

Methodenetablierung zur nichtinvasiven Detektion von
hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat im DEN-induzierten HCC
der Ratte

Selamawit Lia Gebrekidan

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin
(Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Lutz Renders

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rickmer Braren
2. Priv.-Doz. Dr. Georgios Kaissis

Die Dissertation wurde am 09.05.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.09.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Das hepatozelluläre Karzinom	3
2.1.1 Klassifikation.....	3
2.1.2 Ätiologie.....	3
2.1.3 Klinik.....	4
2.1.4 Diagnostik.....	5
2.1.4.1 Diagnosealgorithmus nach S3-Leitlinie	5
2.1.4.2 Alpha-Fetoprotein	5
2.1.4.3 Computertomographie	6
2.1.4.4 Magnetresonanztomographie	6
2.1.4.5 Sonographie	7
2.1.4.6 Positronen-Emissions-Tomographie.....	8
2.1.4.7 Leberbiopsie	9
2.1.5 Therapie	9
2.2 Tumormetabolismus.....	11
2.2.1 Glukosemetabolismus	11
2.2.1.1 Aerobe Glykolyse	12
2.2.1.2 Anaerobe Glykolyse	13
2.2.2 Warburg-Effekt	13
2.2.3 Metabolomik	14
2.3 Magnetresonanzspektroskopie	15
2.3.1 ¹³ C-Magnetresonanzspektroskopie	15
2.3.2 Physikalische Grundlagen	16
2.3.3 Sequenzen der ¹³ C-Magnetresonanzspektroskopie	19
2.3.3.1 FID-CSI	19
2.3.3.2 EPSI	21
2.3.4 Hyperpolarisation.....	21
2.3.4.1 Electron Paramagnetic Agents	22
2.3.4.2 Einfluss von Gadolinium auf die Signalverstärkung.....	23
2.3.4.3 Das thermodynamische DNP-Modell.....	24
2.3.4.4 Dissolution	24
2.4 Diethylnitrosamin-induziertes HCC am Rattenmodell	25
3 Materialien und Methoden	26
3.1 Versuchstiere	26
3.2 Hyperpolarisation von ¹³ C-Pyruvat	28
3.3 MR-Bildgebung	29
3.4 MR-Spektroskopie.....	30
3.5 Signal-zu-Rausch-Verhältnis.....	31
3.6 Histologie	32
3.6.1 Anfertigung der Gewebeschnitte	32
3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
3.6.3 Immunhistochemie	32

3.7	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Detektionsraten der ¹³ C-Metabolite	34
4.2	Signal-zu-Rausch-Verhältnis in der EPSI- und in der FID-CSI-Kohorte	36
4.2.1	Pyruvat	36
4.2.2	Laktat	37
4.2.3	Alanin	38
4.3	EPSI-Signal im zeitlichen Verlauf	38
4.4	Laktat-Alanin-Verhältnis in Abhängigkeit von der Histologie	40
4.4.1	EPSI-Kohorte	40
4.4.2	FID-CSI-Kohorte	40
4.5	Laktat-Alanin-Verhältnis in Abhängigkeit von der GLUT1-Rezeptor- Expression	41
4.6	Spektrale Artefakte in der EPSI-Sequenz	42
5	Diskussion	43
5.1	DEN-Modell	43
5.2	Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Detektionsrate der Metabolite	43
5.3	Laktat-Alanin-Verhältnis im HCC	44
5.4	Laktatproduktion in Tumorzellen in Abhängigkeit von der GLUT1- Expression	45
5.5	Spektrale Artefakte in der EPSI-Sequenz	45
5.6	Metabolische Bildgebung im Vergleich: ¹³ C-Magnetresonanzspektroskopie vs. PET	46
6	Ausblick	49
7	Zusammenfassung	51
8	Publikationen	52
9	Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

^{18}F -FDG	^{18}F -Fluordesoxyglucose
a.u.	Arbitrary Unit
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AFP	Alpha-Fetoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
B_0	äußeres Magnetfeld
B_{eff}	effektives Magnetfeld
B_i	induziertes Magnetfeld
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CSI	Chemical Shift Imaging
CT	Computertomographie
DEN	Diethylnitrosamin
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Electron Paramagnetic Agent
EPSI	Echoplanar Spectroscopic Imaging
ESR	Elektronenspinresonanz
FADH_2	Flavinadenindinucleotid (reduziert)
FID	Free Induction Decay
FT	Fourier-Transformation
GLUT1	Glukosetransporter 1
GTP	Guanosintriphosphat
H_2O	chemische Summenformel von Wasser
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (engl.: Hepatocellular Carcinoma)
HCV	Hepatitis-C-Virus
HF-Puls	Hochfrequenz-Puls
M	Molar
mBar	Millibar

μl	Mikroliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
mW	Milliwatt
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PARP14	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 14
PBS	Phosphate-buffered Saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKM2	Pyruvatkinase 2
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: Signal-to-noise Ratio)
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxide
T	Tesla
TACE	transarterielle Chemoembolisation
ω	Larmorfrequenz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des aeroben und anaeroben Glukosemetabolismus	12
Abbildung 2: Larmorpräzession.....	17
Abbildung 3: FID-Signal als Funktion der Zeit	20
Abbildung 4: Ausrichtung der Kernspins im externen Magnetfeld B_0	22
Abbildung 5: Fixierte Leberprobe mit zwei Tumorherden (*)	27
Abbildung 6: HyperSense DNP-Polarizer	29
Abbildung 7: Anatomische T2-gewichtete Bildgebung der Leber und der Tumorregion (gestrichelter Kreis) (A). Fusion des anatomischen und des spektroskopischen Datensatzes (B). Laktat- und Pyruvatspektren in der Tumorregion nach Fourier-Transformation gemittelt über den gesamten Messzeitraum (C). Dynamische Laktatkurve in der Tumorregion im zeitlichen Verlauf (D).....	31
Abbildung 8: Detektionsraten des Pyruvat-Signals mit EPSI und FID-CSI	34
Abbildung 9: Detektionsraten des Laktat-Signals mit EPSI und FID-CSI	35
Abbildung 10: Detektionsraten des Alanin-Signals mit EPSI und FID-CSI	35
Abbildung 11: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Pyruvat mit EPSI und FID-CSI ..	36
Abbildung 12: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Laktat mit EPSI und FID-CSI.....	37
Abbildung 13: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Alanin mit EPSI und FID-CSI.....	38
Abbildung 14: Signalintensität von Pyruvat im zeitlichen Verlauf	39
Abbildung 15: Signalintensität von Laktat im zeitlichen Verlauf.....	39
Abbildung 16: Laktat-Alanin-Verhältnis in den Tumoren der EPSI-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte	40
Abbildung 17: Laktat-Alanin-Verhältnis in den Tumoren der FID-CSI-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte	41
Abbildung 18: Laktat-Alanin-Verhältnis in Abhängigkeit von der GLUT1-Rezeptor-Expression.....	42
Abbildung 19: Spektrales Artefakt des ^{13}C -Pyruvat-Signals in der Aorta.....	42

1 Einleitung

Das primäre Leberkarzinom ist die sechsthäufigste Tumorerkrankung weltweit und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache (McGlynn et al., 2015). Jährlich sterben weltweit 745 000 Menschen an Leberkrebs (vgl. Tabelle 1). Die Inzidenz liegt mit 782 000 neu auftretenden Fällen pro Jahr leicht über der Mortalitätsrate. Ein Großteil der Neuerkrankungen und Todesfälle tritt in Entwicklungsländern auf, wobei die höchsten Raten in Asien und Afrika vorzufinden sind. Alleine in China treten 50 % aller Neuerkrankungen und Todesfälle auf. Nord-, Zentral- und Osteuropa sowie Zentralasien weisen weltweit die niedrigsten Raten auf. Es besteht zudem ein deutlicher geschlechtsbezogener Unterschied: Die Prävalenz unter der männlichen Bevölkerung ist mehr als doppelt so hoch wie unter der weiblichen (Torre et al., 2015).

Tabelle 1: Epidemiologie des hepatozellulären Karzinoms (Torre et al., 2015)

	Geschätzte Anzahl der Neuerkrankungen		Geschätzte Anzahl der Todesfälle	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
weltweit	554 000	228 100	521 000	224 500
entwickelte Länder	92 000	42 300	80 400	43 400
Entwicklungsländer	462 000	185 800	440 600	181 100

Bereits 1924 machte der Biochemiker und Physiologe Otto Warburg die Beobachtung, dass Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen eine veränderte Glukoseverwertung aufweisen. Während in normal differenzierten Zellen Energie in erster Linie durch aerobe Glykolyse erzeugt wird, gewinnt die Mehrheit der Tumorzellen ihre Energie selbst bei adäquater Sauerstoffversorgung durch anaerobe Glykolyse, wodurch vermehrt Laktat produziert wird. Dieser Mechanismus wird als *Warburg-Effekt* bezeichnet (Vander Heiden et al., 2009). Die Mehrzahl der Tumorzellen weist zudem eine vermehrte Expression von GLUT1-Rezeptoren auf, die eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme in die Zelle spielen (Carvalho et al., 2011).

Die ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie ist ein auf der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) basierendes Verfahren und ermöglicht die Messung kleiner endogener Metabolite des Intra- und Extrazellulärums. Auf diese Weise können Veränderungen in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, beispielsweise in der Glykolyse, im Citratzyklus und in der Fettsäuresynthese dargestellt werden (Kurhanewicz et al., 2008). ^{13}C -Pyruvat wird im Rahmen der anaeroben Glykolyse durch das Enzym Laktatdehydrogenase zu ^{13}C -Laktat abgebaut. Alternativ wird ^{13}C -Pyruvat durch das Enzym Alanin-Aminotransferase zu ^{13}C -Alanin verstoffwechselt (Chaumeil et al., 2015, S. 9). Das Laktat-Alanin-Verhältnis kann somit als ein indirektes Maß für die Ausprägung des Warburg-Effekts herangezogen werden.

Die vorliegende Arbeit soll durch die Anwendung der ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie mit hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat zeigen, inwieweit der Warburg-Effekt ein charakteristisches Merkmal des hepatozellulären Karzinoms (HCC) darstellt. Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit Diethylnitrosamin(DEN)-induzierten Lebertumoren verwendet. Als Referenz wurden klinisch gesunde, unbehandelte Kontrolltiere eingesetzt. Im ersten Schritt wurden Veränderungen des Tumormetabolismus durch eine In-vivo-Quantifizierung des Laktat-Alanin-Verhältnisses untersucht. Für die ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie wurden die Sequenzen EPSI (Echoplanar Spectroscopic Imaging) und FID-CSI (FID: Free Induction Decay; CSI: Chemical Shift Imaging) angewandt, die hinsichtlich ihrer Sensitivität zur Detektion der verschiedenen Metaboliten und ihrem Signal-zu-Rausch-Verhältnis untersucht wurden. Im zweiten Schritt fand eine Ex-vivo-Validierung der Versuchsergebnisse statt. Es erfolgte eine histologische Einordnung der Tumore als Präkanzerose oder als HCC. Präkanzerosen, HCCs und gesunde Proben wurden im Hinblick auf Unterschiede des Laktat-Alanin-Verhältnisses untersucht. Nach immunhistochemischer Aufarbeitung des Probenmaterials wurde zudem untersucht, ob die GLUT1-Expression eine Korrelation mit dem Laktat-Alanin-Verhältnis aufweist.

Eine Übertragung der Versuchsergebnisse in die klinische Praxis könnte einen wichtigen Beitrag zur nichtinvasiven Charakterisierung der Tumorheterogenität, zur frühzeitigen Detektion von Präkanzerosen und HCC-Läsionen, Festlegung des Therapiekonzeptes und zur Beurteilung des Therapieansprechens leisten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

2.1.1 Klassifikation

Das HCC stellt mit 70 % die häufigste Form des primären Leberkarzinoms dar (Massarweh & El-Serag, 2017). Beim fibrolamellären Karzinom handelt es sich um eine seltene Sonderform des HCC, welche vor allem jüngere Patienten zwischen 10 und 35 Jahren unabhängig von einer vorbestehenden Lebererkrankung betrifft (Lafaro & Pawlik, 2015).

Cholangiokarzinome stellen mit einem Anteil von 10 bis 20 % die zweithäufigste Form des Leberkarzinoms dar. Die genaue Ätiologie des Cholangiokarzinoms ist unbekannt, es gibt jedoch einige Faktoren, die die Entstehung der Krankheit begünstigen. Hierzu zählen unter anderem Choledochuszysten und die primär sklerosierende Cholangitis. In asiatischen Ländern spielt zusätzlich der parasitäre Befall durch Leberegel eine besondere Rolle: Das Risiko für die Entstehung eines Cholangiokarzinoms wird dadurch um das Zwei- bis Fünffache erhöht (Massarweh & El-Serag, 2017).

Das Hepatoblastom ist eine seltene Leberkrebserkrankung, die bei Kleinkindern jedoch das häufigste primäre Leberkarzinom darstellt (Hiyama, 2014).

Das Angiosarkom der Leber ist ebenfalls eine seltene Erkrankung. Es handelt sich um eine mesenchymale Neoplasie, die gerade einmal 2 % aller primären Leberkarzinome ausmacht. Ein bekannter Risikofaktor ist die Exposition gegenüber Vinylchlorid, wodurch das Risiko für die Entwicklung eines Angiosarkoms um das 45-Fache ansteigt (Ananthakrishnan et al., 2006).

2.1.2 Ätiologie

Es sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt, die die Entstehung eines HCC begünstigen. Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) gilt weltweit als die häufigste Ursache für die Entwicklung eines HCC und erhöht das Erkrankungsrisiko um das 15- bis 20-Fache (Massarweh & El-Serag, 2017). Die hohe HCC-Prävalenz in Teilen Asiens und Afrikas ist in erster Linie auf die hohe Prävalenz von chronischen HBV-Infektionen zurückzuführen (Torre et al., 2015).

In westlichen Ländern stellt eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) das größte Risiko für die Entwicklung eines HCC dar. Die Prävalenz ist in den vergangenen Jahrzehnten stark angestiegen und führt zu einer erhöhten Inzidenz und Mortalität (Dragani, 2010). Es wird geschätzt, dass sich insgesamt 75 % aller HCC-Fälle auf eine chronische HBV- oder HCV-Infektion zurückführen lassen (Bartosch, 2010).

Chronischer Alkoholabusus gilt als dritthäufigste Ursache für eine HCC-Erkrankung. Neben den entzündlichen Veränderungen und Leberzellnekrosen, die zu einer Leberzirrhose führen, spielt möglicherweise auch eine direkte genotoxische Wirkung des Alkohols eine Rolle bei der HCC-Karzinogenese (Testino et al., 2014).

Eine weitere Ursache für die Entstehung des HCC ist die Kontamination von Lebensmitteln mit Aflatoxinen. Hierbei handelt es sich um Mykotoxine, die von Aspergillen gebildet werden. Die Metabolisierung von Aflatoxinen durch Cytochrom-P450-Enzyme führt zur Entstehung genotoxischer Zwischenprodukte, die DNA-Addukte bilden und dadurch eine mutagene Wirkung auf das Tumorsuppressorgen p53 ausüben (Hamid et al., 2013).

In den letzten Jahrzehnten haben – insbesondere in westlichen Ländern – Lebensstilfaktoren für die Entstehung von HCC an Bedeutung gewonnen. Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 können eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung verursachen, die wiederum mit einem erhöhten Risiko für eine HCC-Erkrankung einhergeht. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines metabolischen Syndroms und der Entstehung von HCC konnte durch zahlreiche Metaanalysen belegt werden (Jang, 2016). Ein weiterer bekannter Risikofaktor ist chronischer Nikotinkonsum (Shih et al., 2012).

2.1.3 Klinik

Betroffene Patienten sind in den frühen Stadien der Erkrankung häufig asymptomatisch. In 80 % der Fälle wird die Erkrankung daher erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Zu den häufigsten Symptomen zählen Oberbauchschmerzen, eine tastbare Vergrößerung der Leber und Gewichtsverlust (Sun & Sarna, 2008). In den späten Stadien kann es durch die hepatische Dekompensation zusätzlich zu Ikterus, Anasarka, Varizenblutung und zu einer hepatischen Enzephalopathie kommen (Bialecki & Di Bisceglie, 2005).

2.1.4 Diagnostik

2.1.4.1 Diagnosealgorithmus nach S3-Leitlinie

Risikopatienten, die an einer chronischen HBV-Infektion, Fettleberhepatitis oder Leberzirrhose leiden, sollten durch halbjährliche Ultraschalluntersuchungen der Leber verlaufskontrolliert werden. Zusätzlich ist der Einsatz des serologischen Tumormarkers Alpha-Fetoprotein (AFP) möglich. Tumormarker sind aufgrund ihrer geringen Spezifität nicht für die Primärdiagnostik geeignet, können jedoch für die Verlaufsbeurteilung hilfreich sein.

Malignitätsverdächtige Leberumherde sollten unabhängig von der Größe abgeklärt werden. Zur Beurteilung der Ausdehnung und eines möglichen Gefäßeinbruchs des Tumors wird ein kontrastmittelverstärktes Schnittbildverfahren verwendet. Typischerweise zeigt sich eine arterielle Hypervaskularisation mit einem raschen „Wash-out“ des Kontrastmittels und relativer Kontrastumkehr zum umgebenden Leberparenchym. Dies gilt als ausreichend sicherer Nachweis eines HCC.

Bei malignitätsverdächtigen Leberumherden unter 2 cm ohne charakteristisches Kontrastmittelverhalten in der initialen Schnittbildgebung erreicht die Histologie die höchste Sensitivität. Leberbiopsien sollten aufgrund ihrer Invasivität nur dann durchgeführt werden, wenn der zu erwartende Befunde therapeutische Konsequenzen nach sich zieht. Bei malignitätsverdächtigen Leberumherden über 2 cm ohne charakteristisches Kontrastmittelverhalten in der initialen Schnittbildgebung wird der Einsatz eines zweiten kontrastmittelverstärkten Schnittbildverfahrens empfohlen.

Für die intrahepatische Ausbreitungsdiagnostik wird vorzugsweise die kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Treten die Tumoren multifokal auf oder liegt ein Gefäßeinbruch vor, sollte zur Abklärung extrahepatischer Herde zusätzlich eine Computertomographie (CT) des Thorax durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

2.1.4.2 Alpha-Fetoprotein

Die fetale Leber und der Dottersack erzeugen physiologisch große Mengen des Glykoproteins AFP. Innerhalb von 300 Tagen nach der Geburt fällt der AFP-Wert im Blutserum auf unter 0,1 ng/ml ab. Erhöhte Serumwerte im Erwachsenenalter sind ein Hinweis auf das Vorliegen eines HCC. Es besteht eine positive Korrelation zwischen

der Höhe des AFP-Wertes im Blut und der Tumorgöße sowie der Tumoraggressivität. Bei circa 30 % der HCC-Patienten liegen zum Diagnosezeitpunkt normale AFP-Werte vor. Der positive prädiktive Wert von AFP liegt mit 9 bis 32 % eher im niedrigen Bereich. Eine erfolgreiche Tumorresektion führt zu einem schnellen Abfall des AFP-Serumspiegels, da die Halbwertszeit von AFP nur 3 bis 5 Tage beträgt. Auch bei der Evaluation des Therapieansprechens auf nichtoperative Therapiemaßnahmen hat sich die Bestimmung des AFP-Wertes als aussagekräftige Maßnahme erwiesen. Physiologische AFP-Werte lassen nicht mit Sicherheit auf eine komplette Tumorremission schließen, die regelmäßige Überwachung des AFP-Wertes kann jedoch dabei helfen, ein Rezidiv frühzeitig zu diagnostizieren (Bialecki & Di Bisceglie, 2005).

2.1.4.3 Computertomographie

Das HCC kann in der CT-Bildgebung ein knotiges oder diffus-infiltratives Wachstumsmuster aufweisen (A. R. Reynolds et al., 2015). In der nativen Computertomographie erscheinen knotige Läsionen meistens hypodens mit deutlicher Abgrenzung zum restlichen Lebergewebe (Bücheler et al., 2006, S. 401). Intratumorale Kalzifizierungen, Hämorrhagien und Nekrosen können ein heterogenes Erscheinungsbild verursachen (Lee et al., 2012). Das HCC wird fast ausschließlich arteriell versorgt, wohingegen das gesunde Leberparenchym größtenteils durch Äste der Pfortader versorgt wird (Cazejust et al., 2014). Das HCC stellt sich in der frühen arteriellen Phase aufgrund des starken Kontrastmittel-Enhancements hyperdens zum umgebenden Parenchym dar, in der anschließenden portalvenösen und spätvenösen Phase stellt sich der Tumor bedingt durch das rasche Wash-out des Kontrastmittels hypodens dar (Herrmann & Ros, 2012, S. 1007). Während 80 bis 90 % der HCCs hypervaskulär sind, können vor allem kleinere Tumoren mit einem Durchmesser unter 2 cm auch hypovaskulär sein. Ein fehlendes Kontrastmittel-Enhancement schließt ein HCC daher nicht zwingend aus (Lee et al., 2012). Die Sensitivität der mehrphasigen kontrastmittelverstärkten CT-Untersuchung liegt bei 68 %, die Spezifität bei 93 % (Attwa & El-Etreby, 2015).

