

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie

Klinikum rechts der Isar

Abteilungsleiter: Univ.-Prof. Dr. C. Zimmer

Klinische Validierung
einer T2'-basierten MRT Methode
für Hypoxiebildung in Gliomen

Vivien Tóth

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. C. Zimmer

2. apl. Prof. Dr. F. Ringel

3. Univ.-Prof. Dr. S. E. Combs

Die Dissertation wurde am 09.07.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	4
2 Zielsetzung der Arbeit	6
3 Hintergrund.....	7
3.1 Übersicht der zerebralen Tumoren.....	7
3.2 Tumorhypoxie	9
3.2.1 Entwicklung der hypoxischen Mikroumgebung in Hirntumoren	9
3.2.2 Molekularbiologische Korrelate	11
3.2.3 Tumorzellen und Subpopulationen	12
3.2.4 Therapieresistenz.....	13
3.3 Bildgebung in der Neuroonkologie	15
3.3.1 Konventionelle MRT-Bildgebung	15
3.3.2 Der BOLD Effekt.....	21
3.3.3 T2' Bildgebung	22
3.3.4 Perfusionsmessung (PWI)	23
4 Patienten und Methodik	27
4.1 Patienten.....	27
4.2 Experimentelle Details	29
4.3 Auswertung	31
4.3.1 Erstellung der Hypoxiekarten	31
4.3.2 Datenanalyse	32
4.4 Biopsieentnahmen	34
4.4.1 Präoperative Biopsieplanung	34
4.4.2 Technische Durchführung der Entnahmen	34
4.4.3 Histologische Aufarbeitung	35
5 Ergebnisse.....	37
5.1 Durchführbarkeit der Methode.....	37
5.2 Bildqualität.....	38
5.3 Ergebnisse der Datenanalyse	39
5.3.1 Vergleich der Perfusionsmessung mit der DCE und DSC Methode	39
5.3.2 Ergebnisse der VOI-Analyse	40
5.4 Korrelation mit der Histologie	42
6 Diskussion	45
6.1 Artefiziell erhöhte rOEF Werte	45
6.2 Probleme der quantitativen T2 Messung.....	46
6.3 Probleme der Perfusionsmessung	47
6.4 rOEF in grauer und weißer Substanz.....	48
6.5 VOI Definition im Tumorgewebe	48
6.6 rOEF im Tumorgewebe	49
6.7 Korrelation mit der HIF-1 α Immunohistochemie	50
6.8 Schlussfolgerung.....	51
7 Zusammenfassung.....	52
8 Literatur	54
9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	62
10 Danksagung.....	64
11 Lebenslauf.....	65
12 Veröffentlichungen	66

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
AA	anaplastisches Astrozytom
ADC	Apparent Diffusion Coefficient
ADEM	Akute Disseminierte Enzephalomyelitis
AIF	Arterial Input Function
ASL	Arterial Spin Labeling
BOLD	Blood Oxygen Level Dependent
CET	Contrast Enhancing Tumor (schränkengestörter Tumor)
CSC	Cancer Stem Cells (Tumorstammzellen)
DCE	Dynamic Contrast Enhanced
DSC	Dynamic Susceptibility Contrast
DTI	Diffusion Tensor Imaging (Diffusions-Tensor-Bildgebung)
DWI	Diffusion Weighted Imaging (Diffusionswichtung)
EPI	Echo Planar Imaging
GBM	Glioblastom
Gd	Gadolinium
Gd-DOTA	Gadotersäure
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin
GE	Gradientenecho
GM	Grey Matter (graue Substanz)
GSC	Glioma Stem Cells (Gliomstammzellen)
Hb	Hämoglobin
HIF	Hypoxia Inducible Factor (Hypoxie-induzierbarer Faktor)
HT	Hypoxic Tumor (hypoxischer Tumor)
LGG	Low Grade Glioma (niedriggradiges Gliom)
MRT	Magnetresonanztomographie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PWI	Perfusion Weighted Imaging (Perfusionsbildgebung)
rCBV	relative/regional Cerebral Blood Volume
rOEF	relative Oxygen Extraction Fraction
ROI	Region of Interest
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOI	Volume of Interest
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WM	White Matter (weiße Substanz)
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Tumoren des Zentralnervensystems sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen selten – es werden jedes Jahr ca. 7000 Neuerkrankungen in Deutschland registriert, entsprechend einer Inzidenz von 8,3/100.000. (Deutsche Hirntumorhilfe, 2014) Hirntumoren zählen dennoch zu den meist gefürchteten onkologischen Erkrankungen, aufgrund der sich rasch entwickelnden, gravierenden klinischen Beschwerden (sogar bei den histologisch gutartigen Tumoren), des schnellen Verlusts der Selbständigkeit und der oft düsteren Prognose. Die unspezifische klinische Symptomatik einer intrakraniellen Raumforderung ermöglicht keine Aussage über die Entität und somit über die notwendige Therapie und Therapieerfolgaussichten. Die ersten tomographischen Untersuchungen (Computertomographie - CT - seit 1971 und Magnetresonanztomographie - MRT - seit 1985) konnten lange nur Lokalisation und Größe der Raumforderung feststellen, eine spezifische Artdiagnostik konnte damit nicht erreicht werden. (Hoeffner *et al.*, 2012) Mit dem Erscheinen neuer MRT-Techniken ist es erst in den letzten Jahren möglich geworden, präoperativ und nichtinvasiv Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Tumorgewebes zu ziehen und somit diese artdiagnostisch und prognostisch einzuordnen. Die World Health Organisation (WHO) definiert über 100 histopathologische Tumorentitäten (Louis *et al.*, 2007); deren bildgebende Charakteristika wurden ausführlich beschrieben (Osborn *et al.*, AJNR 2012, Zimmer *et al.*, Rofo 1997). Eine frühe und exakte radiologische Diagnose ist von großem Interesse, da sie eine frühe und gezielte Therapieplanung ermöglicht und den prognostischen Wert somit optimiert.

Die Diagnostik der Wahl bei Verdacht auf einen Hirntumor ist aktuell die MRT bei hoher Feldstärke mit Anwendung von hochauflösenden dreidimensionalen (3D) Sequenzen (Prabhakaran *et al.*, 2012). Mittels neuer MRT-Techniken sind Veränderungen auf histopathologischer Ebene, so z.B. Mikroblutungen, Kalzifikationen, Störungen der Blut-Hirn-Schranke, Ödeme, verminderte Diffusivität und hohe Zelldichte mit guter Spezifität nachweisbar. Darüber hinaus können auch

neurophysiologische Veränderungen wie erhöhte oder verminderte Durchblutung, eine pathologische Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte oder der Stoffwechselrate mit neuartigen MRT-Methoden nachgewiesen werden. Funktionelle Netzwerke können mit aktuellsten Methoden wie der Diffusion Tensor Bildgebung (DTI) oder der BOLD (blood oxygen level dependent)-basierten funktionellen MRT nachgewiesen und visuell dargestellt werden. Diese Methoden ermöglichen eine bessere Differenzialdiagnostik, die Einschätzung des Malignitätsgrades, eine exaktere Abgrenzung der Ausdehnung und die Operationsplanung. Der Therapiefokus kann durch Lokalisierung der "bösartigsten" Areale (sog. hot spots) sowie der funktionell zu erhaltenden Areale präzise eingeschränkt werden (Essig *et al.*, 2012). Studien zur Korrelation der präoperativen Bildgebung und der klinischen Angaben haben gezeigt, dass der multimodale Ansatz die diagnostische Exaktheit erhöht und die Prognose verbessert (Taylor, 2010). Die aktuellen therapeutischen Leitlinien beachten allerdings nur die morphologischen Charakteristika der Tumordiagnostik (Lutz *et al.*, 2011), obwohl diese in den Studien die klinischen Endpunkte nicht vorhersagen konnten (Upadhyay and Waldman, 2011). Die Entwicklung robuster Methoden zur multimodalen Tumorcharakterisierung und Prognoseeinschätzung ist somit gegeben und gefordert.

Die neuesten Entwicklungen in der Tumorpathophysiologie und in der Strahlentherapie haben gezeigt, dass unter den variablen Stoffwechselstörungen im Tumorgewebe die hypoxische Mikroumgebung eine sehr wichtige Rolle spielt und ihre Ausprägung mit der Malignität und der Therapieresistenz des Tumorgewebe korreliert (Harrison *et al.*, 2002; Krohn *et al.*, 2008). Die Darstellung dieser malignen Tumornischen ist von großer Bedeutung, da sie die Therapieplanung wesentlich beeinflussen könnte.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel unserer Arbeit war, die hypoxischen Tumorareale, die in Studien *in vitro* nachgewiesen wurden, bei Patienten mit Hirntumoren nicht-invasiv kernspintomographisch darzustellen. Dabei wurde eine MRT-Methode auf Grundlage des BOLD-Effekts verwendet, die zuvor in der Abteilung für Diagnostischen und Interventionellen Neuroradiologie (Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München) entwickelt wurde. In diesem Rahmen wurde eine klinisch einsetzbare Messtechnik etabliert, in einer klinischen Pilotstudie bei Patienten mit Hirntumoren erprobt und die möglichen Fehlerquellen identifiziert und analysiert. Bei sechs Patienten wurden während der Resektion gezielte Biopsien aus verschiedenen Tumorarealen entnommen und die Histologie mit den MRT-Eigenschaften korreliert. Die Patienten wurden gemäß der histologischen Diagnose gruppiert und die MRT-Ergebnisse mit dem Tumorgrad korreliert.

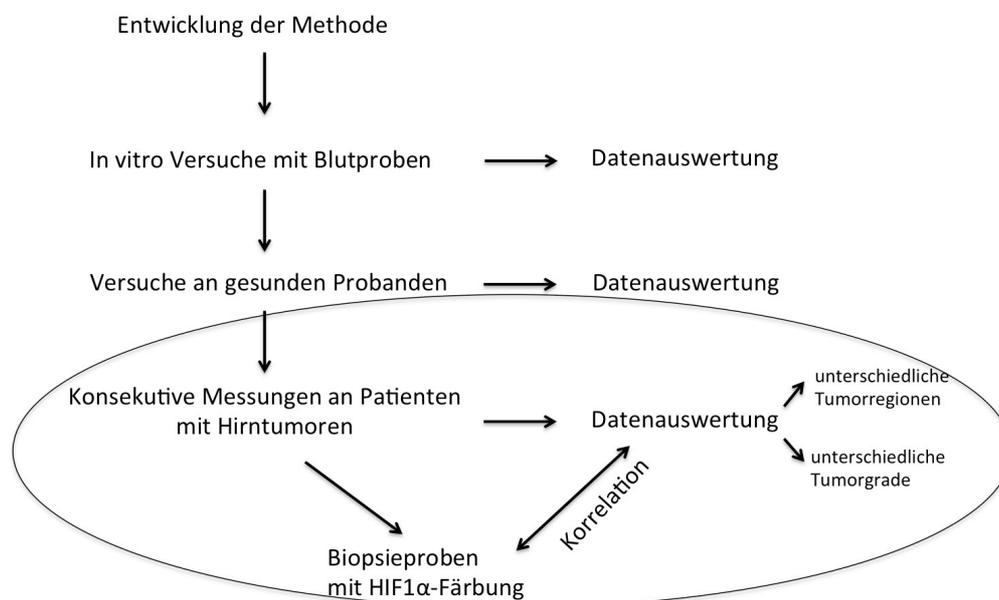


Abbildung 1 Ablaufdiagramm der Studie im Rahmen des Teilprojekts B6 des SFB 824 der TUM. Der eingekreiste Teil ist das Thema dieser Dissertation.

3 Hintergrund

3.1 Übersicht der zerebralen Tumoren

Zerebrale Raumforderungen entstehen primär intrakraniell oder metastasieren hierhin. Insgesamt gibt es 130 verschiedene Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS), deren Ursprung die unterschiedlichen Zellarten von Neuronen und Astrozyten bis zu den Immunzellen sind. Alle intrakraniellen Tumoren können durch ihre raumfordernde Wirkung und die Verdrängung lebenswichtiger Hirnregionen symptomatisch und lebensbedrohlich werden. Der Begriff „maligner Hirntumor“ bezeichnet jedoch Tumoren, die bestimmte histologische Kriterien der Malignität aufweisen. Die häufigsten primären malignen Tumoren des ZNS sind Glioblastome (16.3%). Unter den hirneigenen Tumoren (Gliomen) ist das Glioblastom mit 53.9% die am häufigsten auftretende Tumorart, gefolgt vom anaplastischen Astrozytom (6.7%), dem Oligodendrogliom (6.4%) und dem Ependymom (5.8%). Die Hirntumoren werden in der WHO Klassifikation (Louis *et al.*, 2007) aufgelistet (s. Tabelle 1) mit Unterteilung in Gruppen anhand des zellulären Ursprungs. Thema dieser Arbeit waren die Eigenschaften der hirneigenen astrozytären Tumoren.

Grading	Beschreibung
WHO Grad I	histologisch gutartige Tumoren, die durch eine operative Entfernung üblicherweise geheilt werden können
WHO Grad II	histologisch gutartige, jedoch häufig infiltrativ wachsende Tumoren, die zu Rezidiven neigen, ohne jedoch die Überlebenszeit wesentlich einzuschränken
WHO Grad III	histologisch bösartige Tumoren, die mit einer Reduktion der Überlebenszeit einhergehen
WHO Grad IV	äußerst bösartige Tumoren, die mit einer deutlichen Reduktion der Überlebenszeit einhergehen, sofern keine effektive Behandlung zur Verfügung steht

Histologische Kriterien zur Beurteilung der Malignität: Kernatypien, Mitosen, Endothelproliferation und Nekrosen.
Grad I = 0 ; Grad II = 1 ; Grad III = 2 ; Grad IV = 3 oder 4 Kriterien erfüllt.

Tabelle 1.1 WHO Klassifikation der Hirntumoren: Grading-System (Louis *et al.*, 2007)

Tumor-Typ	Grad		
	benigne	Übergangsstadium	maligne
Tumoren des neuroepithelialen Gewebes			
• <i>Astrozytome und Glioblastome</i>			
• <i>Oligodendrogliome</i>			
• <i>Oligoastrozytome</i>			
• <i>Ependymale Tumoren</i>			
• <i>Ependymale Tumoren (Subependymom und Ependymom)</i>			
• <i>Choroidale Plexustumoren</i>			
• <i>Andere Neuroepitheliale Tumoren</i>			
• <i>Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumoren: Gangliozytome, DNET, Gangliogliome und Neurozytome</i>			
• <i>Tumoren der Pinealisregion</i>			
• <i>Embryonale Tumoren (Medulloblastom, PNET, ATRT)</i>			
Tumoren der kranialen und paraspinalen Nerven			
Tumoren der Meningen			
Lymphome und hämatopoetische Neoplasien (Plasmozytome, granulozytisches Sarkom)			
Keimzelltumoren			
Tumoren der Sellaregion			
Metastasen			

Tabelle 1.2 WHO Klassifikation der Hirntumoren: Untergruppen der Entitäten (Louis *et al.*, 2007)

Hirntumoren werden klinisch durch ihre raumfordernde Wirkung auffällig. Die Symptome sind abhängig von der Lokalisation, der Größe sowie dem Wachstumsmuster und –tempo. Die Unterbrechung der neuronalen Netzwerke ist ursächlich für eine Wesensveränderung sowie für epileptische Anfälle und Funktionsausfälle. Die Verdrängung der Hirnhäute und des Nervus facialis sowie trigeminalis verursacht Kopfschmerzen; die Verdrängung aller Hirnnerven kann hierfür charakteristische Symptome hervorrufen. Die Einengung der liquorführenden Räume resultiert in Hirndruckzeichen. Allein die klinische Symptomatik erlaubt keine Rückschlüsse auf die Malignität eines Hirntumors.

Die Therapie der Hirntumoren beruht auf den klassischen onkologischen Therapiekonzepten: operative Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie. Die Wahl des Therapiekonzeptes hängt von der Tumorart, dem Krankheitsstadium und individuellen Gegebenheiten ab. Die histologischen Eigenschaften des Tumorgewebes beeinflussen die individuelle Therapieentscheidung.

3.2 Tumorhypoxie

3.2.1 Entwicklung der hypoxischen Mikroumgebung in Hirntumoren

Der mitochondriale aerobe Metabolismus gilt als der effizienteste Weg der intrazellulären Energieproduktion. Wirbeltiere sind vom Sauerstoff für den oxidativen Stoffwechselweg zum maximalen Energiegewinn abhängig. Ein komplexes Kontrollsystem - von der Lunge bis zur Mikrozirkulation reichend - ist zuständig für die Prozessoptimierung der Perfusion und der Sauerstoffextraktion, so dass immer eine adäquate Sauerstoffzufuhr vorhanden ist. Unter Belastung können manche Gewebearten (typischerweise Muskelzellen) einen anaeroben Metabolismus implementieren, um möglichst schnell auch bei mangelnder Sauerstoffzufuhr Energie gewinnen zu können. Im Gehirn ist eine solche Umstellung jedoch nicht möglich, weil die hochdifferenzierten Zellarten und neuronalen Netzwerke obligat Sauerstoffabhängig sind. Der Sauerstoffbedarf variiert zwischen verschiedenen Zelltypen und Gerinregionen von 4.1 mmHg O₂ Partialdruck im Mittelhirn bis 60 mmHg in der Pia mater (Hoge und Pike, 2001). Unter physiologischen Bedingungen ist eine territorial erhöhte Extraktionsrate durch funktionelle Aktivierung bekannt (Kwong, 2012), und eine schnelle Anpassung an den erhöhten Sauerstoffbedarf wird durch das spezielle Autoregulationssystem der Gehirngefäße gewährleistet. In vitro Studien haben gezeigt, dass der Vorrat an Sauerstoff die Proliferation bzw. Differenzierung neuraler Vorläuferzellen beeinflusst (Pistollato *et al.*, 2007). Bei unzureichender Zufuhr oder Störungen der Stoffwechselwege kommt es daher zu pathologischen Zuständen. Gewebhypoxie ist ein ubiquitäres pathophysiologisches Merkmal von Malignitäten und insbesondere malignen Hirntumoren.

Eine ersichtliche pathophysiologische Ursache der Hypoxie ist die erhöhte metabolische Aktivität der Tumorzellen mit konsekutiv erhöhtem Sauerstoffbedarf. Die Tumormasse wächst zunächst über ihre eigene Blutversorgung hinaus und die von den Kapillaren am weitesten liegenden Tumorzellen werden – aufgrund des begrenzten Diffusionsvermögens in der extrazellulären Matrix - weniger Sauerstoff erhalten.

Eine weitere, neuere Hypothese behauptet, dass die Tumorgefäße, welche durch die

Tumorneoangiogenese in einem raschen proliferativen Prozess entstehen, pathologisch durchlässig und somit funktionsgestört sind. Deren Autoregulation wird als ungenügend betrachtet. Eine Folge der konsekutiven lokalen Hypoxie ist die vaskuläre Mimikry, in der Tumorzellen mit transendotheliale Phenotyp-Potenzial neue vaskuläre Netzwerke bilden (Seftor *et al.*, 2012). Diese wiederum beinhalten pathologische Gefäße und somit entsteht eine hypoxische Mikroumgebung im Tumorgewebe.

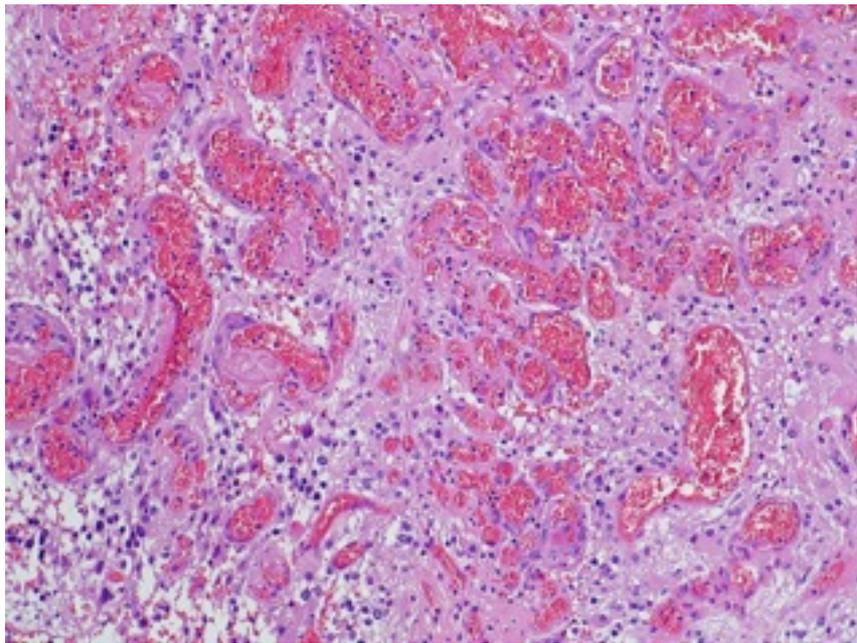


Abbildung 2 Bildbeispiel zur Illustration der pathologischen Tumorgefäße in einem Glioblastom (H-E Färbung; C. Delbridge, Abteilung für Neuropathologie, Klinikum Rechts der Isar der TU München)

Zusammenfassend ist belegbar, dass die lokale hypoxische Mikroumgebung eine deutliche Besonderheit von malignem Tumorgewebe und ein definitiver Marker der bösartigsten Tumorzellpopulationen ist.

