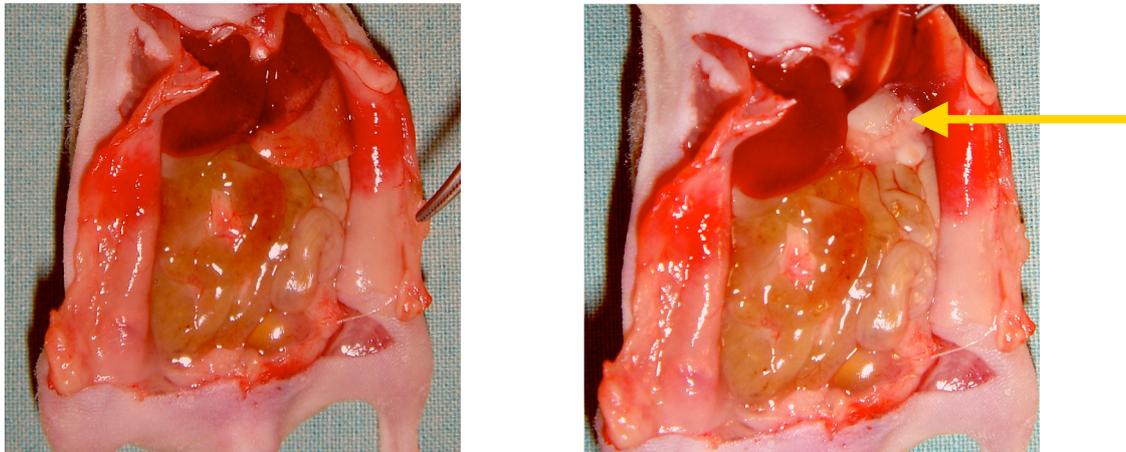


Abb. 13

Links: Obduktionssitus einer Maus. Das Peritoneum ist eröffnet. Sämtliche Organe sind in ihrer Lage belassen. Der Pankreastumor ist vollständig von der Leber verdeckt. Rechts: Obduktionssitus der Abdominalregion der gleichen Maus. Der linke Leberlappen mit einer Pinzette angehoben und der Pankreastumor (mit Pfeil markiert) wird sichtbar. In den Biolumineszenz Aufnahmen konnte dieser Tumor aufgrund der völligen Auslöschung des Signals durch die Leber nicht detektiert werden.

4. Ergebnisse

Die anderen beiden Fälle der Nicht-Detektierbarkeit ergeben sich durch die Tatsache, dass sich am Pankreas jeweils zwei kleine, in nächster Nähe liegende, aber noch klar voneinander abgrenzbare Tumoren ausbildeten, die sich jedoch im Biolumineszenz Imaging als eine einzige Lokalisation darstellten (Abb. 14).

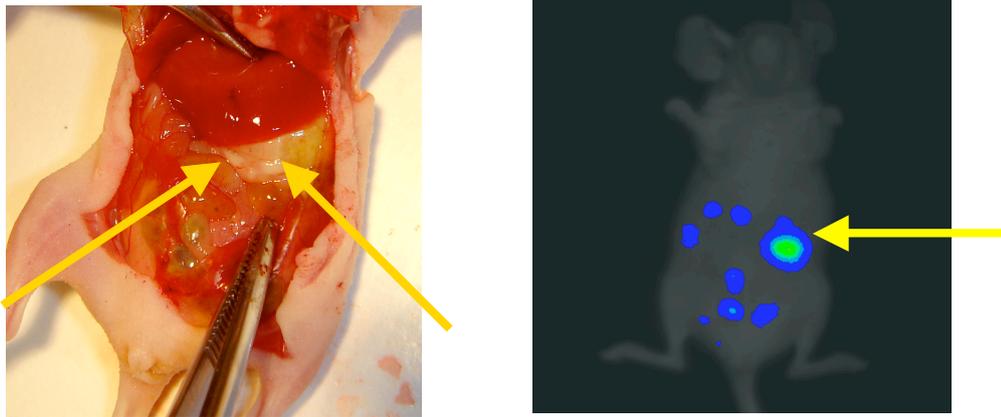


Abb. 14

Links: Aufnahme des Obduktionssitus einer Maus. Rechts: die entsprechende Biolumineszenz Aufnahme. Bei der Obduktion wurden zwei kleine, sehr nahe beieinander liegende Tumorknoten gefunden (mit Pfeilen markiert). In der Biolumineszenz Aufnahme stellen sich beide Tumore als eine einzige Lokalisation dar.

Von 4 Tumoren, die am Duodenalschenkel des Pankreas gefunden wurden, konnten 3 detektiert werden. Beide im medialen Teil des Pankreas aufgelagerte Metastasen konnten dargestellt werden.

4. Ergebnisse

Mittels PET konnten von den 18 Tumoren, die bei Obduktion im Bereich des Pankreas gefunden wurden, 15 detektiert werden.

11 der 12 Tumore, die an der für diese Studie typischen Lokalisation auf dem Pankreas lagen und mit ihren Ausläufern die Pylorusregion des Magens und die Milz infiltrierten, konnten detektiert werden. Eine Tumorerkrankung an dieser typischen Lokalisation wurde als nichtdetektiert dokumentiert, da zwei nahe nebeneinander liegende, aber noch sicher voneinander abgrenzbare Tumore sich im PET als eine einzige intensive Anreicherung darstellten. Abbildung 15 zeigt das typische Bild der FDG-Anreicherung im Pankreas-Tumor.

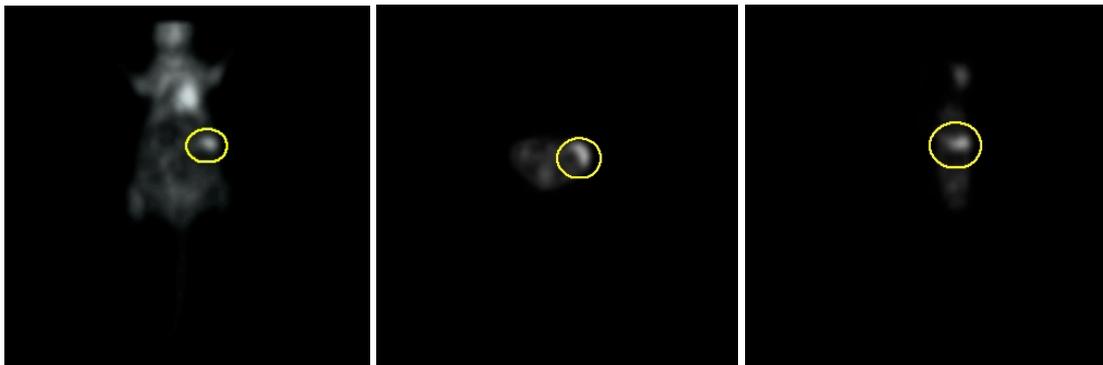


Abb. 15

PET-Aufnahmen einer Maus (von links nach rechts: koronare, sagittale und transversale Ansicht): Der Tumor in der Pankreasregion präsentiert sich als deutliche fokale FDG-Anreicherung im linken Oberbauch.

Von den 4 Tumoren, die sich am Duodenalschenkel des Pankreas entwickelt hatten, konnten 2 Tumore detektiert werden. Der eine Tumor besaß eine Größe von 2mm × 1mm × 1mm und stellte den einzigen Pankreastumor dieser Maus dar und war somit

4. Ergebnisse

leicht zu detektieren. Der andere Tumor besaß eine Abmessung von 2mm × 3mm × 1mm und konnte trotz Vorhandensein eines weiteren Pankreastumors an typischer Lokalisation als einzelne fokale Anreicherung detektiert werden.

Die zwei nichtdetektierten Tumorkläsionen besaßen Abmessungen von 1mm Durchmesser bzw. 1,5 mm Durchmesser und stellten sich jeweils zusammen mit einem größeren Pankreastumor an typischer Lokalisation als eine Anreicherung dar.

Die beiden Tumorzellabsiedelungen im medialen Teil des Pankreas (3mm × 1,5mm × 1mm bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm) konnten beide mittels PET dargestellt werden.

Bei zwei Mäusen wurde bei Obduktion je eine Tumorkläsion am Uterus entdeckt. Ihre Abmessung betrug 1,5mm im Durchmesser bzw. 3mm × 2mm × 1mm.

Im Biolumineszenz Imaging konnten beide Tumore, die im Bereich des Uterus gefunden wurden, detektiert werden.

Im PET konnten ebenfalls beide Tumore dargestellt werden.

Bei der Obduktion wurden bei zwei Mäusen je eine Metastase im Bereich der Blase gefunden. Diese besaßen eine Ausdehnung von 1,5mm im Durchmesser bzw. 4mm × 2mm × 1mm.

Im Biolumineszenz Imaging konnte keiner der 2 Tumoren im Bereich der Blase dargestellt werden.

Im PET konnte eine (4mm × 2mm × 1mm) der beiden Kläsionen im Bereich der Blase detektiert werden.

Insgesamt wurde bei der Obduktion von 15 Mäusen 82 Tumorkläsionen gefunden, die als Standard of Reference bei der Beurteilung der Bildgebenden Verfahren verwendet wurden.

Mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging konnten 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

4. Ergebnisse

tiefer in der Bauchhöhle oder wurden von Organen wie der Leber oder von Darmschlingen verdeckt, ließen sie sich nur schwer oder gar nicht darstellen.

Mit Hilfe der PET konnten insgesamt 58 von 78 Tumorerkrankungen detektiert werden.

Bei der Beurteilung der PET-Bilder entstanden 7 falsch positive Befunde. Alle falsch positiven Befunde entstanden durch fokale Anreicherungen im Bauchraum der Mäuse, die von den Betrachtern als Tumorerkrankung eingestuft wurden. Diese fokalen Anreicherungen stellten sich bei der Obduktion als tumorfrei heraus.

4.3 Sensitivität der Detektion von BLI und PET in Abhängigkeit der Größe

Die bei der Obduktion gefundenen Läsionen wurden entsprechend ihrer Größe in 5 Gruppen eingeteilt.

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die Sensitivität des BLI und des PET in Abhängigkeit der Größe der Läsionen.

Tabelle 4: Abmessung, Anzahl der bei Obduktion gefundener Tumorkläsionen, sowie Sensitivität von BLI und PET

Abmessung der Läsion	Anzahl bei Obduktion	Sensitivität PET	Sensitivität BLI
1-2mm	50	29/47 = 61%	20/50 = 40%
2-4mm	18	16/18 = 89%	8/18 = 44%
4-6mm	7	6/6 = 100%	6/7 = 86%
6-8mm	3	3/3 = 100%	3/3 = 100%
8-10mm	4	4/4 = 100%	3/4 = 75%
Gesamt	82	58/78 = 74%	40/82 = 49%

Mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging konnten 20 von 50 Läsionen im Bereich von 1-2mm detektiert werden. Im Bereich von 2-4mm konnten 8 von 18 Läsionen dargestellt werden, im Bereich von 4-6mm 6 von 7 Läsionen, im Bereich von 6-8mm 3 von 3 Läsionen und im Bereich größer 8mm konnten 3 von 4 Läsionen dargestellt werden.