2.1.4.4 Magnetresonanztomographie

Kleinere HCC-Läsionen erscheinen in T1-gewichteten MRT-Sequenzen hypointens, während sie in T2-gewichteten Sequenzen hyperintens imponieren. Größere Tumoren

präsentieren sich in T1-gewichteten Sequenzen häufig heterogen mit Bindegewebssträngen, fettigen Degenerationen und invasivem Wachstum. Oft treten charakteristische Satellitenknoten in der Nähe der Tumorläsionen auf. Die MRT-Untersuchung der Leber kann sowohl mit als auch ohne Kontrastmittel durchgeführt werden. Zu den nativen Sequenzen gehören unter anderem die Fast-Spin-Echo-Sequenz und die Gradienten-Echo-Sequenz, deren Vorteil vor allem in der hohen Geschwindigkeit der Datenakquisition liegt. Innerhalb eines Atemzugs kann bereits ein Bild der gesamten Leber generiert werden, wodurch Atemartefakte deutlich reduziert werden können. Durch den Einsatz des Kontrastmittels Gadolinium in mehrphasigen T1-gewichteten Sequenzen kann die Detektion und Charakterisierung kleinerer HCC-Läsionen verbessert werden (Digumarthy et al., 2005). Bis zu 87 % der Tumoren mit einem Durchmesser unter 2 cm können mithilfe einer MRT-Untersuchung erkannt werden (Arif-Tiwari et al., 2014).

Ein weiteres Kontrastmittel, das für die MRT verwendet wird, ist superparamagnetisches Eisenoxid (SPIO). Hierbei handelt es sich um Nanopartikel, die von den Kupferzellen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen und phagozytiert werden. Im Gegensatz zu benignen Leberläsionen kann das HCC kein SPIO aufnehmen. Dadurch wird eine bessere Differenzierung ermöglicht (Wang, 2011).

2.1.4.5 Sonographie

Da es sich um ein kostengünstiges und nichtinvasives Verfahren handelt, ist die Sonographie zur Detektion von Lebertumoren weit verbreitet. Die Sensitivität der Untersuchung liegt bei 60 %, die Spezifität bei 90 %. Es ergeben sich allerdings Limitationen aufgrund von Untersuchererfahrung, Qualität des Sonographiegerätes oder Lage der Läsionen. Eine bestehende Zirrhose oder Fettlebererkrankung kann die Diagnostik ebenfalls erschweren. Durch die Kombination von Sonographie und dem Serummarker AFP ist es möglich, die Sensitivität auf bis zu 99 % zu erhöhen. Im B-Mode des Ultraschalls präsentieren sich kleinere Tumoren homogen und hypoechogen mit einem echoarmen Randsaum. Mit zunehmender Größe weisen die Tumoren vermehrt Fett- und Kalkeinlagerungen sowie Nekrosen auf. Im Ultraschallbild imponieren diese Tumoren heterogen, mehrheitlich jedoch hyperechogen. Mithilfe der Farbdoppler-Untersuchung kann der Blutfluss ohne den zusätzlichen Einsatz eines

Kontrastmittels untersucht werden. Durch die vermehrte Tumolvaskularität sind häufig pulsierende arterielle Flussmuster zu erkennen (Kee & Lu, 2017).

Bei vorbestehender Leberzirrhose weist die Ultraschalluntersuchung eine geringere Sensitivität und einen geringeren positiven prädiktiven Wert auf. Daher wurde sie weitgehend von der CT- und MRT-Bildgebung abgelöst. Der Einsatz der kontrastmittelverstärkten Sonographie, bei der Mikrobläschen mit einer Größe von 1 bis 10 μm eingesetzt werden, kann die Genauigkeit der Untersuchung verbessern (Bialecki & Di Bisceglie, 2005). Die Sensitivität des Verfahrens beträgt 84 %. Das hierbei eingesetzte Kontrastmittel weist eine gute Verträglichkeit auf, was vor allem bei einer gestörten Schilddrüsen- oder Nierenfunktion von Vorteil ist (Kee & Lu, 2017).

2.1.4.6 Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein funktionelles Bildgebungsverfahren, das Aufschluss über die metabolischen Vorgänge in einem Organismus gibt. Insbesondere in Kombination mit der CT hat das Verfahren bei der Diagnostik von Tumorerkrankungen zunehmend an Bedeutung gewonnen (Omami et al., 2014). Es existieren verschiedene Radiopharmaka, die je nach Fragestellung für die Bildgebung eingesetzt werden können. Beim Glukose-Analogen ^{18}F -Fluordesoxyglukose (^{18}F -FDG) handelt es sich um das am weitesten verbreitete Radiopharmakon. Nachdem ^{18}F -FDG zunächst wie herkömmliche Glukose von Zellen aufgenommen wird, erfolgt eine Phosphorylierung zu ^{18}F -FDG-Phosphat, welches von der Zelle nicht weiter verstoffwechselt werden kann. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation des Substrats in der Zelle („metabolic trapping“). Tumorzellen weisen aufgrund ihres gesteigerten Stoffwechsels einen vermehrten, quantifizierbaren FDG-Uptake auf (Kumar & Chauhan, 2013, S. 373).

Die PET basiert auf der Emission von Positronen, die durch den β^+ -Zerfall des intravenös verabreichten Radionuklids freigesetzt werden. Durch die Wechselwirkung der Positronen mit einem Elektron (Annihilation) entstehen zwei hochenergetische Photonen mit einer Energie von jeweils 511 keV, die in einem Winkel von nahezu 180 Grad ausgesandt werden. Die entstandene Vernichtungsstrahlung wird von zwei gegenüberliegenden Koinzidenzdetektoren gemessen (Ziegler, 2004, S. 3). Durch den Einsatz von gefilterten Rückprojektionen und iterativen Rekonstruktionsalgorithmen

können aus dem Rohdatensatz anschließend axiale Schichten rekonstruiert werden (Omami et al., 2014).

Die ^{18}F -FDG-PET hat sich für Diagnostik und Staging zahlreicher Krebsarten bewährt. Der potenzielle Nutzen der FDG-PET-Untersuchung für die Diagnostik des HCC muss noch evaluiert werden. Eine Studie des *PET Imaging Center of Northwest Louisiana, USA* hat gezeigt, dass der FDG-Uptake in 70 % der HCC-Läsionen erhöht ist. 100 % der Tumore mit einem Durchmesser über 5 cm konnten erfasst werden, von den Tumoren ≤ 5 cm konnten jedoch nur 25 % detektiert werden (Wolfort et al., 2010). Insgesamt liegt die Sensitivität der PET für die Detektion von HCCs lediglich bei 50 bis 68 % (Tan et al., 2011).

2.1.4.7 Leberbiopsie

Die Leberbiopsie stellt eine sichere und effektive Methode zur Diagnostik von HCC-verdächtigen Läsionen dar. Zytologische und histologische Proben können mittels einer Ultraschall- oder CT-gesteuerten perkutanen Feinnadelpunktion gewonnen werden (Russo et al., 2018). In unklaren Fällen kann eine laparoskopische Biopsie durchgeführt werden, da sie zusätzlich eine Beurteilung der Leberoberfläche erlaubt (Tannapfel et al., 2012). Die Sensitivität der Biopsie für die HCC-Diagnostik liegt bei 86 bis 96 %, die Spezifität erreicht Werte von 95 bis 100 %. Damit ist die Leberbiopsie hinsichtlich Sensitivität und Spezifität jeder anderen Methode überlegen (Sparchez & Mocan, 2018).

2.1.5 Therapie

Für die Therapie des HCC existieren verschiedene Behandlungsansätze. Um eine stadiengerechte Therapiestratifikation zu gewährleisten, sollte die Barcelona-Clinic-Liver-Cancer-Klassifikation herangezogen werden, die neben der Tumorausbreitung auch die Schwere der Lebererkrankung und den Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt (Hernández-Guerra et al., 2015). Die chirurgische Resektion ist bei Patienten ohne zirrhotische Leberveränderungen und extrahepatischen Tumorbefall die Therapie der Wahl. Liegt zusätzlich eine Leberzirrhose vor, stellt eine Lebertransplantation die beste Therapieoption dar, da neben dem Tumor auch die prognostisch bedeutende Zirrhose mitbehandelt wird (Lang & Mischinger, 2008, S. 188). Bei Lebertumoren, die keiner chirurgischen Entfernung zugänglich sind,

stehen alternativ verschiedene Ablationsverfahren zur Verfügung. Bei der Radiofrequenzablation werden elektrisch isolierte Sonden in die Leber eingebracht, die durch Applikation eines hochfrequenten Wechselstroms das Tumorgewebe erhitzen und dadurch eine Koagulationsnekrose herbeiführen. Das Verfahren erzielt gute Langzeitergebnisse bei einer Komplikationsrate von unter 2 % (Wittekind, 2006, S. 21).

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) hat als palliative Therapie breite Anwendung gefunden und wird zunehmend als Bridging-Therapie vor einer geplanten Lebertransplantation eingesetzt. Durch den kombinierten Einsatz von Chemotherapeutika und gefäßokkludierenden Partikeln werden hohe lokale Zytostatika-Spiegel erreicht, die eine Tumornekrose-Rate von bis zu 90 % erzielen (Ettorre & Laurenzi, 2020, S. 186; Fischbach, 2012, S. 676).

Die selektive interne Radiotherapie stellt ein weiteres transarterielles Verfahren zur Behandlung von Lebertumoren dar. Ähnlich wie bei der TACE wird durch den Einsatz von Mikrosphären, die den Betastrahler Yttrium-90 enthalten, eine Embolisation der tumorversorgenden Gefäße erreicht. Durch die geringe Eindringtiefe von nur wenigen Millimetern entstehen hohe lokale Strahlendosen, während das gesunde Leberparenchym geschont wird (Fischbach, 2012, S. 676). Kleinere Tumore lassen sich auch mit perkutanen Ethanolinjektionen behandeln. Unter sonographischer Kontrolle wird eine hochkonzentrierte Alkohollösung in den Tumor injiziert, die durch zelluläre Dehydratation und Obliteration der zu- und abführenden Gefäße zu einer Destruktion des Tumorgewebes führt (Sahm & Caspary, 2003, S. 215; Schäberle, 2000). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kommen systemische Therapien zum Einsatz. Sorafenib war das erste und lange Zeit einzige Medikament, das bei Patienten mit nichtresektablen HCCs eine Verlängerung der Überlebenszeit bewirkte. Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor, der durch Neoangiogenese und Induktion der Apoptose eine Verzögerung des Krankheitsprogresses bewirkt. In einer Phase-III-Studie (SHARP) konnte gezeigt werden, dass die Überlebenszeit von 7,9 Monaten in der Placebo-Gruppe auf 10,7 Monate in der Sorafenib-Gruppe anstieg. Bei Patienten mit Leberzirrhose im Child-A-Stadium und gutem Allgemeinzustand konnte sich Sorafenib als Erstlinientherapie etablieren (Huang et al., 2013, S. 85–86). Seit 2018 ist der Multikinase-Inhibitor Lenvatinib zur Erstlinientherapie zugelassen. In der randomisierten REFLECT-Studie konnte die Nichtunterlegenheit gegenüber Sorafenib

nachgewiesen werden (Telfah et al., 2018, S. 161). In therapierefraktären Fällen kann das strukturell mit Sorafenib verwandte Regorafenib als Zweitlinientherapie eingesetzt werden (Hoshida, 2019, S. 230).

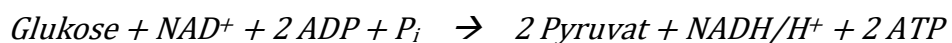
Die Lebenserwartung von HCC-Patienten ist mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 6 bis 20 Monaten gering. Trotz großer Fortschritte im diagnostischen und therapeutischen Bereich konnte die Mortalitätsrate kaum gesenkt werden. Ein großer Teil der HCC-Forschung befasst sich daher mit der frühen Identifizierung des Tumors (Bialecki & Di Bisceglie, 2005).

2.2 Tumormetabolismus

2.2.1 Glukosemetabolismus

Die Glykolyse ist der wichtigste Mechanismus zur Energiegewinnung und findet im Zytoplasma aller Zellen statt. In insgesamt zehn Schritten wird Glukose zu Pyruvat abgebaut. Außerdem werden im Rahmen der Glykolyse unter Beteiligung von oxidiertem Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+), Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) zwei Moleküle des Energieäquivalents Adenosintriphosphat (ATP) sowie zwei Moleküle reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid ($NADH/H^+$) gebildet (vgl. Abbildung 1). In Abhängigkeit von der weiteren Verstoffwechslung des Pyruvats wird zwischen der aeroben und anaeroben Glykolyse unterschieden (Kreutzig, 2006, S. 112–119).

Summenformel der Glykolyse:



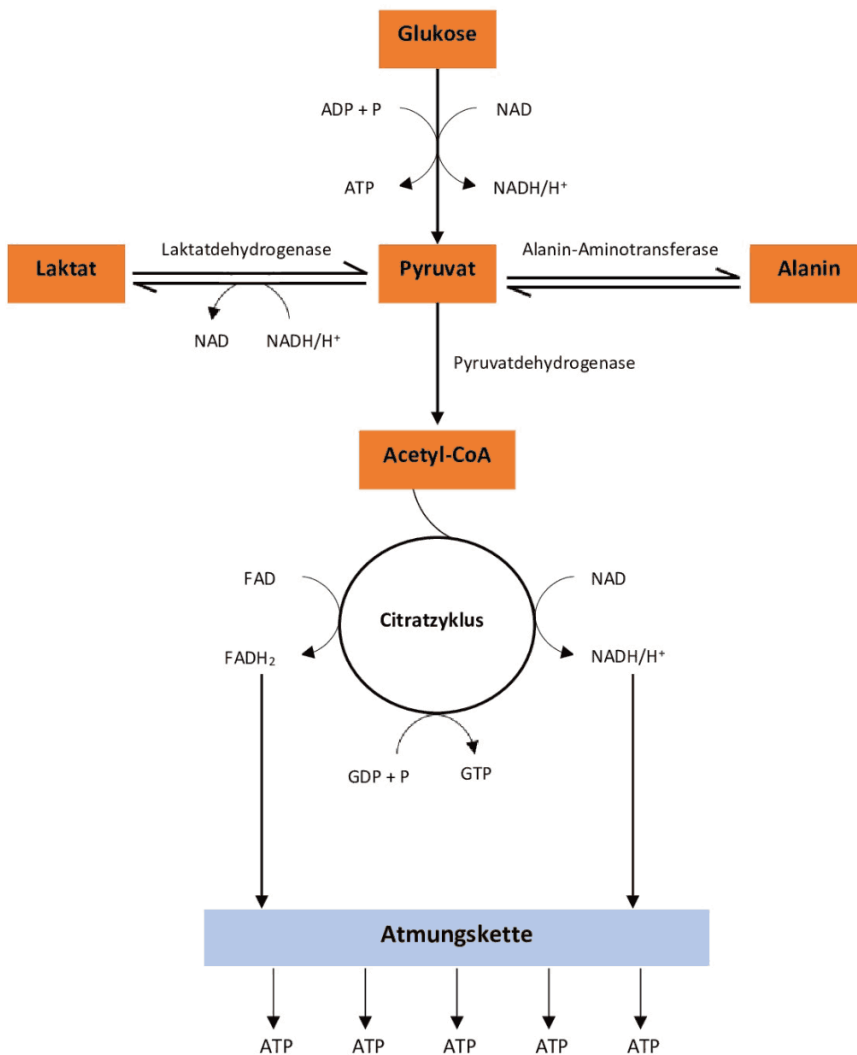


Abbildung 1: Schematische Darstellung des aeroben und anaeroben Glukosemetabolismus

2.2.1.1 Aerobe Glykolyse

Voraussetzung für die aerobe Glykolyse ist die ausreichende Versorgung der Zelle mit Sauerstoff. Durch die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat wird Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) gebildet, das in den Citratzyklus eintritt (Berg et al., 2013). Der Citratzyklus stellt eine elementare Schnittstelle des Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsels dar (Horn, 2015, S. 125).

Durch den weiteren Abbau von Acetyl-CoA zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser (H₂O) wird Energie in Form von Guanosintriphosphat (GTP) gewonnen (vgl. Abbildung 1). Außerdem entstehen die Reduktionsäquivalente NADH/H⁺ und

Flavinadenindinucleotid (FADH₂), die Elektronen und Wasserstoff für die Redoxreaktionen der Atmungskette bereitstellen (Horn, 2015, S. 245).

In der Atmungskette werden die Elektronen der Reduktionsäquivalente auf Sauerstoff übertragen, wodurch ein Protonengradient aufgebaut wird, der die Herstellung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat ermöglicht (Horn, 2015, S. 259). Je nach Literatur werden zwischen 30 und 38 ATP als Ausbeute des vollständigen oxidativen Abbaus von einem Molekül Glukose angegeben (Horn, 2015, S. 270).

2.2.1.2 Anaerobe Glykolyse

In Abwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat durch das Enzym Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert (Linnemann & Kühl, 2005, S. 247–250). Der Vorgang wird auch als anaerobe Glykolyse bezeichnet. Beim Abbau von Glukose zu Laktat findet keine Netto-Oxidation statt, daher ist der Energiegewinn gering. Durch die anaerobe Glykolyse werden zwei Moleküle ATP gebildet. In der Laktat-Dehydrogenase-Reaktion wird keine weitere Energie erzeugt, sondern das zuvor in der Glykolyse entstandene NADH/H⁺ durch Oxidation zu NAD⁺ regeneriert (vgl. Abbildung 1). Damit steht es der Glykolyse wieder zur Verfügung und ein Stillstand der Reaktionskette wird verhindert (Schartl et al., 2009, S. 148–149).

2.2.2 Warburg-Effekt

Pyruvatkinase 2 (PKM2) ist eine tumorspezifische Isoform des glykolytischen Enzyms Pyruvatkinase, das die anaerobe Glykolyse fördert und als Schlüsselregulator des Warburg-Effekts gilt. In HCCs konnte eine vermehrte Expression der antiapoptotischen Poly(ADP-ribose)polymerase 14 (PARP14) beobachtet werden, die zu einer vermehrten Aktivierung von PKM2 und dadurch zu einem Selektionsvorteil von Tumorzellen führt (Iansante et al., 2015).

Es ist nach wie vor nicht geklärt, weshalb diese Art der Energiegewinnung trotz ihrer Ineffizienz in Tumorzellen vorrangig stattfindet. Otto Warburg ging davon aus, dass Tumorzellen einen Defekt in den Mitochondrien aufweisen, der zu einer eingeschränkten oxidativen Phosphorylierung führt. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass in den meisten Tumorzellen keine Einschränkung der mitochondrialen Funktion vorliegt. Somit stellt sich die Frage, warum schnell proliferierende Zellen zu einem weniger effizienten Stoffwechsel übergehen (Potter et al., 2016).

Es gibt mehrere Hypothesen über den Nutzen, den der Warburg-Effekt für die Tumorzellen bringen könnte. Proliferierende Zellen müssen sämtliche Zellbestandteile replizieren, um zwei lebensfähige Tochterzellen zu produzieren. Dies erfordert eine große Menge an Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden. Glukose ist neben Glutamin der wichtigste Hauptlieferant für Kohlenstoff, Stickstoff, freie Energie und Reduktionsäquivalente. Die Verstoffwechslung von Glukose dient daher nicht nur der Gewinnung von ATP, sondern auch der Biosynthese komplexer organischer Substanzen. Ein Glukose-Molekül kann je nach Stoffwechselweg bis zu 38 Moleküle ATP generieren, aber nur maximal zwei Moleküle NADPH. Ein hohes Verhältnis von ATP zu ADP hemmt zudem die weitere Glykolyse. Dies würde zu einer mangelnden Produktion von Acetyl-CoA und NADPH führen, die für die Synthese von Makromolekülen essentiell sind. Der Metabolismus von Tumorzellen verfügt im Vergleich zu normalen Zellen über eine erhöhte Adaptionfähigkeit. Im Falle eines erhöhten ATP-Bedarfs steigt in Tumorzellen der Anteil der anaeroben Glykolyse an der Energiegewinnung, wohingegen die Rate der oxidativen Phosphorylierung nahezu unverändert bleibt. Dadurch könnten Tumorzellen einen Selektionsvorteil gegenüber den umliegenden Stroma- und Immunzellen im Wettbewerb um die begrenzten Energiequellen haben. (Vander Heiden et al., 2009).

Eine weitere Hypothese über den Warburg-Effekt befasst sich mit der Tumormikroumgebung. Durch die vermehrte Laktatexkretion bei der anaeroben Glykolyse sinkt der pH-Wert in der Umgebung des Tumors ab. Die Azidifizierung führt zu einer Remodellierung des umgebenden Gewebes und könnte somit die Tumordinfiltration erleichtern (Zheng, 2012).

2.2.3 Metabolomik

Lange Zeit lag der Fokus der Tumorforschung auf den genetischen Veränderungen, die mit den jeweiligen Tumorerkrankungen assoziiert sind. Die Metabolomik ist ein verhältnismäßig neuer Forschungsbereich und befasst sich mit der Erfassung sämtlicher Stoffwechselprodukte innerhalb einer Zelle beziehungsweise eines biologischen Systems. Auf diese Weise können veränderte Stoffwechselvorgänge und deren Interaktionen untereinander nachvollzogen werden. Ein großer Teil der Metabolomik-Forschung befasst sich mit der Entdeckung neuer Biomarker. Aber auch bei der Stadienbestimmung von Tumoren und zur Beurteilung des

Therapieansprechens findet die Metabolomik zunehmend Anwendung (Vermeersch & Styczynski, 2013).

