

Validation der C13-Magnetresonanzspektroskopie-Bildgebung mittels Protonenspektroskopie und klinischer Chemie am DEN-induzierten HCC der Ratte

Dominik Michael Keim

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanne Kossatz

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rickmer Braren
2. Prof. Dr. Franz Schilling

Die Dissertation wurde am 13.09.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 21.02.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Die Heterogenität des HCC.....	7
1.1.3 Die genetische Heterogenität des HCC.....	8
1.1.4 Die Alteration des Stoffwechsels in Tumorzellen.....	9
1.1.5 Metabolische Heterogenität.....	10
1.1.6 Heterogenität als Risiko- und Prognosefaktor	12
1.2 Bildgebungsmethoden	12
1.2.1 Diagnostik und klinische Bildgebung	12
1.2.2 C13-Spektroskopie mit hyperpolarisierten Substraten.....	14
1.3 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Einhaltung ethischer und tierschutzrechtlicher Grundlagen.....	17
2.2 Tierhaltung.....	17
2.3 Kohortenbeschreibung.....	17
2.4 Screening der Versuchstiere auf Tumoren.....	18
2.5 Versuchsaufbau	19
2.5.1 Bildgebung.....	19
2.5.1.1 Tumorlokalisierung vor C13-Injektion	19
2.5.1.2 Hyperpolarisat	19
C13-Pyruvat Hyperpolarisation	19
Intravenöse Applikation.....	20
2.5.1.3 C13-Magnet-Resonanz-Spectroscopic-Imaging mit FID-CSI.....	20
2.5.1.4 13C-Datenanalyse.....	21
2.6 <i>Ex vivo</i> Validierung	22
2.6.1 Probenentnahme.....	22
2.6.2 NMR-Spektroskopie	23
2.6.2.1 Probenaufbereitung.....	23
2.6.2.2 Protonen-NMR-Spektroskopie.....	23
2.6.3 Klinische Chemie	24

2.6.4	Histologie	25
2.6.5	Statistik	25
3	Ergebnisse	26
3.1	C13-Laktat/Alanin-Verhältnis im FID-CSI	26
3.1.1	Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe mit Tumor	26
3.1.2	Vergleich der Kontrollgruppe mit nach histologischem Bild differenzierten Gruppen	27
3.2	LDH/GPT-Verhältnis	28
3.2.1	Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe mit Tumor	28
3.2.2	Vergleich der Kontrollgruppe mit nach histologischem Bild differenzierten Gruppen	29
3.2.3	Lineare Regression des LDH/GPT- und des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses	30
3.3	Protonenspektroskopie des Laktat/Alanin-Verhältnisses	31
3.3.1	Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe mit Tumor	31
3.3.2	Vergleich der Kontrollgruppe mit nach histologischem Bild differenzierten Gruppen	32
3.3.3	Protonen-Laktat/Alanin-Verhältnis und C13-Laktat/Alanin-Verhältnis	33
4	Diskussion	34
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	34
4.2	Wahl des Versuchsmodells	34
4.3	DEN	35
4.3.1	Vorteile der HCC-Induktion mittels DEN	35
4.3.2	Nachteile der HCC-Induktion mittels DEN	36
4.4	Limitationen des Versuchsmodells	37
4.4.1	Makrometabolismus und Ernährung	37
4.4.2	Probenentnahme und Konservierung	38
4.4.3	Methodenstabilität	39
4.4.4	C13 Limitationen	39
4.5	FID-CSI	40
4.6	Statistik	41
4.7	Vergleich mit aktueller Literatur	41
4.7.1	Heterogenität	41
4.7.2	Laktat-Status	43
4.7.3	Alanin-Status	45

4.7.4	Label exchange.....	46
4.7.5	Laktat/Alanin-Verhältnis	46
5	Ausblick	48
6	Zusammenfassung	49
7	Summary	51
8	Literaturverzeichnis.....	53
9	Abbildungsverzeichnis	63
	Danksagung	65

Abkürzungsverzeichnis

ACSS	Acetyl-CoA-Synthetase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMPK	AMP Activated Protein Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BPTES	Bis-Phenylacetamid-Thiadiazol-Ethyl-Sulfid
bzw.	beziehungsweise
CE-CT	Contrast Enhanced Computed Tomography
CE-MRT	Contrast Enhanced Magnetic Resonance Tomography
CE-US	Contrast Enhanced Ultrasound
CNR	contrast-to-noise ratio
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
d	Tage
DEN	Di-Ethyl-Nitrosamin
DNP	Dynamische Kernpolarisation (engl. Dynamic Nuclear Polarization)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
et al.	et altera
FASN	Fatty Acid Synthase
FDG	Fluordesoxyglucose
FGF	Fibroblast Growth Factor
FID-CSI	Free Induction Decay - Chemical Shift Imaging
FOV	Field of view
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GLUT-1	Glucose Transporter, Type 1
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF	Hypoxia Inducible Factor
Hz	Hertz
i.v.	intravenös
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Mol
MCT	Monocarboxylat Transporter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MRSI	Magnet resonance spectroscopic imaging

MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (engl. Non alcoholic fatty liver disease)
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl. Non-small-cell lung cancer)
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered Saline
PEP	Phosphoenol-Pyruvat
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKLR	Pyruvat Kinase L/R
ppm	parts per million
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
S.	Seite
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio)
TE	Echozeit
TGF-B1	Transforming growth factor beta 1
TR	Repetitionszeit
TSE	Turbo Spin Echo
US	Ultraschall
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen der Leber sind die am sechsthäufigsten diagnostizierte und vierthäufigste Krebsart mit Todesfolge weltweit. Im Jahre 2018 erkrankten über 840.000 Menschen und die Mortalität lag bei über 780.000 Fällen. 75% - 85% des primären Leberkrebses sind ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) [1].

In 90% der Fälle bildet sich das HCC auf Basis einer Leberzirrhose [2]. Diese ist ein entscheidender Faktor für die Entstehung [3]. In den westlichen Ländern sind der Alkoholismus und die chronische Infektion mit Hepatitis-C-Virus Hauptverursacher der Leberzirrhose und somit des HCC [4]. Weitere Risikofaktoren sind die Infektion mit Hepatitis-B-Virus, vor allem in Entwicklungsländern, und die Intoxikation mit Aflatoxin B1 [6-7], insbesondere bei Koinfektion mit HBV, wo sie für 85% aller HCC-Fälle verantwortlich sind [7]. Auch eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) oder nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) als Folge von Diabetes mellitus und des metabolischen Syndroms führt zu einer erhöhten Inzidenz [8], selbst bei nicht vorhandener Zirrhose.

1.1.2 Die Heterogenität des HCC

Bis zur Entstehung des HCC lassen sich eine Reihe von Veränderungen in der Leber beobachten, welche auch nebeneinander aufzufinden sind. Hierzu zählen Fibrose, Zirrhose, Zellregeneration und Dysplasien. Dysplasien gelten als Tumorstufe. Sie entstehen durch Akkumulation genetischer Veränderungen [9] und können im weiteren Verlauf zum HCC entarten [10]. Häufig können mehrere dysplastische Knoten gefunden werden, welche sich unabhängig voneinander entwickelt haben. Die Akkumulation unterschiedlicher genetischer Veränderungen führt auch zu unterschiedlichen monoklonalen Zellverbänden und somit heterogenen Tumoren [11]. Im Folgenden wird auf die Mechanismen eingegangen, welche zur Heterogenität führen.

1.1.3 Die genetische Heterogenität des HCC

Das HCC gilt als genetisch ausgesprochen heterogener Tumor [9]. Eine Hauptursache für genetische Vielfalt ist genomische Unbeständigkeit. Diese kann durch exogene und endogene Faktoren begünstigt werden [12].

Als exogene Faktoren sind die in Kapitel 1.1.1 genannten Risikofaktoren zu berücksichtigen. So bildet sich das HCC vor allem auf Basis einer zirrhotisch veränderten Leber oder in chronisch-entzündlichem Milieu. Ein HCC aufgrund einer ethyltoxischen Zirrhose ist assoziiert mit der Induktion entzündlicher Prozesse und der damit einhergehenden Hepatozytennekrose und -regeneration, oxidativen Stress und Zirrhose [10].

Epigenetische und endogene Faktoren wie Mutationen und Dysfunktionen in der Transkription, Replikation und den zellulären DNA-Reparaturmechanismen führen zur Veränderung des Erbguts [12]. Hieraus kann die Dysregulation zellulärer Signaltransduktionswege resultieren. In diesem Zusammenhang konnten mehr als 160 Gene in Verbindung mit der Entstehung des HCC gebracht werden [13]. Neben p53 können die Gene von TGF- β 1, MYC, PI3K/Akt, mTOR, Ras/Raf, Wnt/ β -catenin und NRF2/KEAP1 betroffen sein [13-15], und die aus den Mutationen resultierende Dysfunktion der entsprechenden Signalkaskaden die Entstehung des HCC fördern. Es konnte außerdem eine Überexpression des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF) sowie deren Rezeptoren im HCC beobachtet werden. Sie begünstigen Tumorwachstum, Invasion des umgebenden Gewebes und der Gefäße, Metastasierung und Vaskularisation des Tumors [16].

Die Kombination der genetischen Veränderungen und deren Ausprägung bilden die Grundlage für genetisch unterschiedliche Zellpopulationen und somit für die Entstehung von Tumorsubtypen. Sie sind die Basis sowohl für (intra- und inter-)tumorale Heterogenität im Individuum als auch für (inter-)tumorale Heterogenität zwischen verschiedenen Patienten und wirken sich auf die Tumorentwicklung und das Therapieansprechen aus [12, 17].

1.1.4 Die Alteration des Stoffwechsels in Tumorzellen

Veränderungen des Erbguts bedingen auch Veränderungen der intrazellulären Stoffwechselregulation. Erste Entdeckungen bezüglich eines im Tumor alterierten Metabolismus stammen von Otto von Warburg, welcher sie in der *Warburg-Hypothese* zur aeroben Glykolyse formulierte. Sie besagt, dass Tumorgewebe trotz Vorhandenseins von ausreichend Sauerstoff die Vergärung von Glucose zu Laktat bevorzugt. Dies steht im Gegensatz zum normalen Gewebe, welches primär die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzt (vgl. Abbildung 18, S. 44) [18]. In vielen Tumoren, unter anderem dem HCC, wurde ein erhöhtes Vorkommen von Laktatdehydrogenase A (LDHA) und ihres Kofaktors NADH nachgewiesen. LDHA katalysiert unter Verwendung von NADH bevorzugt die Reaktion von Pyruvat zu Laktat [19] (vgl. Abbildung 17, S. 43), was somit den Warburg Effekt begünstigt.

Heute ist erwiesen, dass zahlreiche zelluläre Signalwege auch den intrazellulären Metabolismus beeinflussen. Mutationen in den Signalkaskaden, die auch im HCC betroffen sind, wie PI3K, HIF, p53, MYC und AMPK, wirken sich regulierend auf den Glucosestoffwechsel aus [20].

Die Hauptaufgabe des alterierten Metabolismus ist es, dem erhöhten Stoffwechsel bei hoher Teilungsrate gerecht zu werden. Hierzu gehören ein erhöhter Bedarf an ATP, vermehrter Makromolekülanabolismus und die Instandhaltung des Redoxstatus der Zelle [20].

Glucose wird im Zuge der Glykolyse zunächst zu Pyruvat metabolisiert. Anfallendes Pyruvat kann in der Zelle auf verschiedene Art für den Metabolismus verwendet werden. Durch die Umwandlung per Transaminierung in Alanin ist die Anbindung an den Aminosäurehaushalt möglich, über die Pyruvatcarboxylase die Eingliederung in die Gluconeogenese, über die Pyruvatdehydrogenase die Einspeisung in den Citratzyklus oder durch die Laktatdehydrogenase die anaerobe Gärung zu Laktat (vgl. Abbildung 1, S. 10).

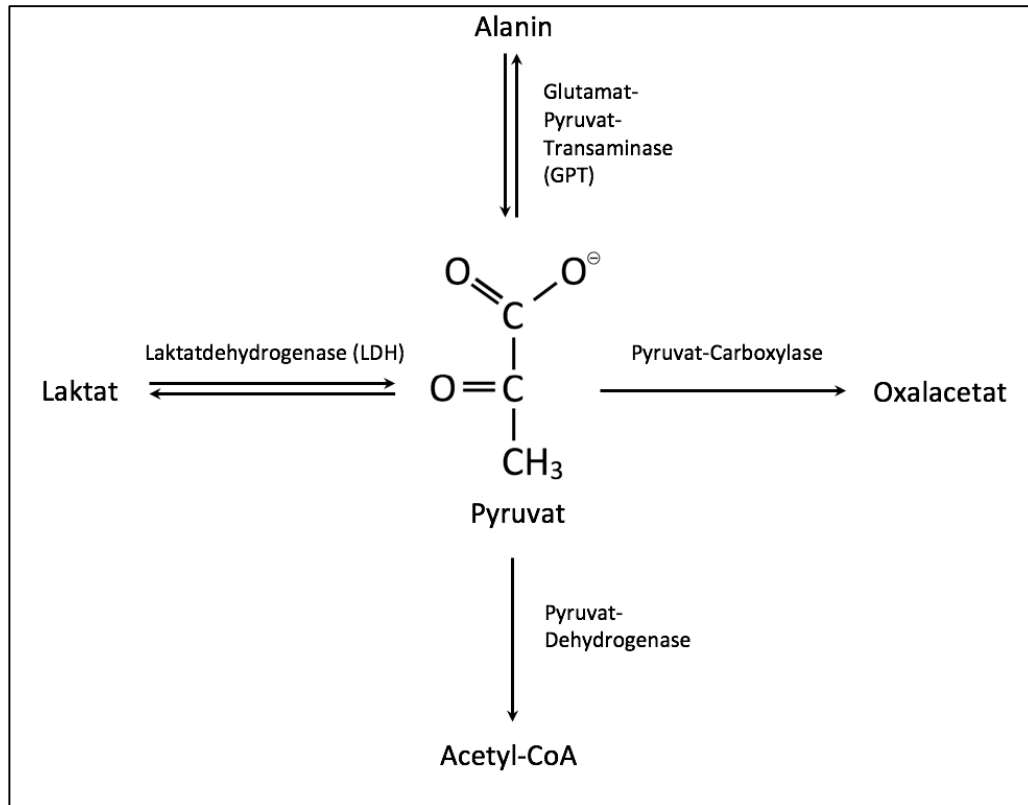


Abbildung 1: Übersicht der Reaktionen von Pyruvat: Durch die Umwandlung von Pyruvat zu Alanin über die Glutamat-Pyruvat-Transaminase ist das Einbringen in den Aminosäurehaushalt möglich. Bei der durch die Pyruvat-Carboxylase katalysierten Reaktion resultiert Oxalacetat, welches für die Gluconeogenese verwendet werden kann. Das bei der Reaktion der Pyruvat-Dehydrogenase entstehende Acetyl-CoA kann in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden. Unter aeroben Bedingungen kann Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat metabolisiert werden.

1.1.5 Metabolische Heterogenität

Die in Kapitel 1.1.3 beschriebene genetische Vielfalt bildet als Konsequenz des Zusammenhangs von Genetik und Metabolismus die Grundlage für tumorale metabolische Heterogenität.

Daemen et al. [21] lieferten Ansatzpunkte für neue Charakteristika zur Differenzierung von Tumoren und nutzten diese zur Erstellung eines metabolischen Tumorprofils. Sie untersuchten zunächst das duktales Pankreaskarzinom und weiteten ihre Forschung anschließend auf über 200 Zelllinien verschiedener Tumorentitäten aus. Die Ergebnisse

zeigten die Aufteilbarkeit aller untersuchter Tumoren in eine hoch proliferative und eine gering proliferative Tumorentität. Die hoch proliferative Gruppe ließ sich zudem in einen glykolytischen und einen lipogenen Typ differenzieren.

Der glykolytische Typ wies erhöhte Konzentrationen an Komponenten der Glykolyse auf wie Phosphoenlpyruvat (PEP), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Laktat, während die stoffliche Konzentration von Redox-Komponenten wie NAD, NADH, NADP, NADPH, Glutathiondisulfid und Glutathion erniedrigt war. Der lipogene Typ zeigte erhöhte Konzentrationen an Lipid-Metaboliten wie Palmitinsäure, Ölsäure, Palmitoleinsäure, Myristinsäure, sowie mitochondrialer Komponenten der Elektronentransportkette wie Coenzym Q10 und Coenzym Q9 und von Teilen des Aspartat-Malat-Shuttles wie Aspartat und Malat. Diese Unterschiede der Subgruppen spiegelten sich auch im Ansprechen auf Stoffwechsellinhibitoren wider. Zelllinien des glykolytischen Typs waren sensitiver für LDHA-Inhibitoren, Oxamat und BPTES und Zelllinien des lipogenen Typs sensitiver für FASN-Inhibitor GSK1195010, Cerulenin und Orlistat [21].