Diese Verteilung zeigt, dass die Größe der Läsion nicht allein ausschlaggebend für eine erfolgreiche Detektion ist. Vielmehr bestimmt die Lage der Läsion, ob sie mit dem BLI detektiert werden kann. So lässt sich erklären, dass bereits eine Vielzahl von kleinen Läsionen im Bereich von 1-2mm dargestellt werden konnte, wenn sie oberflächlich lagen. Andererseits konnte auch eine größere Läsion (8mm) im Biolumineszenz Imaging nicht detektiert werden.

Mit Hilfe des PET konnten 29 von 47 Läsionen im Bereich von 1-2mm detektiert werden. Im Bereich von 2-4mm konnten 16 von 18 Läsionen dargestellt werden, im Bereich von 4-6mm 6 von 6 Läsionen, im Bereich von 6-8mm 3 von 3 Läsionen und im Bereich größer 8 mm konnten 4 von 4 Läsionen dargestellt werden. Diese Verteilung zeigt, dass die Detektion im PET größenabhängig, aber lageunabhängig ist.

4.4 Versuch der Quantifizierung des BLI

Neben der qualitativen Beurteilung der Detektionsmöglichkeit des Biolumineszenz Imaging wurde mit verschiedenen Ansätzen versucht, die Ergebnisse der Aufnahmen quantitativ zu erfassen.

Ziel dieses Auswertungsansatzes war die Prüfung einer Korrelation zwischen den beim Biolumineszenz Imaging gemessenen Lichtintensitäten und den bei der Obduktion tatsächlich gemessenen Tumorgrößen bzw. Tumolvolumen.

Es wurden Tumore im Bereich des Pankreas und Tumore im Bereich der Dünn- und Dickdarmschlingen gewählt.

Abbildung 16 zeigt die graphische Darstellung der Korrelation zwischen den gemessenen Signalintensitäten und den tatsächlichen Tumolvolumina für Tumore im Bereich des Pankreas.

4. Ergebnisse

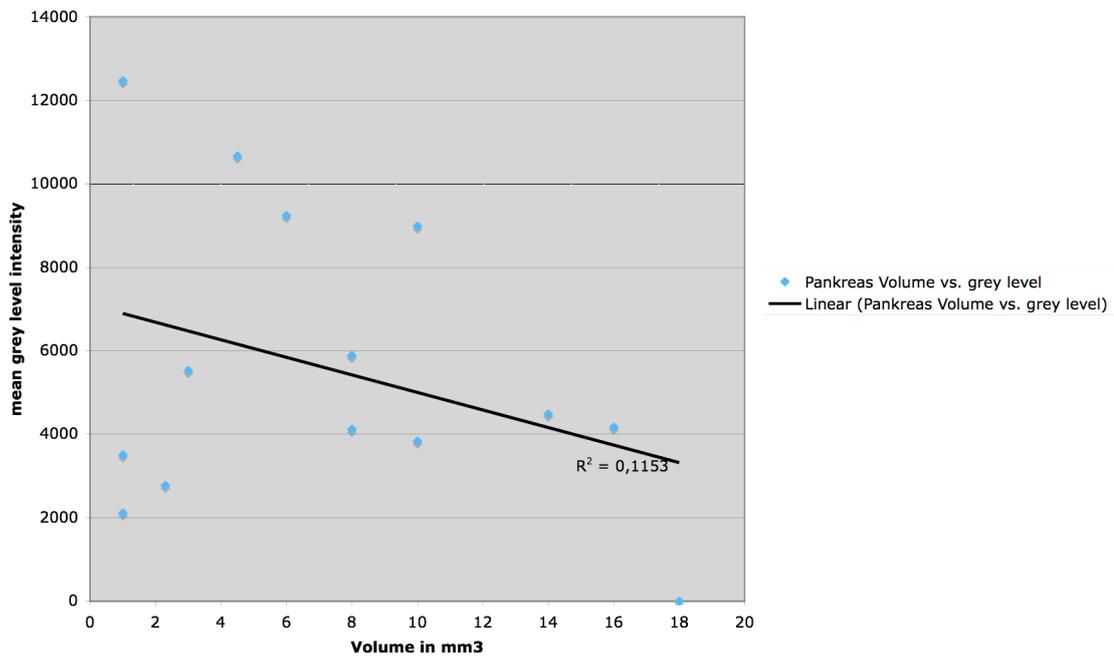


Abb. 16

Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der mittleren Lichtintensität (mean grey level intensity) und dem Volumen der Pankreastumoren.

Auf der Abszisse ist das Volumen der einzelnen Tumorknoten aufgetragen, auf der Ordinate die mittlere Lichtintensität (mean grey level intensity).

Es ergibt sich kein Zusammenhang zwischen der gemessenen Signalintensität und den tatsächlichen Volumina der Tumoren. R^2 beträgt 0,1153.

Neben Tumoren des Pankreas wurden auch Tumore im Bereich der Dünn- und Dickdarmschlingen auf eine Korrelation zwischen Lichtintensität und Tumolvolumen untersucht.

Abbildung 17 zeigt die graphische Darstellung der Korrelation zwischen den gemessenen Signalintensitäten und den tatsächlichen Tumolvolumina für Tumore im Bereich der Dünn- und Dickdarmschlingen.

4. Ergebnisse

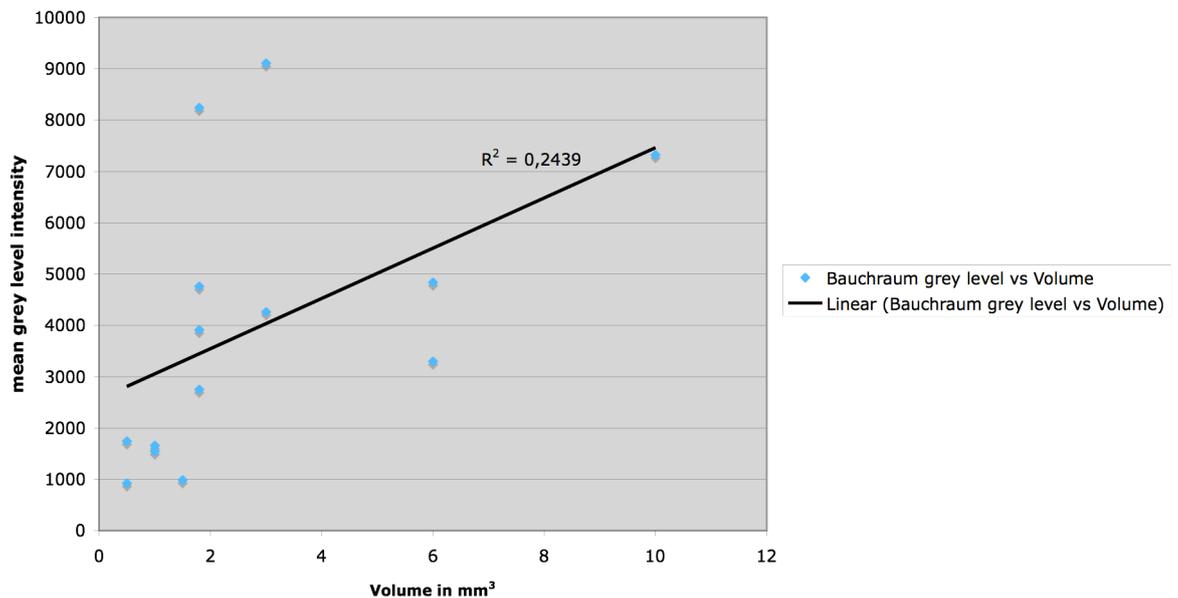


Abb. 17

Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der mittleren Lichtintensität (mean grey level intensity) und dem Volumen der Tumoren im Bereich des Dünn- und Dickdarms

Es ergibt sich eine geringe Korrelation zwischen den gemessenen Lichtintensitäten und den tatsächlichen Volumina der Tumore. R^2 beträgt 0,2439.

4.5 Quantitative Auswertung der PET

Die mittlere tumor-to-background-ratio der 59 detektierten Tumore lag bei 2,02 (1,07 – 4,58). Die mittlere tumor-to-background-ratio der falsch positiven Tumore lag bei 1,54 (1,2 – 2,17).

4.6 Vergleich der bildgebenden Verfahren BLI, PET und MRT

Nach der Auswertung der MRT-Aufnahmen (Doktorarbeit von Matthias Abenstein) wurden diese Ergebnisse mit den Ergebnissen des BLI und der PET verglichen. Um eine aussagekräftige Beurteilung zu den Stärken und Schwächen jedes Verfahrens zu ermöglichen, wurde der Vergleich sowohl lage- als auch größenabhängig durchgeführt.

4.6.1 Lokalisationsbezogene Auswertung

Abbildung 4.14 zeigt eine Übersicht aller gefundenen Tumore, eingeteilt nach ihrer Lage sowie die Detektierbarkeit der drei bildgebenden Verfahren BLI, PET und MRT.

4. Ergebnisse

Tabelle 5: Anzahl, Lokalisation und Volumen der bei Obduktion gefundenen Tumorerkrankungen, sowie die Sensitivität bei ihrer Detektion von PET, BLI und MRT.

n	Lokalisation	Volumen range in mm³	Sensitivität PET	Sensitivität BLI	Sensitivität MRT
8	Einstichstelle	0,3-9	5/8 = 63%	8/8 = 100%	3/8 = 38%
2	Peritoneum (Innenseite)	1-1,8	1/2 = 50%	2/2 = 100%	0/2 = 0%
7	Zwerchfell	0,1-1,8	1/7 = 14%	0/7 = 0%	0/6 = 0%
13	Leber	0,5 - 3	11/13 = 85%	1/13 = 8%	0/12 = 0%
1	Magen	0,5	1/1 = 100%	0/1 = 0%	0/1 = 0%
1	Duodenum	3	1/1 = 100%	0/1 = 0%	0/1 = 0%
21	Jejunum	0,5-10	16/19 = 84%	10/21 = 48%	5/20 = 25%
6	Colon	0,5-6	4/5 = 80%	2/6 = 33%	2/5 = 40%
19	Pankreas	1-18	15/18 = 83%	15/19 = 79%	5/17 = 29%
2	Uterus	1,8-3	2/2 = 100%	2/2 = 100%	1/2 = 50%
2	Blase	1,8-4	1/2 = 50%	0/2 = 0%	1/2 = 50%
82	Gesamt	0,1 - 18	58/78 = 74%	40/82 = 49%	17/76 = 22%

4. Ergebnisse

4.6.2 Größenbezogene Auswertung

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der gefundenen Tumore in Abhängigkeit ihrer Abmessung sowie die Sensitivität der drei bildgebenden Verfahren BLI, PET und MRT.