2.3 Magnetresonanzspektroskopie

2.3.1 ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie

Nichtinvasive Biomarker und klinische Parameter spielen eine wichtige Rolle bei der Einschätzung der Tumoraggressivität und der Beurteilung der Therapieantwort. Während die konventionelle MRT-Technologie eine Beurteilung der Tumormorphologie ermöglicht, kann die spektroskopische Bildgebung zusätzlich Aufschluss über den Tumormetabolismus geben (Nelson et al., 2008).

Aufgrund ihres häufigen natürlichen Vorkommens und der hohen Sensitivität werden vor allem ^1H -Kerne in der Magnetresonanzspektroskopie eingesetzt. Die spektroskopische Bildgebung ist jedoch auch mit anderen Kernen möglich, hierzu gehören unter anderem ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F und ^{31}F (Hatada & Kitayama, 2004, S. 13).

^{13}C nimmt eine besondere Stellung in der NMR-Spektroskopie ein, da es Bestandteil zahlreicher biologisch relevanter Strukturen ist. Es ist das erste Molekül, das in einer klinischen Studie für die hyperpolarisierte metabolische Bildgebung am Menschen verwendet wurde, und gehört zu den am besten untersuchten Wirksubstanzen für die dynamische Kernpolarisation (DNP). ^{13}C -Pyruvat wird im Organismus genauso verstoffwechselt wie gewöhnliches Pyruvat. Es kann durch das Enzym Laktatdehydrogenase zu ^{13}C -Laktat oder durch das Enzym Alanin-Aminotransferase zu ^{13}C -Alanin abgebaut werden. Das Enzym Pyruvat-Dehydrogenase bewirkt eine Spaltung des ^{13}C -Pyruvats in Acetyl-CoA und $^{13}\text{CO}_2$, welches in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit ^{13}C -Bikarbonat steht (Chaumeil et al., 2015, S. 9).

Als Schnittstelle zahlreicher bedeutender Stoffwechselforgänge ist ^{13}C -Pyruvat von großem Nutzen in der Onkologie (Wilson & Kurhanewicz, 2014). Durch die Quantifizierung der Metabolisierung von ^{13}C -Pyruvat zu ^{13}C -Laktat ist eine direkte Beobachtung des Warburg-Effekts möglich (Hansen et al., 2018b).

2.3.2 Physikalische Grundlagen

Die Kernspinresonanzspektroskopie stellt ein grundlegendes Verfahren zur Analyse von molekularen Strukturen dar. Gebundene Wasserstoff- und Kohlenstoffatome weisen charakteristische Resonanzfrequenzen auf, die Rückschlüsse auf die molekulare Zusammensetzung einer Probe erlauben. Atomkerne besitzen einen Eigendrehimpuls (Spin) und somit auch ein magnetisches Dipolmoment. Das Verhältnis von Drehimpuls zum magnetischen Moment wird als gyromagnetisches Verhältnis γ bezeichnet. Durch das Anlegen eines statischen äußeren Magnetfeldes B_0 entlang der Längsachse z richten sich alle magnetischen Momente parallel beziehungsweise antiparallel zu B_0 aus (vgl. Abbildung 2). Aufgrund der energetisch günstigen Lage besteht ein geringer Überschuss an parallel ausgerichteten Spins, die eine messbare Gesamtmagnetisierung M_0 erzeugen. Aus dem Eigendrehimpuls des Atomkerns und der damit verbundenen Drehimpulserhaltung resultiert eine kreiselähnliche Präzessionsbewegung des magnetischen Moments um die Längsachse mit der Larmorfrequenz ω , die das Produkt des gyromagnetischen Verhältnisses γ und des magnetischen Feldes B_0 darstellt (Friebolin & Thiele, 2013, S. 45–47):

$$\omega = \gamma \cdot B_0$$

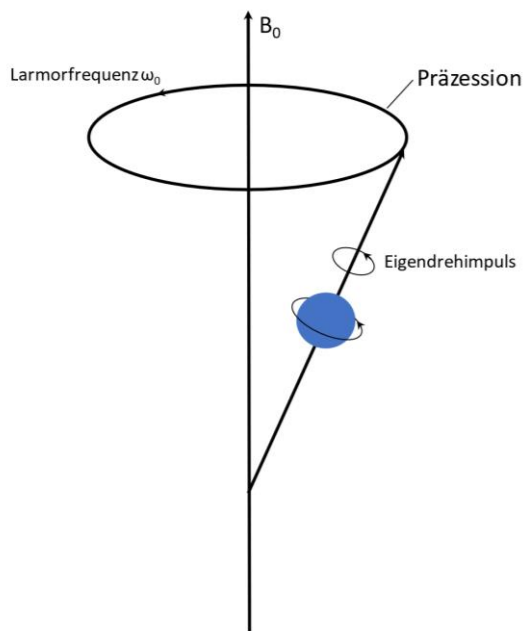


Abbildung 2: Larmorpräzession. In Molekülen sind die Atomkerne einem lokalen magnetischen Feld ausgesetzt, das von der Elektronendichteverteilung abhängig ist. Durch die Bewegung der Elektronen wird ein magnetisches Feld B_i induziert, das dem äußeren Magnetfeld entgegengesetzt ist und es somit abschwächt (Friebolin & Thiele, 2013, S. 45–47).

Das effektive Magnetfeld B_{eff} , welches auf den Atomkern wirkt, ergibt sich aus der Differenz zwischen dem äußeren magnetischen Feld B_0 und dem induzierten magnetischen Feld B_i :

$$B_{eff} = B_0 - B_i$$

Die Stärke des induzierten Magnetfeldes verhält sich proportional zum äußeren Magnetfeld. Der Proportionalitätsfaktor wird als Abschirmkonstante σ bezeichnet und ist ein Maß für die Abschwächung des äußeren Magnetfeldes:

$$B_i = \sigma \cdot B_0$$

Atome mit einer höheren Elektronendichte weisen stärkere induzierte Magnetfelder auf. Dadurch tritt eine vermehrte Abschirmung auf, die zu einer geringeren Resonanzfrequenz der Atomkerne führt. Die Varianz der Resonanzfrequenzen wird

als chemische Verschiebung δ bezeichnet und in Relation zu einer Referenzsubstanz angegeben. Hierbei handelt es sich in der Regel um Tetramethylsilan. Die chemische Verschiebung δ wird in der Einheit Parts per Million (ppm) angegeben. Während die absolute Frequenz ν vom externen magnetischen Feld abhängig ist, gibt die chemische Verschiebung δ das Verhältnis der Frequenzen wieder und ist somit von der Stärke des externen Magnetfelds unabhängig (Ernst, 1980, S. 11–14).

$$\delta = \frac{\nu_{Probe} - \nu_{Referenz}}{\nu_{Referenz}} \times 10^6$$

Durch das kurzzeitige Anlegen eines hochfrequenten Zusatzfeldes mit einem 90°-Anregungsimpuls, dessen Frequenz der Larmorfrequenz entspricht (Resonanzbedingung), kann abhängig von Dauer und Stärke des Hochfrequenz-Pulses (HF-Puls) eine phasensynchrone Auslenkung aller Kerne von bis zu 90° zum statischen Magnetfeld z erreicht werden. Die hieraus resultierende Transversalmagnetisierung M_{xy} induziert eine Wechselspannung, die mithilfe einer Spule über das Faraday'sche Induktionsgesetz gemessen werden kann (Stöcker & Shah, 2013, S. 62–64). Nach Abschalten des Wechselfeldes beginnt sich der Gleichgewichtszustand mit ausschließlich longitudinaler Magnetisierung wiederaufzubauen. Dieser Vorgang wird als Längsrelaxation T1 (Spin-Gitter-Relaxation) bezeichnet. Als T1-Zeit wird der Zeitpunkt definiert, zu dem die Längsmagnetisierung wieder 63 % ihres Ausgangswertes erreicht hat. In der x-y-Ebene kommt es nach Beendigung des Radiofrequenz-Impulses durch die Spin-Spin-Wechselwirkung zu einem Verlust der Phasenkohärenz. Der Vorgang wird als Querrelaxation T2 (Spin-Spin-Relaxation) bezeichnet. Eine weitere Ursache für den Verlust der Quermagnetisierung sind Magnetfeldinhomogenitäten. Die Zeitkonstante des Signalabfalls unter Berücksichtigung der Magnetfeldinhomogenitäten bezeichnet man als T2*. Das von der Empfängerspule gemessene Signal der präzedierenden Quermagnetisierung nimmt ebenfalls ab und verschwindet nach einer gewissen Zeit. Diesen Vorgang nennt man freien Induktionszerfall. Die Relaxationszeit ist sowohl vom Molekül, in dem das Atom eingebunden ist, als auch von dessen chemischer Umgebung abhängig. Verschiedene Gewebearten weisen daher einen charakteristischen Signalzerfall und somit eine charakteristische Signalstärke auf (Meier, 2013, S. 7–9). Die Kodierung der räumlichen Information erfolgt durch das Anlegen verschiedener Gradienten. Der Schichtselektionsgradient bewirkt, dass

lediglich die Spins innerhalb einer definierten Schicht angeregt werden. Der Frequenzkodiergradient ermöglicht eine Zuordnung der Signale entlang der x-Achse. Durch den Phasenkodiergradienten ist eine weitere Differenzierung der Signale entlang der y-Achse möglich. Die Raumfrequenzinformationen werden zeilenweise in eine Matrix (k-Raum) eingetragen. Bei der anschließenden Fourier-Transformation erfolgt eine Übersetzung des Datensatzes in ein zweidimensionales Bild (Stöcker & Shah, 2013, S. 66–68).

2.3.3 Sequenzen der ^{13}C -Magnetresonanztomographie

2.3.3.1 FID-CSI

FID-CSI gilt als eine der einfachsten und robustesten Sequenzen der spektroskopischen Bildgebung. Die schichtselektive Anregung der Spins erfolgt durch einen 90° -HF-Impuls senkrecht zum statischen Magnetfeld und führt zu einer Auslenkung der Magnetisierung von der z-Achse in die x-y-Ebene. Beim FID-Signal handelt es sich um eine Projektion der präzedierenden Transversalmagnetisierung entlang der x-Achse (vgl. Abbildung 3). Das FID-CSI-Signal wird als Funktion der Zeit wiedergegeben und weist eine gedämpfte Schwingung auf. Die Schwingung kommt durch die Oszillation des Signals in der x-y-Ebene zustande. Die Dämpfung ist Ausdruck eines exponentiellen Signalabfalls durch die T_2^* -Relaxation (Hore, 2015, S. 84–86).

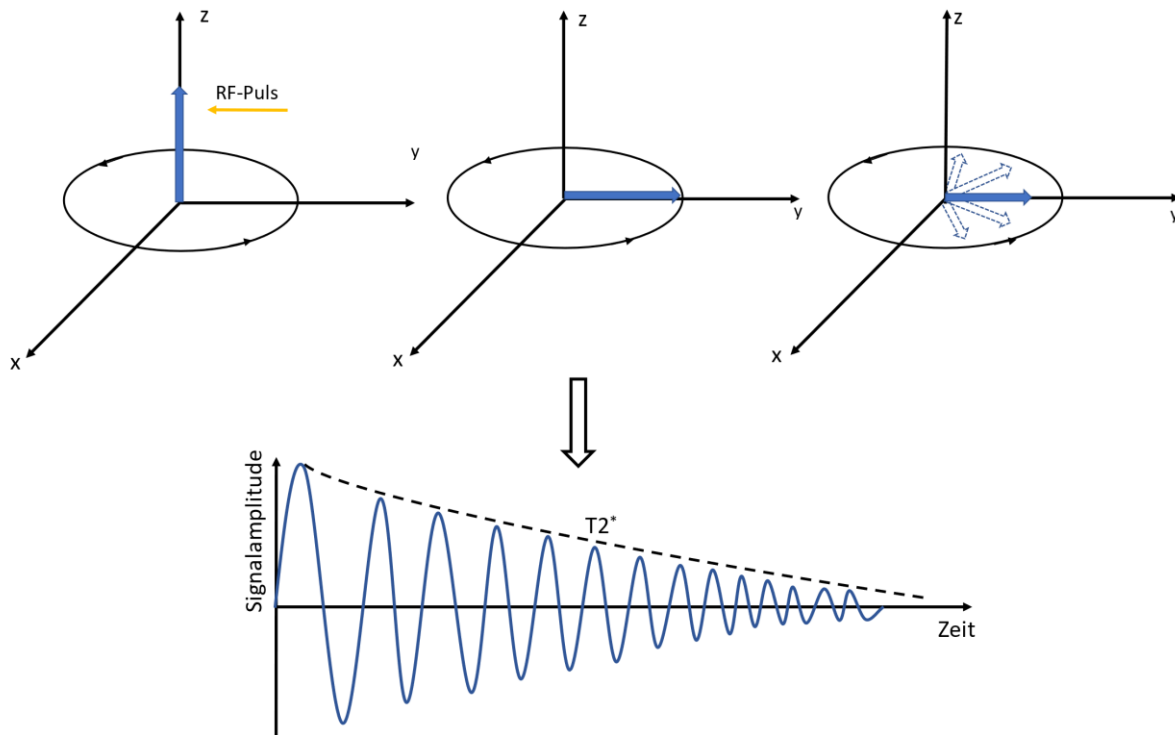


Abbildung 3: FID-Signal als Funktion der Zeit

Die Oszillationsfrequenz ω_{eff} entspricht der Larmorfrequenz und ist für jedes Proton charakteristisch (Atkins et al., 2014, S. 478):

$$\omega_{\text{eff}} = \gamma B_0 (1 - \sigma)$$

Da sich die Larmorfrequenzen der verschiedenen Kerne nur um wenige Kilohertz unterscheiden, können sie durch einen einzigen 90°-HF-Puls simultan angeregt werden. Das gemessene FID-Signal ergibt sich aus der Summe der einzelnen FID-Kurven, anhand derer die Signalintensitäten der verschiedenen Moleküle berechnet werden (Atkins et al., 2014, S. 478; Neubauer, 2005, S. 198). Nach der Phasenkodierung in der x- und y-Dimension findet eine dreidimensionale Fourier-Transformation mit zwei räumlichen und einer spektralen Dimension statt. Da für jeden Bildpunkt jeweils ein FID-Signal generiert werden muss, ist die Akquisitionszeit entsprechend lang, was zu einem ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen kann. CSI-Sequenzen werden daher in der Regel mit einer relativ geringen Auflösung von 16×16 oder 32×32 Bildpunkten durchgeführt (Conolly et al., 2013).

2.3.3.2 EPSI

Die spektroskopische echoplanare Bildgebung (EPSI) ermöglicht die parallele Akquisition von räumlichen und spektralen Informationen. Sie stellt eine der schnellsten Sequenzen der Magnetresonanzspektroskopie dar. Eine vollständige Schicht kann innerhalb von 40 bis 100 Millisekunden gescannt werden. Bei den klassischen Single-Shot-Sequenzen wird nach einem einzigen 90°-RF-Anregungspuls der komplette Rohdatensatz eines Bildes generiert. Durch den Anregungspuls erfolgt zunächst eine maximale Auslenkung der Magnetisierung M_0 aus der z-Ebene in die x-y-Ebene. Im Anschluss wird eine Abfolge von schnell oszillierenden frequenzkodierenden Gradienten eingesetzt, die einen Gradientenechozug erzeugen. Vor jedem Echo wird kurzzeitig ein phasenkodierender Gradient eingeschaltet, dessen Gradientenstärke sich mit jedem Phasenkodierschritt ändert, sodass jedes Echo ein spezifisches Phasenverschiebungsmuster aufweist. Die Echozuglänge entspricht der Anzahl der phasenkodierenden Schritte (Hendrick, 2008, S. 80–81). Die Vorteile der EPSI-Sequenz liegen in der verkürzten Bildgebungsdauer und der damit verbundenen Möglichkeit, schnelle physiologische Prozesse besser darzustellen zu können. Für die technische Umsetzung werden jedoch sehr leistungsstarke Gradientensysteme benötigt. Außerdem ist im Vergleich zu konventionellen CSI-Methoden die spektrale Bandbreite geringer und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis schlechter (Poustchi-Amin et al., 2001).

2.3.4 Hyperpolarisation

Ein wesentlicher Nachteil der ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie liegt in der geringeren Sensitivität im Vergleich zur ^1H -Magnetresonanzspektroskopie. Bei nur 1,07 % aller natürlich vorkommenden Kohlenstoffatome handelt es sich um das Kohlenstoffisotop ^{13}C , das die Spinzahl $I = \frac{1}{2}$ aufweist und somit das einzige NMR-aktive Kohlenstoffisotop darstellt. Das gyromagnetische Verhältnis γ von ^{13}C ist mit $6,7283 \times 10^7 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ ein Viertel so groß wie das von ^1H . Die relative Sensitivität der konventionellen ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie beträgt im Vergleich zur ^1H -Magnetresonanzspektroskopie lediglich 0,0159 (Ernst, 1980, S. 3; Friebolin & Thiele, 2013, S. 3).

Im thermischen Gleichgewicht richten sich die Atomkerne entweder parallel oder antiparallel zum externen magnetischen Feld aus. Da die Anzahl der parallel

ausgerichteten Kernspins überwiegt, entsteht eine Netto-Polarisation, die ein messbares MR-Signal erzeugt (vgl. Abbildung 4). Im thermischen Gleichgewicht beträgt die Polarisation von ^{13}C nur 0,0005 % (Schroeder et al., 2011).

Durch die DNP wird die Orientierung eines Großteils der Spins in dieselbe Richtung und somit eine erhebliche Verstärkung des Signals erzielt. Es können Polarisationswerte von über 20 % erreicht werden. Das Verfahren war bereits in den 1950er Jahren bekannt und wurde für die Herstellung polarisierter Substrate im Rahmen von physikalischen Experimenten eingesetzt. Erst durch technische Fortschritte in der DNP-Technologie durch das Forschungsteam um Ardenkjaer-Larsen im Jahr 2003 hat das DNP-Verfahren Einzug in die moderne NMR-Spektroskopie gehalten (Lumata et al., 2012). Es hat sich gezeigt, dass das Signal von ^{13}C -Proben um das 10.000-Fache verstärkt werden kann (Nelson et al., 2008).

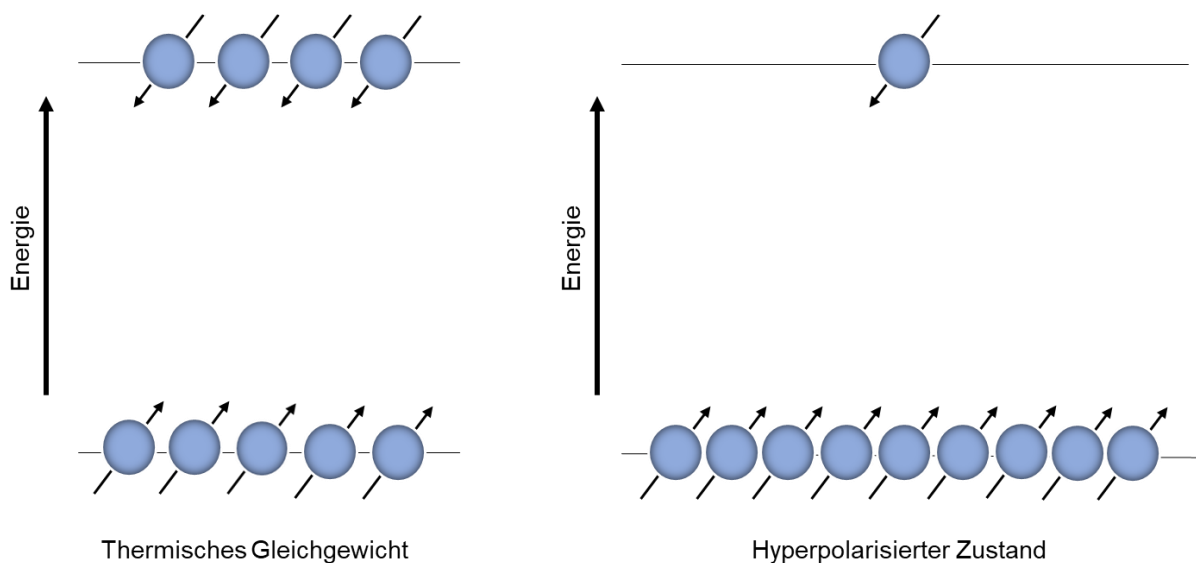


Abbildung 4: Ausrichtung der Kernspins im externen Magnetfeld B_0 . Im thermischen Gleichgewicht liegt nur eine geringe Differenz zwischen der Anzahl der parallel und der antiparallel zum externen Magnetfeld B_0 ausgerichteten Kernspins vor. Im hyperpolarisierten Zustand überwiegen die parallel zum externen Magnetfeld ausgerichteten Kernspins. Dies führt zu einem deutlich verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis im jeweiligen NMR-Spektrum.

