

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Zentrum für Radiologie und Endoskopie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Adam

## **Quantitative Magnetresonanztomographie zur Phänotypisierung und zum Therapiemonitoring verschiedener Tumorarten im Mausxenograftmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

Philip Konietzke

aus Wiesbaden

Hamburg 2016

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.04.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss

Vorsitzender:

PD Dr. Marc Regier

Gutachter:

Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfer:

Prof. Dr. Tobias Lange

stellv. Mitglied:

PD Dr. Peter Bannas

# Inhaltsverzeichnis

1 Hypothesen und Fragestellung .....	5
1.1 Therapiemonitoring zweier unterschiedlicher NIS-positiver Tumorzelllinien durch multiparametrische Magnetresonanztomographie.....	5
1.2 Phänotypisierung verschiedener Tumorentitäten mittels multiparametrischer MRT.....	7
2 Einleitung .....	8
2.1 Therapieansätze basierend auf dem Natrium-Jodid-Symporter und Therapiemonitoring	8
2.1 Tumorphänotypisierung mittels multiparametrischer MRT Analyse.....	10
2.3 Die Magnetresonanztomographie .....	10
2.3.1. Funktionsprinzip und Basistechniken .....	10
2.3.1.1 Physikalische und technische Grundlagen .....	10
2.3.1.2 Sequenzfamilien .....	15
2.3.1.3 Weitere Technikgrundlagen .....	17
2.3.2 Die verschiedenen MRT-Untersuchungen und ihre Interpretation.....	18
2.3.2.1 T2-gewichtete Magnetresonanztomographie .....	18
2.3.2.1.1 Technische Grundlagen .....	18
2.3.2.1.2 Interpretation des Tumolvolumens im zeitlichen Verlauf.....	19
2.3.2.2 Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DWI) .....	20
2.3.2.2.1 Funktionsprinzip der DWI und technische Grundlagen .....	20
2.3.2.2.2 Apparent Diffusion Coefficient (ADC).....	22
Anwendung und Interpretation des ADC-Wertes .....	23
2.3.2.2.3 IntraVoxel Incoherent Motion (IVIM) .....	25
Anwendung und Interpretation des IVIM-Modells .....	26
2.3.2.3 Dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE).....	27
2.3.2.3.1 Biologische Grundlagen der Tumervaskularisierung.....	27
2.3.2.3.2 Funktionsprinzip der DCE-MRT und technische Grundlagen .....	28

2.3.2.3.3 Modellfreie semiquantitative Parameter.....	29
Anwendung und Interpretation semiquantitativer Parameter .....	30
2.3.2.3.4 Pharmakodynamisches Modell und quantitative Parameter.....	31
Anwendung und Interpretation quantitativer Parameter .....	34
2.3.2.4 Auswertung und Darstellung erhobener Parameter.....	35
3 Material und Methoden .....	36
3.1 Zellen und Zellkultur .....	36
3.1.1 Tumorzellenlinien humanen Ursprungs.....	36
3.1.2 Zellkulturbedingungen .....	36
3.1.3 Transfektion der HT-29 und MCF-7 Zelllinien .....	37
3.2. Mausxenograftmodell.....	37
3.2.1 Versuchstiere.....	37
3.2.2 Vorbereitung der Zelllinien.....	38
3.2.3 Subkutane Injektion ins Tier .....	38
3.3 Radiojodtherapie.....	38
3.4 Tumormonitoring.....	39
3.4.1 SPECT-CT zum Monitoring der NIS-Expression .....	39
3.4.2 Magnetresonanztomographie .....	39
3.4.2.1 MRT-Gerät .....	39
3.4.2.2 Messprotokoll.....	40
3.4.2.3 Datenakquise .....	42
3.4.2.4 Nachbearbeitung der Daten .....	44
Festlegung der Regions of interest (ROI).....	44
Bestimmung des Tumolvolumen.....	45
Quantitative Analyse der erhobenen Messdaten .....	46
Auswertung der erhobenen Messdaten.....	46

Erstellung der verwendeten Abbildungen .....	47
3.5 Histologie des Tumorgewebes.....	47
3.5.1 Probengewinnung .....	47
3.5.2 Gewebebehandlung.....	48
3.5.3 Färbemethoden.....	48
3.5.3.1 Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE) .....	48
3.5.3.2 Immunhistochemie (IHC) .....	49
3.5.4 Akquisition der histologischen Aufnahmen.....	50
3.6 Statistik .....	50
4 Ergebnisse .....	51
4.1 Therapiemonitoring zweier unterschiedlicher NIS-positiver Tumorzelllinien durch multiparametrische MRT.....	51
4.1.1 Größenverlauf der HT-29 und MCF-7 Tumoren .....	51
4.1.2. SPECT/CT-Darstellung der HT-29 und MCF-7 Tumoren .....	54
4.1.3 Histologie zur Therapieevaluation .....	57
4.1.3.1 NIS-Expression der HT-29 Tumore und MCF-7 .....	57
4.1.2.2 Histologische Darstellung der Therapieeffekte .....	59
4.1.4 Ergebnisse der diffusionsgewichteten MRT .....	61
4.1.4.1 Zeitlicher Verlauf der DWI-MRT Parameter bei HT-29 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe.....	61
4.1.4.2 Zeitlicher Verlauf der DWI-MRT Parameter bei MCF-7 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe.....	66
4.1.5 Ergebnisse der dynamischen kontrastmittelverstärkten MRT .....	71
4.1.5.1 Zeitlicher Verlauf der DCE-MRT Parameter bei HT-29 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe.....	71
4.1.5.2 Zeitlicher Verlauf der DCE-MRT Parameter bei MCF-7 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe.....	77

4.2 Phänotypisierung verschiedener Tumorentitäten mittels MRT .....	83
4.2.1 Ergebnisse der diffusionsgewichteten MRT .....	83
4.2.2 Ergebnisse der dynamischen kontrastmittelverstärkten MRT .....	86
4.2.3 Histologie zur Phänotypisierung .....	89
4.3 Problemfälle.....	91
5 Diskussion .....	92
5.1 Multiparametrische MRT zur Therapieevaluation .....	92
5.1.1 Das Tumolvolumen als valider Parameter.....	92
5.1.2 Die DWI-MRT eignet sich zur Erfassung Radiojod induzierter Änderungen im Tumorgewebe, kann dabei aber nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden ..	93
5.1.3 Welchen Nutzen hat die DCE bei der Evaluation einer Radiojodtherapie? .....	96
5.2 Multiparametrische MRT zur Phänotypisierung von Tumoren .....	100
5.2.1 Das Festlegen der ROI und ihr Einfluss auf die erhobenen Parameter.....	100
5.2.2 Ist eine Phänotypisierung mit DCE-MRT und DWI-MRT möglich und korrelieren die gewonnen Informationen mit der Histologie? .....	101
6 Zusammenfassung .....	103
7 Anhang .....	107
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	107
7.2 Literaturverzeichnis .....	110
7.3 Danksagung .....	129
7.4 Lebenslauf .....	130
7.5 Eidesstattliche Versicherung .....	131

# 1 Hypothesen und Fragestellung

## 1.1 Therapiemonitoring zweier unterschiedlicher NIS-positiver Tumorzelllinien durch multiparametrische Magnetresonanztomographie

Im Mausxenograftmodell erfolgt die Beurteilung des Therapieerfolges in der Regel über eine Tumolvolumenbestimmung mittels Messschieber. Mit der Magnetresonanztomographie (MRT) ist aufgrund des hohen anatomischen Auflösungsvermögens eine präzisere Bestimmung des Tumolvolumens möglich. Das Tumolvolumen alleine ist ein stabiler und aussagekräftiger Parameter, der jedoch keine Aussagen über mögliche Änderungen auf molekularer Ebene treffen kann. Techniken wie die Positronen-Emissions-Tomographie (*positron emission tomography*, PET) oder die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*single photon emission computed tomography*, SPECT) vermögen dies, haben aber bedingt durch den fehlenden anatomischen Informationsgehalt und die verwendeten Radionuklide einige Nachteile. Mit der MRT kann das Therapiemonitoring um die diffusionsgewichtete MRT (*diffusion weighted imaging*, DWI) sowie die dynamische kontrastmittelverstärkte MRT (*dynamic contrast enhanced*, DCE) ergänzt werden, womit sich die Beurteilung möglicher Therapieeffekte auf die zelluläre Ebene ausweiten lässt. Zum Nachweis eines Therapieeffektes unter Radiojodtherapie scheint der ADC-Wert (*apparent diffusion coefficient*) der vielversprechendste Parameter zu sein. Er ist besonders sensitiv für die unter Radiojodtherapie stattfindende Nekrose bzw. Apoptose (Marx et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Erfolg einer Radiojodtherapie an zwei mit dem humanen Natrium-Jodid-Symporter-Gen transfizierten Tumorzelllinien (MCF-7, HT-29) mittels multiparametrischer MRT im Mausxenograftmodell verifiziert werden. Dies wurde nach eigenem Wissen bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt. Das Ziel bestand darin, mittels MRT die therapieassoziierten molekularen Veränderungen in radiojod-therapierten Tumorgewebe besser erfassen und bewerten zu können. Im Besonderen sollte der Nutzen des IVIM-Modells bzw. der DCE-MRT evaluiert werden. Die folgende Arbeitshypothese mit den entsprechenden Fragestellungen stand dabei im Zentrum.

**Arbeitshypothese:**

**Es ist möglich die Wirkung einer Radiojodtherapie an NIS-positiven extrathyroidalen Tumoren mittels multiparametrischer MRT zu validieren.**

Fragestellungen:

- a) Wie unterscheiden sich Therapie- und Kontrollgruppe hinsichtlich der erhobenen MRT-Parameter?
- b) Welche MRT-Parameter eignen sich am besten zur Beurteilung eines Therapieerfolges?
- c) Gibt es Unterschiede zwischen den beiden Tumorzelllinien?
- d) Kann die Histologie die mittels MRT erfassten Veränderungen im Gewebe bestätigen?

## **1.2 Phänotypisierung verschiedener Tumorentitäten mittels multiparametrischer MRT**

Nach extensiver Literaturrecherche existieren bis heute keine Studien, die mehrere unterschiedliche Tumorentitäten mittels multiparametrischer MRT-Bildgebung phänotypisiert und die Ergebnisse mit histopathologischen Untersuchungen korreliert haben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, valide Parameter zur Differenzierung unterschiedlicher Tumortypen herauszuarbeiten, um zu einer weiteren Verfeinerung multiparametrischer MRT-Studien in der Tumorbildgebung beizutragen.

Zu diesem Zweck wurden die vier verschiedenen humane Tumortypen, Pankreas (BxPC-3), Colon (HT-29), Mamma (MCF-7) und Schilddrüse (ML-1) im Mausxenograftmodell etabliert und durch multiparametrische MRT beschrieben. Die verwendeten Parameter wurden mit DWI- und DCE-Messungen erhoben. Im Zuge der Datenauswertung wurden die Tumoren durch *regions of interest* (ROI) in einen zentralen und einen 700 µm breiten Randbereich aufgeteilt und im Anschluss die einzelnen Parameter für Zentrum, Randbereich sowie für den ganzen Tumor berechnet. Damit sollten mögliche strukturelle Unterschiede auf zellulärer Ebene bzw. bei der Tumolvaskularisierung zwischen den Tumortypen sowie den unterschiedlichen ROI erfasst werden. Die folgende Arbeitshypothese mit den entsprechenden Fragestellungen stand dabei im Vordergrund.

### **Arbeitshypothese:**

**Es ist möglich verschiedene Tumorentitäten humanen Ursprungs anhand eines Mausxenograftmodell mittels multiparametrischer MRT zu phänotypisieren.**

Fragestellungen:

- a) Wie unterscheiden sich die einzelnen Tumortypen hinsichtlich der erhobenen MRT-Parameter?
- b) Welche MRT-Parameter sind diesbezüglich besonders geeignet?
- c) Lassen sich die mittels MRT erfassten Unterschiede mit der Histopathologie korrelieren?

## 2 Einleitung

Die multiparametrische Magnetresonanztomographie zur Beurteilung von Tumorerkrankungen und die Evaluation neuer Therapien ist Gegenstand aktueller Forschung. Die phänotypischen Eigenschaften einzelner Tumortypen bedingen unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe sowie ein zum Teil schwer abschätzbares Therapieansprechen. Deshalb ist es wichtig, valide deskriptive Parameter zur Beurteilung von Tumoren herauszuarbeiten, um damit die Genauigkeit von Prognosen und Therapieevaluationen zu verbessern. Die nichtinvasive MRT scheint hierzu im besonderen Maße geeignet, da sie auf Basis unterschiedlicher Techniken eine Reihe gewebedeskriptiver Parameter liefern kann. Die innerhalb dieses Forschungsgebietes liegende präklinische Arbeit bearbeitet die in 1.1 und 1.2 aufgeführten Fragestellungen und soll über deren konkrete Beantwortung hinaus zum besseren Verständnis der mittels multiparametrischer MRT erhobenen Parameter beitragen.

### 2.1 Therapieansätze basierend auf dem Natrium-Jodid-Symporter und Therapiemonitoring

Die Radiojodtherapie ist eine seit 40 Jahren etablierte Methode zur Behandlung von gutartigen Schilddrüsenerkrankungen (Dietlein et al. 2004a) und Schilddrüsenkarzinomen (Dietlein et al. 2004b). Das Prinzip besteht aus der selektiven Aufnahme des radioaktiven Jod-Isotops  $^{131}\text{I}$  über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) in die Schilddrüsenzellen und dessen dortiger Organifizierung. Die Therapiemethode gilt als sicher und nebenwirkungsarm, da sich die Jodaufnahme auf das Schilddrüsengewebe beschränkt und die  $\beta$ -Strahlen des  $^{131}\text{I}$ , begründet durch ihre geringe Reichweite von 0,5 bis 2 mm, nur eine lokale Wirkung haben. Abhängig von der Dosis bewirken die  $\beta$ -Strahlen entweder Zellnekrose oder Zelloptose (Sopotyk et al. 2004, Marx et al. 2006). Bei der Aufnahme von Jod in das Schilddrüsengewebe spielt das NIS-Protein als nicht-toxisches und nicht-immunogenes Protein eine zentrale Rolle. Seine Fähigkeit positiv geladene Ionen über selektiven Transport aus dem Blut in die Zelle aufzunehmen, ermöglicht die Anwendung einer Reihe von Radionukliden, wodurch sich verschiedene diagnostische ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), und therapeutische ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ) Möglichkeiten eröffnen.

Die Darstellung NIS-positiver Zellen mit der PET, der SPECT oder der Szintigraphie (Dingli et al. 2003, Spitzweg 2003) wird klinisch genutzt, um verschiedene Schilddrüsenerkrankungen zu diagnostizieren. Therapeutisch ist die Anwendung von

Radiojod bei NIS-positiven Zellen möglich. Durch die Klonierung und molekulare Charakterisierung des NIS-Gens (Smanik et al. 1997, Pinke et al. 2001) konnte das Therapiekonzept, NIS-positive Zellen mit Radiojod zu therapieren, auf extrathyroidale Gewebe ausgeweitet werden. Eine gute Zusammenfassung diesbezüglich bietet das Review von Penheiter *et al.* (Penheiter et al. 2012).

In den letzten 10 Jahren wurden verschiedene Konzepte erprobt, um das NIS-Gen in NIS-negative Zellen einzubringen und damit das Spektrum möglicher Zielzellen zu erweitern. Dingli *et al.* infizierten erfolgreich MM1-Zellen (multiples Myelom) *in vivo* durch intravenöse Injektion eines NIS exprimierenden rekombinanten Masernvirus und therapierten diese anschließend mit  $^{131}\text{I}$  (Dingli et al. 2004). Der Therapieerfolg wurde durch Volumenbestimmung erfasst, welche auf einer Längenmessung der Tumorachsen mittels Messschieber basierte. Diese Studie vermochte es als erste den synergistischen Therapieeffekt eines NIS exprimierenden onkolytischen Virus und einer systemischen Radiojodtherapie nachzuweisen. Den gleichen Ansatz verfolgten Goel *et al.* bei der Therapie von 5TGM1-Zellen (multiples Myelom) mit  $^{131}\text{I}$ . SPECT/CT und Messschiebermessungen wurden zur Erfolgskontrolle durchgeführt (Goel et al. 2007). Peerlinck *et al.* injizierten einen NIS kodierenden Adenovirus direkt in Xenotumoren kolorektalen Ursprungs und therapierten diese mit  $^{131}\text{I}$ . Das Ausmaß der NIS Expression wurde mittels  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  an einem SPECT/CT untersucht und die Therapiekontrolle erfolgte mittels Messschieber (Peerlinck et al. 2009). Klutz *et al.* untersuchten die Effektivität von Adenoviren (Klutz et al. 2011b, Grunwald et al. 2013), Nanopartikeln (Klutz et al. 2011a) sowie Stammzellen (Knoop et al. 2011) bezüglich ihrer Eignung als NIS Vektor im Zusammenhang mit einer möglichen Radiojodtherapie des hepatozellulären Karzinoms. Ähnliche Ansätze wurden auch bei anderen Tumorentitäten verfolgt, z.B. bei Pankreaskarzinomen (Penheiter et al. 2010), Prostatakarzinomen (Trujillo et al. 2010) und Mesotheliomen (Li et al. 2010). