

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar

**In vivo Evaluation des Thymidinanalogons
3´-[¹⁸F]Fluoro-3´-Desoxythymidin als Surrogatparameter für die
frühe Responseprädiktion des malignen Lymphoms**

Jürgen den Hollander

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. Priv.- Doz. Dr. A. K. Buck
2. Univ.- Prof. Dr. H.-J. P. Wester

Die Dissertation wurde am 14.12.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.04.2010 angenommen.

Inhalt

0	Abkürzungsverzeichnis.....	4
1	Einleitung.....	7
1.1	Geschichte und Wirkmechanismus der Positronenemissionstomographie mit dem Tracers [¹⁸ F]FLT.....	7
1.2	Fragestellung und Zielsetzung	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Synthese von [¹⁸ F]FLT	16
2.2	Methodik der tierexperimentellen Studie	16
2.2.1	Tiermodell.....	16
2.2.2	Zellkultur, Xenotransplantation der Lymphoms.....	17
2.2.3	Tumorzellenmessung und Therapieschema.....	17
2.2.4	Bildgebung im Kleintier-PET.....	18
2.2.5	Bildbearbeitung und semiquantitative Bestimmung der [¹⁸ F]FLT-Anreicherung mittels Bildanalyse	20
2.2.6	Ex vivo Messung der FLT-Anreicherung mittels Gammacounter.....	21
2.2.7	Histologie und immunhistochemische Untersuchungen	21
2.2.8	Statistik.....	22
2.3	Methodik der klinischen Studie	23
2.3.1	Patientenkollektiv.....	23
2.3.2	Histologische Klassifikation	24
2.3.3	Therapieprotokoll.....	25
2.3.4	Molekulare / funktionelle Bildgebung mit PET	28
2.3.5	PET Datenanalyse.....	28
2.3.6	Klinische Evaluation des Therapieerfolgs und Follow-Up.....	29
2.3.7	Statistik.....	30

3	Ergebnisse.....	31
3.1	Tierexperimentelle Studie	31
3.1.1	Effekte der Chemotherapie auf die Tumorgröße	31
3.1.2	Frühe Beurteilung des Therapieeffekts mit [¹⁸ F]FLT-PET.....	33
3.1.2	Validierung der [¹⁸ F]FLT-PET Ergebnisse mittels ex vivo Aktivitätsmessung	37
3.1.3	Histologie und Immunhistochemie.....	38
3.2	Klinische Studie.....	39
3.2.1	Patienten	39
3.2.2	Beurteilung des Therapieansprechens mit [¹⁸ F]FLT-PET 7 und 40 Tage nach R-CHOP/CHOP (Gruppe (1)).....	41
3.2.3	Beurteilung des Therapieansprechens mit [¹⁸ F]FLT-PET 2 Tage nach Rituximab und 2 Tage nach CHOP (Gruppe (2)).....	43
3.2.4	Beurteilung des klinischen Therapieansprechens und Verlaufsbeobachtung	46
3.2.5	Korrelation der klinischen Beurteilung des Therapieansprechens mit der Beurteilung durch eine [¹⁸ F]FLT-PET-Untersuchung.....	47
4	Diskussion	48
4.1	Vergleich der Möglichkeiten zur Überwachung des Therapieansprechens bei malignen Lymphomen.....	48
4.2	Diskussion der tierexperimentellen Studie	50
4.3	Diskussion der klinischen Studie.....	57
4.4	Limitationen und unbeantwortete Fragen beim Einsatz von [¹⁸ F]FLT-PET	59
4.5	Neue experimentelle Herangehensweisen zur Messung der Proliferationsaktivität durch molekulare Bildgebung.....	62
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Danksagung	77

0 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
[¹⁸ F]FDG	2'-[¹⁸ F]Fluoro-2'-Desoxy-D-Glukose
[¹⁸ F]FLT	3'-[¹⁸ F]Fluoro-3'-Desoxythymidin
[¹⁸ F]FMAU	2'-[¹⁸ F]Fluoro-5-Methyl-1-β-D-Arabinofuranosyl-Uracil
[¹¹ C]FMAU	2'-[¹¹ C]Fluoro-5-Methyl-1-β-D-Arabinofuranosyl-Uracil
[⁷⁶ Br]FBAU	1-(2'-Deoxy-2'-Fluoro-β-D-Arabinofuranosyl)-5-[⁷⁶ Br]-Bromouracil
Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (erworbenes Immundefektsyndrom)
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin
CD	cluster of differentiation (Differenzierungscluster auf Leukozyten)
CHOP	Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
CO ₂	Kohlendioxid
CR	complete remission (komplette Remission)
CT	Computertomographie / -gramm / -graph
d	Tag
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
FCS	fetales Kälberserum
FL	Follikuläres Lymphom
FLT	3'-Desoxy-3'-Fluorothymidin
FLTMP	FLT-Monophosphat (FLT siehe dort)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
KG	Körpergewicht
LI	Labelingindex (Markierungsindex)
MALT	mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe

mDNA	mitochondriale DNA (siehe dort)
MRT	Magnetresonanztomographie / -gramm / -graph
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hogdkin-Lymphom
NRTI	Nukleosidartige Reverse Transkriptase Inhibitoren
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen (Nukleäres Antigen proliferierender Zellen = Proliferationsmarker)
PD	progressive disease (fortschreitende Erkrankung)
PET	Positronenemissionstomographie / -gramm /-graph
PR	partial remission (partielle Remission)
r	Korrelationskoeffizient
R-CHOP	Chemotherapieschema nach dem CHOP (siehe dort) + Rituximab
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
s.c.	subcutan
SCID	severe combined immunodeficiency (schwere kombinierte Immundefizienz)
SD	Standardabweichung
SUV	standard uptake value
Tab.	Tabelle
TBR	tumor background ratio (Tumor-Hintergrund-Quotient)
TdR	Thymidin
TK1	Thymidinkinase 1
TK2	Thymidinkinase 2
TMP	Thymidinmonophosphat
TMR	tumor muscle ratio (Tumor-Muskel-Quotient)
TP	Thymidinphosphorylase
TS	Thymidinsynthetase
TTP	Thymidintriphosphat
V	Volumen

WB

Wertebereich

WHO

World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Wirkmechanismus der Positronenemissionstomographie mit dem Tracers [¹⁸F]FLT

Die Positronenemissionstomographie hat in den letzten Jahren einen starken Aufschwung in der medizinischen Diagnostik erlebt. Sie wird hauptsächlich in den Fächern Neurologie, Kardiologie und Onkologie eingesetzt. Nach Injektion eines Positronen emittierenden Nuklids wird seine Anreicherung im Körper mit einer Ortsauflösung im Millimeterbereich gemessen. Dies ist möglich, da das emittierte Positron in nächster Nähe mit einem Elektron reagiert und sich die Teilchen dabei gegenseitig vernichten. Die Energie entweicht in Form von zwei Photonen, die sich genau in entgegengesetzter Richtung (180°) vom Reaktionsort wegbewegen. Die ringförmig um den Patienten angeordneten Detektoren registrieren nun diese Photonen. Aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung der Messereignisse wird wiederum auf die räumliche Verteilung des zerfallenden Nuklids im Körperinneren geschlossen und eine Serie von Schnittbildern errechnet. Diese Technik der Positronenemissionstomographie ist bereits validiert und schon seit Jahren im klinischen Einsatz.

Es hängt von den Eigenschaften des einzelnen Tracers ab, d.h. von dem Molekül das radioaktiv markiert wurde, welche zellulären Stoffwechselforgänge adressiert werden und aufgrund dessen wo er sich im Körper vermehrt anreichert. Viele Tracer sind im Körper vorhandenen Metaboliten und Botenstoffen in ihrer Struktur ähnlich, jedoch meist nicht komplett gleich (siehe Abb. 1). Um nun eine Anreicherung in einem bestimmten Areal interpretieren zu können, ist es auf der einen Seite wichtig die Stoffwechselforgänge des Ursprungsmetaboliten zu kennen. Noch wichtiger ist es jedoch auf der anderen Seite genau die individuellen biochemischen Eigenschaften, den Metabolismus und die Pharmakokinetik des Tracers selbst heraus zu finden. Der meist erforschte und klinisch etablierte Tracer ist [¹⁸F]FDG.

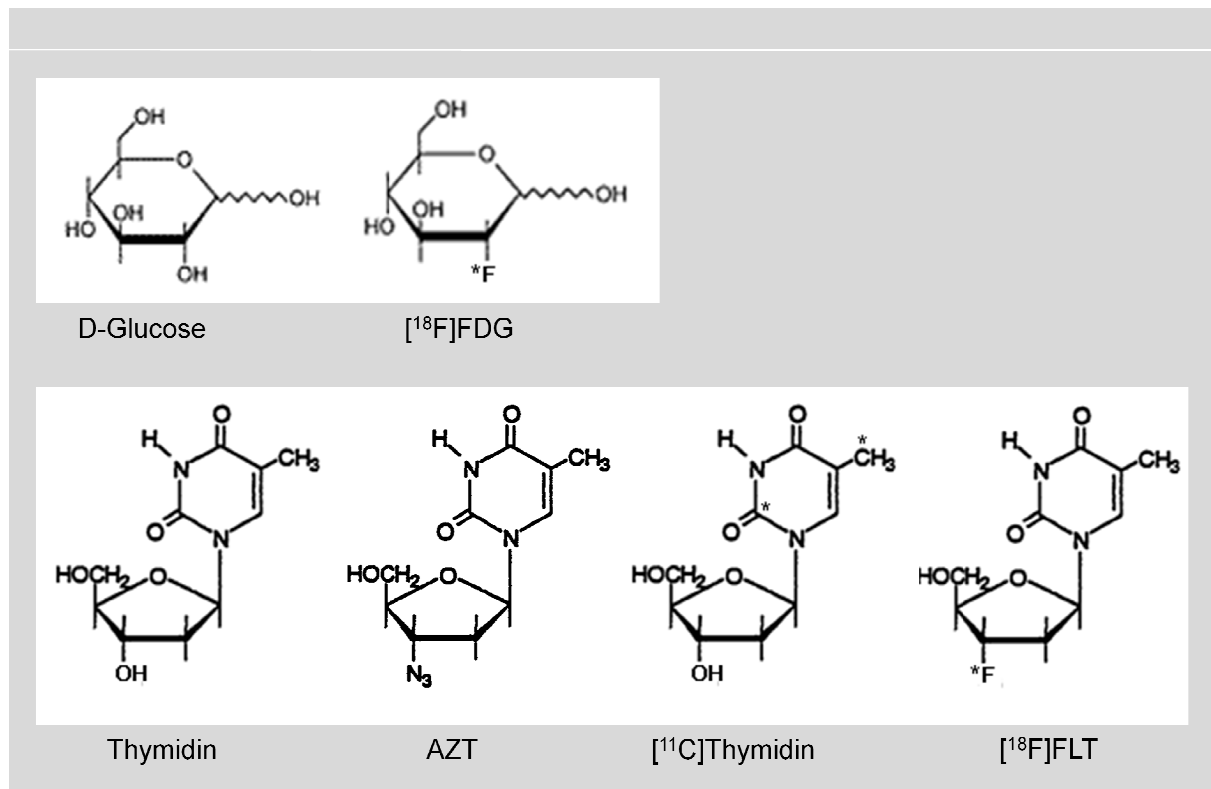


Abb. 1: Molekulare Struktur von den Metaboliten D-Glucose und Thymidin und den korrespondierenden Radiopharmaka [^{18}F]FDG und [^{11}C]Thymidin bzw. [^{18}F]FLT, sowie des pharmakologisch genutzten Azidothymidin (AZT). * = Lokalisation des radioaktiven Nuklids. Adaptiert und erweitert nach Bading et al.⁴

Den Weg zur Entdeckung des Tracers [^{18}F]FLT bahnte die Entwicklung antiretroviraler Medikamente gegen HIV. Nach der Entdeckung von Zidovudin (= Azidothymidin, AZT) versuchte man weitere Thymidinanaloga als Nukleosidartige Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) zu synthetisieren. Alovudin (= 3'-Deoxy-3'-Fluorothymidin, FLT) ist ein Beispiel, welches es bis in die klinische Erprobung schaffte. Jedoch musste eine Phase I Studie 1994 bei Patienten mit AIDS abgebrochen werden, da es bei der Gabe von FLT in einer klinisch wirksamen Dosierung zu verstärkter Toxizität kam²⁶. Man lernte jedoch auch, dass es in geringer Dosierung, wie sie bei einer PET-Untersuchung von Nöten ist, völlig unbedenklich gegeben werden kann. Daraufhin wurden verschiedene Wege entwickelt FLT, mit positronenemittierendem Fluor (^{18}F) zu markieren.

1998 wurde [^{18}F]FLT erstmalig von Shields et al. als neuer PET-Tracer eingesetzt. Man erhoffte sich Rückschlüsse auf die Proliferationskinetik eines Gewebes. Die ersten tierexperimentellen und klinischen Studien erbrachten dann auch

kontrastreiche Bilder mit einer hohen Anreicherung in stark proliferierendem Gewebe sowie in Tumoren^{65, 84}.

Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass [¹⁸F]FLT in der Zelle akkumuliert. Durch unspezifische Nukleosidtransporter gelangt es in die Zelle. Ähnlich wie [¹⁸F]FDG durch die Hexokinase wird [¹⁸F]FLT hauptsächlich durch die zellzyklusabhängige Thymidinkinase 1 (TK1), sehr viel weniger durch die mitochondriale, zyklusunabhängige Thymidinkinase 2 (TK2), ATP-abhängig phosphoryliert und kann die Zelle dadurch nicht mehr verlassen^{7, 40, 53, 57}. Da das Fluor an der 3'-Position der Ribose von [¹⁸F]FLT eingefügt ist, führt es beim Einbau in DNA zum Kettenabbruch. Hier spiegelt sich seine Wirkung als antivirales Medikament wieder: das Übersetzen der viralen RNA in DNA sollte somit gehemmt werden^{7, 40, 57}. In weiterführenden Untersuchungen fand sich jedoch nur wenig [¹⁸F]FLT in der Kern-DNA der Zellen, die dem Tracer ausgesetzt waren^{7, 40, 57}. Dies ist durch eine sehr geringe Affinität von [¹⁸F]FLT an die Enzyme der zelleigenen DNA-Synthese zu erklären. Der normale Replikationsvorgang der Zelle wird somit durch den Tracer wenig beeinflusst. Durch das Fluor an der 3'-Position der Ribose ergibt sich noch ein weiterer essentieller Effekt: sie verhindert das Angreifen der Thymidinphosphorylase und damit den intrazellulären Abbau von [¹⁸F]FLT. Daraus folgt, dass der Tracer zwar beim Eintreten in die Zelle und mit seiner Phosphorylierung seinem Ursprungsmolekül, dem Thymidin, gleicht, dann jedoch weder abgebaut wird, noch weiter metabolisiert wird, noch die Zelle wieder verlassen kann. Dieser Einschluss des Tracers in die Zelle wird als „Trapping“ bezeichnet und findet in analoger Weise auch bei dem Tracer [¹⁸F]FDG statt (siehe Abb. 2a und b).

Dieser Effekt erklärt die oben erwähnten kontrastreichen Bilder mit einer hohen Anreicherung im Gewebe und geringem Rauschen durch unspezifische Verteilung von signalgebenden Tracermetaboliten im Blut. Beim Vorgänger [¹¹C]Thymidin, der ebenfalls zur in vivo Proliferationsmessung eingesetzt wurde, erzeugten die durch seinen Abbau entstehenden Metaboliten, die die Zelle ungehindert wieder verlassen konnten, eine störend hohe Hintergrundaktivität. Zudem begrenzte die kurze Halbwertszeit des ¹¹C von 20 Minuten den breiten Einsatz im klinischen Alltag^{65, 66, 74,}

83.

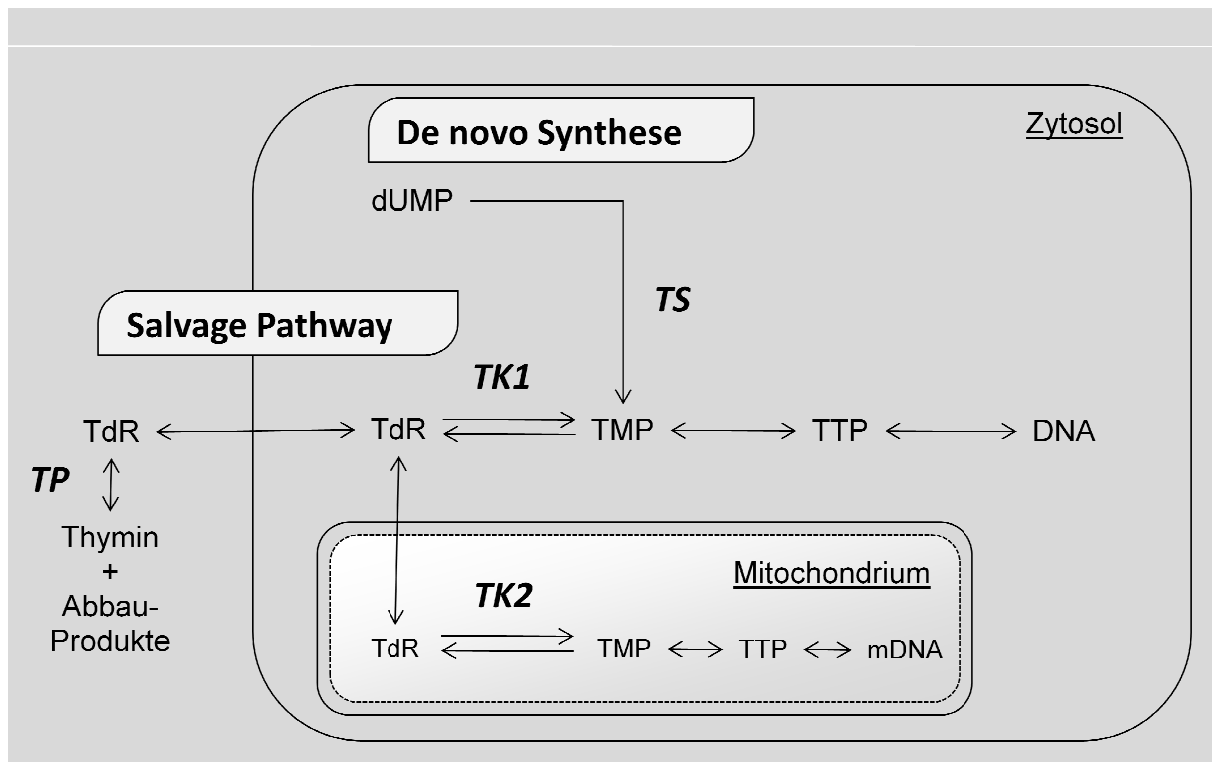


Abb. 2a: Normaler Thymidinmetabolismus in vereinfachter Darstellung (TdR = Thymidin, dUMP = Desoxyuridinmonophosphat, TMP = Thymidinmonophosphat, TTP = Thymidintriphosphat). Die Enzyme stehen in kursiver Schrift über den katalysierten Reaktionen: TS = Thymidinsynthetase, TK1 = Thymidinkinase 1, TK2 = Thymidinkinase 2, TP = Thymidinphosphorylase. Adaptiert nach Bading et al.⁴

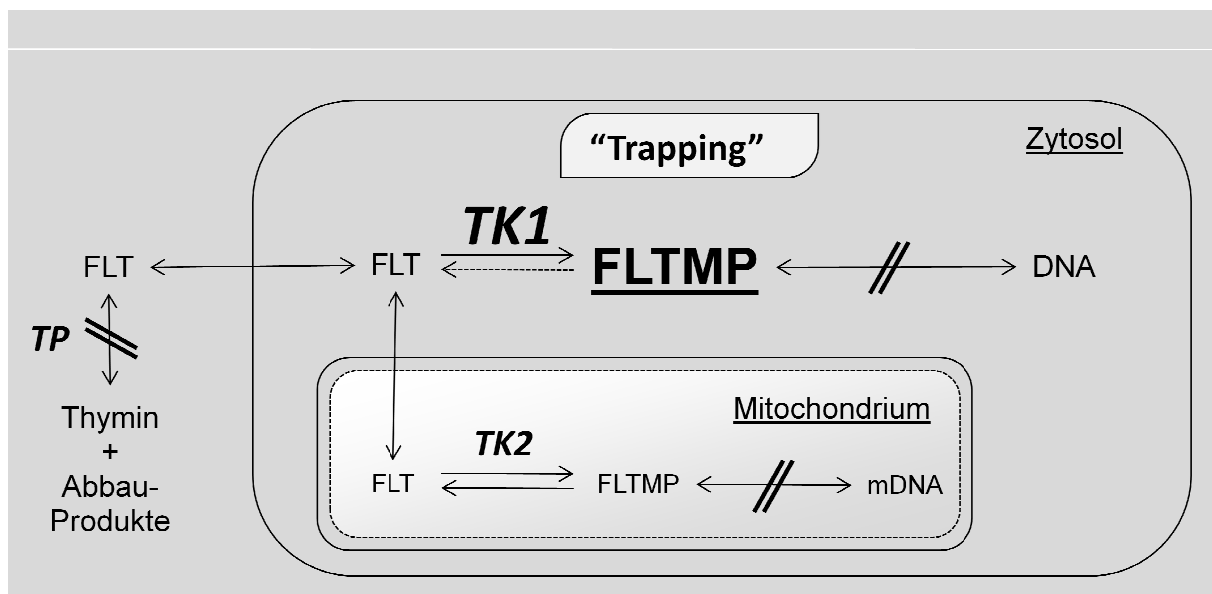


Abb. 2b: Intrazelluläres „Trapping“ von $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$. Das Enzym Thymidinkinase 1 (TK1) wird in proliferierenden Zellen hochreguliert und katalysiert die Phosphorylierung von $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ zu $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Monophosphat (FLTMP), welches nicht mehr aus der Zelle entweichen kann und sich nun anhäuft, da es kaum in die DNA eingebaut wird. Zudem ist $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ durch seine molekulare Struktur gegenüber seinem eigenen Abbau durch die Thymidinphosphorylase (TP) resistent. Adaptiert nach Bading et al.⁴

Nun ist weiterhin nachzuweisen, dass [¹⁸F]FLT tatsächlich die Proliferation von Zellen widerspiegelt. Stark proliferierende Zellpopulationen befinden sich zu einem hohen Prozentsatz im Zellzyklus. Zunächst wird dabei in der S-Phase die DNA verdoppelt. Hierfür werden vermehrt Nukleotide benötigt, die normalerweise aus dem Blut zellzyklusabhängig, verstärkt in der S-Phase, in die Zelle aufgenommen werden. Obwohl [¹⁸F]FLT nur wenig in die DNA (0,2%) eingebaut wird, korreliert seine Aufnahme eindeutig ($r = 0,88$) mit der von Thymidin in Zellen mit verschiedener Proliferationskinetik. Dies zeigen Vergleichsuntersuchungen mit dem Thymidinanalogon [³H]Thymidin, das entsprechend dem nativen Molekül Thymidin in die DNA (90%) eingebaut wird⁷⁹. Daraus schloss man, dass der zelluläre Bedarf an Thymidin durch das Schlüsselenzym, die Thymidinkinase 1 (TK 1), reguliert wird und somit mit der Zellproliferation korreliert^{25, 40, 53, 57}. Man konnte auch zeigen, dass die Expression dieser Kinase spezifisch in der S-Phase stark hochreguliert wird^{25, 63}. Es ist bekannt, dass viele Tumorarten dieses Enzym überexprimieren und sich dadurch gut mit [¹⁸F]FLT darstellen lassen. Für folgende Tumorarten wie Mammakarzinome, Lungenkarzinome, Larynxkarzinome, kolorektale Karzinome, Sarkome und Melanome ist dies bereits gezeigt^{10, 17-19, 24, 27, 70}. In entnommenem humanem Tumorgewebe kann die Proliferationsrate konventionell, zum Beispiel mit dem etablierten Marker Ki-67 durch immunhistochemische Färbung bestimmt werden. Vergleicht man nun die Proliferationsrate eines Tumors gemessen mit Ki-67 und die [¹⁸F]FLT-Anreicherung innerhalb des Tumors so erhält man, wie schon in mehreren Studien gezeigt, hohe Korrelationskoeffizienten ($r = 0,84$; $r = 0,92$)^{12, 84}.

Nicht zuletzt muss vor der Beurteilung des Nutzens eines Tracers die klinische Einsetzbarkeit und die Unbedenklichkeit des Radiopharmakons [¹⁸F]FLT gezeigt werden bzw. etwaige Belastungen für den Patienten quantifiziert werden. Die Halbwertszeit von ¹⁸F ist mit 110min gleich der von [¹⁸F]FDG und ist für den Einsatz in der klinischen Routine gut geeignet. Die toxikologische Unbedenklichkeit in der Dosierung, wie sie bei der Diagnostik eingesetzt wird, war wie oben genannt schon vor der Nutzung von [¹⁸F]FLT als Tracer bekannt^{26, 49}. Der Aufwand der Synthese von [¹⁸F]FLT unterscheidet sich heute kaum mehr vom kommerziell erhältlichen [¹⁸F]FDG. Schließlich liegt auch die Ganzkörperstrahlenbelastung mit etwa 5-10mSv, sowie die Strahlenexposition der einzelnen Organe bei einer [¹⁸F]FLT-PET-Untersuchung in Rahmen anderer nuklearmedizinischer Untersuchungen⁷⁰.

Als klinisch einsetzbarer, proliferationspezifischer Marker ist es daher sinnvoll zu untersuchen ob [¹⁸F]FLT speziell bei Non-Hodgkin-Lymphomen als Surrogatmarker zur Therapieevaluation geeignet ist, nicht zuletzt auch da die NHL ein durchaus bedeutendes Krankheitsbild darstellen.

An einem Non-Hodgkin-Lymphom erkranken in Deutschland aktuell jährlich 5.850 Männer und 6.250 Frauen. Damit liegt das NHL von allen malignen Erkrankungen bei Männern an zehnter und bei Frauen an zwölfter Stelle. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 53% für Männer und 61% für Frauen und hat sich seit den letzten 20 Jahren nur wenig verändert. Obwohl die Interpretation durch verschiedene konkurrierende Klassifikationsschemata erschwert ist, steht fest, dass die Erkrankungsraten sowie der Mortalitätsraten für Männer sowie für Frauen deutlich ansteigen⁸.

Die Non-Hodgkin-Lymphome sind eine sehr heterogene Krankheitsgruppe und werden aktuell in der gültigen WHO-Klassifikation nach Zellart und Differenzierung in 4 große Hauptgruppen eingeteilt (siehe Tab. 1a)⁷².

Tab. 1a: Die häufigsten malignen Lymphomentitäten nach der neuen WHO-Klassifikation von 2001 adaptiert nach Stein et al.⁷², geordnet nach deren Zellart und Zelldifferenzierung.

B-Zell-Vorläufer-Neoplasien	B-Zell-Vorläufer lymphoblastisches Lymphom
Reife (periphere) B-Zell-Neoplasien	B-Zell chronische lymphatische Leukämie Mantelzell-Lymphom Follikuläres Lymphom Grad 1,2 und 3 Marginalzonen B-Zell Lymphom vom MALT-Typ Plasmozytom / Plasmazell-Myelom Diffus großzelliges B-Zell Lymphom Burkitt-Lymphom
T-Zell-Vorläufer-Neoplasien	T-Zell-Vorläufer lymphoblastisches Lymphom
Reife (periphere) T-Zell-Neoplasien	Mycosis fungoides/ Sézary Syndrom Peripheres T-Zell Lymphom, nicht spezifiziert Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom Extranodales NK/T-Zell Lymphom Anaplastisches großzelliges Lymphom

Tab. 1b: Klinische Einteilung der malignen Lymphome nach der neuen WHO-Klassifikation von 2001 adaptiert nach Hiddemann et al.²⁹. Drei Kategorien werden definiert: Indolente Lymphome (low risk), Aggressive Lymphome (intermediate risk) und Sehr aggressive Lymphome (high risk).

Indolente Lymphome (low risk)	B-Zell chronische lymphatische Leukämie Mantelzell-Lymphom Follikuläres Lymphom Grad 1 und 2 Marginalzonen B-Zell Lymphom vom MALT-Typ Plasmozytom / Plasmazell-Myelom
	Mycosis fungoides/ Sézary Syndrom
Aggressive Lymphome (intermediate risk)	Follikuläres Lymphom Grad 3 Diffus großzelliges B-Zell Lymphom Burkitt-Lymphom
	Peripheres T-Zell Lymphom, nicht spezifiziert Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom Extranodales NK/T-Zell Lymphom Anaplastisches großzelliges Lymphom
Sehr aggressive Lymphome (high risk)	B-Zell-Vorläufer lymphoblastisches Lymphom
	T-Zell-Vorläufer lymphoblastisches Lymphom

Die Klassifizierung eines NHL-Befalls in eine dieser Entitäten ist nur durch eine exzisionale Biopsie und eine anschließende histopathologische und immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes möglich, evtl. auch mit Hilfe genetischer und molekularbiologischer Methoden. Um auch den klinischen Verlauf und die Prognose der einzelnen Erkrankungen zu beschreiben teilt die WHO die Non-Hodgkin-Lymphome zusätzlich in Indolent, Aggressiv und Sehr Aggressiv ein (siehe Tab 1b)²⁹.

Nach der Diagnosestellung folgt direkt eine Stadieneinteilung (Staging) der Erkrankung, um den genauen Ausbreitungsgrad des Lymphoms festzustellen. Sie stellt einerseits einen wichtigen Eckpfeiler der Therapieplanung dar, andererseits ergeben sich aus ihr prognostische Informationen. Das Ann Arbour-Staging-System wird nach wie vor zur Stadieneinteilung bei Non-Hodgkin-Lymphomen gebraucht,

obwohl es ursprünglich für den Morbus Hodgkin entwickelt worden war (siehe Tab. 1c)⁵⁹.

Tab. 1c: Stadieneinteilung maligner Lymphome nach der modifizierten Ann Arbor Klassifikation adaptiert nach Rosenberg et al.⁵⁹. Als Lymphatische Organe gelten Lymphknoten, Milz, Thymus, Waldeyerscher Rachenring und Appendix.

I	Befall einer <u>einzig</u>en Lymphknotenregion (I) oder Vorliegen eines <u>einzig</u>en oder lokalisierten extranodalen Herdes (IE)
II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf <u>ein</u>er Seite des Zwerchfells (II) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde und Befall einer oder mehr Lymphknotenregionen auf <u>ein</u>er Seite des Zwerchfells (IIE)
III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf <u>beiden</u> Seiten des Zwerchfells (III) oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Lymphknotenbefall, so dass ein Befall auf <u>beiden</u> Seiten des Zwerchfells vorliegt (IIIE)
	1 subphrenische Lokalisation, beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale Lymphknoten
	2 subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraaortaler, mesenterialer, iliakaler und/oder inguinaler Lymphknoten
IV	disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten
A	ohne Allgemeinsymptome
B	nicht erklärbares Fieber > 38°C und/oder nicht erklärbares Nachtschweiß und/oder nicht erklärbarer Gewichtsverlust von mehr als 10% des Körpergewichts innerhalb sechs Monate

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Gerade in einer solchen heterogenen Krankheitsgruppe, wie die der aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome, bei der bei weitem nicht jeder Behandlungsversuch zu einer Besserung, geschweige denn zu einer Heilung führt, ist es sehr wichtig, die Wirksamkeit einer begonnenen Therapie schnell beurteilen zu können.

Routinemäßig wird das Therapieansprechen im Rahmen morphologischer, anatomischer Bildgebung mit Computertomographie (CT), Ultraschall oder Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) beurteilt¹⁴. Da Veränderungen in der Tumorgroße frühestens mehrere Wochen nach Beginn der Therapie sichtbar werden, verzögert dies notwendige Anpassungen des Schemas bei Nichtansprechen der Therapie und führt zu unnötiger Toxizität und Kosten. Zusätzlich tun sich die Bildgebungsverfahren schwer zwischen vitalem Tumorgewebe und fibrotischen Gewebe in residualen Tumormassen zu unterscheiden⁷⁵.

Als nichtinvasives funktionelles Bildgebungsverfahren wurde die Positronenemissionstomographie erstmals mit dem Tracer [^{18}F]FDG zur Beurteilung des Therapieansprechens eingesetzt, nach dem großen Erfolg dieser Untersuchung in der Erstdiagnostik und beim Staging maligner Erkrankungen^{33, 35}. Da [^{18}F]FDG aber als Glukoseanalogon vielmehr den zellulären Energieumsatz in einem Gewebe widerspiegelt als die Proliferation, ist die Spezifität zur Beurteilung des Therapieansprechens unzureichend. Der Hauptgrund dafür ist eine unspezifische Anreicherung des Tracers in Entzündungsherden im tumorösen Areal^{38, 60}. Es wurde gezeigt, dass proliferative Aktivität weitaus spezifischer für maligne Tumore ist als der erhöhte Glucosemetabolismus⁸². Desweiteren ist das Hauptziel der klassischen Chemotherapeutika ebenfalls die Zellproliferation. Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll zu untersuchen, ob [^{18}F]FLT, welches ja spezifisch die Zellproliferation widerspiegelt, für die nichtinvasive Therapieevaluation bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen geeignet ist.

Diese Arbeit ist zweiteilig aufgebaut. Zunächst wurde in einer tierexperimentellen Studie untersucht, ob das Ansprechen einer Chemotherapie, in Form des in der NHL-Therapie standartmäßig genutzten, Doxorubicin in vivo mit einer [^{18}F]FLT-Positronenemissionstomographie bei einem xenotransplantierten Non-Hodgkin-Lymphom im Mausmodell schon nach wenigen Tagen beurteilt werden kann. Die Resultate wurden zur Validierung der nichtinvasiven Bildgebung anschließend mit den histologischen bzw. molekularbiologischen Veränderungen innerhalb des Tumorgewebes verglichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde in einer prospektiven, klinischen Studie der Einsatz von [^{18}F]FLT als Surrogatmarker für eine frühe Therapieprädiktion bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen untersucht. Als Chemotherapieschema wurde CHOP allein oder R-CHOP (mit Rituximab) verwendet. Eine Polychemotherapie nach dem CHOP-Schema gilt heute beim aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom als Standard. Dieses enthält Cyclophosphamid, Adriamycin (=Doxorubicin), Vincristin und Prednison. Es wurde gezeigt, dass die zusätzliche Gabe von Rituximab, einem chimären monoclonalen Anti-CD20-Antikörper zu einer signifikanten Verlängerung der ereignisfreien Zeit führt. Auch das Gesamtüberleben wurde signifikant verlängert^{20, 55}. Daraufhin wurden die Resultate mit der

standardmäßig durchgeführten Diagnostik zur Therapieevaluation in Form einer Computertomographie verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Synthese von [¹⁸F]FLT

Die Synthese von [¹⁸F]FLT wurde in der Abteilung für Radiopharmazie im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Deutschland, durchgeführt. Der Tracer wurde für alle hier aufgeführten Experimente dort nach der von Machulla et al. publizierten und etablierten Standardmethode hergestellt⁴⁶. Dazu wurde als Ausgangsstoff das durch eine Benzoylgruppe vor dem Zerfall geschützte Anhydrothymidin verwendet. Die Radiosynthese erfolgte aus Strahlenschutzgründen ferngesteuert. Das [¹⁸F]Fluorid zur radioaktiven Markierung wurde durch Protonenbestrahlung (18MeV) aus [¹⁸O]H₂O im Zyklotron des Klinikums (Siemens AG, München, Deutschland) generiert. Anschließend wurde der Tracer in seiner Qualität geprüft, das heißt es wurde eine Stoffidentifikation durchgeführt, um Verunreinigungen und Fehlsynthesen auszuschließen. Zudem wurde die radioaktive Markierungsausbeute kontrolliert. Um das [¹⁸F]FLT für die Injektion vorzubereiten, wurde es mit einem Sterilisationsfilter filtriert und in steriler Umgebung in eine sterile Injektionslösung überführt. Der Tracer wurde direkt anschließend an die nuklearmedizinische Klinik übergeben und zeitnah für die Tierexperimente und für die klinischen PET-Untersuchungen verwendet.

2.2 Methodik der tierexperimentellen Studie

2.2.1 Tiermodell

Die Versuchstiere, Mäuse mit einer schweren Immundefizienz, mit dem kombinierten Immundefekt CB-17/Icr - Prkdc^{SCID}/CrI (SCID-Mäuse) wurden über Charles River (WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) aus spezifisch pathogenfreier Zucht bezogen. Diese Versuchstiere sind kombiniert immundefizient bezüglich der T-Zell- sowie der B-Zell-Funktion. Es lag die Genehmigung für Tierversuche durch die Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag-Nummer: 55.2-1-54-2531-52-07) vor. Gehalten

wurden die Tiere im Einklang mit dem Tierschutzgesetz in Käfigen zu je vier bis sechs Mäuse in einem Tierstall bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit. Die Nahrung bestand aus Spezialfutter für immundefiziente Mäuse (Altromin 1314 Zuchtdiät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum.

2.2.2 Zellkultur, Xenotransplantation der Lymphoms

Für die Xenotransplantation wurde die Zelllinie SU-DHL-4, 1975 generiert aus einem humanen diffus großzelligen B-Zell Lymphom, bezogen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Bestellnummer: ACC 495, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die Zelllinie wurde in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit mit dem Fertigmedium RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640, Invitogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 1% L-Glutamin (Invitogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (Invitogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte drei- bis viermal pro Woche.

10 Millionen (10×10^6) Lymphom Zellen wurden in sterilem PBS (Invitogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) suspendiert. Daraufhin wurden die 6-7 Wochen alten, weiblichen, immundefizienten Mäuse subkutan im Bereich der rechten Schulterregion mit diesen Zellen xenotransplantiert.

2.2.3 Tumorumfangmessung und Therapieschema

Das Wachstum der Tumore wurde mit einer Schublehre beurteilt. Nach ca. 3-4 Wochen, als die Tumoren im Mittel eine Größe von $1,3 \times 1,1$ cm (Länge \times Breite) erreichten, wurde mit der Therapie begonnen. Zur Beurteilung des Effekts der Therapie auf das Tumorumfang wurde täglich anhand des Längendurchmessers (entspricht einer Parallele der Longitudinalachse) und des Breitendurchmessers (entspricht einer Parallele der Sagittalachse) das Tumorumfang mit der folgenden Formel abgeschätzt:

$$V [cm^3] = \frac{L\ddot{a}nge [cm] \times (Breite [cm])^2}{2}$$

Um die Messungengenauigkeit zu verringern wurden die Achsen auf den Tieren markiert.

Die Chemotherapie der Tumoren bestand aus einer einmaligen Injektion von 100µl Doxorubicin (Cell Pharm GmbH, Bad Vilbel, Deutschland) mit einer gewichtsadaptierten Konzentration von 10µg/gKG intraperitoneal. Diese Art und Dosierung der Therapie wurde bereits von Schmitt et al. publiziert⁶¹. Die Kontrollgruppe erhielt ebenfalls eine intraperitoneale Injektion von 100µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl).

2.2.4 Bildgebung im Kleintier-PET

Während der Messung im PET ist eine durchgehende Anästhesie der Versuchstiere von Nöten. Zu deren Einleitung wurde den Mäusen 4% Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) unter Verwendung des Tiermedizinischen Anästhesie Systems (Vetland Medical Sales and Services, Louisville, KY, USA) per inhalationem zugeführt. Nach der Anflutung zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde die Konzentration auf 1,5% Isofluran reduziert. Um das Austrocknen der Augen der Versuchstiere zu verhindern, wurden diese mit einer Augensalbe bedeckt.

Der Tracer [¹⁸F]FLT wurde den Tieren intravenös mittels eines Katheters in die Schwanzvene injiziert. Der Katheter wurde anschließend mit 0,9% NaCl gespült und die in der Injektionsspritze verbliebene Aktivität durch Rückmessung bestimmt. Es wurden 3,7-7,4 MBq pro Maus verwendet.

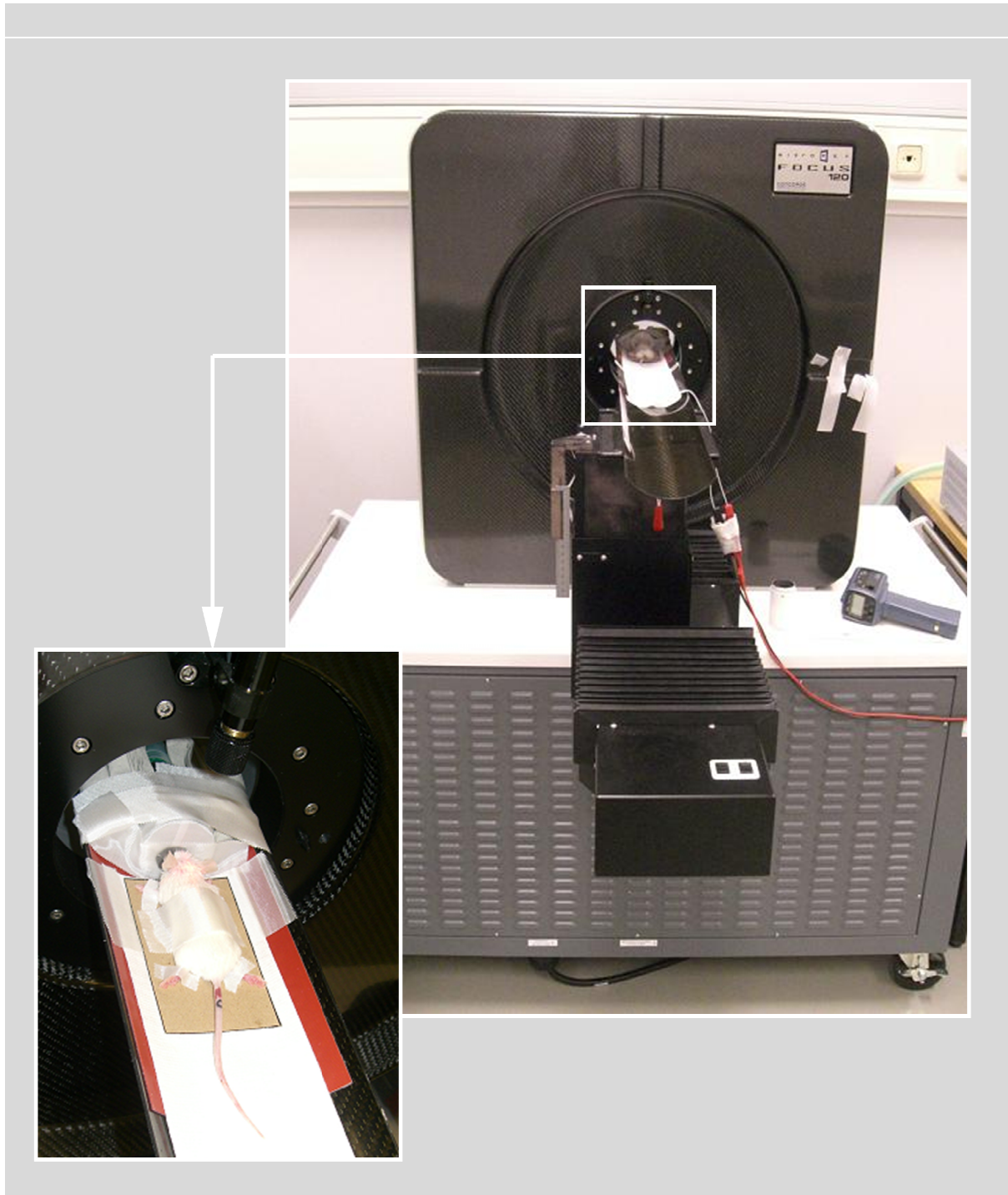


Abb. 3: Dynamische, nichtinvasive Bildgebung der Versuchstiere mit einem Kleintier-Positronenemissionstomographen über 60min in vivo unter inhalativer Anästhesie mit Isofluran über eine Atemmaske unter Aufrechterhaltung der Körpertemperatur mittels in der Liege eingebauter Heizung.

Die Bildgebung erfolgte dynamisch direkt nach der Injektion des Tracers im hochauflösenden Kleintier-Vollringscanner MicroPET Focus 120 (SIEMENS Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA) über 60 Minuten. Um zu gewährleisten, dass die Körpertemperatur der Versuchstiere während der Untersuchung nicht

absinkt, wurde eine regelbare Heizung in die Liege der Tomographen installiert und die Umgebungstemperatur direkt um das Versuchstier kontrolliert (siehe Abb.3). Der Abstand der einzelnen Messungen in der dynamischen Bildgebung betrug 5min. Die Rohdaten wurden in Sinogramme transformiert und anschließend rekonstruiert in ein $128 \times 128 \times 95$ Voxelbild. Dies entspricht einer Voxelgröße von $0.43 \times 0.43 \times 0.80$ mm³. Die Daten wurden automatisch gegenüber der Totzeit korrigiert, d.h. die fehlende Registration der Photonen, die in der Zeit nach einem Messereignis den Detektor treffen, während dieser noch nicht wieder bereit ist ein neues Photon nachzuweisen, wurden durch ein stochastisches Modell mit berücksichtigt. Zudem wurde der physikalische Zerfall des Tracers über die Zeit in die Berechnung miteinbezogen.

2.2.5 Bildbearbeitung und semiquantitative Bestimmung der [¹⁸F]FLT-Anreicherung mittels Bildanalyse

Zur objektiven Bewertung der PET-Daten wurde die tumor background ratio (TBR, Tumor-Hintergrund-Quotient) wie früher von Buck at al. und Tseng at al. publiziert berechnet^{11, 81}. Dieser lässt eine semiquantitative Beurteilung der [¹⁸F]FLT-Aufnahme im Tumor zu. Zu diesem Zweck wurde von Hand im letzten Frame, also ca. 1h nach Injektion des Tracers, jeweils in dem koronaren Schnittbild mit der höchsten Aktivität eine Kreisfläche mit 3mm Radius als Region-of-Interest (2D-ROI) definiert. Als Hintergrund-2D-ROI wurde der Querschnitt durch die Muskulatur des rechten Hinterlaufs benutzt. Als anerkannte Bildbearbeitungssoftware diente hierfür PMOD - Biomedical Image Quantification Software, Version 2.8 (PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz). Die TBR errechnet sich aus den mittleren gemessenen Aktivitäten der ROIs von Tumor und Muskel wie folgt:

$$TBR = \frac{\text{mittlere gemessene Aktivität ROI(Tumor)[counts/s]}}{\text{mittlere gemessene Aktivität ROI(Muskel)[counts/s]}}$$

2.2.6 Ex vivo Messung der FLT-Anreicherung mittels Gammacounter

Im Mittel 140min nach der PET-Messung wurden die Versuchstiere mittels CO₂-Inhalation in Narkose versetzt und nach anschließender Eröffnung des Thorax mit einem Herzschnitt getötet. Gewebeproben des Tumors und des Muskels wurden neben anderen Organen (Blut, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Knochen, Hirn) entnommen und gewogen ($\pm 0,0002\text{g}$). Die Zählrate pro Minute wurde in einem automatisierten Gammacounter (Gammacounter, TYP 1480 Wizard TM 3 Wallac, Finnland) gemessen. Aus diesen Daten wurde zerfallskorrigiert die injizierte Dosis pro g Organmasse (%ID/g) berechnet. Zusätzlich wurde der Tumor-Muskel-Quotient ermittelt. Diese Herangehensweise ist bereits von Buck et al. veröffentlicht¹¹.

2.2.7 Histologie und immunhistochemische Untersuchungen

Das seziierte Tumorgewebe wurde in 4%iger Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München wurden Dünnschnitte einer Dicke von 5 μm wurden auf Glasträger (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) aufgebracht und durch Erhitzen auf 58°C über Nacht befestigt. Ein Teil der Schnitte wurde in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung für die histologische Untersuchung weiterverarbeitet. Die anderen Schnitte wurden dann für die Immunfärbung in Xylol entwachst und in einer Acetonreihe je 5min in 100%, 96%, 75% und 40% rehydriert. In 0,01mol/l Citratpuffer (pH = 6,0) und 0,1% Tween 20 vor Austrocknung geschützt, wurden die Schnitte anschließend in der Mikrowelle bei 800W 30 Minuten erhitzt, um die Antigene wieder zu demaskieren (alle hier genannten Chemikalien wurden von Merck KG, Darmstadt, Deutschland bezogen). Danach schloss sich ein Waschvorgang in Kochsalzlösung mit 5% fetalem Kälberserum (FCS, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA), gepuffert mit Tris-Puffer (pH = 7,6, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) über 20min an.

Als Primärantikörper wurde MIB-1, ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Ki-67, ein nukleäres Proliferationsantigen (Immunotech, Westbrook, ME, USA; Verdünnung 1:10) und der Cleaved Caspase 3 Antikörper, ebenfalls ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die aktivierte Caspase 3 (Cell Signaling,

New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), welche nur aktiv vorhanden ist, wenn Apoptose in der Zelle eingeleitet wird, verwendet und die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Zweitantikörper gegen Kaninchen-IgG (EnVision, DAKO, Hamburg, Deutschland) ist Träger eines Peroxidasekomplexes, welcher, zusammen mit Diaminobenzidin (Merck KG, Darmstadt, Deutschland) die Färbung der mit dem Primärantikörper besetzten, positiven Kerne bewirkt. Die immunhistochemische Färbung wurde in dem automatisierten Immunostainer (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) nach dem mitgelieferten Protokoll der Firma durchgeführt. Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper und mit einem unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps zeigten keine spezifische Färbung. Es wurden repräsentative Ausschnitte ausgewählt und photographiert.

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (Version: 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Mittelwerte (Arithmetisches Mittel), Median, Wertebereich (WB) und die einfache Standardabweichung (SD) der Tumorgröße, des Tumor-Hintergrund-Quotienten und der Tumor-Muskel-Quotienten wurden wie folgt ermittelt⁵.

$$\text{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad \text{Median: } x = \begin{cases} x_{\left(\frac{n+1}{2}\right)} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} \left(x_{\left(\frac{n}{2}\right)} + x_{\left(\frac{n}{2}+1\right)} \right) & n \text{ gerade} \end{cases},$$

$$\text{Wertebereich (WB): } [x_1 - x_n], \quad \text{Standardabweichung (SD): } \sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Signifikanz wurde mittels des in der Software implementierten Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Dies ist ein nicht parametrischer statistischer Test, der überprüft, ob zwei unabhängige Stichproben A und B zu derselben Grundgesamtheit gehören, ohne a priori eine Normalverteilung der Stichproben anzunehmen³¹. Dieser Test setzt voraus, dass die verwendeten Daten mindestens ordinal skaliert sind, diese Voraussetzung ist bei den hier untersuchten Daten gegeben. Die Nullhypothese $H(0)$ besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt, d.h. $A = B$.

Ergibt sich aus dem Test ein signifikanter Unterschied, kann diese verworfen werden. Der Test lässt sich einseitig oder zweiseitig durchführen. Bei den in der tierexperimentellen Studie untersuchten Fragestellungen wurde ein einseitiger Test angewendet, also ist $A > B$ bzw. $A < B$. Ein P-Wert kleiner 0,05 ($p < 0,05$) wurde als signifikant angenommen. Durch die ebenfalls in der Software implementierte Regressionsanalyse wurde die Unabhängigkeit der Variablen und damit die Anwendbarkeit des Mann-Whitney-U-Tests bestätigt.

2.3 Methodik der klinischen Studie

Diese klinische Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München vor ihrem Start begutachtet und genehmigt. Die Aufklärung der Patienten erfolgte sowohl in einem Gespräch mit einem Arzt als auch schriftlich mit einem Aufklärungsbogen, in dem alle etwaigen Risiken und Nebenwirkungen der vorgesehenen Untersuchungen aufgelistet waren. Eine nach der Aufklärung unterschriebene Einverständniserklärung war obligatorische Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie. Diese wurde zur Aufbewahrung in der Klinik für Nuklearmedizin der Technischen Universität München hinterlegt.

2.3.1 Patientenkollektiv

Um der Fragestellung näher zu kommen, ob sich mit dem Tracer [^{18}F]FLT früh ein Ansprechen der Therapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen darstellen lässt, wurde eine prospektive Studie geplant.

Dafür wurden 22 Patienten vom 12.08.2004 bis zum 12.07.2006 mit bioptisch gesichertem aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom, 16 Männer und 6 Frauen, im Alter von 34 bis 76 Jahren in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter betrug 59 ± 14 Jahre. Alle Patienten begannen erstmals innerhalb der Studie eine systemische Immunochemotherapie nach dem R-CHOP-Protokoll, ($n=20$) oder eine alleinige Chemotherapie nach dem CHOP-Protokoll ohne Rituximab bei Patienten mit anaplastischem T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom ($n=2$). Ausschlusskriterien waren frühere maligne Erkrankungen und eine bereits begonnene Radio- oder Chemotherapie, sowie eine noch nicht erreichte Volljährigkeit.

2.3.2 Histologische Klassifikation

Lymphome wurden histologisch mit dem neuen WHO Klassifikationssystem von 2001 klassifiziert. In allen 22 Patienten wurde ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom bestätigt, bei 18 Patienten ein diffus großzelliges B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, bei 2 Patienten ein Grad 3 follikuläres Lymphom und bei 2 Patienten ein anaplastisches großzelliges T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (siehe Tab. 2).

Tab 2: Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patienten, einschließlich Histologie des diagnostizierten NHLs, das Stadium der Erkrankung, sowie das gewählte Therapieschema. Die Stadieneinteilung wurde nach der Ann Arbor Klassifikation vorgenommen (siehe Tab. 1c). Gruppe (1): Eingang-[¹⁸F]FLT-PET, sowie weitere Messung an Tag 7 und Tag 40 nach Therapiebeginn (siehe Abb 4). Gruppe (2): Eingang-[¹⁸F]FLT-PET, sowie weitere Messung an Tag 2 nach der Gabe von Rituximab und an Tag 4 zwei Tage nach dem 1. Zyklus CHOP (siehe Abb. 5). Weiß markiert ist Pat Nr. 15, welcher als repräsentatives Beispiel in Abb. 14 abgebildet ist.

Patient	Alter [a]	Histologie	Stadium	Therapieschema
Gruppe (1)				
17	48	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
16	76	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
21	70	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IVEA	R-CHOP
18	46	Follikuläres Lymphom Grad 3	IVEA	R-CHOP
19	34	Anaplastisches großzelliges T-Zell Lymphom	IIIA	CHOP
22	56	Anaplastisches großzelliges T-Zell Lymphom	IIIA	CHOP
Gruppe (2)				
9	55	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IA	R-CHOP
13	55	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IA	R-CHOP
14	74	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IA	R-CHOP
15	69	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IA	R-CHOP
3	76	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
4	29	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
5	71	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
6	76	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
7	27	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
11	65	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
20	63	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEA	R-CHOP
1	51	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IEB	R-CHOP
8	62	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IIIEA	R-CHOP
10	69	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IVA	R-CHOP
2	69	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	IVEA	R-CHOP
12	63	Follikuläres Lymphom Grad 3	IVA	R-CHOP

2.3.3 Therapieprotokoll

Aktuell ist die Standardtherapie bei fortgeschrittenen Non-Hodgkin-Lymphomen weiterhin die Chemotherapie. Patienten mit aggressiven NHL erhalten diese im Rahmen eines Therapieprotokolls namens CHOP. Zusätzlich wird bei B-Zell-NHL der chimäre Anti-CD20-Antikörper Rituximab gegeben. Das CHOP-Protokoll beinhaltet die klassischen Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon. Diese wurden, dem Protokoll entsprechend, in ihrer Standarddosis (siehe Tab. 3) in Zyklen alle 3 Wochen verabreicht. Abhängig vom Blutbild wurde bei Bedarf die Dosis reduziert oder der Zeitpunkt der Verabreichung verschoben. 20 der 22 Patienten erhielten zusätzlich Rituximab, entsprechend dem R-CHOP-Protokoll in seiner Standarddosis (siehe Tab. 2).

Cyclophosphamid	750mg/m ²
Doxorubicin	50mg/m ²
Vincristin	1,4mg/m ²
Prednisolon	100mg
Rituximab	375mg/m ²

Tab. 3: Das CHOP-Therapieschema mit den jeweiligen Dosierungen stellt den Grundbaustein bei der Therapie aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome dar. Zusätzlich wird im Rahmen des R-CHOP Therapieschemas Rituximab verabreicht.

Bei allen Patienten wurde zunächst eine Ausgangsuntersuchung mit der [¹⁸F]FLT-PET innerhalb der ersten Woche vor Therapiebeginn (Tag 1) durchgeführt. In dieses Zeitfenster wurden auch alle anderen notwendigen Untersuchungen gelegt, wie z. B. die Staginguntersuchungen (klinische Untersuchung, CT) oder ein [¹⁸F]FDG-PET. Die Patienten wurden je nachdem, welches Untersuchungsschema gewählt wurde, in zwei Gruppen unterteilt und später getrennt von einander analysiert. Diese zwei Untersuchungsschemata sind im Folgenden dargestellt.

Gruppe 1:

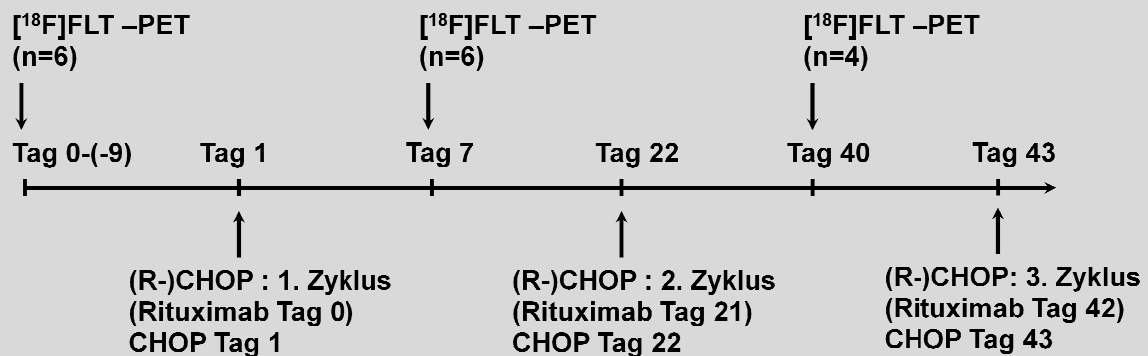


Abb. 4: Studiendesign der Gruppe (1). Zeitlicher Ablauf der einzelnen Zyklen der beiden Therapieschemata CHOP und R-CHOP (das Rituximab wurde jeweils ein Tag vor der CHOP-Gabe verabreicht), sowie der durchgeführten [¹⁸F]FLT-PET-Untersuchungen zur Therapieevaluation mit den dazugehörigen Fallzahlen (n).

In Gruppe (1) (n = 6; siehe Tab. 2) wurde, nach einem Eingangs-[¹⁸F]FLT-PET innerhalb einer Woche vor Therapiebeginn, an Tag 1 mit dem ersten Zyklus des CHOP-Protokolls (n = 2) begonnen. Den Patienten, die mit R-CHOP behandelt wurden, wurde jeweils einen Tag zuvor Rituximab verabreicht (n = 4).

Im Mittel am Tag 7 (Mittelwert = 6,3; WB = Tag 6 - Tag 7) nach Therapiebeginn wurde ein weiterer [¹⁸F]FLT-PET-Scan durchgeführt (n = 6).

Eine dritte [¹⁸F]FLT-PET-Untersuchung schloss sich den ersten Beiden im Mittel am Tag 40 nach der Vollendung des zweiten Zyklus des R-CHOP bzw. CHOP Therapieschemas (Mittelwert: 39,3; WB = Tag 39 - Tag 41) an (n = 4) (siehe Abb 4).

Gruppe 2:

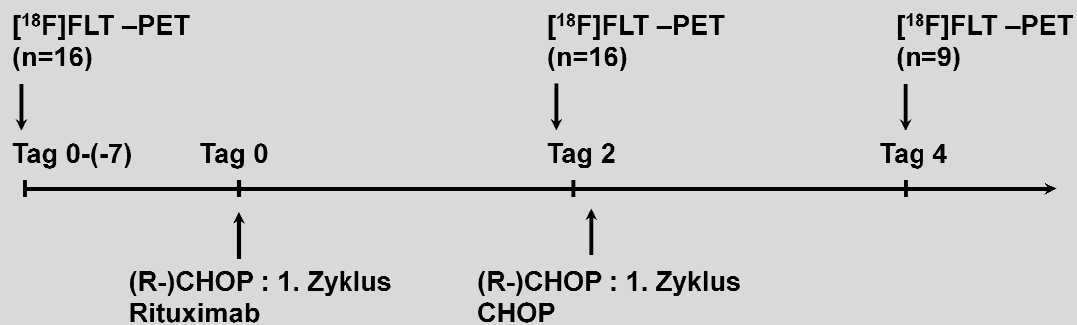


Abb. 5: Studiendesign der Gruppe (2). Zeitlicher Ablauf der Zyklen des R-CHOP Therapieschemas (Rituximab wurde jeweils zwei Tage vor der CHOP-Gabe verabreicht), sowie der durchgeführten $[^{18}\text{F}]\text{FLT-PET}$ -Untersuchungen zur Therapieevaluation mit den dazugehörigen Fallzahlen (n).

Alle Patienten in Gruppe (2) ($n = 16$; siehe Abb. 5) erhielten eine Therapie nach dem R-CHOP-Protokoll. Auch hier wurde zunächst ein Eingang- $[^{18}\text{F}]\text{FLT-PET}$ innerhalb einer Woche vor Therapiebeginn durchgeführt. An Tag 0 wurde bei allen Patienten mit der Rituximabtherapie begonnen.

Anschließend wurde bei allen Patienten im Mittel an Tag 2 (Mittelwert = 2,3; WB = Tag 2 - Tag 3) mit ein weiteres $[^{18}\text{F}]\text{FLT-PET}$ durchgeführt ($n = 16$). Daraufhin wurde die Therapie mit CHOP weitergeführt.

Wiederum im Mittel nach zwei weiteren Tagen, also an Tag 4 (Mittelwert= 4,4; WB = Tag 4 - Tag 6) nach der Gabe der klassischen Chemotherapeutika schloss sich eine weitere $[^{18}\text{F}]\text{FLT-PET}$ -Untersuchung an ($n = 9$) (siehe Abb. 5).

Rituximab wurde bei dreizehn Patienten ohne vorherige Dexamethasongabe verabreicht. Jedoch bekamen drei Patienten Dexamethason aus anderen medizinischen Gründen.

Nach Abschluss von drei bis sechs Zyklen der R-CHOP-Therapie wurden bei allen Patienten die standardisierten Restaging-Untersuchungen durchgeführt. Diese umfassen entweder eine CT- oder eine MRT-Bildgebung.

2.3.4 Molekulare / funktionelle Bildgebung mit PET

Insgesamt wurden 57 [¹⁸F]FLT-PET-Scans durchgeführt. Davon erhielten neun Patienten zwei Scans und dreizehn Patienten drei Scans.

[¹⁸F]FLT wurde wie vorher beschrieben synthetisiert (siehe 2.1). Vor der Untersuchung blieben die Patienten sechs Stunden nüchtern. Dann erfolgte die intravenöse Tracerapplikation. Daraufhin wurden die Patienten angehalten, wenig zu sprechen und übermäßige, nicht notwendige Muskelaktivität zu vermeiden. Durchgeführt wurden statische Emissionsmessungen 45min nach Injektion von im Mittel 300MBq [¹⁸F]FLT (WB = 270 - 340MBq). Die Positronenemissionstomogramme wurden mit einem hochauflösenden Ganzkörper-PET-Scanner gemessen (ECAT HR+, Siemens/CTI Inc., Knoxville, TN, USA). Dieser Scanner misst 47 Vollring-Schnitte mit einer Dicke von 3,4mm in einem Messvorgang. Die Daten wurden automatisch korrigiert um Fehler aufgrund zufallsbedingter Koinzidenzen, aufgrund der Totzeit, sowie aufgrund des Photo- bzw. des Comptoneffekts möglichst auszuschalten. Daraufhin wurden die Schnittbilder durch einen im Gerät implementierten Algorithmus berechnet.

Die Matrix der berechneten Bilder betrug 128×128 Pixel mit einer Pixelgröße von 4,0×4,0mm. Die Pixel-Counts wurden umgerechnet in Aktivitätskonzentration (Bq/ml) und gegenüber dem physikalischen Zerfall korrigiert.

2.3.5 PET Datenanalyse

Für die nun folgend beschriebene Analyse der PET-Daten wurden speziell zu diesem Zweck programmierte Software verwendet, wie sie auch bei der Arbeit von Weber et al. verwendet wurde⁸⁹.

Alle PET-Datensätze wurden von zwei erfahrenen Nuklearmedizinern begutachtet, die weder die klinischen Befunde, noch die Ergebnisse der anderen die Studie betreffenden Untersuchungen kannten. Im dem koronaren Schnittbild mit der höchsten Aktivität des Tumors wurde von beiden Untersuchern eine Kreisfläche mit 1,5cm Radius als Region-of-Interest (2D-ROI) definiert. Diese lag innerhalb des Tumorgewebes bei einem mittlerem Durchmesser der zur Analyse herangezogenen Läsionen von 4,6cm (Median = 4,0cm; WB = 2,0cm – 17,5cm). Der Standard-uptake-value (SUV), eine dimensionslose Masszahl, die einen absoluten Vergleich zwischen

der gemessenen Aktivität in gleich großen ROI's ermöglicht, wurde aus der injizierten Dosis und dem Körpergewicht des Patienten mit folgender Formel berechnet:

$$SUV = \frac{\text{mittlere gemessene Aktivität der ROI} \left[\frac{Bq}{g} \right] \times KG [g]}{\text{Injizierte Aktivität [Bq]}}$$

In die weitere Analyse der Daten wurden immer beide Standard-uptake-values mit einbezogen.

In gleicher Weise wurde bei den anderen Regions of Interest verfahren, die ebenfalls mit einem Radius von 1,5cm in die Leber (rechter Leberlappen ohne jeweils den Leberrand oder den zentralen Leberbereich zu streifen), in die Milz (ebenfalls ohne den Milzrand und den Milzhilus zu streifen), ins Knochenmark (zentral in den vierten Lendenwirbel) und in einen Muskel (Zentral in den großen Glutealmuskel) positioniert. Um die berechneten SUV-Werte in den einzelnen Geweben zu verifizieren und Fehlberechnungen zu eliminieren wurden die Einzel-SUV-Werte der beiden Untersucher bei den verschiedenen Untersuchungen in identischen Regions of Interest miteinander verglichen und gegebenenfalls angepasst.

Das gesamte Vorgehen zur Auswertung der PET-Daten ist auch von Weber et al., sowie von Wieder et al. veröffentlicht und hat sich als adäquat im Bezug auf die Beurteilung der Therapie erwiesen^{88, 90}.

2.3.6 Klinische Evaluation des Therapieerfolgs und Follow-Up

Zur Beurteilung des Therapieerfolgs als Teil der klinischen Routine wurden bei allen Patienten CT-Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde eine prätherapeutische CT-Untersuchung von Kopf, Hals, Thorax, Abdomen und Becken vor Beginn der Chemotherapie erstellt. Nach drei und nach sechs Zyklen folgte erneut eine Computertomographie. Nach dem Ende von sechs Zyklen der R-CHOP- bzw. der CHOP-Therapie wurde der Therapieerfolg nach den Kriterien zur Evaluation des Therapieerfolgs in soliden Tumoren, veröffentlicht durch Therasse et al.⁷⁸, evaluiert und klassifiziert. Dazu wurde der maximale Durchmesser der korrespondierenden Tumorkläsionen und anschließend der größte Durchmesser der Läsion senkrecht dazu auf derselben Ebene vermessen und dessen Veränderung im Vergleich zur Eingangsuntersuchung vor Therapie beurteilt. Daraufhin wurde der Therapieerfolg in

komplette Remission (CR), partielle Remission (PR), und in fortschreitende Erkrankung (PD) eingeteilt, ebenfalls nach Therasse at al.⁷⁸. Die weiteren Kontrolluntersuchungen in Bezug auf das Ansprechen der Therapie nach dem Standardprotokoll wurden alle drei Monate durchgeführt.

2.3.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (Version: 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), entsprechend der tierexperimentellen Studie. Mittelwerte, Median, Wertebereich und Standardabweichung der Standard-uptake-value der verschiedenen Organe und des Tumors wurden, wie oben beschrieben, berechnet. Die Signifikanz wurde entweder mittels des in der Software implementierten t -Tests für Stichproben, bei denen eine Normalverteilung zu Grunde gelegt werden konnte, ermittelt oder mittels des Mann-Whitney-U-Tests, für Daten mit fehlendem Nachweis der Normalverteilung. Der Mann-Whitney-U-Test wurde bereits in 2.2.8 näher erklärt. Der t -Test ist ein parametrischer statistischer Test, der eine Normalverteilung der verwendeten Stichproben voraussetzt³⁰. Ob nun die in der klinischen Studie erhobenen Daten diese Voraussetzung erfüllen, wurde mit dem Shapiro-Francia-Test geprüft. Dabei wird geprüft, ob die Stichproben einen signifikanten Unterschied zur Normalverteilung zeigen oder nicht. Bestand bei bestimmten Fragestellungen eine Abhängigkeit der beiden zu untersuchenden Stichproben wurde der gepaarte t -Test angewendet. Waren die Stichproben unabhängig voneinander wurde der ungepaarte t -Test benutzt. Durch die, ebenfalls in der Software implementierten Regressionsanalyse wurde gegebenenfalls die Unabhängigkeit der Variablen bestätigt. Analog zum Mann-Whitney-U-Test besagt die Nullhypothese $H(0)$ beim t -Test, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt. Ergibt sich aus dem Test ein signifikanter Unterschied, kann die Nullhypothese verworfen werden. Der Test lässt sich einseitig oder zweiseitig durchführen³⁰. Bei der Analyse der klinischen Daten wurde der Test immer zweiseitig durchgeführt. Ein P-Wert kleiner 0,05 ($p < 0,05$) wurde als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Tierexperimentelle Studie

3.1.1 Effekte der Chemotherapie auf die Tumorgröße

Um den Effekt der Chemotherapie auf das Tumorwachstum zu beurteilen, wurde die Größe der Xenotransplantate bei elf Mäusen (n=11) gemessen, nachdem das Xenotransplantat nach 9-16 Tagen unter der Haut der SCID-Mäuse tastbar war. Erreichte der Tumor eine Größe von mindestens 1cm × 1cm, wurden die Versuchstiere in die Studie eingeschlossen und erhielten zunächst ein dynamisches [¹⁸F]FLT-PET. Diese Messung lieferte die prätherapeutischen Referenzdaten, mit denen im Anschluss alle weiteren Untersuchungen in Relation gesetzt wurden. Anschließend direkt nach der Untersuchung an Tag 0 wurde den Tieren der Versuchsgruppe eine Chemotherapie in Form einer einmaligen Injektion von Doxorubicin 10mg/kg intraperitoneal verabreicht. Im Anschluss daran wurden die Tiere erneut an Tag 1, Tag 5 und Tag 9 weiteren Untersuchungen unterzogen, sowie das Xenotransplantat und weitere Organe zur ex vivo Validierung der im PET gemessenen Daten durch eine Gammacounter messung entnommen (siehe Abb. 6).

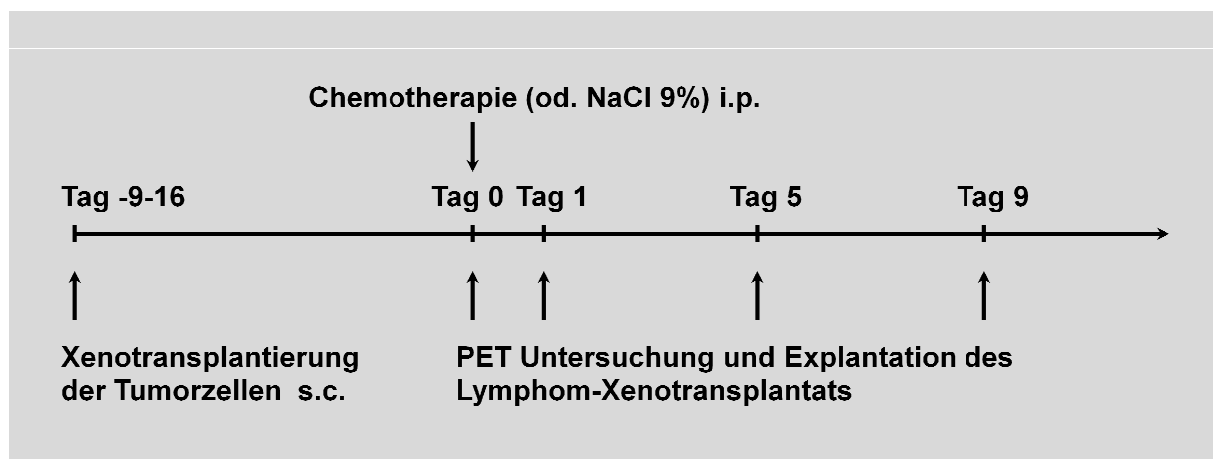


Abb. 6: Versuchsprotokoll des tierexperimentellen Teils. Tag -9 bis -16 Xenotransplantation s.c. in SCID-Mäuse von 10×10^6 Tumorzellen der Zelllinie SU-DHL-4, die aus einem diffus großzelligen B-Zell Lymphoms kultiviert wurde. Am Tag 0 Eingangs-¹⁸F]FLT-PET und entweder Chemotherapie (Doxorubicin 10mg/kg) i.p. oder Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) i.p. bei den Kontrolltieren. An Tag 1, Tag 5, Tag 9 erneute dynamische [¹⁸F]FLT-PET-Messung zur Therapieevaluation und zur ex vivo Validierung der PET-Daten Explantation des Tumors und weiterer Organe.

Als Kontrollgruppe dienten vier Mäuse (n=4) die nur eine einmalige intraperitoneale Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) bei einer Tumorgröße von

im Mittel $1,0 \times 1,0\text{cm}$ erhielten. Zudem wurde täglich die Tumorgöße bis zum Tag 9 nach der Therapie bzw. der NaCl-Injektion gemessen. Aus diesen Daten wurde das Tumolvolumen abgeschätzt und die Entwicklung des Wachstums dargestellt.

Zwei Mäuse ($n=2$) aus der Kontrollgruppe wurden über die gesamten neun Tage beobachtet, dabei wurde ein elfacher Zuwachs des Tumolvolumens abgeschätzt. Gleichzeitig wuchs das Tumolvolumen bei drei therapierten Tieren ($n=3$) nur um 50% im gleichen Zeitintervall.

Wenn man das Tumorstadium aller behandelten Tiere ($n=11$) und aller unbehandelten Tiere ($n=4$) mittelt und in Prozent umrechnet, wobei das Tumolvolumen an Tag 0 100% entspricht, ergibt sich Abb. 7. Das Tumolvolumen wurde mit der Formel in 2.1.3 abgeschätzt.

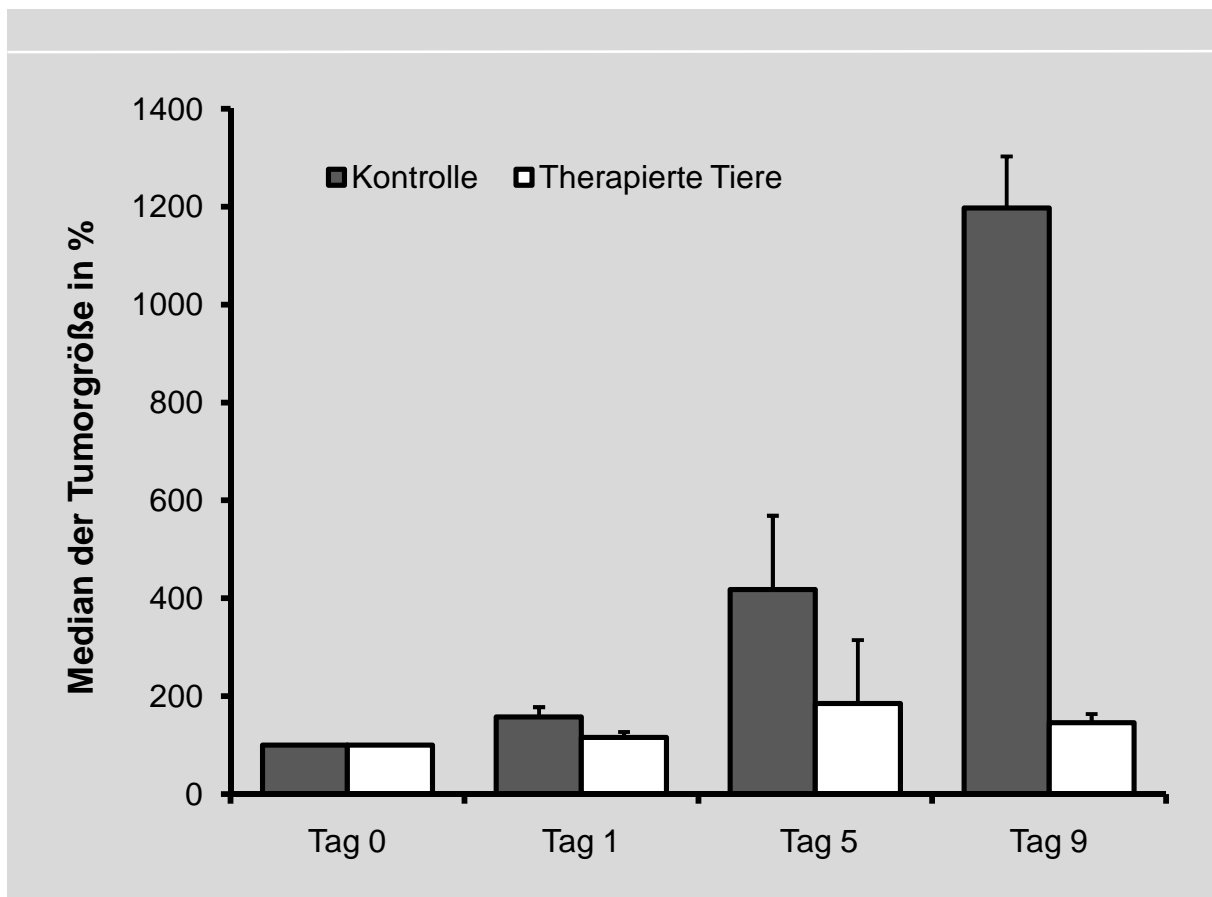


Abb. 7: Median des Tumorstadiums \cong Änderung des Tumorstadiums, angegeben in Prozent an Tag 1, Tag 5 und Tag 9 gegenüber des Tumorstadiums an Tag 0 (=100%). Das Tumorstadium wurde mit der Formel in 2.1.3 abgeschätzt. Zur Berechnung der Grafik wurden die folgende Anzahl an Versuchstieren herangezogen: An Tag 0 und Tag 1 ($n=10$), an Tag 5 ($n=7$) und an Tag 9 ($n=2$) in der therapierten Gruppe (weiß); in der Kontrollgruppe (grau) an Tag 0 und Tag 1 ($n=4$), an Tag 5 ($n=3$) und an Tag 9 ($n=2$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Das mittlere Tumorwachstum pro Tag in der behandelten Gruppe betrug: Mittelwert (\ln Tumorwachstum/d)=0,116 (*Median* = 0,107; SD = 0,094; WB = 0,004-0,310), in der unbehandelten Gruppe: Mittelwert (\ln Tumorwachstum/d)=0,374 (*Median* = 0,380; SD = 0,169; WB = 0,190-0,547).