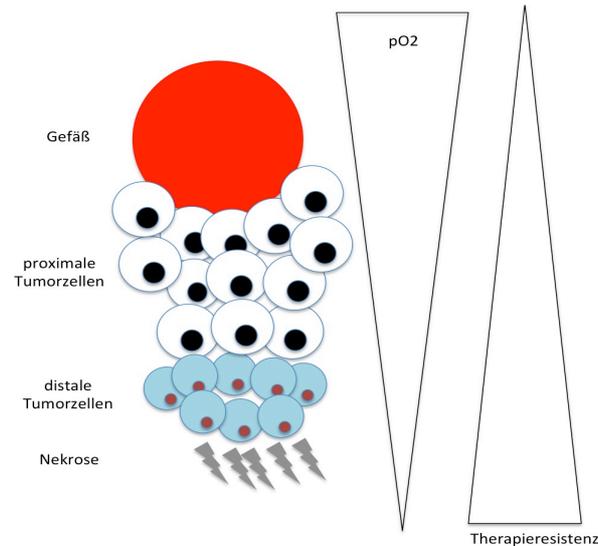


Abbildung 3 Modell zur Genese der hypoxischen Mikroumgebung im Tumorgewebe (Eigenes Bildmaterial, erstellt anhand der Daten der Literatur)

3.2.2 Molekularbiologische Korrelate

Die hypoxische Mikroumgebung induziert verschiedene molekulare Signalwege, von denen bis dato nur ein kleiner Anteil bekannt ist. Der sogenannte Hypoxie-induzierbare Faktor (Hypoxia Inducible Factor, HIF) ist ein transkriptionaler Komplex, welcher 1995 beschrieben wurde (Wang *et al.*, 1995). Der HIF Komplex lässt sich in stabiler Form in Zellen nachweisen, die auf einen glykolitischen Metabolismus mit erhöhter reaktiver Sauerstoffspeziesbildung (Reactive Oxygen Species, ROS) angewiesen sind. Der Subtyp HIF-1 α konnte in Tumorealen mit niedrigem Sauerstoffgradienten und niedrigem extrazellulärem pH nachgewiesen werden. Die molekulare Tumorforschung konnte in den letzten 15 Jahren die Hochregulierung und Überaktivität von HIF-1 α mit der Tumormalignität korrelieren (Vaupel, 2004; Gillespie *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden mehrere weitere Pfade entdeckt, die durch HIF-1 α beeinflusst werden, insbesondere die Aktivierung des Notch-Stoffwechselweges (Gustafsson *et al.*, 2005), des mTOR Systems (Bernardi *et al.*, 2006) oder des c-Met Pfades (Eckerich *et al.*, 2007), welche alle zu der Stimulation von Tumorzellmigration und Tumoringfiltration führen.

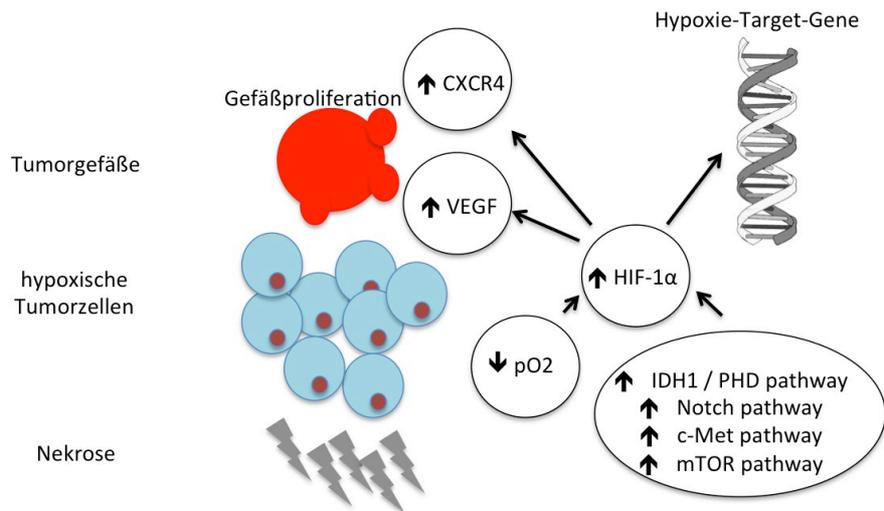


Abbildung 4 Überblick der wichtigsten molekularen Signalwege in der hypoxischen Mikroumgebung (Eigenes Bildmaterial, erstellt anhand der Daten der Literatur)

3.2.3 Tumorzellen und Subpopulationen

Die Proliferation bzw. Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen ist abhängig vom Sauerstoffangebot (Pistollato *et al.*, 2007). Eine Störung der Autoregulation und somit des Sauerstoffvorrats kann dadurch zu einer Fehlentwicklung der neuronalen Zellen und zur Genese von sog. Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) führen. Diese Subpopulation von Tumorzellen wurde in verschiedenen malignen Tumoren beschrieben; sie weisen grundsätzlich multiple Malignitätsmarker und eine äußerst erhöhte Proliferationsrate auf. Die Entdeckung dieser Tumorstammzellen hat die vorher angenommene zelluläre Heterogenität des Tumorgewebes bestätigt. Ihre genaue Rolle in der Tumorgenese wird intensiv erforscht (Singh *et al.*, 2004).

Auch in Gliomen wurden distinkte Tumorzellsubpopulationen mit spezifischen genetischen Markern beschrieben – sog. Gliomstammzellen (Glioma Stem Cells, GSC) (Piccirillo *et al.*, 2009; Bar, 2011). Diese Zellen werden von der hypoxischen Mikroumgebung durchgreifend beeinflusst, was durch in vitro Studien gezeigt werden konnte: in Tumorarealen mit unterschiedlichem Hypoxiegrad waren GSCs mit diversen Markern zu finden (Rodríguez-Jiménez *et al.*, 2008; Tafani *et al.*, 2011). Ferner wiesen GSCs in hypoxischen Nischen deutlich höhere Proliferationsraten auf. Intra- und extrazelluläre Faktoren haben eine gleich große Rolle in der Genese von

GSCs. Dies ist das Motiv für die Erforschung der intratumoralen Mikroumgebung und der GSC-Nischen (Heddleston *et al.*, 2011). Zudem wird angenommen, dass Hypoxie eine wichtige Rolle in der Unterhaltung solcher Nischen spielt. (Heddleston *et al.*, 2009) Es ist jedoch weiterhin umstritten, wo diese Nischen intratumoral lokalisiert sind (Sneddon und Werb, 2007). GSCs konnten in perivaskulären Konglomeraten nachgewiesen werden (Gilbertson und Rich, 2007) und sie waren gegenüber den löslichen und homing Faktoren der Endothelzellen empfindlich. (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006) Nekrotische Tumorareale sind ebenfalls hypoxisch. GSC Nischen wurden auch im soliden Tumorgewebe, weiter entfernt von den Gefäßen gefunden, wo der Sauerstoffkonzentration niedrig ist.

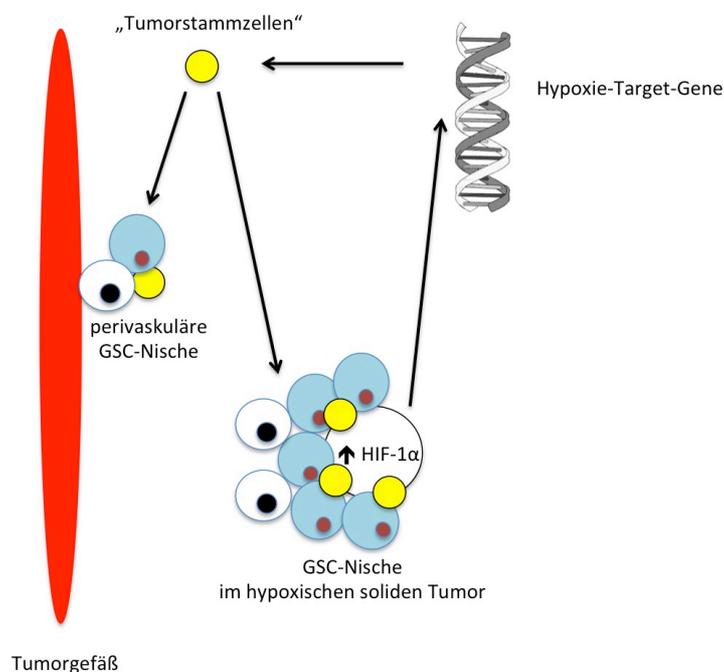


Abbildung 5 Modell der malignen Tumornischen (perivaskulär und distal der Gefäße), wo die sog. Tumorstammzellen auffindbar sind (Eigenes Bildmaterial, erstellt anhand der Daten der Literatur)

3.2.4 Therapieresistenz

Hypoxie in Hirntumoren ist mit einem malignen Phentyp, mit Therapieresistenz und mit schlechter Prognose assoziiert (Jensen, 2009). Die Resistenz hypoxischer Tumoren gegenüber Strahlentherapie ist seit langem bekannt und gut erforscht (Schwartz *et al.*, 2011; Jamal *et al.*, 2012). Des Weiteren wurden experimentelle Ansätze zur Verbesserung der Radiosensitivität dieser Tumore erprobt (Sheehan *et al.*, 2010). Multiple molekulare Korrelate für die Resistenz der hypoxischen

Tumorareale gegenüber Chemotherapeutika wurden beschrieben; pharmazeutische Versuche zur Umgehung dieser Resistenz sind in der Entwicklung (Shannon *et al.*, 2003). Innovative Therapieansätze richten sich gezielt gegen charakteristische Signalwege und die hypoxische Mikroumgebung der GSC (Binello und Germano, 2011). Mit der Entwicklung von antiangiogenetischen Therapien – welche VEGF und weitere Neoangiogenesefaktoren antagonisieren – wurde eine neue Ära der Tumorthherapie erwartet. In der klinischen Anwendung kam es allerdings zum Teil zu unklaren und auch enttäuschenden Ergebnissen, mit nur vorübergehender Wirkung und einem sog. Pseudo-Regression-Phänomen. Pathophysiologisch und bildgebend konnte in Untersuchungen mit kleinen Fallzahlen gezeigt werden, dass diese Mittel die Entwicklung einer hypoxischen Mikroumgebung provozieren und – auch wenn die in vielen Fällen gut wirksam sind - zum Teil hierdurch eine Stimulierung der Tumorstammzellen bewirken können. (Bergers und Hanahan, 2008; Sathornsumetee *et al.*, 2008; Hattingen *et al.*, 2011).

Zusammenfassend konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass das Hypoxie-Profil eines Glioblastoms mit der Malignität und der Therapieresistenz korreliert. Eine besonders maligne Subpopulation der Tumorzellen, die sog. Gliom-Stammzellen (GSC) entstehen in den Tumornischen in einer hypoxischen Mikroumgebung. Diese sind entweder um die pathologischen Tumorgefäße oder im soliden Tumorgewebe weit von den Kapillaren entfernt. Die Gliomstammzellen dieser Tumornischen sind vermutlich Hypoxie-abhängig. Neue Therapieansätze zielen genau auf diese Zellen und greifen in deren spezifischen Hypoxie-dependenten Signalwege ein.

Es ist daher geboten, diese für die therapeutische Entscheidung äußerst relevanten Tumorareale *in vivo* zu detektieren.

3.3 Bildgebung in der Neuroonkologie

Neuroonkologische Bildgebung beinhaltet leitliniengemäß MRT und PET Untersuchungen für eine anatomische sowie eine funktionelle Datenerhebung. Die aktuell verfügbaren Geräte und Applikationen ermöglichen eine strukturelle Auflösung mit mikroskopischer Tumorlokalisierung. Die gegenwärtigen Leitlinien betrachten die Veränderung von Kontrastmittelanreicherung und T2 Signalveränderung, obwohl diese letztlich nur Areale der Schrankenstörung und des Ödems abgrenzen. In den folgenden Abschnitten wird der physikalische Hintergrund derjenigen MRT-Parameter diskutiert, die in der untersuchten MRT-Methode für Hypoxiebildung eine wesentliche Rolle spielen.

3.3.1 Konventionelle MRT-Bildgebung

Grundlage der neuroradiologischen Diagnostik sind T1 und T2 gewichtete Sequenzen, die in allen neuroradiologischen Protokollen enthalten sind. Hauptvoraussetzung im Bereich des Gehirns ist eine multiplanare hochaufgelöste Bildgebung: eine optimale Strategie ist die Erfassung von 3D isovoxel Karten mit Auflösung im Submillimeterbereich. Deren Daten sind später für die intraoperative Navigation anwendbar.

Die entscheidende Information, die aus diesen Messungen gewonnen werden kann ist die exakte Lokalisierung der Läsion: die infra- oder supratentorielle Lage, der Bezug zu den Meningen, grauer oder weißer Substanz sowie zum Ventrikelependym liefern Hinweise auf den Ursprung des Tumors und engen die Gruppe der Differenzialdiagnosen deutlich ein.

Die Signalgebung in der T2 und T1 Wichtung wird durch die Zelldichte, den intra- und extrazellulären Wassergehalt sowie die Blutabbauprodukte beeinflusst. Die Gewebestruktur, die Infiltrationszone und die peritumorale Reaktionszone liefern Informationen bezüglich der Ursprungszellen und Malignität der Raumforderung. Ein sehr verlässliches Korrelat der Malignität ist das Vorhandensein einer Nekrose. Die konventionelle Bildgebung liefert zwar eine große Menge an Informationen, die die Differenzialdiagnose vereinfachen, funktionelle und metabolische Informationen für eine exaktere Diagnose, Prognose und Therapieplanung sind nicht vorhanden. Die

Veränderungen im Wassergehalt (T2 gewichtete Signalintensität) sowie die Schrankenstörung (erhöhte T1 Signalintensität mit Kontrastmittel) sind nicht spezifisch und können sowohl durch Tumorproliferation als auch durch Therapieansprechen hervorgerufen werden; diese können durch konventionelle Bildgebung allein nicht differenziert werden. Die in den Leitlinien empfohlenen linearen Größenmessungen reflektieren die feinen Veränderungen in den unscharf begrenzten infiltrierenden Tumoren nicht. Obwohl die konventionelle Bildgebung in den meisten Studien als Grundlage für Verlaufskontrollen dient (Lutz *et al.*, 2011), sie korreliert nicht mit dem klinischen Profil und der Prognose (Upadhyay und Waldman, 2011) und die Anwendung von quantitativen und funktionellen Messungen wird in der Neuroonkologie besonders empfohlen.

3.3.1.1 Die Kernspinresonanz

Für das Verständnis der unterschiedlichen Wichtungen und Sequenzen ist eine Übersicht der physikalischen Grundlagen der MRT erforderlich. Ausgenutzt wird hier die Kernspinresonanz, i.e. die Tatsache, dass die Atomkerne von Protonen einen Eigendrehimpuls (Spin) und ein magnetisches Dipolmoment besitzen. Edward Purcell und Felix Bloch waren die ersten Pioniere, die Kernspinresonanz experimentell nachweisen konnten. (Bloch, 1953)

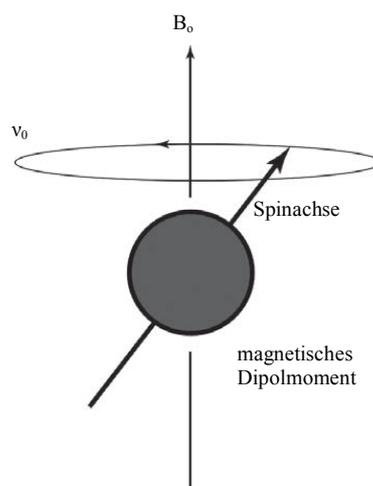


Abbildung 6 Schematische Illustration des magnetischen Dipolmoments und der Präzession

In einem statischen Magnetfeld (B_0) ist die Energie minimal, wenn das magnetische Dipolmoment parallel zum Feld ausgerichtet ist; bzw. es wirkt auf alle Kerne ein Drehmoment, um sie in die Richtung des magnetischen Moments zu drehen. Wegen des Eigendrehimpulses des Atomkerns und der Drehimpulserhaltung resultiert daraus die Präzessionsbewegung mit der Larmor-Frequenz. Sie hängt von der Stärke des äußeren Magnetfeldes und vom betrachteten Kern ab (nach der Formel $\nu_0 = \gamma B_0$), für Protonen bei 1.5 Tesla ist sie 64 MHz.

3.3.1.2 T1, T2 und T2*

Die Relaxation bezeichnet das Phänomen, dass das magnetische Dipolmoment sich nach einer großen Anzahl an Präzessionszyklen annähernd parallel zum Magnetfeld ausrichtet, im Sinne eines Energieausgleiches. Die Zeitkonstante für diesen Prozess ist T1 (longitudinale Relaxationszeit) und hängt von den Gewebeeigenschaften ab. Die T1-Zeiten in reinen, niedrigviskosen Flüssigkeiten wie z. B. Wasser liegen meist im Bereich von einigen Sekunden. Flüssigkeiten mit höherer Viskosität (z. B. Öle) oder Wasser in strukturierten Systemen wie z. B. Gelen, porösen Materialien oder Gewebe weisen im Allgemeinen kürzere T1-Zeiten auf. In hoch geordneten Festkörpern werden hingegen sehr lange Relaxationszeiten gefunden, die eventuell im Bereich von Stunden liegen können. Typische Werte für T1 im menschlichen Gewebe liegen zwischen einigen Sekunden für Körperflüssigkeiten wie Blut oder Liquor und ca. 100 ms für Körperfett.

Durch die thermische Energie der Kerne bei normalen Temperaturen sind die Dipolmomente fast vollständig isotrop ausgerichtet; es gibt nur einen sehr kleinen Überschuss von Atomkernen, deren Dipolmomente in Richtung des statischen Magnetfeldes ausgerichtet sind. Dieser geringe Überschuss bewirkt die außen messbare Magnetisierung in Richtung des äußeren statischen Feldes (Longitudinalmagnetisierung, M_0 , proportional zu der Protonendichte).

Ein hochfrequentes Zusatzfeld, senkrecht zum statischen Magnetfeld B_0 , also in der Transversalebene (B_1 , erzeugt vom Radiofrequenzpuls), dessen Frequenz mit der Larmorfrequenz in Resonanz ist, lenkt alle Kerne phasensynchron aus ihrer aktuellen Lage zum statischen Feld aus. Die makroskopische Magnetisierung wird aus der

Richtung des statischen Feldes gekippt (sog. Flipwinkel), es entsteht eine Transversalmagnetisierung.

Durch die rotierende Transversalmagnetisierung wird in der Messspule eine Spannung induziert, deren Frequenz von der Larmorfrequenz und Amplitude von der Stärke der Transversalmagnetisierung abhängt, ihrerseits abhängig von der genauen Sequenz von Pulsen, vom Ort und vom Gewebetyp.

Die Transversalmagnetisierung zerfällt durch Wechselwirkung mit benachbarten Atomen. Für die Dephasierung ist die sog. Spin-Spin-Wechselwirkung verantwortlich. Die Zeitkonstante für den Zerfall ist T₂ (transversale oder Spin-Spin Relaxationszeit). Im menschlichen Hirngewebe sind typische T₂ Werte bei 1.5 T z.B. 70 ms für weiße Substanz, 90 ms für graue Substanz und 400 ms für Liquor. Entsprechend ist bei einer Messung, die 100 ms dauert, das Liquor-Signal viel größer d.h. viel heller als das Parenchym-Signal (T₂ Wichtung).

Wenn der Vorgang wiederholt wird, hängt das Ergebnis von der Zeit zwischen den RF Pulsen ab, d.h. von der Repetitionszeit (TR). Wenn die TR relativ lang ist, wird das Ergebnis ähnlich wie beim ersten Schritt. Mit der Verkürzung der TR wird das zweite Signal niedriger. Die T₁-Erholungszeit wird immer länger (700 ms für weiße Substanz, 900 ms für graue Substanz und 4000 ms für Liquor). Entsprechend kann mit einer kurzen T₂ das Signal der weißen Substanz sich besser erholen als das Liquorsignal, sodass das Liquor dunkler erscheint als das Parenchym (T₁ Wichtung). T₁ gewichtete Sequenzen ermöglichen eine bessere Ortsauflösung bei geringerem Gewebekontrast.