Entsprechende Untersuchungen des HCC zur Klassifizierung in metabolische Subtypen sind Bestandteil aktueller Forschung. Björnson et al. wiesen ein erhöhtes Vorkommen mitochondrialen Acetates nach, was durch eine vermehrte Expression des mitochondrialen Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase (ACSS) bedingt war. Dabei ging eine vermehrte Expression des Enzym-Subtyps ACSS1 mit verstärktem Tumorwachstum und erhöhter Malignität unter hypoxischen Bedingungen einher, im Vergleich zum Enzym-Subtyp ACSS2 [22]. Bidkhori et al. fanden vergleichbare Ergebnisse und klassifizierten das HCC in drei Typen mit unterschiedlichem Patienten-Outcome, welche metabolisch differierten hinsichtlich des Flusses von Aminosäuren, Kofaktoren und Coenzymen, Pyruvat, Steroiden sowie bei der Betaoxidation von Fettsäuren, des Karnitin-Shuttles und der oxidativen Phosphorylierung [23]. Auch in der Aktivität von Glykolyse, Citratzyklus und Fettsäuresynthese waren Unterschiede zu nachzuweisen sowie in der Expression zahlreicher Gene, unter anderem PKLR [23], welche die Pyruvatkinase kodiert und nach Studien als mögliches Ziel für leberspezifische Therapie mit Hilfe von PKLR-Inhibitoren dienen kann [24].

1.1.6 Heterogenität als Risiko- und Prognosefaktor

Die Parallelexistenz genetisch unterschiedlicher Zell-Subklone innerhalb eines Tumors kann ein unterschiedliches Verhalten dieser Zellgruppen bedingen. Die intratumorale Heterogenität kann daher einen Faktor für Tumorprogression darstellen [25]. Die Subklone des Tumors können dabei untereinander in Konkurrenz stehen, aber auch kooperieren [26]. Die Heterogenität wirkt sich auf das Metastasierungsverhalten aus und kann den Zeitpunkt beeinflussen, zu dem die Metastasierung initiiert wird [27].

Für das Outcome der Patienten ist die Heterogenität ebenfalls von Bedeutung. In einer Studie wurden 12 Tumortypen untersucht, wobei sich die Anzahl der Zellsubklone innerhalb eines Tumors auf die Mortalität auswirkte. Mehr als zwei Subklone erhöhten die Mortalität, mehr als vier Klone wiederum erniedrigten sie [28]. Dies legt nahe, dass das Ausmaß der Heterogenität innerhalb eines Tumors das Überleben erheblich beeinflussen kann. Auch beim HCC konnte der Heterogenität ein prognostischer Wert zugesprochen werden und als Faktor in Bezug auf die Gesamtüberlebensrate sowie das krankheitsfreie Überleben identifiziert werden [29].

Zudem hängt das Therapieansprechen von der Heterogenität ab, wie durch Forschungsergebnisse am NSCLC, Kolorektalen Karzinom und am Mammakarzinom gezeigt werden konnte. Eine durchgeführte Chemotherapie bewirkt unter Umständen nur die Unterdrückung des dominanten Zellklons, erzeugt nebenbei jedoch Selektionsdruck auf die Subklone und ermöglicht so das Überleben der therapieresistenten Subklone [27-33].

1.2 Bildgebungsmethoden

1.2.1 Diagnostik und klinische Bildgebung

Gemäß den AASLD-Richtlinien [37] sollten HCC-Risikopatienten zur Erfassung neu auftretender Raumforderungen im halbjährlichen Rhythmus mittels Sonographie überwacht werden. Zur Detektion von malignitätsverdächtigen Leberaumforderungen sind die native MRT, CT und Ultraschall (US) ohne Kontrastmittel geeignet. Auf Basis nativer Bildgebungsverfahren kann die Diagnose des HCC jedoch nicht bestätigt werden.

Bei Läsionen mit einer Größe über 1 cm kann das Kontrastmittelverhalten in der kontrastmittelverstärkten CT (CE-CT), kontrastmittelverstärkten MRT (CE-MRT) bzw. im kontrastmittelverstärkten Ultraschall (CE-US) Aufschluss über die Dignität geben. Läsionen ohne charakteristisches Kontrastmittelverhalten mit einer Größe unter 2 cm sollten gemäß Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des HCC bioptisch gesichert werden [38].

Auf histologischer Ebene sind die Tumorzellen meist in mehreren Zelllagen trabekulär angeordnet. Zwischen den Trabekeln finden sich sinusoidähnliche Zwischenräume, welche von Endothel ausgekleidet sind [39]. Mit zunehmender Entdifferenzierung und Tumorprogression kommt es zur fortschreitenden Angiogenese mit Entstehung ungepaarter, nicht-triadaler Arterien und sinusoidaler Kapillarisation. Die arterielle Versorgung des HCC nimmt zu, während die über die Portalvene abnimmt und stattdessen der venöse Abfluss gesteigert ist [37, 38].

Das führt zum typischen Kontrastmittelverhalten des HCC in der Bildgebung. Charakteristisch ist dabei eine initiale Signalverstärkung im Tumor im Vergleich zum umliegenden Leberparenchym (hyperdens im CT, hyperintens in der T1 des MRT), die während der arteriellen Kontrastmittelpase der Untersuchung auftritt. Gefolgt wird sie vom sogenannten *Washout*, einem schnellen verminderten Kontrastmittelsignal im Vergleich zum umliegenden Leberparenchym (hypodens im CT, hypointens in der T1 des MRT) in der venösen Phase der Untersuchung [42]. Aufgrund des typischen Kontrastmittelverhaltens des HCC in CE-CT und CE-MRT stellen diese Untersuchungsmethoden den derzeitigen Goldstandard dar [38].

Die Bildgebung wird heute standardmäßig durch diffusionsgewichtete MRT-Bildgebung erweitert, welche Informationen über die Struktur der Läsion liefert und die zelluläre Dichte und den Stromaanteil der Läsionen beurteilbar macht. Dies trägt zur Detektion des Tumors bei, ist jedoch alleinstehend zur Diagnosesicherung nicht ausreichend [38].

Eine Untersuchung mittels ¹⁸F-FDG-PET-CT hat in der primären Diagnostik des HCC derzeit nur geringe Relevanz [35, 40]. Diese nuklearmedizinische Methode liefert Informationen zur Glucoseaufnahme des Tumors und ermöglicht eine Beurteilung des

Tumormetabolismus durch Darstellung der in den Tumor aufgenommenen und angereicherten 18-FDG.

Derzeit existiert jedoch keine Methode, die über die Glucoseaufnahme hinaus eine präzise Aussage über den tumoralen Stoffwechsel erlaubt.

1.2.2 C13-Spektroskopie mit hyperpolarisierten Substraten

Die Bestimmung von Metabolitenkonzentrationen ist in der MRT nur begrenzt möglich. Eine Methode ist die Protonenspektroskopie, welche auch ohne markierte Substrate auskommt und in der Neuroradiologie zur *in vivo* Beurteilung von ZNS-Entwicklungsstörungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Infektionen, Tumorklassifikation und hypoxisch-ischämischer sowie traumatischer Hirnschädigung bereits klinische Anwendung findet [41-45].

Die Signale von Pyruvat, Laktat und Alanin verschwinden hier jedoch aufgrund der geringen Konzentration im Rauschen oder werden von anderen Substanzen überlagert, weshalb sie mittels konventioneller Protonenspektroskopie nicht zugänglich sind [49]. Theoretisch wäre eine Messung bei entsprechend vielen Wiederholungen möglich, was jedoch einen sehr großen Zeitaufwand bedeutet und somit in der Routine nicht praktikierbar ist [49]. Für Untersuchungen *in vivo* benötigt man daher Substanzen, welche eine möglichst überlagerungsfreie, selektive Signalanreicherung bieten.

Die C13-Magnetresonanzspektroskopie erfüllt diese Voraussetzungen und stellt eine neue Methode zur Datengewinnung *in vivo* dar. Sie bedient sich Kohlenstoff-13-markierter Substrate.

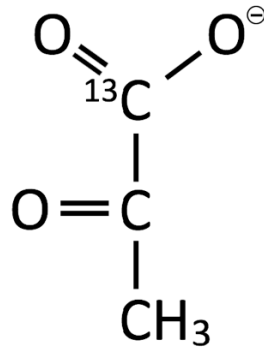


Abbildung 2: Struktur von 1-¹³C-Pyruvat

Bei der Hyperpolarisation mittels dynamischer Kernpolarisation (engl. *Dynamic Nuclear Polarization*, DNP) kann bei niedrigen Temperaturen (1,2 Kelvin) durch Einstrahlung von Mikrowellen die Besetzungszahlen der Spins maßgeblich beeinflusst werden [50]. Somit kann das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) im Vergleich zur konventionellen C13-Spektroskopie auf das über 10.000-Fache angehoben werden.

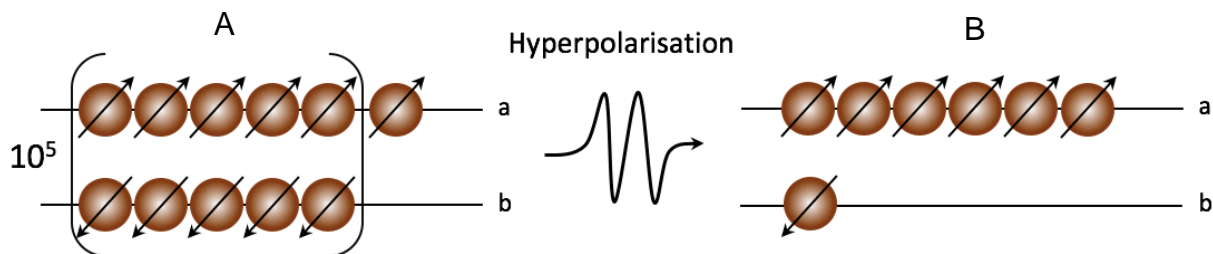


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hyperpolarisation; im Normalzustand richten sich die Spins in einem Magnetfeld parallel (a) und antiparallel (b) aus. Nur die überschüssig in einer Richtung angeordneten Spins sind in der MRSI messbar. Bei einer Temperatur von 37° Celsius ist das im Verhältnis 1 zu 10⁵ der Fall (A). Durch dynamische Kernpolarisation kann die Besetzung der Spins zugunsten eines höheren Überschusses verschoben (B) und somit eine Signalverstärkung erreicht werden.

Die Entwicklung einer intravenös applizierfähigen Lösung ermöglichte die Darstellung des Substrats *in vivo* [47, 48]. Studien zeigten, dass nach intravenöser Injektion von hyperpolarisiertem C13-Pyruvat sowohl das Pyruvat als auch dessen Metabolite C13-Laktat und C13-Alanin im Zielgewebe mittels MRSI bestimmt werden konnten [52]. Somit bietet diese Methode eine nichtinvasive Technik zur Darstellung des Metabolismus *in vivo*.

Weitere Studien nutzten dieses Verfahren zur Evaluation des Tumorstoffwechsels. Im murinen HCC-Modell mit mutiertem Myc-Status konnte eine Steigerung der Konversion von Pyruvat zu Laktat noch vor dem eigentlichen Tumorwachstum nachgewiesen werden. Umgekehrt war auch ein Rückgang dieses Stoffwechselschrittes noch vor der Tumorregression zu beobachten [53].

Eine erste klinische Studie mit C13-Pyruvat wurde an Prostatakarzinompatienten durchgeführt. In ihr wurde erhöhtes C13-Laktat in Bereichen mit bioptisch gesichertem Karzinom nachgewiesen. Zudem wurde demonstriert, dass das intravenös applizierte C13-Pyruvat keine toxische Wirkung hatte [54].

In einer weiteren murinen Lymphom-Studie wurde die Reaktion von Laktat zu Pyruvat nach Verabreichung eines Chemotherapeutikums untersucht. Nach Applikation von Etoposid konnte innerhalb von 24 Stunden ein Rückgang dieser Reaktion in der C13-Spektroskopie verzeichnet werden [55].

Die oben genannten Studien legen damit nahe, dass diese Methode zukünftig die Möglichkeit zur *in vivo* Evaluation von Metabolismus und Therapie am Patienten zulassen könnte.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Validierung der in der C13-Spektroskopie gemessenen Substrate mittels Protonenmagnetresonanzspektroskopie und klinischer Chemie. Hierzu wurde C13-Pyruvat in Ratten mit chemisch induziertem HCC angewendet. Die gemessenen Ergebnisse wurden auf Hinweise zur Tumorheterogenität untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Einhaltung ethischer und tierschutzrechtlicher Grundlagen

Alle Experimente sowie die Tierhaltung wurden gemäß den Richtlinien der Tierschutzbehörde Oberbayern durchgeführt. Der Antrag auf Tierversuche wurde eingereicht und genehmigt. Alle beteiligten Personen wurden in Versuchstierhaltung und Handhabung unterrichtet und absolvierten einen theoretischen Kurs mit abschließender Prüfung.

2.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden in Standardkäfigen des Typs III (Maße: Höhe 20 cm, Breite 22 cm, Tiefe 37 cm) unter konventionellen Hygienebedingungen Futter und Trinkwasser wurde *ad libitum* zur Verfügung gestellt, bei 2-fachem Wasserwechsel pro Woche. Die Tierpflege wurde durch ausgebildete Versuchstierpfleger verrichtet. Ein Tagesrhythmus mit Hell-Dunkel-Phasen von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase wurde simuliert.

2.3 Kohortenbeschreibung

Es wurde das Versuchsmodell der Ratte gewählt unter Verwendung von 28 männlichen Farbratten der Züchtung Wistar (RccHan:WIST, sechs bis acht Wochen alt, Envig, Re Schaijk, Niederlande). 4 Ratten dienten als Kontrollgruppe. Den 28 Versuchstieren wurde Di-Ethyl-Nitrosamin (DENA, SigmaAldrich) in der Konzentration von 0,01% über das Trinkwasser über einen Zeitraum von 8 Wochen verabreicht, gefolgt von einer 2-wöchigen Auswaschperiode. 1 x/Woche erfolgte die Gewichtskontrolle und Evaluation des Allgemeinzustands durch eine Tierärztin. 8 Versuchstiere starben während der Tumorinduktion mit DEN oder entwickelten keinen Tumor. 3 Tiere wurden aufgrund unzureichender Tumorgöße nicht in die Versuchsreihe eingegliedert. Am Ende wurden Proben von 4 Kontrolltieren mit gesunden Lebern und insgesamt 17 Tumoren in die Versuchsreihe aufgenommen.

Von einem Tier mit Tumor konnten in der C13-Spektroskopie keine Daten ermittelt werden, weshalb dieses aus den Korrelations- und Regressionsbestimmungen sowie aus den Subgruppenvergleichen der C13-Spektroskopie exkludiert wurde.

2.4 Screening der Versuchstiere auf Tumoren

Das Screening auf Leber Raumforderungen erfolgte alle 2 Wochen mittels MRT-Bildgebung an einem humanen 3-Tesla-MRT-Scanner (Philips Ingenia 3.0T, Philips Healthcare, Amsterdam, Niederlande) unter Isofluran-Inhalationsnarkose (2,5% Isofluran bei 2 l O₂/min). Zur Bilddatenakquisition wurden eine 2-teilige Handgelenksspule verwendet (dS Wrist 8ch 3.0T, Invivo Corporation, Gainesville, Florida, USA) und durch axiale T2-gewichtete Turbo-Spin-Echo-Sequenzen (TSE) (Schichtdicke 1 mm, 0,5 mm x 0,5 mm in axialer Schichtebene, 41 Schichten, TR = 5975 ms, TE = 80 ms, FOV = 8 x 6 cm) Bilddaten des gesamten Abdomens erhoben (vgl. Abbildung 4).

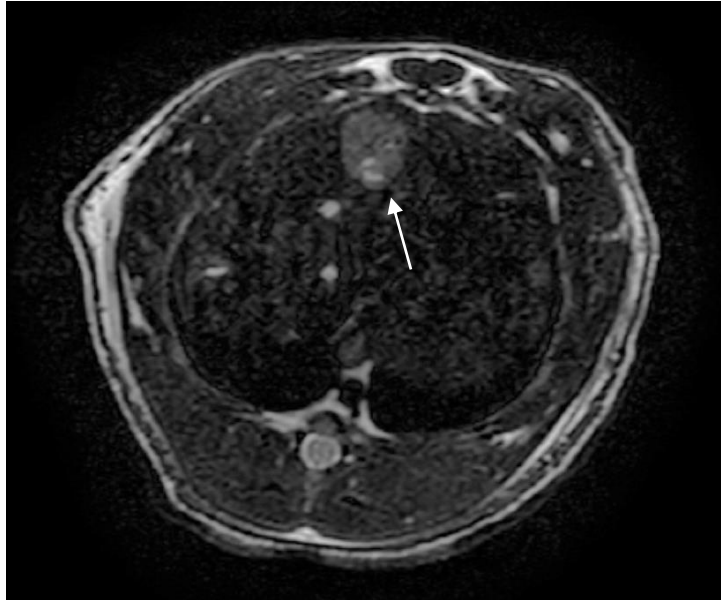


Abbildung 4: Beispielabbildung des Screenings auf Tumoren: Der Tumor wurde anhand des typischen hyperintensiven Signals im Vergleich zum restlichen Lebergewebe identifiziert (weißer Pfeil).