Abb. 8 zeigt eine signifikant niedrigere Rate des Tumorwachstums pro Tag der behandelten Tiere im Gegensatz zu der unbehandelten Gruppe ($p = 0,016$).

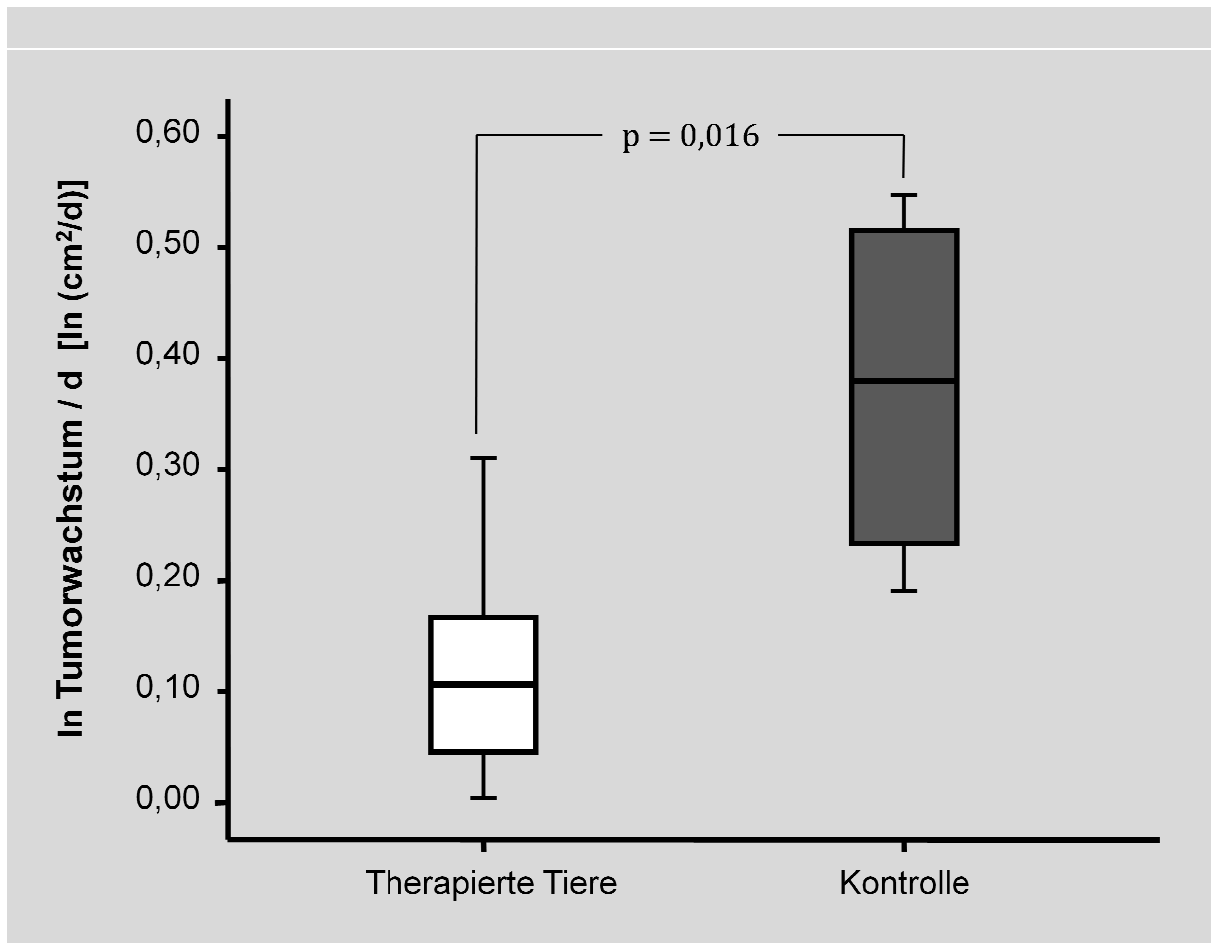


Abb. 8: Logarithmische Darstellung des Tumorwachstums \cong Änderung des Tumorvolumens pro Tag angegeben in $\ln(\text{cm}^2/\text{d})$ der mit Doxorubicin therapierten Versuchstiere (weiß) und der untherapierten Kontrolltiere (grau). Das Boxplot-Diagramm zeigt einen signifikanten Unterschied des Tumorwachstums pro Tag zwischen therapierten und nicht therapierten Tiere ($p=0,016$). Das Tumorvolumen wurde mit der Formel in 2.1.3 abgeschätzt.

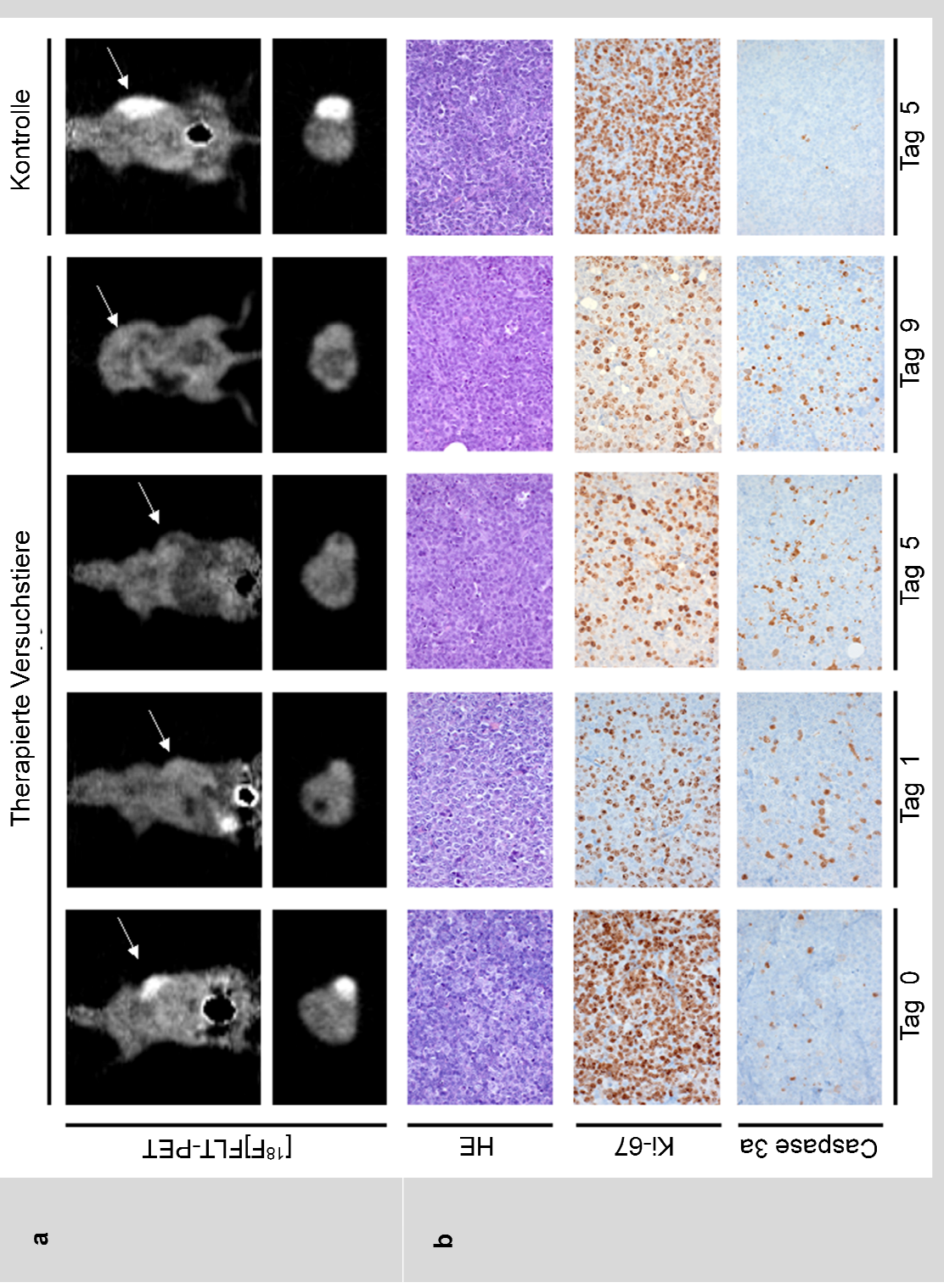
3.1.2 Frühe Beurteilung des Therapieeffekts mit [^{18}F]FLT-PET

Für eine frühe Beurteilung des Ansprechens der Chemotherapie wurden die Versuchstiere einer dynamischen [^{18}F]FLT-PET Untersuchung vor Therapie, Tag 1 nach Therapie, Tag 5 nach Therapie (*Mittelwert* = 5,5d; WB = 5-6d) und nach Tag 9

unterzogen. In Abb. 10a sind repräsentative PET-Bilder einer identischen Maus in den Spalten 1-3 und eine weitere untersuchte Maus in der Spalte 4 gezeigt, die alle eine standardisierte Chemotherapie erhielten. Bei der Messung am Tag 0 ist der Tumor mit hohem Kontrast vom umliegenden Gewebe abzugrenzen. Das Signal schwächt sich anschließend von Tag 1 an nach Therapie deutlich ab (siehe Pfeile auf Abb. 9a). Im Gegensatz dazu bleibt das Therapiesignal im Kontrolltier unverändert hoch.

Abb. 9a (siehe nächste Seite): Exemplarische axiale und coronare Schichten der [¹⁸F]FLT-Positronenemissionstomogramme durch ein Xenotransplantat vor Therapie (Tag 0) und im Verlauf nach Gabe der Chemotherapie. An Tag 1, 5 und 9 nach Therapie erkennt man eine reduzierte Anreicherung des Tracers innerhalb des Tumors (Pfeile). Beim Kontroll-Tier kommt es zu keinem Rückgang der Anreicherung von [¹⁸F]FLT an Tag 5 nach der Eingangsuntersuchung.

Abb. 9b (siehe nächste Seite): Exemplarische HE-Färbungen (HE), immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 (Ki-67) und des Markers für die in Gang gesetzte Apoptose, die aktivierte Caspase 3 (Caspase3a) der xenotransplantierten Lymphome vor Therapie (Tag 0) und Tag 1, 5 und 9 nach Therapie, sowie einer Kontrolle an Tag 5 nach der Eingangsuntersuchung. Das Kontrolltier zeigt eine hohe proliferative Aktivität des Tumors und eine niedrige Anzahl in Apoptose gehender Zellen. Die Schnitte der therapierten Versuchstiere zeigen an Tag 1, 5 und 9 nach Therapie eine reduzierte Proliferationsrate, sowie eine Zunahme an in Apoptose gehende Zellen, angezeigt durch die Zunahme Caspase 3a positiver Zellen. Die HE-Färbung zeigt im Verlauf nach Therapie nur minimale Veränderungen, wie eine Zunahme von Apoptosekörperchen an Tag 5 und 9. Ausschnitte in 400facher Vergrößerung.



Für eine objektive Bewertung der PET-Bilder ist eine quantitative Bildauswertung nötig. Hierfür wurden sog. Regions-of-Interest (2D-ROIs) in repräsentative koronare Schnitte durch den Tumor, sowie durch den Muskel bei allen [^{18}F]FLT-PET Messungen gelegt und ein Kontrastverhältnis, die sogenannte tumor background ratio (TBR, Tumor-Hintergrund-Quotient), wie in 2.2.5 beschrieben, berechnet.

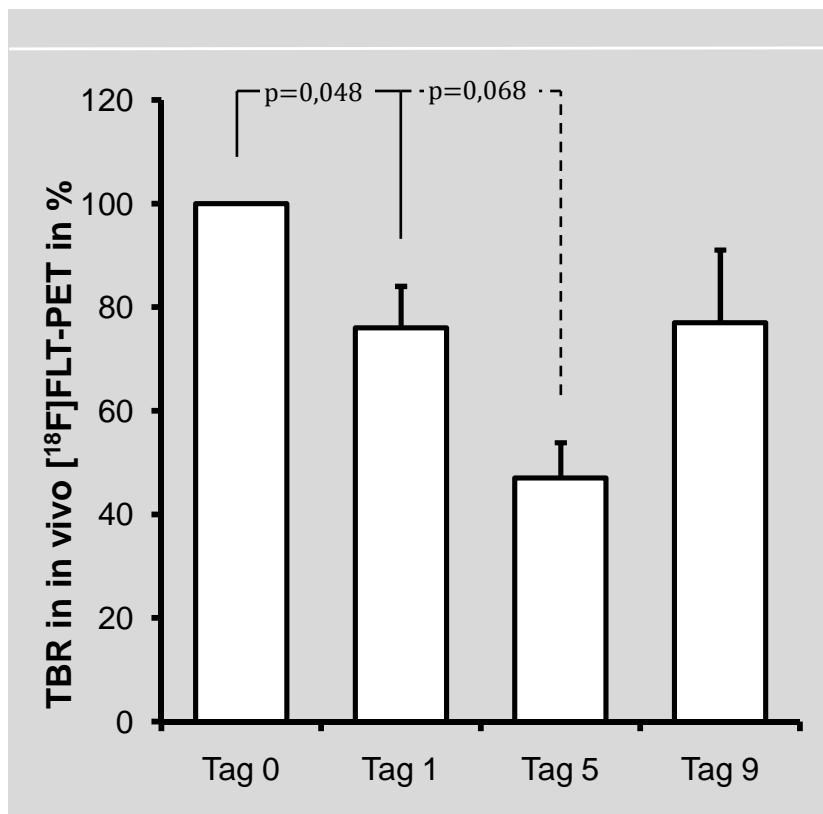


Abb. 10: Median der TBR (tumor background ratio) vor (Tag 0) $n=11$ ($\cong 100\%$), an Tag 1 $n=6$, an Tag 5 $n=4$ und Tag 9 $n=2$ nach Gabe der Chemotherapie. Die TBR sank signifikant an Tag 1 auf 76% ($p=0,048$) und auf 47% an Tag 5 ($p=0,068$). An Tag 9 kam es interessanterweise zu einem Wiederanstiegen der TBR auf 77%. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Der Median der TBR aller Tiere ($n=11$) vor Therapie wurde als 100% definiert. Ein Tag nach der Therapie sank er signifikant auf 76% ($n=6$; $p=0,048$). Am Tag 5 nach Therapie reduzierte er sich weiter auf 47% ($n=4$; $p=0,068$) in Bezug auf den Anfangswert. Am Tag 9 stieg die TBR wieder auf 77% ($n=2$; p-Wert Berechnung nicht möglich) an. In Abb. 10 sind diese Ergebnisse dargestellt.

3.1.2 Validierung der [¹⁸F]FLT-PET Ergebnisse mittels ex vivo Aktivitätsmessung

Wie Abb. 6 zeigt, wurden zu den Zeitpunkten Tag 0, 1, 5 und 9 bei einzelnen Tieren der Tumor und andere Referenzorgane entnommen und die Aktivität in diesen mittels eines Gammacounters gemessen, um die Ergebnisse der Untersuchungen zu validieren. Als Referenzorgan wurde hier analog zur Bildauswertung der Musculus quadriceps femoris des rechten Hinterlaufs verwendet. Aus der Aktivität des jeweiligen Organs und des Muskels wurde ein Quotient gebildet (TMR, tumor muscle ratio, Tumor-Muskel-Quotient). Der Median dieses Quotienten für die Lymphom-Xenotransplantate ist in Abb. 11 gezeigt. In der Kontrolle ergab sich ein Wert von 3,31 (SD = 1,25; n = 3), dieser fiel an Tag 1 auf 2,53 (SD = 0,22; n = 2) und weiter an Tag 5 auf 1,82 (SD = 0,93; n = 4). Am Tag 9 wurde ein Wert von 1,85 (SD = 0,78; n = 2) gemessen.

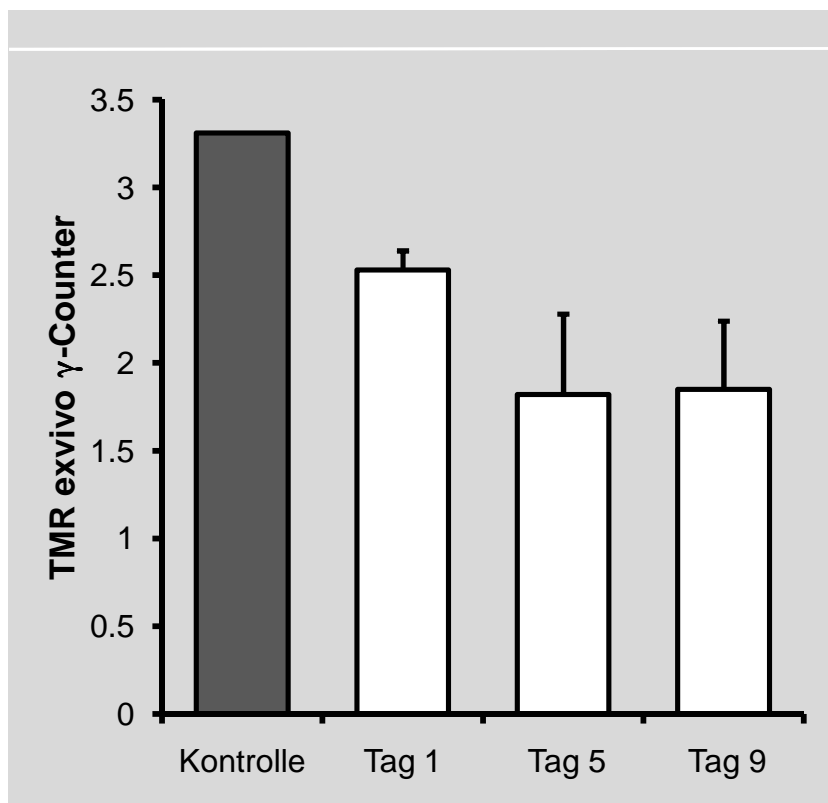


Abb. 11: [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den Lymphom-Xenotransplantaten ex vivo gemessen mit einem Gammacounter, dargestellt als TMR (tumor muscle ratio), der Kontrolltiere (n=3) und der therapierten Tiere an Tag 1 (n=2), an Tag 5 (n=4) und an Tag 9 (n=2) nach Therapie. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Im Gegensatz zur Abnahme der relativen Aktivität im Tumor nach der Therapie blieb der Quotient von Lebergewebe-, Herzmuskel- und Hirngewebeaktivität durch die Aktivität im Muskel über die Zeit konstant. Es fällt auf, dass der Tracer im Hirngewebe kaum anreichert, da er gleich seinem Ursprungsmetaboliten Thymidin eine intakte Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Alle anderen untersuchten Geweben, wie auch Leber oder Herzmuskel, zeigten nur geringe Unterschiede zur Hintergrundaktivität, mit Ausnahme der Nieren. Dies steht im Einklang mit den PET-Bildern (siehe Abb. 9) und zu früheren Untersuchungen zur [¹⁸F]FLT-Anreicherung in normalen Organen⁸⁶.

3.1.3 Histologie und Immunhistochemie

Um zu untersuchen, wie die abnehmende [¹⁸F]FLT-Anreicherung im Lymphom-Xenotransplantat am Tag 1, 5 und 9 nach der Chemotherapie zustande kommt, wurde Tumorgewebe zu diesen genannten Zeitpunkten entnommen und histologisch bzw. immunhistochemisch analysiert. Repräsentative histologische Schnitte von vitalem Tumorgewebe behandelter bzw. unbehandelter Tiere sind in Abb. 9b gezeigt. Auf eine quantitative Auswertung wurde bei den immunhistochemischen Untersuchungen verzichtet, da das Tumorgewebe insgesamt relativ inhomogen war. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ist eine hohe Anzahl an Tumorzellen, zwischen denen sich wenige Stromazellen befinden, sichtbar. Kleine nekrotische Herde sind ebenfalls sichtbar. Morphologisch veränderte sich das Tumorgewebe nur geringgradig. An Tag 5 und Tag 9 ist bei den behandelten Lymphomen eine Zunahme von apoptotischen Zellkörpern zu erkennen (Abb. 9b). Die immunhistologische Färbung des proliferationspezifischen Antigens Ki-67 stellt eine validierte Methode zur Bestimmung der Proliferationsaktivität in Gewebedünnschnitten bei Non-Hodgkin-Lymphomen dar, wie in der Veröffentlichung von Szczuraszek et al. beschrieben⁷⁶. Unbehandelte Lymphomzellen waren zum überwiegenden Teil Ki-67 positiv, was auf eine hohe proliferative Aktivität der Tumorzellen hindeutet. In behandelten Tieren verringerte sich der Anteil der Ki-67 positiven Zellen zunehmend. In der Kontrollgruppe blieb der Anteil Ki-67 positiver Zellen konstant hoch (Abb 9b).

Die aktivierte Caspase 3 ist ein etabliertes Marker-Protein für apoptotische Zellen, da diese aktivierte Form von Caspase 3 nur in Zellen vorkommt, die gerade Apoptose,

d.h. den programmierten Zelltod, durchlaufen²⁸. Bei der immunhistologischen Färbung gegen die aktivierte Caspase 3 eines unbehandelten Tumorschnittes finden sich nur vereinzelt positive, d.h. apoptotische Zellen. Die Zahl steigt jedoch schon am Tag 1 deutlich sichtbar und weiterhin an Tag 5 und 9 an. Bei der Kontrollgruppe ist kein Anstieg apoptotischer Zellen sichtbar (Abb. 9b).

3.2 Klinische Studie

3.2.1 Patienten

Bei allen Teilnehmern der Studie wurde nach den aktuellen Leitlinien postbioptisch eine histopathologische Artdiagnose gestellt und der Tumor nach der WHO Klassifikation von 2001 eingeteilt. Zudem wurde leitliniengerecht die Ausdehnung des Tumorleidens ermittelt (Staging) und die Erkrankung nach Ann Arbor klassifiziert. Bei achtzehn Patienten wurde ein diffus großzelliges B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom diagnostiziert. Diese wurden den Stadien I(E)A-IV(E)A zugeordnet. Zwei Patienten litten an einem follikulären Lymphom Grad 3, Stadium IV(E)A und zwei Patienten an einem nodalen anaplastischen großzelligem T-Zell Lymphom, Stadium IIIA. Die initialen [¹⁸F]FLT-Positronenemissionstomogramme ergaben hoch kontrastreiche Bilder, die zum einen die Lymphom-Manifestationen sowie das stark proliferativ aktive Knochenmark darstellten. Bei allen Patienten wurden die im Routine-Staging beschriebenen Manifestationen, nodal und extranodal, durch eine fokale Mehranreicherung von [¹⁸F]FLT nachgewiesen (Sensitivität der [¹⁸F]FLT-PET, 100%). In Abbildung 15 sind neben den Patientendaten die Werte der Anreicherung von [¹⁸F]FLT in einem Bereich innerhalb des Tumors (der [¹⁸F]FLT-SUV, Berechnung siehe unter 2.3.5) und dessen Entwicklung im Laufe der Therapie pro Patient einzeln aufgeführt, sowie die Einteilung des Therapieerfolgs nach der leitlinienkonformen klinischen Evaluation.

Die mittlere Anreicherung von [¹⁸F]FLT in den tumorösen Arealen (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV) lag bei 8,1 (Median = 7,4; SD = 3,9; Wertebereich = 2,6-19,4). Die mittlere [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den Lymphommanifestationen zur prätherapeutischen Eingangsuntersuchung war nicht signifikant unterschiedlich in den beiden Gruppen (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (Gruppe (1)) = 6,0; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (Gruppe (2)) = 9,0; p=0,06). Außer im Tumorgewebe wurde auch im proliferativen aktiven Knochenmark eine hohe [¹⁸F]FLT-Anreicherung gemessen (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = 7,0; Median =

6,8; Wertebereich = 4,2-9,0). Zur weiteren Analyse wurde der SUV in einem Referenzsegment der Leber (mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV} = 4,7$; Median = 4,4; Wertebereich = 2,9-7,9), in der Milz (mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV} = 2,2$; Median = 2,1; Wertebereich = 1,3-3,8) und im Muskelgewebe (mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV} = 0,8$; Median = 0,8; Wertebereich = 0,5-1,1) gemessen (siehe auszugsweise in Abb. 12 und 13).

Tab. 4: Histologie (DLBCL = Diffus großzelliges B-Zell Lymphom, FL = Follikuläres Lymphom, Anapl. T-Zell L. = Anaplastisches großzelliges T-Zell Lymphom), sowie Stadium des diagnostizierten NHLs und die Einzelwerte der Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ (SUV-Wert, Berechnung siehe unter 2.3.5) zur prätherapeutischen Eingangsuntersuchung (Tag 0) und dessen Verlauf an Tag 2,4,7 und 40 nach Therapiebeginn, sowie das Ergebnis der klinischen Beurteilung des Therapieansprechens nach den Abschluss von sechs Zyklen R-CHOP bzw. CHOP. Weiß markiert ist Pat Nr. 15, welcher als repräsentatives Beispiel in Abb. 14 abgebildet ist.