Tabelle 6: Abmessung und Anzahl der bei der Obduktion gefundenen Läsionen, sowie die Sensitivität bei ihrer Detektion mit PET, BLI und MRT.

Abmessung der Läsion	Anzahl bei Obduktion	Sensitivität PET	Sensitivität BLI	Sensitivität MRT
1-2mm	50	29/47 = 61%	20/50 = 40%	2/47 = 4%
2-4mm	18	16/18 = 89%	8/18 = 44%	4/16 = 25%
4-6mm	7	6/6 = 100%	6/7 = 86%	6/7 = 86%
6-8mm	3	3/3 = 100%	3/3 = 100%	2/3 = 67%
8-10mm	4	4/4 = 100%	3/4 = 75%	3/3 = 100%
Gesamt	82	58/78 = 74%	40/82 = 49%	17/76 = 22%

4.7 Exemplarische Gegenüberstellung von PET, BLI und MRT

Die Abbildungen 18 – 21 zeigen jeweils die Gegenüberstellung des Obduktionssitus mit Tumoren unterschiedlicher Größe und die entsprechenden Aufnahmen der 3 bildgebenden Verfahren. Abbildung 18 zeigt eine Tumorzellabsiedelung in Bereich des Jejunums mit 1mm Durchmesser. Die Läsion konnte weder im BLI, noch im PET oder MRT detektiert werden. Die Läsion war zu klein und zu tief im Bauchraum gelegen um ein detektierbares Signal im BLI zu erzeugen. Auch im PET erwies sich die FDG-Anreicherung in diesem Fall als zu gering, um die Läsion zu detektieren. Im MRT konnten Läsionen mit dieser Abmessung nicht dargestellt werden.

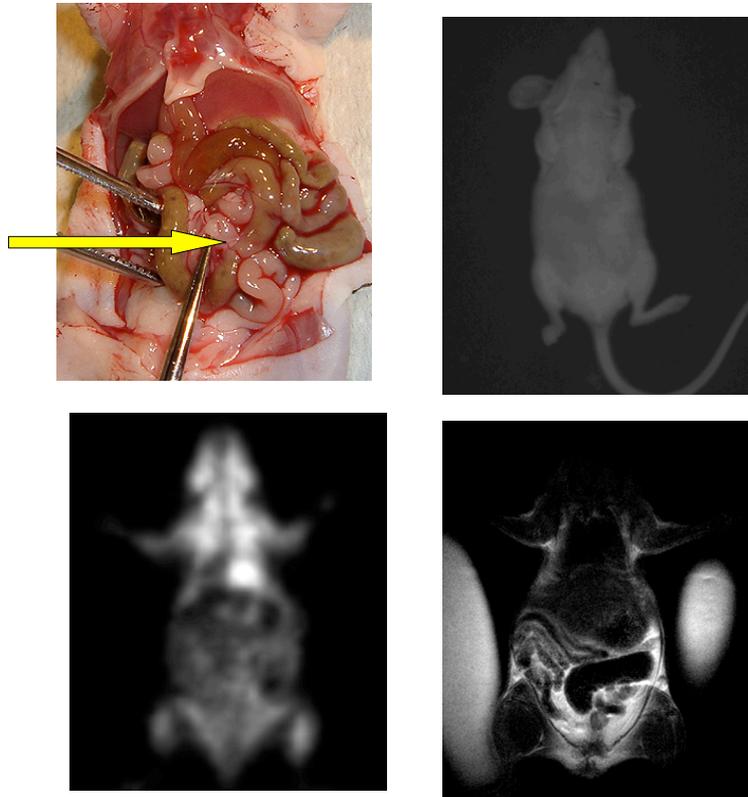


Abb. 18

Gegenüberstellung des Obduktionssitus und der einzelnen bildgebenden Verfahren.

Oben links: Obduktionssitus: Tumorkläsion im Bereich des Jejunums (Pfeil, 1mm Durchmesser). Oben rechts: BLI- Aufnahme dieser Maus. Die Kläsion war zu klein und zu tief im Bauchraum gelegen, um ein sichtbares Signal zu erzeugen. Unten links: PET-Aufnahme dieser Maus. Die Kläsion ist nicht eindeutig als fokale Mehranreicherung im Bauchraum der Maus zu erkennen. Unten rechts: MRT-Aufnahme dieser Maus. Kläsionen in dieser Größe konnten nicht detektiert werden.

4. Ergebnisse

Abb. 19 zeigt eine Gegenüberstellung der 3 Modalitäten bei einer 2mm großen Tumorkläsion des Pankreas. Sowohl im BLI als auch im PET konnte die Kläsion sicher detektiert werden. Im MRT stellt sich die Detektion von Kläsionen mit diesen Abmessungen als schwierig dar und gelang in diesem Falle nicht.

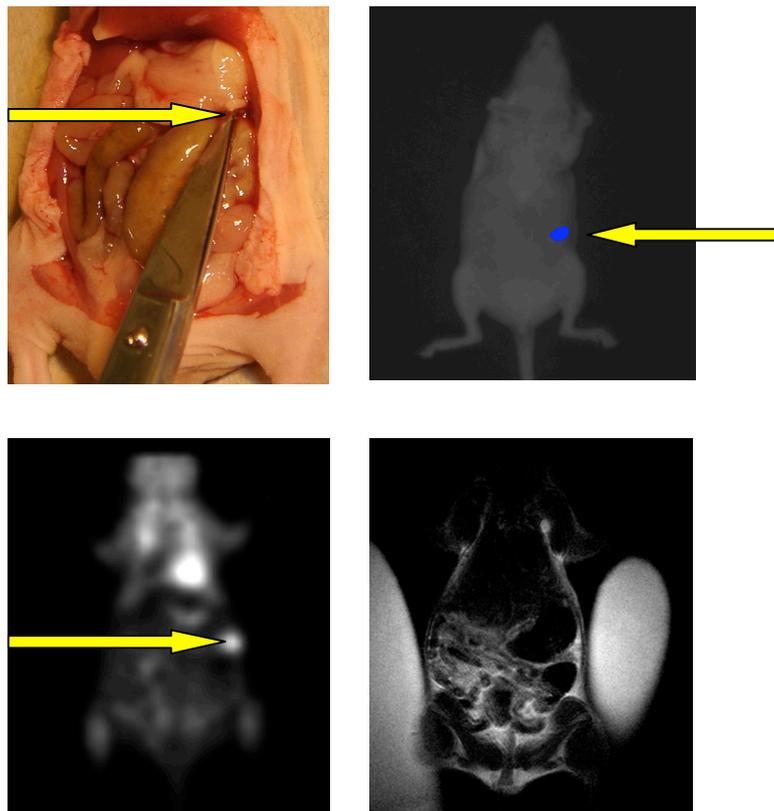


Abb. 19

Gegenüberstellung des Obduktionssitus und der einzelnen bildgebenden Verfahren.

Oben links: Obduktionssitus: Tumorkläsion im Bereich des Pankreas (mit Pfeil gekennzeichnet, 2mm). Oben rechts: BLI- Aufnahme dieser Maus. Die Kläsion stellt sich als deutliches Signal dar. Unten links: PET-Aufnahme dieser Maus. Die Kläsion ist eindeutig als fokale Mehranreicherung zu erkennen. Unten rechts: MRT-Aufnahme dieser Maus. Die Kläsion konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

Abb. 20 zeigt einen Tumor der Größenordnung 4-6mm. Die im Bereich des Colon gelegene Tumorzellabsiedelung konnte durch PET und BLI nachgewiesen werden. Läsionen in dieser Größe konnten im BLI und vor allem im PET sicher nachgewiesen werden. Der Nachweis mittels MRT gelang nicht in allen Fällen.

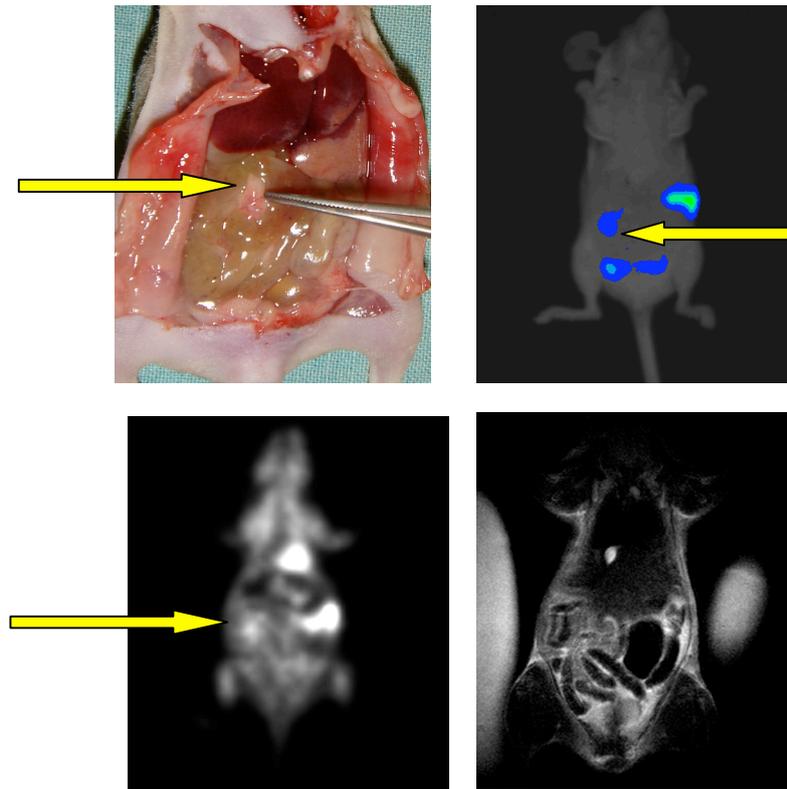


Abb. 20

Gegenüberstellung des Obduktionssitus und der einzelnen bildgebenden Verfahren.

Oben links: Obduktionssitus: Tumorerkrankung im Bereich des Colons (mit Pfeil gekennzeichnet, 6mm). Oben rechts: BLI- Aufnahme dieser Maus. Die Läsion stellt sich als deutliches Signal dar. Unten links: PET-Aufnahme dieser Maus. Die Läsion ist eindeutig als fokale Mehranreicherung zu erkennen. Unten rechts: MRT-Aufnahme dieser Maus. Die Läsion konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

Abbildung 21 zeigt einen 8mm großen Tumor am Pankreas. Läsionen in dieser Größenordnung konnten mit allen 3 Modalitäten sicher detektiert werden.