Bei einem Tumordurchmesser über 10 mm im axialen Schnittbild wurde die Experimentalmessung geplant.

2.5 Versuchsaufbau

2.5.1 Bildgebung

2.5.1.1 Tumorlokalisierung vor C13-Injektion

Das Versuchstier wurde unter fortlaufender Isoflurannarkose (Isofluran 2,5% bei 2 l O₂/min) in der Halterungsschiene für Ratten positioniert. Die Messung erfolgte im 7-Tesla-Hochfeld-Kleintier-MRT (Discovery MR901, GE Healthcare und Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) unter Benutzung der Ganzkörpervolumenspule.

Der Tumor wurde in der TSE-Sequenz identifiziert. Die Schnittebene mit dem größten Tumordurchmesser wurde bestimmt und zur Durchführung der C13-Spektroskopiemessung festgelegt.

2.5.1.2 Hyperpolarisat

C13-Pyruvat Hyperpolarisation

Zur Hyperpolarisation von Pyruvat, wurden 30 mg einer Mischung bestehend aus 14 M [1-¹³C]-Pyruvat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 16 mM OX063 (Oxford Instruments, Abingdon, Vereinigtes Königreich) und 1 mM Gadoterate Megluminde (Dotarem, Guerbet Laboratories Ltd., Villepinte, Frankreich) mit einem HyperSense DNP Polarizer (Oxford Instruments, Abingdon, Vereinigtes Königreich) bei einer Wellenlänge von 94,172 GHz polarisiert. Bei >90% des maximal erreichbaren Polarisationsgrades bei 3,35 T und 1,2 K wurde der Lösungsvorgang mit 4,2 ml Pufferlösung eingeleitet. Die Pufferlösung wurde zusammengesetzt aus destilliertem Wasser, 80mM TRIS (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1 g/l EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 80 mM Natriumhydroxid (NaOH), was zuvor auf 180 °C vorgeheizt wurde. Das führte zu einer 80 mM [1-¹³C]-Pyruvat-haltigen Lösung mit physiologischem pH-Wert und einem durchschnittlichen Polarisationsgrad von 38% bei Beginn des Lösungsvorgangs unter den vorgegebenen experimentellen Bedingungen [56].

Intravenöse Applikation

Dem Versuchstier wurden 3,75 ml/kg Körpergewicht Hyperpolarisat-Lösung (pH-Wert \approx 7,5) plus 0,6 ml Totraumvolumen intravenös injiziert (insgesamt $2,2 \pm 0,1$ ml).

2.5.1.3 C13-Magnet-Resonanz-Spectroscopic-Imaging mit FID-CSI

Nach 2-stündiger Nahrungskarenz erfolgte die Narkoseeinleitung mit Hilfe einer Ganzkörperbox und 5% Isofluran bei 4 l O₂/min. Unter Isofluranerhaltungsdosis (2,5% Isofluran bei 2 l O₂/min) wurde ein Venenverweilkatheter (Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, USA) in eine Schwanzvene gelegt. Die Körpertemperatur wurde mit einem Warmluftgebläse (Mistral-Air Plus, The37°Company, Amersfoort, Niederlande) bei 37 °C gehalten und die Körpertemperatur und Atemfrequenz mittels Rektalsonde bzw. Druckkissen (SA Instruments Inc., New York, USA) überwacht.

Die Versuchsmessungen wurden unter Benutzung eines 7-Tesla Magneten (Agilent Technologies, Oxford, Vereinigtes Königreich) mit einem Kleintier-MRT (ursprünglich Discovery MR901, GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA; umgebaut zu AVANCE III HD electronics, Bruker Corporation, Billerica, USA) und durchgeführt unter Benutzung einer entkoppelten C13/H1-Doppelfrequenz Ganzkörpervolumenspule (72 mm Innendurchmesser, RAPID Biomedical GmbH, Würzburg-Rimpar, Deutschland). Als Referenzphantom wurde eine mit 4-molarer-Harnstofflösung befüllte NMR-Probenröhre für die 13C-Spektroskopie neben dem Versuchstier platziert. Die Anästhesiedauer wurde beständig und durchschnittlich für 95 Minuten aufrechterhalten um Messfehler aufgrund der Narkosezeit zu vermeiden.

15 s nach Injektion wurde die Bildakquisition für die Dauer von 30 s gestartet mit 9,9 s pro Einzelbild. Verwendet wurde eine FID-CSI-Sequenz mit 2D-Phasenkodierung, k-space Auslesung von zentral nach außen, 12x12 Matrix, Kippwinkel 6 Grad, Empfängerbandbreite 5 kHz, 2048 Spektralpunkten, Schichtdicke 5 mm, FOV 48 x 48 mm und TR 68 ms.

2.5.1.4 13C-Datenanalyse

Datenakquisition und Auswertung der Messwerte zur Erstellung der C13 Spektroskopie erfolgte durch MATLAB (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) mit Hilfe einer für das Projekt entwickelten Software (vgl. Abbildung 5, S. 21 und Abbildung 6, S. 22).

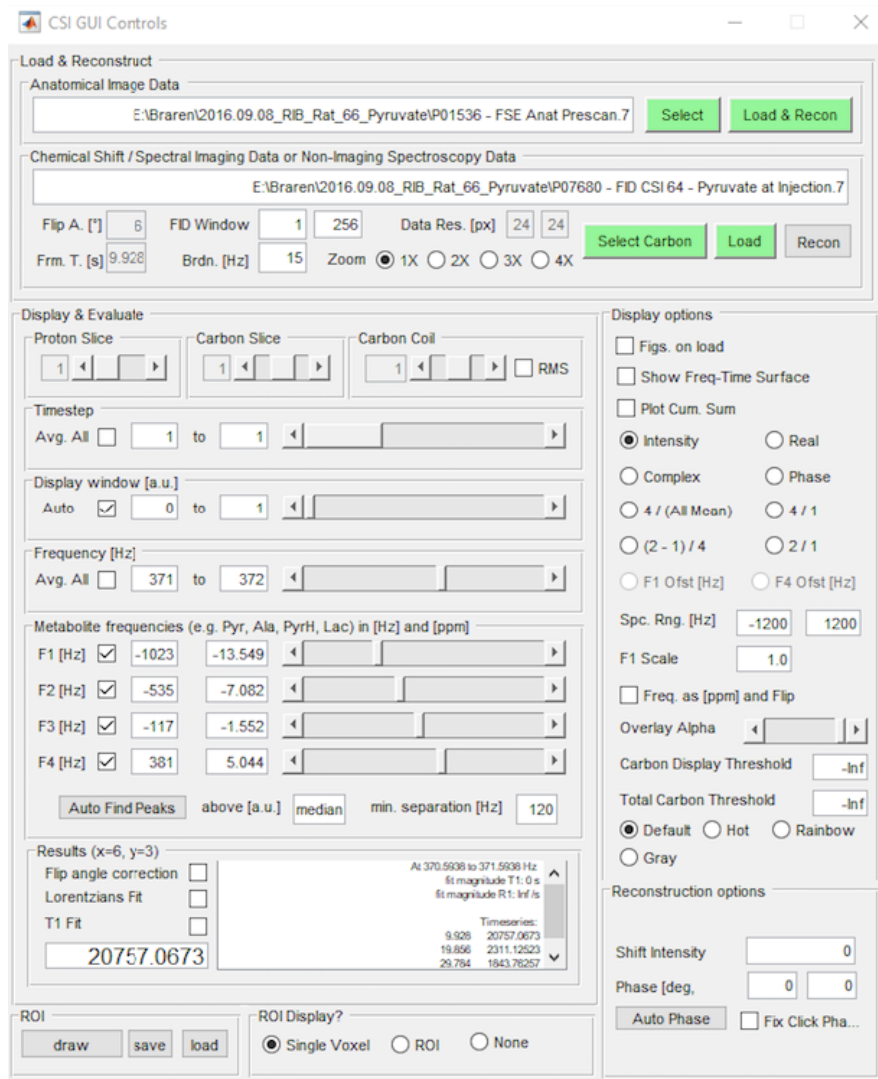


Abbildung 5: MATLAB Skript: Darstellung des Bedienfeldes des verwendeten MATLAB-Skriptes mit Beispielhaften Datensatz.

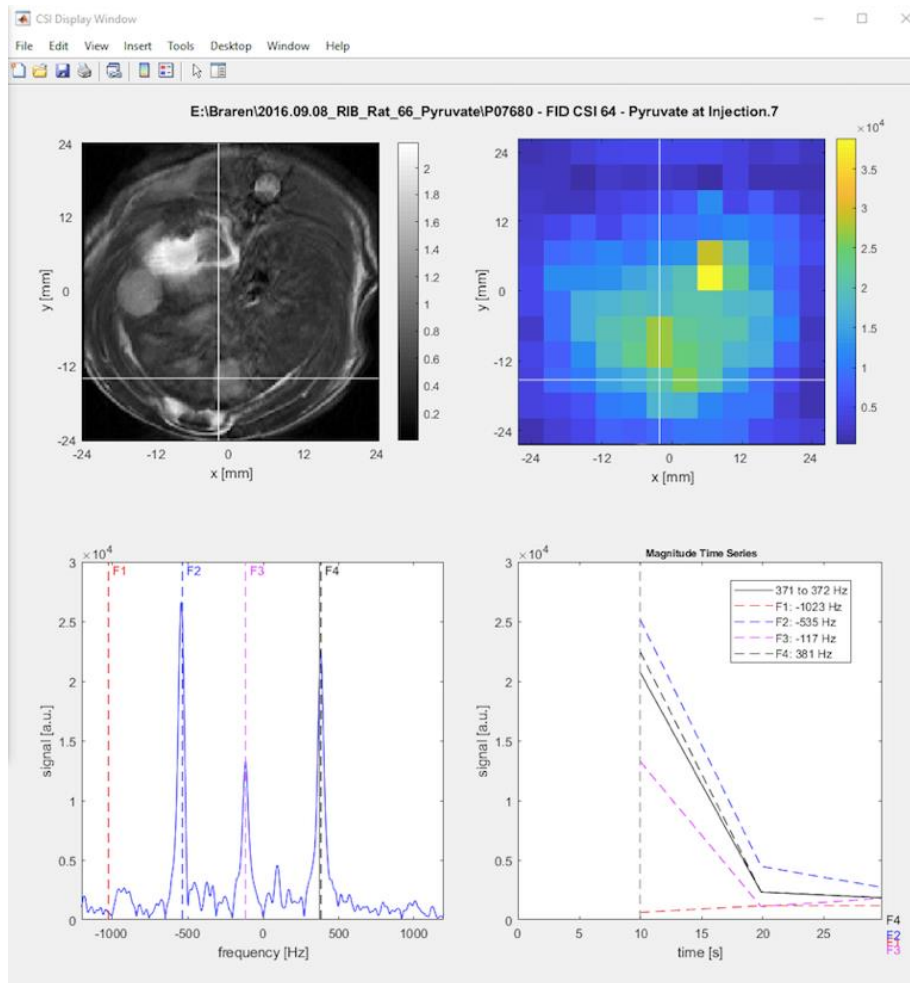


Abbildung 6: MATLAB-Skript: Visualisierungsfenster: Darstellung des verwendeten MATLAB-Skriptes mit beispielhaftem Datensatz. Oben rechts im Bild ist das Kreuz in den Tumor gesetzt. Unten links ist das Frequenzspektrum der Metabolite abgebildet mit Pyruvat, Alanin und Laktat, sowie deren Signal im zeitlichen Verlauf (unten rechts).

2.6 Ex vivo Validierung

2.6.1 Probenentnahme

Nach Abschluss der C13-Bilddatenerhebung wurde das Tier aus dem Gerät entfernt und mittels intravenös appliziertem Phenobarbital euthanasiert.

Anschließend erfolgte die Leberentnahme in Rückenlage. Das Abdomen wurde chirurgisch eröffnet, der Tumor identifiziert und isoliert. Es folgte die Aufteilung des Tumors in zwei Teile. Ein Teil wurde kryokonserviert in flüssigem Stickstoff mit anschließender Lagerung bei -80 Grad Celsius. Ein Teil mit Restleber wurde in 4%igem-Formalin fixiert.

2.6.2 NMR-Spektroskopie

2.6.2.1 Probenaufbereitung

Die Proben wurden nach dem Zweistufenprotokoll von Wu et al. aufbereitet und für die NMR-Spektroskopie vorbereitet [57]. 50-120 mg der Gewebeproben wurden unter Kühlung abgewogen und mit 4 ml/g Methanol und 0,85 ml/g destilliertem Wasser bei 4 Grad Celsius homogenisiert (6 m/s für 40 Sekunden, 1 Zyklus, FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer, MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Anschließend wurden 4 ml/g Chloroform und 2 ml/g destilliertes Wasser hinzugefügt, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die polare Phase wurde pipettiert und anschließend lyophilisiert (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland).

2.6.2.2 Protonen-NMR-Spektroskopie

Die lyophilisierten Proben wurden in 590 µl Wasser und 10 µl D₂O gelöst und die Lösung in 5 mm NMR Röhren gegeben. Die Protonen-NMR-Spektren wurde bei 300 MHz im Routine-NMR-Spektrometer gemessen (7,04 T, Avance III HD 300 MHz Vertical Bore Spectrometer, TUM Fakultät für Chemie, Bruker BioSpin, Deutschland), im Puls-Verfahren (16 + Scandurchläufe + 2 Testscans, Flip-Winkel 30°, TR: 6,45 s, Empfänger Bandbreite: 6 kHz Akquisitionszeit: 5,45 s, FID-Größe 65,563 Punkte, Gesamtakquisitionszeit: 1 Min 56 s).

Zur Quantifizierung von Alanin und Laktat in den Tumorextrakten wurden die Integrale unter den Alanin- und Laktatspitzen verglichen mit dem Integral der 0,01 mM Hydrochinonspitze (vgl. Abbildung 7, S. 24). Zur Errechnung der absoluten Konzentration wurde die arithmetische Summe des 0,01-mM-Hydrochinon-Referenzspektrums unter gleichen Lösungsmittelbedingungen und des Spektrums der Probe mit MNOVA (MestReNova, 10.0 Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain) berechnet. Das Integral eines Protonensignals ist proportional zur Anzahl der Protonen und folglich zur Konzentration [58]. Das Integral von 0,01 mM Hydrochinon, welches 4 äquivalente

Protonen trägt, wurde als Referenz auf 1 festgelegt. Anschließend wurden die Integrale von Alanin und Laktat hiermit verglichen. Alanin und Laktat haben nur 3 äquivalente Protonen, weshalb die Konzentration bei gleicher Integralgröße um den Faktor 1,33 (4/3) höher ist [58].

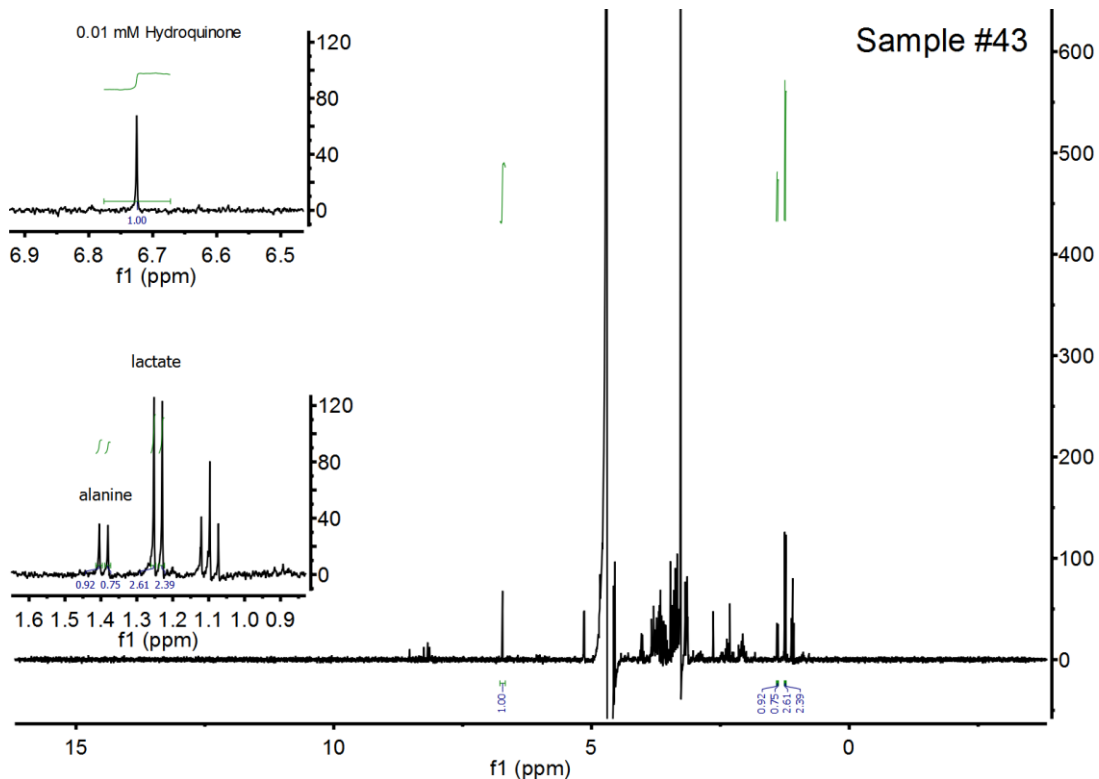


Abbildung 7: Exemplarischer Datensatz mit Auswertung der Protonenspektroskopie; zu sehen ist ein Übersichtsspektrum (groß) und jeweils ein Einzelausschnitt des Spektrums mit Fokus auf Hydrochinon (links oben, $\delta=6,73$ ppm) sowie Laktat und Alanin (links unten; Laktat $\delta=1,25$ ppm; Alanin $\delta=1,4$ ppm); das errechnete Integral ist in blauer Schrift, der für die Berechnung herangezogene Bereich ist in grün markiert; ppm = parts per million.