Pat.	Histologie	Stadium	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 40	Ansprechen
Gruppe (1)								
17	DLBCL	IEA	8.2	–	–	2.0	1.0	CR
16	DLBCL	IEA	6.9	–	–	1.8	1.4	CR
21	DLBCL	IVEA	5.1	–	–	1.3	–	PR
18	FL Grad 3	IVEA	4.7	–	–	1.4	0.7	CR
19	Anapl. T-Zell L.	IIIA	6.2	–	–	1.0	0.8	CR
22	Anapl. T-Zell L.	IIIA	4.6	–	–	0.7	–	CR
Gruppe (2)								
9	DLBCL	IA	10.5	11.5	–	–	–	CR
13	DLBCL	IA	7.2	2.7	–	–	–	PR
14	DLBCL	IA	5.8	6.2	1.5	–	–	CR
15	DLBCL	IA	7.7	10.6	1.4	–	–	CR
3	DLBCL	IEA	11.8	10.4	–	–	–	PR
4	DLBCL	IEA	4.7	4.9	–	–	–	CR
5	DLBCL	IEA	19.4	16.3	3.0	–	–	PR
6	DLBCL	IEA	13.8	10.4	–	–	–	CR
7	DLBCL	IEA	8.0	7.8	1.8	–	–	CR
11	DLBCL	IEA	6.9	6.5	–	–	–	–
20	DLBCL	IEA	5.8	2.4	2.1	–	–	CR
1	DLBCL	IEB	2.6	2.5	1.0	–	–	CR
8	DLBCL	IIIEA	8.3	8.2	3.1	–	–	PR
10	DLBCL	IVA	14.8	14.3	9.0	–	–	PD
2	DLBCL	IVEA	8.5	6.6	2.8	–	–	PR
12	FL Grad 3	IVA	7.6	2.1	–	–	–	CR

3.2.2 Beurteilung des Therapieansprechens mit [¹⁸F]FLT-PET 7 und 40 Tage nach R-CHOP/CHOP (Gruppe (1))

In Gruppe (1), welche nach dem Therapieschema in Abb. 4 behandelt wurden, erreichte die mittlere Anreicherung von [¹⁸F]FLT vor Therapie (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV) einen Wert von 6,0 (n=6; Median = 5,7; SD = 1,4; Wertebereich = 4,6-8,2). Sieben Tage nach Beginn der Chemotherapie reduzierte sich die [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den Tumorarealen signifikant um 77% (n=6; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = 1,4; Median = 1,4; SD = 0,5; Wertebereich = 0,7-2,0; p<0,001) und nach 40 Tagen um 85% (n=4; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = 1,0; Median = 0,9; SD = 0,5; Wertebereich = 0,7-1,4; p=0,003) Der initiale mittlere [¹⁸F]FLT-SUV, der nach 40 Tagen untersuchten Patienten, betrug 6,5 (n=4; Median = 6,6; SD = 1,5; Wertebereich = 4,7-8,2).

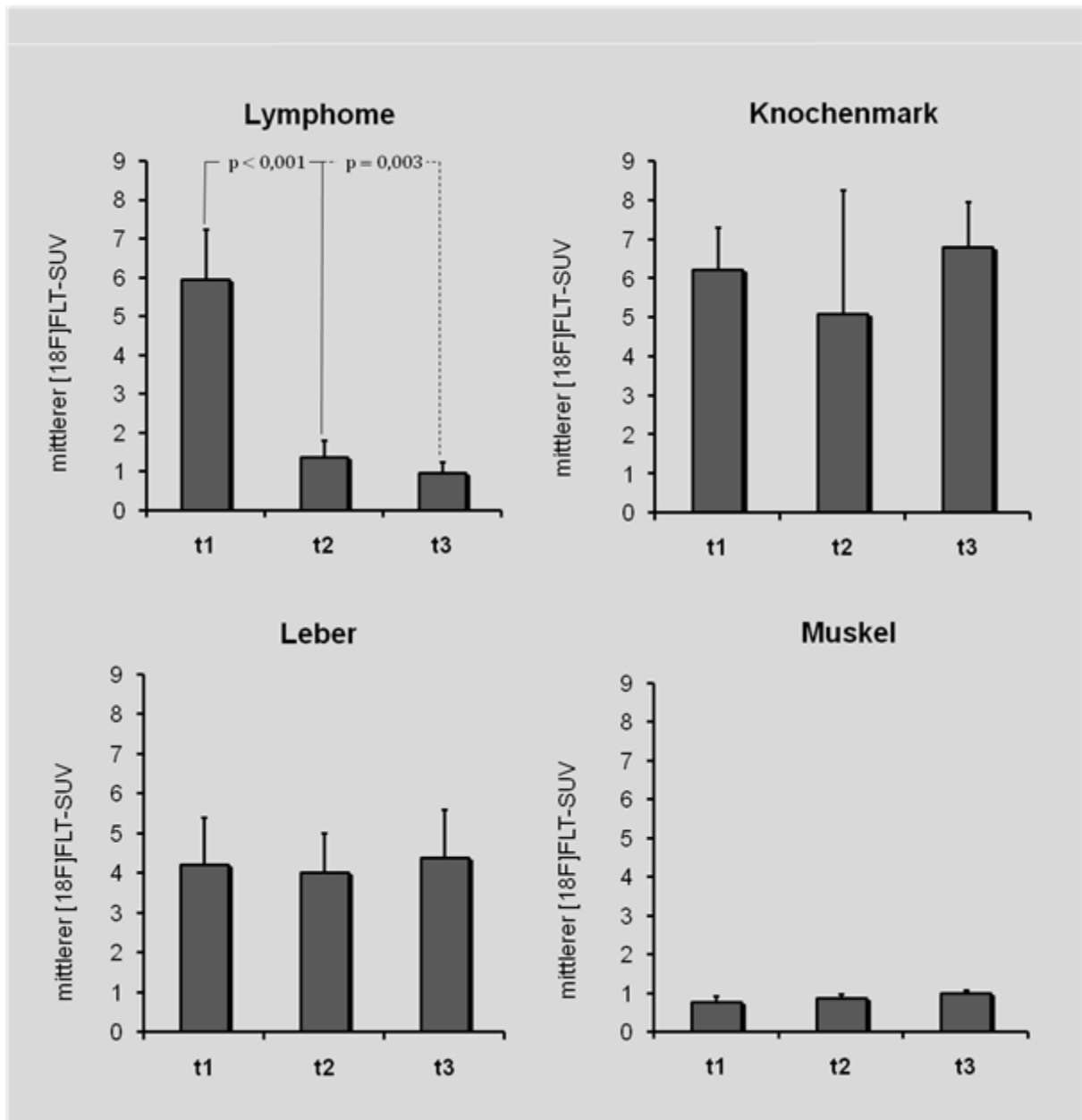


Abb. 12: Absolutwerte des mittleren $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ der Gruppe (1)(n=6) in einem Bereich der Lymphom-Manifestation, des Knochenmarks, innerhalb der Leber und innerhalb eines Muskels zur Eingangsuntersuchung (t1) und im Verlauf der Therapie mit R-CHOP bzw. CHOP an Tag 7 (t2) und Tag 40 (t3). Bei signifikanten Unterschieden sind die p-Werte angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Gegensatz dazu blieb die $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Anreicherung in der Leber, wie auch im Muskel, die Untersuchungszeit über konstant und zeigte keine signifikanten Veränderungen (mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ der Leber (vor Therapie) = 4,2; mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ der Leber (Tag 7 nach Therapie) = 4,0; mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ der Leber (Tag 40 nach Therapie) = 4,4; mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ des Muskels (vor Therapie) = 0,8; mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ des Muskels (Tag 7 nach Therapie) = 0,9; mittlerer $[^{18}\text{F}]\text{FLT-SUV}$ des

Muskels (Tag 40 nach Therapie) = 1,0) (siehe Abb.12). Im Knochenmark zeigte sich sieben Tage nach Therapie ein geringer nichtsignifikanter Rückgang der [¹⁸F]FLT-Anreicherung, bei der Untersuchung 40 Tage nach Therapiebeginn stieg der [¹⁸F]FLT-SUV wieder auf die Ursprungswerte an (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV im Knochenmark (vor Therapie) = 6,2; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV im Knochenmark (Tag 7 nach Therapie) = 5,1; p=0,42; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV im Knochenmark (Tag 40 nach Therapie) = 4,4; p=0,76) (siehe Abb. 12).

3.2.3 Beurteilung des Therapieansprechens mit [¹⁸F]FLT-PET 2 Tage nach Rituximab und 2 Tage nach CHOP (Gruppe (2))

Dreizehn Patienten wurden aus der Gruppe (2), welche nach dem Therapieschema in Abb. 5 behandelt wurden, beurteilt. Drei Patienten davon erhielten Dexamethason vor der Gabe von Rituximab und wurden separat analysiert. Die [¹⁸F]FLT-Anreicherung (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV) vor Therapie betrug bei Patienten ohne Dexamethason Medikation 9,4 (n=13; Median = 8,3; SD = 4,6; Wertebereich =2,6-19,4). Alle 13 Patienten erhielten eine [¹⁸F]FLT-PET kurz nach der Gabe von Rituximab und zeigten keine signifikante Veränderungen in der Anreicherung im den Lymphommanifestationen (n=13; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = 8,9; Median = 8,2; SD = 3,8; Wertebereich = 2,5-16,3; p=0,3). Im Gegensatz dazu sank der [¹⁸F]FLT-Anreicherung signifikant zwei Tage nach Verabreichung des CHOP Therapieschemas. (n=8; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = 3,0; Median = 2,3; SD = 2,6; Wertebereich = 1,0-9,0) gegenüber dem Wert vor Therapiebeginn (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = 9,4; Median = 8,2; SD = 5,3; Wertebereich = 2,6-19,4; p=0,004). Auf gleiche Weise verhielt sich das Knochenmark, das zwei Tage nach der Gabe von Rituximab ähnliche Anreicherungswerte ergab als beim [¹⁸F]FLT-PET vor der Therapie (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (vor Rituximab) = 7,4; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (Tag 2 nach Rituximab) = 7,4; p=0,93), jedoch sank der Wert signifikant zwei Tage nach Beginn des CHOP-Schemas (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (Tag 2 nach CHOP) = 2,4; p<0,001). Die Anreicherung in der Leber, als auch im Muskels, hielt sich stabil über die Untersuchungszeit (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV der Leber (vor Rituximab) = 5,0; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV der Leber (Tag 2 nach Rituximab) = 5,6; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV der Leber (Tag 2 nach CHOP) = 4,1; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV des Muskels (vor Rituximab) = 0,8;

mittlerer ^{18}F FLT-SUV des Muskels (Tag 2 nach Rituximab) = 1,0; mittlerer ^{18}F FLT-SUV des Muskels (Tag 2 nach CHOP) = 1,0) (siehe Abb. 13).

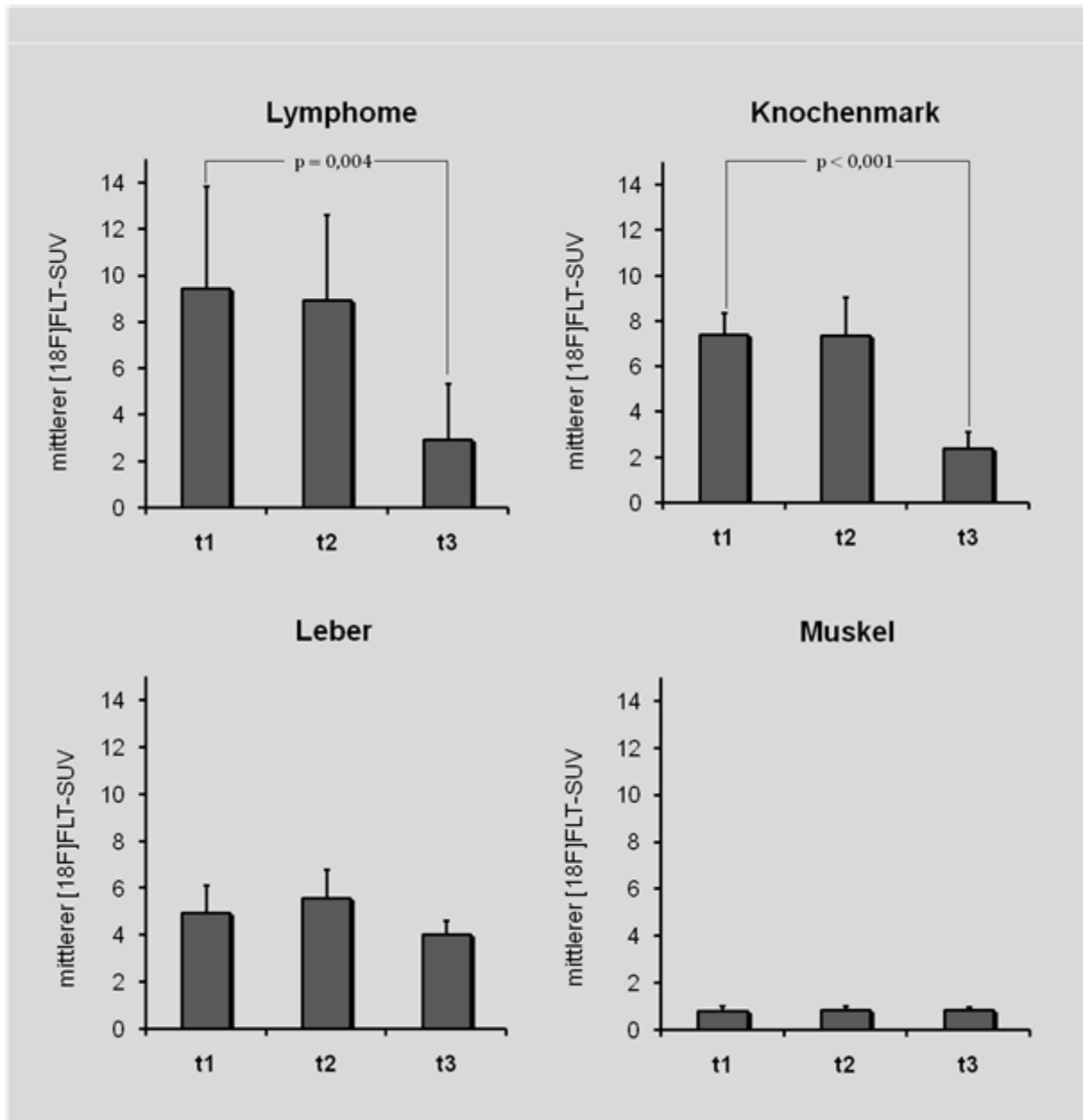


Abb. 13: Absolutwerte der mittleren ^{18}F FLT-SUV, der Patienten der Gruppe (2)(n=13) ohne Dexamethasonvorbehandlung in einem Bereich der Lymphomanifestation, des Knochenmarks, innerhalb der Leber und innerhalb eines Muskels zur Eingangsuntersuchung (t1) und im Verlauf der Therapie mit R-CHOP an Tag 2 (t2) und Tag 4 (t3). Bei signifikanten Unterschieden sind die p-Werte angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

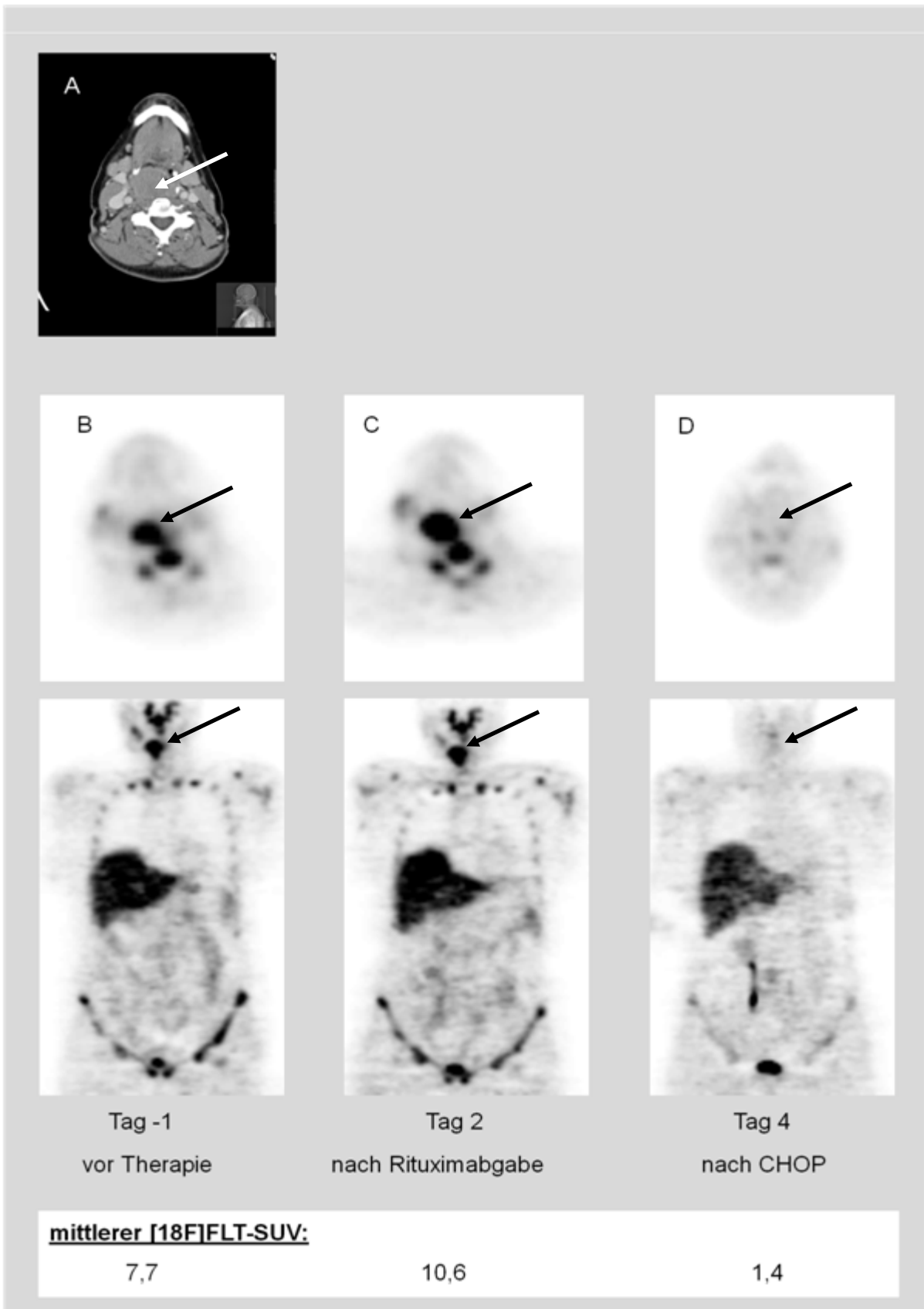


Abb. 14: (A) Konventionelles CT durch die lymphombefallene Region, sowie ein korrespondierender Schnitt und eine koronal rekonstruierte Ganzkörperaufnahme des $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PET jeweils zur Eingangsuntersuchung vor Therapie (B), 2 Tage nach Rituximabgabe (C) und 2 Tage nach CHOP (D) des Patienten Nummer 15 aus der Gruppe (2).

Beispielhaft ist in Abbildung 14 der zeitliche Verlauf der einzelnen [¹⁸F]FLT-PET-Scans in repräsentativen Schnitten vor und während der Therapie von Patient 15 gezeigt.

Bei den drei Patienten, die vor der Rituximabgabe mit Dexamethason behandelt wurden (Patienten mit der Nummer 12, 13 und 20, siehe Tab. 4), betrug die [¹⁸F]FLT-Anreicherung (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV) vor Rituximabgabe 6,9 (n=3; Median = 7,2; SD = 0,9; Wertebereich = 5,8-7,6), zwei Tage nach der Verabreichung von Dexamethason und Rituximab sank der Wert signifikant auf 2,4 (n=3; Median = 2,4; SD = 0,3; Wertebereich = 2,1-2,7; p=0,018). Wiederum verhielt sich das Knochenmark ähnlich in der [¹⁸F]FLT-Anreicherung und sank signifikant (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (vor Rituximab) = 7,1; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (Tag 2 nach Rituximab) = 2,2; p=0,024), wobei auch hier die Werte in der Leber und im Muskel konstant blieben (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV der Leber (vor Rituximab) = 4,7; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV der Leber (Tag 2 nach Rituximab) = 4,2; p=0,24; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV des Muskels (vor Rituximab) = 0,8; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV des Muskels (Tag 2 nach Rituximab) = 1,0).

3.2.4 Beurteilung des klinischen Therapieansprechens und Verlaufsbeobachtung

Eine klinische Beurteilung im Verlauf war bei 21 von 22 Patienten möglich, da es einen nicht mit der hier untersuchten Grunderkrankung zusammenhängenden Todesfall während dem ersten Therapiezyklus gab (Patient Nummer 11, siehe Tab. 4). Nach sechs Zyklen R-CHOP bzw. CHOP wurde klinisch das Ansprechen mittels konventioneller Bildgebung durchgeführt. Nach zwei Zyklen Chemotherapie wurde die Erkrankung eines Patienten (Patient Nummer 10) als progredient (PD) eingestuft und daraufhin eine Zweitlinientherapie begonnen. Die übrigen 20 Patienten sprachen nach den zwei Zyklen auf die verabreichte Therapie an und wurden nach dem Restaging als komplette Remission (CR; n=14) oder partielle Remission (PR; n=6) eingestuft.

Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 12,6 Monaten bei 20 Patienten (Wertebereich = 3,3-24,2 Monate) erreichten 15 die Einstufung der kompletten Remission (CR), 3 die Einstufung partielle Remission (PR) und zwei Patienten erlitten ein Rezidiv. Einer dieser Patienten war anfänglich als komplette Remission

eingestuft (Patient Nummer 12), der andere als partielle Remission (Patient Nummer 2).

3.2.5 Korrelation der klinischen Beurteilung des Therapieansprechens mit der Beurteilung durch eine [¹⁸F]FLT-PET-Untersuchung

Alle Patienten, die auf das verabreichte Therapieschema R-CHOP bzw. CHOP ansprachen, zeigten eine signifikante Abnahme der [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den Lymphom-Manifestationen, zudem war die verbliebene Traceraufnahme in Tumorgebiet niedriger als die Anreicherung von [¹⁸F]FLT in der Leber (siehe für Gruppe (1) Abb. 12 und für Gruppe (2) Abb. 13). Im Gegensatz dazu verblieb bei dem Patienten, der nicht auf die verabreichte Therapie ansprach und nach zwei Zyklen Chemotherapie als PD eingestuft wurde, die [¹⁸F]FLT-Anreicherung auf einem hohen Niveau im Bereich des Tumors und zeigte nur eine moderate Signalabschwächung um 39% im Gegensatz zur Anreicherung bei der prätherapeutischen Eingangsuntersuchung ([¹⁸F]FLT-SUV (vor R-CHOP) = 14,8; [¹⁸F]FLT-SUV (nach R-CHOP) = 9,0). Aufgrund der niedrigen Anzahl der Patienten mit PD konnte eine weitere statistische Auswertung nicht erfolgen.

Der Unterschied der [¹⁸F]FLT-Anreicherung im Tumorgebiet in der prätherapeutischen PET-Untersuchung zwischen den Patienten, die in der Verlaufsbeobachtung nach sechs Zyklen Chemotherapie in der konventionellen Bildgebung mittels CT als partielle Remission (PR), und denen, die als komplette Remission (CR) eingestuft wurden, war nicht signifikant ($p=0,09$). Jedoch bei den 14 Patienten, die früh nach dem ersten Zyklus der Chemotherapie ein [¹⁸F]FLT-PET erhielten ($n = 8$ (4 Tage nach R-CHOP) und $n = 6$ (7 Tage nach R-CHOP/CHOP)) zeigte sich ein signifikanter Unterschied der [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den Lymphommanifestationen zwischen denen, die dann nach der Therapie als partielle (PR) und denen, die nach der Therapie als komplette Remission (CR) eingestuft wurden (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (PR) = 2,6; mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV (CR) = 1,5; $p=0,009$).

Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeitraum von 12,6 Monaten war die Mehrzahl der Patienten immer noch in kompletter bzw. partieller Remission ($n=18$). Nur zwei Patienten erlitten einen Rückfall, nachdem sie zunächst auf die Therapie ansprachen (Patient Nummer 2, Rückgang der [¹⁸F]FLT-Anreicherung zur

Eingangsuntersuchung = 67% und Patient Nummer 12, hier wurde keine frühe [¹⁸F]FLT-Untersuchung nach Therapiebeginn durchgeführt; siehe Tab. 4). Aufgrund der niedrigen Anzahl der Patienten mit einem Rückfall der Erkrankung wurde auf eine Korrelation der Veränderungen der [¹⁸F]FLT-Anreicherung im Verlauf und dem Ergebnis der Nachbeobachtung verzichtet.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit den Proliferationsmarker [¹⁸F]FLT als Tracer im Rahmen einer PET-Untersuchung für die frühe Therapieevaluation bei aggressiven Lymphomen zu nutzen untersucht. Dies geschah in zwei Schritten. In einem tierexperimentellen Ansatz wurde der histopathologisch und immunhistochemisch nachweisbare Therapieeffekt mit der früh nach Beginn der Chemotherapie messbaren Abnahme der Traceranreicherung korreliert und somit [¹⁸F]FLT für die Prädiktion eines Therapieerfolgs validiert. Zugleich wurde in einer klinischen Studie die [¹⁸F]FLT-PET zum Nachweis früher Therapieeffekte eingesetzt und die Resultate mit dem Standardverfahren zur Beurteilung des Therapieansprechens (konventionelle Bildgebung) verglichen. Im präklinischen Modell und in der humanen Erkrankung konnte erstmals gezeigt werden, dass [¹⁸F]FLT ein brauchbarer in vivo Surrogatmarker für die nicht-invasive frühe Beurteilung des Therapieansprechens maligner Lymphome darstellt.

4.1 Vergleich der Möglichkeiten zur Überwachung des Therapieansprechens bei malignen Lymphomen

Momentan werden in der klinischen Routine zur Therapieüberwachung und zur Bewertung des Therapieansprechens meist die konventionellen morphologisch-anatomisch bildgebenden Verfahren angewandt, wie Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie^{15, 35, 43}. Es wird dabei nach einem festgelegten Zeitplan vorgegangen, der einen Zeitraum von Wochen bis Monaten nach Therapiebeginn voraussetzt, um morphologische Veränderungen im Bereich des Tumors identifizieren zu können. Der Nachteil bei diesem Vorgehen ist,

dass bei Nichtansprechen evtl. nötige Therapiemodifikationen oder Regimewechsel und nicht zuletzt der Therapieabbruch und Wechsel zu palliativer Pflege und Therapie (best supportive care) um diese Wartezeit verzögert wird. Weiterhin kommt es trotz des langen Zeitraums zwischen Therapiebeginn und Evaluation bei einem nicht zu vernachlässigbaren Anteil der Patienten zu Problemen, zwischen Nabengewebe und vitalem Tumor im Bereich der vorbekannten Tumorlokalisation zu unterscheiden^{15, 34}. Auch führen bestimmte Tumortherapeutika, obwohl sie wirksam sind, nicht zwingend zu einer Verkleinerung des Tumolvolumens³⁴. Vor allem bei Patienten, die auf die Therapie nicht ansprechen, würde eine zuverlässige, frühe Beurteilung des Therapieerfolgs viel früher eine Therapieanpassung erlauben, als es bisher mit den herkömmlichen Schnittbildverfahren möglich ist. Diese gewonnene Zeit würde dem Patienten zusätzliche Toxizität der unwirksamen Therapie ersparen, und nicht zuletzt Kosten reduzieren.