2.3.4.1 Electron Paramagnetic Agents

Aufgrund ihres geringen magnetischen Moments werden ^{13}C -Kerne selbst bei niedrigen Temperaturen nur bedingt polarisiert. Durch den Einsatz von ungepaarten

Elektronen kann das DNP-Signal von ^{13}C deutlich verstärkt werden. Das magnetische Moment eines Elektrons ist 2700-mal so groß wie das eines ^{13}C -Nukleus. Daher kann bereits bei einer moderaten Feldstärke von 3,35 Tesla (T) und einer Temperatur von 1 Kelvin eine Elektronenspin-Polarisation von 98 % erreicht werden. Die Elektronen stammen in der Regel von einem organischen Radikal (EPA = Electron Paramagnetic Agent). Eine homogene Mischung aus ^{13}C -markierten Molekülen und organischen Radikalen wird gemeinsam polarisiert. Anschließend erfolgt ein Transfer der Polarisation von den Elektronen auf die Kernspins (Hurd et al., 2012).

Für eine erfolgreiche Polarisation muss die Linienbreite der Elektronenspinresonanz (ESR) größer als die Larmorfrequenz des Kernspins sein. Man kann zwischen zwei Klassen von EPAs unterscheiden, den Nitroxid- und den Tritylradikalen. Tritylradikale stellen das ideale EPA für ^{13}C -Pyruvat dar. Sie weisen eine geringe ESR-Linienbreite auf und ermöglichen hohe Polarisationswerte.

Aufgrund der größeren Linienbreite von Nitroxidradikalen kommt es zu einer gleichzeitigen Polarisation von ^{13}C - und ^1H -Kernen. Die erreichbaren Polarisationswerte für ^{13}C -Kerne sind jedoch geringer als bei Tritylradikalen (Chaumeil et al., 2015, S. 23).

2.3.4.2 Einfluss von Gadolinium auf die Signalverstärkung

Zur Verbesserung des NMR-Signals kann der hyperpolarisierten Probe neben freien Radikalen auch Gadolinium beigefügt werden. Mehrere Studien haben den positiven Einfluss von Gadolinium-basierten Kontrastmitteln auf das NMR-Signal gezeigt (Friesen-Waldner et al., 2012; Lumata et al., 2012). Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber Ardenkjaer et al. konnten nachweisen, dass Gadolinium eine Signalverstärkung durch die Verringerung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bewirkt (Ardenkjaer-Larsen et al., 2008). Der Effekt tritt sowohl bei der Verwendung von freien Gd^{3+} -Ionen als auch mit komplexiertem GdCl_3 (ProHance[®], Magnevist[®], Dotarem[®]) auf. In einer Studie wurden ^{13}C -Pyruvat-Proben freie Radikale und Gd^{3+} in unterschiedlichen Konzentrationen beigefügt. Durch das Hinzufügen von 1–2 mmol/l Gd^{3+} konnte eine signifikante DNP-Verstärkung erreicht werden. Ein Anstieg der Gd^{3+} -Konzentration über 4–5 mmol/l hatte jedoch einen Abfall des Polarisationslevels zur Folge. Von den untersuchten Radikalen wies die Kombination des Tritylradikals OX063 mit Gd^{3+} den stärksten Effekt auf die DNP-Verstärkung auf. Es konnte eine Steigerung

der Kernpolarisation um 300 % erzielt werden. Das Nitroxid-Radikal 4-oxo-TEMPO und das Benzylalkohol-Derivat BDPA bewirkten dagegen eine Steigerung von lediglich 5 bis 20 % (Lumata et al., 2012).

2.3.4.3 Das thermodynamische DNP-Modell

Es gibt mehrere Mechanismen, die zu einer DNP-Verstärkung führen. Dazu gehören der Solid-Effect, der Cross-Effect und die thermische Mischung (Shimon et al., 2012). Die thermische Mischung ist der dominierende Mechanismus, wenn die ESR-Linienbreite D des freien Radikals größer oder vergleichbar mit der Larmorfrequenz des Kerns ist. Das thermodynamische DNP-Modell beschreibt die Interaktion von drei thermischen Komponenten. Hierbei handelt es sich um das Elektronen-Zeeman-Reservoir, das Elektronen-Spin-Spin-Reservoir und das Kern-Zeeman-Reservoir. Durch Mikrowellenbestrahlung kommt es zu einer thermischen Koppelung des Elektronen-Spin-Spin-Reservoirs und des Kern-Zeeman-Reservoirs und zu einer Angleichung der Spintemperatur T_s in den beiden Systemen. Mithilfe dieser Methode können hohe Verstärkungen der Kernpolarisation erzielt werden. Die Signalverstärkung ϵ gibt das Verhältnis der Intensität des hyperpolarisierten NMR-Signals gegenüber der Signalintensität der Probe im thermischen Equilibrium an (Lumata et al., 2011). Dynamische Kernpolarisationen werden bei magnetischen Feldstärken zwischen 0,35 T und 16,5 T durchgeführt. Die Temperaturen reichen von wenigen Millikelvin bis hin zu Raumtemperatur (Hurd et al., 2012). Die niedrigen Temperaturen werden durch den Einsatz von flüssigem Helium erreicht (Thurber & Tycko, 2016). Signifikante Verbesserungen der Polarisation können durch eine höhere magnetische Feldstärke oder eine niedrigere Temperatur erreicht werden (Ardenkjaer-Larsen et al., 2003).

2.3.4.4 Dissolution

Im Anschluss an den Polarisationsvorgang werden die hyperpolarisierten Substanzen erhitzt, in einem geeigneten Puffer aufgelöst und in einen flüssigen Zustand überführt. Dieser Vorgang wird als Dissolution bezeichnet. Durch die Zugabe eines Puffers wird ein physiologischer pH-Wert erreicht. Der Dissolution-Vorgang muss zügig erfolgen, um die Kernpolarisation aufrechtzuerhalten. Um die Relaxation möglichst gering zu halten, wird der Vorgang innerhalb eines Kryostats bei hoher Feldstärke durchgeführt. Paramagnetische Ionen können ebenfalls eine schnellere Relaxation bewirken. Durch

eine Komplexierung mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) kann dieser Effekt gemindert werden (Ardenkjær-Larsen et al., 2010, S. 380).

2.4 Diethylnitrosamin-induziertes HCC am Rattenmodell

Die orale oder parenterale Gabe von DEN über einen längeren Zeitraum stellt eine effektive Methode zur Induktion von Lebertumoren dar. Nitrosamine weisen sowohl bei Tieren als auch bei Menschen toxische Eigenschaften auf. Die parenterale oder orale Gabe von DEN führt bereits in den kleinsten Mengen zu schwerwiegenden Leberschäden. Histologisch zeigen sich ausgeprägte neutrophile Infiltrationen, zentrilobuläre hämorrhagische Nekrosen, Brückennekrosen, Gallengangsproliferation und Fibrosen, die letztendlich zu einer Hepatokanzerogenese führen. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit des hepatokanzerogenen Effekts wird DEN häufig zur Tumorinduktion eingesetzt. Durch die Verstoffwechslung von DEN entstehen mutagene Metabolite, die Addukte mit der DNA bilden und sie auf diese Weise schädigen. Die Reaktion wird mithilfe von Cytochrom-P450-Enzymen katalysiert. Der oxidative Stress, der durch DEN verursacht wird, trägt zusätzlich zur Hepatokanzerogenese bei. Bereits eine einzelne DEN-Anwendung mit einer Dosierung von 10–90 mg/kg Körpergewicht führt in der Regel zu einer irreversiblen kanzerogenen Wirkung bei Nagetieren. Die DEN-Induktion kann auf verschiedene Weisen erfolgen. DEN kann den Versuchstieren über das Trinkwasser, die Nahrung oder durch Nahrungssonden verabreicht werden. Eine DEN-Exposition durch Inhalation oder intratracheale Applikation ist ebenfalls möglich. Das gebräuchlichste Verfahren ist die intraperitoneale Injektion der DEN-Lösung. Diese Applikationsform erlaubt eine genaue Quantifizierung der DEN-Dosis und garantiert somit, dass jedes Tier die gleiche Menge an DEN erhält (Tolba et al., 2015).

3 Materialien und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten im Alter von acht Wochen verwendet (Envigo, Re Schaijk, Niederlande). Die Versuche wurden von der Tierschutzbehörde der Regierung von Oberbayern genehmigt und gemäß der EU-Richtlinie 2010/63 zum Schutz von Versuchstieren durchgeführt. Die DEN-Induktion fand über einen zehnwöchigen Zeitraum statt. Die Gabe von DEN (Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte über eine 0,01 %ige Trinkwasserlösung, die zweimal pro Woche erneuert wurde. Im Anschluss fand eine zweiwöchige Auswaschperiode statt, in der der Wirkstoff von den Versuchstieren vollständig ausgeschieden wurde. Die Tierhaltung erfolgte im Klinikaustauschraum der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München bei 20–24 °C Raumtemperatur, 45–65 % Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden. Die Tiere wurden maximal zu zweit in einzelbelüfteten IVC-Käfigen oder Makrolon-Käfigen mit Holzgranulateinstreu und Zellstoff als Nestbaumaterial gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter (Haltungsfutter Nr. 1234, Altromin). Die Tiere wurden mithilfe eines Score Sheets engmaschig überwacht. Das Körpergewicht wurde wöchentlich kontrolliert. Eine Gewichtsabnahme oder ein Sistieren der Gewichtszunahme galten als Abbruchkriterien. Alle zwei Wochen erfolgte ein Screening mit einer T2-gewichteten Sequenz an einem klinischen 3T-MRT-System (Philips Ingenia 3.0T, Philips Medical, Amsterdam, Niederlande), um neu aufgetretene Lebertumore zu erfassen und ihr Wachstum im weiteren Verlauf zu beobachten. Als Kontrollgruppe wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, an denen keine DEN-Induktion erfolgt ist.

Die DEN-induzierten Versuchstiere wurden einer FID-CSI-Kohorte (n = 9) und einer EPSI-Kohorte (n = 11) zugewiesen. In den Lebern einiger Versuchstiere haben sich mehrere Tumore gebildet, die jeweils separat für die Messungen berücksichtigt worden sind. Es lagen insgesamt 16 Tumore in der FID-CSI-Kohorte und 17 Tumore in der EPSI-Kohorte vor. Die Tumore der FID-CSI-Kohorte wurden unter Berücksichtigung der histologischen Ergebnisse in zwei Subgruppen aufgeteilt. Bei 5 der 16 untersuchten Tumoren handelte es sich um Präkanzerosen, die restlichen 11 Tumoren

wurden als HCCs eingestuft. Die gesunden Kontrolltiere (n = 4) wurden mit der FID-CSI-Sequenz untersucht.

Am Versuchstag hielten die Tiere eine Nahrungskarenz von 4 Stunden vor der Versuchsdurchführung ein. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Ganzkörperkammer mit 5 % Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany) und 1,5 l/min Sauerstoff. Für die Versuchsdauer wurde die Narkose durch eine Kopfkammer mit 1,5–2,5 % Isofluran aufrechterhalten. Während der gesamten Untersuchung wurden die Atemfrequenz und Körpertemperatur überwacht (SA Instruments Inc., New York, NY, USA). Um einer Unterkühlung der Versuchstiere vorzubeugen, erfolgte zusätzlich eine Stabilisierung der Körpertemperatur durch eine Heizmatte. Nach Abschluss der Versuche wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis des Barbiturats Pentorbital (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert. Im Anschluss wurde der Bauchraum mittels medianer Längslaparotomie eröffnet und die Leber entnommen. Die Tumore wurden aufgeteilt und zur histologischen Aufbereitung in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert oder für weitere analytische Verfahren in flüssigem Stickstoff eingefroren (vgl. Abbildung 5).



Abbildung 5: Fixierte Leberprobe mit zwei Tumorherden (*)

3.2 Hyperpolarisation von ^{13}C -Pyruvat

Die Hyperpolarisation erfolgte an einem präklinischen HyperSense DNP Polarizer (Oxford Instruments, Abingdon, United Kingdom) bei einer magnetischen Feldstärke von 3,35 T und einem Druck von 3 mbar (vgl. Abbildung 6). Für die Hyperpolarisation wurde ein Gemisch aus 14 M $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Pyruvat (Eurisotop, Saint-Aubin, Frankreich), 15 mM OX063 (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Großbritannien) und 1 mM Dotarem (Guerbet, Villepinte, Frankreich) verwendet. 30 μl des Polarisationsgemisches wurden in einen kleinen Probenbecher pipettiert und anschließend in den Kryostaten des Polarizer-Systems eingebracht. Nachdem die Probe durch flüssiges Helium und flüssigen Stickstoff auf eine Temperatur von 1,4 K heruntergekühlt wurde, erfolgte für den Polarisationstransfer eine Bestrahlung der Probe mit einer Mikrowellen-Frequenz von 94,105 Gigahertz bei einer Leistung von 100 Milliwatt. Nach 45 Minuten wurden über 90 % des maximal möglichen Polarisationslevels erreicht. Der Polarisationsaufbau wurde mit einem angeschlossenen Spektrometer (Spinsolve Carbon, Magritek, Aachen, Germany) gemessen. Die einzelnen Datenpunkte wurden in Intervallen von 5 Minuten in einem Kurvendiagramm erfasst. Nach Erreichen des maximalen Polarisationswertes erfolgte die Dissolution. In diesem Schritt wurde die gefrorene, polarisierte Probe durch eine stark erhitzte Pufferlösung, bestehend aus 100 mM Natriumhydroxid, 100 mM Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und 0,1 g/l EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in einen flüssigen Zustand mit einem physiologischen pH-Wert von $\sim 7,4$ überführt. Das hierbei entstandene Pyruvat-Polarisat wurde anschließend mit einer Spritze aufgezogen und zügig in den Scan-Raum transportiert, um den Signalzerfall möglichst gering zu halten. Das Polarisat wurde in einer Dosierung von 3,75 ml/kg Körpergewicht in die zuvor katheterisierte Schwanzvene des Versuchstieres injiziert.

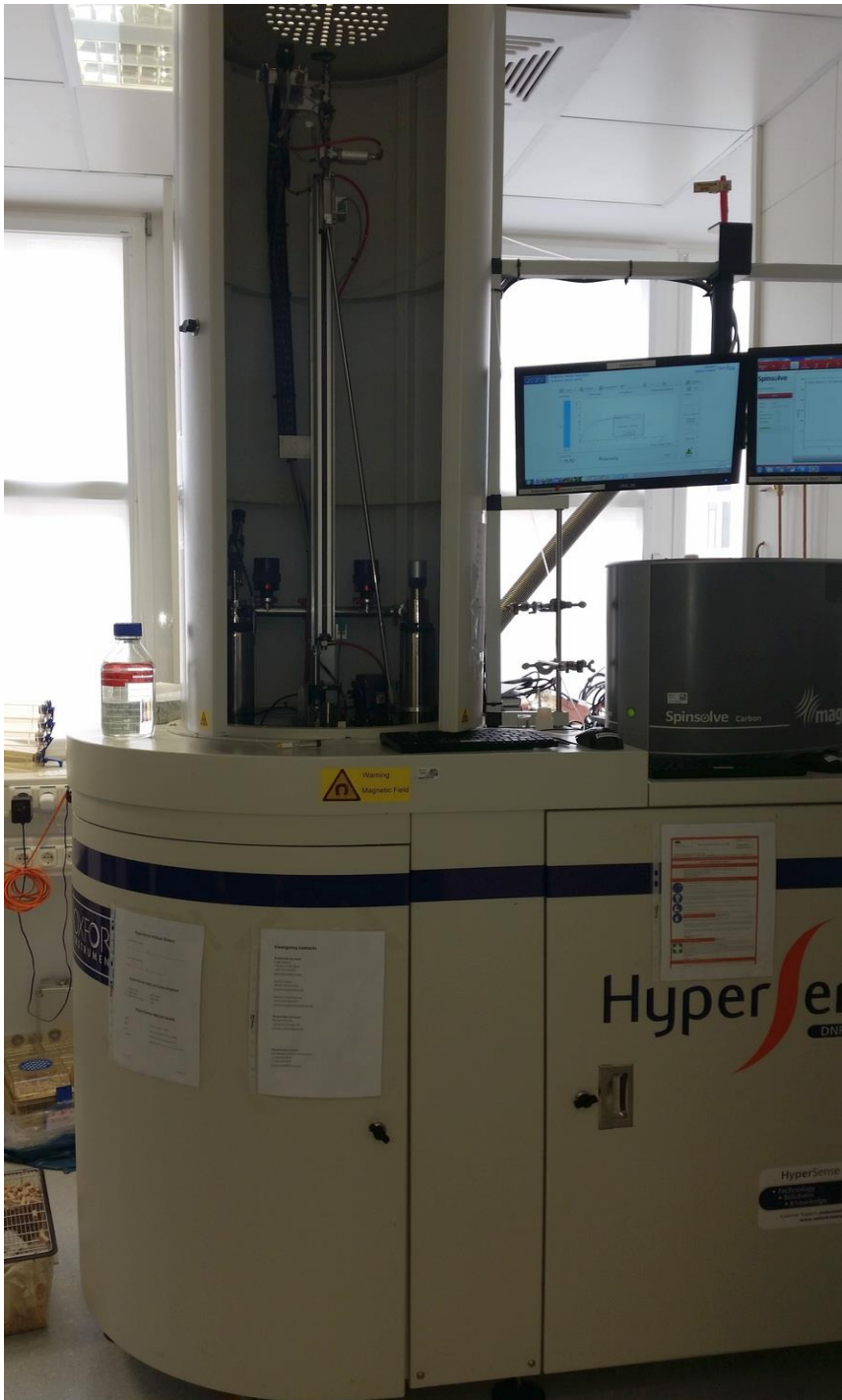


Abbildung 6: HyperSense DNP-Polarizer

3.3 MR-Bildgebung

Für die genaue Lokalisierung der Tumoren wurde zunächst ein anatomischer MRT-Datensatz mit einer T2-gewichteten Fast-Spin-Echo-Sequenz an einem 7T-Kleintier-MRT-System (Discovery MR901 System; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) akquiriert (Matrix 256×256, Field of View 48–60 mm, Repetitionszeit 2500/2400–6200 ms, Echozeit 40–43 ms, Schichtdicke 1 mm, Flip-Winkel 90°).

3.4 MR-Spektroskopie

Die spektroskopischen Datensätze wurden im Anschluss an die anatomischen Sequenzen ebenfalls am 7T-Kleintier-MR-System generiert. Zur Anregung der ^{13}C -Kerne und zur Messung der entsprechenden Spektren wurde eine doppelresonante $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Oberflächenspule (Rapid Biomedical, Rimpar, Germany) verwendet, die auf Höhe des zuvor lokalisierten Tumors positioniert wurde. Die spektroskopische Bildgebung startete zeitgleich mit der Injektion des Pyruvat-Gemischs. Die Spektroskopie erfolgte bei der FID-CSI-Kohorte mit der statischen FID-CSI-Sequenz (Flip-Winkel 6° , spektrale Bandbreite 5000 Hz, Schichtdicke 5 mm, Repetitionszeit 68 ms, Field of View 48 mm, Bildpunkte 256), bei der EPSI-Kohorte wurde die dynamische EPSI-Sequenz angewandt (Flip-Winkel 8° , spektrale Bandbreite 250 Kilohertz, Schichtdicke 5 mm, Repetitionszeit 400 ms, Field of View 60 mm, Bildpunkte 16.384, zeitliche Auflösung 5 Sekunden). Für die Messung des Signals wurde eine Region of Interest basierend auf der T2-gewichteten anatomischen Bildgebung der Tumoren herangezogen. Bei den gesunden Kontrolltieren wurde die gesamte Leber als Region of Interest zur Signalmessung herangezogen. Die anschließende Frequenzspektrumanalyse der spektroskopischen Datensätze erfolgte in Matlab (The MathWorks, Natick, USA) mithilfe eines hierfür implementierten Prozessierungs- und Rekonstruktionsalgorithmus (vgl. Abbildung 7).