2.6.3 Klinische Chemie

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 90-110 mg Tumorgewebe in 1 ml RIPA-Puffer (FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer, MP Biomedicals, Santa Ana, USA) homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die LDH- und GPT-Aktivität photometrisch nach Herstellerangaben bestimmt (cobas c 701/702 System, Roche/Hitachi, LDH-Aktivität: LDHI2 (Laktatdehydrogenase nach IFCC ver. 2) und GPT-Aktivität: ALTPM (Alanin-Aminotransferase nach IFCC mit Pyridoxalphosphat Aktivierung), Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz).

2.6.4 Histologie

Zur histologischen Untersuchung und Bestimmung des Tumor-Gradings wurden die Proben direkt nach Entnahme 36 Stunden in Para-Formaldehyd aufbewahrt und anschließend in Ethanol zur Entwässerung überführt.

Es erfolgte die Einbettung der Proben in Paraffin. Von der Probe wurde ein Schnitt mit einer Dicke von 2—3 μm abgetragen und auf einen Superfrost-plus-Objektträger gebettet. Die Färbung war Hämatoxylin-Eosin nach labormedizinischem Standard.

2.6.5 Statistik

Die statistische und grafische Auswertung erfolgte mit Prism 8 für Mac (GraphPad Software, San Diego, California). Für den Vergleich innerhalb der C13-Spektroskopie, des LDH/GPT-Verhältnisses und des Protonen-Laktat/Alanin-Verhältnisses wurden bei Normalverteilung Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Statistisch wurde nach Prüfung der Normalität die Korrelationsanalyse nach Pearson's Rho durchgeführt. In allen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 C13-Laktat/Alanin-Verhältnis im FID-CSI

3.1.1 Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe mit Tumor

Das C13-Laktat/Alanin-Verhältnis war in der Gruppe mit Tumor signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,039$).

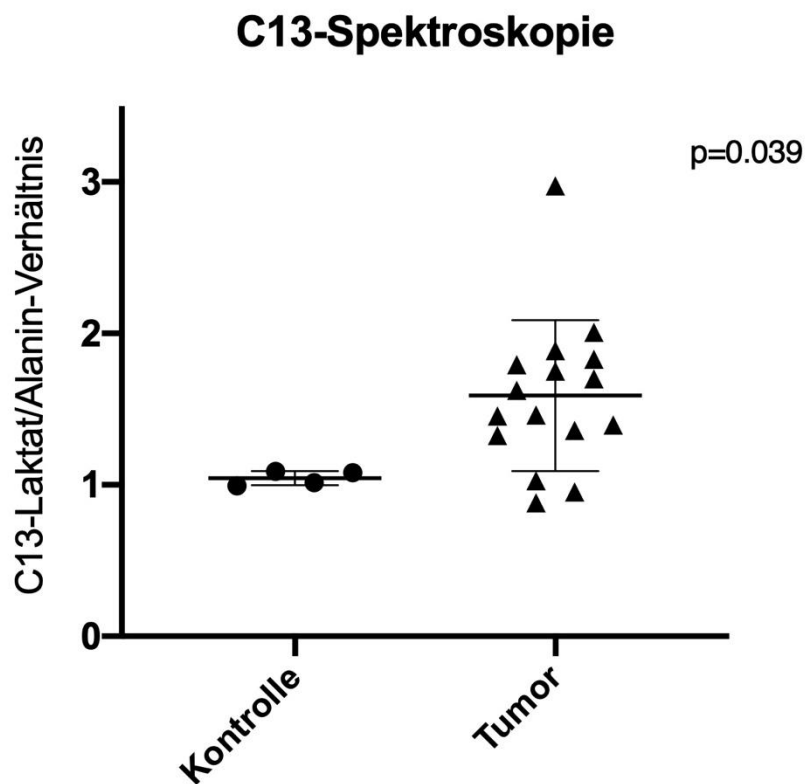


Abbildung 8: C13-Laktat/Alanin-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses in den verschiedenen Entitäten mit Mittelwert und Standardabweichung. Kontrolle: $n=4$, $MW=1,04\pm 0,05$; Tumor: $n=16$, $MW=1,59\pm 0,50$;

3.1.2 Vergleich der Kontrollgruppe mit nach histologischem Bild differenzierten Gruppen

Im Vergleich der Kontrollgruppe und der Gruppe mit dysplastischen Knoten beziehungsweise HCC ist ein p-Wert an der Grenze zur Signifikanz zu verzeichnen ($p=0,064$ bzw. $p=0,078$).

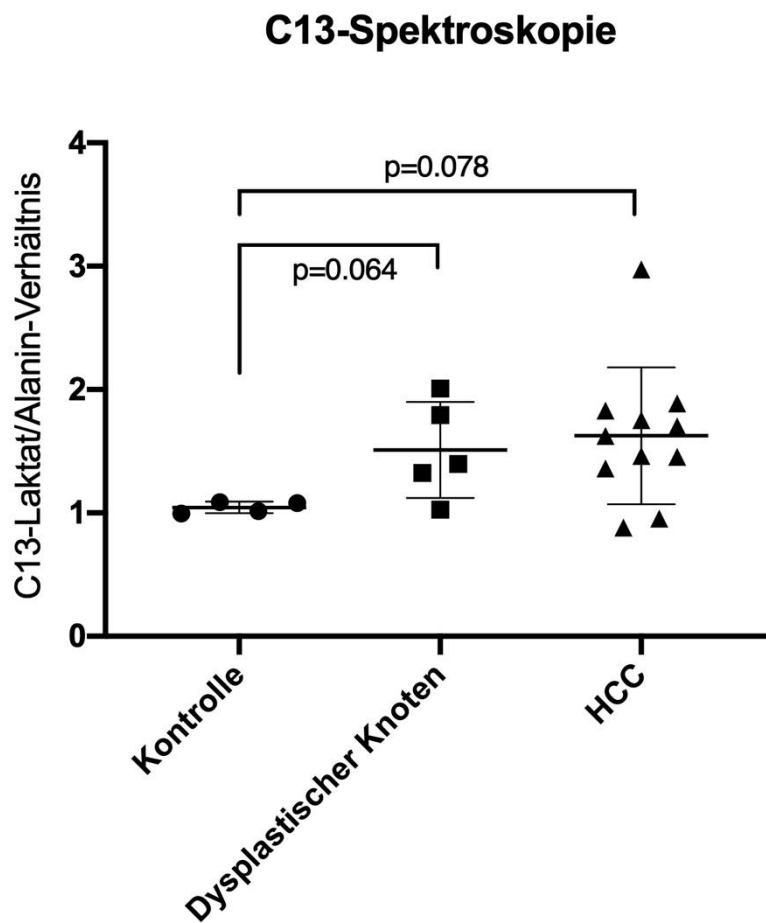


Abbildung 9: C13-Laktat/Alanin-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses in den verschiedenen Entitäten mit Mittelwert und Standardabweichung. Kontrolle: $n=4$, $MW=1,04\pm 0,05$; Dysplastischer Knoten: $n=5$, $MW=1,51\pm 0,39$; HCC: $n=11$, $MW=1,63\pm 0,56$;

3.2 LDH/GPT-Verhältnis

3.2.1 Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe mit Tumor

Das Verhältnis von LDH/GPT war in der Gruppe mit Tumor signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,001$).

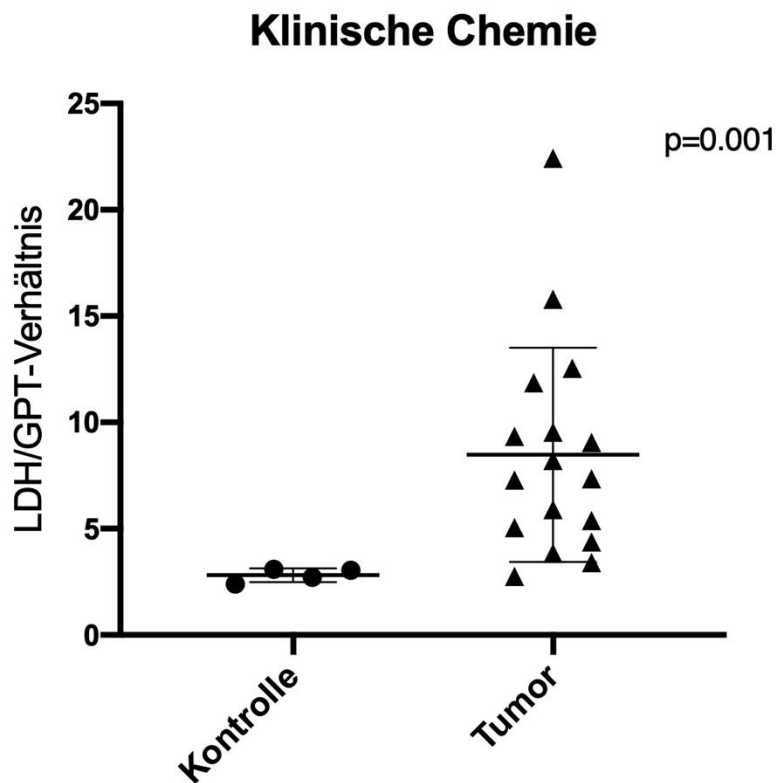


Abbildung 10: LDH/GPT-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des LDH/GPT-Verhältnisses in den verschiedenen Entitäten mit Mittelwert und Standardabweichung. Kontrolle: $n=4$, $MW=2,81\pm 0,33$; Tumor: $n=17$, $MW=8,48\pm 5,04$;

3.2.2 Vergleich der Kontrollgruppe mit nach histologischem Bild differenzierten Gruppen

Das Verhältnis von LDH/GPT war in der Gruppe mit dysplastischen Knoten signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,016$). Auch in der Gruppe mit HCC war das Verhältnis von LDH/GPT signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,004$).

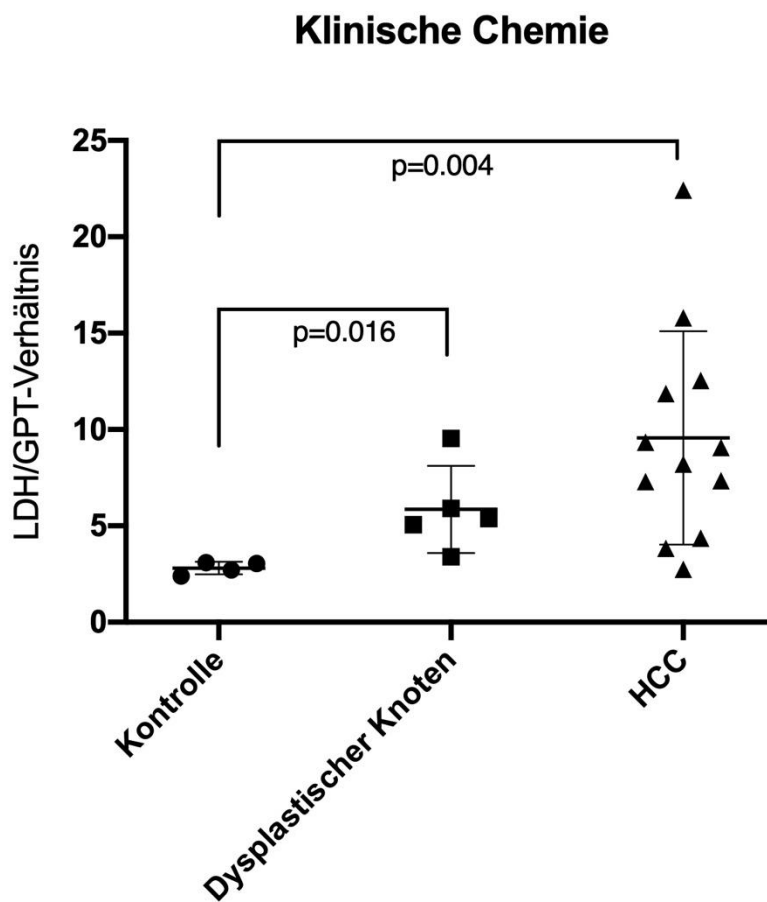


Abbildung 11: LDH/GPT-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des Verhältnisses von LDH/GPT in den verschiedenen Entitäten mit Mittelwert und Standardabweichung. Kontrolle: $n=4$, $MW=2,81\pm 0,33$; Dysplastischer Knoten: $n=5$, $MW=5,86\pm 2,26$; HCC: $n=12$, $MW=9,57\pm 5,53$;

3.2.3 Lineare Regression des LDH/GPT- und des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses

Das Verhältnis von LDH/GPT korrelierte signifikant positiv mit dem C13-Laktat/Alanin-Verhältnis ($r=0,613$; $p=0,004$). In der Regressionsbestimmung ergibt sich ein $R^2=0,376$.

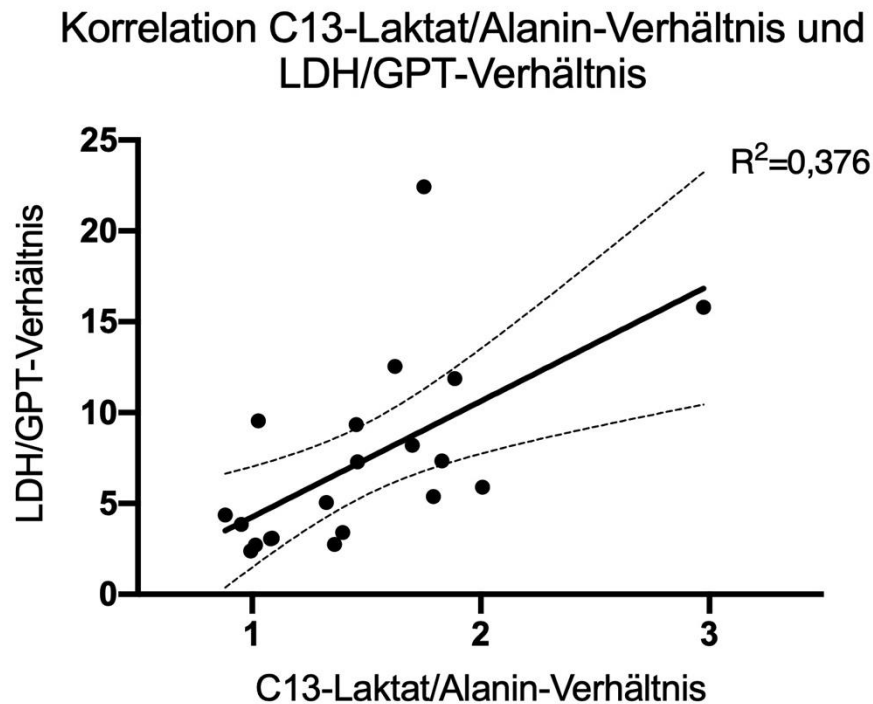


Abbildung 12: Lineare Regression der Verhältnisse von C13-Laktat/Alanin und LDH/GPT; die durchgehende Linie zeigt die ermittelte lineare Regressionsgerade, die darüber- und darunterliegenden gestrichelten Linien geben das 95%-Konfidenzintervall an; $R^2=0,376$; $n=20$

3.3 Protonenspektroskopie des Laktat/Alanin-Verhältnisses

3.3.1 Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe mit Tumor

Das Laktat/Alanin-Verhältnis war in der Gruppe mit Tumor signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,009$).