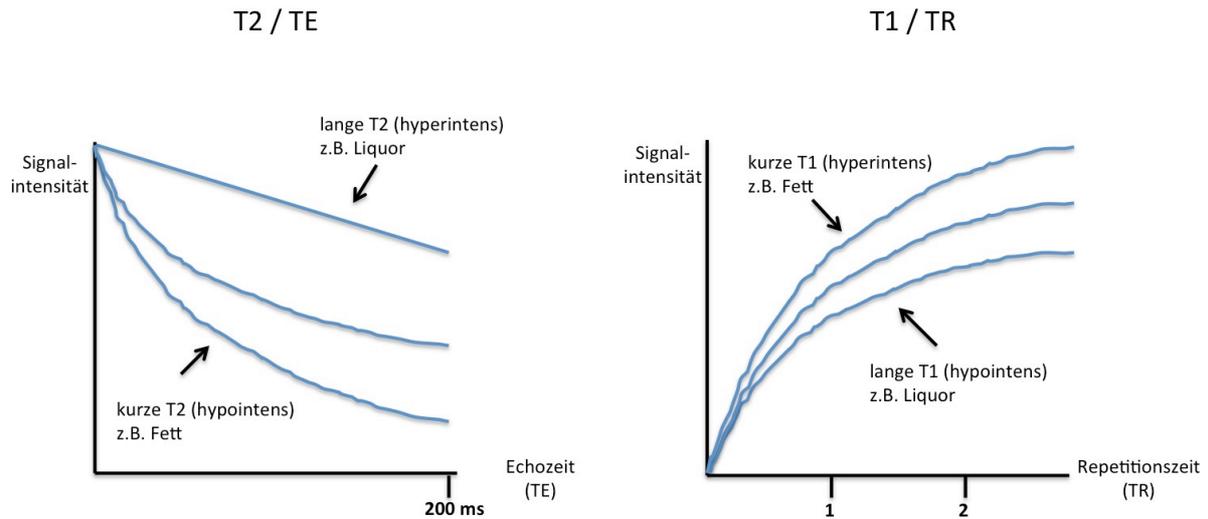


Abbildung 7 Schematische Illustration der Relaxationszeiten und des Signalverhaltens in der T2 und T1 Wichtung

Eine MRT-Sequenz (oder Pulssequenz) ist eine Kombination aus Hochfrequenzimpulsen und magnetischen Gradientenfeldern bestimmter Frequenz bzw. Stärke, die vielfach in jeder Sekunde in vorgegebener Reihenfolge ein- und ausgeschaltet werden, um Bilder mit unterschiedlichen Kontrasten zu erzeugen.

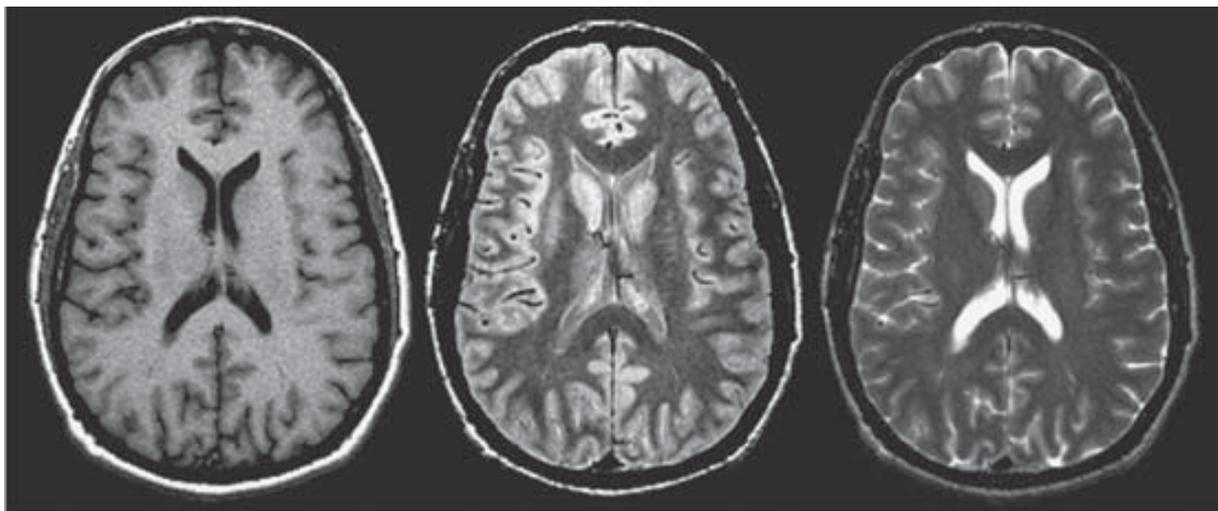


Abbildung 8 T1 (TR=600, TE=11), Protonendichte (TR=3000, TE=17) und T2 gewichtete (TR=3800, TE=102) Bilder; gleicher Patient und gleiche Schicht mit unterschiedlichen Gewebekontrasten. Im ersten Bild ist das Liquor dunkel und im letzten Bild ist es hell. Der Kontrast zwischen Liquor und Parenchym wird durch die Einstellung verschiedener Parameter manipuliert d.h. von TR (Repetitionszeit) und TE (Echozeit) (Buxton, 2009).

Nach der Anwendung des RF Pulses fällt das Signal idealerweise - in einem absolut homogenen Magnetfeld - mit der Zeitkonstante T2 ab. In der Wirklichkeit sieht man aber einen viel größeren Signalabfall: dieses Phänomen wird als die apparente transversale Relaxationszeit oder T2* beschrieben, wo die Zeitkonstante T2* kleiner ist als T2. Die Ursache des T2* Effekts ist die Inhomogenität des statischen Magnetfelds. Die Präzessionsrate ist vom Magnetfeld abhängig - deswegen führt jegliche Magnetfeldinhomogenität zu einer Vielfalt von Präzessionsraten, was eine Dephasierung verursacht und das Signal wird durch diese destruktive Interferenz reduziert.

Wenn ein reiner T2 Kontrast erwünscht ist, kann ein geeigneter 180°-Rephasierungs-Hochfrequenzimpuls bewirken, dass ein Teil der Dephasierung (T2*-Dephasierung durch zeitlich unveränderliche Magnetfeldinhomogenitäten) zum Zeitpunkt der Messung wieder rückgängig gemacht wird, so dass wieder mehr Spins in der gleichen Phase sind. Die Signalstärke hängt dann nicht von der T2* Relaxationszeit ab, sondern nur noch von der T2-Relaxationszeit, die auf nicht-reversiblen Effekten beruht.

3.3.1.3 Suszeptibilitätseffekte

Die magnetische Suszeptibilität (χ) ist eine Eigenschaft des untersuchten Materials und beschreibt seine Magnetisierbarkeit (M) im externen Magnetfeld (B), abhängig vom Material (μ), vom Magnetfeld (Stärke und Frequenz) sowie von der Lokalisation im Magnetfeld. Diamagnetische Materialien wie Wasser, Lipide und Fett ($\chi < 0$) unterscheiden sich von paramagnetischen Materialien ($\chi > 0$) und die unterschiedliche Suszeptibilität von zwei nebeneinander liegenden Materialien im Magnetfeld führt zu einer Distorsion im Feld. Das Magnetfeld im Kopf ist typischerweise sehr inhomogen, bedingt durch viele Gewebegrenzen zwischen Knochen, Luft und Hirnparenchym. Das MR-Signal ist sehr empfindlich für diese Effekte, die einen starken T2* Signalabfall verursachen. Die Effekte der unterschiedlichen Suszeptibilitäten werden bei der Entwicklung von Eisen- oder Blutgewichteten Sequenzen für spezifische Fragestellungen sowie bei der Theorie der T2' bzw. BOLD Bildgebung (s. unten) ausgenutzt; diese T2*-sensitive Messungen sind aber auch sehr anfällig für Artefakte in Bereichen mit großen Suszeptibilitätsunterschieden.

3.3.2 Der BOLD Effekt

In der T2' und BOLD (blood oxygen level dependent) Bildgebung werden die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften des oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobins genutzt. Oxygeniertes Hämoglobin ist diamagnetisch – da die vier O₂ Molekülen zusammen mit Fe²⁺ einen 0-Spin ergeben - und deoxygeniertes Hämoglobin ist paramagnetisch. Der Suszeptibilitätsunterschied zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin beträgt $\Delta \chi_0 = 0.264 * 10^{-6}$. (Jain *et al.*, 2012)

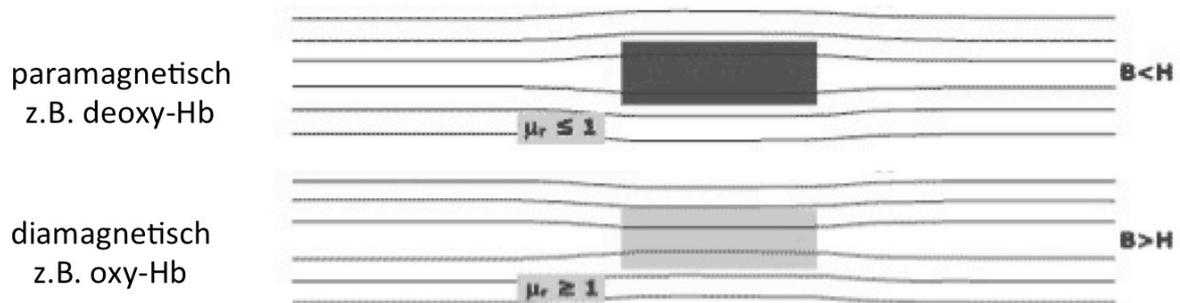


Abbildung 9 Schematische Darstellung der unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften und deren Nutzen in der BOLD-Bildgebung

Das paramagnetische deoxygenierte Hämoglobin erzeugt eine größere Feldinhomogenität um venöse Gefäße mit entsprechend erniedrigtem Signal im perivaskulären Gewebe bis zu einer fünffachen Entfernung des Gefäßdurchmessers. Es folgt eine schnellere Dephasierung der Spins von Wasserprotonen und hierdurch eine Verkürzung der T2* Relaxationszeit mit weniger Singal in den T2* gewichteten Bildern (Ogawa *et al.*, 1990).

Dieser BOLD Effekt kann in Kenntnis der neurovaskulären Kopplung vor allem zur funktionellen Bildgebung benutzt werden (Kwong *et al.*, 1992; Blockley *et al.*, 2013; Kwong, 2012). Hierzu wird das BOLD Signal dynamisch - entweder unter Ruhebedingungen für die Darstellung funktioneller Netzwerke (sog. Ruhenetzwerke) oder durch einen Wechsel von Aufgaben und Ruhe-Bedingungen für die Darstellung Aufgaben-spezifischer Hirnregionen – registriert.

3.3.3 T2' Bildgebung

Ein Ansatz zur Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs beruht ebenfalls auf dem geschilderten BOLD Effekt. Theoretische und präklinische Modelle wurden entwickelt um ein MR-Korrelat der Gewebehypoxie zu finden, wobei von der durch die Messung dargestellten vaskulären Oxygenierung Rückschlüsse auf die intrazellulären Sauerstoffverhältnisse gezogen werden müssen. Diese Methode wurde erst vor kurzem auch in einem klinischen Kontext umgesetzt.

Die Arbeit von Yablonskiy und Haacke (1994) hat als erste die analytische Beschreibung der transversalen Relaxation in einem Netzwerk zufällig orientierter zylindrischer Strukturen (analog zu Blutgefäßen) ermöglicht. Damit ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der transversalen Relaxationsrate $R2'$

$$R2' = \frac{1}{T2^*} - \frac{1}{T2}$$

und der Sauerstoffsättigung Y in einem Netzwerk von Blutgefäßen mit einem venösen Blutanteil ζ (welcher ungefähr dem venösen Blutvolumen entspricht $\approx 0.75 \cdot \text{CBV}$ (An und Lin, 2000)):

$$R2' = \zeta \cdot \gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi \cdot (1 - Y) \cdot B_0 \quad [1]$$

B_0 = Magnetfeldstärke; γ = gyromagnetisches Verhältnis = $2.675 \cdot 10^8 \text{ sec}^{-1}\text{T}^{-1}$; Y = Anteil des oxygenierten venösen Blutes

Die ersten klinischen Einsätze der Methode beschränkten sich auf eine Messung von $T2'$ und beschäftigten sich mit dem reduzierten Metabolismus im Alter (Siemonsen, Finsterbusch *et al.*, 2008) und bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (Holst *et al.*, 2009). Es wurde auch eine Anwendung beim ischämischen Schlaganfall vorgestellt (Siemonsen, Fitting *et al.*, 2008). Neuroonkologisch wurde die Methode in einer Studie zur Darstellung hypoxischer Areale im Glioblastom mit einem multimodalen Ansatz (McMillan *et al.*, 2006) sowie in einer weiteren Studie über die Wirkung von Angiogenesehemmer beim Glioblastom (Hattingen *et al.*, 2011).

Die in der Abteilung für Neuroradiologie entwickelte Methode ist eine Bearbeitung dieses Modells mit dem neuartigen Ansatz der unabhängigen Perfusionsmessung und der Korrektur der Werte mit Hilfe des deoxygenierten Blutvolumens.

Anhand der Formel [1] wird $T2'$ berechnet. Bei einem physiologischen $Y = 0.6$ (An und Lin, 2000) und bei einem Hämatokrit von 0.4 ($\Delta\chi = 0.8 \cdot 10^{-7}$) beträgt der Suszeptibilitätsunterschied (t_c or $T2'$) zwischen deoxygeniertem und oxygeniertem Blut

$$t_c = \left(\frac{4}{3} \cdot \gamma \cdot \pi \cdot \Delta\chi \cdot (1 - Y) \cdot B_0 \right)^{-1} \cong 9 \text{ ms}$$

t_c : charakteristische Zeitkonstante (Korrelationszeit); $\Delta\chi$: Suszeptibilitätsunterschied zwischen vollständig oxygeniertem und vollständig deoxygeniertem Blut

Der Anteil des deoxygenierten Blutes ($1-Y$) kann anhand [1] folgendermaßen berechnet werden:

$$1 - Y = \frac{R2'}{\zeta \cdot \gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi \cdot B_0} \approx \frac{R2'}{CBV \cdot c} \quad [2]$$

Bei arterieller Sauerstoffsättigung $Y_a = 100\%$ ist $1-Y = OEF$.

Weil der Anteil des venösen Blutes ζ nicht einfach messbar ist, wird er in einer Approximation durch CBV ersetzt. Aus diesem Grund kann OEF nicht quantifiziert werden und es wird ein relativer $rOEF$ bestimmt. Die übrigen Faktoren werden durch die Konstante $c = \frac{4}{3} \cdot \gamma \cdot \pi \cdot \Delta\chi \cdot B_0 = 317 \text{ sec}^{-1}$ zusammengefasst (Werte aus der Literatur (Yablonskiy und Haacke, 1994; An und Lin, 2000)).

$$1 - Y = rOEF = \frac{R2'}{CBV \cdot c} \quad [3]$$

Dieser Quotient – ein Korrelat der $rOEF$ - kann als ein semi-quantitativer Indikator der Gewebshypoxie betrachtet werden.

3.3.4 Perfusionsmessung (PWI)

Die gemessenen und berechneten Parameter der Gewebedurchblutung liefern dynamische Informationen über die Physiologie in gesundem und pathologisch

verändertem Gewebe. Die MR-Perfusionsbildgebung liefert Hinweise auf die kapilläre Mikrozirkulation, indem sie ein Korrelat des Blutvolumens (ml/100g) darstellt. Hierfür wird die Signalintensitätsänderung im Gewebe während der Anflutung eines Kontrastmittels über die Zeit gemessen.

Kontrastmittel

Gadolinium (Gd), ein zu den Metallen der seltenen Erden gezähltes Element, wird in einem inaktiven Chelatkomplex wie Gd-DTPA oder Gd-DOTA als Kontrastmittel eingesetzt. Gd ist aufgrund sieben ungepaarter f-Elektronen paramagnetisch. Gd(III)-Komplexe agieren dadurch als Kontrastmittel in der MRT, dass sie eine schnellere Relaxation der Protonen ermöglichen. Dies ist insbesondere bei intravenöser Gabe für die Blutwasserprotonen relevant und führt zu einer verkürzten T1 Relaxationszeit, d.h. zu einem verstärkten T1 Kontrast. Durch das kontrastierte Blut werden insbesondere die multiplen pathologischen intra- und peritumoralen Gefäße dargestellt. In Bereichen mit einer Schrankenstörung und Extravasation des Kontrastmittels wird das Signal in diesen Arealen diffus verstärkt. Die nativ T1 hyperintensiven Strukturen wie Blutabbauprodukte oder Verkalkungen können durch einen Vergleich zwischen nativen und Kontrastmittelgestützten Sequenzen abgegrenzt werden.

Die üblichste klinisch angewandte Methode der MRT-Perfusionsbildgebung mit exogenem Kontrastmittel beruht auf dem Suszeptibilitätseffekt der Gd-Chelate, welcher zu einem T2 und T2* Signalabfall im perivaskulären Gewebe führt. Diese Technik wird daher dynamische Suszeptibilitätskontrastbildgebung (dynamic susceptibility imaging, DSC) genannt. Die Signaländerung hängt von dem Gefäßdurchmesser und der Gefäßdichte ab. Die dynamische Bilderfassung erfolgt typischerweise mittels sehr schnellen T2* gewichteten GE-EPI Sequenzen; es werden Bilder vor der Kontrastmittelanflutung (baseline), während der Anflutung (first pass) und danach (steady state, Phase der Extravasation) gewonnen (s. Abb. 9).

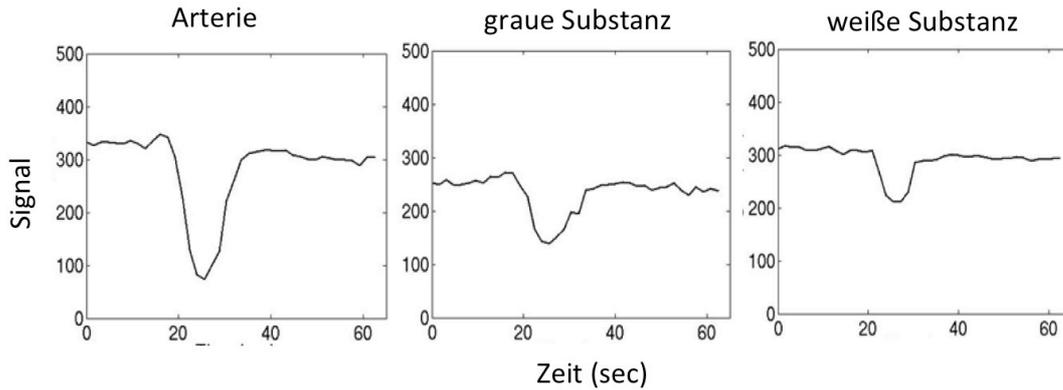


Abbildung 10 Typische Signalkurven der DSC PWI in drei verschiedenen ROIs (C. Preibisch, Abteilung für Neuroradiologie, Klinikum Rechts der Isar der TU München)

Aus den gemessenen Signal-Zeitverläufen können durch komplexe Modellierung folgende Parameter berechnet:

- T₀: die Zeit bis zur Ankunft des Kontrastmittels in der ausgewählten Schicht
- TTP (Time to Peak): die Zeit zwischen T₀ und der maximalen Kontrastmittel-Konzentration (Minimum der Signalkurve)
- MTT (Mean Transit Time): die Zeit der Kontrastmittel-Passage im Gewebe, d.h. die Breite der Kurve auf Höhe der Hälfte des Maximums
- rCBV (regionales oder relatives zerebrales Blutvolumen / cerebral blood volume): die Fläche unter der Kurve (Integral); diese Werte sind sehr robust und werden in der Tumorbildgebung am meisten verwendet
- rCBF (regionaler oder relativer zerebraler Blutfluss / cerebral blood flow): die Signalsteigung (=rCBV/MTT)

Die Bezeichnung „relativ“ bedeutet, dass die Werte in Bezug auf gesundes Gewebe normalisiert werden.