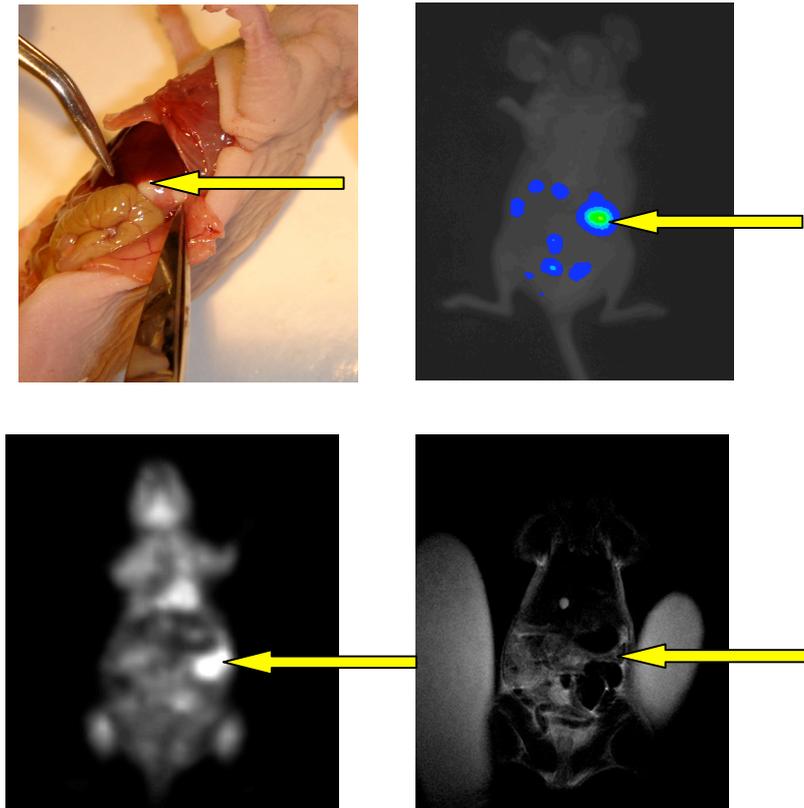


Abb. 21

Gegenüberstellung des Obduktionssitus und der einzelnen bildgebenden Verfahren.

Oben links: Obduktionssitus: Tumorkläsion im Bereich des Pankreas (mit Pfeil gekennzeichnet, 8mm). Oben rechts: BLI- Aufnahme dieser Maus. Die Läsion ist als deutliches Signal erkennbar. Unten links: PET-Aufnahme dieser Maus. Die Läsion ist eindeutig als fokale Mehranreicherung zu erkennen. Unten rechts: MRT-Aufnahme dieser Maus. Der Pfeil markiert die Läsion.

4.8 Fusion von PET- und MRT-Aufnahmen

Die erhaltenen PET- und MRT-Aufnahmen wurden wie in 3.11 beschrieben überlagert.

Die Abbildungen 22 - 23 zeigen 2 Beispiele der überlagerten Aufnahmen.

Abbildung 22 zeigt einen Tumor im Bereich des Jejunums. Abbildung 23 zeigt die Aufnahme des in dieser Studie typischen Tumors des Pankreas und Magens. Die fokale Mehranreicherung des ^{18}F -FDG im Bereich der Magenvorderwand und des Pankreas ist deutlich erkennbar. Dank der fusionierten MRT-Aufnahme erhält man exakte anatomische Informationen, die eine genaue Lokalisation des Tumors ermöglichen.

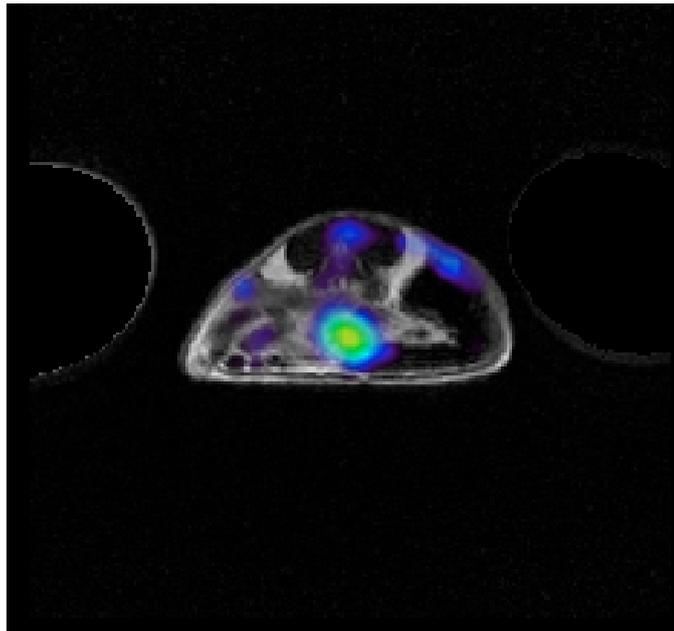


Abb.22

Transversale Ansicht von fusionierten PET- und MRT-Aufnahmen. Die fokale Mehranreicherung im PET stellt einen Tumor im Bereich des Jejunums dar. Aufgrund der fusionierten MRT-Aufnahme ist eine exakte Zuordnung zu anatomischen Strukturen möglich.

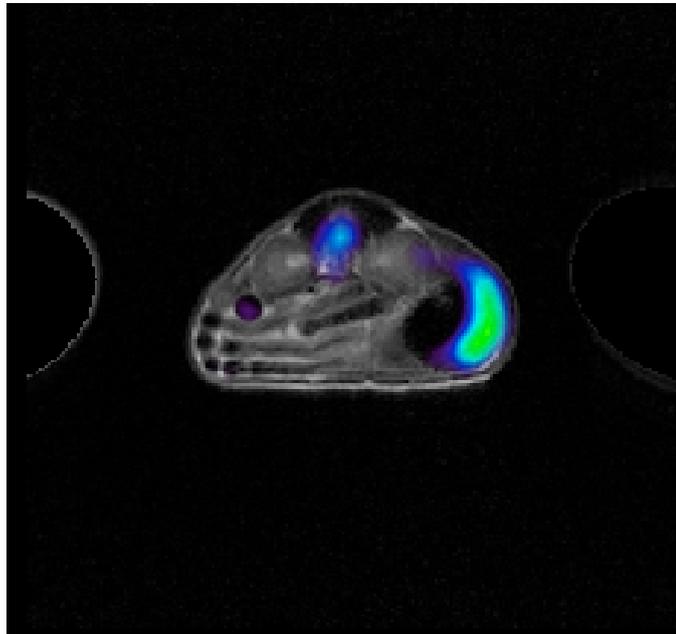


Abb. 23

Transversale Ansicht der fusionierten PET- und MRT-Aufnahmen. Die fokale Mehranreicherung im PET stellt einen Tumor im Bereich des Pankreas dar. Aufgrund der fusionierten MRT-Aufnahme ist auch hier eine exakte Zuordnung zu anatomischen Strukturen möglich.

5. Diskussion

Die nicht-invasive Darstellung einer Peritonealkarzinose stellt heutzutage immer noch eine große Herausforderung dar. Das Auftreten einer manifesten Peritonealkarzinose verschlechtert die Prognose eines Patienten drastisch. Daher ist eine frühestmögliche Detektion einer Peritonealkarzinose von entscheidender Bedeutung.

Ziel dieser Studie war die Beurteilung der bildgebenden Verfahren Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Biolumineszenz Imaging (BLI) und Magnetresonanztomographie (MRT) in Hinblick auf ihre Sensitivität bei der Detektion einer frühen Peritonealkarzinose im Mausmodell.

Die Bildgebung für Kleintiere, wie z.B. Mäuse, hat sich in den letzten Jahren rasant entwickelt. Neben der ständigen Verbesserung von präklinischen Verfahren wie dem Biolumineszenz Imaging wurde auch eine große Anzahl von CT-, MRT- und PET-Scannern speziell für die Verwendung bei Kleintieren konstruiert, die in einer Vielzahl von Studien zum Einsatz kommen (Koo et al., 2007) und wichtige Erkenntnisse zum Verständnis von Tumorerkrankungen beitragen.

5.1 Versuchsaufbau

Um die Sensitivität der drei bildgebenden Verfahren zur Erfassung einer Peritonealkarzinose zu beurteilen, wurden 16 Nacktmäusen jeweils 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen inokuliert. In Vorversuchen sowie in der Arbeit von Buchhorn et al. (2007) hatte sich gezeigt, dass die intraperitoneale Inokulation von 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen in Nacktmäusen bereits nach einigen Tagen zu einer manifesten Peritonealkarzinose führt und im Biolumineszenz Imaging sicher dargestellt werden kann. Das Versuchsprotokoll wurde so gewählt, dass die bildgebenden Verfahren möglichst aussagekräftig miteinander verglichen werden konnten. Es wurden zwei unterschiedliche Gruppen von Mäusen gebildet, die sich durch den Zeitpunkt der Bildgebung und der Obduktion unterschieden. Dadurch wurde gewährleistet, dass sich Tumorknoten unterschiedlicher Größe ausbildeten. Weiter wurden alle Aufnahmen und die Obduktion in möglichst engem zeitlichen Abstand durchgeführt. Es musste

jedoch beachtet werden, dass sich die wiederholten Narkosen, die für die Aufnahmen nötig waren, nicht zu einer potentiell letalen Belastung für die Mäuse entwickelten. Da während der Narkose der Stoffwechsel der Maus sehr reduziert ist, besteht zudem eine große Gefahr der Auskühlung. Diese stellt sich im Falle der Nacktmaus durch das Fehlen eines schützenden Felles noch gravierender dar. Das Versterben einer Maus während einer Aufnahme hätte den Verlust von wichtigen Daten bedeutet. Diese Überlegungen führten dazu, die Aufnahmen mit PET, BLI und MRT sowie die anschließende Obduktion an zwei aufeinander folgenden Tagen durchzuführen. Dies geschah je nach Gruppe entweder an Tag 3 und Tag 4 oder an Tag 6 und 7.

5.2 Obduktionsergebnisse

Bei allen Tieren konnte bei der Obduktion die Ausbildung einer Peritonealkarzinose beobachtet werden. Das Konzept, durch unterschiedliche Obduktionszeitpunkte eine Vielzahl von Tumorknoten unterschiedlicher Größe vorzufinden, erwies sich als richtig. Es konnten sowohl kleine Tumorknoten mit einem Durchmesser von 1mm gefunden werden als auch größere Tumorzellabsiedelungen mit Abmessungen bis zu 8mm × 2mm × 2mm. Das Auffinden von insgesamt 81 Läsionen in unterschiedlichen Lokalisationen und mit unterschiedlicher Größe ließ eine umfassende Beurteilung der bildgebenden Verfahren zu. Der Befall durch die Magenkarzinomzellen zeigte bei allen Tieren ein ähnliches Muster. So war die Region um Pankreas und Magen am häufigsten betroffen. Desweiteren fand sich eine Vielzahl von meist kleinen Tumorknoten im Abdominalbereich der Mäuse, die am Jejunum oder dessen Mesenterium anhafteten. Der Lobus caudatus der Leber und das Zwerchfell waren ebenfalls überproportional häufig befallen. Aszitesbildung erfolgte aufgrund des relativ kurzen Metastasierungszeitraumes von maximal 7 Tagen bei keiner Maus. Die bei der Obduktion erhaltenen Ergebnisse bestätigen die bevorzugten Lokalisationen der HSC-M2-luc Zellen, wie sie in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurden (Huber, 2003).