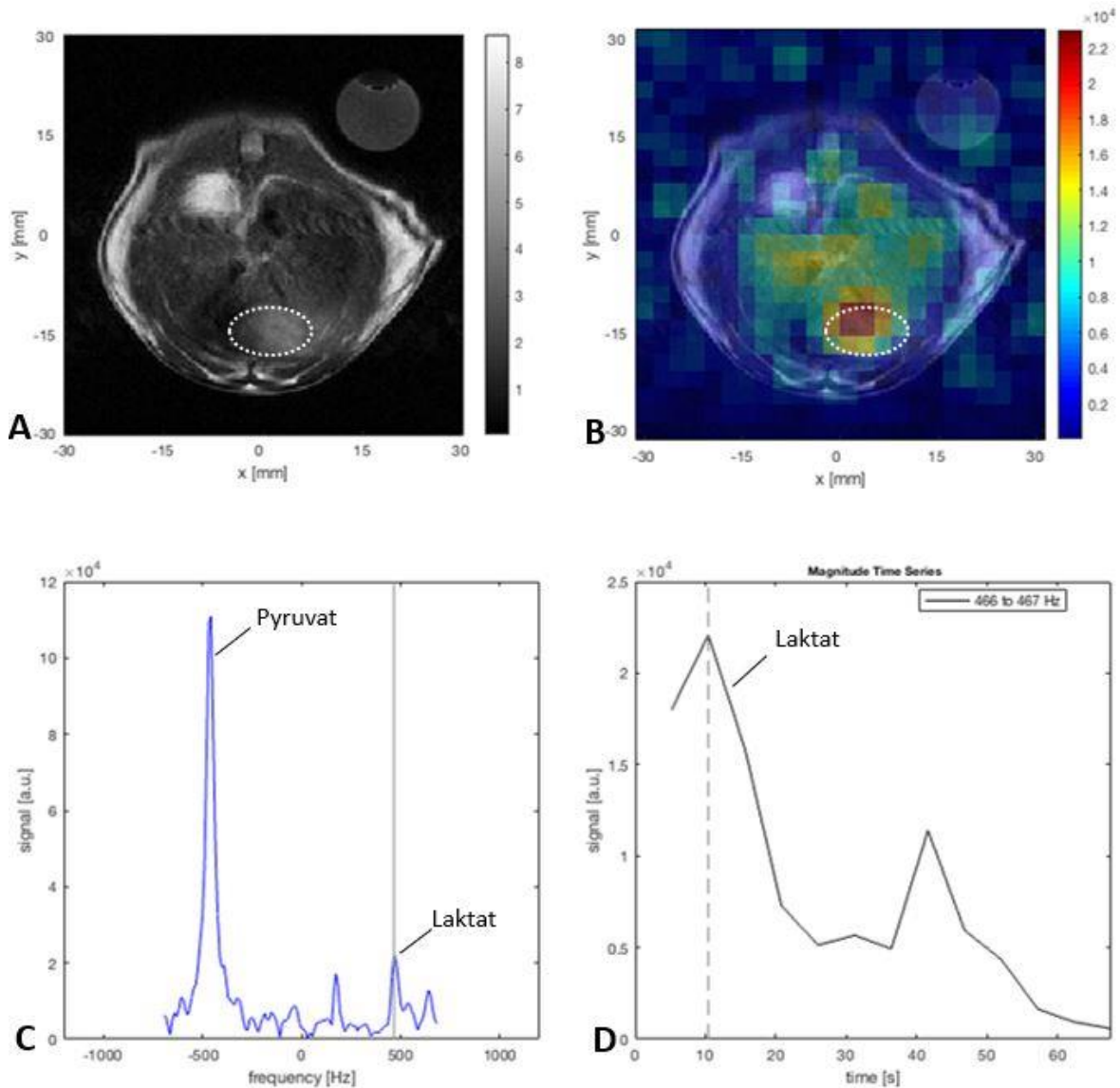


Abbildung 7: Anatomische T2-gewichtete Bildgebung der Leber und der Tumorregion (gestrichelter Kreis) (A). Fusion des anatomischen und des spektroskopischen Datensatzes (B). Laktat- und Pyruvatspektren in der Tumorregion nach Fourier-Transformation gemittelt über den gesamten Messzeitraum (C). Dynamische Laktatkurve in der Tumorregion im zeitlichen Verlauf (D).

3.5 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) gibt das Verhältnis des Resonanzsignals zum Bildrauschen wieder. Hierfür wurden in Matlab die Signalamplituden (A_{Signal}) für Pyruvat, Laktat und Alanin sowie die Standardabweichung des Rauschens (σ_{Rauschen}) in einem signalfreien Bereich des Frequenzspektrums festgelegt. Hieraus ergibt sich:

$$SNR = \frac{A_{\text{Signal}}}{\sigma_{\text{Rauschen}}}$$

3.6 Histologie

3.6.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die histologische Aufbereitung der Tumore erfolgte im Institut für Pathologie der Technischen Universität München. Die Gewebeproben wurden für 24–48 Stunden bei 4 °C mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Im Anschluss erfolgte eine Entwässerung unter Standardbedingungen (Entwässerungsmaschine Leica ASP300S; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) und eine Einbettung in Paraffin (Paraffinausgießstation Leica EG1150 H; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Aus den ausgehärteten Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms (CM 350E, Thermo Scientific; ThermoFisher Scientific, Waltham) Schnitte angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend nach verschiedenen Protokollen weiter aufbereitet.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte in destilliertes Wasser überführt. Die Schnitte wurden mit saurem Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt und für 10 Minuten intensiv mit Leitungswasser gespült, wodurch eine Erhöhung des pH-Wertes und eine Blaufärbung der Schnitte erreicht wurde. Im Anschluss erfolgte eine Gegenfärbung durch eine alkoholische 1 %ige Eosinlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, zweimal für jeweils 1,5 Minuten in Xylol eingelegt und anschließend durch das Eindeckmedium Pertex (Mediate Mounting Medium, Mediate Cancer Diagnostics, Orlando, USA) fixiert.

3.6.3 Immunhistochemie

Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte mit PBS gespült und in einem Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 erwärmt. Nach einer Abkühlzeit von 15 Minuten erfolgte eine erneute Spülung mit PBS und 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung für 5 Minuten. Zur Proteinblockierung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde in

5 %igem Ziegenserum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper ab40082 (Anti-Glukosetransporter-GLUT1-Antikörper; Abcam, Cambridge, Großbritannien) in einer Verdünnung von 1:700 aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen und nach Applikation des Sekundärantikörpers EnVision™ (Dako, Carpinteria, CA, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe des chromogenen Diaminobenzidins (Dako, Carpinteria, CA, USA) bilden sich braune Präzipitate, durch die der Glukosetransporter 1 (GLUT1) als Zielantigen sichtbar gemacht wird. Zur Erhöhung des Kontrastes erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämotoxylin gemäß dem im Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Protokoll. Das gefärbte Gewebe wurde durch das synthetische Einschlussmittel ROTI® Histokitt II (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme erfolgte mit der Software SPSS Version 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel Version 2019 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Als Kennwerte der deskriptiven Statistik wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet beziehungsweise prozentuale Anteile angegeben. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Zur Prüfung auf Varianzhomogenität wurde der Levene-Test durchgeführt. Für die Berechnung von Mittelwertunterschieden normalverteilter Variablen wurde der Student's *t*-Test angewendet. Bei fehlender Varianzhomogenität wurde der Welch-Test angewendet. Mittelwertvergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen erfolgten mittels Varianzanalyse (ANOVA). Statistische Signifikanz wurde für alle Hypothesen bei einem p -Wert $\leq 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Detektionsraten der ^{13}C -Metabolite

Das Signal von ^{13}C -Pyruvat konnte sowohl mit der FID-CSI-Sequenz als auch mit der EPSI-Sequenz in allen Proben detektiert werden. Für beide Sequenzen ergab sich damit eine Sensitivität von 100 % bei der Detektion des ^{13}C -Pyruvat-Signals (vgl. Abbildung 8).

Das ^{13}C -Laktat-Signal war mit der EPSI-Sequenz in 15 von 17 Proben messbar, während es mit der FID-CSI-Sequenz in allen 20 Proben gemessen werden konnte. Die Detektionsrate des hyperpolarisierten ^{13}C -Laktats lag somit bei 88,2 % für die EPSI-Sequenz und bei 100 % für die FID-CSI-Sequenz (vgl. Abbildung 9).

Das Signal von ^{13}C -Alanin konnte mit der EPSI-Sequenz in 10 von 17 Tumoren gemessen werden, woraus sich eine Detektionsrate von 58,8 % ergibt. Mit der FID-CSI-Sequenz gelang die ^{13}C -Alanin-Signalmessung in 100 % der Proben (vgl. Abbildung 10).

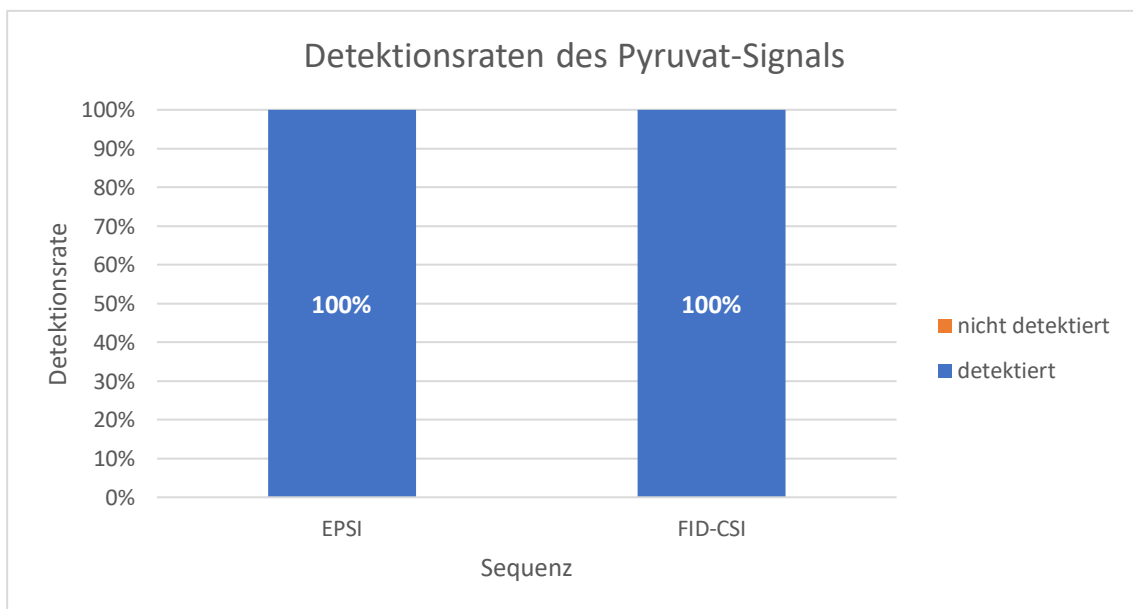


Abbildung 8: Detektionsraten des Pyruvat-Signals mit EPSI und FID-CSI

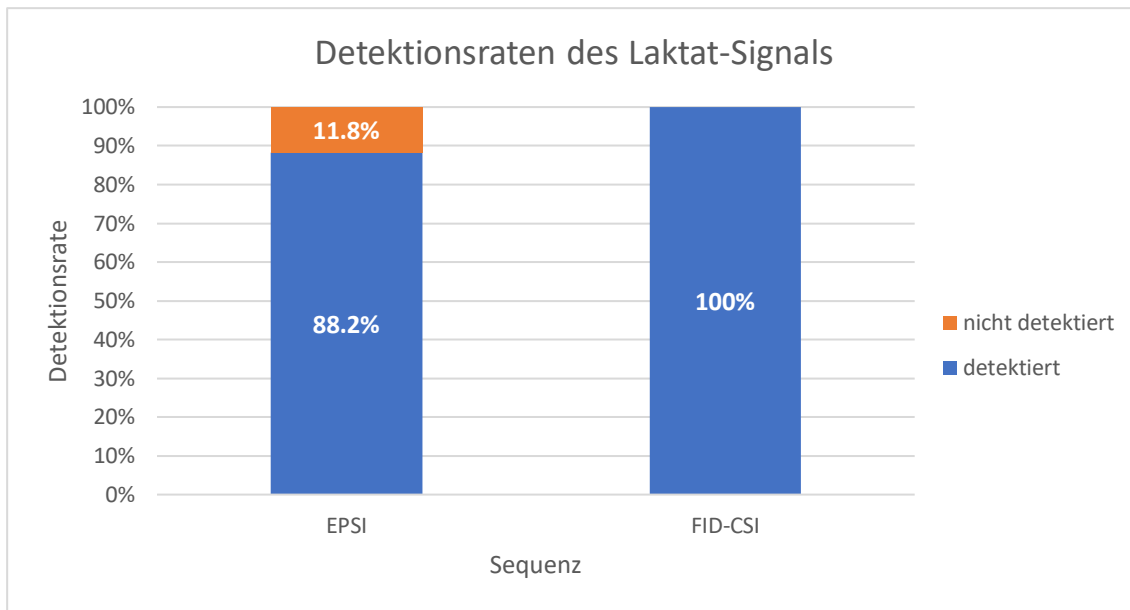


Abbildung 9: Detektionsraten des Laktat-Signals mit EPSI und FID-CSI

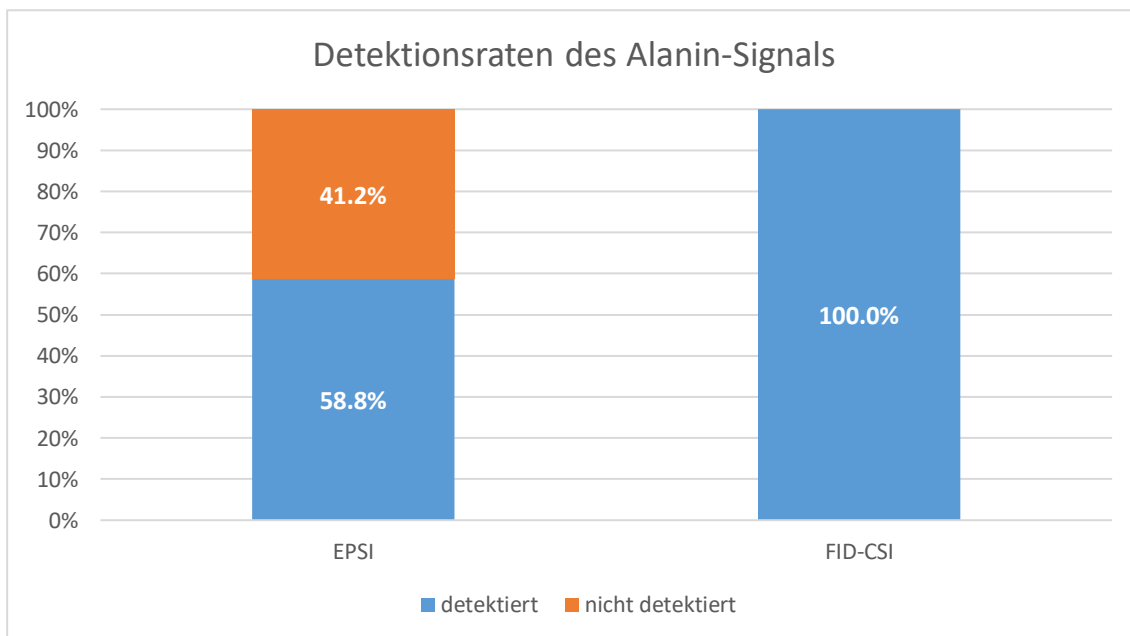


Abbildung 10: Detektionsraten des Alanin-Signals mit EPSI und FID-CSI

4.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis in der EPSI- und in der FID-CSI-Kohorte

4.2.1 Pyruvat

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für ^{13}C -Pyruvat betrug in der EPSI-Kohorte 19,7 ($\pm 10,6$). In der FID-CSI-Kohorte lag das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei 27,2 ($\pm 14,8$). Es lag somit kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) bezüglich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der beiden Kohorten vor (siehe Abbildung 11).

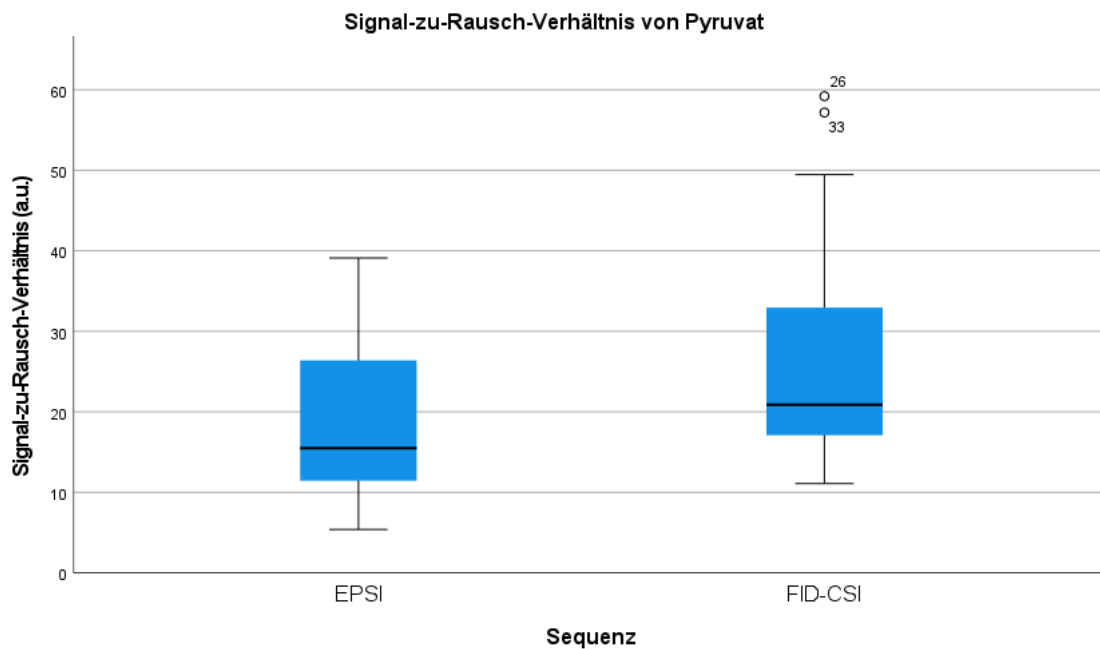


Abbildung 11: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Pyruvat mit EPSI und FID-CSI

4.2.2 Laktat

In der EPSI-Kohorte betrug das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für ^{13}C -Laktat $4,6 (\pm 3,2)$. In der FID-CSI-Kohorte lag das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei $17,6 (\pm 10,2)$. Die Differenz zwischen den beiden Kohorten ist somit als statistisch signifikant ($p < 0,001$) zu betrachten (vgl. Abbildung 12).

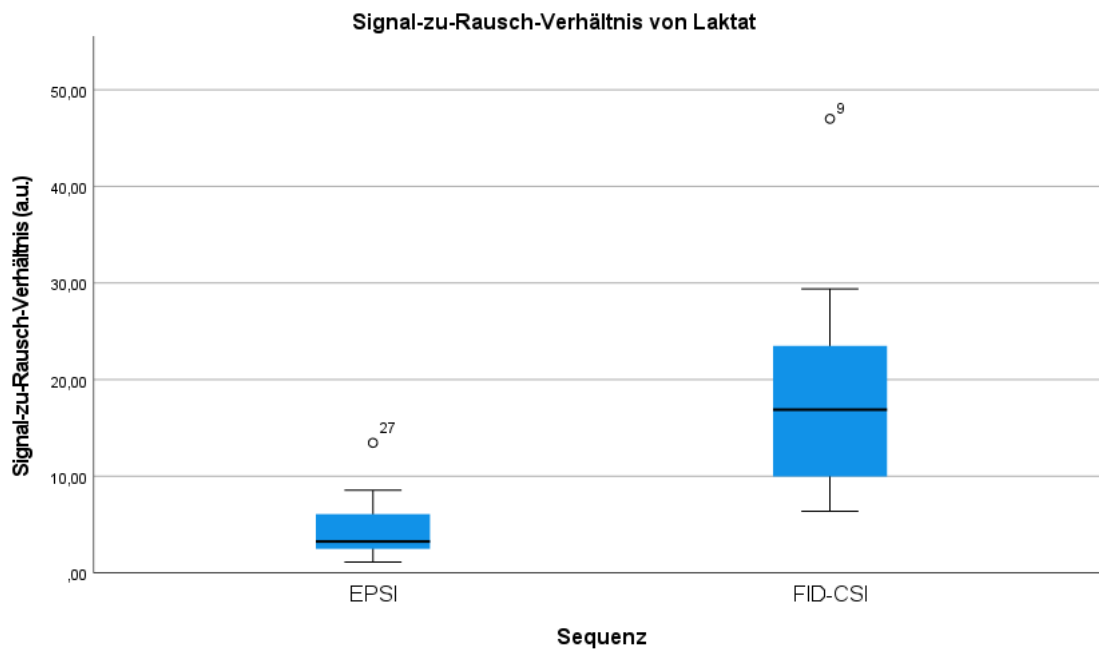


Abbildung 12: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Laktat mit EPSI und FID-CSI

4.2.3 Alanin

In der EPSI-Kohorte betrug das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für ^{13}C -Alanin $2,5 (\pm 1,3)$, während in der FID-CSI-Kohorte ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von $13,3 (\pm 8,7)$ erreicht wurde. Es besteht damit ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den beiden Kohorten hinsichtlich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (vgl. Abbildung 13).

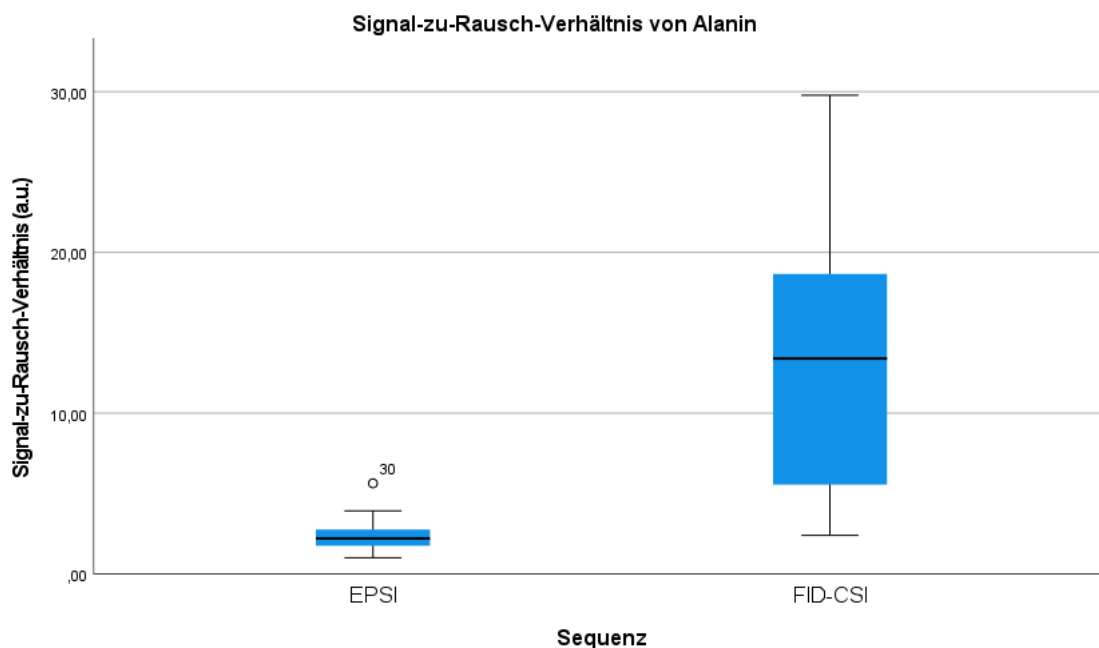


Abbildung 13: Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Alanin mit EPSI und FID-CSI

4.3 EPSI-Signal im zeitlichen Verlauf

Die Bildakquisition startete zeitgleich mit der Injektion des Polarisats mit einer zeitlichen Auflösung von 5 Sekunden. ^{13}C -Pyruvat zeigte eine rasche Anflutung im Tumor und erreichte nach mittleren 5,9 Sekunden ($\pm 2,6$ Sekunden) sein Maximum mit einem anschließend raschen Kurvenabfall. In 64,7 % der Tumore (11 von 17) stellte sich ein zweiter Rezirkulationsgipfel des Pyruvatsignals nach 28,6 Sekunden ($\pm 2,3$ Sekunden) dar (vgl. Abbildung 14). Das ^{13}C -Laktat-Signal erreichte sein Maximum nach 12,4 Sekunden ($\pm 5,8$ Sekunden) und fiel anschließend kontinuierlich ab (vgl. Abbildung 15). Aufgrund des niedrigeren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und der damit verbundenen geringeren Detektionsrate von ^{13}C -Alanin war keine valide Aussage über das dynamische Verhalten des Metaboliten möglich.