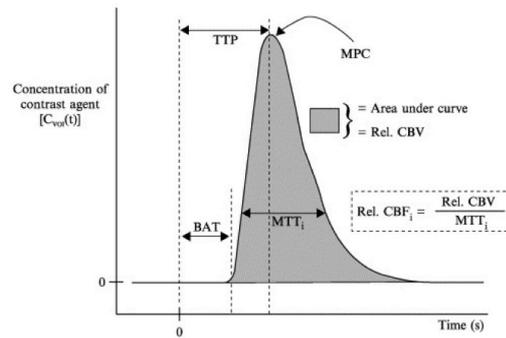


Abbildung 11 Schematische Illustration der berechneten Anflutungskurve und der abgeleiteten Parameter

Quantitative Messungen von CBV, CBF und MTT erfordern eine Dekonvolution des gemessenen Signalzeitverlaufs im Gewebe mit dem Signalzeitverlauf eines arteriellen Gefäßes (AIF) sowie eine Berechnung der Kontrastmittelkonzentration aus dem gemessenen Signal.

Eine besondere Problematik der beschriebenen Methode ist das Signalverhalten im Hirnparenchym mit geschädigter Blut-Hirn-Schranke. Der Kontrastmittelaustritt beeinträchtigt das Perfusionssignal und führt zu einer Unterschätzung der rCBV. Eine Methode, die dieses Problem berücksichtigt ist die T1 basierte dynamische Kontrastmittelanreicherung (Dynamic Contrast Enhancement, DCE). Diese Methode wird für die Perfusionmessung bei Hirntumoren üblicherweise als der DSC Methode überlegen eingestuft, wobei sämtliche limitierende Faktoren auch hier mit in Betracht gezogen werden müssen. In kleineren Studien wurde gezeigt, dass das dynamische Anreicherungsmuster in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich ist: Tumorgewebe mit hoher Proliferationsrate zeigt eine steile Kontrastmittelanreicherung, Narbengewebe reichert das Kontrastmittel jedoch langsamer an (Taylor und Reddick, 2000).

4 Patienten und Methodik

4.1 Patienten

Diagnostisch indizierte MRT-Untersuchungen wurden zwischen April 2011 und Oktober 2012 bei 67 Patienten mit zusätzlichen Studienmessungen ergänzt. Diese Patienten wurden über die üblichen Kontraindikationen der MRT-Untersuchung sowie über die anfallende zusätzliche Messzeit informiert. Eine schriftliche Einwilligung wurde ausgefüllt. Die Indikation für die MRT-Untersuchung wurde durch den zuständigen Neurologen oder Neurochirurgen bei Verdacht auf einen intrakraniell raumfordernden Prozess gestellt. Bei vier Patienten mit bekanntem Hirntumor bestand der Verdacht auf ein Rezidiv. In sechs Fällen erfolgte keine histologische Sicherung der Diagnose; diese Fälle wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. In sechs Fällen war die Untersuchungsqualität wegen Unruhe des Patienten oder aus technischen Gründen nicht ausreichend, diese Fälle wurden ebenfalls aus der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen. In die Analyse wurden letztendlich nur hirneigene Tumoren eingeschlossen.

Patienten		N =	
Untersucht		67	
Ausgeschlossen aus der weiteren Analyse	Σ	24	
	Ausschluss- kriterien	<i>Untersuchungsqualität nicht ausreichend</i>	6
		<i>Fehlende histologische Diagnose</i>	6
		<i>Nicht hirneigene Tumoren</i>	12
		<i>Lymphom</i>	2
		<i>Metastase</i>	2
		<i>ADEM</i>	4
		<i>Vaskulitis</i>	1
		<i>Infarktnarbe</i>	1
	<i>Sarkom</i>	1	
	<i>Meningeom</i>	1	
Datenanalyse		43	

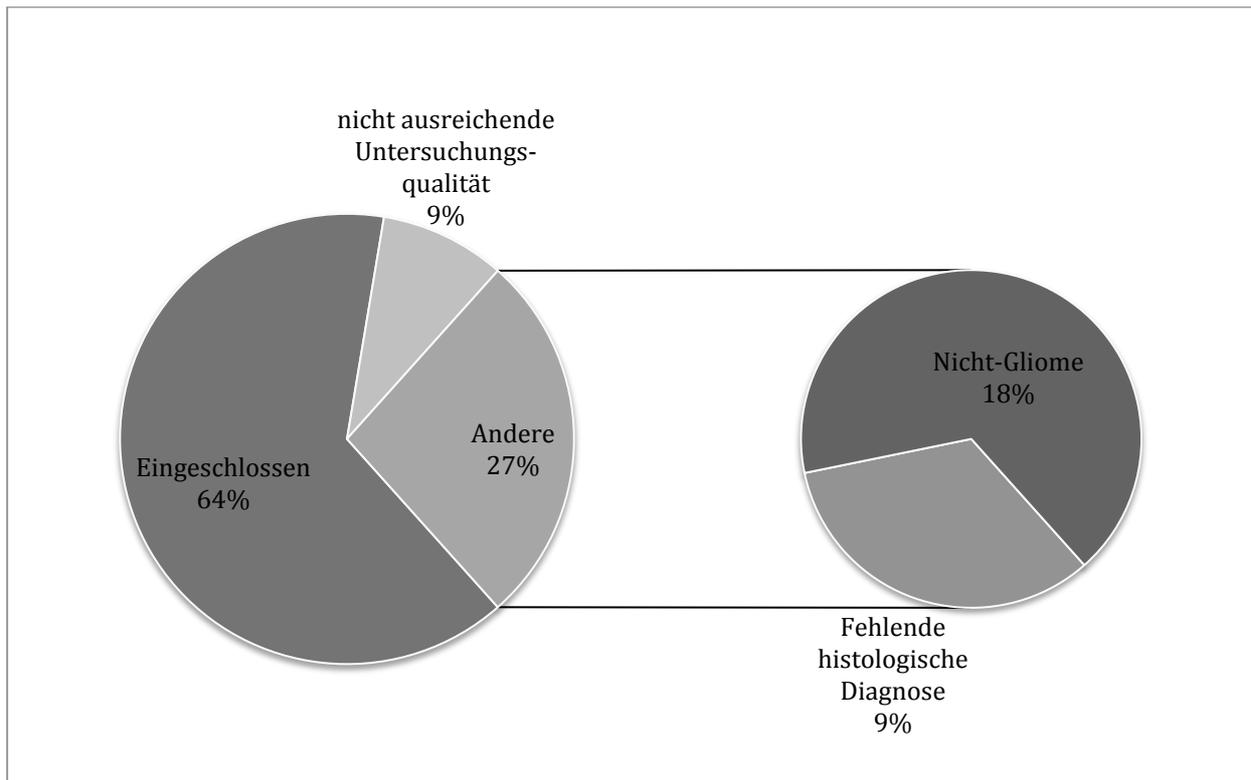


Tabelle 2. Tabellarische und Diagramm-Übersicht der untersuchten Patienten und der Ausschlusskriterien

Diagnosen		N=	Mittleres Alter in Jahren (min-max)	Geschlecht w / m
Gliome (N= 43)	GBM °IV	27	61 (40 – 84)	14 / 13
	AA °III	10	47 (18 – 75)	4 / 6
	LGG °II	6	51 (41 – 64)	1 / 5

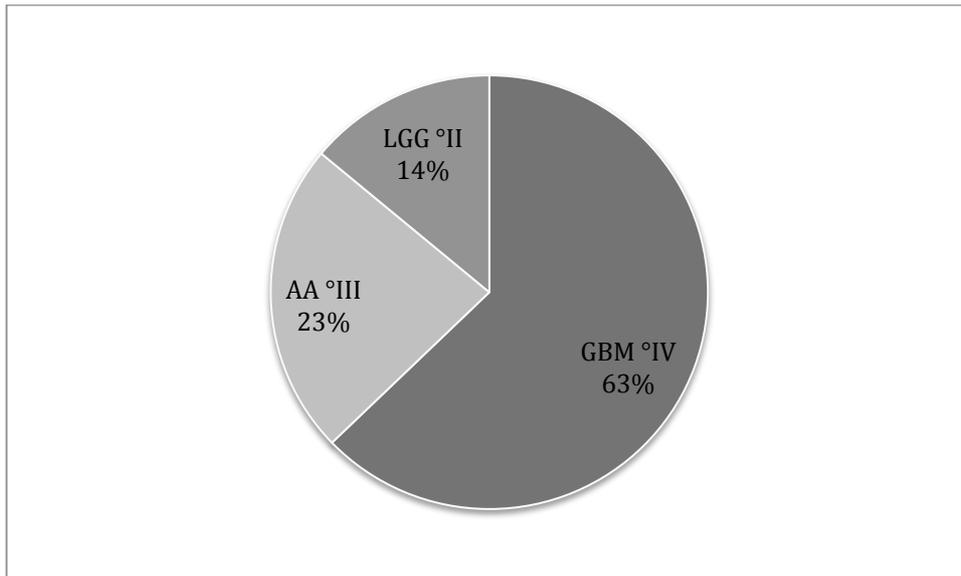


Tabelle 3. Tabellarische und Diagramm-Übersicht der Diagnosen und Patientendaten (nur die in die Analyse eingeschlossenen Untersuchungen)

Bei sechs Patienten aus der GBM Gruppe wurden intraoperativ gezielte Biopsieproben entnommen.

4.2 Experimentelle Details

Die Bildgebung erfolgte bei allen Patienten an einem 3T Ganzkörper MRT (Achieva 3T, Philips Healthcare, Hamburg, Germany) mit einer 8- oder 16-Kanal phased-array Kopf Empfangsspule. Die Kontrastmittelgabe erfolgte mit einer programmierbaren Kontrastmittelpumpe (Medtronic). Es waren keine zusätzlichen Anpassungen des üblichen Aufbaus benötigt.

Zusätzlich zu der konventionellen Bildgebung (axiale FLAIR, T2* Häm, T1 nativ und nach Kontrastmittelgabe) sowie ggf. funktioneller Bildgebung (Spektroskopie, fMRT) wurden zur Quantifizierung von T2 und T2* multi Gradientenecho (GE) und multi-echo Gradienten-Spinecho (GRASE) Messungen angefertigt. Diese Messungen wurden vor der ersten Anwendung bei Patienten an Probanden problemlos durchgeführt. Zudem erfolgte bei den Patienten routinemäßig eine DSC Perfusionsmessung zur Messung der rCBV.

Die multi GE Sequenz hatte folgende Parameter: 12 Echos, TE1 = 6 ms, Δ TE = 5 ms, TR = 1950 ms, α = 30°. Multi-echo GRASE Parameter waren: EPI Faktor 7, SENSE Faktor 2, 8 Echos, TE1 = 16 ms, Δ TE = 16 ms, TR = 8547 ms. Die Auflösung

war jeweils $2 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ mit einer Matrix von 112×106 und 30 Schichten. Für die Korrektur von makroskopischen Hintergrundgradienten wurde ein Anregungspuls mit exponentiellem Zeitprofil appliziert (Baudrexel *et al.*, 2009; Hirsch und Preibisch, 2013). Die multi GE Messung wurde mit halbiertem Auflösung wiederholt, um die Korrektur der Bewegungsartefakte durch den Austausch der zentralen Linien des k-Raums zu erlauben (Magerkurth *et al.*, 2011). Die DSC PWI Sequenz (Østergaard, 2004) hatte folgende Parameter: single-shot EPI, SENSE Faktor 2, $\alpha = 75^\circ$, $TE=40\text{ms}$, $TR = 1.7 \text{ s}$, Auflösung $2.33 \times 2.33 \times 4 \text{ mm}^3$, 40 Dynamiken. Das gesamte Untersuchungsprotokoll hatte eine Länge von etwa 30 Minuten; die Zusatzmessungen dauerten hiervon etwa 8 Minuten.

Messung (Philips Bezeichnung)	Dauer (min : sec)	Beschreibung
SmartBrain 3D FFE	00 : 53	Planungssequenz
T2w FLAIR ax	03 : 00	Anatomische Sequenz
T2w FFE	02 : 30	= Häm oder Gradientenecho
DWI ax	02 : 09	Diffusionswichtung
T1w SE ax	04 : 00	Anatomische Sequenz
T2 GRASE	02 : 16	Zusatzmessungen
T2S EXPO		
T2S EXPO for MoCo	01 : 35	
T2* Perfusion – Bolus von 0.1 mmol/kg Kontrastmittel (Gadopentetate dimeglumine; Magnograf, Marotrust GmbH, Jena, Germany) mit einem Fluss von 4 ml/s	01 : 07	DSC PWI
MPRage nach Kontrastmittel	05 : 55	Anatomische Sequenz, 3D T1w

Tabelle 4. Übersicht des Untersuchungsprotokolls

Für die Validation der Perfusionsmessung wurden bei 7 Glioblastompatienten zusätzlich zu den DSC Perfusionsmessungen auch dynamische T1 gewichtete Perfusionsmessungen (DCE) (Patlak und Blasberg, 1985; Tofts, 1997; Larsson *et al.*,

2009) durchgeführt. Die DCE Sequenz hatte folgende Parameter: T1 TFE-EPI (EPI Faktor 5, TFE Faktor 1, SENSE Faktor 2, TE = 2.9 ms, TR = 6.4ms, $\alpha = 30^\circ$, Auflösung $3 \times 3 \times 8 \text{ mm}^3$, Matrix 56×64 , 15 Schichten) mit geteiltem TFE Sättigungs-Prepuls an 13 Zeitpunkten zwischen 100 ms und 7100 ms nach Sättigung. Ein Vor-Bolus von 7.5 mL Gd-DTPA wurde appliziert 120 ms vor den DCE Aufnahmen. 180 dynamische Serien wurden aufgenommen mit einer zeitlichen Auflösung von 0.577 s.

4.3 Auswertung

4.3.1 Erstellung der Hypoxiekarten

Alle Bilder wurden im Philips Par/Rec Format exportiert. Die für die Auswertung benötigten hausinternen Programme wurden in MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) und in SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) konzipiert. T2 und T2* fitting wurde mit den entsprechenden Korrekturen für makroskopische Magnetfeldgradienten und Patientenbewegung durchgeführt (Baudrexel *et al.*, 2009; Magerkurth *et al.*, 2011; Hirsch und Preibisch, 2013). Alle Bilder wurden räumlich zum ersten Echo der GRASE multi-Echo Serie koregistriert. Die Auswertung der DSC Perfusionsmessung erfolgte mit Hilfe des Stroketool Programms (Digital Image Solutions, Frechen, Germany). Die CBV-Werte wurden auf einen gesunden Wert von 1.5% normalisiert (Helenius *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005).

Für die Auswertung der DCE Messungen wurden ebenfalls Programme in Matlab angewendet. T1 wurde durch einen Fitting-Prozess zu der exponentiellen Sättigungs=Erholungs-Kurve erzeugt. M0, die Äquilibrium-Magnetisierung wurde von den prä-Kontrastmittel DCE Daten bestimmt. Die AIF wurde bei den Patienten in gut abgrenzbaren Arterien mit 4 Voxeln manuell bestimmt. Die CBV Karten wurden anhand des Patlak-Modells berechnet (Patlak und Blasberg, 1985) bzw. in Arealen mit Schrankenstörung anhand des modifizierten Tofts-Modells neugerechnet (Li *et al.*, 2012).

Die Bilder bzw. Karten der relativen Sauerstoffextraktion (relative oxygen extraction fraction, rOEF) – die sog. Hypoxiekarten oder rOEF-Karten – wurden voxelweise berechnet. Die zugrundeliegende Methodik ist im Absatz 3.3.3 dieser Arbeit ausführlich dargestellt.

4.3.2 Datenanalyse

4.3.2.1 Bildqualität

Die R2', CBV and rOEF Karten wurden hinsichtlich der Bildqualität von zwei unabhängigen Auswertern (V. Tóth, C. Preibisch) auf einer Skala von 1 (nicht ausreichend) – 6 (sehr gut) für deren diagnostische Beurteilbarkeit und Qualität bewertet.

4.3.2.2 VOI Analyse

Zwei Neuroradiologen (V. Tóth, A. Förschler) haben die koregistrierten Karten ohne Kenntnis der histologischen Ergebnisse betrachtet und VOIs erstellt. Die Erstellung der VOIs erfolgte semi-automatisch in VINCI (Version 3.95.0, Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln, Deutschland) mit Hilfe eines Werkzeuges zur Schwellenwertbildung und mit manueller Nachbearbeitung. Die VOI Definitionen beruhen auf der Arbeit einer anderen Arbeitsgruppe mit ähnlichem Ansatz (Hattingen *et al.*, 2011):

1. Schrankengestörte Tumorareale (Contrast Enhancing Tumor, CET) wurden auf T1 Bildern nach Kontrastmittelgabe mit Ausschluss von nativ T1 hyperintensiven Arealen definiert.
2. Perifokales Tumorödem (Edema) – möglicherweise z.T. vermischt mit der Tumordinfiltrationszone - wurde auf FLAIR und T2 Bildern in Arealen mit sehr hohen T2 Werten und fingerförmiger Ausbreitung definiert.
3. Tumoröses T2 hyperintensives Gewebe oder T2-Tumor (T2T) wurde auf den FLAIR und T2 Bildern in nicht-schrankengestörten T2-signalveränderten Arealen definiert, die sich auch vom Tumorödem mit einer moderaten T2-Signalanhebung, inhomogenem Muster, Auftreibung der Mark-Rinden-Grenze mit kortikaler Infiltration, raumfordernder Wirkung und ohne fingerförmiger Ausbreitung unterschieden haben. Zysten, intratumorale Einblutungen und Gefäße wurden nicht mit eingeschlossen.
4. Mit der Summation der o.g. VOIs wurde ein Ganztumor-VOI (All Tumor, AT) erstellt.

5. VOIs der grauen und weißen Substanz (gray matter, GM; white matter, WM) wurden auf T1 Bildern in SPM8 mit automatischer Segmentierung erstellt (Probabilität > 75%) und das VOI „All Tumor“ hiervon subtrahiert.
6. T2, T2*, R2', rCBV und rOEF Werte wurden für jeweils alle VOIs exportiert.
7. Es wurde ein Schwellenwert für rOEF als $rOEF_{\text{Mittelwert} + SD(rOEF)}$ bestimmt.
8. Das VOI „Hypoxischer Tumor“ (HT) wurde im Bereich des Tumors mit überschwelligen rOEF-Werten erzeugt.
9. Der Anteil des hypoxischen Tumors in den jeweiligen Tumor-VOIs wurde mittels Schnittmengeberechnung (Intersection) bestimmt (HT/AT, HT/CET, HT/T2T, HT/Edema).