Eine klinisch schon etablierte Möglichkeit nichtinvasiv Veränderungen im Metabolismus des Tumorgewebes durch eine Chemotherapie nachzuweisen ist ein PET-Scan mit [¹⁸F]FDG als Tracer. In vielen Studien ist der klinische Nutzen einer [¹⁸F]FDG-PET für die Erstdiagnostik und für das Staging und Restaging einer Lymphomkrankung aufgrund seiner hohen Sensitivität beschrieben worden^{15, 32-35, 51, 52}. Zudem besteht laut einigen Studien eine Korrelation zwischen der [¹⁸F]FDG-Anreicherung im Lymphom und dem Grad der Malignität (Tumorgrading)^{54, 58, 62}. Dieser kann sich im Laufe der Erkrankung ändern und sollte überwacht werden, da sich dadurch die bevorzugte Behandlung des Tumors ebenfalls ändert und entsprechend angepasst werden muss. Bei der Bewertung des Therapieansprechens zeigt sich die [¹⁸F]FDG-PET überlegen gegenüber der konventionellen, CT-basierten Diagnostik^{15, 34, 35, 71}. Das Verfahren ist damit effektiver bei der Identifizierung derjenigen Patienten, die nicht von der verabreichten Therapie profitieren. Aus diesem Grund empfiehlt Cheson et al. den momentanen Standard der Therapieevaluation bei Lymphomen zu Gunsten der [¹⁸F]FDG-PET anzupassen¹⁵.

Wichtig ist es jedoch auch, die Limitationen der [¹⁸F]FDG-PET zu beleuchten. Die Spezifität ist durch eine vermehrte Aufnahme in entzündlich verändertem Gewebe, wie zum Beispiel in Granulomen bei Tuberkulose oder Sarkoidose und in Abszessen reduziert^{41, 68}. Auch in Tumormanifestationen ist nur ein Teil der Anreicherung tatsächlich auf die Proliferationsaktivität der malignen Zellen zurückzuführen⁴¹. Diese

Beobachtung gewinnt umso mehr an Bedeutung, wenn sich das tumoröse Gewebe aufgrund der begonnenen Therapie in seiner zellulären Zusammensetzung verändert, und führt damit zu einer eingeschränkten Interpretierbarkeit des [¹⁸F]FDG-PET beim Einsatz in der Therapieevaluation.

Um die Aussagekraft der PET-Untersuchung weiter zu verbessern, rückte das Radiopharmakon [¹⁸F]FLT ins Augenmerk der Forscher, da dieses im Gegensatz zu [¹⁸F]FDG ein fast ausschließlich tumorzellspezifisches Merkmal adressiert, die exzessive Proliferation.

Wie in tierexperimentellen und klinischen Studien gezeigt, korreliert die [¹⁸F]FLT-Aufnahme eng mit der Tumorphiliferation^{9, 12, 86}. In der Studie von Wagner et al. wurde gezeigt, dass mit einer [¹⁸F]FLT-PET eine hohe Sensitivität bei der Detektion von Lymphomen erzielt wird⁸⁶. Eine leichte Überlegenheit gegenüber der Routinediagnostik beim Staging von Lymphomen wurde in der Studie von Buck et al. festgestellt. In dieser Studie wurde auch untersucht, ob der Grad der Malignität (Tumorgrading) der Tumore mit der [¹⁸F]FLT-PET messbar ist, ob also eine Differenzierung in aggressive und indolente Lymphome möglich ist. Tatsächlich wurde ein signifikanter Unterschied der Traceranreicherung innerhalb der Tumormanifestationen zwischen aggressiven und indolenten Lymphomen gefunden⁹. Zum Thema frühe Therapieevaluation einer Chemotherapie bei malignen Lymphomen liegen auch schon erste Ergebnisse vor. So zeigte sich in einer tierexperimentellen Studie ebenfalls von Buck et al. eine signifikante Korrelation zwischen dem Rückgang der Proliferationsfraktion 48h nach der Injektion eines Chemotherapeutikums und dem Rückgang der ex vivo im Tumorgewebe gemessenen [¹⁸F]FLT-Aufnahme¹¹. Diese vielversprechenden Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Diskussion der tierexperimentellen Studie

Zur Beurteilung des Therapieeffektes in einem präklinischen Modell wurden Lymphom xenotransplantierte Mäuse generiert und mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion mit Doxorubicin (10µg/g Körpergewicht), einem Standardtherapeutikum bei malignen Lymphomen, therapiert.

Doxorubicin interagiert direkt mit der DNA, durch Interkalierung blockiert es die Matrizenfunktion und damit die Replikation der DNA und die Synthese von RNA⁵⁰.

Dieser Schaden führt schließlich zum Zellzyklusarrest und zu Apoptose^{23, 92}. Um nun den Therapieeffekt mit [¹⁸F]FLT zu messen, darf weder der Metabolismus des Tracers, noch des Ursprungsmetaboliten Thymidin direkt durch Doxorubicin beeinflusst werden. Thymidin kann in der Zelle entweder energieaufwendig „de novo“ also komplett neu innerhalb der Zelle produziert oder energiesparend über den „Salvage pathway“ durch transmembranäre Aufnahme und Umwandlung von im Blut zirkulierendem Thymin bereitgestellt werden (siehe Abb. 2a). Anschließend daran wird es im Zellzyklus in die DNA eingebaut. Auch [¹⁸F]FLT nutzt bei seiner Anreicherung innerhalb der Zelle, dem sog. „Trapping“, die gleichen Reaktionswege wie sein Ursprungsmetabolit (siehe Abb. 2b). In einer Studie von Keno et al. wurden keine Hinweise für einen direkten Einfluss des Chemotherapeutikums Doxorubicin auf den Thymidinmetabolismus, den „Salvage pathway“ und die transmembranäre Aufnahme von Nucleosiden aus dem extrazellulären Raum gefunden³⁶. Damit ist eine Messung der sinkenden proliferativen Aktivität der Lymphomzellen im Rahmen der Doxorubicinbehandlung mit [¹⁸F]FLT als Surrogatparameter möglich.

Alle Tumormanifestationen der Versuchstiere wurden mit der [¹⁸F]FLT-PET mit hohem Kontrast dargestellt, damit errechnet sich eine Sensitivität bei der Tumordetektion von 100%. Obwohl kein signifikanter Unterschied in der Tumorgroße zwischen den therapierten Tieren und den Kontrolltieren an Tag +1 bestand, wurde schon eine signifikante Reduktion in der [¹⁸F]FLT-Aufnahme 24h nach der Therapie im Vergleich zum PET-Scan vor der Therapie gemessen. Der Median des Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisses (tumor background ratio, TBR) verminderte sich signifikant um 24% an Tag +1 ($p = 0,048$), gefolgt von einer weiteren Reduktion an Tag +5 (53%) im Vergleich zur Eingangsuntersuchung. Zusätzlich wurden die Xenotransplantate direkt nach der PET-Messung entnommen und zeigten auch ex vivo mit einem Gammacounter gemessen, wie erwartet, eine erniedrigte TMR (tumor muscle ratio = Tumor-Muskel-Quotient) nach Chemotherapie. Dazu passend fand sich eine Reduktion der proliferierenden Zellen am Tag +1 nach Therapie, gezeigt durch immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (MIB1) gegen den Proliferationsmarker Ki-67. Die Reduktion des Anteils der proliferierenden Zellen blieb bis zum Tag +9 bestehen. Weiterhin konnte ein Anstieg der aktivierten Caspase 3 positiven Zellen ab Tag+1 nach der Gabe der Chemotherapie beobachtet werden. Diese Proteinkinase ist in ihrer aktivierten Form

ein Marker für das eingeleitete Apoptoseprogramm, d. h. für den ablaufenden programmierten Zelltod. Beide Resultate aus den immunhistochemischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion in den Tumorzellen die zugrundeliegenden Mechanismen für die reduzierte [¹⁸F]FLT-Aufnahme in den behandelten Mäusen darstellen. Interessanterweise zeigte ein Versuchstier nach einem anfänglichen Abfall der TBR um 24% an Tag +1 eine fast vollständige Rekonstitution der TBR am Tag +9. Dies könnte darauf hindeuten, dass nicht in Apoptose gegangene Zellen die Chemotherapie überwinden und sich nach einiger Zeit wieder teilen. Dies scheint ein erster Hinweis darauf zu sein, dass [¹⁸F]FLT auch im Falle eines Rezidivs die wiedergewonnene proliferative Aktivität im Tumor darstellen kann.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind statistisch durch die geringe Anzahl der Versuchstiere etwas in ihrer Interpretierbarkeit limitiert. So ergab sich kein statistisch signifikantes Ergebnis beim Abfall der TBR am Tag +5 nach Therapie. Trotzdem ist ein eindeutiger Trend ersichtlich. Das Gleiche gilt für die ex vivo Messung der FLT-Anreicherung im Tumorgewebe und die immunhistochemischen Untersuchungen. Auch wurde auf eine statistische Auswertung der Immunhistochemie verzichtet, da sich das Tumorgewebe bei einigen Versuchstieren inhomogen darstellte. Zusammengefasst jedoch bekräftigen die Resultate dieser Studie den Einsatz des nicht-invasiven [¹⁸F]FLT-PET-Scans zur frühen Beurteilung des Therapieerfolgs einer zytotoxischen Therapie bei aggressiven Lymphomen. Auch bei anderen Tumorentitäten wurde [¹⁸F]FLT als Surrogatmarker zur Therapieevaluation klassischer Chemotherapeutika bereits untersucht. Anschließend sollen die wichtigsten Arbeiten zu diesem Thema dargestellt werden.

In einer Arbeit von Apisarnthanarax et al. wurde in einem ähnlichen tierexperimentellen Ansatz der Tracer [¹⁸F]FLT für die frühe Therapieprädiktion einer kombinierten Radiochemotherapie beim Ösophaguskarzinom eingesetzt. Dabei wurden ebenfalls Xenotransplantate in immundefiziente Mäuse mit einer Zelllinie namens SEG-1, aus einem Adenokarzinom des Ösophagus, generiert. Anschließend wurden diese mit Doxetaxel und Radiatio oder gar nicht therapiert. Auch hier wurde die Tumorgöße gemessen bei der kombinierten Radiochemotherapie ergab sich erst 8 Tage nach Therapie eine signifikante Größenregredienz der behandelten Tumoren ($p = 0,03$). Zu verschiedenen Zeitpunkten, einen, zwei und vier Tage, nach Therapie

wurde ex vivo die Aufnahme von [³H]FLT im Tumorgewebe der Versuchstiere gemessen und mit der Aufnahme von [³H]FDG verglichen und anschließend mit dem Proliferationsmarker Ki-67 korreliert. Dabei ergab sich bei [³H]FLT eine signifikante Reduktion der ex vivo gemessenen TMR auf 43% im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 1. An Tag 2 reduzierte sich dieser weiter auf 20%, an Tag 4 lag die Anreicherung bei 12% ($p < 0,001$ in der Varianzanalyse). Die [³H]FDG-Messung nach Therapie ergab nur eine geringe nicht signifikante Reduktion der TMR um weniger als 20%¹. Es zeichnet sich derselbe Trend wie in der hier dargestellten tierexperimentellen Studie beim Lymphom ab und bestätigt die, mangels fehlender Signifikanz bei geringer Fallzahl nur wenig aussagekräftigen, ex vivo Messungen der [¹⁸F]FLT-Aufnahme nach Therapie. Von einem signifikanten Einfluss des in der Arbeit von Apisarnthanarax et al. verwendeten Tritium (³H) als positronenemittierendes Nuklid ist nicht auszugehen, da dieses an der gleichen Position innerhalb des Tracermoleküls eingefügt ist wie das ¹⁸F bei [¹⁸F]FLT und sich daher keine Unterschiede im Metabolismus des Tracers ergeben.

Um eine statistische Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse zu erreichen wurde in der Arbeit von Apisarnthanarax et al. der Markierungsindex der sog. Labelingindex (LI_{Ki-67}) berechnet, der die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen mit der Anzahl in einer standardisierten Fläche vorhandenen Zellen in Beziehung setzt. Mit einem Korrelationskoeffizient von $r = 0,89$ ($p < 0,001$) ergab sich eine signifikante Korrelation der TMR und dem Proliferationsmarker Ki-67 über die Zeit nach Therapie. Während dieser Zeit änderte sich das Tumolvolumen der therapierten Tiere nur wenig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch in vivo Messungen mit [¹⁸F]FLT mit Hilfe einer PET zwei Tage nach Radiochemotherapie durchgeführt. Diese zeigten eine deutliche Reduktion der TBR (tumor background ratio = Tumor-Hintergrund-Quotient) um 57%. Jedoch wurde nur eine nicht repräsentative Fallzahl ($n=2$) untersucht. Der TBR sank bei der [¹⁸F]FDG-PET nur um 17% ($n=2$). Obwohl die absolute Anreicherung von [¹⁸F]FLT im Tumorgewebe grundsätzlich etwas niedriger ist als die von [¹⁸F]FDG korrelieren die Messungen mit [¹⁸F]FLT deutlich besser mit der Immunhistochemie¹. Auch diese Ergebnisse passen zu den Resultaten die hier beim Lymphom nach Chemotherapie in vivo mit [¹⁸F]FLT in der PET gemessen wurden, und eine signifikante Reduktion der TBR früh nach Therapiebeginn zeigten.

Eine weitere Studie von Barthel et al. bediente sich beim Fibrosarkom ebenfalls eines ähnlichen experimentellen Ansatzes. Hier wurden ebenfalls Xenotransplantate generiert, in diesem Fall mit einer Fibrosarkomzelllinie namens RIF-1, die anschließend mit 5-Fluorouracil (5-FU) behandelt wurden. Auch hier wurde die Tumorgroße gemessen und es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Tumorgroße zwischen den therapierten Tieren und der Kontrollgruppe an Tag 1 und Tag 2 ($p < 0,001$ in der Varianzanalyse). In der ex vivo Messung reduzierte sich signifikant die [^{18}F]FLT-Anreicherung an Tag 1 nach Verabreichung der Therapie auf 47,8% ($p < 0,01$), während die [^{18}F]FDG-Aufnahme nicht signifikant nur auf 77,6% sank (Differenz zwischen [^{18}F]FDG und [^{18}F]FLT ebenfalls signifikant; $p = 0,037$). An Tag 2 nach Therapie fiel die [^{18}F]FLT-Anreicherung weiter signifikant im Vergleich zum Wert vor Therapie auf 27,1% ($p < 0,001$). Zu diesem Zeitpunkt konnte auch eine signifikante Reduktion der [^{18}F]FDG-Anreicherung in Vergleich zum Anfangswert gemessen werden. Der Wert fiel auf 51,8% ($p < 0,01$). Auch in dieser Studie wurde ein Vergleich mit der Histologie angestellt, hier jedoch wurde eine immunhistochemische Markierung mit dem ebenfalls etablierten Proliferationsmarkers PCNA (proliferating cell nuclear antigen = Nukleäres Antigen proliferierender Zellen) durchgeführt und ebenfalls, wie oben beschrieben, ein Markierungsindex (LI_{PCNA}) ausgewertet. Hier zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der ex vivo gemessenen [^{18}F]FLT-Anreicherung und dem LI_{PCNA} ($r = 0,71$; $p = 0,031$) im zeitlichen Verlauf nach Therapie. Bei der in vivo Bildgebung mit einer [^{18}F]FLT-PET wurde der Wert der fraktionierten Retention ausgewertet, da die therapierten Versuchstiere nach der Therapie mit 5-FU eine schnellere Anflutung und anschließend eine schnellere Elimination aus dem Tumorgewebe über die Messzeit im Vergleich zu den untherapierten Tieren zeigten. Diese Maßzahl definiert sich aus dem Quotienten aus dem gemessenen Absolutwert der Traceranreicherung 5min nach Applikation innerhalb einer ROI (region of interest) und demselben Wert nach 60min in der dynamischen Messung. Er sank bei der Gruppe der therapierten Versuchstiere 48h nach Therapie signifikant ab ($p = 0,026$; $n = 3/\text{Gruppe}$). Diese hier verwendete Auswertung der Traceranreicherung ist laut den Autoren in diesem Fall gerechtfertigt durch eine spezielle Eigenschaft des verwendeten Chemotherapeutikums 5-FU, das einen erhöhten Blutdurchfluss innerhalb des Tumors verursacht und es deshalb zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe schnelleren Anfluten des Tracers im Tumor bei der dynamischen Messung kommt⁶.

Diese Studie zeigt, dass bei der Entscheidung für eine Therapieevaluation mit [¹⁸F]FLT unbedingt die molekularbiologischen Wirkmechanismen der verwendeten Chemotherapeutika und die Veränderungen im Tumorgewebe, die diese verursachen, bekannt sein und bei der Auswertung berücksichtigt werden müssen. Zudem wurde hier eine Korrelation des Rückgangs der Traceranreicherung nach Therapie mit einem weiteren etablierten immunhistochemischen Proliferationsmarker PCNA nachgewiesen, was die in dieser Arbeit durchgeführten Ergebnisse ebenfalls bestätigt.

Die letzte in diesem Zusammenhang erwähnte Arbeit wurde von Leyton et al. verfasst. Darin wurden ebenfalls Fibrosarkomxenotransplantate mit RIF-1 Zellen generiert und anschließend mit Cisplatin behandelt. Auch hier wurde wieder die Tumorgröße gemessen und man fand 24h nach Therapiebeginn keinen Unterschied der Tumorgröße. 48h nach Therapieapplikation jedoch zeigte sich ein signifikanter Volumenunterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tumoren ($p = 0,03$; $n = 8$). Es wurden [¹⁸F]FLT-PET-Untersuchungen 24h und 48h nach Therapie mit Cisplatin durchgeführt und die TBR berechnet, wobei in dieser Arbeit nicht der Muskel als Referenzorgan verwendet wurde sondern die Leber. An 24h nach Therapiebeginn betrug der Wert des $TBR_{(Leber)}$ der therapierten Tiere nur noch 75% des Werts der unbehandelten Kontrollen. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,03$). 48h nach Therapiebeginn fiel der Wert weiter auf 50% im Vergleich zu den Kontrollen ab, ebenfalls signifikant ($p = 0,03$). Auf die gleiche Weise wurden [¹⁸F]FDG-PET-Untersuchungen durchgeführt, dabei errechnete sich ein ebenfalls signifikanter Unterschied von 47% des $TBR_{(Leber)}$ im Vergleich zu dem der Kontrollen 24h nach Therapiebeginn ($p = 0,03$). 48h nach Therapiebeginn sank der $TBR_{(Leber)}$ bei den [¹⁸F]FDG-Messungen nur noch unwesentlich auf 37% des Kontrollwerts. Auch in dieser Arbeit wurde die fraktionierte Retention berechnet, wie oben beschrieben, jedoch brachte sie hier keinen neuen Informationsgewinn. Zudem wurden Schnitte der Tumore nach der Explantation immunhistochemisch mit Antikörper gegen PCNA gefärbt und der LI_{PCNA} , wie oben beschrieben, errechnet. Bei der Analyse wurde bei den Tumoren, die mit [¹⁸F]FLT untersucht wurden, eine signifikante positive Korrelation zwischen dem LI_{PCNA} und der $TBR_{(Leber)}$ gefunden ($r = 0,89$; $p = 0,001$). Für [¹⁸F]FDG wurde ebenfalls eine positive Korrelation ermittelt, die jedoch aufgrund einiger Ausreißer nicht signifikant war ($r = 0,55$; $p = 0,06$). In Zellzyklusanalysen

wurden in dieser Arbeit die molekularbiologischen Mechanismen für die verringerte Traceraufnahme nach Therapie weiter untersucht. Es wurden ein signifikanter Anstieg der G₀-G₁- und der G₂-M-Zellfraktion, sowie ein signifikanter Abfall der S-Phase-Zellfraktion festgestellt⁴². Dies passt ebenfalls sehr gut zu denn hier dargestellten Daten und weist als einen Mechanismus der reduzierten [¹⁸F]FLT-Anreicherung ebenfalls einen Zellzyklusarrest der Tumorzellen nach. Welche Rolle die Apoptoseeinleitung der mit Cisplatin behandelten Tumorzellen spielt wurde in der Arbeit von Leyton et al. nicht weiter untersucht.

Alle oben genannten Studien, inklusive der hier in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen, zeigen konsistente Ergebnisse. Schon früh nach einer Therapie mit klassischen Chemotherapeutika zeigt sich unabhängig von der Tumorentität ein signifikanter Rückgang der [¹⁸F]FLT-Anreicherung ex vivo gemessen. Dies ist auch in einem nicht invasiven [¹⁸F]FLT-PET-Scan gut reproduzierbar, und man fand ebenfalls unabhängig von der Tumorentität eine signifikante Reduktion der Traceranreicherung. Zudem wurde eine signifikante Korrelation mit den etablierten immunhistochemischen Proliferationsmarkern gefunden, wobei bei diesen frühen Messzeitpunkten nicht zwingend eine Reduktion des Tumolvolumens nachweisbar sein muss. In den Studien, in denen ein Vergleich von [¹⁸F]FLT mit [¹⁸F]FDG durchgeführt wurde, zeigten sich deutliche Vorteile von [¹⁸F]FLT beim Nachweis der Effekte der Chemotherapeutika auf das Tumorgewebe im Verlauf. Bekannt ist bereits, dass die Aktivität der Thymidinkinase 1 (TK1) die Traceranreicherung in den Tumorzellen bestimmt. Diese wird wiederum beeinflusst durch seine Expression oder durch die Beeinflussung seiner katalytischen Aktivität, durch einen reduzierten intrazellulären Spiegel des Kofaktor ATP^{6, 7}. Beide Mechanismen scheinen bei der Behandlung mit den klassischen Chemotherapeutika eine Rolle zu spielen. Nach den Ergebnissen der oben genannten Studien scheinen Apoptoseeinleitung und Zyklusarrest die übergeordneten Auslöser für die reduzierte Expression und den verminderten Spiegel an ATP zu sein. Um nun die bisherigen Resultate im Rahmen des Einsatzes von [¹⁸F]FLT als Surrogatmarker bei der Therapieevaluation von Lymphomen und andern Tumorentitäten fortzuführen, wäre als nächster Schritt sinnvoll ein Tiermodell zu etablieren, welches untersucht, ob Therapieversager zuverlässig detektiert werden können. Es sollte auch untersucht werden wie die molekularbiologischen Mechanismen, welche ein Therapieversagen verursachen, die

Traceranreicherung beeinflussen. Es ist also weitere präklinische Forschung notwendig um die bisherigen vielversprechenden Ergebnisse zu festigen und einen sinnvollen klinischen Einsatz von [¹⁸F]FLT vorzubereiten.

4.3 Diskussion der klinischen Studie

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde in einer ersten klinischen Studie gezeigt, dass die frühe Therapieevaluation einer Chemotherapie nach R-CHOP bzw. CHOP bei aggressiven Lymphomen mit der nicht invasiven [¹⁸F]FLT-PET machbar und aussagekräftig ist. In den prätherapeutischen PET-Untersuchungen wurden die Lymphommanifestationen der Patienten mit einer Sensitivität von 100% detektiert. Schon zwei Tage nach Initiation von R-CHOP reduzierte sich die [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den Lymphommanifestationen signifikant auf eine TBR (tumor background ratio = Tumor-Hintergrund-Quotient) < 1 bei allen Patienten, bei denen die Therapie ansprach. Als Referenzorgan für die Berechnung der TBR wurde hier die Leber verwendet. Im Gegensatz dazu wurde in einem nichtansprechenden Patienten eine hohe [¹⁸F]FLT-Anreicherung innerhalb des Tumors nach Therapie gemessen, mit einer TBR von > 2 (SUV Reduktion von 39%). Es gab zwei Patienten bei denen ein Rezidiv der Erkrankung auftrat. Der erste Patient war in partieller Remission nach sechs Zyklen R-CHOP. Dies wurde korrekt durch einen signifikanten Abfall in der [¹⁸F]FLT-Anreicherung angezeigt (67%). Beim zweiten Patient mit Rezidiv wurde der geplante PET-Scan nach kompletter Chemotherapie nicht durchgeführt. Diese Daten weisen daraufhin, dass die [¹⁸F]FLT-Anreicherung innerhalb des Tumors einen Marker für das Therapieansprechen für Immunochemotherapie darstellen könnte.

Die Anreicherung bei der [¹⁸F]FLT-PET-Bildgebung zwei Tage nach der Gabe von Rituximab blieb in den Lymphommanifestationen jedoch unverändert. Es war aber möglich, zwischen dem Effekt auf die in vivo Proliferation von Rituximab allein und der zusätzlichen Gabe von CHOP zu unterscheiden, was darauf hindeutet, dass Rituximab allein nach der ersten Verabreichung nicht die Potenz hat, einen ausreichenden antiproliferativen Effekt zu induzieren. Diese Ergebnisse stimmen mit der Arbeit von Maloney et al. überein, welche gezeigt haben, dass es mit Rituximab als alleinige Therapie nicht möglich ist eine ausreichende Zytotoxizität in Diffus

großzelligen B-Zell Lymphomen zu erreichen⁴⁷. In dieser Phase I Studie wurden 20 vortherapierte Patienten, 15 mit einem niedriggradigen und 5 mit einem mittel- oder hochgradigem B-Zell-Lymphom, eingeschlossen. Von den 18 auswertbaren Patienten sprachen nur 33% an. In der Subgruppenanalyse wurde nur bei den niedriggradigen Lymphomen eine etwas höhere Ansprechrate von 37% festgestellt. Nach dieser Studie wurde der Weg Rituximab, als alleinige Therapie bei hochgradigen B-Zell-Lymphomen einzusetzen, verlassen. Einen weiteren zu beachtenden Gesichtspunkt arbeiteten die Autoren in dieser Arbeit heraus, bei der ersten Injektion lässt sich ein geringerer maximaler Plasmaspiegel von Rituximab nachweisen als in den folgenden Injektionen. Als Erklärung wird angegeben, dass zunächst alle im Blut befindlichen Epitope abgesättigt werden müssen. Das könnte ebenfalls zu der geringen antiproliferativen Wirkung von Rituximab nach der ersten Injektion beigetragen haben. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, in wie weit sich ein [¹⁸F]FLT-PET zur Therapieevaluation einer alleinigen Rituximabtherapie bei niedriggradigen Lymphomen einsetzen lässt.