5.3 Biolumineszenz Imaging

Ein bildgebendes Verfahren, welches große Anwendung bei Kleintieren findet, ist das Biolumineszenz Imaging. Dessen Effektivität bei der Detektion und beim Monitoring eines Therapie-Effekts in Tumormodellen ist in vielen Studien belegt (Edinger et al., 1999, Rehemtulla et al., 2000, Jenkins et al., 2003, Buchhorn et al., 2007).

In dieser Studie verwendeten wir Magenkarzinomzellen der Linie HSC45-M2-luc, die stabil mit einem Gen, das für das Enzym Firefly Luciferase codiert, transfiziert wurden. Die Firefly Luciferase ist ein Enzym der Feuerfliege (*Photinus pyralis*), das in Gegenwart des Substrates Luciferin unter dem Verbrauch von Sauerstoff und ATP Licht in einer Wellenlänge von 562 nm produziert (Hastings, 1996). Dieses Licht wird von einer hochsensiblen charge-coupled-device (CCD) - Kamera erfasst. Aufgrund seines außerordentlich hohen Wirkungsgrades bei der Freisetzung von Licht stellt die Firefly Luciferase das meistverwendeste Enzym im Biolumineszenz Imaging dar (Contag et al., 2002). Es eignet sich sehr gut für Aufnahmen zur Beurteilung sowohl von Tumorwachstum als auch Tumorregression.

Des Weiteren ist das Biolumineszenz Imaging auch ein sehr sensitives Verfahren bei der Detektion von Metastasenbildung, da in kurzer Zeit Aufnahmen der gesamten Maus aus verschiedenen Perspektiven durchgeführt werden können und so die Tumorverteilung im gesamten Organismus beurteilt werden kann. So wurde das BLI bereits in mehreren Studien zum Auffinden von Metastasen und zur Darstellung von Metastasierungswegen erfolgreich verwendet (Dickson et al., 2007, Saur et al., 2005).

Die maximale Intensität der Lichtabgabe der in dieser Studie verwendeten transfizierten Zellen tritt zwischen der zehnten und zwanzigsten Minute nach Luciferin-Injektion auf. Danach nimmt die Lichtabgabe langsam ab. Deshalb wurden die Tiere 9 Minuten nach Injektion des Luciferins in die Dunkelkammer der Kamera gelegt und ab der zehnten Minute nach Injektion wurden die Aufnahmen durchgeführt. Es wurden Aufnahmen von ventral sowie von links und rechts lateral vorgenommen. So war es möglich, einen guten Überblick über die Tumorverteilung im gesamten Körper der Maus zu erhalten. Aufnahmen aus einer einzigen Perspektive hätten

möglicherweise Tumorknoten unerkannt gelassen, die in einer anderen Perspektive gut sichtbar gewesen wären.

Für unsere Studie wurde eine Belichtungszeit von 10 sec ausgewählt. Diese Belichtungszeit hatte sich bei Vorversuchen als geeignet erwiesen. Durch diese gewählte Belichtungszeit konnte die Narkosezeit für die Mäuse kurz gehalten werden. Dies war bei der Vielzahl von Aufnahme-bedingten Narkosen innerhalb des engen Zeitraumes sehr wichtig.

5.3.1 Lokalisationsabhängige Detektion

Bei diesem Auswertungsansatz sollte untersucht werden, inwiefern die Sensitivität des BLI von der Lokalisation der Tumorknoten abhängig ist. Hierzu wurden sämtliche Tumoren nach ihrer Lokalisation eingeteilt.

Alle Tumore, die sich am Peritoneum der Mäuse befanden (n=10), konnten sehr gut dargestellt werden. Dies ist durch die oberflächige Lage der Tumore gut zu erklären. Das Biolumineszenz Imaging ist ein Verfahren, das durch die physikalische Eigenschaften des Lichts limitiert ist, insbesondere durch Streuung und Absorption. Beide Phänomene haben Auswirkung auf die Schärfe der Aufnahmen und die Tiefe der Lichtpenetration (Lewis et al., 2002). Je tiefer sich eine Lichtquelle in einem Organismus befindet, desto größer ist die Streuung des Lichtes bis es die Kamera erreicht und desto ungenauer erscheint das Signal bezogen auf die genaue Lokalisation der Lichtquelle. Ebenso kommt es auf dem Weg durch das Gewebe zur Oberfläche zu einem erheblichen Verlust an Photonenintensität durch Absorption. So erscheinen Tumore, also Lichtquellen, die oberflächlich im Organismus liegen, größer und heller als Tumore, die z.B. tief in der Bauchhöhle liegen (Weissleder, 2001).

Ausgehend von diesen physikalischen Gegebenheiten lässt sich die 100%-ige Detektion von Tumoren am Peritoneum gut erklären. Aufgrund der oberflächigen Lage muß das Lichtsignal nur eine minimale Distanz durch das Gewebe der Maus zurücklegen, ehe es von der Kamera erfasst wird. Durch den geringen Verlust an Intensität erscheint das Signal dieser Tumore als sehr intensiv. Selbst kleinste Tumoren (0,5mm × 0,5mm × 0,2mm) konnten so im BLI sehr gut dargestellt werden.

Im Bereich des Zwerchfells konnte keiner der 7 Tumore mit dem BLI detektiert werden. Die geringe Größe bzw. die kleinen Zellzahlen dieser Läsionen sowie vor allem die Abschirmung des Biolumineszenzsignals durch die ventral des Tumors liegenden Strukturen sind die Ursachen für die Nicht-Detektierbarkeit.

Von den 13 bei der Obduktion gefundenen Tumorknoten im Bereich der Leber konnte nur ein Tumorknoten detektiert werden. Sämtliche Knoten befanden sich am Lobus caudatus sowie in der Nähe des Leberhilus und wurden von linken bzw. medialen Leberlappen verdeckt. Das Biolumineszenzsignal wurde dadurch vollständig absorbiert. Gut durchblutete Organ wie die Leber enthalten viel Hämoglobin, welches das Biolumineszenzsignal sehr stark absorbiert. Daraus resultiert bei gut durchbluteten Organen eine Abschwächung des Signales um etwa den Faktor 10 pro Zentimeter Gewebe-Tiefe (Koo et al., 2007).

Die Sensitivität des Biolumineszenz Imaging in der Bauchhöhle erwies sich wie erwartet als stark lageabhängig. Kleine Tumorknoten mit einem Durchmesser von 1mm (entspricht etwa $1,2 \times 10^5$ Zellen) konnten sehr gut sichtbar gemacht werden, falls sie nahe an der Oberfläche lagen. Lagen sie jedoch tiefer in der Bauchhöhle oder wurden von Darmschlingen verdeckt, waren sie im BLI nicht erkennbar. Insgesamt konnten in unserer Studie 10 von 21 Tumorknoten im Bereich des Jejunums und 2 von 6 Tumorknoten im Bereich des Colons detektiert werden.

Studien berichten, dass Tumorknoten mit nur 1×10^3 Zellen in der Bauchhöhle (Edinger et al., 1999) sowie nach i.p. Inokulation (El Hiali et al., 2002) nachgewiesen konnten. Dieses zeigt, dass die minimal nachweisbare Zellzahl stark vom jeweiligen experimentellen Setup abhängt. Die Sensitivität der Detektion wird sowohl durch die technischen Daten des verwendeten Kamera-Systems als auch durch die Kameraeinstellungen beeinflusst. Desweiteren spielt die Belichtungszeit eine wesentliche Rolle bei der Frage der minimal nachweisbaren Zellzahl. So sind Belichtungszeiten von 4 Minuten (El Hiali et al., 2002) oder 5 Minuten (Edinger et al., 1999) notwendig, um solch kleine Zellzahlen nachweisen zu können.

Im Bereich des Pankreas konnten 15 von 19 Tumoren detektiert werden. Dieses gute Ergebnis lässt sich wiederum durch die Lage der Tumore gut erklären. Der Großteil

der Tumore wurde nur von Peritoneum und Haut verdeckt, so dass das Biolumineszenzsignal nur minimal abgeschwächt und fast vollständig von der Kamera erfasst wurde. Hinzu kommt, dass die an diesen Lokalisationen entstandenen Tumoren meist relativ groß waren, und somit ein intensives Signal produzierten.

Die Tabelle 4 veranschaulicht sehr gut den erklärten Sachverhalt der Absorption durch stark pigmentierte, hämoglobinhaltige Organe wie die Leber. Aufgrund der völligen Absorption des Signals in der Leber waren selbst große Tumore im BLI nicht sichtbar. Insgesamt erwies sich die Detektion im BLI als stark lageabhängig.

5.3.2 Größenabhängige Detektion

In diesem Auswertungsansatz sollte untersucht werden, inwiefern die Detektionssensitivität des BLI abhängig von der Größe der Tumorknoten ist. Hierzu wurden sämtliche Tumoren nach ihrer Größe eingeteilt.

Die Tabelle 4 zeigt das Ergebnis dieser Auswertung. Diese Tabelle lässt eine Größenabhängigkeit als wahrscheinlich erscheinen. Je größer ein Tumorknoten ist, desto intensiver stellt sich sein Lichtsignal dar und desto leichter ist er detektierbar.

Zieht man allerdings die Ergebnisse der lokalisationsabhängigen Auswertung hinzu, so wird klar, dass die Lage des Tumorknoten innerhalb des Organismus entscheidender als seine Größe ist. Selbst ein großer Tumor im Bereich des Pankreas wird durch stark pigmentierte Organe wie die Leber vollständig ausgelöscht.

5.3.3 Korrelation zwischen Tumolvolumen und Biolumineszenz Signal

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine enge Korrelation zwischen dem Gewicht von Tumorknoten und dem erfassten Biolumineszenz Signal besteht (Jenkins et al., 2003). Auch wurde eine Korrelation zwischen der injizierten Zellzahl und dem erfassten Biolumineszenz Signal beobachtet (El Hiali et al., 2002).