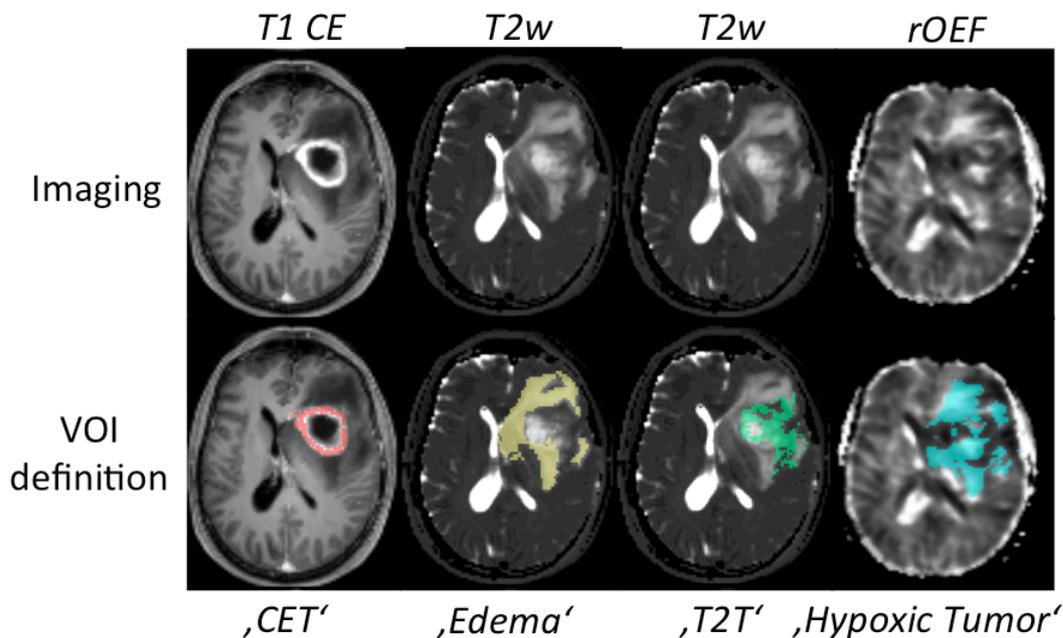


Abbildung 12 Bildbeispiel für die Definition der VOI Areale (Tóth *et al.*, 2013)

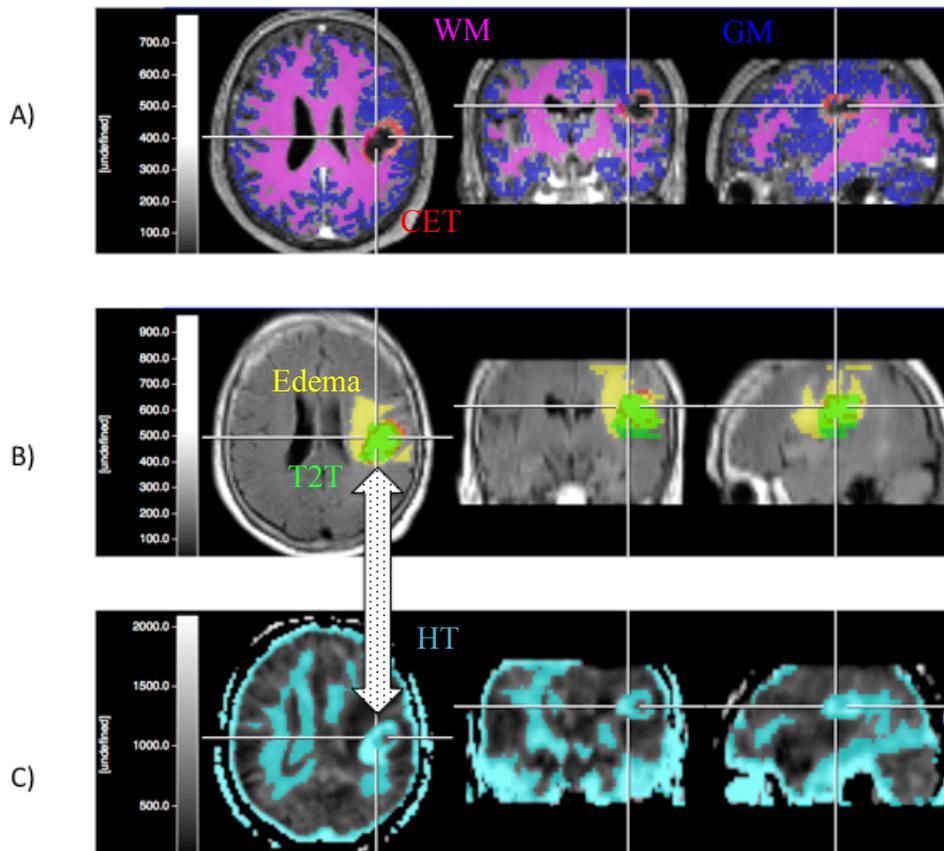


Abbildung 13 Übersicht der semi-automatischen dreidimensionalen VOI Definition: A) VOIs der grauen und weißen Substanz (GM, WM) und des schrankengestörten Tumors (CET) wurden auf den T1 Bildern definiert B) Die VOIs „Edema“ und „T2T“ wurden auf FLAIR und T2 Bildern definiert C) VOIs mit rOEF überschwelligen Werten wurden erzeugt; die artefiziell hohen Werte wurden nicht in die Analyse einbezogen. Das VOI „hypoxischer Tumor“ wurde als die Überlappung zwischen den hohen rOEF Werten und den Tumorarealen erzeugt.

Statistische Analysen wurden in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) durchgeführt.

4.4 Biopsieentnahmen

4.4.1 Präoperative Biopsieplanung

4.4.2 Technische Durchführung der Entnahmen

Präoperativ wurden die Bilddaten an die Auswertungs- und Navigationssoftware BrainLAB iPlan® Net Cranial 3.0.1 (BrainLAB AG, Feldkirchen, Germany) übertragen. Hier wurden die Sequenzen koregistriert und fusioniert. Zusammen mit den operierenden Neurochirurgen wurden die Biopsieziele im Bereich des

resezierbaren Tumors definiert. Die benötigten Trajektorien wurden parallel simuliert, um eine Schädigung des gesunden Parenchyms und der großen Gefäße zu vermeiden.

Intraoperativ wurde die Biopsieentnahme nach Hochladen dieser Biopsieziele in die Bildnavigationssoftware VarioGuide (BrainLAB AG, Feldkirchen, Germany) in einem rahmenlosen Stereotaxiesystem mit online Feedback durchgeführt (Gempt *et al.*, 2012).

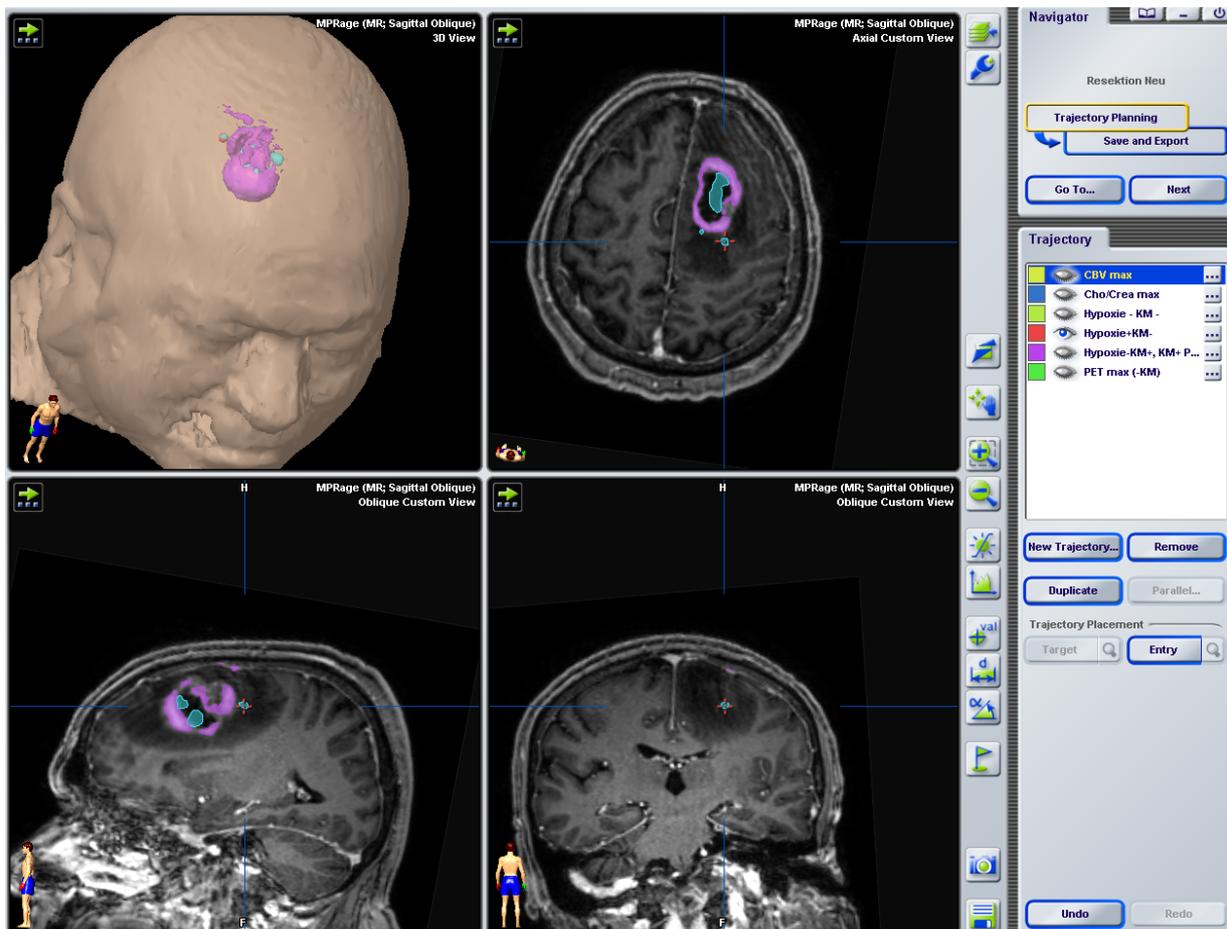


Abbildung 14 Bildbeispiel über die Planung der Biopsieziele (3D T1 Wichtung nach Kontrastmittelgabe in 3D-Projektion und in drei Ebenen rekonstruiert; CET in lila, HT in blau; rotes Kreuz im nicht-anreichernden Tumor - HT/T2T)

4.4.3 Histologische Aufarbeitung

Die zylindrischen Biopsieproben (Durchmesser ca. 1-4mm) wurden nach der Entnahme umgehend in sterilen beschrifteten Röhrchen mit 4% gepuffertem Formalin platziert (1 Probe / Röhrchen) und in die Abteilung für Neuropathologie

transportiert. Eine zusätzliche Probe wurde für die Schnellschnittsdiagnose benutzt. Die in Formalin fixierten Proben wurden 2-6 Stunden nach der Entnahme in Paraffin eingebettet. Schnitte dieser Gewebeblöcke wurden dann immunohistochemisch nach folgenden Schritten aufbereitet:

1. Vorbehandlung (Antigen Retrieval): pH 9.0 Tris/EDTA Puffer (Dako Target Retrieval Solution)
2. Peroxidase-Blockade in 3 % H₂O₂
3. Blockierung der aspezifischen Antigene mit Avidin/Biotin (Vector) und 5 % Ziegenserum (Normal, Dako)
4. Inkubation mit einem anti-HIF-1 α Antikörper (polyklonales Hasen-IgG, Upstate Cell Signaling Solutions, in Dako REALTM Antikörper Lösung 1:500), bei 4 °C über Nacht.
5. Sichtbarmachung mit dem Dako REALTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Hase/Maus
6. Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper und mit einem Streptavidin-peroxidase Antikörper
7. Visualisierung in einer DAB chromogenen Lösung und mit Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die histologische Auswertung beschreibt die Präsenz und Menge tumoröser Zellen, Nekrose und Vaskularisierung. Der Grad der HIF-1 α Färbung wurde entsprechend der modifizierten immunohistochemischen Auswertung nach Remmele *et al.* (1986), mit einer Kombination der Zahl der gefärbten Zellen im Bildfeld und der Färbungsintensität definiert. Die HIF-1 α Färbung wurde bei weniger als 5% Kernfärbung als „negativ“, bei 5-25% Kernfärbung als „schwach“ und bei mehr als 25% Kernfärbung als „stark“ beschrieben.

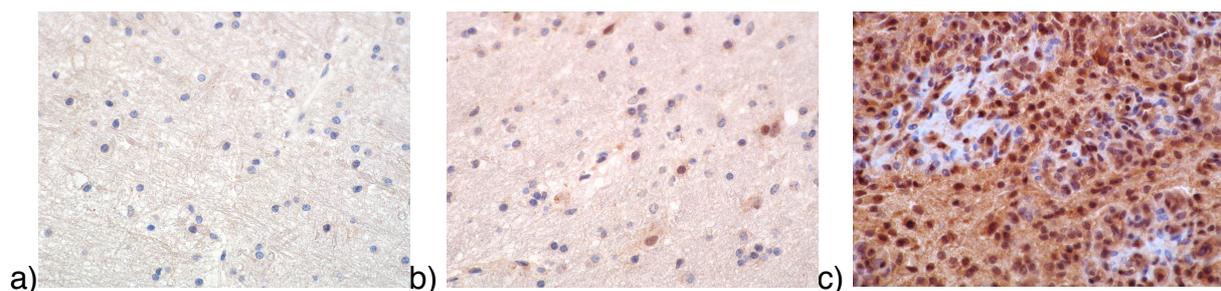


Abbildung 15 Bildbeispiele für die HIF-1 α Färbung: a) negative b) schwache c) starke Färbung (C. Delbridge, J. Schlegel, Abteilung für Neuropathologie, Klinikum Rechts der Isar der TU München)

5 Ergebnisse

5.1 Durchführbarkeit der Methode

Die erzeugten rOEF Karten waren in 61/67 (91%) der Patienten diagnostisch verwertbar. Besonderheiten dieser Karten sind in der Abbildung 16 (unterste Reihe) dargestellt. Ein schmaler hyperintenser Saum rund um das Gehirn ist immer zu sehen, dieser entspricht ist durch Suszeptibilitätsartefakte bedingt. Darüber hinaus zeigt sich eine starke Hyperintensität der Basalganglien und der großen venösen Gefäße – bei Suszeptibilitätsartefakte durch Eisenablagerungen und deoxygeniertes Blut bedingt - sowie eine relative Hyperintensität der weißen Substanz im Vergleich zur grauen Substanz. Weitere Areale, in denen Suszeptibilitätsartefakte eine diagnostische Beurteilung erschweren können finden sich frontobasal, temporal und infratentoriell, d.h. angrenzend an Knochen und Luft. Eine genaue Koregistrierung mit konventionellen MRT-Bildern ist unerlässlich, um solche Artefakte zu erkennen.

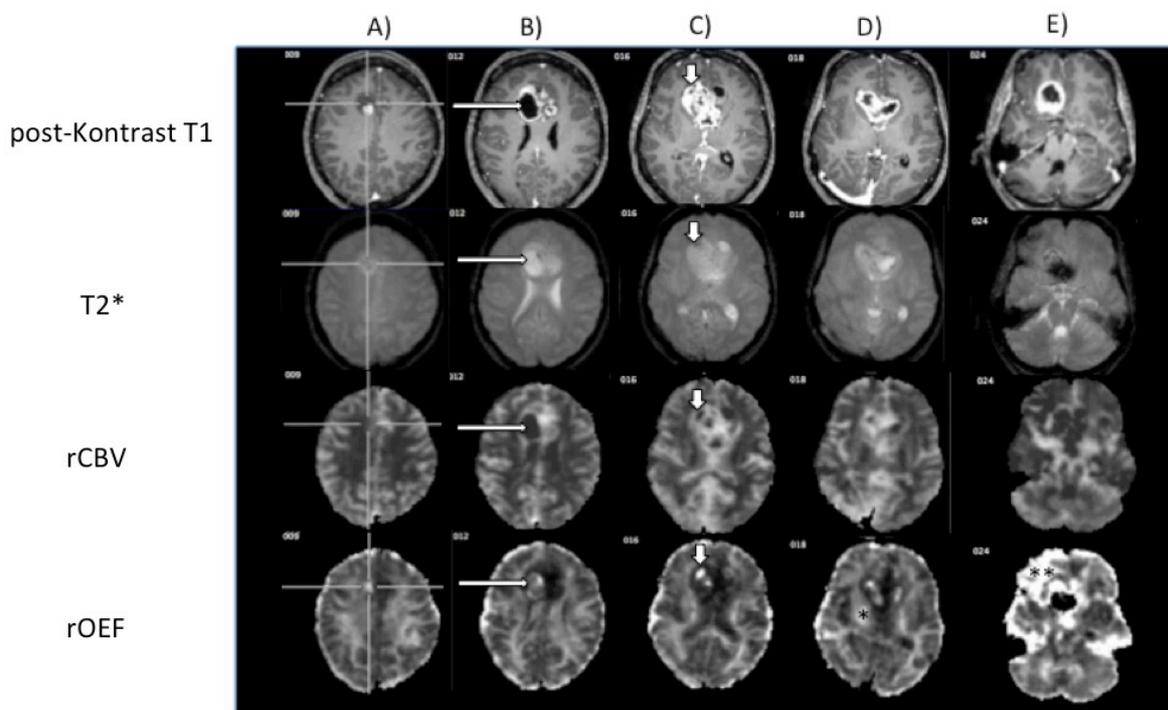


Abbildung 16 Typische Merkmale der Hypoxiekarten: in den Reihen unterschiedliche Sequenzen, in den Spalten unterschiedliche Schichten (40-jährige Patientin mit GBM). A) Der Zielkreis zeigt auf ein nicht-anreicherndes, T2 hyperintenses tumorverdächtiges Areal; die rCBV Werte sind weder erhöht noch sehr niedrig; die rOEF Karte zeigt eine fokale Hyperintensität, als Korrelat einer möglichen

hypoxischen Nische. B) Der Pfeil zeigt auf ein Tumorareal mit mäßiger rOEF Erhöhung, welche aber der zentralen Tumornekrose entspricht, mit sehr niedrigen rCBV Werten. C) Der Pfeil zeigt auf ein schrankengestörtes Tumorareal mit nur wenig Nekrose oder Blutung, gemischt niedrigen rCBV Werten und eine deutliche rOEF Erhöhung, perinekrotischem hypoxischem Tumorgewebe entsprechend. D) Der Stern liegt im Bereich des Putamens rechts, wo artefiziell erhöhte rOEF Werte durch die Eisenablagerungen entstehen. E) Der Doppelstern liegt rechts frontobasal, wo die rOEF Werte artefiziell hoch sind durch die makroskopischen Suszeptibilitätsartefakte; in diesem Bereich ist keine sinnvolle Auswertung der rOEF Karten möglich.

Tumoren stellen sich in den rOEF Karten im Bereich der zentralen Nekrose und des perifokalen Ödems meist hyperintens dar. Dies ist vor allem durch sehr niedrige CBV Werte erklärbar (s. Berechnungsformel in [3]). Fokale Hyperintensitäten in Tumorarealen waren in allen Glioblastomen und in der Mehrheit der °III Tumoren detektierbar, jedoch in keinem °II Tumor. Diese rOEF Hyperintensitäten zeigten sich im schrankengestörten Tumorgewebe bei 16/17 Glioblastomen (94%) und in 4/7 °III Tumoren (57%); im nicht-schrankengestörten Tumoranteil (T2T) waren sie bei 7/17 Glioblastomen (41%) und bei 3/7 °III Tumoren (43%) nachweisbar. In einzelnen Fällen entsprachen Hyperintensitäten - bei der parallelen Betrachtung der anatomischen Karten - intratumoralen Einblutungen oder großen Gefäßen und wurden als artefiziell gewertet.

5.2 Bildqualität

Die Bildqualität der erzeugten R2', rCBV_{DSC} und rOEF Karten wurde durch zwei Prüfer (V. Tóth, C. Preibisch) evaluiert mit dem Schulnotensystem (1 = sehr gut; 6 = ungenügend). Die Inter-Rater-Reliabilität wurde mit Hilfe der Kappa-Statistik bestimmt und zeigte eine sehr gute Übereinstimmung ($\kappa = 0.95$). Die Bildqualität war durchschnittlich als gut/befriedigend (2.84 ± 1.03 für R2', 2.12 ± 0.72 für CBV und 2.84 ± 1.15 für rOEF) bewertet.

	R2'			CBV _{DSC}			rOEF		
	Pr. 1	Pr. 2	Mittel-wert	Pr. 1	Pr. 2	Mittel-wert	Pr. 1	Pr. 2	Mittel-wert
Mittel-wert	3.0	2.85	2.84	2.1	2.13	2.12	2.8	2.85	2.84
SD	1.1	1.04	1.03	0.8	0.73	0.72	1.3	1.16	1.15

Tabelle 5. Bewertung der Bildqualität

5.3 Ergebnisse der Datenanalyse

5.3.1 Vergleich der Perfusionsmessung mit der DCE und DSC Methode

Die CBV Werte waren bei beiden Methoden in allen VOIs vergleichbar. In den schrankengestörten Tumoranteilen waren die Mittelwerte für $5.0 \pm 1.3\%$ für CBV_{DSC} und $5.8 \pm 6.3\%$ für CBV_{DCE} . Insgesamt wurde eine deutlich höhere Abweichung der Werte mit der DCE Methode gesehen und in der Bewertung der Bildqualität erhielten die CBV_{DCE} Karten einen Mittelwert von 3.84 ± 0.7 . Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Durchschnitts-rOEF Werten in den Tumor-VOIs und insbesondere in CET mit der CBV_{DSC} und mit der CBV_{DCE} Methode gefunden.