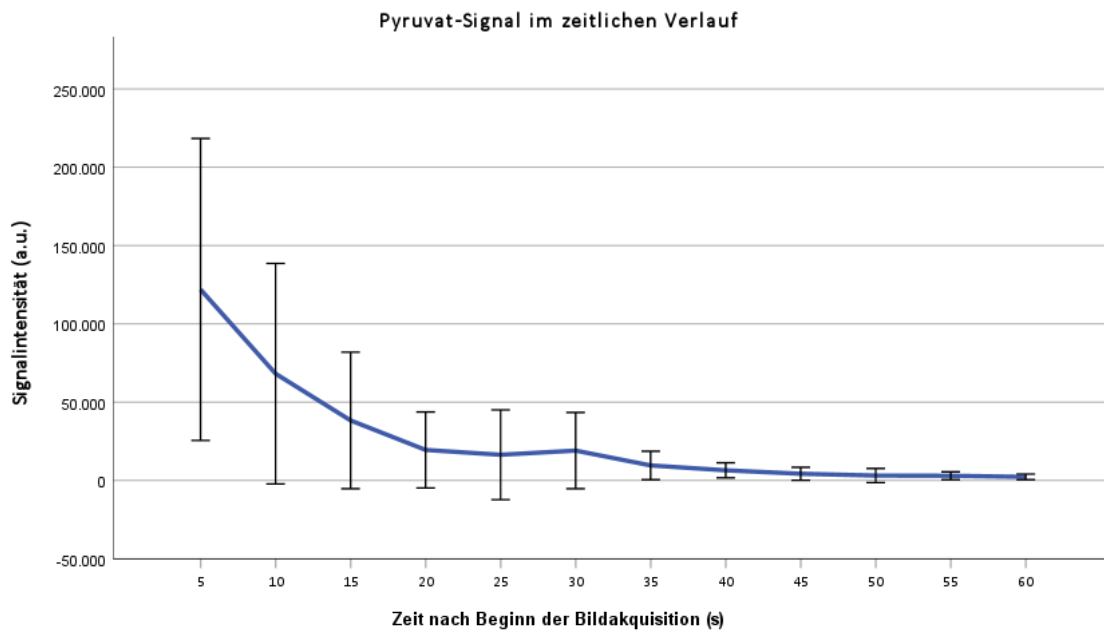


Abbildung 14: Signalintensität von Pyruvat im zeitlichen Verlauf

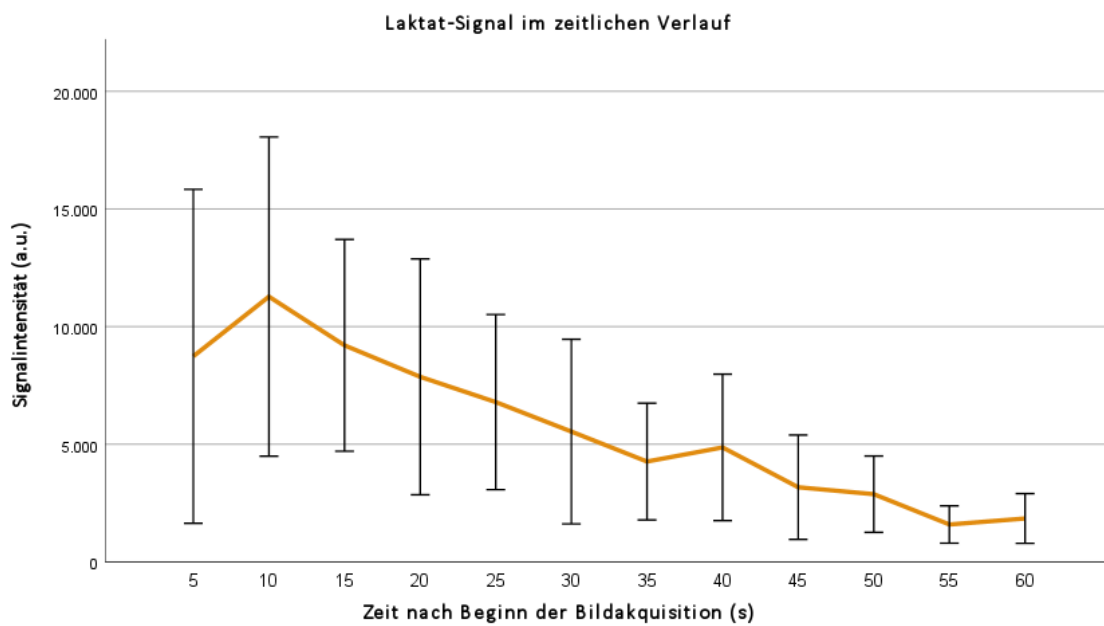


Abbildung 15: Signalintensität von Laktat im zeitlichen Verlauf

4.4 Laktat-Alanin-Verhältnis in Abhängigkeit von der Histologie

4.4.1 EPSI-Kohorte

Für die Bestimmung des Laktat-Alanin-Verhältnisses in der EPSI-Kohorte wurden die Metabolitensignale herangezogen, die 10 Sekunden nach Beginn der Bildakquisition gemessen wurden. Das Laktat-Alanin-Verhältnis in den HCCs der EPSI-Kohorte betrug $2,2 (\pm 1,1)$, in der Kontrollgruppe, die mit der FID-CSI-Sequenz untersucht wurde, lag es bei $0,99 (\pm 0,11)$. Die HCCs in der EPSI-Kohorte wiesen somit im Vergleich zum gesunden Leberparenchym der Kontrollgruppe ein signifikant höheres Laktat-Alanin-Verhältnis ($p = 0,004$) auf (vgl. Abbildung 16).

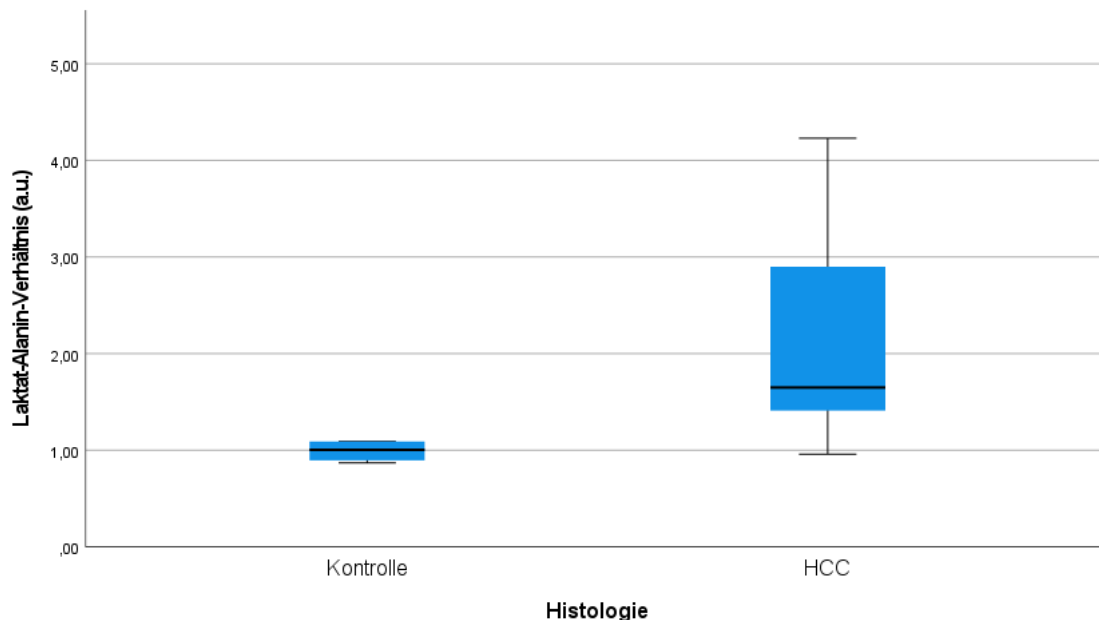


Abbildung 16: Laktat-Alanin-Verhältnis in den Tumoren der EPSI-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte

4.4.2 FID-CSI-Kohorte

Das Laktat-Alanin-Verhältnis in der Kontrollgruppe lag bei $0,99 (\pm 0,11)$. Die Subgruppe der Versuchstiere mit präkanzerösen Läsionen wies ein Laktat-Alanin-Verhältnis von $1,7 (\pm 0,52)$ auf; in der HCC-Subgruppe lag es bei $1,6 (\pm 0,62)$. Das mittlere Laktat-Alanin-Verhältnis lag damit sowohl in der Subgruppe mit den Präkanzerösen als auch in der Subgruppe mit den HCCs höher als in der Kontrollgruppe; in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-

Korrektur konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,108$) zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 17).

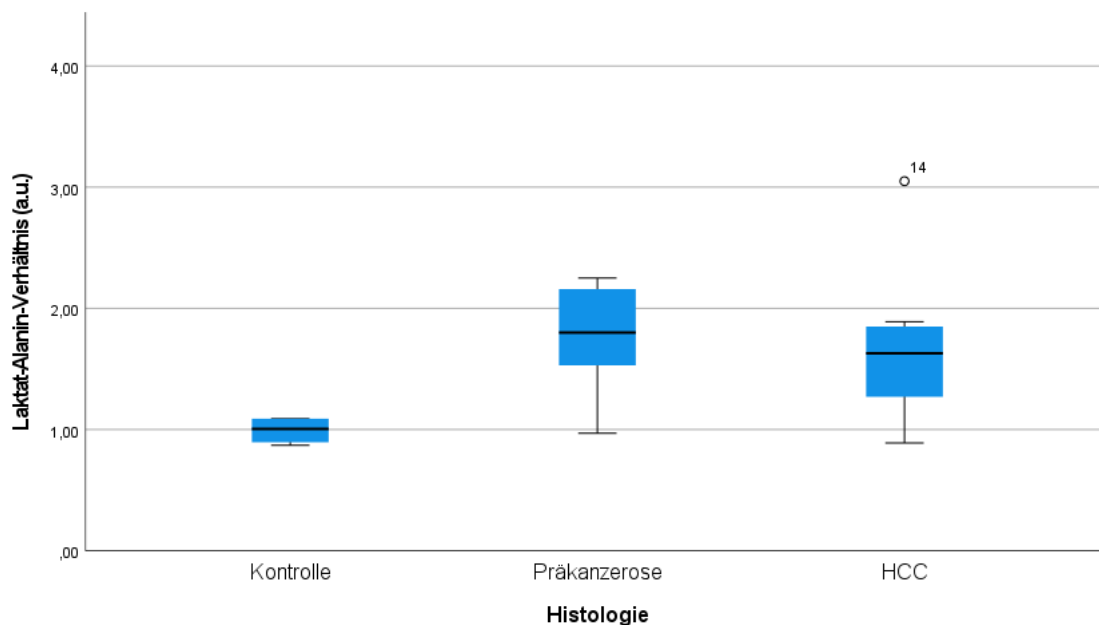


Abbildung 17: Laktat-Alanin-Verhältnis in den Tumoren der FID-CSI-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte

4.5 Laktat-Alanin-Verhältnis in Abhängigkeit von der GLUT1-Rezeptor-Expression

Die gegen GLUT1 gefärbten Gewebeproben wurden anhand des immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner entsprechend ihrer Färbeintensität und dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen in vier Kategorien (0–3) eingeteilt. Das Laktat-Alanin-Verhältnis stieg mit zunehmender GLUT1-Expression an: In der Kategorie 0 lag es bei $1,3 (\pm 0,4)$, in Kategorie 1 bei $1,6 (\pm 0,6)$. Die Kategorien 2 und 3 wiesen ein Laktat-Alanin-Verhältnis von $1,5 (\pm 0,5)$ bzw. von $2,5 (\pm 0,8)$ auf (vgl. Abbildung 18). Aufgrund der kleinen Stichprobenumfänge ist keine statistische Auswertung hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Kategorien möglich. Es zeigt sich jedoch, dass mit zunehmender GLUT1-Expression das Laktat-Alanin-Verhältnis ansteigt.

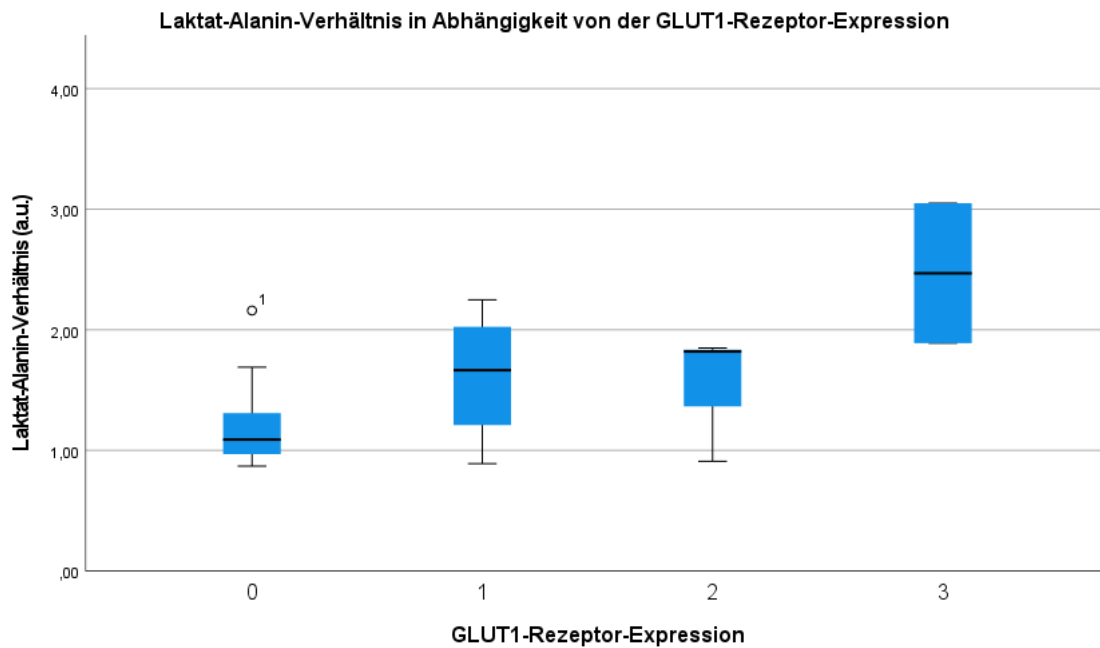


Abbildung 18: Laktat-Alanin-Verhältnis in Abhängigkeit von der GLUT1-Rezeptor-Expression

4.6 Spektrale Artefakte in der EPSI-Sequenz

In den spektroskopischen Datensätzen der EPSI-Sequenz traten teilweise ausgeprägte spektrale Artefakte auf. Das Phänomen konnte vor allem in Voxeln beobachtet werden, in denen sich größere Gefäße mit einer hohen intravasalen Konzentration von ^{13}C -Pyruvat befanden. Das Pyruvat-Signal „strahlte“ aus dem ursprünglichen Voxel kreuzförmig in die umliegenden Voxel (vgl. Abbildung 19).

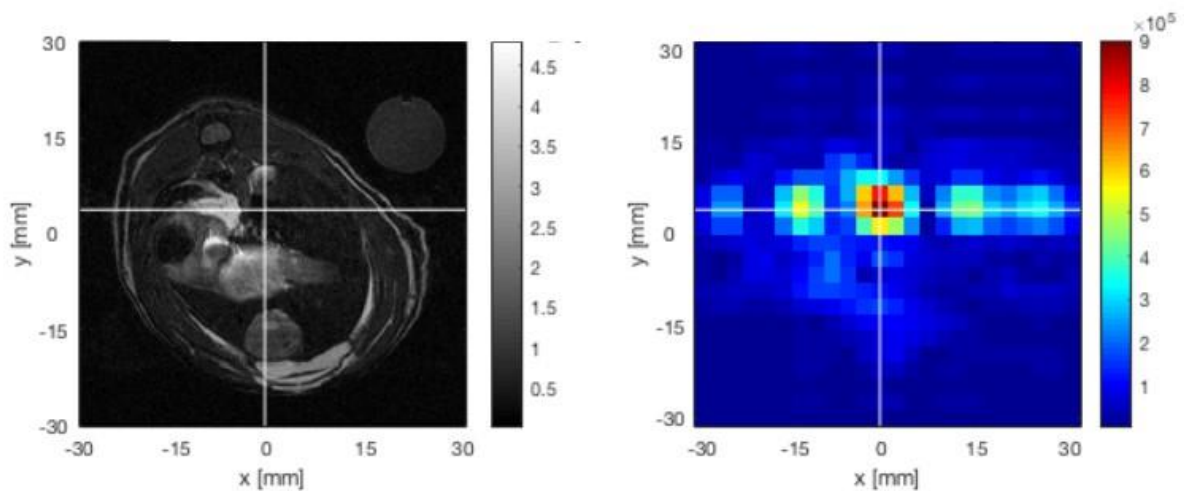


Abbildung 19: Spektrales Artefakt des ^{13}C -Pyruvat-Signals in der Aorta

5 Diskussion

5.1 DEN-Modell

Das DEN-induzierte HCC-Modell der Wistar-Ratte weist bezüglich Heterogenität, Mikroumgebung, Art der Tumorprogression und Metastasierungsmuster eine hohe Vergleichbarkeit mit dem HCC des Menschen auf (Ding et al., 2017; Hansen et al., 2018b; Macek Jilkova et al., 2019). Die DEN-Induktion führt zu zirrhotischen Veränderungen der Leber, die auch bei der Mehrheit der humanen HCCs zu finden sind, und bildet den Verlauf der Erkrankung dadurch besser ab als Tumortransplantatmodelle, in denen das benachbarte Leberparenchym keine histopathologischen Veränderungen aufweist. Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, da bei männlichen Tieren die Inzidenz des HCC nach DEN-Induktion höher ist als bei weiblichen. Als mögliche Ursache hierfür wird eine Östrogen-vermittelte Interleukin-6-Produktion angenommen, die zu einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion der Leber führt (Naugler et al., 2007).

5.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Detektionsrate der Metabolite

Erwartungsgemäß konnte die FID-CSI-Sequenz bei der Messung aller ^{13}C -Metabolite höhere Signal-zu-Rausch-Verhältnisse erzielen als die EPSI-Sequenz. Aufgrund der hohen ^{13}C -Pyruvat-Dosis, die den Versuchstieren injiziert wurde, war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für beide Sequenzen ausreichend, um eine Detektion des ^{13}C -Pyruvats-Signals in allen Proben zu ermöglichen. Auffällig ist die große Variabilität des ^{13}C -Pyruvat-Signals, obwohl für alle Versuche die gleiche gewichtsadaptierte ^{13}C -Pyruvat-Dosis verwendet wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der rasche Signalabfall, der bereits bei geringen zeitlichen Differenzen hinsichtlich des Beginns der Datenakquisition stark ins Gewicht fallen kann.

Durch den Einsatz automatisierter Injektionssysteme kann die Reproduzierbarkeit der Versuche erhöht werden. So haben beispielsweise S. Reynolds et al. (2014) ein MR-kompatibles, automatisiertes Injektionssystem entwickelt, das durch eine Kontrolle der Injektionsgeschwindigkeit und der Flussrate einen standardisierten Ablauf ermöglicht, wodurch die Reproduzierbarkeit der Versuche erhöht wird. Zusätzlich wird durch den Einsatz einer Peristaltikpumpe statt eines Spritzensystems die Injektionszeit verkürzt und somit der Polarisationsverlust minimiert.