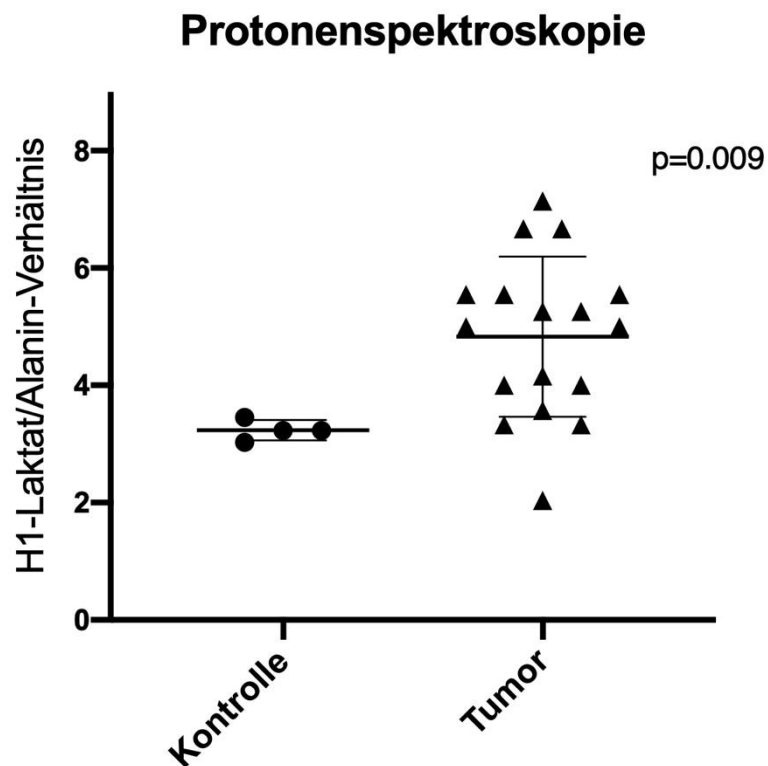


Abbildung 13: Laktat/Alanin-Verhältnis der Protonenspektroskopie: Punktwolken mit Darstellung des Laktat/Alanin-Verhältnisses in den verschiedenen Entitäten mit Mittelwert und Standardabweichung; Kontrolle: $n=4$, $MW=3,24 \pm 0,17$; Tumor: $n=17$, $MW=4,83 \pm 1,36$;

3.3.2 Vergleich der Kontrollgruppe mit nach histologischem Bild differenzierten Gruppen

Das Laktat/Alanin-Verhältnis war in der Gruppe mit dysplastischen Knoten signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,032$). Auch in der Gruppe mit HCC war das Laktat/Alanin-Verhältnis signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,019$).

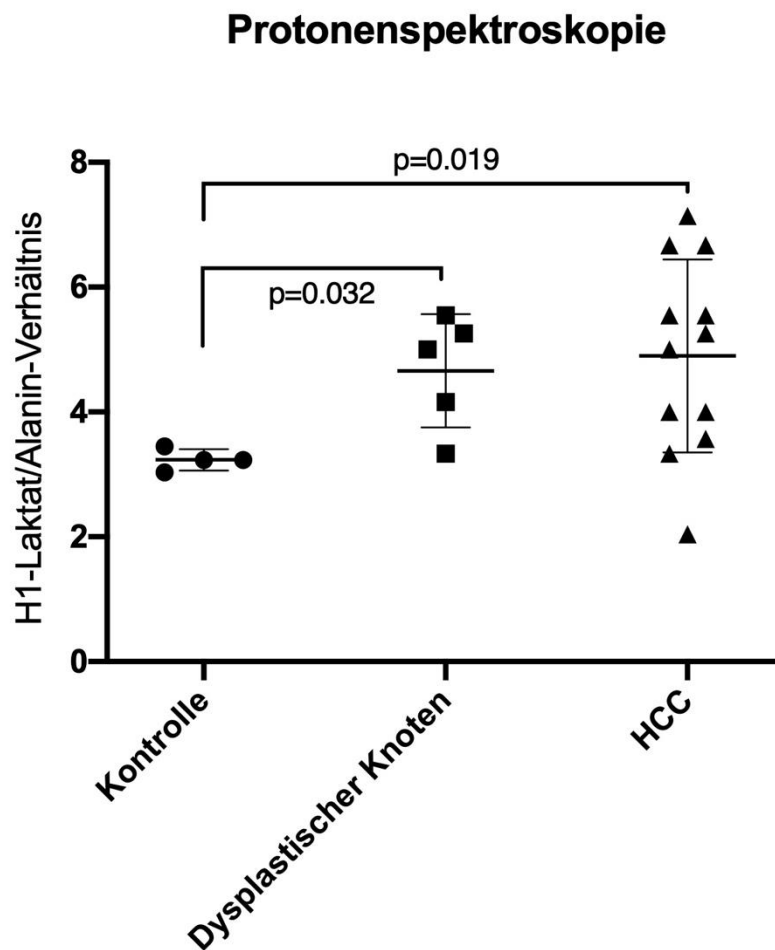


Abbildung 14: Laktat/Alanin-Verhältnis der Protonenspektroskopie: Punktwolken mit Darstellung des Laktat/Alanin-Verhältnisses in den verschiedenen Entitäten mit Mittelwert und Standardabweichung; Kontrolle $n=4$, $MW=3,24\pm0,17$; Dysplastischer Knoten $n=5$, $MW=4,66\pm0,91$; HCC: $n=12$, $MW=4,90\pm1,55$;

3.3.3 Protonen-Laktat/Alanin-Verhältnis und C13-Laktat/Alanin-Verhältnis

Das Laktat/Alanin-Verhältnis der Protonenspektroskopie korrelierte positiv, nicht signifikant mit dem Laktat/Alanin-Verhältnis der C13-Spektroskopie ($r=0,385$; $p=0,094$). In der linearen Regressionsbestimmung ergibt sich ein $R^2=0,148$.

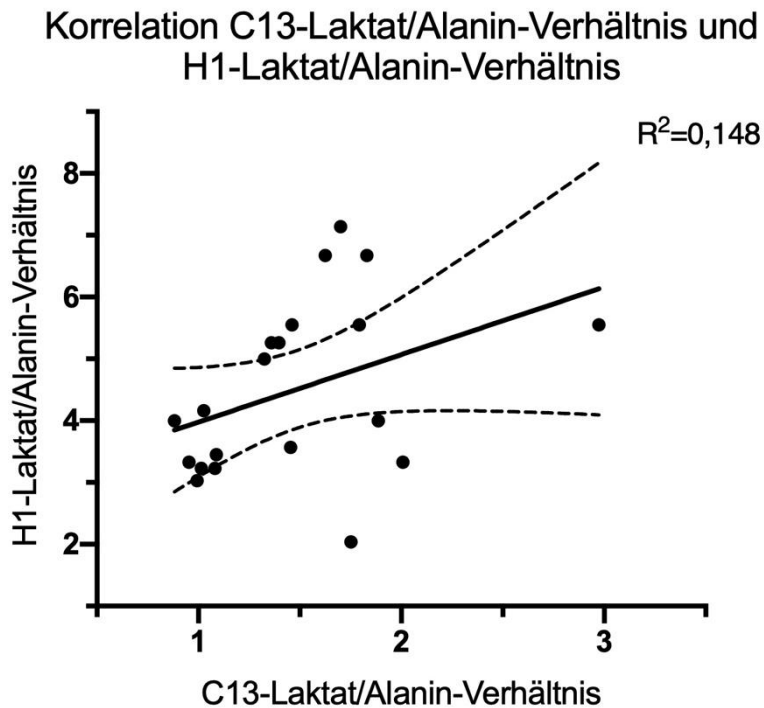


Abbildung 15: Lineare Regression der Verhältnisse von C13-Laktat/Alanin und H1-Laktat/Alanin; die durchgehende Linie zeigt die ermittelte lineare Regressionsgerade, die darüber- und darunterliegenden gestrichelten Linien geben das 95%-Konfidenzintervall an; $R^2=0,148$; $n=20$

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Tumorerogenität im HCC der Ratte mittels C13-Spektroskopie und der Validation der Spektroskopie-Ergebnisse mittels konventioneller Methoden. Es wurde eine signifikante Korrelation des Laktat/Alanin-Verhältnisses in der C13-Spektroskopie mit dem Vorliegen eines Tumors gefunden. Auch in den konventionellen Methoden der LDH/GPT Aktivität und der Protonenspektroskopie konnte dieser signifikante Unterschied nachgewiesen werden und zudem signifikant nach histologischem Bild differenziert werden. Die Ergebnisse der Laktat/Alanin-Verhältnisse in der C13-Spektroskopie korrelierten in der Regressionsbestimmung signifikant positiv linear mit den Ergebnissen der LDH/GPT-Bestimmung und positiv linear, jedoch nicht signifikant mit den Ergebnissen der Protonenspektroskopie.

Darüber hinaus ist in allen Ergebnissen eine starke Überdispersion zu beobachten. Unter Überdispersion versteht man im statistischen Zusammenhang, wenn die gemessenen Werte eine gewisse Variabilität aufweisen und somit eine unbeobachtete Heterogenität vorliegt, was in diesem Fall auf Unterschiede in den metabolischen Eigenschaften der Tumore hindeutet.

4.2 Wahl des Versuchsmodells

Zur Erforschung des HCC steht ein weites Spektrum an Versuchsmodellen zur Verfügung, was sich auf die in Kapitel 1.1.1 erläuterte Relevanz des HCC in der Medizin zurückführen lässt. Bereits die Wahl des Versuchstiers ist hierbei von Bedeutung. Häufig wird die Maus als Versuchsmodell herangezogen, bei dem aufgrund der häufigen Verwendung eine große Auswahl an speziesspezifischen molekularen und genetischen Werkzeugen verfügbar ist.

Bildgebungsstudien werden jedoch durch die Begrenzung der durchschnittlichen Größenentwicklung des Versuchstiers limitiert [55-57]. Sie erschwert die Datenerhebung

und begrenzt zudem die Größe des sich entwickelnden Tumors. Aus diesem Grund wurde die Ratte als Versuchstier gewählt, in welcher sich, im Vergleich zur Maus, bei höherer Körpermasse auch ein größerer Tumor bilden kann.

4.3 DEN

4.3.1 Vorteile der HCC-Induktion mittels DEN

Ziel war es, ein möglichst realitätsnahes Modell heranzuziehen, das auch die Problematik der Komorbiditäten beim Menschen und der Heterogenität des HCC mitberücksichtigt.

Die Qualität einer Untersuchungsmethode hängt ab von ihrer erzielten Sensitivität und Spezifität. Die beim Menschen häufig gleichzeitig zum HCC vorliegende Zirrhose stellt dabei eine Herausforderung bei klinischen Studien dar. Insbesondere in der Erprobung neuer Pharmazeutika sowie in der Bildgebung können aufgrund diskrepanter Rahmenbedingungen präklinische Ergebnisse für die translationale Medizin unbrauchbar werden [62].

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das mit DEN induzierte HCC der Ratte eine gute Vergleichbarkeit mit menschlichen Kontrollgruppen aufweist [63] und zudem mit einer hohen Tumorpenetranz einhergeht [59].

Die Tumorentstehung bei Induktion mit DEN ähnelt aufgrund seines Wirkmechanismus der des HCC. DEN wirkt lebertoxisch, wie beim Menschen z.B. der übermäßige Alkoholkonsum, wodurch auch hier der Tumor auf Basis einer chronischen Leberschädigung entsteht [64]. In der DEN-Leber ist eine verstärkte Fibrose nachweisbar, und es zeigen sich die für Lebertoxizität typischen Veränderungen wie Gallengangshyperplasie und vermehrte Mitose. Unmittelbar vor Tumorentwicklung kann ein signifikanter Anstieg der Leberenzyme GPT und GOT verzeichnet werden [59]. Somit können viele der zum menschlichen HCC publizierten metabolischen Vorgänge in diesem Modell des HCC der Ratte nachvollzogen werden, wodurch es eine gute Basis für eine klinische Ergebnistranslation bildet.

Die Studienlage zeigt, dass die HCC-Induktion mittels DEN sowohl inter- als auch intraindividuelle Tumorheterogenität gewährleistet [59]. Diese spiegelt sich auch in der

Bildgebung und in den Diffusions- und Perfusionswerten wider, welche in der Bildgebung beim HCC des Menschen Beachtung finden [38]. Im Vergleich zum orthotopen Modell, bei dem sich nur G3-Tumoren bilden, wurde nach DEN-Induktion die Bildung dysplastischer Knoten als Präkanzerose nachgewiesen und die Tumoren verzeichneten ein Grading von G1 bis G3 [59].

Die Tumorinduktion mittels DEN ist daher das beste derzeit zur Verfügung stehende Modell, um unter Laborbedingungen einen beim Menschen auffindbaren Tumorbefund möglichst adäquat zu repräsentieren [59].

4.3.2 Nachteile der HCC-Induktion mittels DEN

Limitiert ist das Modell vor allem aufgrund schwer beeinflussbarer Faktoren. So wird das mit DEN versetzte Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Das ermöglicht eine hohe Variabilität der individuellen Trinkmenge und somit der daraus folgenden Toxinexposition. DEN ist kanzerogen und wirkt in größeren Mengen akut toxisch. Daher kann eine frühzeitige Tumorentwicklung resultieren oder bei übermäßiger Toxinaufnahme auch der Tod des Versuchstiers aufgrund toxischer Komplikationen, noch bevor die Versuchsreihe startet. Auf der anderen Seite kann eine zu geringe Toxinaufnahme eine unzureichende Tumorentwicklung und somit die Exklusion des Individuums aus der Versuchsreihe bedingen.

Im Vergleich der gesunden Leber im orthotopen Tumormodell erfolgte durch die Induktion mittels DEN aufgrund der hohen Toxizität eine Leberparenchymschädigung, welche die Leberzirrhose beim Menschen widerspiegeln soll. In der histopathologischen Analyse wurde dieser Gewebeschaden jedoch eher als Fibrose gewertet, nicht als Zirrhose [59], welche wiederum beim humanen HCC überwiegt.

Die entzündlichen Leberveränderungen beeinflussen zudem die Messungen und wirken sich auf Kontrast und Signal-Rausch-Verhältnis aus. Dabei ist es unklar, inwieweit in diesen Versuchen das anatomisch benachbarte Gefäßsystem Hyperpolarisat transportiert und das Signal der Voxel im Tumor beeinflusst hat. Eine höhere Auflösung sowie ein höheres SNR lassen sich unter Verwendung einer Oberflächenspule erzeugen, welche jedoch nur bei oberflächlich oder subkutan liegenden Tumoren angewendet

werden kann und aufgrund der anatomischen Lage der Rattenleber hier keine Verwendungsmöglichkeit hatte.

Auch die ökonomischen Aspekte sind zu beachten. Die Tumorinduktion mittels DEN ist ein zeit- und kostenaufwendiges Verfahren. Aufgrund der Kanzerogenität ist die Tierhaltung während der Toxinexposition unter spezifischen Laborbedingungen mit engmaschiger Kontrolle des Gesundheitsstatus der Tiere notwendig, was neben den Haltungskosten auch einen hohen Personalaufwand bedingt. Eine Tumorentstehung unmittelbar im Anschluss an 8 Wochen DEN-Induktion ist zudem nicht garantiert. Die Induktion nach Exposition kann bis zum Erreichen einer für die Messungen adäquaten Tumorgöße mehrere Wochen dauern.

Im Gegensatz dazu wird das sonst häufig verwendete Verfahren der orthotopen Tumordinjektion bei zuverlässiger, zeitnaher Tumorentstehung als ein kostengünstiges und zeiteffizientes Modell angesehen, das häufig in präklinischen Studien Anwendung findet [61, 62].

4.4 Limitationen des Versuchsmodells

4.4.1 Makrometabolismus und Ernährung

Aus Versuchen an der gesunden Leber im Rattenmodell ist bekannt, dass das Verhältnis von Laktat zu Alanin bei regelmäßiger Nahrungszufuhr signifikant geringer ist als nach 24 Stunden Nahrungskarenz [67]. Es ist daher anzunehmen, dass die Ernährung ein wichtiger Faktor für die Ergebnisinterpretation ist.

In der Vergangenheit wurde demonstriert, dass das in der murinen Leber metabolisierte C13-Alanin aus hyperpolarisiertem C13-Pyruvat von physiologischen Vorgängen wie denen des Fastens beeinflussbar ist [67]. Diese Beobachtung ist gestützt durch vorangegangene Metabolismusstudien, welche belegen, dass Alanin als Hauptsubstrat für die Gluconeogenese herangezogen wird, wie zum Beispiel infolge des Fastens [64-66]. Dabei ist die Dauer der Nahrungskarenz entscheidend. So konnte ein signifikanter Unterschied der Gluconeogenese aus Alanin nachgewiesen werden bei Gegenüberstellung des Metabolismus nach 12 Stunden bzw. 24 Stunden Fasten [69].