	GM		WM		CET		T2T		Edema	
	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 1	Gr. 2
T2 [ms]	92.7 (±16.7)	96.6 (±10.5)	82.2 (±4.0)	80.4 (±4.7)	126.5 (±25.9)	134.9 (±17.2)	129.1 (±24.4)	151.3 (±54.5)	164.7 (±13.3)	152.2 (±25.1)
T2* [ms]	52.5 (±6.0)	51.6 (±8.9)	53.1 (±5.1)	51.1 (±5.3)	69.6 (±10.9)	81.1 (±34.4)	78.0 (±11.6)	76.1 (±17.6)	103.0 (±10.5)	98.6 (±24.8)
R2' [ms]	7.7 (±0.2)	8.3 (±2.2)	7.1 (±0.6)	7.4 (±1.6)	7.2 (±2.3)	6.9 (±2.4)	5.7 (±1.1)	7.5 (±2.8)	4.2 (±0.8)	4.5 (±2.0)
rCBV_{DSC} [%]	3.9 (±0.7)	4.0 (±0.7)	2.7 (±0.5)	2.7 (±0.5)	5.0 (±1.3)	4.7 (±1.4)	4.0 (±1.1)	4.4 (±1.5)	2.0 (±1.0)	2.8 (±0.7)
rCBV_{DCE} [%]	4.3 (±1.31)		2.5 (±1.16)		5.8 (±6.3)		3.7 (±0.8)		2.2 (±0.7)	
p	0.4898		0.6827		0.7478		0.5703		0.6723	
rOEF_{DSC}	0.59 (±0.08)	0.71 (±0.25)	0.84 (±0.13)	0.95 (±0.22)	0.49 (±0.25)	0.55 (±0.32)	0.51 (±0.15)	0.68 (±0.38)	0.72 (±0.16)	0.58 (±0.26)
rOEF_{DCE}	0.77 (±0.11)	-	1.16 (±0.13)	-	0.62 (±0.25)	-	0.64 (±0.15)	-	0.73 (±0.12)	-
p	0.0044		0.0006		0.3498		0.1309		0.8969	

Tabelle 6. Ergebnisse des Vergleichs der CBV_{DSC} und der CBV_{DCE} Methode (Patienten mit beiden Messungen in der Gruppe 1; N=7). Zum Vergleich werden auch die CBV_{DSC} Werte der Patientengruppe ohne zusätzlichen CBV_{DCE} Messungen (Gr. 2; N=17) gezeigt. Alle Patienten hatten Glioblastome. Statistisch (Student t-Test, $p < 0.1 / 0.05$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

5.3.2 Ergebnisse der VOI-Analyse

T2 und T2* Werte waren im Tumorgewebe um ca. 50 bis 100% erhöht im Vergleich zum gesunden Gewebe; die höchsten Werte wurden im Tumorödem registriert. R2' war im Tumorgewebe ca. 80 % niedriger als im gesunden Gewebe. rOEF war in Tumorgewebe generell niedriger als in gesundem Gewebe, und niedriger in CET als in T2T und in Edema – vor allem wegen des erhöhten CBV-Effekts.

	GM	WM	CET			T2T			Ödem		
	alle	alle	GBM	°III	°II	GBM	°III	°II	GBM	°III	°II ⁽¹⁾ (N=1)
T2 [ms]	96.5 (± 10.6) _____*	80.1 (± 4.6) _____*	132.7 (±16.3)	150.0 (±99.0)	-	145.5 (±49.2)	137.8 (±56.7)	149.5 (±29.9)	155.0 (±31.2)	164.9 (±77.5)	130.7
T2* [ms]	52.9 (± 8.1)	51.2 (± 5.0)	78.1 (±30.6)	93.7 (±58.0)	-	76.6 (±16.2)	78.3 (±17.7)	110.0 (±43.4)	99.6 (±25.5)	99.7 (±28.4)	87.3
R2' [sec ⁻¹]	7.9 (± 2.0)	7.2 (± 1.5)	7.0 (±2.4)	5.6 (±2.8)	-	7.0 (±2.7)	6.2 (±1.4)	2.1 (±1.0)	4.5 (±1.6)	4.9 (±1.7)	2.4
CBV [%]	4.2 (± 0.7) _____*	2.8 (± 0.6) _____*	4.8 (±2.0)	5.9 (±2.7)	-	4.3 (±1.8)	5.0 (±2.1) _____†	2.3 (±0.4)	2.6 (±0.8)	4.3 (±1.9)	2.6
rOEF	0.64 (± 0.23) _____*	0.91 (± 0.22)	0.54 (±0.31)	0.33 (±0.12) _____†	-	0.64 (±0.34)	0.52 (±0.30) _____†	0.27 (±0.15)	0.61 (±0.27)	0.48 (±0.22) _____†	0.28

Tabelle 7. Ergebnisse der VOI Analyse: T2, T2*, R2', CBV und rOEF Werte (Mittelwert ± SD) in dem Gesamtkollektiv in gesundem Gewebe (graue Substanz –GM– und weiße Substanz –WM–) sowie im schrankengestörtem (CET), nicht-anreicherndem (T2T) Tumorgewebe und im Perifokalödem (Ödem) bei unterschiedlichen Tumorgraden (GBM, °III und °II). Unter den Datenreihen sind jeweils die statistisch signifikanten Unterschiede markiert:

* statistisch signifikanter Unterschied (p<0.05) (Student's t-test)

† statistisch signifikanter Unterschied (p<0.1) (Student's t-Test)

⁽¹⁾: Grubbs' test (extreme studentized deviate) zur Erkennung eines statistischen Ausreißers (bei N=1 in der Gruppe °II im VOI Edema).

Malignere Tumoren zeigten (fokal) höhere rOEF Werte trotz der insgesamt erhöhter Perfusion (rCBV).

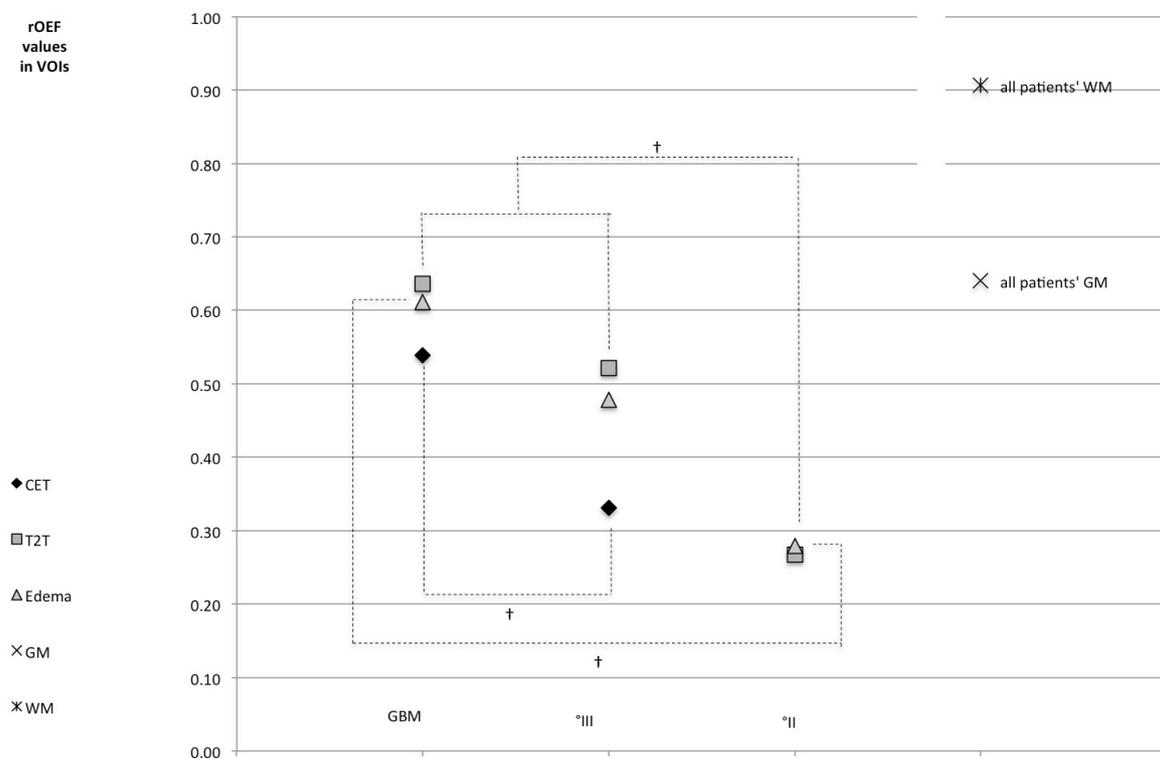


Abbildung 17 Illustration zur Verteilung der rOEF Werte je nach Tumorgrad und Tumor-VOI (†: statistisch signifikanter Unterschied; $p < 0.1$; Student's t-Test)

Die volumetrische Analyse zeigte, dass höhergradige Tumoren einen größeren Anteil an Gewebe mit hohem rOEF haben. Dieser Anteil war vor allem im nicht-anreichernden Tumor lokalisiert. Im Perifokalödem wurden auch hohe rOEF Werte gefunden. Der Anteil des „hypoxischen“ Gewebes im Tumor korrelierte mit dem Tumorgrad (Spearman-Test, $r = 0.9993$, $p < 0.0001$).

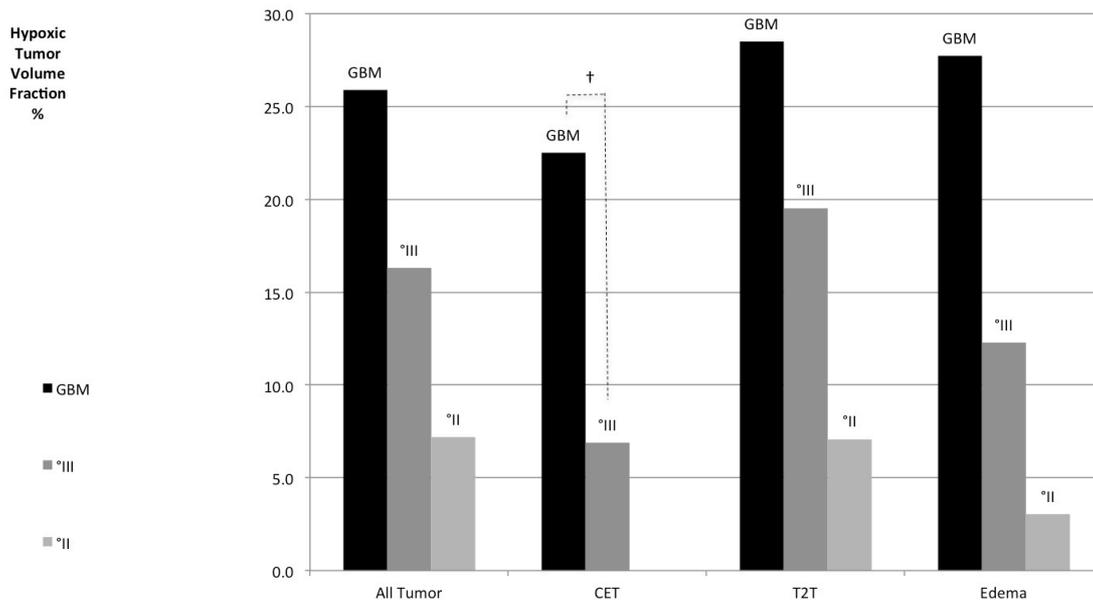


Abbildung 18 Die volumetrische Analyse zeigt einen größeren Anteil mit hohem rOEF in allen VOIs der höhergradigen Tumoren

rCBV und rOEF waren invers korreliert (Spearman Test, $r = -0.6343$, $p = 0.0009$). R² und rCBV zeigten keine Korrelation. Eine Korrelation der rCBV mit dem Tumorgrad konnte in diesem Patientenkollektiv nicht gezeigt werden.

5.4 Korrelation mit der Histologie

Bei sechs Patienten wurden Biopsieziele präoperativ geplant und während der Resektions-OP intraoperativ stereotaktisch entnommen; insgesamt wurden 25 Biopsieproben gesammelt.

	schrankengestörter Tumor	nicht-anreichernder Tumor
$\uparrow rOEF$ $= > rOEF_{Mittelwert} \pm SD(rOEF)$	HT / CET N = 2	HT / T2T N = 4 * + 2 Proben in der Tumornekrose
$\downarrow rOEF$ $= < rOEF_{Mittelwert} \pm SD(rOEF)$	nicht-HT / CET N = 9	nicht-HT / T2T N = 8

Tabelle 8. Übersicht der anhand MRT-Bilder gezielten Biopsieproben (HT = hypoxischer Tumor, Tumorareal mit erhöhten rOEF Werten; nicht-HT = Tumorareal mit rOEF-Werten unter dem Grenzwert)

Patient	Probe	MR Befund		Histologie-Befund			
		Lokalisation	↑rOEF (0 =nein, 1=ja)	Lokalisation	Nekrose 0: keine 1: 0-50% 2: >50%	Vaskularisierung 0: keine 1: mäßige 2: starke	HIF-1α 0: 0-5% 1: 5-25% 2: >25%
Patient 1	1	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	1	1	0
	2	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	1	1	2
	3	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorzentrum	1	1	1
	4	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorrand	0	0	1
	5	nicht-anreichernder Tumor	1	Tumorrand	0	0	2
	6	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	1	1	0
Patient 2	7	nicht-anreichernder Tumor	1	Tumorrand	0	0	2
	8	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	1	1	0
	9	schrangegestörter Tumor	1	Tumorzentrum	1	1	2
	10	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorrand	0	0	1
Patient 3	11	nicht-anreichernder Tumor	1	Infiltration	0	0	0
	12	zentrale Tumornekrose	1	Tumorzentrum	0	1	1
	13	schrangegestörter Tumor	0	Tumorrand	0	0	1
	14	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorrand	0	0	0
Patient 4	15	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	0	2	1
	16	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	1	2	2
	17	schrangegestörter Tumor	0	Tumorrand	0	0	1
	18	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorrand	0	0	1
Patient 5	19	schrangegestörter Tumor	1	Tumorzentrum	1	2	2
	20	zentrale Tumornekrose	1	Tumorzentrum	2	0	0
	21	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorrand	0	0	1
Patient 6	22	schrangegestörter Tumor	0	Tumorzentrum	0	1	1
	23	nicht-anreichernder Tumor	1	Tumorrand	0	0	1
	24	nicht-anreichernder Tumor	0	Tumorrand	0	1	1
	25	nicht-anreichernder Tumor	0	Infiltration	0	0	2

Tabelle 9. Übersicht der entnommenen Biopsieproben mit Nebeneinanderstellung der präoperativen Planung anhand der MRT-Bilder und der histologischen Befunde

Die Korrelation der histologischen Befunde mit den MRT-Eigenschaften der Biopsieproben wird in einem Säulendiagramm in Abbildung 19 dargestellt. Zwei Proben wurden aus der Tumornekrose entnommen und zeigten trotz hoher rOEF Werte keine deutliche HIF-1α Färbung; histopathologisch konnte hier keine

Kernfärbung bei fehlenden zellulären Komponenten festgestellt werden. Die Mehrheit der Biopsieproben aus Tumorarealen mit niedrigem rOEF zeigte wenig Färbung mit HIF-1 α . Vier Proben aus Tumorarealen mit hohem rOEF (d.h. zwei Drittel der Proben aus solidem Tumor mit hohem rOEF) zeigten eine starke HIF-1 α Immunreaktivität. Sensitivität und Spezifität wurden anhand der Formel *Sensitivität = richtig positiv / (richtig positiv + falsch negativ)* und *Spezifität = richtig negativ / (richtig negativ + falsch positiv)* berechnet, wobei die HIF-1 α Färbung (> 25% Kernfärbung) als „gold standard“ für die Beurteilung der Tumorphypoxie angenommen wurde. Hiernach lag die Spezifität der rOEF Messung bei 0.71; die Sensitivität lag bei 0.5. In der Untergruppenanalyse war die Spezifität 0.9 für den schrankengestörten Tumor und 0.67 für den nicht-anreichernden Tumor.

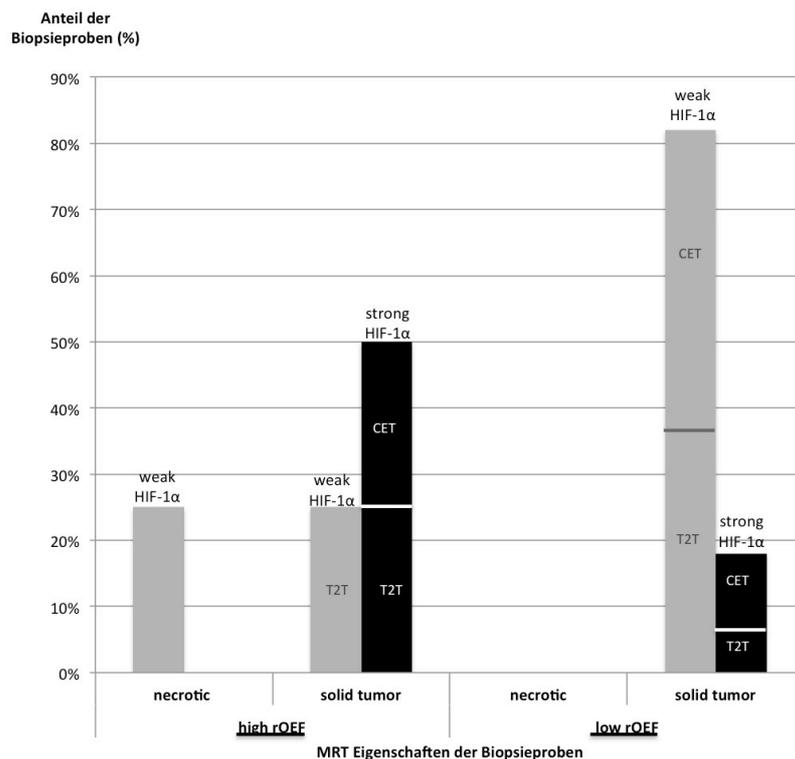


Abbildung 19 Illustration der Ergebnisse der Korrelation der HIF1 α Färbung der Biopsieproben mit den MRT-Eigenschaften der Biopsieziele.

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die hypoxischen Tumornischen in Gliomen nicht-invasiv kernspintomographisch darzustellen, wobei eine neu entwickelte MRT-Methode erstmalig klinisch angewendet wurde. Die ersten Ergebnisse dieser Pilotstudie sind vielversprechend. Eine sorgfältige Betrachtung der möglichen Fehlerquellen und Limitationen sowie der Ausblick in die vorhandene Literatur ist unerlässlich für die Interpretation der Ergebnisse. In diesem Absatz werden die Limitationen der Methode diskutiert.

6.1 Artefiziell erhöhte rOEF Werte

Die angewendete Methode beruht auf dem BOLD Effekt und liefert Informationen über den vaskulären Oxygenierungsstatus, ein mögliches Korrelat der Gewebhypoxie. Im Sinne der Berechnungsweise ergeben sich hohe rOEF Werte durch niedrige CBV oder hohe R2' Werte. In Arealen mit hoher Sauerstoffextraktion, d.h. mit hohem Anteil von deoxygeniertem Hämoglobin entstehen in den intakten venösen Gefäßen mikroskopische Suszeptibilitätsstörungen - entsprechend muss eine „reale“, durch venöse Deoxygenierung verursachte R2' Erhöhung mit einem entsprechenden hohen venösen Blutvolumen gekoppelt sein. Dieses Model gilt jedoch nicht in Liquorräumen und in Bereichen mit Nekrose, Einblutung, bei vermehrten Eisenablagerungen oder makroskopischen Suszeptibilitätsgradienten anderer Ursache. In diesen Bereichen sind die erhöhten rOEF Werte entweder durch die fehlende Durchblutung ($CBV \approx 0$) oder durch erhöhte R2' Werte, verursacht durch nicht-vaskulären Suszeptibilitätsgradienten. Diese Fehlerquellen erschweren es die artefiziell hyperintensiven rOEF Areale von Arealen mit realer rOEF Erhöhung zu unterscheiden. Eine „harte“ Maskierung der rOEF Karten kann behilflich sein, insbesondere gilt dies für die Liquorräume und Areale mit makroskopischen Suszeptibilitätsartefakten. Areale mit Eisenablagerungen (Stammganglien etc.) und Einblutungen können jedoch nicht auf diese einfache Weise maskiert werden.

Diese Erkenntnisse begründen die Unerlässlichkeit der parallelen Betrachtung mehrerer MRT-Sequenzen (post-Kontrast-T1, T2* und CBV Karten).