Da ^{13}C -Laktat und ^{13}C -Alanin durch eine enzymatische Konversion von ^{13}C -Pyruvat entstehen, liegen sie *in vivo* in wesentlich geringeren Konzentrationen als ^{13}C -Pyruvat vor und weisen dementsprechend ein ungünstigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Eine weitere mögliche Ursache für das niedrigere Signal-zu-Rausch-Verhältnis liegt darin, dass ^{13}C -Laktat und ^{13}C -Alanin zu einem späteren Zeitpunkt als ^{13}C -Pyruvat nachweisbar sind und somit einem stärkeren Polarisationsverlust unterliegen. Für die Messung des ^{13}C -Laktat- und des ^{13}C -Alanin-Signals konnte mit der FID-CSI-Sequenz ein signifikant höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit auch eine höhere Detektionsrate als mit der EPSI-Sequenz erzielt werden. Eine Möglichkeit zur Optimierung der Signale ist der Einsatz von Multiband-RF-Pulsen. Pyruvat wird hierbei mit kleinen Flipwinkeln angeregt, um die Magnetisierung zu erhalten, während Laktat und Alanin durch größere Flipwinkel angeregt werden, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern (Larson et al., 2010).

Der Einsatz von variablen Flipwinkeln stellt eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses dar. Xing et al. (2013) konnten zeigen, dass durch eine graduelle Steigerung der Flipwinkel unter Berücksichtigung des Signalverlusts durch T_1 -Relaxation, vorangegangene RF-Anregungspulse und metabolische Konversion eine relativ konstante Verteilung der Magnetisierung während des Akquisitionsprozesses erreicht werden kann. Mithilfe dieses Schemas konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Laktat und Alanin insbesondere zu den späteren Messzeitpunkten verbessert werden. Die hieraus resultierende Erweiterung des Akquisitionsfensters ermöglicht es, präzisere Aussagen über die Kinetik der Metabolite zu treffen.

5.3 Laktat-Alanin-Verhältnis im HCC

Die Ergebnisse dieser Studie stützen die Hypothese, dass die Laktatproduktion ein charakteristisches Merkmal des HCC darstellt. Die Tumore der EPSI-Kohorte wiesen im Vergleich zum gesunden Leberparenchym der Kontrollgruppe ein signifikant höheres Laktat-Alanin-Verhältnis auf. Sowohl die HCCs als auch die präkanzerösen Läsionen in der FID-CSI-Kohorte wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höheres Laktat-Alanin-Verhältnis auf, wenngleich die Unterschiede zwischen den drei Gruppen nicht statistisch signifikant waren. Die frühzeitige, nichtinvasive Erkennung von Vorläuferstufen des HCC anhand metabolischer Veränderungen stellt eine

vielversprechende Möglichkeit für das Screening von Risikopatienten dar. Eine kürzliche Studie von Dutta et al. (2020) konnte beispielsweise den Stellenwert der hyperpolarisierten Bildgebung bei der frühzeitigen Detektion und Risikostratifizierung von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien zeigen, die als Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms gelten.

5.4 Laktatproduktion in Tumorzellen in Abhängigkeit von der GLUT1-Expression

Tumorzellen verfügen über einen besonderen Stoffwechsel, der durch eine hohe Glukosetransport- und Glykolyserate charakterisiert ist. Die Mehrzahl der Tumorzellen weist eine vermehrte Expression von GLUT1-Rezeptoren auf, die eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme in die Zelle spielen. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass auch beim HCC eine gesteigerte GLUT1-Expression mit einer erhöhten Laktatproduktion in den Tumorzellen einhergeht. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass eine Überexpression von GLUT1-Rezeptoren die Apoptose unterdrückt und eine Stimulation des Tumorwachstums bewirkt (Carvalho et al., 2011; Choi et al., 2007; Luo et al., 2010). Eine Studie von Amann et al. (2009) hat gezeigt, dass GLUT1-positive HCCs im Vergleich zu GLUT1-negativen eine signifikant höhere Proliferationsrate aufweisen. Die Inhibition der GLUT1-Expression durch siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der Glukoseaufnahme und Laktatproduktion in Hep3B-Zellen, die von humanen HCCs stammen. Darüber hinaus waren eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums und eine signifikante Hemmung der Zellmigration zu beobachten. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass bestrahlungsresistente Brustkrebszellen, die eine GLUT1-Überexpression aufwiesen, durch die Behandlung mit dem GLUT1-Inhibitor WZB117 gegenüber einer Bestrahlungstherapie resensitiviert werden konnten (Zhao et al., 2016). Die Bestimmung der ¹³C-Laktat-Konzentration durch die Magnetresonanzspektroskopie kann möglicherweise dabei helfen, das Therapieansprechen auf die Behandlung mit GLUT1-Inhibitoren frühzeitig zu erkennen.

5.5 Spektrale Artefakte in der EPSI-Sequenz

Der Einsatz von oszillierenden Gradienten während des freien Induktionszerfalls zur Akquisition von EPSI-Datensätzen führt durch Unstimmigkeiten von geraden und ungeraden Echos häufig zum Auftreten von Nyquist-Geisterartefakten, die in zweierlei

Hinsicht problematisch sind: Die Geister-Resonanzen eines Peaks können in der Nähe eines weiteren Peaks erscheinen und dadurch zu einer fehlerhaften Quantifizierung des zweiten Peaks führen. Außerdem führen Geister-Resonanzen dazu, dass die Intensität des eigentlichen Peaks reduziert wird (Du et al., 2003). Die reduzierte Signalintensität kann insbesondere bei der Detektion von Metaboliten, die in geringen Konzentrationen vorliegen, ein Problem darstellen.

5.6 Metabolische Bildgebung im Vergleich: ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie vs. PET

Die ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie weist gegenüber der PET, die derzeit die Standardmethode in der metabolischen Bildgebung darstellt, einige Vorteile auf. Während die PET die Akkumulation eines Tracers misst, ohne zwischen den verschiedenen radioaktiv markierten Metaboliten zu differenzieren, können im Rahmen der hyperpolarisierten ^{13}C -Bildgebung sowohl das injizierte Substrat als auch die daraus entstehenden Metabolite separat voneinander betrachtet werden. Die multiparametrische Detektion ermöglicht es, verschiedene Stoffwechselprozesse simultan zu untersuchen und in Echtzeit darzustellen.

Einige Tumorentitäten sind für die Untersuchung mittels ^{18}F -FDG-PET nur bedingt geeignet. Prostatakarzinome weisen, insbesondere bei guter Differenzierung, nur eine geringe ^{18}F -FDG-Aufnahme auf und können durch die FDG-PET-Untersuchung in der Regel nicht adäquat abgebildet werden. Die Untersuchungsbedingungen werden zusätzlich durch Tracer-Akkumulation in der Harnblase erschwert (Watanabe et al., 2010). Hirntumore sind aufgrund des hohen physiologischen Glukose-Uptakes des Gehirns in der PET-Bildgebung nur schwer vom gesunden Gewebe zu unterscheiden (D'Souza et al., 2011). Für diese Tumorentitäten stellt die hyperpolarisierte ^{13}C -Bildgebung eine vielversprechende Alternative zur Untersuchung des Stoffwechsels dar.

Ein wesentlicher Nachteil der hyperpolarisierten Bildgebung gegenüber der PET ist die geringere Sensitivität. Während bereits geringe Konzentrationen eines PET-Tracers im Nano- bis Pikomol-Bereich für dessen Detektion ausreichend sind, liegt die Sensitivitätsschwelle der ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie im Millimol-Bereich und überschreitet somit die physiologischen Konzentrationen der Metabolite. Dies könnte

einen potenziellen Störfaktor für den normalen Zellstoffwechsel darstellen (Gallagher et al., 2011).

Eine weitere Limitation der ^{13}C -Magnetresonanztomographie liegt in der im Vergleich zum PET geringeren örtlichen Auflösung. Mit der PET-Untersuchung ist eine isotrope Auflösung von bis zu 1 mm möglich. Bei der ^{13}C -Magnetresonanztomographie werden hingegen dickere Schichten von ungefähr 5 mm verwendet, um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Die PET ermöglicht eine Ganzkörperaufnahme, wohingegen das Untersuchungsgebiet bei der ^{13}C -Magnetresonanztomographie auf eine zuvor festgelegte Region eingegrenzt ist (Gallagher et al., 2011).

Beide Verfahren unterliegen in Abhängigkeit von den Halbwertszeiten der eingesetzten Substrate zeitlichen Limitationen. Dies ist vor allem bei der hyperpolarisierten Bildgebung problematisch, da die Halbwertszeit von ^{13}C -Pyruvat nur 30 bis 40 Sekunden beträgt (Serrao & Brindle, 2016). Langsamere oder später einsetzende Stoffwechselprozesse können somit nur eingeschränkt untersucht werden.

Die PET-Untersuchung, die zur anatomischen Koregistrierung in der Regel zusammen mit einer CT durchgeführt wird, stellt eine Strahlenexposition für den Körper dar. Die Belastung einer einzelnen Untersuchung ist zwar gering, im Falle von wiederholter Exposition kann es jedoch zu einer relevanten Akkumulation der Strahlenbelastung kommen, die insbesondere bei Kindern und Frauen im gebärfähigen Alter problematisch sein kann (Gallagher et al., 2011). Die ^{13}C -Magnetresonanztomographie stellt eine strahlenfreie Alternative zur PET-CT dar. In der ersten am Menschen durchgeführte Studie zur Hyperpolarisationsbildgebung von Nelson et al. konnte keine dosislimitierende Toxizität des injizierten Hyperpolarisats festgestellt werden (Nelson et al., 2013).

Die simultane Bildgebung mittels ^{13}C -Magnetresonanztomographie und FDG-PET/MRT konnte in mehreren Studien vielversprechendes Potenzial demonstrieren. Durch den kombinierten Einsatz beider Verfahren ist es möglich, die Glykolyse von der Glukoseaufnahme in die Zelle bis hin zur Laktatkonversion zu erfassen. Die ^{13}C -Magnetresonanztomographie kann außerdem in unklaren Fällen dazu beitragen,

zwischen unspezifischem und tumorbedingtem FDG-Uptake zu differenzieren (Hansen et al., 2018a).

6 Ausblick

Die DNP-Polarisation ist eine relativ neue Technologie, die eine nichtinvasive Beobachtung von hyperpolarisierten ^{13}C -markierten Molekülen ermöglicht. Die Anwendung am Menschen hat bereits vielversprechende Ergebnisse hervorgebracht. Die erste hyperpolarisierte ^{13}C -Bildgebung am Menschen wurde an der *University of California, San Francisco* an Patienten mit Prostatakarzinom durchgeführt. Durch das gemessene ^{13}C -Laktat-Signal konnten Lokalisation und Größe des Tumors in Abgrenzung zum benachbarten, gutartigen Gewebe präzise erfasst werden. Die Studie ergab zudem, dass die Injektion von hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat auch für die Anwendung am Menschen sicher ist und keine unerwünschten Nebenwirkungen hat. Die ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie konnte zudem Tumorregionen erfassen, die durch die multiparametrische ^1H -Bildgebung nicht detektiert wurden (Wilson & Kurhanewicz, 2014).

Eines der vielversprechendsten Anwendungsgebiete der ^{13}C -Bildgebung ist die frühzeitige Beurteilung des Therapieansprechens. Iasante et al. konnten zeigen, dass ein Knock-down von PARP14 mithilfe einer PARP14-spezifischen Short-Hairpin-RNA durch eine verringerte Glukoseaufnahme, eine verringerte Laktatproduktion und eine verringerte extrazelluläre Azidifizierung zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums bei HCCs führt. Mithilfe der ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie können die Veränderungen im Glukosestoffwechsel frühzeitig dargestellt werden (Iasante et al., 2015).

Die Bildgebung mit hyperpolarisierten ^{13}C -Molekülen konnte bereits an zahlreichen Organen durchgeführt werden, unter anderem am Herzen, am Gehirn, an der Leber, an der Prostata und an der Brust. Die hyperpolarisierte Bildgebung ist nicht nur auf onkologische Fragestellungen begrenzt, sie findet zunehmend auch in anderen Bereichen Anwendung. Golman et al. (2008) konnten zum Beispiel zeigen, dass eine ischämiebedingte Myokardschädigung durch eine verminderte Konversion von ^{13}C -Pyruvat zu ^{13}C -Bikarbonat quantifiziert werden kann. Hypoxische Nierenschäden im Rahmen einer diabetischen Nephropathie könnten möglicherweise durch eine vermehrte Konversion von Pyruvat zu Laktat entdeckt werden (Laustsen et al., 2013).

Bisher ist ^{13}C -Pyruvat das einzige Molekül, das für die Anwendung am Menschen zugelassen ist. Daneben existieren jedoch weitere ^{13}C -markierte Substanzen, die in

Zukunft für die klinische Anwendung zugelassen werden könnten. Hierzu gehört beispielsweise ^{13}C -Fumarat, dessen Metabolisierung zu ^{13}C -Malat einen Marker für die Zellnekrose darstellt (Laustsen et al., 2020). Die Anwendung von ^{13}C -Harnstoff als Perfusionsmarker und von ^{13}C -Bicarbonat als pH-Marker wird in zahlreichen Studien untersucht (Fuetterer et al., 2017; Gallagher et al., 2008).

Wenngleich sich die Technologie noch in ihren Anfängen befindet, konnten in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden. Die Zahl der Institute und Einrichtungen, die die hyperpolarisierte ^{13}C -Bildgebung anwenden, steigt stetig an. Durch den Einsatz einheitlicher Protokolle kann die Reproduzierbarkeit der Versuche erhöht und somit eine Möglichkeit zur Durchführung von Multicenter-Studien geschaffen werden. Durch die Entdeckung neuer, biologisch relevanter ^{13}C -Tracer und durch technologische Fortschritte in der Bildakquisition wachsen die potenziellen Anwendungsgebiete der ^{13}C -DNP kontinuierlich.

7 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom stellt weltweit die sechsthäufigste Tumorerkrankung dar und ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Da die Erkrankung in den frühen Stadien in der Regel asymptomatisch ist, erfolgt die Diagnose häufig erst im fortgeschrittenen Stadium. Zur klassischen bildgebenden HCC-Diagnostik gehören die Sonographie, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie. Die Positronen-Emissions-Tomographie kann zusätzlich Aufschluss über den Tumormetabolismus geben, die Anwendung zur HCC-Diagnostik ist jedoch aufgrund der geringen Sensitivität limitiert.

Häufig gewinnen Tumorzellen ihre Energie selbst bei adäquater Sauerstoffversorgung durch anaerobe Glykolyse, wodurch vermehrt Laktat generiert wird. Dieser Mechanismus wird nach seinem Entdecker auch als Warburg-Effekt bezeichnet. Die Hyperpolarisations-Magnetresonanztomographie erlaubt durch eine nichtinvasive Quantifizierung der Laktatproduktion einen Einblick in den Tumormetabolismus.

In dieser Studie wurde die Laktatproduktion des HCC an männlichen Wistar-Ratten mit DEN-induzierten Tumoren untersucht. Die Versuchstiere wurden in zwei Kohorten unterteilt, die mit verschiedenen Sequenzen der Magnetresonanztomographie untersucht wurden. Bei den Sequenzen handelte es sich um die statische FID-CSI-Sequenz und die dynamische EPSI-Sequenz. Nach Injektion von hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat wurde dessen Konversion zu ^{13}C -Laktat und ^{13}C -Alanin in den Tumoren gemessen. Die FID-CSI-Sequenz wies im Vergleich zur EPSI-Sequenz eine höhere Sensitivität bei der Detektion der Metabolite, ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie eine geringere Artefaktanfälligkeit auf. Ein Vorteil der EPSI-Sequenz lag in der Möglichkeit, die Metabolite über einen bestimmten Zeitraum mehrfach zu messen und somit eine Aussage über die zeitliche Dynamik der Stoffwechselfvorgänge zu treffen, wohingegen bei der FID-CSI-Sequenz lediglich eine einmalige Messung in einem definierten Zeitfenster erfolgte, sodass nur die Metaboliten-Konzentrationen, nicht aber die zeitliche Dynamik untersucht werden konnte.

Die Studie konnte zeigen, dass die Tumoren sowohl in der FID-CSI- als auch in der EPSI-Kohorte gegenüber den gesunden Lebern der Kontrollgruppe eine vermehrte Laktatproduktion aufwiesen, wobei dieser Unterschied nur in der EPSI-Kohorte statistisch signifikant war. Bemerkenswerterweise wies die Subgruppe der FID-CSI-

Kohorte mit präkanzerösen Läsionen im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine vermehrte Laktatproduktion auf, wenngleich der Unterschied nicht statistisch signifikant war.

Die immunhistochemische Aufarbeitung des Tumorgewebes zeigte eine positive Korrelation zwischen der Expression des Glukose-Transporters GLUT1 und der Laktatproduktion der Tumorzellen. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen einiger Studien, die zeigen, dass die Inhibition der GLUT1-Expression einen vielversprechenden Ansatz darstellt, um die Laktatproduktion von Tumorzellen zu reduzieren.

Die Ergebnisse untermauern somit die Hypothese, dass der Warburg-Effekt bei der Kanzerogenese des hepatozellulären Karzinoms eine entscheidende Rolle spielt und eine frühzeitige Erkennung von Vorläuferläsionen ermöglichen kann. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Magnetresonanzspektroskopie mit hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat ein geeignetes Verfahren zur nichtinvasiven Diagnostik des Laktatstoffwechsels im HCC darstellt.

8 Publikationen

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde auf dem 98. Deutschen Röntgenkongresses in Form eines Kongressbeitrags mit dem Titel: „Detektion metaboler Subgruppen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRSI) mit hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat“ präsentiert.

Ein Teil der Ergebnisse, die in diese Arbeit eingegangen sind, wurde in Form eines wissenschaftlichen Papers mit dem Titel „Hyperpolarized ^{13}C pyruvate magnetic resonance spectroscopy for in vivo metabolic phenotyping of rat HCC“ im Journal Scientific Reports am 13.01.2021 veröffentlicht.

9 Literaturverzeichnis

- Amann, T., Maegdefrau, U., Hartmann, A., Agaimy, A., Marienhagen, J., Weiss, T. S., Stoeltzing, O., Warnecke, C., Schölmerich, J., Oefner, P. J., Kreutz, M., Bosserhoff, A. K. & Hellerbrand, C. (2009). GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 174(4), 1544–1552. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080596>
- Ananthakrishnan, A., Gogineni, V. & Saeian, K. (2006). Epidemiology of primary and secondary liver cancers. *Semin Intervent Radiol*, 23(1), 47–63. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939841>
- Ardenkjær-Larsen, J. H., Golman, K. & Brindle, K. M. (2010). Hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging: principles and applications. In R. Weissleder, B. D. Ross, A. Rehemtulla & S. S. Gambhir (Hg.), *Molecular imaging: principles and practice* (S. 377–388). People's Medical Publishing House–USA.
- Ardenkjaer-Larsen, J. H., Macholl, S. & Jóhannesson, H. (2008). Dynamic nuclear polarization with trityls at 1.2 K. *Appl Magn Reson*, 34(3-4), 509–522. <https://doi.org/10.1007/s00723-008-0134-4>
- Ardenkjaer-Larsen, J. H., Fridlund, B., Gram, A., Hansson, G., Hansson, L., Lerche, M. H., Servin, R., Thaning, M. & Golman, K. (2003). Increase in signal-to-noise ratio of 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10158–10163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1733835100>
- Arif-Tiwari, H., Kalb, B., Chundru, S., Sharma, P., Costello, J., Guessner, R. W. & Martin, D. R. (2014). MRI of hepatocellular carcinoma: an update of current practices. *Diagn Interv Radiol*, 20(3), 209–221. <https://doi.org/10.5152/dir.2014.13370>
- Atkins, P. W., Paula, J. de & Friedman, R. S. (2014). *Physical chemistry: quanta, matter, and change* (2. Aufl.). Oxford University Press.
- Attwa, M. H. & El-Etreby, S. A. (2015). Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, 7(12), 1632–1651. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i12.1632>
- Bartosch, B. (2010). Hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma. *Viruses*, 2(8), 1504–1509. <https://doi.org/10.3390/v2081504>
- Berg, J. M., Stryer, L. & Tymoczko, J. L. (2013). *Stryer Biochemie* (7. Aufl.). Springer.
- Bialecki, E. S. & Di Bisceglie, A. M. (2005). Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, 7(1), 26–34. <https://doi.org/10.1080/13651820410024049>