Ausgehend von diesen Berichten trugen wir das Volumen von Pankreastumoren gegen das entsprechende Biolumineszenz Signal auf. Es zeigte sich, dass in unserem Falle

keine Korrelation zwischen dem Volumen und dem Biolumineszenz Signal besteht. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis. Bei der Studie von Jenkins et al. (2003) handelte es sich um ein Modell mit subkutan implantierten Tumoren, die sich in Hinblick auf Wachstum und Größe sehr ähnlich waren. In unserer Studie wurde durch eine intraperitoneale Injektion von Magenkarzinomzellen eine Peritonealkarzinose erzeugt, was eine größere Heterogenität in Form und Ausbreitung der Tumoren bedingt. Obwohl die Tumoren in unserer Studie alle der gleichen Lokalisation entstammten, besaßen sie sehr unterschiedliche Gestalt und unterschieden sich mitunter beträchtlich in ihrer Ausdehnung. Manche Tumore besaßen eine sehr langgezogene Form von lateral nach medial, was ein entsprechend intensives Signal erzeugte. Andere Tumoren mit gleichem Volumen besaßen ihre größte Ausdehnung von ventral nach dorsal, was zu einem geringeren Signal führte, da große Teile dieser Tumore tiefer im Gewebe lagen. Insgesamt gab es in diesem Auswertungsansatz zu viele Variablen, um eine gute Korrelation zwischen Tumolvolumen und Signal zu erzielen.

Die gleichen Fakten treffen auch auf die Relation zwischen Biolumineszenz Signal und Volumen bei Tumoren der Adominalregion zu.

5.3.4 Wertung

Insgesamt konnten mit Hilfe des Biolumineszenz Imaging 40 von 82 Tumorkläsionen detektiert werden, was einer Overall-Sensitivität von 49% entspricht.

Aufgrund der kurzen Belichtungszeiten von einigen Sekunden bis max. wenigen Minuten können in kurzer Zeit viele Aufnahmen durchgeführt werden (Dickson et al., 2007). Des Weiteren ist das Verfahren außerordentlich kostengünstig. Hierhin liegen entscheidende Vorteile der Methode gegenüber CT, MRT oder PET.

In Studien an subkutanen Tumormodellen zeigte sich eine hohe Sensitivität des Biolumineszenz Imaging (Jenkins et al., 2003). Unsere Ergebnisse bestätigen, dass das Biolumineszenz Imaging ein überaus sensitives Verfahren bei der Beurteilung einer

Peritonealkarzinose ist und selbst sehr kleine Tumorknoten (0,5mm × 0,5mm × 0,2 mm) sehr gut dargestellt werden können, wenn sie oberflächlich liegen.

Ein Nachteil des Biolumineszenz Imaging stellt das Fehlen von anatomischen Informationen dar. Diese Tatsache macht es manchmal schwierig, Lichtsignale ihrem exakten Herkunftsort zuzuordnen. Durch Aufnahmen aus verschiedenen Perspektiven kann dieser Nachteil teilweise kompensiert werden.

Die Abschwächung und Streuung des Biolumineszenzsignals v.a. bei tiefer gelegenen Tumoren ist der bedeutendste limitierende Faktor. Die Signalintensität ist tiefenabhängig (Levin, 2005) und macht es schwieriger, tiefer gelegene Tumorknoten sicher darzustellen.

Die Biolumineszenz Imaging stellt somit eine sehr schnelle, kostengünstige Methode zur in-vivo Darstellung der Peritonealkarzinose dar, die jedoch aktuell nur im Tierversuch zur Anwendung kommt und nur bei oberflächlich gelegenen Tumoren eine hohe Sensitivität besitzt.

5.4 Positronen-Emissions-Tomographie

Der Einsatz der Positronen-Emissions-Tomographie in der tierexperimentellen Forschung war im vorangehenden Jahrzehnt aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung der Scanner fast ausschließlich bei größeren Tieren möglich. In den letzten Jahren konnte jedoch durch neue Detektor-Systeme die räumliche Auflösung so weit verbessert werden, dass die Positronen-Emissions-Tomographie heutzutage auch in einer Vielzahl von Kleintier-Studien zum Einsatz kommt und mittlerweile eines der wichtigsten bildgebenden Verfahren im Feld des small-animal-in-vivo-imaging darstellt (Chatziioannou, 2002). So wurden mit Hilfe des Kleintier-PET bereits Therapieerfolge in verschiedenen Tumormodellen dargestellt (Dorow et al. 2006, Su et al., 2006).

Der von uns bei den PET-Aufnahmen verwendete Tracer ^{18}F -FDG ist in der Onkologie weit verbreitet und findet große Verwendung sowohl im klinischen PET-Einsatz am Menschen als auch in experimentellen Tumormodellen. Er reichert sich aufgrund der gesteigerten Glukose-Aufnahme und des erhöhten Glukose-Stoffwechsels in

Tumorzellen an (Griffin et al., 2004). Die Verwendung von ^{18}F -FDG und des small-animal-scanners MOSAIC von Philips eignete sich sehr gut für diese Studie (Huisman et al., 2007).

Die Positronen-Emissions-Tomographie besitzt eine sehr hohe Sensitivität, und ist in der Lage, picomolare Mengen eines Tracers zu detektieren und zu quantifizieren. Dies ist unabhängig von der Gewebetiefe (Lyons, 2005). So wurde das PET bereits zur Metastasensuche von Ewing-Tumoren (Franzius et al., 2006) oder zur frühen Detektion von Metastasen eines Rhabdomyosarkoms (Nanni et al., 2007) benützt.

In dieser Studie wurde den Mäusen 13 MBq ^{18}F -FDG intraperitoneal injiziert. Die intraperitoneale Injektion wurde der intravenösen vorgezogen, da der geringe Durchmesser der murinen Schwanzvene häufig eine teilweise paravenöse Injektion bedingt. Dies führt unweigerlich zu einer erheblichen Varianz der applizierten Tracermenge. Eine Studie beschreibt vergleichbare Aktivitätskonzentrationen nach i.p. und i.v. Injektionen (Fueger et al., 2006). Die Aufnahmen wurden 3 Stunden nach Injektion durchgeführt. Dieser Zeitpunkt ließ aufgrund der geringen Hintergrundanreicherung eine gute Beurteilung der Aufnahmen zu.

So konnte bei allen Mäusen mit Hilfe des PET die Entwicklung einer Peritonealkarzinose beobachtet werden. Wir beobachteten außerdem die bekannte, hohe Aufnahme von ^{18}F -FDG in Herz, Muskel und braunem Fettgewebe.

5.4.1 Lage- und größenabhängige Auswertung

Von den 10 Tumoren, die am Peritoneum gefunden wurden, konnten 6 detektiert werden. Die nicht-detektierten Tumoren besaßen eine geringe Abmessung (1mm × 1mm × 0,5mm bzw. 2mm × 1mm × 0,5mm) und stellten sich nicht als fokale, eindeutige FDG-Mehranreicherung dar. Gleiches gilt für die nichtdetektierten Tumore am Zwerchfell. Auch sie konnten aufgrund der zu geringen Größe im PET nicht eindeutig dargestellt werden.

Die hohe Sensitivität bei den teilweise auch kleinen Tumoren der Leber (11 von 13 Tumoren detektiert) lässt sich durch die sehr geringe Hintergrundaktivität des Lebergewebes erklären, die für einen sehr guten Kontrast sorgte.

Im Abdominalbereich konnten sowohl im Bereich des Jejunums (16 von 19 Tumoren detektiert) als auch im Bereich des Colons (4 von 5 Tumoren detektiert) gute Ergebnisse erzielt werden. Auch kleine Tumoren mit einem Durchmesser von 1mm konnten hier detektiert werden. Allerdings kam es in dieser Region auch zu 7 falsch positiven Befunden. Insbesondere in der Intraabdominalregion konnten wir diese teils fokale Anreicherung von ^{18}F -FDG in nicht-pathologischem Gewebe beobachten, was zu den falsch positiven Resultaten führte. Die Tumoren am Pankreas ließen sich aufgrund ihrer Größe gut detektieren (15 von 18 Tumoren detektiert). Beim Vorhandensein von zwei Tumoren, die nur 1mm voneinander entfernt lagen, wurden diese in den PET-Aufnahmen aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung als eine Tumorlokalisierung dargestellt (Levin, 2005).

Der in dieser Studie verwendete Tracer ^{18}F -FDG ist ein Glukose-Analogon. Die Aufnahme in die menschliche Zelle erfolgt auf dem gleichen Weg wie Glukose und ist abhängig von der Anzahl der aktiven Glukose-Transporter auf der Zell-Membran. Diese Glukose-Transporter kommen nicht nur in Tumorzellen vor, sondern in ebenfalls hohem Maße in Gehirn, Herz und braunem Fettgewebe (Deroose et al., 2007). Dieses Phänomen konnten auch wir in unseren PET-Aufnahmen bestätigen. Die Anreicherung von FDG in nicht-pathologischen Geweben erschwert die Detektion von Tumorknoten und führt zu falsch-positiven sowie falsch-negativen Befunden. Dies fordert die weitere Evaluation von neuen Tracern wie z.B. dem 3'- ^{18}F -Flour-3'-deoxythymidine (FLT).

F-18-FLT dient als Marker der zellulären Proliferation und wurde 1998 erstmals in der Positronenemissionstomographie eingesetzt. Shields et al. (1998) beobachteten damals sowohl im Tierversuch als auch an einem Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom die spezifische Aufnahme von F-18-FLT in den Tumor und das Knochenmark. Mittlerweile ist F-18-FLT als zuverlässiger Marker der Tumorzellproliferation etabliert und erweist sich z.B. bei der Bildgebung von

Sarkomen dem ^{18}F -FDG überlegen (Buck et al., 2008). Mehrere Studien beschreiben zudem F-18-FLT als frühzeitigen Parameter zur Erfassung von Tumorregression nach Therapie (Waldherr et al., 2005), der sensitiver sei als ^{18}F -FDG (Barthel et al., 2003, Leyton et al., 2005).

Diese neuen Ansätze versprechen eine spezifischere Darstellung vom Proliferationsverhalten und Tumorstoffwechsel in-vivo (Abbey et al. 2006).

Nach Abschluss unserer Studie erschienen Studien über das optimale Handling von Mäusen bei ^{18}F -FDG-PET-Aufnahmen. Das Ziel dieser dort beschriebenen Methoden ist, die Aufnahme in nicht pathologischen Gewebe möglichst gering zu halten und eine möglichst hohe Aufnahme im Tumor zu gewährleisten (Fueger et al., 2006). Diese Studie zeigt, dass nach derzeitigem Stand der Wissenschaft den Tieren in der Nacht vor den Aufnahmen die Aufnahme von Nahrung verwehrt werden sollte. Weiter sollten sie vor und nach der ^{18}F -FDG-Injektion gewärmt werden, um eine möglichst geringe Aufnahme von ^{18}F -FDG in den Skelettmuskel und in das braune Fettgewebe, das sich v.a. im Nackenbereich der Tiere befindet, zu bewirken. Die Tiere sollten zwischen ^{18}F -FDG-Injektion und PET-Aufnahmen nach Möglichkeit narkotisiert bleiben, um eine hohe ^{18}F -FDG-Aufnahme in die Skelettmuskulatur durch Bewegung der Mäuse zu verhindern.