Die Verfügbarkeit der Nahrung *ad libitum* kann daher einen nicht homogenen Ernährungszustand innerhalb der Versuchsgruppe zur Folge haben. Untersuchungen legen nahe, dass eine daraus resultierende Adipositas oder gegebenenfalls tumorbedingte Kachexie einen fraglichen, wenn auch bisher nicht untersuchten Einfluss auf die Ergebnisse haben kann [65, 66].

Auch die makromolekulare Zusammensetzung der Nahrung kann ein Störfaktor sein. Das ist vor allem bei translationaler Interpretation der Ergebnisse zu beachten, da die Ernährung von Mensch und Ratte unterschiedlich ist.

4.4.2 Probenentnahme und Konservierung

Die Zeit von der Injektion und C13-MRSI bis zur Kryokonservierung der Organproben birgt Anfälligkeit für Störfaktoren. Während die C13-Spektroskopie direkt im Anschluss an die Injektion erfolgte, fand die Organentnahme erst nach der Bildakquisition statt. Zusätzliche zeitliche Verzögerung wurde verursacht durch die benötigte Zeit zur Entnahme des Tieres aus dem MRT und der Durchführung der Euthanasie. Erst im Anschluss daran erfolgten die Organentnahme und die Konservierung in flüssigem Stickstoff.

In dieser Zeit kann ein Ausschwemmen des Substrats aus der zu untersuchenden Geweberegion oder eine Verschiebung des Gleichgewichts auf den Seiten der Enzymreaktionen stattfinden. Hierdurch ist eine Verfälschung der Validierungsergebnisse möglich, was die hohen Schwankungen in der Regression des C13 und des protonenspektroskopischen Laktat/Alanin-Verhältnisses erklären könnte.

Aufgrund der geringen Tumorgröße und der Aufteilung des Tumors zur Untersuchung in der Histologie, klinischen Chemie und Protonenspektroskopie ist es möglich, dass die entnommenen Proben nicht exakt den in der C13-Spektroskopie untersuchten Leberregionen entsprachen und somit die Ergebnisse verfälschten. Auch intratumorale Variabilität konnte in diesem Kontext vorhanden und nicht beachtet worden sein.

4.4.3 Methodenstabilität

Die C13-MRSI ist noch kein etabliertes und standardisiertes Verfahren, auch die Anwendung in Laboren weltweit ist derzeit begrenzt und nicht standardisiert. Es bleibt unklar, inwieweit sich Abweichungen beim Pipettieren, bei Injektion, Pufferherstellung, Materialbeschaffenheit und Raumtemperatur auf die Messungen auswirken.

4.4.4 C13 Limitationen

Die Signalstärke der C13-Spektroskopie ist maßgeblich abhängig vom Polarisationsniveau des injizierten Substrats, in diesem Fall des C13-Pyruvats. Dieses wird beeinflusst durch die für die Polarisation zur Verfügung stehende Zeit. Das Polarisationsniveau kann somit schwanken und Messfehler im Bereich der Signalstärke bedingen. In der Versuchsreihe wurde darauf geachtet, ein Polarisationsniveau von mindestens 95% vor Pufferung und Injektion zu erreichen.

Der Zustand der Hyperpolarisation ist zeitlich begrenzt mit relativ kurzer Halbwertszeit (<60 Sekunden, abhängig von der Feldstärke B_0 , Temperatur, Lösungsmittelzusammensetzung: pH-Wert, Ionenstärke, Konzentration des Metaboliten) [67, 68]. Für experimentelle Messungen hat das zur Konsequenz, dass die zur Datenerhebung verfügbare Zeit sehr limitiert ist. Nach vollständiger Relaxation ist der hyperpolarisierte Status verloren und die Signalstärke entsprechend klein. Der Hyperpolarisationsverlust wird verursacht durch die eingestrahlten Anregungspulse, die natürliche T1- und T2-Relaxation und Mechanismen wie dipolare Kopplung, Spin-Spin-Kopplung und chemische Verschiebungs-Anisotropie [72].

Zu beachten ist zudem, dass in der Messung mit FID-CSI die Schichtdicke in der C13-MRSI entsprechend groß gewählt wird, um eine ausreichende Signalstärke zu gewährleisten (in dieser Arbeit verwendete Schichtdicke: 5 mm). Dies steht im Gegensatz zu einer hohen Auflösung, welche für die Detektion eines Tumors und die Aussagefähigkeit bezüglich des Metabolismus erstrebenswert wäre. Zusammengefasst schränken diese Punkte die Anwendung beim Menschen ein. Um eine humane Leber zu untersuchen, ist es erforderlich, ein im Verhältnis zur Rattenleber großes Volumen in nur einer Messung zu untersuchen. Um das zu realisieren, wären

unter Beachtung des schnellen Signalverfalls durch den Hyperpolarisationsverlust für ein hochauflösendes MRSI-Bild mehrere Injektionen Pyruvat notwendig. In Anbetracht der zeitaufwendigen Aufbereitung und Hyperpolarisation der Injektionslösung wird die Umsetzung beim Menschen hier limitiert.

Gemäß der Warburg-Hypothese erfolgt überwiegend die Metabolisierung von Pyruvat zu Laktat und Alanin (vgl. Kapitel 1.1.4). Der gesamte Zellmetabolismus ist jedoch wesentlich umfangreicher. Bei der C13-Spektroskopie ist entsprechend nur eine partielle Darstellung und Evaluation des Metabolismus möglich. Die Anwendungsmöglichkeiten einer Untersuchung mit C13-Pyruvat sind somit insbesondere in Hinblick auf die Therapieevaluation eingeschränkt, da vornehmlich Substanzen beurteilt werden können, welche in den darstellbaren Teil des Metabolismus eingreifen. Substanzen, welche diese Voraussetzungen erfüllen, sind zum Beispiel FX11 als LDHA-Inhibitor oder BPTES als GPT-Inhibitor [21, 69].

Der Substratmetabolismus ist dabei abhängig von der Enzymaktivität (vgl. Kapitel 4.7.2 und 4.7.3). Es ist zu beachten, dass die Reaktion und die Signalstärke auch von der Verfügbarkeit notwendiger Coenzyme wie NADH abhängig ist [55], welche im Versuch nicht berücksichtigt wurden.

Das injizierte Pyruvat wird zudem nicht nur in der Leber, sondern auch im restlichen Körpergewebe metabolisiert. Hierdurch anfallendes Laktat kann über das Blut transportiert und in das gut vaskularisierte Tumorgewebe eingeschwemmt werden, wo es somit zu einer Signalverfälschung kommt. Wespi et al. demonstrierten, dass die vorangehende Sättigung des in der Leber produzierten Laktats im MRSI zu einer Änderung von $9,7 \pm 0,6$ % des myokardialen Laktatsignals führen kann [74].

4.5 FID-CSI

Aufgrund des Hyperpolarisationsverlusts des injizierten Substrats (siehe auch Kapitel 4.4.4) ist eine schnelle Datenerhebung in der Spektroskopie notwendig. Bisherige Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Messung mittels FID-CSI hierfür geeignet ist [75]. In der Literatur wurde FID-CSI als eine robuste Sequenz beschrieben, welche bei

kurzer Akquisitionszeit die Messung der Daten in einer spezifischen Schichtdicke und Matrix (hier verwendet: 12x12) bei gutem SNR und benignem Artefaktverhalten bietet [70, 71]. Das SNR in der Modellmessung am Phantom konnte in der Literatur in einer niedrigauflösenden 8x8-Matrix sowie einer hochauflösenden 16x16-Matrix am Versuchstier bestätigt werden [75]. Die Sequenz wird in der Anwendung limitiert, da nur eine statische und keine dynamische Datenakquisition möglich ist [70, 71]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnten außer den in der Literatur vorbeschriebenen Artefakten [75] keine weiteren Artefakte verzeichnet werden.

4.6 Statistik

Im Vergleich der Laktat/Alanin-Verhältnisse in der C13-Spektroskopie verzeichnete die Ergebnisse in der Gruppe mit dysplastischem Knoten bzw. mit HCC nur grenzwertig signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 9, S. 27). Das Fehlen der Signifikanz ist mutmaßlich durch die Kohortengröße zu erklären. Hinzu kommt die zu beobachtende Überdispersion, welche einen Hinweis auf weitere Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen liefert.

4.7 Vergleich mit aktueller Literatur

4.7.1 Heterogenität

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist die Beurteilung des Metabolismus durch C13-MRSI eingeschränkt. Sie kann dennoch Aufschluss geben über Aspekte, die Einzug in Theorien zum Tumormetabolismus gefunden haben, wie z.B. den Warburg-Effekt (vgl. Kapitel 1.1.4).

Die von Daemen et al. (vgl. Kapitel 1.1.5) ermittelte metabolische Heterogenität des Pankreaskarzinoms liefert neue Aspekte zur Tumordifferenzierung [21], welche in der Forschung an Tumoren wie dem HCC Beachtung finden sollte.

In der Tumorguppe weisen die Ergebnisse des Laktat/Alanin-Verhältnisses in der C13-MRSI sowie in der Protonenspektroskopie und auch des LDH/GPT-Verhältnisses

eine weite Streuung auf (vgl. Abbildung 9, S. 27, Abbildung 14, S. 30, Abbildung 14, S. 32) und liefern so Hinweise auf metabolische Unterschiede innerhalb des HCC. Das unterstützt die Theorie der intertumoralen Heterogenität und damit die Hypothese von Daemen et al. [21], dass Stoffwechselunterschiede innerhalb des gleichen Tumortyps existieren können. Eine solche metabolische Heterogenität kann sich, wie von Daemen demonstriert, auf das Therapieansprechen auswirken und bietet daher neue Aspekte, die es weiter zu evaluieren gilt.

Heterogenität verursacht jedoch auch Herausforderungen. Um eindeutige Aussagen und zuverlässige Interpretationen der MRSI-Spektren zu gewährleisten, wird ein stets gleichbleibender Bezugsrahmen benötigt. Eventuell vorhandene Variabilität der einzelnen Tumorspektren könnte daher die Funktionalität der C13-MRSI maßgeblich einschränken. Wiederholungsmessungen mit zeitlichem Abstand zeigen jedoch, dass das Signal über mehrere Tage stabil bleibt, und liefern so die Bestätigung für die Wiederholbarkeit der Messungen.

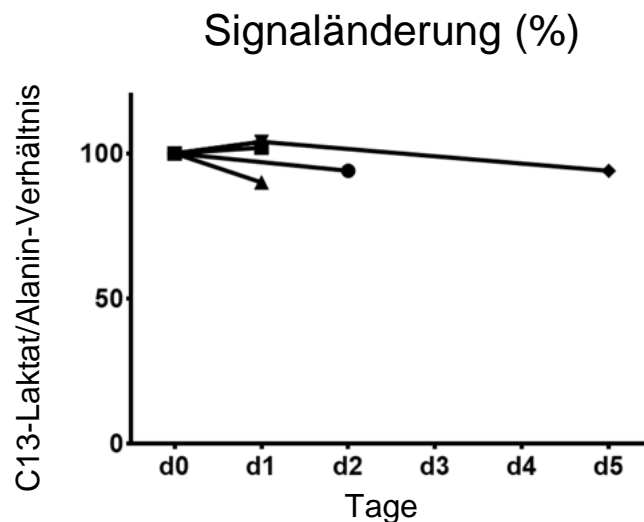


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses: Das Signal in der C13-MRSI blieb über den Zeitraum von bis zu 5 Tagen stabil; n=5

4.7.2 Laktat-Status

Die Zelle nimmt Glucose über den Glucosetransporter 1 (GLUT-1) auf. In der Glykolyse wird die Glucose zu Pyruvat metabolisiert. Laktat entsteht in der Zelle durch die Konversion von Pyruvat unter Verwendung von NADH zu Laktat und NAD⁺. Die Reaktion ist reversibel und wird von dem Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert.

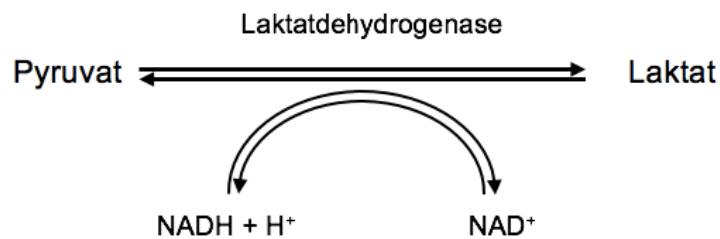
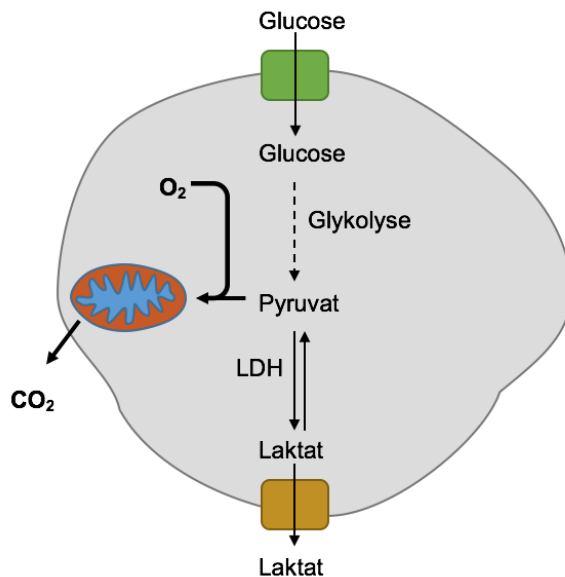


Abbildung 17: Funktionsweise der Laktatdehydrogenase: LDH katalysiert die reversible Reaktion von Pyruvat und NADH zu Laktat und NAD⁺.

Das anfallende Laktat wird über die Monocarboxylat Transporter MCT-1 und MCT-4 im Kotransport mit Protonen aus der Zelle geschleust [77]. Wie in Kapitel 1.1.4 erläutert, wird in Tumorzellen vermehrt Laktat gebildet, bekannt unter dem Warburg-Effekt.

A: Gesunde Zelle



B: Tumorzelle

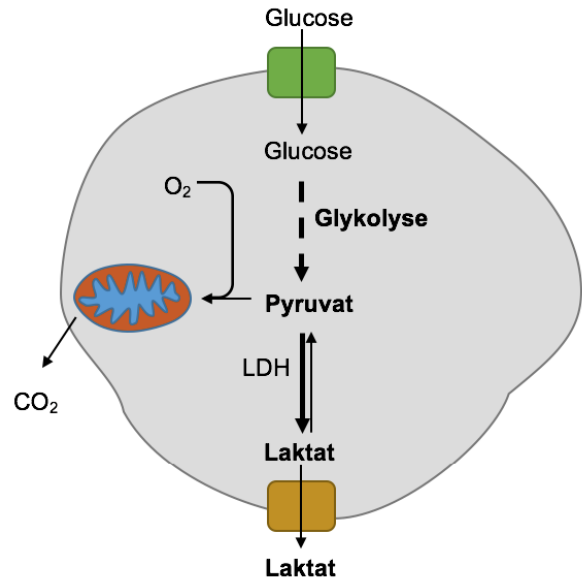


Abbildung 18: Der Warburg Effekt und die aerobe Glykolyse: Die Glucose wird über den Glucosetransporter GLUT-1 in die Zelle aufgenommen und in der Glykolyse schrittweise in Pyruvat umgewandelt. In der gesunden Zelle wird das Pyruvat in die Mitochondrien eingeschleust, wo es mit Sauerstoff durch Oxydative Phosphorylierung zur ATP-Synthese verwendet wird (A). In der Tumorzelle wird das Pyruvat vorzugsweise zu Laktat umgewandelt und über den Transporter MCT-1 sezerniert (B).

Eine Bolusinjektion von exogen zugeführtem C13-Pyruvat führt zu einer anschließenden konstitutiven Erhöhung von C13-Laktat im untersuchten Gewebe [52, 72-76]. Eine vermehrte Konversion von Pyruvat zu Laktat kann durch eine erhöhte Enzymaktivität der LDH verursacht werden.

Die LDH wird aus 4 Untereinheiten zusammengesetzt. Für diese gibt es drei Gene, LDHA, LDHB und LDHC [83], jeweils für eine verschiedene Untereinheit des Enzyms codierend. Je nach Kombination bilden sich unterschiedliche Isoenzyme.

Bereits 1956 wurde nachgewiesen, dass Tumorzellen verstärkt das Gen der Laktatdehydrogenase-A (LDHA) exprimieren, wodurch die LDH-5 gebildet wird. Diese katalysiert bevorzugt die Reaktion von Glucose zu Laktat [84]. Eine Erhöhung von LDHA im HCC Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Lebergewebe wurde am orthotopen Mausmodell nachgewiesen [79, 80], was die vermehrte Laktatproduktion bedingen kann.

Ein erhöhtes Laktat im HCC im Vergleich zum gesunden Lebergewebe ist aus vorherigen Studien am DEN-induzierten HCC-Modell bekannt [50, 79-81]. Die Ergebnisse decken sich somit mit den aktuellen Forschungsergebnissen.