6.2 Probleme der quantitativen T2 Messung

Die rOEF Werte in unserer Arbeit sind mit 0.64 ± 0.23 (GM) und 0.91 ± 0.22 (WM) deutlich höher als die Werte in der Literatur. In PET- und MRT-Studien wurden Werte zwischen 0.3-0.5 beschrieben bei gesunden Probanden (Raichle *et al.*, 2001). Die quantitativen T2, T2* und CBV Werte im gesunden Hirnparenchym lagen jedoch im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte (Lu *et al.*, 2005; Baudrexel *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 2009; Sourbron *et al.*, 2009; Christen *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Die meisten MRT-Studien, die sich mit der Gewebshypoxie und quantitativen Messungen beschäftigt haben, basieren auf der simultanen Messung von deoxygeniertem Blutvolumen und der transversalen Relaxation mittels Gradientenecho Sampling mit Spin Echo Technik oder GESSE (Kennan *et al.*, 1994; An und Lin, 2000; He und Yablonskiy, 2007; Yablonskiy *et al.*, 2012), so dass methodologisch bedingt ein exakter Vergleich nicht möglich ist. Kürzlich haben Christen und Zaharchuk (Christen *et al.*, 2011) ähnlich zu unserem Ansatz über unabhängige Messungen von T2, T2* und CBV bei gesunden Probanden berichtet; sie fanden mit ihrer MRT-Methode eine Sauerstoffsättigung von 60 % im gesunden Hirnparenchym - entsprechend einem rOEF von ca. 0.4. Ihre T2* Werte mit 53 ± 2 ms und ihre CBV Werte mit 4.1 ± 0.6 % entsprechen unseren Ergebnissen. Allerdings sind ihre quantitativen T2 Werte (Gesamthirn) mit 69 ± 1 ms erheblich niedriger als die in unserer Studie gemessenen Werte (96.6 ± 10.5 in GM und 80.4 ± 4.7 in WM). Demnach können unsere hohen rOEF Werte vor allem durch die systematisch höheren T2 Werte erklärt werden, die sich mit der schnellen multi-Echo GRASE Methode ergaben. Um diese Frage genauer zu untersuchen, haben wir in einer Kontrollstudie bei gesunden Probanden zusätzliche T2 Messungen mit multiplen Single Spin Echo Methode durchgeführt; diese resultierten in deutlich niedrigeren T2 Werten mit 73.5 ± 2.4 ms in GM und 68.2 ± 2.2 ms in WM. Diese Methode ist jedoch mit einer Messzeit von 16:40 Minuten im klinischen Umfeld nicht praktikabel. Allerdings liegt das Problem bei der T2-Messung nicht nur an

systemischen Fehlern, sondern auch an einigen zu vereinfachten Modellannahmen. Die Probleme der quantitativen T2 Messungen werden weiterhin von mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet (Yablonskiy *et al.*, 2012).

6.3 Probleme der Perfusionsmessung

Eine weitere Herausforderung ist die absolute Quantifikation des CBV. Die Entscheidung, in unserer Arbeit die DSC Methode (Østergaard, 2004) anzuwenden, wurde in Hinsicht auf die methodische Robustheit getroffen, indem das Integral der gemessenen $\Delta R2^*(t)$ ein stabiles Korrelat der CBV ist (Buxton, 2009). Eine absolute Quantifikation ist in der klinischen Anwendung schwierig (Landis *et al.*, 2000; Kjølby *et al.*, 2006), wenn nicht sogar unmöglich, sodass die Werte wie gewöhnlich im Vergleich zum gesunden Gewebe normiert werden (Covarrubias *et al.*, 2004). Mit dieser Methode ergaben sich in unserer Studie valide Werte in Arealen mit erhaltener Blut-Hirn-Schranke, im Bereich der aus der Literatur bekannten Werten (Lu *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2009; Sourbron *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Im schrankengestörten Gewebe mit Kontrastmittelaustritt aus den pathologischen Gefäßen werden die CBV Werte jedoch mit dieser Methode eher unterschätzt (Quarles *et al.*, 2009; Tate und Aghi, 2009), mit einer konsekutiven Überschätzung der rOEF im schrankengestörten Tumorareal. Diese Fehlerquelle haben wir mit dem Vergleich der DSC- und der DCE-Methode untersucht. Die ermittelten niedrigeren CBV_{DSC} -Werte im schrankengestörten Tumor sind passend zu der Annahme, dass die DSC Methode im Bereich des Kontrastmittelaustrittes das CBV unterschätzt. Es gab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Durchschnitts-rOEF Werten zwischen den Methoden in den Tumor-VOIs, insbesondere nicht im schrankengestörten Tumor. Die DCE Methode hat jedoch eine niedrigere SNR, was zu einer deutlichen Qualitätsminderung bis zur Nicht-Auswertbarkeit der rOEF-Karten führte. Zusammenfassend stellte sich die DSC Methode als solider und robuster dar.

6.4 rOEF in grauer und weißer Substanz

Unsere Messungen ergaben höhere rOEF Werte in WM als in GM, wobei vorliegende PET Studien homogene rOEF Werte im gesamten Hirnparenchym beschreiben (Raichle *et al.*, 2001). Andererseits sind die Karten der Sauerstoffsättigung von Christen und Zaharchuk ähnlich in Bezug auf den Unterschied zwischen grauer und weißer Substanz (Christen *et al.*, 2011). Der Hintergrund dieser Besonderheit ist wahrscheinlich die – sehr diskrete und erst vor kurzem genauer untersuchte - Abhängigkeit der T2* Werte von dem Faserverlauf in der weißen Substanz (Lange *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2006; Bender and Klose, 2010; Denk *et al.*, 2011). Dies ist möglicherweise durch den variierenden Myelinverhalt und dessen Struktur (Duyn *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008) sowie durch die Orientierung der Fasern und der kleinsten Gefäßen im Verhältnis zum Magnetfeld (-*et al.*, 2004) bedingt. Es ist gut vorstellbar, dass der Verlauf der Gefäße in grauer Substanz und im Tumorgewebe dem Modell der ungeordneten Gefäßorientierung besser entspricht, was letztendlich zu einem Unterschied der rOEF Werte zwischen GM und WM führt.

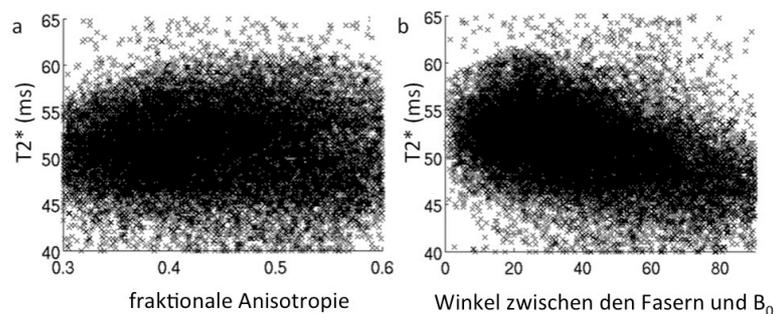


Abbildung 20 Abhängigkeit der gemessenen T2* Werte (a) von der fraktionalen Anisotropie und (b) von dem Winkel zwischen den Fasern und dem Hauptmagnetfeld B₀. Daten der Korrelationsstudie mit SE-EPI DTI (32 Gradientenausrichtungen, TE = 47 ms, TR = 14.3 s, Auflösung 2 x 2 x 3 mm³, Matrix 112 x 112 x 60) in 4 gesunden Probanden (3 Männer, 1 Frau, mittleres Alter 30.3 ± 6.6 years). (Abbildung aus Lange *et al.*, 2012)

6.5 VOI Definition im Tumorgewebe

Ein weiterer Diskussionspunkt bei der Betrachtung unserer Ergebnisse ist die Definition unserer VOIs. Diese wurden anhand einer vorliegenden Arbeit einer Frankfurter Arbeitsgruppe (Hattingen *et al.*, 2011) konzipiert, die die Wirkung des Angiogenesehemmers Bevacizumab untersucht hat. Schrankenstörung (CET), nicht-

anreichernder Tumor (T2T) und perifokales Ödem sind typische Merkmale der hirneigenen Tumoren, die bei der klinischen Befundung berücksichtigt werden. Deren optische Abgrenzung kann nur annähernd bestimmt werden, daher sind diese VOIs auch nicht immer komplementär. Das VOI „T2T“ könnte zum Teil Tumoranteile mit Schrankenstörung beinhalten und das VOI „Edema“ könnte Anteile des nicht-anreichernden Tumors einschließen. Trotz dieser Ungenauigkeiten haben wir diesen Ansatz gewählt, um dem klinischen Alltag nahe zu bleiben und die gewöhnliche Befundung zu simulieren. Als Kontroll-Auswertung haben wir die VOIs „T2T“ und „Edema“ in sieben GBM-Patienten mit modifizierten VOIs verglichen, in welchen wir die CET VOIs zusätzlich subtrahieren ($T2T_{neu}=T2T-CET$ und $Edema_{neu}=Edema-CET$). In dieser Analyse fanden wir keine signifikanten Unterschiede zwischen der ursprünglichen und der modifizierten Methode.

	T2	T2*	R2'	CBV _{DSC}	CBV _{DCE}	rOEF _{DSC}	rOEF _{DCE}
T2T	129.1 (±24.4)	78.0 (±11.6)	5.7 (±1.1)	4.0 (±1.1)	3.7 (±0.8)	0.51 (±0.15)	0.64 (±0.15)
T2T-CET	130.6 (±24.0)	77.1 (±12.7)	5.7 (±1.1)	3.8 (±1.1)	3.7 (±0.8)	0.54 (±0.17)	0.64 (±0.16)
p	0.9096	0.8922	1.0000	0.7396	1.0000	0.7323	1.0000
Edema	164.7 (±13.3)	103.0 (±10.5)	4.2 (±0.8)	2.0 (±1.0)	2.2 (±0.7)	0.72 (±0.16)	0.73 (±0.12)
Edema-CET	153.0 (±15.1)	94.3 (±11.8)	4.7 (±1.3)	2.0 (±0.8)	2.3 (±0.5)	0.77 (±0.16)	0.74 (±0.15)
p	0.1499	0.4573	0.4031	1.0000	0.7637	0.5696	0.8927

Tabelle 10: Vergleich der herkömmlichen VOI-Definition („T2T“ und „Edema“) und einer Analyse mit zusätzlicher Subtraktion der schrankengestörten Areale (T2T-CET und Ödem-CET) (7 Patienten mit Glioblastom). Die statistische Analyse (Student t-Test, $p < 0.1 / 0.05$) ergab keine signifikanten Unterschiede.

6.6 rOEF im Tumorgewebe

Das Tumorgewebe zeigte durchschnittlich niedrigere rOEF-Werte als das gesunde Hirnparenchym (GM und WM), mit fokalen rOEF-Erhöhungen. Diese fanden sich zum Teil in der zentralen Tumornekrose (vor allem artefiziell, durch Einblutungen und T2* Artefakte oder durch eine fehlende Durchblutung) aber auch im soliden

Tumorgewebe (CET und T2T). Die insgesamt niedrigen intratumoralen rOEF-Werte – in „CET“ etwas niedriger als in „T2T“ (0.54 bzw. 0.64 bei GBM [p=0.41]; 0.33 bzw. 0.52 [p=0.1] bei °III Tumoren) – entstehen am ehesten durch das erhöhte Tumor-CBV ohne Erhöhung der R2'-Werte, als Korrelat einer guten vaskulären Sauerstoffversorgung im perfundierten Tumorgewebe. Diese Ergebnisse sind mit dem geschilderten Modell des vaskularisierten Tumors mit einzelnen hypoxischen Tumornischen gut vereinbar. Fokale rOEF-Erhöhen wurden sowohl im schrankengestörten als auch im nicht-anreichernden Tumor gefunden - passend zu dem theoretischen Modell der hypoxischen Nischen, die sowohl im perivaskulären als auch distal der Tumorgefäße auffindbar seien (Heddleston *et al.*, 2009). Insgesamt sind diese Ergebnisse mit den theoretischen Modellen sehr gut vereinbar und reflektieren die pathophysiologische Heterogenität der hirneigenen Tumoren.

Eine deutliche Limitation der Arbeit ist die begrenzte Anzahl der niedriggradigen Gliomen als Folge der begrenzten Studiendauer und Patientenzahl. Nur Fälle mit bekannter histologischer Diagnose wurden in die Auswertung eingeschlossen, um eine pathophysiologische Verwirrung zu vermeiden. Das Primärziel der Studie war der Nachweis der Durchführbarkeit und die Charakterisierung der rOEF-Karten in hirneigenen Tumoren und nicht ein definitives Tumorigradung anhand der Methode. Trotz der unausgeglichenen Verteilung entsprechen unsere Ergebnisse dem theoretischen Modell, in dem Hypoxie als ein Marker der Malignität bezeichnet wird.

6.7 Korrelation mit der HIF-1 α Immunohistochemie

Die Validierung der MRT-rOEF-Messmethode mittels HIF-1 α Immunohistochemie ist ein vorläufiger Versuch. Die begrenzte Anzahl und die unausgeglichene Verteilung der Biopsieproben sowie der Mangel an niedriggradigen Tumorproben und Kontrolluntersuchungen limitiert die Aussagekraft dieser Ergebnisse. Trotz der genannten Einschränkungen ist die Spezifität der MRT-Methode für die Detektierung von hypoxischen Tumornischen mit starker HIF-1 α Expression akzeptabel. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanzen zwischen den rOEF Eigenschaften und der Histopathologie ist der theoretische Hintergrund der MRT-Methode. Anhand des

Modells wird hier ein Korrelat der vaskulären Hypoxie gemessen, wohingegen die Expression von HIF-1 α ein Korrelat der intrazellulären Hypoxie ist. Darüber hinaus ist HIF-1 α ein eher unspezifischer histopathologischer Marker der Gewebhypoxie, trotz weiter Verbreitung und Akzeptanz. Letztere waren die Gründe, warum die HIF-1 α Immunohistochemie in unserer Pilotstudie eingeschlossen wurde. Für die Erweiterung der Studie wird eine Anwendung der neueren und objektiver auswertbaren Carboanhydrase-Färbung (Carbonic Anhydrase IX, CAIX) und GLUT1 angestrebt. Es gibt allerdings bis dato keine etablierte, allgemein akzeptierte histopathologische Methode zur Darstellung der Gewebhypoxie. In der Anschlussstudie an diese Arbeit wird angestrebt, diese MRT-Methode in Gliomen mittels [18F]-MISO-PET Bildgebung und der oben beschriebenen immunohistochemischen Markern zu validieren.

6.8 Schlussfolgerung

Maligne Tumoren weisen hypoxische Tumornischen mit hoch-proliferativen Tumorzellen auf, die für die Malignität, die Therapieresistenz und Rezidive verantwortlich gehalten werden. Die präoperative nicht-invasive Darstellung dieser hypoxischen Tumorareale hätte eine große prognostische und therapeutische Relevanz. Die Entwicklung einer neuen MRT-Methode – basierend auf der Messung der Sauerstoffextraktionsfraktion (rOEF) als möglicher Marker für Gewebhypoxie - hat sich in präklinischen Studien als erfolgsversprechend erwiesen. Ziel dieser Pilotstudie war es, erste klinische Erfahrungen bei Patienten mit Hirntumoren durch diese Methode zu sammeln. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen die Durchführbarkeit der Methode und entsprechen den theoretischen Modellen der Tumorphypoxie. Ein vorläufiger Vergleich mit der HIF-1 α Immunohistochemie ergab entsprechende Ergebnisse. In weiteren Studien muss die Methodik – insbesondere was die Genauigkeit der Perfusionsmessung in Tumoren als auch was die histopathologische Validierung der Tumorphypoxie angeht – weiter optimiert werden.

7 Zusammenfassung

Die Therapie der malignen Gliome stellt eine große Herausforderung dar – trotz Resektion und postoperativer Radio-Chemotherapie ist die durchschnittliche Überlebenszeit kurz und die Rezidivrate hoch; eine kurative Therapie ist nicht bekannt. Die präoperative Darstellung der Raumforderung soll die Therapieplanung unterstützen; hierfür ist es von besonderem Interesse, die „böartigsten“ Tumorareale – die sog. Hot spots – bildgebend darzustellen.

Anhand molekularbiologischer Studien ist bekannt, dass ein Sauerstoffmangel im Hirnparenchym Einfluss auf die Entwicklung der neuronalen Vorläuferzellen hat. In Tumoren korreliert die hypoxische Mikroumgebung mit der Malignität und Therapieresistenz. (Harrison *et al.*, 2002; Krohn *et al.*, 2008) In Hirntumoren konnten fokale hypoxische Nischen mit besonders malignen, sehr proliferationsstarken Tumorzellen nachgewiesen werden. Die lokale Hypoxie spielt eine vermutlich wesentliche Rolle in der Erzeugung und Erhaltung dieser malignen Tumornischen.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, diese hypoxischen Tumornischen in Gliomen nicht-invasiv kernspintomographisch durch die erstmalige klinische Anwendung einer neu entwickelten MRT-Methode darzustellen. Diese, von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode beruht auf dem BOLD-Effekt. Sie ermöglicht auf der Grundlage einer unabhängigen Messung von R_2' und CBV und anhand eines theoretischen Modells eine Berechnung der Sauerstoffextraktionsfraktion (rOEF), als Korrelat der Gewebhypoxie betrachtet.

Anhand präklinischer Daten war unsere Hypothese, mit Hilfe dieser MRT-Methode hypoxische Tumorareale mit erhöhter rOEF, insbesondere in höhergradigen hirneigenen Tumoren darstellen zu können. Hierzu haben wir in unserer Pilotstudie 58 Patienten mit Hirntumoren untersucht und nach Vorliegen der histologischen Diagnose 34 in die spätere Analyse eingeschlossen. Nach einer qualitativen Auswertung der MRT-Methode wurde ein Vergleich der hypoxischen Tumoranteile zwischen unterschiedlichen Gliomen und unterschiedlichen Tumorarealen durchgeführt. Zusätzlich wurde in 25 Biopsieproben die MRT-Methode mit der immunohistochemischen Färbung von HIF-1 α verglichen.

Diese erste klinische Erfahrung mit einer neuen MRT-Methode zur Darstellung der vaskulären Deoxygenierung ergab wesentliche Ergebnisse. Die MRT-Messung ließ sich im klinischen Umfeld gut durchführen, sogar bei einem schwer kranken Patientenkollektiv. Vertretbare Messzeiten und diagnostisch verwertbare Bildqualität sprechen für eine klinische Anwendbarkeit. Die Qualität der ermittelten rOEF-Karten wurden durchschnittlich als „befriedigend“ bewertet. In der Auswertung ist eine parallele Analyse der rOEF-Karten mit den post-Kontrast-T1, T2* und CBV Karten unerlässlich. Der Anteil hypoxischer Tumorareale korrelierte mit dem Tumorgrad. Sowohl schrankengestörte als auch nicht-anreichernde Tumorareale wiesen fokale rOEF-Erhöhungen – im Sinne von hypoxischen Nischen – auf. Erste histopathologische Ergebnisse mit der HIF-1 α Färbung konnten mit den MRT-abgeleiteten rOEF Werten korreliert werden. Einschränkungen bestehen derzeit bezüglich der Validität des physikalischen Modells, der Genauigkeit der Perfusionsmessung sowie der histopathologischen Beurteilung der Tumorhypoxie.

8 Literatur

- An, H., Lin, W. Quantitative measurements of cerebral blood oxygen saturation using magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20 (2000) 1225-36
- Bar, E. E. Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain Pathol.* 21 (2011) 119-29
- Baudrexel, S., Volz, S., Preibisch, C., Klein, J.C., Steinmetz, H., Hilker, R., Deichmann, R. Rapid single-scan T2*-mapping using exponential excitation pulses and image-based correction for linear background gradients. *Magn Reson Med.* 62 (2009) 263-8
- Bender, B., Klose, U. The in vivo influence of white matter fiber orientation towards B(0) on T2* in the human brain. *NMR Biomed.* 23 (2010) 1071-6
- Bergers, G., Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 8 (2008) 592-603
- Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M.C., Rafii, S., Pandolfi, P.P. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature.* 442 (2006) 779-85
- Binello, E., Germano, I. M. Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors. *Cancer Sci.* 102 (2011) 1958-66
- Bloch, F. The Principle of Nuclear Induction. *Science.* 118 (1953) 425-30
- Blockley, N.P., Griffeth, V.E., Simon, A.B., Buxton, R.B. A review of calibrated blood oxygenation level-dependent (BOLD) methods for the measurement of task-induced changes in brain oxygen metabolism. *NMR Biomed.* 26 (2013) 987-1003
- Buxton, R.B. Introduction to functional magnetic resonance imaging: Principles and techniques. Cambridge University Press, Cambridge 2009.
- Chappell, K.E., Robson, M.D., Stonebridge-Foster, A., Glover, A., Allsop, J.M., Williams, A.D., Herlihy, A.H., Moss, J., Gishen, P., Bydder, G.M. Magic angle effects in MR neurography. *AJNR Am J Neuroradiol.* 25 (2004) 431-40
- Christen, T., Schmiedeskamp, H., Straka, M., Bammer, R., Zaharchuk, G. Measuring brain oxygenation in humans using a multiparametric quantitative blood oxygenation level dependent MRI approach. *Magn Reson Med.* 68 (2011) 905-11
- Covarrubias, D. J., Rosen, B. R., Lev, M. H. Dynamic magnetic resonance perfusion imaging of brain tumors. *Oncologist.* 9 (2004) 528-37

Denk, C., Hernandez Torres, E., MacKay, A., Rauscher A. The influence of white matter fibre orientation on MR signal phase and decay. *NMR Biomed.* 24 (2011) 246-52

Deutsche Hirntumorhilfe. (2013) Hirntumoren in Deutschland. (<http://www.hirntumorhilfe.de/hirntumor/statistiken/zahlen-deutschland/>) Stand: 1.5.2014

Duyn, J.H., van Gelderen, P., Li, T.Q., de Zwart, J.A., Koretsky, A.P., Fukunaga, M. High-field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 (2007) 11796-801

Eckerich, C., Zapf, S., Fillbrandt, R., Loges, S., Westphal, M., Lamszus K. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer.* 121 (2007) 276-83

Essig, M., Anzalone, N., Combs, S.E., Dörfler, A., Lee, S.K., Picozzi, P., Rovira, A., Weller, M., Law, M. MR imaging of neoplastic central nervous system lesions: review and recommendations for current practice. *AJNR Am J Neuroradiol,* 33 (2012) 803-17

Gempt, J., Buchmann, N., Ryang, Y.M., Krieg, S., Kreutzer, J., Meyer, B., Ringel, F. Frameless image-guided stereotaxy with real-time visual feedback for brain biopsy. *Acta Neurochir (Wien).* 154 (2012) 1663-7

Gilberston, R. J., Rich, J. N. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer.* 7 (2007) 733-6

Gillespie, D.L., Flynn, J.R., Ragel, B.T., Arce-Larreta, M., Kelly, D.A., Tripp, S.R., Jensen, R.L. Silencing of HIF-1alpha by RNA interference in human glioma cells in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol.* 487 (2009) 283-301

Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., Bondesson, M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* 9 (2005) 617-28

Harrison, L.B., Chadha, M., Hill, R.J., Hu, K., Shasha, D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* 7 (2002) 492-508

Hattingen, E., Jurcoane, A., Bähr, O., Rieger, J., Magerkurth, J., Anti, S., Steinbach, J.P., Pilatus, U. Bevacizumab impairs oxidative energy metabolism and shows antitumoral effects in recurrent glioblastomas: a 31P/1H MRSI and quantitative magnetic resonance imaging study. *Neuro Oncol.* 13 (2011) 1349-63

He, X., Yablonskiy, D. A. Quantitative BOLD: mapping of human cerebral deoxygenated blood volume and oxygen extraction fraction: default state. *Magn Reson Med.* 57 (2007) 115-26

Heddleston, J.M., Hitomi, M., Venere, M., Flavahan, W.A., Yang, K., Kim, Y., Minhas, S., Rich, J.N., Hjelmeland, A.B. Glioma stem cell maintenance: the role of the microenvironment. *Curr Pharm Des.* 17 (2011) 2386-401

Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle.* 15 (2009) 3274-84

Helenius, J., Perkiö, J., Soinnie, L., Østergaard, L., Carano, R.A., Salonen, O., Savolainen, S., Kaste, M., Aronen, H.J., Tatlisumak, T. Cerebral hemodynamics in a healthy population measured by dynamic susceptibility contrast MR imaging. *Acta Radiol.* 44 (2003) 538-46

Hirsch, N. M., Preibisch, C. T2* mapping with background gradient correction using different excitation pulse shapes. *AJNR Am J Neuroradiol.* 34 (2013). E65-8

Hoeffner, E.G., Mukherji, S.K., Srinivasan, A., Quint, D.J. Neuroradiology back to the future: brain imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 33 (2012) 5-11

Hoge, R. D., Pike, G. B. Oxidative metabolism and the detection of neuronal activation via imaging. *J Chem Neuroanat.* 22 (2001) 43-52

Holst, B., Siemonsen, S., Finsterbusch, J., Bester, M., Schippling, S., Martin, R., Fiehler, J. T2' imaging indicates decreased tissue metabolism in frontal white matter of MS patients. *Mult Scler.* 15 (2009) 701-7

Jain, V., Abdulmalik, O., Propert, K.J., Wehrli, F.W. Investigating the magnetic susceptibility properties of fresh human blood for noninvasive oxygen saturation quantification. *Magn Reson Med.* 68 (2012) 863-7

Jamal, M., Rath, B.H., Tsang, P.S., Camphausen, K., Tofilon, P.J. The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia.* 14 (2012) 150-8

Jensen, R. L. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol.* 92 (2009) 317-35

Kennan, R. P., Zhong, J., Gore, J. C. Intravascular susceptibility contrast mechanisms in tissues. *Magn Reson Med.* 31 (1994) 9-21

Kjølby, B. F., Østergaard, L., Kiselev, V. G. Theoretical model of intravascular paramagnetic tracers effect on tissue relaxation. *Magn Reson Med.* 56 (2006) 187-97

Krohn, K. A., Link, J. M., Mason, R. P. Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med.* 49 (2008) 129S-48S

- Kumar, R., Delshad, S., Woo, M.A., Macey, P.M., Harper, R.M. Age-related regional brain T2-relaxation changes in healthy adults. *J Magn Reson Imaging*. 35 (2011) 300-8
- Kwong, K. K. Record of a single fMRI experiment in May of 1991. *Neuroimage*. 62 (2012) 610-2
- Kwong, K.K., Belliveau, J.W., Chesler, D.A., Goldberg, I.E., Weisskoff, R.M., Poncelet, B.P., Kennedy, D.N., Hoppel, B.E., Cohen, M.S., Turner, R. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89 (1992) 5675-9
- Landis, C.S., Li, X., Telang, F.W., Coderre, J.A., Micca, P.L., Rooney, W.D., Latour, L.L., Véték, G., Pályka, I., Springer, C.S. Jr. Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: effect of equilibrium transcytolemmal water exchange. *Magn Reson Med*. 44 (2000) 563-74
- Lange, I., Hirsch, N.M., Shao, J. Effect of white matter fiber orientation and fractional anisotropy on T2* in human brain. *Magn Reson Mater Phys*. 25 (2012) S88
- Larsson, H.B., Courivaud, F., Rostrup, E., Hansen, A.E. Measurement of brain perfusion, blood volume, and blood-brain barrier permeability, using dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI at 3 tesla. *Magn Reson Med*. 62 (2009) 1270-81
- Li, K.L., Buonaccorsi, G., Thompson, G., Cain, J.R., Watkins, A., Russell, D., Qureshi, S., Evans, D.G., Lloyd, S.K., Zhu, X., Jackson, A. An improved coverage and spatial resolution--using dual injection dynamic contrast-enhanced (ICE-DICE) MRI: a novel dynamic contrast-enhanced technique for cerebral tumors. *Magn Reson Med*. 68 (2012) 452-62
- Li, T.Q., van Gelderen, P., Merkle, H., Talagala, L., Koretsky, A.P., Duyn, J. Extensive heterogeneity in white matter intensity in high-resolution T2*-weighted MRI of the human brain at 7.0 T. *Neuroimage*. 32 (2006) 1032-40
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D. Cavenee, W.K., Burger P.C., Jouvét, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 114 (2007) 97–109
- Lu, H., Law, M., Johnson, G., Ge, Y., van Zijl, P.C., Helpert, J.A. Novel approach to the measurement of absolute cerebral blood volume using vascular-space-occupancy magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 54 (2005) 1403-11
- Lutz, K., Radbruch, A., Wiestler, B., Bäumer, P., Wick, W., Bendszus, M. Neuroradiological response criteria for high-grade gliomas. *Clin Neuroradiol*. 21 (2011) 199-205

Magerkurth, J., Volz, S., Wagner, M., Jurcoane, A., Anti, S., Seiler, A., Hattingen, E., Deichmann, R. Quantitative T*2-mapping based on multi-slice multiple gradient echo flash imaging: retrospective correction for subject motion effects. *Magn Reson Med.* 66 (2011) 989-97

McMillan, K.M., Rogers, B.P., Field, A.S., Laird, A.R., Fine, J.P., Meyerand, M.E. Physiologic characterisation of glioblastoma multiforme using MRI-based hypoxia mapping, chemical shift imaging, perfusion and diffusion maps. *J Clin Neurosci.* 13 (2006) 811-7

Ogawa, S., Lee, T.M., Kay, A.R., Tank, D.W. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87 (1990) 9868-72

Osborn, A.G., Salzman, K.L., Thurnher, M.M., Rees, J.H., Castillo, M. The new World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: what can the neuroradiologist really say? *AJNR Am J Neuroradiol.* 33 (2012) 795-80

Patlak, C. S., Blasberg, R. G. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. Generalizations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 5 (1985) 584-90

Piccirillo, S.G., Combi, R., Cajola, L., Patrizi, A., Redaelli, S., Bentivegna, A., Baronchelli, S., Maira, G., Pollo, B., Mangiola, A., DiMeco, F., Dalprà, L., Vescovi, A.L. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene.* 28 (2009) 1807-11

Pistollato, F., Chen, H.L., Schwartz, P.H., Basso, G., Panchision, D.M. Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 35 (2007) 424-35

Prabhakaran, V., Nair, V.A., Austin, B.P., La, C., Gallagher, T.A., Wu, Y., McLaren, D.G., Xu, G., Turski, P., Rowley, H. Current status and future perspectives of magnetic resonance high-field imaging: a summary. *Neuroimaging Clin N Am,* 22 (2012) 373-97

Quarles, C.C., Gochberg, D.F., Gore, J.C., Yankeelov, T.E. A theoretical framework to model DSC-MRI data acquired in the presence of contrast agent extravasation. *Phys Med Biol.* 54 (2009) 5749-66

Raichle, M.E., MacLeod, A.M., Snyder, A.Z., Powers, W.J., Gusnard, D.A., Shulman, G.L. A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98 (2001) 676-82

Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J., Fariñas, I. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci.* 9 (2006) 331-9

Remmele, W., Hildebrand, U., Hienz, H.A., Klein, P.J., Vierbuchen, M., Behnken, L.J., Heicke, B., Scheidt, E. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 409 (1986) 127-47

Rodríguez-Jiménez, F.J., Moreno-Manzano, V., Lucas-Dominguez, R., Sánchez-Puelles, J.M. Hypoxia causes downregulation of mismatch repair system and genomic instability in stem cells. *Stem Cells.* 26 (2008) 2052-62

Sathornsumetee, S., Cao, Y., Marcello, J.E., Herndon, J.E. 2nd, McLendon, R.E., Desjardins, A., Friedman, H.S., Dewhirst, M.W., Vredenburgh, J.J., Rich, J.N. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *J Clin Oncol.* 26 (2008) 271-8

Schwartz, D.L., Bankson, J., Bidaut, L., He, Y., Williams, R., Lemos, R., Thitai, A.K., Oh, J., Volgin, A., Soghomonyan, S., Yeh, H.H., Nishii, R., Mukhopadhyay, U., Alauddin, M., Mushkudiani, I., Kuno, N., Krishnan, S., Bornman, W., Lai, S.Y., Powis, G., Hazle, J., Gelovani, J. HIF-1-dependent stromal adaptation to ischemia mediates in vivo tumor radiation resistance. *Mol Cancer Res.* 9 (2011) 259-70

Seftor, R.E., Hess, A.R., Seftor, E.A., Kirschmann, D.A., Hardy, K.M., Margaryan, N.V., Hendrix, M.J. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol.* 181 (2012) 1115-25

Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condron, C.M., Toomey, D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev.* 29 (2003) 297-307

Sheehan, J.P., Shaffrey, M.E., Gupta, B., Larner, J., Rich, J.N., Park, D.M. Improving the radiosensitivity of radioresistant and hypoxic glioblastoma. *Future Oncol.* 6 (2010) 1591-601

Siemonsen, S., Finsterbusch, J., Matschke, J., Lorenzen, A., Ding, X.Q., Fiehler, J. Age-dependent normal values of T2* and T2' in brain parenchyma. *AJNR Am J Neuroradiol.* 29 (2008) 950-5

Siemonsen, S., Fitting, T., Thomalla, G., Horn, P., Finsterbusch, J., Summers, P., Saager, C., Kucinski, T., Fiehler, J. T2' imaging predicts infarct growth beyond the acute diffusion-weighted imaging lesion in acute stroke. *Radiology.* 248 (2008) 979-86

Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., Dirks, P.B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 23 (2004) 7267-73

- Sneddon, J. B., Werb, Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 1 (2007) 607-11
- Sourbron, S., Ingrisich, M., Siefert, A., Reiser, M., Herrmann, K. Quantification of cerebral blood flow, cerebral blood volume, and blood-brain-barrier leakage with DCE-MRI. *Magn Reson Med*. 62 (2009) 205-17
- Tafani, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E., Santoro, A., Raco, A., Salvati, M., De Maria, R., Russo, M.A. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J Neuroinflammation*. 8 (2011) 32-48
- Tate, M. C., Aghi, M. K. Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics*. 6 (2009) 447-57
- Taylor, J. S., Reddick, W. E. Evolution from empirical dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging to pharmacokinetic MRI. *Adv Drug Deliv Rev*. 41 (2000) 91-110
- Taylor, L. P. Diagnosis, treatment, and prognosis of glioma: five new things. *Neurology*, 75 (2010) S28-32
- Tofts, P. S. Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging. *J Magn Reson Imaging*. 7 (1997) 91-101
- Tóth, V., Förschler, A., Hirsch, N.M., den Hollander, J., Kooijman, H., Gempt, J., Ringel, F., Schlegel, J., Zimmer, C., Preibisch, C. MR-based hypoxia measures in human glioma. *J Neurooncol*. 115 (2013) 197-207
- Upadhyay, N., Waldman, A. D. Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol*. 84 (2011) S107-11
- Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*. 9 (2004) S10-7
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92 (1995) 5510-4
- Yablonskiy, D. A., Haacke, E. M. Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. *Magn Reson Med*. 32 (1994) 749-63
- Yablonskiy, D. A., Sukstanskii, A. L., He, X. Blood oxygenation level-dependent (BOLD)-based techniques for the quantification of brain hemodynamic and metabolic properties - theoretical models and experimental approaches. *NMR Biomed* 26 (2013) 963-86

Zhang, Y., Wang, J., Wang, X., Zhang, J., Fang, J., Jiang, X. Feasibility study of exploring a T₁-weighted dynamic contrast-enhanced MR approach for brain perfusion imaging. *J Magn Reson Imaging*. 35 (2012) 1322-31

Zhong, K., Leupold, J., von Elverfeldt, D., Speck, O. The molecular basis for gray and white matter contrast in phase imaging. *Neuroimage*. 40 (2008) 1561-6

Zimmer, C., Traupe, H., Hamm, B. [The revised WHO classification of brain tumors. Radiological aspects of 4 new tumor entities]. *Rofo*. 166 (1997) 522-7

Østergaard, L. Cerebral perfusion imaging by bolus tracking. *Top Magn Reson Imaging*. 15 (2004) 3-9

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 (Seite 7) – eigenes Bildmaterial

Abbildung 2 (Seite 11) - mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. C. Delbridge, Abteilung für Neuropathologie, Klinikum Rechts der Isar der TU München

Abbildung 3 (Seite 11) eigenes Bildmaterial

Abbildung 4 (Seite 12) eigenes Bildmaterial

Abbildung 5 (Seite 14) eigenes Bildmaterial

Abbildung 6 (Seite 17) mit Änderungen übernommen von Buxton, R.B. Introduction to functional magnetic resonance imaging: Principles and techniques. Cambridge University Press, Cambridge 2009.

Abbildung 7 (Seite 19) mit Änderungen übernommen von Buxton, R.B. Introduction to functional magnetic resonance imaging: Principles and techniques. Cambridge University Press, Cambridge 2009.

Abbildung 8 (Seite 20) mit Änderungen übernommen von Buxton, R.B. Introduction to functional magnetic resonance imaging: Principles and techniques. Cambridge University Press, Cambridge 2009.

Abbildung 9 (Seite 21) mit Änderungen übernommen von Buxton, R.B. Introduction to functional magnetic resonance imaging: Principles and techniques. Cambridge University Press, Cambridge 2009.

Abbildung 10 (Seite 25) mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. C. Preibisch, Abteilung für Neuroradiologie, Klinikum Rechts der Isar der TU München

Abbildung 11 (Seite 26) Abbildung aus dem Philips Achieva Anleitung für Anwender

Abbildung 12 (Seite 33) eigenes Bildmaterial

Abbildung 13 (Seite 33) eigenes Bildmaterial

Abbildung 14 (Seite 35) eigenes Bildmaterial

Abbildung 14 (Seite 35) eigenes Bildmaterial

Abbildung 15 (Seite 36) mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. J. Schlegel und Dr. med. C. Delbridge, Abteilung für Neuropathologie, Klinikum Rechts der Isar der TUM

Abbildung 16 (Seite 37) eigenes Bildmaterial

Abbildung 17 (Seite 41) eigenes Bildmaterial

Abbildung 18 (Seite 42) eigenes Bildmaterial

Abbildung 19 (Seite 44) eigenes Bildmaterial

Abbildung 20 (Seite 35) mit freundlicher Genehmigung von Isabel Lange und Dr. rer. nat. C. Preibisch, Abteilung für Neuroradiologie, Klinikum Rechts der Isar der TU München

Tabelle 1.1 und 1.2 (Seite 8-9) mit Änderungen und übersetzt übernommen von Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D. Cavenee, W.K., Burger P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 114 (2007) 97–109

Tabelle 2 (Seite 27): eigene Daten

Tabelle 3 (Seite 28): eigene Daten

Tabelle 4 (Seite 30): eigene Daten

Tabelle 5 (Seite 38): eigene Daten

Tabelle 6 (Seite 39): eigene Daten

Tabelle 7 (Seite 40): eigene Daten

Tabelle 8 (Seite 42): eigene Daten

Tabelle 9 (Seite 43): eigene Daten

Tabelle 10 (Seite 49): eigene Daten

10 Danksagung

Herrn Professor C. Zimmer danke ich ganz herzlich für die Unterstützung der Arbeit in der Abteilung für Neuroradiologie der Technischen Universität München.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Christine Preibisch für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche Entwicklung der Methodik und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke Dr. med. Annette Förschler für die freundliche Anleitung und für die vielen wertvollen Anregungen.

Zudem danke ich bei Jürgen den Hollander, Nuria M. Hirsch und Isabel Lange für Ihre wertvolle Mitarbeit am Projekt.

PD Dr. Florian Ringel und Dr. med. Jens Gempt aus der Neurochirurgischen Klinik und Professor Schlegel und Dr. med. Claire Delbridge aus der Abteilung für Neuropathologie danke ich für die neurochirurgischen und neuropathologischen Blickpunkte.

Meiner Familie danke ich herzlich für die Geduld, die sie für meinen langen Ausbildungsweg aufgebracht haben und für die großzügige Unterstützung aus der Ferne.

12 Veröffentlichungen

Tóth, V., Förschler, A., Hirsch, N.M., den Hollander, J., Kooijman, H., Gempt, J., Ringel, F., Schlegel, J., Zimmer, C., Preibisch, C. MR-based hypoxia measures in human glioma. J Neurooncol. 115 (2013) 197-207

Hirsch, N.M., **Tóth, V.**, Förschler, A., Kooijman, H., Zimmer, C., Preibisch, C. Technical considerations on the validity of blood oxygenation level-dependent-based MR assessment of vascular deoxygenation

Preibisch, C., Hirsch, N.M., **Tóth, V.**, Kooijman, H., Zimmer, C. Influence of CBV on MR based measures of hypoxia in healthy human brain and tumorous tissue. Proc ESMRMB. 29 (2012) 77

Hirsch, N.M., Preibisch, C., **Tóth, V.**, den Hollander, J., Förschler, A., Kooijman, H., Zimmer, C. Characterization of Hypoxic Areas in the Human Brain. Proc ISMRM. 20 (2012) 3180

Kozák, L.R., **Tóth, V.**, Barsi, P., Rudas, G. Functional magnetic resonance imaging for cortical mapping in epilepsy. Ideggyogy Sz. 30 (2011) 294-9

Vorträge und Poster

- 03/2013 **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung (DGKN) 2013**
pcASL – eine neue Methode zur Charakterisierung der intrazerebralen Blutversorgung (Poster)
- 10/2012 **Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie**
„Die deutsche Wissenschaft“ - die besten drei Vorträge der Kategorie Hypoxie-Bildgebung von Gliomen – Validierung einer semiquantitativen MRT-Methode
- 06/2012 **Jahrestagung der Neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA)**
Semiquantitative Charakterisierung hypoxischer Areale in malignen Gliomen mittels MRT (Poster)
- 04/2012 **Annual Meeting of the American Society of Neuroradiology**
MRI Hypoxia Index – Detecting hypoxic regions in brain tumors
- 10/2010 **Symposium Neuroradiologicum, Bologna, Italien**
The role of fMRI in the planning of neurosurgical interventions