Der Entzug von Nahrung während der Nacht vor den Aufnahmen ist aus tierschutzrechtlichen Gründen durchaus bedenklich. Die wiederholten Narkosen im Rahmen der Studie stellten bereits eine hohe Belastung für die Tiere dar, die wir nicht noch durch den nächtlichen Futterentzug verstärken wollten. Ebenso hätte eine mehrstündige Narkose zwischen Injektion des ^{18}F -FDG und PET-Aufnahme eine unverhältnismässige Belastung für die Nacktmäuse dargestellt, die aufgrund des fehlenden Fells stark durch Auskühlung gefährdet sind.

Aus diesen Gründen wurde in unserer Studie den Mäusen das Futter nicht entzogen, und sie befanden sich während des 3-stündigen Zeitfensters zwischen ^{18}F -FDG-Injektion und Aufnahme nicht in Narkose und durften sich in ihrem Stall frei bewegen. Die daraus resultierende Mehraufnahme von ^{18}F -FDG in das braune Fettgewebe und in die Skelettmuskulatur wirkte sich jedoch bei unserer Studie nicht nachteilig aus, da wir

intraabdominelle Tumoren beurteilten und somit unsere Beurteilung nicht von Hintergrundanreicherungen in Skelettmuskulatur und Nacken erschwert wurde.

Die Auswertung der lage- und größenabhängigen Detektion zeigte, dass sich bei steigenden Tumorumfängen die Sensitivität erhöhte. So konnten zwar bereits im Bereich von 1-2 mm Tumoren zu 61% (29/47) nachgewiesen werden, ab einer Größe von 2-4 mm lag die Sensitivität schon bei 89% (16/18) und bei Tumoren >4mm bei 100%. Dies liegt im Einklang mit der Studie von Kondo et al. (2004), die bessere Ergebnisse des ^{18}F -FDG-PET für Läsionen über 4 mm beschrieben.

5.4.2 Wertung

Insgesamt konnte die PET 58 von 78 Metastasen detektieren und erzielte so eine Overall-Sensitivität von 74%.

Die Positronen-Emissions-Tomographie bestätigte sich in unserer Studie als hochsensitives Verfahren bei der Detektion von Tumorzellabsiedelungen nach intraperitonealer Injektion von Magenkarzinomzellen. Sie konnte eine deutlich höhere Sensitivität als das Biolumineszenz Imaging erzielen. Dies lag v.a. an der lageunabhängigen Detektierbarkeit des PET. Selbst kleine Tumorknoten konnten zu 61% detektiert werden.

Das Fehlen von anatomischen Landmarks kann die Zuordnung von fokalen Mehranreicherungen zu Organen erschweren.

Die teils unspezifische Anreicherung des ^{18}F -FDG führte zu falsch positiven Ergebnissen und fordert die Suche nach neuen Tracern.

5.5 Limitationen der Studie

Eine Limitation dieser Studie stellt das Fehlen eines histologischen Standards dar, sodass kleinste Tumorzellabsiedelungen, die makroskopisch nicht identifiziert wurden, in der Studie nicht berücksichtigt wurden. Jedoch konnten Metastasen im Millimeter-Bereich, der Schwerpunkt dieser Studie, bei der Obduktion und makroskopischen Inspektion sicher entdeckt werden.

Eine Verlängerung der Belichtungszeit im Biolumineszenz Imaging könnte zu einer Steigerung der Sensitivität bei tiefer gelegenen Tumoren führen. Dagegen sprach jedoch die sehr hohe Narkosebelastung der Tiere durch die Aufnahmen mit drei bildgebenden Verfahren.

5.6 Multimodality Imaging

Das optimale bildgebende Verfahren verfügt über bestmögliche räumliche Auflösung, höchste Sensitivität und höchste Spezifität. Des weiteren sollte es nicht-invasiv und in die Klinik übertragbar sein (Rudin et al., 2005). Ein all diese Anforderungen erfüllende Verfahren existiert nicht. Aber durch Kombination von verschiedenen Verfahren kann eine nahezu optimale Bildgebung erreicht werden. Die Kombination von PET, BLI und MRT, wie in dieser Studie, stellt eine hochauflösende, anatomiegetreue Bildgebung für das Verständnis von funktionalen Prozessen zur Verfügung. Auch die Verwendung von speziellen small-animal-CTs als morphologische Bildgebung bietet sich in diesem Zuge an.

Das Konzept in dieser Studie stellt einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Tumormodelle dar und kann zur Beurteilung der Wirksamkeit von neuartigen Therapiekonzepten verwendet werden. Tumorwachstum sowie Regression nach verschiedenen Therapieschemata könnten so besser beurteilt werden.

6. Zusammenfassung

Nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels PET und Biolumineszenz Imaging sowie Bewertung der beiden Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität

Die Darstellung einer Peritonealkarzinose stellt aufgrund der geringen Größenverhältnisse noch immer eine große Herausforderung dar. Ziel dieser Studie war die möglichst frühzeitige, nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels Positronenemissionstomographie und Biolumineszenz Imaging sowie der Vergleich der beiden Methoden in Hinblick auf ihre Sensitivität bei der Detektion von Läsionen in Abhängigkeit von ihrer Größe und Lokalisation. Es wurde ein Mausmodell entwickelt, das durch die Verwendung der mit dem Luciferase-Gen transfizierten Magenkarzinomzell-Linie HSC-45-M2-luc einen Vergleich der Sensitivität der PET und des BLI ermöglichte.

Humane Magenkarzinomzellen (HSC45-M2), stabil mit dem Gen für Firefly Luciferase transfiziert (HSC45-M2-luc), wurden Nacktmäusen intraperitoneal appliziert (1×10^7 HSC45-M2-luc-Zellen pro Maus). PET- und Biolumineszenz Imaging-Aufnahmen erfolgten entweder an Tag 3 und 4 oder an Tag 6 und 7 nach Zellinokulation. Die bei der anschließenden Autopsie gefundenen Tumorknoten dienten als Referenz für die Bewertung der Bildgebung. Die PET-Aufnahmen erfolgten mit einem small animal PET scanner (Philips) mit einer räumlichen Auflösung von 2,5 mm, 3 h nach der intraperitonealen Injektion von 13 MBq ^{18}F -FDG pro Maus. Die Darstellung der Biolumineszenz erfolgte mittels einer CCD-Kamera mit Bildverstärker, 10 min nach der i.p. Injektion von 300 μl Luciferin. Die Auswertung erfolgte sowohl größen- als auch lageabhängig.

Mit Hilfe des BLI konnten 40 von 82 Tumoren dargestellt werden, was einer Sensitivität von 49% entspricht. Die Sensitivität erwies sich als stark lageabhängig. So konnten alle oberflächlich gelegenen Knoten selbst bei einer Größe von nur 1-2mm

sehr gut dargestellt werden, während deutlich größere, tief in der Bauchhöhle liegende Tumoren nicht darstellbar waren.

Mittels PET konnten 58 von 78 Läsionen dargestellt werden, was einer Sensitivität von 74% entspricht. Läsionen mit einer Größe von 1-2mm konnten bereits in über 60% der Fälle detektiert werden, Tumorknoten in der Größe zwischen 2-4mm waren zu 89% detektierbar, Tumorknoten > 4mm zu 100% detektierbar. Die Detektion zeigte sich als lageunabhängig.

Biolumineszenz Imaging ist in der Lage, oberflächlich gelegene Tumoren sehr früh und zuverlässig darzustellen. Die Darstellung tiefer liegender Tumoren ist dagegen schwierig. PET stellte die sensitivste Methode in dieser Studie dar und erweist sich als eine sehr vielversprechende Methode auch im Mausmodell. Eine Kombination der beiden bildgebenden Verfahren stellt einen vielversprechenden experimentellen Ansatz zur Beurteilung von Tumorwachstum und Tumorausbreitung dar.

Literaturverzeichnis:

Abbey CK, Borowsky AD, Gregg JP, Cardiff RD, Cherry SR
Preclinical Imaging of Mammary Intraepithelial Neoplasia
with Positron Emission Tomography
J Mammary Gland Biol Neoplasia (2006) 11: 137–149

Bennett 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

Barthel H, Cleij MC, Collingridge DR, Hutchinson OC, Osman S, He Q, Luthra
SK, Brady F, Price PM, Aboagye EO
3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response
to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography.
Cancer Res. 2003 Jul 1; 63(13): 3791-8

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

Buck AK, Herrmann K, Büschenfelde CM, Juweid ME, Bischoff M, Glatting G, Weirich G, Möller P, Wester HJ, Scheidhauer K, Dechow T, Peschel C, Schwaiger M, Reske SN.

Imaging bone and soft tissue tumors with the proliferation marker [18F]fluorodeoxythymidine.

Clin Cancer Res. 2008 May 15;14(10):2970-7. Epub 2008 Apr 29.

Chatziioannou A.

Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs

Eur J Nucl Med 2002; 29:98-114

Contag H., Bachmann M.

Advances in vivo Bioluminescence Imaging of Gene Expression

Annu. Rev. Biomed. Engl. 2002, 4: 235-60

Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M.

Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005 May; 32(5): 601-14

Czech N., Brenner W., Kampen W.U., Henze E.

Die diagnostische Wertigkeit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in der klinischen Onkologie

Deutschen Medizinischen Wochenschrift 2000,125 (18): 565-567

D'Angelica M, Gonen M, Brennan MF, Turnbull AD, Bains M, Karpeh MS

Patterns of initial recurrence in completely resected gastric adenocarcinoma.

Ann Surg. 2004 Nov; 240 (5): 808-16

de Bree E, Koops W, Kröger R, van Ruth S, Witkamp AJ, Zoetmulder FA
Peritoneal carcinomatosis from colorectal or appendiceal origin: correlation of
preoperative CT with intraoperative findings and evaluation of interobserver
agreement.

J Surg Oncol. 2004 May 1; 86 (2): 64-73

Delbeke D.

Oncological applications of FDG PET imaging.

J Nucl Med. 1999 Oct; 40 (10): 1706-15

Dickson P., Hamner B., Ng C., Hall M., Zhou J., Hargrove P., McCarville M.,
Davidoff A.

In vivo bioluminescence imaging for early detection and monitoring of disease
progression in a murine model of neuroblastoma

Journal of Pediatric Surgery (2007) 42, 1172-1179

Dorow D.S., Cullinane C., Conus N., Roselt P., Binns D., McCarthy T.J.,
McArthur G.A. and Hicks R.J.,

Multitracer small animal PET imaging of the tumour response to the novel pan-
Erb-B inhibitor CI-1033.