Interessanterweise fand sich ein Unterschied bei der [¹⁸F]FLT-Anreicherung innerhalb des Tumors zwischen Patienten in partieller Remission und Patienten in kompletter Remission (n = 14), welche in einem PET-Scan früh nach Beginn der Chemotherapie untersucht wurden (p = 0,009). Im der Nachbeobachtungszeit trat ein nicht-Lymphom-assoziiertes Todesfall bei einem Patienten auf, der auf die verabreichte Therapie nicht ansprach, und es wurden zwei Patienten mit Progression der Krankheit nach kompletter bzw. partieller Remission beobachtet. Daraus errechnete sich eine Ansprechrate von insgesamt 82% (18 von 22). Ähnlich hohe Ansprechraten wurden ebenfalls in früheren Therapieevaluationsstudien von Coiffier et al.²⁰, Czuczman et al.²² und Vase et al.⁸⁵, die R-CHOP mit CHOP bei aggressiven Lymphomen verglichen, gefunden. In diesen Studien fand man Ansprechraten von 76% bis über 90%. Zudem stellte sich in allen genannten Arbeiten ein signifikanter Vorteil von R-CHOP gegenüber der alleinigen Gabe von CHOP dar.

Durch die niedrige Anzahl therapierefraktärer oder rückfälliger Patienten kann der prädiktive Wert der [¹⁸F]FLT-PET nicht abschließend bestimmt werden. Jedoch finden sich in der Literatur vergleichbare Ergebnisse in Studien zur Responseevaluation bei verschiedenen Tumorentitäten mit Tracern, die wie [¹⁸F]FLT

die zelluläre Proliferation adressieren. So wurde von Shields et al. der Tracer [^{11}C]Thymidin bei sechs Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom oder einem high-grade Sarkom vor und nach Chemotherapie untersucht. Bei Patienten die auf die Therapie ansprachen, zeigte sich ein Abfall der [^{11}C]Thymidin-Anreicherung sowie der [^{18}F]FDG-Anreicherung innerhalb des Tumors, dagegen bei Patienten, die therapierefraktär waren, blieb die Anreicherung beider Substanzen unverändert⁶⁷. Auch bei Brustkrebs wurde die Beurteilung des Therapieansprechens mit der [^{18}F]FLT-PET untersucht. Kenny et al. konnte in einer Pilotstudie mit 13 Patienten feststellen, dass ein [^{18}F]FLT-PET Proliferationsveränderungen im Tumor innerhalb einer Woche nach Beginn der Chemotherapie bereits darstellen kann³⁹. In einer klinischen Studie, in die 14 Patienten eingeschlossen wurden, zeigte Pio et al., dass die mittlere Veränderung der [^{18}F]FLT-Anreicherung bei primären und metastasierten Brustkrebs bereits nach einem Zyklus Chemotherapie signifikant mit den späteren Veränderungen der Tumormarker korreliert⁵⁶. Durch die genannten Arbeiten und die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie scheint eine [^{18}F]FLT-PET die Potenz zu besitzen Veränderungen in der Proliferationskinetik von Lymphomen und anderen malignen Tumoren nach der Applikation von Chemotherapeutika auch im Menschen darzustellen.

4.4 Limitationen und unbeantwortete Fragen beim Einsatz von [^{18}F]FLT-PET

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen sollten bestimmte Limitationen beim klinischen Einsatz des Tracers [^{18}F]FLT beachtet werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wird mit [^{18}F]FLT nicht direkt der Thymidineinbau in die DNA dargestellt, sondern die Aktivität der Thymidinkinase 1. Es ist vorstellbar, dass verschiedene Therapieregimes in den Metabolismus von [^{18}F]FLT direkt eingreifen, zum Beispiel durch Beeinflussung der Thymidinkinase-1-Aktivität direkt, durch die Beeinflussung der Konzentration des Cofaktors ATP in der Zelle oder durch die Veränderung des Expressionslevels⁷. Dies hätte die Abkopplung des [^{18}F]FLT-Signals von der tatsächlichen Proliferationsaktivität der Zelle zur Folge. Es ist auch zu beachten, dass Therapieschemata, die im Rahmen einer Chemotherapie eingesetzt werden, zunächst die Zellen durch verschiedene Mechanismen daran hindern, sich weiter zu teilen. Man nennt diese Situation Zellzyklusarrest. Die Zellen reagieren daraufhin normalerweise mit

Apoptoseeinleitung⁶⁹. Dies ist das Ziel einer zytotoxischen Therapie. Problematisch ist die Situation bei Zellen, die auf die Behandlung hin nur in einem Zyklusarrest „arretiert“ sind und kein Apoptose-Programm einleiten, etwa aufgrund von Mutationen in Schlüsselenzymen der entsprechenden Proteinkaskade. Diese Zellen sind immer noch vital, proliferieren jedoch nicht mehr und werden deswegen vermutlich nicht in einem [¹⁸F]FLT-PET erfasst werden. Sie sind jedoch potentiell in der Lage, sich nach einiger Zeit erneut zu teilen und können ein Fehlschlagen der Tumorthherapie verursachen. Aus diesen Überlegungen heraus bleibt noch zu beweisen, ob eine zurückgehende Proliferationsaktivität, einmal gemessen durch eine [¹⁸F]FLT-PET früh nach Therapiebeginn, ein ausreichender Prädiktor für den Therapieerfolg über einen längeren Zeitraum darstellt. Der erneute Anstieg der mittleren TBR 9 Tage nach Therapiebeginn in der hier gezeigten tierexperimentellen Studie deutet darauf hin, dass die proliferative Aktivität längere Zeit nach Therapie auch wieder ansteigen kann. Endgültige Schlussfolgerungen lassen sich aus diesen Hinweisen nicht ziehen, da keine Langzeitbeobachtungen im Sinne von Überlebenskurven erstellt wurden.

Auch in der klinischen Studie ist es, aufgrund der limitierten Anzahl der Patienten und aufgrund der hohen Ansprechrate der untersuchten Patienten momentan nicht möglich, eine abschließende Aussage über den prädiktiven Wert der Veränderung der [¹⁸F]FLT-Anreicherung im Tumor in Bezug auf das Langzeitansprechen zu machen. Die Bestimmung dieses Wertes ist jedoch obligat vor einem breiten Einsatz in der Klinik. Auch weil in einer Studie von Wieder et al. gezeigt wurde, dass sich ein [¹⁸F]FLT-PET nicht immer zur Bewertung des Therapieerfolgs eignet⁹¹. In dieser Arbeit wurde die Beurteilung des Therapieerfolgs einer neoadjuvanten Radiochemotherapie (Gesamtbestrahlungsdosis 45Gy, mit Verabreichung von 250mg/m² 5-FU) bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen mittels eines [¹⁸F]FLT-PET untersucht. Dafür wurden 10 Patienten in die Studie eingeschlossen, die dann vor Therapie, zwei Wochen nach Therapie und präoperativ (fünf bis sechs Wochen nach Therapie) im PET untersucht wurden. Nach der Operation wurde anschließend histologisch das Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie beurteilt, indem der Prozentsatz des mit vitalen Tumorzellen infiltrierten Gewebes zum übrigen Gewebe im makroskopisch sichtbaren Tumorbett in Beziehung gesetzt wurde. Anschließend wurden, wie schon früher publiziert, die Patienten bei denen nur weniger als 10% des Tumorbetts tumorinfiltriert waren als „Therapieansprecher“ klassifiziert und diejenigen die mehr als 10% Tumorinfiltration

aufwiesen als „Therapieversager“ eingestuft. Die [^{18}F]FLT-Anreicherung, repräsentiert durch den mittleren SUV-Wert innerhalb des Tumors sank signifikant 2 Wochen nach Therapie auf im Mittel 71,4% ($p = 0,005$) und weiter signifikant auf 45,3% präoperativ ($p = 0,005$). Diese Ergebnisse erscheinen zunächst in Einklang mit den hier beim Lymphom erhobenen Daten. Jedoch zeigte sich keine Korrelation mit der histologischen Klassifikation des Therapieansprechens, d. h. histologisch als Therapieansprecher klassifizierte Patienten zeigten keinen Unterschied in Bezug auf den Rückgang der Traceraufnahme oder in Bezug auf die Absolutwerte der [^{18}F]FLT-Anreicherung im Verlauf der Therapie im Vergleich zu den histologisch als Therapieversager eingestuften Patienten.

Insgesamt ist die Datenlage zur Bewertung der prädiktiven Aussagekraft einer Therapieevaluation mit [^{18}F]FLT als Surrogatmarker noch unzureichend. Es bleibt großer angelegten Studien für einzelne Tumorentitäten vorbehalten mit genügend großer Anzahl an Therapieversagern hier weiter Klarheit zu schaffen. Ebenfalls muss noch geklärt werden ob und in welchen Zeitabständen es sinnvoll ist die Untersuchung zu wiederholen um einen hohen Vorhersagewert zu erreichen.

Desweiteren ist, durch die Tatsache, dass [^{18}F]FDG-PET bereits erfolgreich Einzug in die Diagnostik und Therapieevaluation von malignen Lymphomen gehalten hat, erst noch in zukünftigen Studien mit größerer Fallzahl nachzuweisen, dass der Tracer [^{18}F]FLT einen signifikanten Vorteil gegenüber [^{18}F]FDG aufweist. In einigen oben genannten tierexperimentellen Studien zeigte sich ein Vorteil von [^{18}F]FLT gegenüber [^{18}F]FDG. Auch in einer klinischen Studie von Buck et al. sind erste Ergebnisse, die auf eine solche Überlegenheit hindeuten, bei Lungentumoren bereits erbracht worden. Hier zeigte sich eine signifikant bessere Korrelation zwischen der proliferativen Aktivität und der Anreicherung von [^{18}F]FLT im Bereich des Tumors als der Anreicherung von [^{18}F]FDG¹⁰. Ein Vergleich zwischen [^{18}F]FLT und [^{18}F]FDG wurde auch von Chen et al. angestellt. Hier wurden behandelte und neu diagnostizierte Gliome mit einem PET jeweils für beide Tracer untersucht, um herauszufinden, welcher Tracer ein besserer Prädiktor für Tumorprogression und Gesamtüberleben darstellt. Bei high-grade Gliomen ergab sich für [^{18}F]FLT eine signifikant bessere prädiktive Aussagekraft in Bezug auf Tumorprogression und Gesamtüberleben als für [^{18}F]FDG¹³. Auch die von Kasper et al. veröffentlichte Studie vergleicht die beiden Tracer unter dem Gesichtspunkt, ob sich bei der Untersuchung residualer Tumormassen bei Lymphomen nach Therapie mit dem

PET, je nach Tracer eine bessere Vorhersage des Gesamtüberlebens machen lässt. Aus den Ergebnissen lässt sich ein etwas besserer prädiktiver Wert des [^{18}F]FLT-PET vermuten, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied³⁷. Eine aussagekräftige, zwischen [^{18}F]FLT und [^{18}F]FDG vergleichende Studie zur frühen Therapieresponseevaluation bei malignen Lymphomen steht noch aus.

Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass, obwohl [^{18}F]FLT spezifischer erscheint als [^{18}F]FDG, es Hinweise auf eine unspezifische Traceranreicherung in entzündliche Läsionen mit hoher proliferativer Aktivität gibt, wie zum Beispiel in reaktiven Lymphknoten oder bei der Sarkoidose⁶⁴. Denn auch der Entzündungsprozess kann von proliferativer Aktivität der Entzündungszellen selbst begleitet sein. Dies kann zum Beispiel, wie eine Studie von Troost et al. zeigt, zu Differenzierungsschwierigkeiten zwischen reaktiven, also benignen Lymphknotenveränderungen und metastatisch durchsetzten Lymphknoten führen⁸⁰.

4.5 Neue experimentelle Herangehensweisen zur Messung der Proliferationsaktivität durch molekulare Bildgebung

Es gibt kaum Eigenschaften, die allen malignen Tumoren zugleich eigen sind. Die wohl grundlegendste Gemeinsamkeit ist die deregulierte exzessive Proliferation. Aus diesem Grund wird der nichtinvasiven Messung der proliferativen Aktivität in der aktuellen Forschung soviel Bedeutung beigemessen. [^{18}F]FLT ist momentan der meist erforschte nicht-invasive Marker für diesen Einsatz. Da jedoch nur ein geringer Prozentsatz in die DNA inkorporiert wird, ist ausschließlich eine indirekte Messung der Proliferation möglich. Diese ist durch die Aktivität und Expression der Thymidinkinase 1 (TK1) charakterisiert. Um nun diese Unschärfe auszuschalten, wird trotz der vielen positiven Eigenschaften von [^{18}F]FLT an neuen molekularen Tracerstrukturen geforscht, die eine direkte nichtinvasive Messung von Proliferation möglich macht. Man geht davon aus, dass die Aufnahme eines Tracers, welcher zu einem hohen Anteil in die DNA eingebaut wird, nur noch von der Progression des Zellzyklus abhängt und damit direkt die Proliferation der Zelle anzeigt.

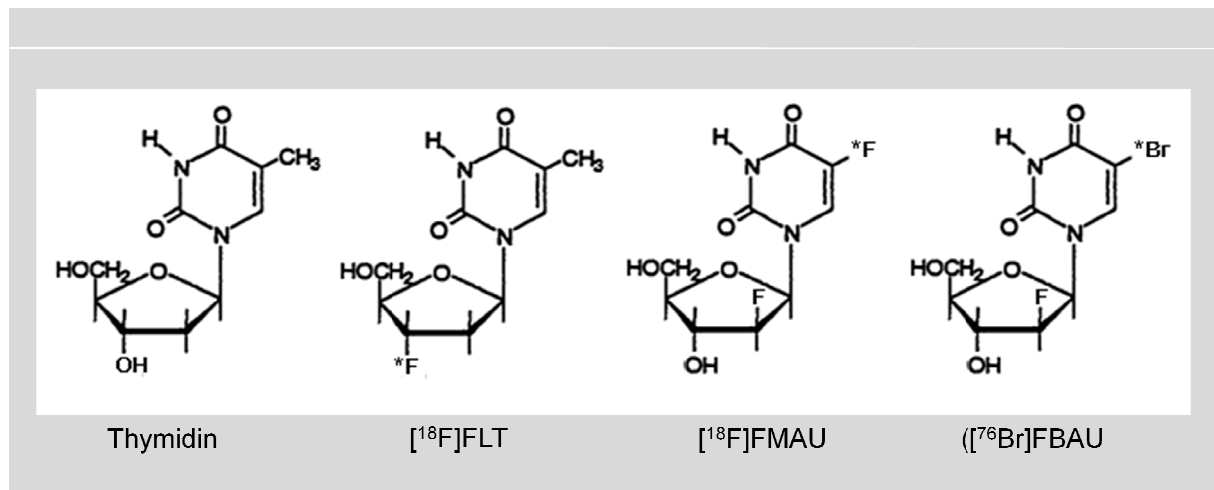


Abb. 15: Molekulare Struktur von Thymidin und den korrespondierenden Radiopharmaka [¹⁸F]FLT, [¹⁸F]FMAU und [¹⁸F]FBAU. * = Lokalisation des radioaktiven Nuklids. Adaptiert nach Bading et al.⁴

Ein Versuch, dies zu verwirklichen, wurde mit dem Tracer [¹¹C]Thymidin bereits unternommen. Wie oben beschrieben verhinderten jedoch die geringe Halbwertszeit von ¹¹C und die durch den schnellen Zerfall von [¹¹C]Thymidin in der Zelle ungeeignete Pharmakodynamik die breite Untersuchung des Tracers in der Klinik. Neue Tracer sind jedoch bereits in der Entwicklung und werden auf ihre Eignung hin untersucht. Die vielversprechendsten Beispiele dafür sind die Thymidinanaloga 2'-[¹⁸F]Fluoro-5-Methyl-1-β-D-Arabinofuranosyl-Uracil ([¹⁸F]FMAU) bzw. 2'-[¹¹C]Fluoro-5-Methyl-1-β-D-Arabinofuranosyl-Uracil ([¹¹C]FMAU) und 1-(2'-Deoxy-2'-Fluoro-β-D-Arabinofuranosyl)-5-[⁷⁶Br]-Bromouracil ([⁷⁶Br]FBAU)⁴⁸ (siehe Abb. 15). Präklinische Studien ergaben, dass die Aufnahme und Speicherung von [¹⁸F]FMAU bzw. [¹¹C]FMAU spezifisch in Tumormanifestationen und hochproliferativen Geweben seinen eigenen Einbau in die DNA widerspiegelt^{2, 3, 87}. Es finden sich Einbauraten von über 80%³. Zudem ist es hochresistent gegenüber enzymatischen Abbauprozessen und wird wie [¹⁸F]FLT in der Zelle durch Phosphorylierung festgehalten⁷³. In den ersten klinischen Pilotstudien zeigt [¹⁸F]FMAU bzw. [¹¹C]FMAU eine hohe Traceranreicherung in den untersuchten Tumoren, vergleichbar mit der Traceraufnahme von [¹⁸F]FLT^{21, 73}. Im Gegensatz zu [¹⁸F]FLT ist die Anreicherung in der Leber relativ höher, was den Einsatz in diesem Organ beeinträchtigen könnte. Auf der anderen Seite geht die Exkretion des Tracers in die Blase deutlich langsamer vonstatten, was seinen Einsatz im kleinen Becken begünstigt⁴⁵. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Anflutung im Zielgewebe etwa zehn Minuten nach der Injektion des Tracers⁷⁷. Dies könnte die Verwendung des Nuklids ¹¹C trotz seiner kurzen

Halbwertszeit auch in der Klinik erlauben, was die Strahlenbelastung des Patienten verringern würde und eine zusätzliche Bildgebung mit einem ^{18}F markierten Tracer, zum Beispiel ^{18}F FDG, ermöglichen würde. Es ergeben sich wegen dem veränderten molekularen Aufbau von ^{18}F FMAU bzw. ^{11}C FMAU natürlich auch Unterschiede zum Ursprungsmetaboliten. So ist dieser Tracer ein gutes Substrat der Thymidinkinase 2 (TK2), die hauptsächlich zyklusunabhängig in den Mitochondrien exprimiert wird, und weitaus weniger der Thymidinkinase 1 (TK1), ganz im Gegensatz zu Thymidin selbst aber auch im Gegensatz zu ^{18}F FLT¹⁶. Dadurch stellt sich die Frage, inwiefern dieses Affinitätsdefizit von ^{18}F FMAU bzw. ^{11}C FMAU sich durch die hochregulierte Expression von TK1 in stark proliferierenden Zellen ausgeglichen werden kann. Auf jeden Fall könnte die durch den Einbau in mitochondriale DNA entstehende, störende Hintergrundaktivität die Ursache für eine geringere Sensitivität von ^{18}F FMAU gegenüber ^{18}F FLT sein. Zudem muss für den Einsatz bei der Therapieevaluation bedacht werden, dass bestimmte zytotoxische Therapien in den Metabolismus von ^{18}F FMAU eingreifen könnten. Ein weiterer Nachteil ist, dass Langzeittoxizitätsuntersuchungen für diesen Tracer fehlen. ^{18}F FBAU zeigt viele Ähnlichkeiten zu ^{18}F FMAU. Es wird ebenfalls schnell in stark proliferierenden Geweben gespeichert und zu einem ähnlich großen Anteil in die DNA eingebaut^{44, 45}. Ausführliche Untersuchungen zu diesem Tracer stehen noch aus.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die wissenschaftlichen Untersuchungen zu diesen neuen Tracern zur Proliferationsmessung zwar durchaus vielversprechend sind und sich durch ihren molekularen Aufbau bestimmte negative Eigenschaften von ^{18}F FLT zumindest theoretisch aufheben. Eine abschließende Beurteilung dieser Tracer auch im Vergleich zu ^{18}F FLT und ^{18}F FDG kann jedoch erst erfolgen, wenn sie durch weitere Studien besser charakterisiert sind. In diesem Zusammenhang ist sicherlich auch ein Einsatz dieser Tracer bei der frühen Therapieevaluation maligner Erkrankungen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die bereits klinisch etablierte Positronenemissionstomographie (PET) erlaubt es, Prozesse des Zellmetabolismus nichtinvasiv mit einem entsprechenden, radioaktiv markierten Tracer darzustellen. Ein solcher mit dem Thymidinanalogon 3'-[¹⁸F]Fluoro-3'-Desoxythymidin ([¹⁸F]FLT) gut darstellbarer Prozess ist die zelluläre Proliferation. Ist diese dereguliert ist sie gleichzeitig das grundlegendste Merkmal eines malignen Prozesses. Da auch in der Behandlung von Malignomen die meisten therapeutischen Ansätze auf die gesteigerte Proliferation der Tumorzellen zielen, ist wiederum die nichtinvasive Bestimmung der proliferativen Aktivität zur Beurteilung des Therapieansprechens naheliegend. Ziel dieser Arbeit war es, [¹⁸F]FLT als Surrogatparameter für die frühe Prädiktion des Therapieansprechens einer zytotoxischen Therapie beim malignen Lymphom zu untersuchen und zu bewerten.

In der tierexperimentellen Studie wurden in immundefiziente Mäuse humane Non-Hodgkin-Lymphom Xenotransplantate implantiert und anschließend mit dem Standard-Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt (Tag 0). Daraufhin wurde der Therapieeffekt am Tag +1 bis Tag +9 nichtinvasiv mit der [¹⁸F]FLT-PET erhoben und mit der immunhistochemisch gemessenen Proliferationsfraktion und Apoptoseinduktion korreliert.

In der Therapiegruppe war schon an Tag +1 das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis (TBR) der [¹⁸F]FLT-Anreicherung, nicht-invasiv gemessen in einer PET-Untersuchung, signifikant niedriger ($p=0,048$) als zur Eingangsuntersuchung und dieser Trend hielt bis Tag +9 an. Diese Beobachtung wurde mit einer ex vivo Messung der Traceraufnahme bestätigt und korrelierte mit der Abnahme der Proliferationsfraktion, dargestellt durch eine Ki-67 Färbung, und mit der Zunahme apoptotischer Zellen, dargestellt durch die Färbung der aktivierten Caspase 3. Beides deutet darauf hin, dass Zyklusarrest und Apoptoseinduktion die übergeordneten Mechanismen der reduzierten Traceraufnahme sind und zeigt, dass die [¹⁸F]FLT-PET schon 24h nach Therapiebeginn, noch weit vor dem Auftreten einer Veränderung des Tumorumfanges, eine Reduktion der proliferativen Aktivität der Tumorzellen im murinen Lymphom-Modell darstellen kann.

In der klinischen Studie wurden 22 unbehandelte Patienten mit neu diagnostiziertem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom, die einer R-CHOP bzw. CHOP Therapie zugestimmt hatten, eingeschlossen. Sie wurden zur nichtinvasiven

Therapiebeurteilung vor Therapiebeginn und zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Therapie mit der [¹⁸F]FLT-PET untersucht: ein Teil (Gruppe (1), n=6) eine und sechs Wochen nach Beginn des R-CHOP bzw. CHOP Therapieregimes, der andere Teil (Gruppe (2), n=16) zwei Tage nach der Verabreichung von Rituximab und zwei Tage nach CHOP.

Es wurden alle im Standardstaging erkannten Lymphommanifestationen im [¹⁸F]FLT-PET mit einem im Vergleich zum Normalgewebe hohen Standard-uptake-value (SUV) dargestellt (mittlerer [¹⁸F]FLT-SUV = $8,1 \pm 3,9$). Diese dimensionslose Maßzahl ermöglicht einen absoluten Vergleich zwischen der gemessenen Aktivität in gleich großen ROI (region of interest). In Gruppe (1) fiel der mittlere SUV innerhalb der Lymphommanifestationen eine Woche nach R-CHOP bzw. CHOP signifikant auf 23% ($p < 0,001$) und nach sechs Wochen ebenfalls signifikant auf 15% ($p = 0,003$) des Werts der Eingangsuntersuchung ab. In Gruppe (2) zeigte sich keine signifikante SUV-Reduktion zwei Tage nach der Gabe von Rituximab. Jedoch sank der SUV zwei Tage nach CHOP signifikant auf 32% ($p = 0,004$) des Anfangswerts im Bereich des Tumors. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rituximab allein früh nach Therapiebeginn keinen deutlichen antiproliferativen Effekt besitzt, im Gegensatz zum Therapieregime R-CHOP und CHOP. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass

Zusammenfassend belegen beide Studien im Einklang mit anderen Publikationen, dass die [¹⁸F]FLT-PET eine vielversprechende und sensitive Methode ist zur frühen nicht-invasiven Beurteilung von Therapieeffekten auf die Tumorzellproliferation. Jedoch wird auch deutlich, dass die molekularbiologischen Veränderungen in einer Tumorzelle nach Einleitung einer zytotoxischen Therapie komplex und letztlich nicht gänzlich verstanden sind. Zudem ist insgesamt die Datenlage zur Bewertung der prädiktiven Aussagekraft einer frühen Therapieevaluation mit [¹⁸F]FLT noch unzureichend. Es bleibt weiteren tierexperimentellen Studien vorbehalten weiter die molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen der Proliferationskinetik, der Traceraufnahme und der Beeinflussung durch verschiedene Therapieregime zu erforschen und größer angelegten klinischen Studien mit genügend großer Fallzahl den Einsatz des Tracers als Surrogatparameter für die frühe Responseprädiktion weiter zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Apisarnthanarax, S., Alauddin, M.M., Mourtada, F., Ariga, H., Raju, U., Mawlawi, O., Han, D., Bornmann, W.G., Ajani, J.A., Milas, L., Gelovani, J.G., Chao, K.S. Early detection of chemoradioresponse in esophageal carcinoma by 3'-deoxy-3'-³H-fluorothymidine using preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4590-4597
- [2] Bading, J.R., Shahinian, A.H., Bathija, P., Conti, P.S. Pharmacokinetics of the thymidine analog 2'-fluoro-5-[(14)C]-methyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil [(14)C]FMAU in rat prostate tumor cells. *Nucl Med Biol* 27 (2000) 361-368
- [3] Bading, J.R., Shahinian, A.H., Vail, A., Bathija, P., Koszalka, G.W., Koda, R.T., Alauddin, M.M., Fissekis, J.D., Conti, P.S. Pharmacokinetics of the thymidine analog 2'-fluoro-5-methyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil (FMAU) in tumor-bearing rats. *Nucl Med Biol* 31 (2004) 407-418
- [4] Bading, J.R., Shields, A.F. Imaging of cell proliferation: status and prospects. *J Nucl Med* 49 Suppl 2 (2008) 64S-80S
- [5] Barth, F., Mühlbauer, P., Nikol, F., Wörle, K. Stochastik. In: *Mathematische Formeln und Definitionen*, Barth, F., Mühlbauer, P. (Hrsg.), Bayerischer Schulbuch-Verlag GmbH, München, 2004, 8. Auflage, 47-49.
- [6] Barthel, H., Cleij, M.C., Collingridge, D.R., Hutchinson, O.C., Osman, S., He, Q., Luthra, S.K., Brady, F., Price, P.M., Aboagye, E.O. 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. *Cancer Res* 63 (2003) 3791-3798
- [7] Barthel, H., Perumal, M., Latigo, J., He, Q., Brady, F., Luthra, S.K., Price, P.M., Aboagye, E.O. The uptake of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine into L5178Y tumours in vivo is dependent on thymidine kinase 1 protein levels. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (2005) 257-263
- [8] Bertz, J., Hentschel, S., Stabenow, R., Giersiepen, K., Kaatsch, P., Stegmaier, C., Haberland, J., Katalinic, A., Ziegler, H. *Krebs in Deutschland, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe*, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Saarbrücken, 2006.
- [9] Buck, A.K., Bommer, M., Stilgenbauer, S., Juweid, M., Glatting, G., Schirrmeyer, H., Mattfeldt, T., Tepsic, D., Bunjes, D., Mottaghy, F.M., Krause, B.J., Neumaier, B., Dohner, H., Moller, P., Reske, S.N. Molecular imaging of proliferation in malignant lymphoma. *Cancer Res* 66 (2006) 11055-11061

- [10] Buck, A.K., Halter, G., Schirrmeister, H., Kotzerke, J., Wurziger, I., Glatting, G., Mattfeldt, T., Neumaier, B., Reske, S.N., Hetzel, M. Imaging proliferation in lung tumors with PET: 18F-FLT versus 18F-FDG. *J Nucl Med* 44 (2003) 1426-1431
- [11] Buck, A.K., Kratochwil, C., Glatting, G., Juweid, M., Bommer, M., Tepsic, D., Vogg, A.T., Mattfeldt, T., Neumaier, B., Moller, P., Reske, S.N. Early assessment of therapy response in malignant lymphoma with the thymidine analogue [(18)F]FLT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (2007) 1775-1782
- [12] Buck, A.K., Schirrmeister, H., Hetzel, M., Von Der Heide, M., Halter, G., Glatting, G., Mattfeldt, T., Liewald, F., Reske, S.N., Neumaier, B. 3-deoxy-3-[(18)F]fluorothymidine-positron emission tomography for noninvasive assessment of proliferation in pulmonary nodules. *Cancer Res* 62 (2002) 3331-3334
- [13] Chen, W., Cloughesy, T., Kamdar, N., Satyamurthy, N., Bergsneider, M., Liau, L., Mischel, P., Czernin, J., Phelps, M.E., Silverman, D.H. Imaging proliferation in brain tumors with 18F-FLT PET: comparison with 18F-FDG. *J Nucl Med* 46 (2005) 945-952
- [14] Cheson, B.D., Horning, S.J., Coiffier, B., Shipp, M.A., Fisher, R.I., Connors, J.M., Lister, T.A., Vose, J., Grillo-Lopez, A., Hagenbeek, A., Cabanillas, F., Klippensten, D., Hiddemann, W., Castellino, R., Harris, N.L., Armitage, J.O., Carter, W., Hoppe, R., Canellos, G.P. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 17 (1999) 1244
- [15] Cheson, B.D., Pfistner, B., Juweid, M.E., Gascoyne, R.D., Specht, L., Horning, S.J., Coiffier, B., Fisher, R.I., Hagenbeek, A., Zucca, E., Rosen, S.T., Stroobants, S., Lister, T.A., Hoppe, R.T., Dreyling, M., Tobinai, K., Vose, J.M., Connors, J.M., Federico, M., Diehl, V. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 25 (2007) 579-586
- [16] Chou, T.C., Kong, X.B., Fanucchi, M.P., Cheng, Y.C., Takahashi, K., Watanabe, K.A., Fox, J.J. Synthesis and biological effects of 2'-fluoro-5-ethyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil. *Antimicrob Agents Chemother* 31 (1987) 1355-1358
- [17] Cobben, D.C., Elsinga, P.H., Suurmeijer, A.J., Vaalburg, W., Maas, B., Jager, P.L., Hoekstra, H.J. Detection and grading of soft tissue sarcomas of the extremities with (18)F-3'-fluoro-3'-deoxy-L-thymidine. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 1685-1690
- [18] Cobben, D.C., Jager, P.L., Elsinga, P.H., Maas, B., Suurmeijer, A.J., Hoekstra, H.J. 3'-18F-fluoro-3'-deoxy-L-thymidine: a new tracer for staging metastatic melanoma? *J Nucl Med* 44 (2003) 1927-1932
- [19] Cobben, D.C., van der Laan, B.F., Maas, B., Vaalburg, W., Suurmeijer, A.J., Hoekstra, H.J., Jager, P.L., Elsinga, P.H. 18F-FLT PET for visualization of laryngeal cancer: comparison with 18F-FDG PET. *J Nucl Med* 45 (2004) 226-231

- [20] Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., Gisselbrecht, C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 (2002) 235-242
- [21] Conti, P.S., Bading, J.R., Mouton, P.P., Links, J.M., Alauddin, M.M., Fissekis, J.D., Ravert, H.T., Hilton, J., Wong, D.F., Anderson, J.H. In vivo measurement of cell proliferation in canine brain tumor using C-11-labeled FMAU and PET. *Nucl Med Biol* 35 (2008) 131-141
- [22] Czuczman, M.S., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Saleh, M., Gordon, L., LoBuglio, A.F., Jonas, C., Klippenstein, D., Dallaire, B., Varns, C. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 17 (1999) 268-276
- [23] Di Bartolomeo, S., Di Sano, F., Piacentini, M., Spinedi, A. Apoptosis induced by doxorubicin in neurotumor cells is divorced from drug effects on ceramide accumulation and may involve cell cycle-dependent caspase activation. *J Neurochem* 75 (2000) 532-539
- [24] Dittmann, H., Dohmen, B.M., Kehlbach, R., Bartusek, G., Pritzkow, M., Sarbia, M., Bares, R. Early changes in [¹⁸F]FLT uptake after chemotherapy: an experimental study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29 (2002) 1462-1469
- [25] Eriksson, S., Arner, E., Spasokoukotskaja, T., Wang, L., Karlsson, A., Brosjo, O., Gunven, P., Julusson, G., Liliemark, J. Properties and levels of deoxynucleoside kinases in normal and tumor cells; implications for chemotherapy. *Adv Enzyme Regul* 34 (1994) 13-25
- [26] Flexner, C., van der Horst, C., Jacobson, M.A., Powderly, W., Duncanson, F., Ganes, D., Barditch-Crovo, P.A., Petty, B.G., Baron, P.A., Armstrong, D., et al. Relationship between plasma concentrations of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine (alovudine) and antiretroviral activity in two concentration-controlled trials. *J Infect Dis* 170 (1994) 1394-1403
- [27] Francis, D.L., Freeman, A., Visvikis, D., Costa, D.C., Luthra, S.K., Novelli, M., Taylor, I., Ell, P.J. In vivo imaging of cellular proliferation in colorectal cancer using positron emission tomography. *Gut* 52 (2003) 1602-1606
- [28] Gown, A.M., Willingham, M.C. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 50 (2002) 449-454
- [29] Hiddemann, W., Longo, D.L., Coiffier, B., Fisher, R.I., Cabanillas, F., Cavalli, F., Nadler, L.M., De Vita, V.T., Lister, T.A., Armitage, J.O. Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 88 (1996) 4085-4089

- [30] Hüsler, J., Zimmermann, H. Der parametrische Test. In: "Statistische Prinzipien für medizinische Projekte", Verlag Hans Huber, Bern, 2005, 4. Auflage, 83-104
- [31] Hüsler, J., Zimmermann, H. Rang-Tests. In: "Statistische Prinzipien für medizinische Projekte", Verlag Hans Huber, Bern, 2005, 4. Auflage, 111-123.
- [32] Jerusalem, G., Beguin, Y., Fassotte, M.F., Belhocine, T., Hustinx, R., Rigo, P., Fillet, G. Early detection of relapse by whole-body positron emission tomography in the follow-up of patients with Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 14 (2003) 123-130
- [33] Jerusalem, G., Beguin, Y., Fassotte, M.F., Najjar, F., Paulus, P., Rigo, P., Fillet, G. Whole-body positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for posttreatment evaluation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging. *Blood* 94 (1999) 429-433
- [34] Juweid, M.E., Cheson, B.D. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. *N Engl J Med* 354 (2006) 496-507
- [35] Juweid, M.E., Stroobants, S., Hoekstra, O.S., Mottaghy, F.M., Dietlein, M., Guermazi, A., Wiseman, G.A., Kostakoglu, L., Scheidhauer, K., Buck, A., Naumann, R., Spaepen, K., Hicks, R.J., Weber, W.A., Reske, S.N., Schwaiger, M., Schwartz, L.H., Zijlstra, J.M., Siegel, B.A., Cheson, B.D. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol* 25 (2007) 571-578
- [36] Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y., Furukawa, Y. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 97 (2001) 1999-2007
- [37] Kasper, B., Egerer, G., Gronkowski, M., Haufe, S., Lehnert, T., Eisenhut, M., Mechttersheimer, G., Ho, A.D., Haberkorn, U. Functional diagnosis of residual lymphomas after radiochemotherapy with positron emission tomography comparing FDG- and FLT-PET. *Leuk Lymphoma* 48 (2007) 746-753
- [38] Kazama, T., Faria, S.C., Varavithya, V., Phongkitkarun, S., Ito, H., Macapinlac, H.A. FDG PET in the evaluation of treatment for lymphoma: clinical usefulness and pitfalls. *Radiographics* 25 (2005) 191-207
- [39] Kenny, L., Coombes, R.C., Vigushin, D.M., Al-Nahhas, A., Shousha, S., Aboagye, E.O. Imaging early changes in proliferation at 1 week post chemotherapy: a pilot study in breast cancer patients with 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (2007) 1339-1347
- [40] Kong, X.B., Zhu, Q.Y., Vidal, P.M., Watanabe, K.A., Polsky, B., Armstrong, D., Ostrander, M., Lang, S.A., Jr., Muchmore, E., Chou, T.C. Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular

pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother* 36 (1992) 808-818

[41] Kubota, R., Kubota, K., Yamada, S., Tada, M., Ido, T., Tamahashi, N. Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med* 35 (1994) 104-112

[42] Leyton, J., Latigo, J.R., Perumal, M., Dhaliwal, H., He, Q., Aboagye, E.O. 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* 65 (2005) 4202-4210

[43] Lister, T.A., Crowther, D., Sutcliffe, S.B., Glatstein, E., Canellos, G.P., Young, R.C., Rosenberg, S.A., Coltman, C.A., Tubiana, M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 7 (1989) 1630-1636

[44] Lu, L., Bergstrom, M., Fasth, K.J., Langstrom, B. Synthesis of [76Br]bromofluorodeoxyuridine and its validation with regard to uptake, DNA incorporation, and excretion modulation in rats. *J Nucl Med* 41 (2000) 1746-1752

[45] Lu, L., Samuelsson, L., Bergstrom, M., Sato, K., Fasth, K.J., Langstrom, B. Rat studies comparing 11C-FMAU, 18F-FLT, and 76Br-BFU as proliferation markers. *J Nucl Med* 43 (2002) 1688-1698

[46] Machulla, H.J., Blocher, A., Kuntzsch, M., Piert, M., Wei, R., Grierson, J. Simplified labeling approach for synthesizing 3'-deoxy-3'-[18F]Fluorothymidine ([18F]FLT). *J Radioanal Nucl Chem* 243 (2000) 843-846

[47] Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., Bodkin, D.J., White, C.A., Liles, T.M., Royston, I., Varns, C., Rosenberg, J., Levy, R. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15 (1997) 3266-3274

[48] Mangner, T.J., Klecker, R.W., Anderson, L., Shields, A.F. Synthesis of 2'-deoxy-2'-[18F]fluoro-beta-D-arabinofuranosyl nucleosides, [18F]FAU, [18F]FMAU, [18F]FBAU and [18F]FIAU, as potential PET agents for imaging cellular proliferation. Synthesis of [18F]labelled FAU, FMAU, FBAU, FIAU. *Nucl Med Biol* 30 (2003) 215-224

[49] Matthes, E., Lehmann, C., Scholz, D., Rosenthal, H.A., Langen, P. Phosphorylation, anti-HIV activity and cytotoxicity of 3'-fluorothymidine. *Biochem Biophys Res Commun* 153 (1988) 825-831

[50] Momparler, R.L., Karon, M., Siegel, S.E., Avila, F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res* 36 (1976) 2891-2895

- [51] Moog, F., Bangerter, M., Diederichs, C.G., Guhlmann, A., Kotzerke, J., Merkle, E., Kolokythas, O., Herrmann, F., Reske, S.N. Lymphoma: role of whole-body 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose (FDG) PET in nodal staging. *Radiology* 203 (1997) 795-800
- [52] Moog, F., Bangerter, M., Diederichs, C.G., Guhlmann, A., Merkle, E., Frickhofen, N., Reske, S.N. Extranodal malignant lymphoma: detection with FDG PET versus CT. *Radiology* 206 (1998) 475-481
- [53] Munch-Petersen, B., Cloos, L., Tyrsted, G., Eriksson, S. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *J Biol Chem* 266 (1991) 9032-9038
- [54] Noy, A., Schoder, H., Gonen, M., Weissler, M., Ertelt, K., Cohler, C., Portlock, C., Hamlin, P., Yeung, H.W. The majority of transformed lymphomas have high standardized uptake values (SUVs) on positron emission tomography (PET) scanning similar to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Ann Oncol* 20 (2009) 508-512
- [55] Pfreundschuh, M., Trumper, L., Osterborg, A., Pettengell, R., Trneny, M., Imrie, K., Ma, D., Gill, D., Walewski, J., Zinzani, P.L., Stahel, R., Kvaloy, S., Shpilberg, O., Jaeger, U., Hansen, M., Lehtinen, T., Lopez-Guillermo, A., Corrado, C., Scheliga, A., Milpied, N., Mendila, M., Rashford, M., Kuhnt, E., Loeffler, M. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 7 (2006) 379-391
- [56] Pio, B.S., Park, C.K., Pietras, R., Hsueh, W.A., Satyamurthy, N., Pegram, M.D., Czernin, J., Phelps, M.E., Silverman, D.H. Usefulness of 3'-[F-18]fluoro-3'-deoxythymidine with positron emission tomography in predicting breast cancer response to therapy. *Mol Imaging Biol* 8 (2006) 36-42
- [57] Rasey, J.S., Grierson, J.R., Wiens, L.W., Kolb, P.D., Schwartz, J.L. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med* 43 (2002) 1210-1217
- [58] Rodriguez, M., Rehn, S., Ahlstrom, H., Sundstrom, C., Glimelius, B. Predicting malignancy grade with PET in non-Hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med* 36 (1995) 1790-1796
- [59] Rosenberg, S.A., Boiron, M., DeVita, V.T., Jr., Johnson, R.E., Lee, B.J., Ultmann, J.E., Viamonte, M., Jr. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Procedures. *Cancer Res* 31 (1971) 1862-1863
- [60] Sandherr, M., von Schilling, C., Link, T., Stock, K., von Bubnoff, N., Peschel, C., Avril, N. Pitfalls in imaging Hodgkin's disease with computed tomography and positron emission tomography using fluorine-18-fluorodeoxyglucose. *Ann Oncol* 12 (2001) 719-722

- [61] Schmitt, C.A., Rosenthal, C.T., Lowe, S.W. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat Med* 6 (2000) 1029-1035
- [62] Schoder, H., Noy, A., Gonen, M., Weng, L., Green, D., Erdi, Y.E., Larson, S.M., Yeung, H.W. Intensity of 18fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography distinguishes between indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 23 (2005) 4643-4651
- [63] Sherley, J.L., Kelly, T.J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 263 (1988) 8350-8358
- [64] Shields, A.F. PET imaging with 18F-FLT and thymidine analogs: promise and pitfalls. *J Nucl Med* 44 (2003) 1432-1434
- [65] Shields, A.F., Grierson, J.R., Dohmen, B.M., Machulla, H.J., Stayanoff, J.C., Lawhorn-Crews, J.M., Obradovich, J.E., Muzik, O., Mangner, T.J. Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat Med* 4 (1998) 1334-1336
- [66] Shields, A.F., Mankoff, D., Graham, M.M., Zheng, M., Kozawa, S.M., Link, J.M., Krohn, K.A. Analysis of 2-carbon-11-thymidine blood metabolites in PET imaging. *J Nucl Med* 37 (1996) 290-296
- [67] Shields, A.F., Mankoff, D.A., Link, J.M., Graham, M.M., Eary, J.F., Kozawa, S.M., Zheng, M., Lewellen, B., Lewellen, T.K., Grierson, J.R., Krohn, K.A. Carbon-11-thymidine and FDG to measure therapy response. *J Nucl Med* 39 (1998) 1757-1762
- [68] Shreve, P.D., Anzai, Y., Wahl, R.L. Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: physiologic and benign variants. *Radiographics* 19 (1999) 61-77; quiz 150-151
- [69] Smith, P.J., Rackstraw, C., Cotter, F. DNA fragmentation as a consequence of cell cycle traverse in doxorubicin- and idarubicin-treated human lymphoma cells. *Ann Hematol* 69 Suppl 1 (1994) S7-11
- [70] Smyczek-Gargya, B., Fersis, N., Dittmann, H., Vogel, U., Reischl, G., Machulla, H.J., Wallwiener, D., Bares, R., Dohmen, B.M. PET with [18F]fluorothymidine for imaging of primary breast cancer: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (2004) 720-724
- [71] Spaepen, K., Stroobants, S., Dupont, P., Vandenberghe, P., Thomas, J., de Groot, T., Balzarini, J., De Wolf-Peeters, C., Mortelmans, L., Verhoef, G. Early restaging positron emission tomography with (18)F-fluorodeoxyglucose predicts outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13 (2002) 1356-1363
- [72] Stein, H. [The new WHO classification of malignant lymphoma. After "REAL" a further step on the road to a worldwide consensus]. *Pathologie* 21 (2000) 101-105

- [73] Sun, H., Sloan, A., Mangner, T.J., Vaishampayan, U., Muzik, O., Collins, J.M., Douglas, K., Shields, A.F. Imaging DNA synthesis with [18F]FMAU and positron emission tomography in patients with cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (2005) 15-22
- [74] Sundoro-Wu, B.M., Schmall, B., Conti, P.S., Dahl, J.R., Drumm, P., Jacobsen, J.K. Selective alkylation of pyrimidyldianions: synthesis and purification of ¹¹C labeled thymidine for tumor visualization using positron emission tomography. *Int J Appl Radiat Isot* 35 (1984) 705-708
- [75] Surbone, A., Longo, D.L., DeVita, V.T., Jr., Ihde, D.C., Duffey, P.L., Jaffe, E.S., Solomon, D., Hubbard, S.M., Young, R.C. Residual abdominal masses in aggressive non-Hodgkin's lymphoma after combination chemotherapy: significance and management. *J Clin Oncol* 6 (1988) 1832-1837
- [76] Szczuraszek, K., Mazur, G., Jelen, M., Dziegiel, P., Surowiak, P., Zabel, M. Prognostic significance of Ki-67 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res* 28 (2008) 1113-1118
- [77] Tehrani, O.S., Muzik, O., Heilbrun, L.K., Douglas, K.A., Lawhorn-Crews, J.M., Sun, H., Mangner, T.J., Shields, A.F. Tumor imaging using 1-(2'-deoxy-2'-18F-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)thymine and PET. *J Nucl Med* 48 (2007) 1436-1441
- [78] Therasse, P., Arbuck, S.G., Eisenhauer, E.A., Wanders, J., Kaplan, R.S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A.T., Christian, M.C., Gwyther, S.G. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 205-216
- [79] Toyohara, J., Waki, A., Takamatsu, S., Yonekura, Y., Magata, Y., Fujibayashi, Y. Basis of FLT as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with [3H]thymidine and [3H]arabinothymidine, and cell-analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines. *Nucl Med Biol* 29 (2002) 281-287
- [80] Troost, E.G., Vogel, W.V., Merks, M.A., Slootweg, P.J., Marres, H.A., Peeters, W.J., Bussink, J., van der Kogel, A.J., Oyen, W.J., Kaanders, J.H. 18F-FLT PET does not discriminate between reactive and metastatic lymph nodes in primary head and neck cancer patients. *J Nucl Med* 48 (2007) 726-735
- [81] Tseng, J.R., Dandekar, M., Subbarayan, M., Cheng, Z., Park, J.M., Louie, S., Gambhir, S.S. Reproducibility of 3'-deoxy-3'-(18)F-fluorothymidine microPET studies in tumor xenografts in mice. *J Nucl Med* 46 (2005) 1851-1857
- [82] van Waarde, A., Cobben, D.C., Suurmeijer, A.J., Maas, B., Vaalburg, W., de Vries, E.F., Jager, P.L., Hoekstra, H.J., Elsinga, P.H. Selectivity of 18F-FLT and 18F-FDG for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *J Nucl Med* 45 (2004) 695-700

- [83] Vander Borcht, T., Labar, D., Pauwels, S., Lambotte, L. Production of [2-¹¹C]thymidine for quantification of cellular proliferation with PET. *Int J Rad Appl Instrum [A]* 42 (1991) 103-104
- [84] Vesselle, H., Grierson, J., Muzi, M., Pugsley, J.M., Schmidt, R.A., Rabinowitz, P., Peterson, L.M., Vallieres, E., Wood, D.E. In vivo validation of 3'-deoxy-3'-[(¹⁸F)]fluorothymidine ([(¹⁸F)]FLT) as a proliferation imaging tracer in humans: correlation of [(¹⁸F)]FLT uptake by positron emission tomography with Ki-67 immunohistochemistry and flow cytometry in human lung tumors. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 3315-3323
- [85] Vose, J.M., Link, B.K., Grossbard, M.L., Czuczman, M., Grillo-Lopez, A., Gilman, P., Lowe, A., Kunkel, L.A., Fisher, R.I. Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 19 (2001) 389-397
- [86] Wagner, M., Seitz, U., Buck, A., Neumaier, B., Schultheiss, S., Bangerter, M., Bommer, M., Leithauser, F., Wawra, E., Munzert, G., Reske, S.N. 3'-[¹⁸F]fluoro-3'-deoxythymidine ([¹⁸F]-FLT) as positron emission tomography tracer for imaging proliferation in a murine B-Cell lymphoma model and in the human disease. *Cancer Res* 63 (2003) 2681-2687
- [87] Wang, H., Oliver, P., Nan, L., Wang, S., Wang, Z., Rhie, J.K., Zhang, R., Hill, D.L. Radiolabeled 2'-fluorodeoxyuracil-beta-D-arabinofuranoside (FAU) and 2'-fluoro-5-methyldeoxyuracil-beta-D-arabinofuranoside (FMAU) as tumor-imaging agents in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 49 (2002) 419-424
- [88] Weber, W.A., Ott, K., Becker, K., Dittler, H.J., Helmberger, H., Avril, N.E., Meisetschlager, G., Busch, R., Siewert, J.R., Schwaiger, M., Fink, U. Prediction of response to preoperative chemotherapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging. *J Clin Oncol* 19 (2001) 3058-3065
- [89] Weber, W.A., Ziegler, S.I., Thodtmann, R., Hanauske, A.R., Schwaiger, M. Reproducibility of metabolic measurements in malignant tumors using FDG PET. *J Nucl Med* 40 (1999) 1771-1777
- [90] Wieder, H.A., Brucher, B.L., Zimmermann, F., Becker, K., Lordick, F., Beer, A., Schwaiger, M., Fink, U., Siewert, J.R., Stein, H.J., Weber, W.A. Time course of tumor metabolic activity during chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma and response to treatment. *J Clin Oncol* 22 (2004) 900-908
- [91] Wieder, H.A., Geinitz, H., Rosenberg, R., Lordick, F., Becker, K., Stahl, A., Rummeny, E., Siewert, J.R., Schwaiger, M., Stollfuss, J. PET imaging with [¹⁸F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine for prediction of response to neoadjuvant treatment in patients with rectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (2007) 878-883

[92] Zhou, M., Gu, L., Li, F., Zhu, Y., Woods, W.G., Findley, H.W. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303 (2002) 124-131

7 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mir bei der Vorbereitung dieser Arbeit, bei der Durchführung der Experimente und der Datenerhebung und nicht zuletzt bei der Fertigstellung und Korrektur mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei PD Dr. Andreas Buck für die freundliche Aufnahme in seiner Forschergruppe, für die Bereitstellung des Themas, sowie für die vielen förderlichen Gespräche und Hilfestellungen.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Nico Graf und Dr. Herrmann für die hervorragende Betreuung bei der Versuchsdurchführung, Ergebnisauswertung und Anfertigung dieser Promotionsschrift.

Sybille Reder und Elisabeth Aywanger danke ich besonders für ihre allzeit wohlwollende Hilfe bei der Durchführung der Kleintier-PET-Scans.

Mein Dank gilt auch Prof. Christian Peschel und PD Dr. Tobias Dechow als Kooperationspartner aus der III Medizinischen Klinik, die maßgeblich am Zustandekommen der klinischen Studie beteiligt waren.

Außerdem danke ich Frau Prof. Reingard Senekowitsch-Schmidtke, für die Hilfe bei der Tierhaltung, PD Dr. Falko Fend aus dem Institut für Pathologie, für die Unterstützung bei Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Bilder, sowie Tibor Schuster für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Praktisch allen Mitarbeitern der Nuklearmedizinischen Klinik und auch der Abteilung für Radiopharmazie des Klinikums rechts der Isar habe ich für ihr allzeit offenes Ohr und für ihre tatkräftige Hilfe zu danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir während dieser Zeit immer unterstützend zur Seite gestanden sind. Fürs Korrekturlesen danke ich meinem guten Freund Dr. Gerhard Eichhoff.