- Bücheler, E., Götttsche, T., Lackner, K.-J. & Thelen, M. (Hg.) (2006). *Einführung in die Radiologie: Diagnostik und Interventionen* (11. Aufl.). Thieme.
- Carvalho, K. C., Cunha, I. W., Rocha, R. M., Ayala, F. R., Cajaíba, M. M., Begnami, M. D., Vilela, R. S., Paiva, G. R., Andrade, R. G. & Soares, F. A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(6), 965–972. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000600008>
- Cazejust, J., Bessoud, B., Colignon, N., Garcia-Alba, C., Planché, O. & Menu, Y. (2014). Hepatocellular carcinoma vascularization: from the most common to the lesser known arteries. *Diagn Interv Imaging*, 95(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.04.015>
- Chaumeil, M. M., Najac, C. & Ronen, S. M. (2015). Studies of metabolism using ¹³C MRS of hyperpolarized probes. In C. M. Metallo (Hg.), *Methods in enzymology: Bd. 561. Metabolic analysis using stable isotopes* (Bd. 561, S. 1–54). Elsevier; Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.04.001>
- Choi, Y. S., Kim, S. J., Kim, D. S., Park, S. J., Park, Y., Shin, H. J., Jung, K.-Y., Baek, S.-K., Shin, B. K., Choi, J. W., Kim, B. S., Shin, S. W., Kim, Y. H. & Kim, J. S. (2007). Glucose transporter-1 expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Res Treat*, 39(3), 109–115. <https://doi.org/10.4143/crt.2007.39.3.109>
- Conolly, S., Macovski, A., Pauly, J., Schenck, J., Kwong, K. K., Chesler, D. A., Hu, X., Chen, W., Patel, M. & Ugurbil, K. (2013). Magnetic resonance imaging. In M. Analoui, J. D. Bronzino & D. R. Peterson (Hg.), *Medical imaging: principles and practices* (S. 31–37). Taylor & Francis; CRC Press.
- D'Souza, M. M., Sharma, R., Tripathi, M., Panwar, P., Jaimini, A. & Mondal, A. (2011). Novel positron emission tomography radiotracers in brain tumor imaging. *Indian J Radiol Imaging*, 21(3), 202–208. <https://doi.org/10.4103/0971-3026.85369>
- Digumarthy, S. R., Sahani, D. V. & Saini, S. (2005). MRI in detection of hepatocellular carcinoma (HCC). *Cancer Imaging*, 5(1), 20–24. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2005.0005>
- Ding, Y.-F., Wu, Z.-H., Wei, Y.-J., Shu, L. & Peng, Y.-R. (2017). Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine. *J Cancer Res Clin Oncol*, 143(5), 821–834. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2364-z>
- Dragani, T. A. (2010). Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics. *J Hepatol*, 52(2), 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.015>

- Du, W., Du, Y. P., Fan, X., Zamora, M. A. & Karczmar, G. S. (2003). Reduction of spectral ghost artifacts in high-resolution echo-planar spectroscopic imaging of water and fat resonances. *Magn Reson Med*, 49(6), 1113–1120. <https://doi.org/10.1002/mrm.10485>
- Dutta, P., Pando, S. C., Mascaro, M., Riquelme, E., Zoltan, M., Zacharias, N. M., Gammon, S. T., Piwnica-Worms, D., Pagel, M. D., Sen, S., Maitra, A., Shams, S., McAllister, F. & Bhattacharya, P. K. (2020). Early detection of pancreatic intraepithelial neoplasias (panins) in transgenic mouse model by hyperpolarized ^{13}C metabolic magnetic resonance spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3722. <https://doi.org/10.3390/ijms21103722>
- Ernst, L. (1980). *^{13}C -NMR-Spektroskopie: eine Einführung* (Bd. 1061). Steinkopff. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-95971-4>
- Ettorre, G. M. & Laurenzi, A. (2020). Other „bridge“ therapies for liver transplantation: RFA, TACE, and TARE. In U. Cillo & L. de Carlis (Hg.), *Liver transplantation and hepatobiliary surgery: interplay of technical and theoretical aspects* (S. 183–191). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19762-9_19
- Fischbach, R. (2012). Interventionelle regionale Tumorthherapie. In E. Aulbert, H. Pichlmaier & H. Albrecht (Hg.), *Lehrbuch der Palliativmedizin* (3. Aufl., S. 664–680). Schattauer.
- Friebolin, H. & Thiele, C. M. (2013). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung* (5. Aufl.). Wiley-VCH. <http://lib.myilibrary.com/?id=446987>
- Friesen-Waldner, L., Chen, A. P., Mander, W., Scholl, T. J. & McKenzie, C. A. (2012). Optimisation of dynamic nuclear polarisation of $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate by addition of gadolinium-based contrast agents. *J Magn Reson*, 223, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.07.010>
- Fuetterer, M., Busch, J., Peereboom, S. M., Deuster, C. von, Wissmann, L., Lipiski, M., Fleischmann, T., Cesarovic, N., Stoeck, C. T. & Kozerke, S. (2017). Hyperpolarized ^{13}C urea myocardial first-pass perfusion imaging using velocity-selective excitation. *J Cardiovasc Magn Reson*, 19(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12968-017-0364-4>
- Gallagher, F. A., Bohndiek, S. E., Kettunen, M. I., Lewis, D. Y., Soloviev, D. & Brindle, K. M. (2011). Hyperpolarized ^{13}C MRI and PET: in vivo tumor biochemistry. *J Nucl Med*, 52(9), 1333–1336. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.085258>

- Gallagher, F. A., Kettunen, M. I., Day, S. E., Hu, D.-E., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Zandt, R. in't, Jensen, P. R., Karlsson, M., Golman, K., Lerche, M. H. & Brindle, K. M. (2008). Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ^{13}C -labelled bicarbonate. *Nature*, 453(7197), 940–943. <https://doi.org/10.1038/nature07017>
- Golman, K., Petersson, J. S., Magnusson, P., Johansson, E., Akeson, P., Chai, C.-M., Hansson, G. & Månsson, S. (2008). Cardiac metabolism measured noninvasively by hyperpolarized ^{13}C MRI. *Magn Reson Med*, 59(5), 1005–1013. <https://doi.org/10.1002/mrm.21460>
- Hamid, A. S., Tesfamariam, I. G., Zhang, Y. & Zhang, Z. G. (2013). Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncol Lett*, 5(4), 1087–1092. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1169>
- Hansen, A. E., Gutte, H., Holst, P., Johannesen, H. H., Rahbek, S., Clemmensen, A. E., Larsen, M. M., Schøier, C., Ardenkjaer-Larsen, J., Klausen, T. L., Kristensen, A. T. & Kjaer, A. (2018a). Combined hyperpolarized ^{13}C -pyruvate MRS and ^{18}F -FDG PET (hyperPET) estimates of glycolysis in canine cancer patients. *European Journal of Radiology*, 103, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.02.028>
- Hansen, A. E., Gutte, H., Holst, P., Johannesen, H. H., Rahbek, S., Clemmensen, A. E., Larsen, M. M. E., Schøier, C., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Klausen, T. L., Kristensen, A. T. & Kjaer, A. (2018b). Combined hyperpolarized ^{13}C -pyruvate MRS and ^{18}F -FDG PET (hyperPET) estimates of glycolysis in canine cancer patients. *European Journal of Radiology*, 103, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.02.028>
- Hatada, K. & Kitayama, T. (2004). *NMR spectroscopy of polymers*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-08982-8>
- Hendrick, R. E. (Hg.) (2008). *Breast MRI: fundamentals and technical aspects*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-73507-8>
- Hernández-Guerra, M., Hernández-Camba, A., Turnes, J., Ramos, L. M., Arranz, L., Mera, J., Crespo, J. & Quintero, E. (2015). Application of the Barcelona Clinic Liver Cancer therapeutic strategy and impact on survival. *United European Gastroenterol J*, 3(3), 284–293. <https://doi.org/10.1177/2050640615575971>
- Herrmann, K. & Ros, P. R. (2012). Computed tomography. In C. J. Hawkey, J. Bosch, J. E. Richter, G. Garcia-Tsao & F. K. L. Chan (Hg.), *Textbook of clinical gastroenterology and hepatology* (2. Aufl., S. 1006–1013). John Wiley & Sons.

- Hiyama, E. (2014). Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Transl Pediatr*, 3(4), 293–299. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2014.09.01>
- Hore, P. J. (2015). *Nuclear magnetic resonance* (2. Aufl.)(Oxford chemistry primers). Oxford University Press.
- Horn, F. (2015). *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium* (6. Aufl.). Georg Thieme.
- Hoshida, Y. (2019). *Hepatocellular carcinoma: translational precision medicine approaches*. (Molecular and Translational Medicine Ser). Springer International.
- Huang, X., Zheng, Q. & Yu, Z. (2013). Neoadjuvant Chemotherapy for Hepatocellular Carcinoma. In A. O. Kaseb (Hg.), *Hepatocellular carcinoma: future outlook* (S. 81–96). Books on Demand; InTech. <https://doi.org/10.5772/56289>
- Hurd, R. E., Yen, Y.-F., Chen, A. P. & Ardenkjaer-Larsen, J. H. (2012). Hyperpolarized ^{13}C metabolic imaging using dissolution dynamic nuclear polarization. *J Magn Reson Imaging*, 36(6), 1314–1328. <https://doi.org/10.1002/jmri.23753>
- Iansante, V., Choy, P. M., Fung, S. W., Liu, Y., Chai, J.-G., Dyson, J., Del Rio, A., D'Santos, C., Williams, R., Chokshi, S., Anders, R. A., Bubici, C. & Papa, S. (2015). PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms8882>
- Jang, B. K. (2016). Does obesity increase the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients? *Clin Mol Hepatol*, 22(3), 336–338. <https://doi.org/10.3350/cmh.2016.0104>
- Kee, K.-M. & Lu, S.-N. (2017). Diagnostic efficacy of ultrasound in hepatocellular carcinoma diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(4), 277–279. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1292126>
- Kreutzig, T. (2006). *Kurzlehrbuch Biochemie* (12. Aufl.). Elsevier Urban & Fischer.
- Kumar, R. & Chauhan, A. (2013). Recent advances in PET/CT and PET/MR. In A. K. Gupta, V. Chowdhury & N. Khandelwal (Hg.), *AIIMS-MAMC-PGI Imaging Series. Diagnostic radiology: recent advances and applied physics in imaging* (2. Aufl., S. 373–391). Jaypee Brothers Medical Publishers. https://doi.org/10.5005/jp/books/11964_26
- Kurhanewicz, J., Bok, R., Nelson, S. J. & Vigneron, D. B. (2008). Current and potential applications of clinical ^{13}C MR spectroscopy. *J Nucl Med*, 49(3), 341–344. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.045112>

- Lafaro, K. J. & Pawlik, T. M. (2015). Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: current clinical perspectives. *J Hepatocell Carcinoma*, 2, 151–157. <https://doi.org/10.2147/JHC.S75153>
- Lang, H. & Mischinger, H. J. (2008). Primäre Malignome der Leber. In M. Gnant & P. M. Schlag (Hg.), *Chirurgische Onkologie: Strategien und Standards für die Praxis* (S. 185–199). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-211-48613-9_17
- Larson, P. E. Z., Bok, R., Kerr, A. B., Lustig, M., Hu, S., Chen, A. P., Nelson, S. J., Pauly, J. M., Kurhanewicz, J. & Vigneron, D. B. (2010). Investigation of tumor hyperpolarized 1-¹³C-pyruvate dynamics using time-resolved multiband RF excitation echo-planar MRSI. *Magn Reson Med*, 63(3), 582–591. <https://doi.org/10.1002/mrm.22264>
- Laustsen, C., Nielsen, P. M., Qi, H., Løbner, M. H., Palmfeldt, J. & Bertelsen, L. B. (2020). Hyperpolarized [1,4-¹³C]fumarate imaging detects microvascular complications and hypoxia mediated cell death in diabetic nephropathy. *Sci Rep*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66265-6>
- Laustsen, C., Østergaard, J. A., Lauritzen, M. H., Nørregaard, R., Bowen, S., Søgaard, L. V., Flyvbjerg, A., Pedersen, M. & Ardenkjaer-Larsen, J. H. (2013). Assessment of early diabetic renal changes with hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 29(2), 125–129. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2370>
- Lee, J. M., Lee, D. H. & Yoon, J.-H. (2012). Imaging Findings of Cirrhotic Liver. In C. J. Zech, C. Bartolozzi, R. Baron & M. F. Reiser (Hg.), *Medical Radiology. Multislice-CT of the abdomen* (S. 47–83). Springer. https://doi.org/10.1007/174_2012_538
- Leitlinienprogramm Onkologie (Mai 2013). *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms: Langversion 1.0*. AWMF-Registernummer: 032-053OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>
- Linnemann, M. & Kühl, M. (2005). *Biochemie für Mediziner: ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug* (7. Aufl.). Springer. <https://doi.org/10.1007/3-540-34989-8>
- Lumata, L., Merritt, M. E., Malloy, C. R., Sherry, A. D. & Kovacs, Z. (2012). Impact of Gd³⁺ on DNP of [1-¹³C]pyruvate doped with trityl OX063, BDPA, or 4-oxo-TEMPO. *J Phys Chem A*, 116(21), 5129–5138. <https://doi.org/10.1021/jp302399f>

- Lumata, L., Jindal, A. K., Merritt, M. E., Malloy, C. R., Sherry, A. D. & Kovacs, Z. (2011). DNP by thermal mixing under optimized conditions yields >60,000-fold enhancement of ^{89}Y NMR signal. *J Am Chem Soc*, 133(22), 8673–8680. <https://doi.org/10.1021/ja201880y>
- Luo, X.-M., Zhou, S.-H. & Fan, J. (2010). Glucose transporter-1 as a new therapeutic target in laryngeal carcinoma. *J Int Med Res*, 38(6), 1885–1892. <https://doi.org/10.1177/147323001003800601>
- Macek Jilkova, Z., Kurma, K. & Decaens, T. (2019). Animal models of hepatocellular carcinoma: the role of immune system and tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101487>
- Massarweh, N. N. & El-Serag, H. B. (2017). Epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Control*, 24(3), 1073274817729245. <https://doi.org/10.1177/1073274817729245>
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L. & London, W. T. (2015). Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis*, 19(2), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.01.001>
- Meier, D. (2013). *MRI Grundlagen*. Books on Demand.
- Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M. & Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317(5834), 121–124. <https://doi.org/10.1126/science.1140485>
- Nelson, S. J., Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., Larson, P. E. Z., Harzstark, A. L., Ferrone, M., Criekinge, M. van, Chang, J. W., Bok, R., Park, I., Reed, G., Carvajal, L., Small, E. J., Munster, P., Weinberg, V. K., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Chen, A. P., Hurd, R. E., Odegardstuen, L.-I., . . . Murray, J. A. (2013). Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized 1- ^{13}C pyruvate. *Sci Transl Med*, 5(198), 198ra108. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006070>
- Nelson, S. J., Vigneron, D. B., Kurhanewicz, J., Chen, A. P., Bok, R. & Hurd, R. E. (2008). DNP-hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance metabolic imaging for cancer application. *Appl Magn Reson*, 34(3-4), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s00723-008-0136-2>
- Neubauer, S. (2005). Kardiale Magnetresonanzspektroskopie. In V. Hombach, O. Grebe, R. M. Botnar & P. Beerbaum (Hg.), *Kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie: Grundlagen, Technik, klinische Anwendung* (S. 197–222). Schattauer.

- Omami, G., Tamimi, D. & Branstetter, B. F. (2014). Basic principles and applications of ^{18}F -FDG-PET/CT in oral and maxillofacial imaging: a pictorial essay. *Imaging Sci Dent*, 44(4), 325–332. <https://doi.org/10.5624/isd.2014.44.4.325>
- Potter, M., Newport, E. & Morten, K. J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*, 44(5), 1499–1505. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>
- Poustchi-Amin, M., Mirowitz, S. A., Brown, J. J., McKinstry, R. C. & Li, T. (2001). Principles and applications of echo-planar imaging: a review for the general radiologist. *Radiographics*, 21(3), 767–779. <https://doi.org/10.1148/radiographics.21.3.g01ma23767>
- Reynolds, A. R., Furlan, A., Fetzer, D. T., Sasatomi, E., Borhani, A. A., Heller, M. T. & Tublin, M. E. (2015). Infiltrative hepatocellular carcinoma: what radiologists need to know. *Radiographics*, 35(2), 371–386. <https://doi.org/10.1148/rg.352140114>
- Reynolds, S., Bucur, A., Port, M., Alizadeh, T., Kazan, S. M., Tozer, G. M. & Paley, M. N. J. (2014). A system for accurate and automated injection of hyperpolarized substrate with minimal dead time and scalable volumes over a large range. *J Magn Reson*, 239(100), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2013.10.024>
- Russo, F. P., Imondi, A., Lynch, E. N. & Farinati, F. (2018). When and how should we perform a biopsy for HCC in patients with liver cirrhosis in 2018? A review. *Dig Liver Dis*, 50(7), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.014>
- Sahm, S. & Caspary, W. F. (2003). *Gastroenterologische Onkologie: klinischer Leitfaden für Diagnostik und Therapie* (2. Aufl.). Schattauer.
- Schäberle, W. (2000). *Interventionelle Sonographie*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59646-9>
- Schartl, M., Gessler, M. & Eckardstein, A. v. (2009). *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Große Falttafel mit Stoffwechselübersicht. Elsevier Urban & Fischer.
- Schroeder, M. A., Clarke, K., Neubauer, S. & Tyler, D. J. (2011). Hyperpolarized magnetic resonance: a novel technique for the in vivo assessment of cardiovascular disease. *Circulation*, 124(14), 1580–1594. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.024919>
- Serrao, E. M. & Brindle, K. M. (2016). Potential clinical roles for metabolic imaging with hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate. *Front Oncol*, 6, 59. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00059>

- Shih, W.-L., Chang, H.-C., Liaw, Y.-F., Lin, S.-M., Lee, S.-D., Chen, P.-J., Liu, C.-J., Lin, C.-L. & Yu, M.-W. (2012). Influences of tobacco and alcohol use on hepatocellular carcinoma survival. *Int J Cancer*, 131(11), 2612–2621. <https://doi.org/10.1002/ijc.27508>
- Shimon, D., Hovav, Y., Feintuch, A., Goldfarb, D. & Vega, S. (2012). Dynamic nuclear polarization in the solid state: a transition between the cross effect and the solid effect. *Phys Chem Chem Phys*, 14(16), 5729–5743. <https://doi.org/10.1039/C2CP23915A>
- Sparchez, Z. & Mocan, T. (2018). Contemporary role of liver biopsy in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, 10(7), 452–461. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i7.452>
- Stöcker, T. & Shah, N. J. (2013). Grundlagen der MR-Bildgebung. In F. Schneider & G. R. Fink (Hg.), *Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie* (2. Aufl., S. 61–78). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29800-4_3
- Sun, V. C.-Y. & Sarna, L. (2008). Symptom management in hepatocellular carcinoma. *Clin J Oncol Nurs*, 12(5), 759–766. <https://doi.org/10.1188/08.CJON.759-766>
- Tan, C. H., Low, S.-C. A. & Thng, C. H. (2011). APASL and AASLD consensus guidelines on imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma: a review. *Int J Hepatol*, 2011, 519783. <https://doi.org/10.4061/2011/519783>
- Tannapfel, A., Dienes, H.-P. & Lohse, A. W. (2012). The indications for liver biopsy. *Dtsch Arztebl Int*, 109(27-28), 477–483. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0477>
- Telfah, M., Al-Jumayli, M. & Saeed, A. (2018). Biologic and immunotherapy developments in advanced hepatocellular carcinoma. In A. Lasfar (Hg.), *Liver cancer* (S. 159–176). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79872>
- Testino, G., Leone, S. & Borro, P. (2014). Alcohol and hepatocellular carcinoma: a review and a point of view. *World J Gastroenterol*, 20(43), 15943–15954. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15943>
- Thurber, K. & Tycko, R. (2016). Low-temperature dynamic nuclear polarization with helium-cooled samples and nitrogen-driven magic-angle spinning. *J Magn Reson*, 264, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2016.01.011>
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M. & Weiskirchen, R. (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim*, 49(1 Suppl), 59–69. <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>

- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vermeersch, K. A. & Styczynski, M. P. (2013). Applications of metabolomics in cancer research. *J Carcinog*, 12, 9. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.113622>
- Wang, Y.-X. J. (2011). Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg*, 1(1), 35–40. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03>
- Watanabe, H., Kanematsu, M., Kondo, H., Kako, N., Yamamoto, N., Yamada, T., Goshima, S., Hoshi, H. & Bae, K. T. (2010). Preoperative detection of prostate cancer: a comparison with ¹¹C-choline PET, ¹⁸F-fluorodeoxyglucose PET and MR imaging. *J Magn Reson Imaging*, 31(5), 1151–1156. <https://doi.org/10.1002/jmri.22157>
- Wilson, D. M. & Kurhanewicz, J. (2014). Hyperpolarized ¹³C MR for molecular imaging of prostate cancer. *J Nucl Med*, 55(10), 1567–1572. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141705>
- Wittekind, C. (2006). Prinzipien der Tumorklassifikation und Prognosefaktoren. In J. R. Siewert, M. Rothmund & V. Schumpelick (Hg.), *Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie* (2. Aufl., S. 21–34). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-30036-8_3
- Wolfort, R. M., Papillion, P. W., Turnage, R. H., Lillien, D. L., Ramaswamy, M. R. & Zibari, G. B. (2010). Role of FDG-PET in the evaluation and staging of hepatocellular carcinoma with comparison of tumor size, AFP level, and histologic grade. *Int Surg*, 95(1), 67–75.
- Xing, Y., Reed, G. D., Pauly, J. M., Kerr, A. B. & Larson, P. E. Z. (2013). Optimal variable flip angle schemes for dynamic acquisition of exchanging hyperpolarized substrates. *J Magn Reson*, 234, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2013.06.003>
- Zhao, F., Ming, J., Zhou, Y. & Fan, L. (2016). Inhibition of Glut1 by WZB117 sensitizes radioresistant breast cancer cells to irradiation. *Cancer Chemother Pharmacol*, 77(5), 963–972. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3007-9>

Zheng, J. (2012). Energy metabolism of cancer: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Oncol Lett*, 4(6), 1151–1157. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.928> (Review).

Ziegler, S. (2004). Physical principles, dedicated/coincidence PET. In P. Oehr, H.-J. Biersack & R. E. Coleman (Hg.), *PET and PET-CT in oncology* (S. 3–5). Springer.