Eur J Nucl Med Mol Imaging, 33: 441-452, 2006

Drieskens O, Stroobants S, Gysen M, Vandenbosch G, Mortelmans L, Vergote I.

Positron emission tomography with FDG in the detection of peritoneal and
retroperitoneal metastases of ovarian cancer

Gynecol Obstet Invest. 2003; 55(3): 130-4

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.

El Hiali N., Rubio N., Martinez-Villcampa M., Blanco J.
Combined Noninvasive Imaging and Luminometric Quantification of Luciferase-
Labeled Human Prostate Tumors and Metastases
Lab Invest. 2002 Nov; 82 (11): 1563-71

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P.
Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006
Ann Oncol. 2007 Mar;18(3):581-92. Epub 2007 Feb 7

Fischman AJ, Alpert NM.
FDG-PET in oncology: there's more to it than looking at pictures.
J Nucl Med. 1993 Jan; 34 (1): 6-11.

Franzius C, Hotfilder M, Poremba C, Hermann S, Schäfers K, Gabbert HE,
Jürgens H, Schober O, Schäfers M, Vormoor J.
Successful high-resolution animal positron emission
tomography of human Ewing tumours and their metastases
in a murine xenograft model
Eur J Nucl Med Mol Imaging (2006) 33:1432–1441

Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, Phelps ME,
Weber WA.
Impact of animal handling on the results of ¹⁸F-FDG PET studies in mice.
J Nucl Med. 2006; 47: 999–1006.

Griffin J.L., Shockcor J.P.
Metabolic profiles of cancer cells
Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 551-561

Hajnal, J.; Hill, D. L. G. & Hawkes, D. J.

Medical Image Registration

CRC Press, 2001

Hastings JW.

Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review.

Gene 1996; 173:5-11.

Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H.

Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies.

Int J Cancer. 2005 Nov 10; 117 (3): 435-43.

Hughes JM.

¹⁸F-fluorodeoxyglucose PET scans in lung cancer.

Thorax. 1996 Aug; 51 Suppl 2: S16-22.

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

Huisman MC, Reder S, Weber AW, Ziegler SI, Schwaiger M

Performance evaluation of the Philips MOSAIC small animal PET scanner

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007 Apr; 34 (4): 532-40.

Jenkins D., Oei Y., Hornig Y., Yu S., Dusich J., Purchio T., Contag P.
Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of
tumor growth and metastasis
Clinical & Experimental Metastasis 20: 733–744, 2003.

Jenkins DE, Yu SF, Hornig YS, Purchio T, Contag PR.
In vivo monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-
luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer.
Clin Exp Metastasis. 2003; 20 (8): 745-56

Kondo S, Hosono MN, Wada Y, Ishii K, Matsumura A, Takada Y, Tashiro M,
Okamura T, Fukuda H, Yamada R, Watanabe Y, Inoue Y
Use of FDG-micro PET for detection of small nodules in a rabbit model of
pulmonary metastatic cancer
Ann Nucl Med. 2004 Feb; 18 (1): 51-7.

Koo V, Hamilton PW, Williamson K.
Non-invasive in vivo imaging in small animal research.
Cell Oncol. 2006; 28 (4): 127-39

Kuwabara H, Gjedde A
Measurements of glucose phosphorylation with FDG and PET are not reduced by
dephosphorylation of FDG-6-phosphate.
J Nucl Med. 1991 Apr; 32 (4): 692-8

Levin S.
Primer on molecular imaging technology
Eur J Nucl Med Mol Imaging (2005) 32: S325–S345

Lewis J., 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

Leyton J, Latigo JR, Perumal M, Dhaliwal H, He Q, Aboagye EO
Early detection of tumor response to chemotherapy by 3'-deoxy-3'-
[18F]fluorothymidine positron emission tomography: the effect of cisplatin on a
fibrosarcoma tumor model in vivo
Cancer Res. 2005 May 15; 65 (10): 4202-10

Links JM
Advances in nuclear medicine instrumentation: considerations in the design and
selection of an imaging system.
Eur J Nucl Med. 1998 Oct; 25 (10): 1453-66.

Lim L, Michael M, Mann GB, Leong T.
Adjuvant therapy in gastric cancer.
J Clin Oncol. 2005 Sep 1; 23 (25): 6220-32.

Loening AM, Gambhir SS.
AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis.
Mol Imaging 2003;2: 131-7

Lordick F., Siewert JR
Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review,
Gastric Cancer. 2005; 8 (2): 78-85

Lyons S.

Advances in imaging mouse tumour models in vivo
Journal of Pathology 2005; 205: 194-205

Nanni C, Di Leo K, Tonelli R, Pettinato C, Rubello D, Spinelli A, Trespidi S,
Ambrosini V, Castellucci P, Farsad M, Franchi R, Pession A, Fanti S.

FDG small animal PET permits early detection
of malignant cells in a xenograft murine model
Eur J Nucl Med Mol Imaging (2007) 34: 755–762

Nashimoto A, Yabusaki H, Nakagawa S.

Evaluation and problems of follow-up surveillance after curative gastric cancer
surgery
Nippon Geka Gakkai Zasshi. 2007 May; 108 (3): 120-4.

Oriuchi N, Higuchi T, Ishikita T, Miyakubo M, Hanaoka H, Iida Y, Endo K.

Present role and future prospects of positron emission tomography in clinical
oncology
Cancer Sci. 2006 Dec; 97 (12) :1291-7

Ostertag H.

Grundlagen der Positronenemissionstomographie
Radiologie 29:315-317, 1989

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P

Global cancer statistics, 2002.
CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr; 55 (2): 74-108

Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, et al.
Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo
bioluminescence imaging.

Neoplasia 2000; 2: 491-5

Robert-Koch-Institut, Berlin, Krebs in Deutschland, 5.Auflage, 2006

Rudin M., Rausch M., Stoekli M.

Molecular Imaging in Drug Discovery and Development: Potentials and
Limitations of Nonnuclear Methods

Mol Imaging Biol (2005) 7: 5-13

Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J,
Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL, François Y,
Vignal J, Gilly FN.

Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the
EVOCAPE 1 multicentric prospective study

Cancer. 2000 Jan 15; 88 (2): 358-63

Sadikot RT, Blackwell TS

Bioluminescence imaging.

Proc Am Thorac Soc. 2005; 2 (6): 537-40, 511-2

Saur D, Seidler B, Schneider G, Algül H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R,
Schwaiger M, Schmid RM

CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of
pancreatic cancer.

Gastroenterology. 2005 Oct; 129 (4): 1237-50

Sendler A, Siewert JR

Individualizing therapy in gastric cancer.

Expert Rev Anticancer Ther. 2003 Aug; 3 (4): 457-70

Shields AF, Grierson JR, Dohmen BM, Machulla HJ, Stayanoff JC, Lawhorn-Crews JM, Obradovich JE, Muzik O, Mangner TJ.

Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography.

Nat Med. 1998 Nov; 4 (11): 1334-6

Siewert JR, Lordick F, Ott K, Brücher BL, Rosenberg R.

Curative vs palliative strategies in locoregional recurrence of gastrointestinal malignancies

Chirurg. 2006 Mar; 77 (3): 227-35

Su H., Bodenstein C., Dumont R., Seimbille Y., Dubinett S., Phelps M., Herschman H., Czernin J., Weber W.

Monitoring Tumor Glucose Utilization by positron Emission Tomography for the Prediction of Treatment Response to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitor

Clin Cancer Res 2006; 12 (19) 5659-5667

Suzuki A, Kawano T, Takahashi N, Lee J, Nakagami Y, Miyagi E, Hirahara F, Togo S, Shimada H, Inoue T.

Value of 18F-FDG PET in the detection of peritoneal carcinomatosis

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Oct; 31 (10):1413-20. Epub 2004 Jun 16

Tanaka T, Kawai Y, Kanai M, Taki Y, Nakamoto Y, Takabayashi A.

Usefulness of FDG-positron emission tomography in diagnosing peritoneal recurrence of colorectal cancer.

Am J Surg. 2002 Nov; 184 (5): 433-6

Turlakow A, Yeung HW, Salmon AS, Macapinlac HA, Larson SM
Peritoneal carcinomatosis: role of (18)F-FDG PET.
J Nucl Med. 2003 Sep; 44 (9): 1407-12.

Wahl RL.
Targeting glucose transporters for tumor imaging: "sweet" idea, "sour" result.
J Nucl Med. 1996 Jun; 37(6): 1038-41

Waldherr C, Mellinghoff IK, Tran C, Halpern BS, Rozengurt N, Safaei A, Weber
WA, Stout D, Satyamurthy N, Barrio J, Phelps ME, Silverman DH, Sawyers CL,
Czernin J.
Monitoring antiproliferative responses to kinase inhibitor therapy in mice with 3'-
deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET
J Nucl Med. 2005 Jan; 46 (1): 114-20.

Warburg O.
The metabolism of tumors
London: constable & Co.; 1930

Weber, W.A., S. Ziegler, R. Thödtmann, A.-R. Hanauske, M. Schwaiger:
Reproducibility of Metabolic Measurements in Malignant Tumors Using FDG
PET.
J Nucl Med 40 (1999), 1771-7

Weissleder R.
Scaling Down Imaging: Molecular Mapping of Cancer in Mice
Nat Rev Cancer. 2002 Jan; 2 (1): 11-8

7. Literaturverzeichnis

Wilson T, Hastings JW

Bioluminescence.

Annu Rev Cell Dev Biol. 1998; 14:197-230. Review. 1998

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.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas, die immer kompetente und stets freundliche und geduldige Unterstützung während der gesamten Durchführung und Erstellung dieser Arbeit, sowie für die Möglichkeit, die Arbeit auf internationalen Kongressen zu präsentieren.

Herrn Dr. Christoph Seidl danke herzlichst ich für sämtliche Hilfe im Umgang mit den Zellkulturen sowie für zahlreiche Diskussionen, Anregungen, Hilfestellungen und Verbesserungen im Rahmen dieser Arbeit.

Frau Dr. Roswitha Beck danke ich sehr sowohl für die große Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche als auch für die Vielzahl an Anregungen und Lösungsvorschläge während der Experimente.

Herrn PD Dr. Jens Stollfuß möchte ich für die kompetente und immer pragmatische Unterstützung aus radiologischer Sicht danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Matthias Buchhorn für die ausführliche Einarbeitung in dieses Thema sowie für seine Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Meinem Freund und Kollegen Matthias Abenstein möchte ich ganz herzlich für sämtliche Hilfe und Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit danken.

Sämtlichen Mitarbeitern der Forschungsgruppe von Frau Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München danke ich für ein immer kollegiales und sehr freundliches Arbeitsumfeld sowie für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Experimente.