4.7.3 Alanin-Status

Alanin kann in der Zelle unter anderem durch die Reaktion der Alanin-Aminotransferase (ALT) gebildet werden. Die ALT, auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) genannt, katalysiert im Zytoplasma die Umwandlung von Pyruvat und Glutamat zu Alanin und α -Ketoglutarat. Diese Reaktion ist reversibel.

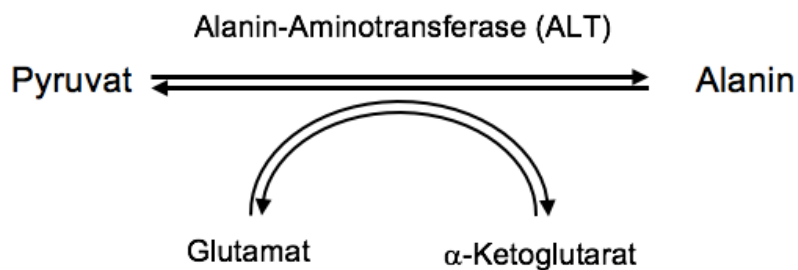


Abbildung 19: Reaktion der Alanin-Aminotransferase: Im Zytoplasma katalysiert die ALT die Umwandlung von Alanin und α -Ketoglutarat zu Pyruvat und Glutamat. Die Reaktion ist reversibel.

Im orthotopen Mausmodell des HCC wurde eine Erhöhung der GPT im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Lebergewebe nachgewiesen [79, 80]. Eine vermehrte Konversion von Pyruvat zu Alanin kann durch eine erhöhte Enzymaktivität der GPT verursacht werden.

Erhöhtes Alanin im HCC Tumorgewebe ist aus vergangenen Studien am DEN-induzierten HCC-Modell bekannt [79-81]. Die Ergebnisse decken sich somit mit den aktuellen Forschungsergebnissen am HCC.

4.7.4 Label exchange

Bei jeder katalysierten, reversiblen chemischen Reaktion stellt sich auf den Seiten von Substrat und Produkt ein chemisches Gleichgewicht ein, so auch bei der Reaktion von Pyruvat zu Laktat. Diese durch das Enzym bedingte Hin- und Rückreaktion von C13-markiertem Substrat wird *label exchange* genannt. Day et al. demonstrierten im Mausmodell anhand von C13-Pyruvat und dessen Konversion zu C13-Laktat, dass die Hinzugabe hyperpolarisierten C13-markierten Substrats den bereits vorhandenen Bestand und das Gleichgewicht widerspiegelt. Die Vergrößerung des endogenen Laktat-Bestands durch Hinzufügen von nichtmarkiertem C12-Laktat bei gleichzeitiger Gabe von hyperpolarisiertem C13-Pyruvat hatte eine entsprechende Erhöhung des C13-Laktat-Signals zur Folge [52, 83]. Dies legt nahe, dass sich eine Verschiebung des Gleichgewichts auch im gemessenen C13-Spektrum zeigt und die Relation von Endprodukten, wie das Laktat/Alanin-Verhältnis, als realistisch gewertet werden kann.

4.7.5 Laktat/Alanin-Verhältnis

Auch in der Forschung an anderen Tumoren wurde gezeigt, dass intravenös verabreichtes C13-Pyruvat vom Tumorgewebe aufgenommen und neben Laktat zu Alanin metabolisiert wird. Brindle et al. demonstrierten im Pankreaskarzinom dabei eine Zunahme des Konzentrationsverhältnisses von C13-Laktat zu C13-Alanin, bei zunehmender Entdifferenzierung des Tumors [89].

Dieser Aspekt wurde am HCC bisher noch nicht weitergehend untersucht. Am cMyc-HCC-Mausmodell wurde demonstriert, dass mit zunehmender Entartung des Tumors die LDHA-Aktivität sowie die Konversion von Pyruvat zu Laktat zunimmt. Die GPT-Aktivität sowie die Konversion von Pyruvat zu Alanin erreicht im prä-tumoralen Stadium einen Höhepunkt, während sie im hochgradigen Tumor rückläufig ist [53]. Darpolor et al. verzeichneten erhöhtes C13-Laktat und C13-Alanin im orthotopen HCC-Modell der Maus und stellten zudem eine positive Korrelation von Tumorprogredienz und dem Verhältnis von LDH/GPT bzw. Laktat/Alanin im Tumor dar, welche *in vivo* mittels C13-Spektroskopie ermittelbar waren [85].

Die Ergebnisse aus der Validierung mittels Protonenspektroskopie stützen daher die These, dass die Messungen der C13-Spektren den tatsächlichen endogenen Laktat- bzw. Alanin-Bestand und das damit verbundene Laktat/Alanin-Verhältnis im Tumor repräsentieren. Auch Serrao et al. untersuchten 2018 ihre C13-Messungen ebenfalls durch *ex vivo* Tumorentnahme nach C13-Injektion im Lymphom am Mausmodell und konnten ihre gemessenen C13-Ergebnisse bestätigen [90].

5 Ausblick

Mit der C13-Spektroskopie lässt sich gesundes Lebergewebe von entartetem Lebergewebe auf Stoffwechselebene differenzieren. Somit existiert eine Methode, um potenziell Aussagen zur Metabolik des HCC *in vivo* zu treffen. Die Varianz der Messwerte innerhalb der Gruppen stützen zudem die These der metabolischen Heterogenität. Zur möglichen Differenzierung in unterschiedliche Stoffwechseltypen mittels C13-Spektroskopie sind weitere Studien notwendig. Für eine translationale Anwendung ließen sich auf diesem Gebiet gewonnene Erkenntnisse zur Entwicklung neuer Substanzgruppen nutzen, welche anschließend gezielt zur Pharmakotherapie eines metabolischen Tumortyps eingesetzt werden können. Das bietet langfristig die Möglichkeit einer maximal effektiven, individualisierten Präzisionstherapie, was entscheidende Auswirkungen auf das Patienten-Outcome haben kann.

6 Zusammenfassung

Hintergrund

Krebserkrankungen der Leber sind die vierthäufigste Krebsart mit Todesfolge weltweit. 75% - 85% des primären Leberkrebses sind ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) [1], welches sich häufig auf Basis einer Leberzirrhose bildet [2]. Das HCC gilt als genetisch heterogener Tumor [9]: Eine Vielzahl genetischer Veränderungen können zur Entstehung des HCC beitragen [13] und führen durch Kumulation zu intra- und intertumoraler Heterogenität, was sich wiederum auf das Therapieansprechen auswirkt [12, 17].

Auf zellulärer Ebene können die genetischen Veränderungen regulierend in den Stoffwechsel eingreifen. Ein gut untersuchtes Phänomen ist hierbei der sogenannte Warburg-Effekt, welcher besagt, dass vermehrt Laktat aus Pyruvat gebildet wird [18, 88-92]. Die Forschung legt nahe, dass darüber hinaus noch eine exaktere, metabolische Subtypisierung eines Tumors möglich ist [21]. Die aktuell der Klinik zur Verfügung stehenden Bildgebungsmethoden ermöglichen zwar die Diagnose des HCC, jedoch können *in vivo* keine weiterführenden Aussagen über den tumoralen Stoffwechsel getroffen werden [35, 40]. Die Entwicklung neuer, MRSI-zugänglicher Substrate und deren Aufbereitung zur intravenösen Applikation lieferten neue Erkenntnisse und Forschungsmöglichkeiten. Durch i.v.-Injektion von hyperpolarisiertem C13-markiertem Pyruvat, und der Darstellung der Substratkonversion des injizierten Pyruvats im MRSI wurde die Evaluation des Metabolismus ermöglicht [47-49]. Die bisherigen Studienergebnisse zeigen, dass diese Technik in Zukunft auch zur Therapieevaluation genutzt werden kann [50-52]. Gegenstand dieser Arbeit ist es, die in der C13-MRSI gemessenen Daten auf Validität zu prüfen.

Methode

Es wurde das Versuchsmodell der Ratte gewählt. Es erfolgte eine endogene Tumorinduktion durch Verabreichung von DEN über das Trinkwasser. Am Ende wurden Proben von 4 Kontrolltieren mit gesunden Lebern und insgesamt 13 Ratten mit Tumoren

in die Versuchsreihe aufgenommen aus denen 16 Tumore hervorgingen, davon 5 im Stadium der Präkanzerose und 11 manifeste Tumoren. Das C13-MRSI mit FID-CSI als Akquisitionsschema wurde nach intravenöser Bolus-Applikation von C13-Pyruvat durchgeführt. Die *ex vivo* Validation erfolgte mittels Protonenmagnetresonanzspektroskopie und photometrischer Bestimmung der Enzymaktivität aus Tumorproben der im Anschluss an das C13-MRSI explantierten Leber.

Ergebnisse

In der C13-Spektroskopie konnte im Vergleich von gesundem Lebergewebe mit Tumorgewebe ein signifikant höheres Laktat/Alanin-Verhältnis nachgewiesen werden ($p=0,039$), im Direktvergleich mit Gewebe mit dysplastischem Knoten bzw. HCC war hier ein nicht signifikanter Trend zu verzeichnen ($p=0,064$ bzw. $p=0,078$). Die Ergebnisse der klinischen Chemie zeigten ebenfalls eine erhöhte LDH/GPT Aktivität in Tumorgewebe ($p=0,001$) aber auch im Vergleich in Gewebe mit dysplastischem Knoten ($p=0,016$) und HCC ($p=0,04$). Die gleichen Ergebnisse konnten in der Protonenspektroskopie nachgewiesen werden mit im Vergleich erhöhtem Laktat/Alanin Verhältnis in Tumor ($p=0,009$), Gewebe mit dysplastischem Knoten ($p=0,032$) und HCC ($p=0,019$) im Vergleich mit gesundem Lebergewebe. Die Ergebnisse der Laktat/Alanin-Verhältnisse in der C13-Spektroskopie korrelierten in der Regressionsbestimmung signifikant positiv linear mit den Ergebnissen der LDH/GPT-Bestimmung ($p=0,004$, $R^2=0,376$) und positiv linear, nicht signifikant mit denen der Protonenspektroskopie ($p=0,094$, $R^2=0,148$).

Schlussfolgerung

Mit der C13-Spektroskopie lässt sich gesundes Lebergewebe von entartetem Lebergewebe auf Stoffwechselebene differenzieren. Somit existiert eine Methode, um potenziell Aussagen zur Metabolik des HCC *in vivo* zu treffen. Die Überdispersion der Messergebnisse in der Tumorgruppe legt zudem nahe, dass es auch innerhalb der Gruppe mit Tumor noch Stoffwechselunterschiede gibt. Dies stützt die These zur tumoralen metabolischen Heterogenität [21]–[23]. Hierzu können weitere Studien Aufschluss geben und neue therapierelevante Erkenntnisse liefern.

7 Summary

Title: Validation of ^{13}C magnetic resonance spectroscopic imaging via nuclear magnetic resonance spectroscopy and clinical chemistry of DEN induced HCC of the rat

Background:

Liver cancer is the 4th leading cause of cancer related death world-wide. 75%-85% of primary liver tumors are hepatocellular carcinomas (HCC), which develop from liver cirrhosis. A variety of mutations contribute to HCC development, causing a large genetic inter- and intratumoral heterogeneity. Due to these various combinations of gene alterations, responses to treatment of HCC differ from patient to patient. Such mutations also affect the cellular metabolism, such as the Warburg-effect, one of the most common metabolic adaptation of tumor cells. It describes an increased conversion rate of intracellular pyruvate to lactate. Recent scientific findings suggest that HCC can be more precisely categorized, based on their metabolic properties. Current diagnostic methods do not enable metabolic specifications *in vivo*.

The development of intravenously injectable substrates which can be detected by hyperpolarized magnetic resonance spectroscopic imaging (HPMRSI) now offer new information and possibilities to assess tumor metabolism *in vivo*. The measurement of intravenously injected hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ -pyruvate and its metabolites via HPMRSI enables for the evaluation of tumor cell metabolism in living organisms. Current research shows that this method can also be used to evaluate treatment responses. The subject of this work is the validation of $[1-^{13}\text{C}]$ HPMRSI acquired data.

Method: For this project the chosen animal model was the rat. Endogenous tumor induction was performed by oral administration of diethyl-nitrosamine. 4 healthy controls and 13 tumor-bearing rats with 16 tumors in total were included into the experiments, of which 5 were in a pre-cancerous state of dysplastic nodule and 11 displayed a manifested HCC. HPMRSI was performed after bolus injection of $[1-^{13}\text{C}]$ -pyruvate and with FID-CSI as acquisition scheme. *Ex vivo* validation was done via nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and photometric measurement of enzyme activity.

Results:

HPMRSI revealed a significantly higher lactate/alanine ratio in tumor tissue than in healthy tissue ($p=0,039$). The comparison of healthy control liver tissue to HCC and dysplastic tumor showed a non-significant trend ($p=0,064$ and $p=0,078$). Enzyme activity also showed significantly higher activity in tumor tissue than in healthy liver tissue ($p=0,001$), but also significant differences when comparing healthy liver tissue to dysplastic nodule ($p=0,016$) and HCC ($p=0,04$). The same results were found in NMR spectroscopy, showing significantly higher lactate/alanine ratio in tumor tissue ($p=0,009$), as well as in tissue with dysplastic nodule ($p=0,032$) or HCC ($p=0,019$) in comparison to a healthy liver. There was a significant linear positive correlation of $[1-^{13}\text{C}]$ -lactate/alanine ratio with enzyme activity ($p=0,004$, $R^2=0,376$) and a linear positive but not significant correlation ($p=0,094$, $R^2=0,148$) of $[1-^{13}\text{C}]$ -lactate/alanine ratio and NMR spectroscopic lactate/alanine ratio. Additionally, tumor lactate/alanine ratios were over-dispersed, suggesting metabolic differences within the tumor group.

Conclusion:

$[1-^{13}\text{C}]$ HPMRSI is a valid method to metabolically differentiate tumor from healthy liver tissue and offers a possibility to evaluate metabolic activity in HCC *in vivo*. Over-dispersion of results in the tumor group indicates varying metabolic activities of the tumors. This supports the hypothesis of metabolic heterogeneity. Additional studies in the field may lead to further therapeutically relevant information.

8 Literaturverzeichnis

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018.
- [2] A. Forner, J. M. Llovet, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma.," *Lancet (London, England)*, vol. 379, no. 9822, pp. 1245–55, Mar. 2012.
- [3] J.-L. Raoul, "Natural History of Hepatocellular Carcinoma and Current Treatment Options," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 38, no. 2, pp. S13–S18, Mar. 2008.
- [4] R. S. O'Shea, S. Dasarathy, and A. J. McCullough, "Alcoholic liver disease," *Hepatology*, vol. 51, no. 1, pp. 307–328, Jan. 2010.
- [5] M. Asim, M. P. Sarma, L. Thayumanavan, and P. Kar, "Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population.," *Clin. Biochem.*, vol. 44, no. 14–15, pp. 1235–40, Oct. 2011.
- [6] R. K. Ross *et al.*, "Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma.," *Lancet (London, England)*, vol. 339, no. 8799, pp. 943–6, Apr. 1992.
- [7] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, "Global cancer statistics, 2002," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 55, no. 2, pp. 74–108, 2002.
- [8] J. Ertle *et al.*, "Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis.," *Int. J. cancer*, vol. 128, no. 10, pp. 2436–43, May 2011.
- [9] S. S. Thorgeirsson and J. W. Grisham, "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.," *Nat. Genet.*, vol. 31, no. 4, pp. 339–46, Aug. 2002.
- [10] P. A. Farazi and R. A. DePinho, "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 9, pp. 674–87, Sep. 2006.
- [11] J. Bruix, G. J. Gores, and V. Mazzaferro, "Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives," *Gut*, vol. 63, no. 5, pp. 844–855, May 2014.

- [12] R. a Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, and C. Swanton, "The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution.," *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 338–45, Sep. 2013.
- [13] K. Schulze *et al.*, "Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets.," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 5, pp. 505–511, May 2015.
- [14] J.-C. Nault, S. Rebouissou, and J. Zucman Rossi, "NRF2/KEAP1 and Wnt/ β -catenin in the multistep process of liver carcinogenesis in humans and rats.," *Hepatology*, vol. 62, no. 3, pp. 677–9, Sep. 2015.
- [15] C. Guichard *et al.*, "Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma.," *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 6, pp. 694–8, May 2012.
- [16] R. Mazzanti, U. Arena, and R. Tassi, "Hepatocellular carcinoma: Where are we?," *World J. Exp. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 21–36, Feb. 2016.
- [17] J. Friemel *et al.*, "Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1951–1961, Apr. 2015.
- [18] O. Warburg, F. Wind, and E. Negelein, "THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 519–30, Mar. 1927.
- [19] F. Hirschhaeuser, U. G. A. Sattler, and W. Mueller-Klieser, "Lactate: a metabolic key player in cancer.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 22, pp. 6921–5, Nov. 2011.
- [20] R. A. Cairns, I. S. Harris, and T. W. Mak, "Regulation of cancer cell metabolism.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 85–95, Feb. 2011.
- [21] A. Daemen *et al.*, "Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 32, pp. E4410-7, Aug. 2015.
- [22] E. Björnson *et al.*, "Stratification of Hepatocellular Carcinoma Patients Based on Acetate Utilization.," *Cell Rep.*, vol. 13, no. 9, pp. 2014–2026, Dec. 2015.
- [23] G. Bidkhori *et al.*, "Metabolic network-based stratification of hepatocellular

carcinoma reveals three distinct tumor subtypes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 50, pp. E11874–E11883, Dec. 2018.

- [24] S. Lee *et al.*, “Network analyses identify liver-specific targets for treating liver diseases.,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 13, no. 8, p. 938, Aug. 2017.
- [25] C. C. Maley *et al.*, “Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma.,” *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 4, pp. 468–73, Apr. 2006.
- [26] D. R. Caswell and C. Swanton, “The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome,” *BMC Med.*, vol. 15, no. 1, p. 133, Dec. 2017.
- [27] S. Turajlic and C. Swanton, “Metastasis as an evolutionary process,” *Science (80-.)*, vol. 352, no. 6282, pp. 169–175, Apr. 2016.
- [28] N. Andor *et al.*, “Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity.,” *Nat. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 105–13, Jan. 2016.
- [29] S. Kiryu *et al.*, “Impact of hepatocellular carcinoma heterogeneity on computed tomography as a prognostic indicator.,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 12689, Oct. 2017.
- [30] A. B. Turke *et al.*, “Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC.,” *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 77–88, Jan. 2010.
- [31] K.-Y. Su *et al.*, “Pretreatment Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) T790M Mutation Predicts Shorter EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Response Duration in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 4, pp. 433–440, Feb. 2012.
- [32] L. A. Diaz *et al.*, “The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers.,” *Nature*, vol. 486, no. 7404, pp. 537–40, Jun. 2012.
- [33] M. J. Niederst *et al.*, “RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer.,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 6377, Mar. 2015.
- [34] M. Janiszewska *et al.*, “In situ single-cell analysis identifies heterogeneity for PIK3CA mutation and HER2 amplification in HER2-positive breast cancer,” *Nat.*

Genet., vol. 47, no. 10, pp. 1212–1219, Oct. 2015.

- [35] G. Siravegna *et al.*, “Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients.,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 795–801, Jul. 2015.
- [36] A. N. Hata *et al.*, “Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition,” *Nat. Med.*, vol. 22, no. 3, pp. 262–269, Mar. 2016.
- [37] European Association For The Study Of The Liver and European Organisation For Research And Treatment Of Cancer, “EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma.,” *J. Hepatol.*, vol. 56, no. 4, pp. 908–43, Apr. 2012.
- [38] “Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms,” *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, AWMF Registriernummer: 032-0530L, Langversion 1.0, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, no. Langversion 1.0, pp. 1–153, 2013.*
- [39] W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe, and H. Moch, *Pathologie*, 5. Aulage. München: Elsevier GmbH, 2012.
- [40] J.-Y. Choi, J.-M. Lee, and C. B. Sirlin, “CT and MR Imaging Diagnosis and Staging of Hepatocellular Carcinoma: Part I. Development, Growth, and Spread: Key Pathologic and Imaging Aspects,” *Radiology*, vol. 272, no. 3, pp. 635–654, Sep. 2014.
- [41] J.-Y. Choi, J.-M. Lee, and C. B. Sirlin, “CT and MR Imaging Diagnosis and Staging of Hepatocellular Carcinoma: Part II. Extracellular Agents, Hepatobiliary Agents, and Ancillary Imaging Features,” *Radiology*, vol. 273, no. 1, pp. 30–50, Oct. 2014.
- [42] A. Sangiovanni *et al.*, “The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis,” *Gut*, vol. 59, no. 5, pp. 638–644, May 2010.
- [43] J.-N. Talbot *et al.*, “Detection of hepatocellular carcinoma with PET/CT: a

- prospective comparison of 18F-fluorocholine and 18F-FDG in patients with cirrhosis or chronic liver disease.,” *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 1699–706, Nov. 2010.
- [44] G. Öz *et al.*, “Clinical Proton MR Spectroscopy in Central Nervous System Disorders,” *Radiology*, vol. 270, no. 3, pp. 658–679, Mar. 2014.
- [45] C. Majós *et al.*, “Brain Tumor Classification by Proton MR Spectroscopy: Comparison of Diagnostic Accuracy at Short and Long TE,” *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 25, no. 10, pp. 1696 LP – 1704, Nov. 2004.
- [46] A. Horská and P. B. Barker, “Imaging of brain tumors: MR spectroscopy and metabolic imaging.,” *Neuroimaging Clin. N. Am.*, vol. 20, no. 3, pp. 293–310, Aug. 2010.
- [47] S. Ulmer and F. J. Ahlhelm, “MR Spectroscopy in Neuroradiology,” in *Applications of NMR Spectroscopy*, vol. 2, Bentham Science Publishers, 2015, pp. 93–120.
- [48] I. Mader, S. Rauer, P. Gall, and U. Klose, “(1)H MR spectroscopy of inflammation, infection and ischemia of the brain.,” *Eur. J. Radiol.*, vol. 67, no. 2, pp. 250–7, Aug. 2008.
- [49] R. A. de Graaf, *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques: 2nd Edition*. 2007.
- [50] J. H. Ardenkjaer-Larsen *et al.*, “Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10158–10163, Sep. 2003.
- [51] K. Golman, J. H. Ardenkjaer-Larsen, J. S. Petersson, S. Mansson, and I. Leunbach, “Molecular imaging with endogenous substances,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 18, pp. 10435–10439, Sep. 2003.
- [52] K. Golman, R. in ’t Zandt, and M. Thaning, “Real-time metabolic imaging,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 30, pp. 11270–11275, Jul. 2006.
- [53] S. Hu *et al.*, “13C-Pyruvate Imaging Reveals Alterations in Glycolysis that Precede c-Myc-Induced Tumor Formation and Regression,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 1, pp. 131–142, Jul. 2011.

- [54] S. J. Nelson *et al.*, “Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 198, p. 198ra108, Aug. 2013.
- [55] S. E. Day *et al.*, “Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized ¹³C magnetic resonance imaging and spectroscopy,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 11, pp. 1382–1387, Nov. 2007.
- [56] C. Hundhammer *et al.*, “Simultaneous characterization of tumor cellularity and the Warburg effect with PET, MRI and hyperpolarized ¹³C-MRSI.,” *Theranostics*, vol. 8, no. 17, pp. 4765–4780, 2018.
- [57] H. Wu, A. D. Southam, A. Hines, and M. R. Viant, “High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics,” *Anal. Biochem.*, vol. 372, no. 2, pp. 204–212, Jan. 2008.
- [58] J. Keeler, *Understanding NMR spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 2013.
- [59] C. Gross *et al.*, “Model Matters: Differences in Orthotopic Rat Hepatocellular Carcinoma Physiology Determine Therapy Response to Sorafenib,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 19, pp. 4440–4450, Oct. 2015.
- [60] F. Heindryckx, I. Colle, and H. Van Vlierberghe, “Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 90, no. 4, pp. 367–386, Aug. 2009.
- [61] P. Newell, A. Villanueva, S. L. Friedman, K. Koike, and J. M. Llovet, “Experimental models of hepatocellular carcinoma,” *J. Hepatol.*, vol. 48, no. 5, pp. 858–879, May 2008.
- [62] M.-A. Wörns and P. R. Galle, “HCC therapies—lessons learned,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 7, pp. 447–452, Jul. 2014.
- [63] J.-S. Lee and S. S. Thorgeirsson, “Comparative and integrative functional genomics of HCC,” *Oncogene*, vol. 25, no. 27, pp. 3801–3809, Jun. 2006.
- [64] M. Polasek *et al.*, “Molecular MR imaging of liver fibrosis: A feasibility study using rat and mouse models,” *J. Hepatol.*, vol. 57, no. 3, pp. 549–555, Sep. 2012.

- [65] H. R. Cho *et al.*, "Sprague-Dawley rats bearing McA-RH7777 cells for study of hepatoma and transarterial chemoembolization.," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 223–30, Jan. 2013.
- [66] J. W. Choi *et al.*, "Blood oxygen level-dependent MRI for evaluation of early response of liver tumors to chemoembolization: an animal study.," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 5, pp. 1887–92, May 2013.
- [67] S. Hu *et al.*, "In Vivo Carbon-13 Dynamic MRS and MRSI of Normal and Fasted Rat Liver with Hyperpolarized ¹³C-Pyruvate," *Mol. Imaging Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 399–407, Nov. 2009.
- [68] P. Felig, "The glucose-alanine cycle," *Metabolism*, vol. 22, no. 2, pp. 179–207, Feb. 1973.
- [69] S. M. Cohen, "Carbon-13 and phosphorus-31 NMR study of gluconeogenesis: utilization of carbon-13-labeled substrates by perfused liver from streptozotocin-diabetic and untreated rats," *Biochemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 563–572, Jan. 1987.
- [70] S. M. Cohen, "Carbon-13 NMR study of the effects of fasting and diabetes on the metabolism of pyruvate in the tricarboxylic acid cycle and of the utilization of pyruvate and ethanol in lipogenesis in perfused rat liver," *Biochemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 581–589, Jan. 1987.
- [71] N. Chattergoon *et al.*, "Field dependence of T₁ for hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 8, no. 1, pp. 57–62, Jan. 2013.
- [72] H.-O. Kalinowski, S. Berger, and S. Braun, *Carbon-13 NMR spectroscopy*. New York: Georg-Thieme-Verlag, 1984.
- [73] A. Le *et al.*, "Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 5, pp. 2037–2042, Feb. 2010.
- [74] P. Wespi, J. Steinhauser, G. Kwiatkowski, and S. Kozerke, "Overestimation of cardiac lactate production caused by liver metabolism of hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate," *Magn. Reson. Med.*, vol. 80, no. 5, pp. 1882–1890, Nov. 2018.

- [75] M. Durst *et al.*, "Comparison of acquisition schemes for hyperpolarised ^{13}C imaging," *NMR Biomed.*, vol. 28, no. 6, pp. 715–725, Jun. 2015.
- [76] Y.-F. Yen *et al.*, "Imaging considerations for in vivo ^{13}C metabolic mapping using hyperpolarized ^{13}C -pyruvate," *Magn. Reson. Med.*, vol. 62, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2009.
- [77] A. P. HALESTRAP and N. T. PRICE, "The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation," *Biochem. J.*, vol. 343, no. 2, pp. 281–299, Oct. 1999.
- [78] A. P. Chen *et al.*, "Hyperpolarized C-13 spectroscopic imaging of the TRAMP mouse at 3T—Initial experience," *Magn. Reson. Med.*, vol. 58, no. 6, pp. 1099–1106, Dec. 2007.
- [79] M. J. Albers *et al.*, "Hyperpolarized ^{13}C Lactate, Pyruvate, and Alanine: Noninvasive Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Grading," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 20, pp. 8607–8615, Oct. 2008.
- [80] C. S. Ward *et al.*, "Noninvasive Detection of Target Modulation following Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition Using Hyperpolarized ^{13}C Magnetic Resonance Spectroscopy," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 4, pp. 1296–1305, Feb. 2010.
- [81] M. I. Kettunen *et al.*, "Magnetization transfer measurements of exchange between hyperpolarized [1- ^{13}C]pyruvate and [1- ^{13}C]lactate in a murine lymphoma," *Magn. Reson. Med.*, vol. 63, no. 4, pp. 872–880, Apr. 2010.
- [82] Y.-F. Yen *et al.*, " $T(2)$ relaxation times of (^{13}C) metabolites in a rat hepatocellular carcinoma model measured in vivo using (^{13}C)-MRS of hyperpolarized [1- (^{13}C)]pyruvate.," *NMR Biomed.*, vol. 23, no. 4, pp. 414–423, May 2010.
- [83] S. S. Li, W. M. Fitch, Y. C. Pan, and F. S. Sharief, "Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A4 (muscle), B4 (heart), and C4 (testis).," *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 11, pp. 7029–7032, Jun. 1983.
- [84] R. D. Goldman, N. O. Kaplan, and T. C. Hall, "Lactic dehydrogenase in human metastatic tissues," *Cancer Res.*, vol. 24, no. 27, pp. 389–99, 1964.

- [85] M. M. Darpolor *et al.*, “In vivo MRSI of hyperpolarized [1-13C]pyruvate metabolism in rat hepatocellular carcinoma,” *NMR Biomed.*, vol. 24, no. 5, pp. 506–513, Jun. 2011.
- [86] E. A. Bard-Chapeau *et al.*, “Transposon mutagenesis identifies genes driving hepatocellular carcinoma in a chronic hepatitis B mouse model,” *Nat. Genet.*, vol. 46, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2014.
- [87] J. Wang *et al.*, “1H-NMR-based metabolomics of tumor tissue for the metabolic characterization of rat hepatocellular carcinoma formation and metastasis,” *Tumor Biol.*, 2011.
- [88] K. M. Brindle, S. E. Bohndiek, F. A. Gallagher, and M. I. Kettunen, “Tumor imaging using hyperpolarized 13C magnetic resonance spectroscopy,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 66, no. 2, pp. 505–519, Aug. 2011.
- [89] E. M. Serrao *et al.*, “MRI with hyperpolarised [1- 13 C]pyruvate detects advanced pancreatic preneoplasia prior to invasive disease in a mouse model,” *Gut*, vol. 65, no. 3, pp. 465–475, Mar. 2016.
- [90] E. M. Serrao *et al.*, “Analysis of 13 C and 14 C labeling in pyruvate and lactate in tumor and blood of lymphoma-bearing mice injected with 13 C- and 14 C-labeled pyruvate,” *NMR Biomed.*, vol. 31, no. 5, p. e3901, May 2018.
- [91] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, “Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation,” *Science (80-.)*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, May 2009.
- [92] M. Upadhyay, J. Samal, M. Kandpal, O. V. Singh, and P. Vivekanandan, “The Warburg effect: Insights from the past decade,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 137, no. 3. pp. 318–330, 2013.
- [93] M. V. Liberti and J. W. Locasale, “The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 211–218, 2016.
- [94] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, “Cancer cell metabolism: Warburg and beyond,” *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 703–707, 2008.

[95] I. San-Millán and G. A. Brooks, “Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect,” *Carcinogenesis*, vol. 38, no. 2, pp. 119–133, 2017.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Reaktionen von Pyruvat	10
Abbildung 2: Struktur von 1-13C-Pyruvat	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hyperpolarisation	15
Abbildung 4: Beispielabbildung des Screenings auf Tumoren.....	18
Abbildung 5: MATLAB Skript: Darstellung des Bedienfeldes.....	21
Abbildung 6: MATLAB-Skript: Visualisierungsfenster	22
Abbildung 7: Exemplarischer Datensatz mit Auswertung der Protonenspektroskopie...	24
Abbildung 8: C13-Laktat/Alanin-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses in Kontrolle und Tumor.....	26
Abbildung 9: C13-Laktat/Alanin-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses in Kontrolle, dysplastischer Knoten und HCC.....	27
Abbildung 10: LDH/GPT-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des LDH/GPT-Verhältnisses in Kontrolle und Tumor.....	28
Abbildung 11: LDH/GPT-Verhältnis: Punktwolken mit Darstellung des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses in Kontrolle, dysplastischer Knoten und HCC.....	29
Abbildung 12: Lineare Regression der Verhältnisse von C13-Laktat/Alanin und LDH/GPT	30
Abbildung 13: Laktat/Alanin-Verhältnis der Protonenspektroskopie: Punktwolken mit Darstellung von Kontrolle und Tumor	31
Abbildung 14: Laktat/Alanin-Verhältnis der Protonenspektroskopie: Punktwolken mit Darstellung von Kontrolle, dysplastischer Knoten und HCC.....	32
Abbildung 15: Lineare Regression der Verhältnisse von C13-Laktat/Alanin und H1-Laktat/Alanin.....	33
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf des C13-Laktat/Alanin-Verhältnisses	42
Abbildung 17: Funktionsweise der Laktatdehydrogenase.....	43

Abbildung 18: Der Warburg Effekt und die aerobe Glykolyse..... 44

Abbildung 19: Reaktion der Alanin-Aminotransferase 45

Danksagung

Danken möchte ich insbesondere meiner Familie. Danke an meine Eltern, die mich von Anfang an auf vielfältigste Art und Weise unterstützt und auch in schwierigen Phasen nie den Glauben an mich verloren haben. Danke an meine Schwester, die mir mit gutem Beispiel vorangegangen ist und die mich durch Höhen und Tiefen begleitet hat. Danke auch meinen engen und lieben Freunden und meiner wundervollen Partnerin, welche mich in diesem Prozess stets unterstützt und bekräftigt haben.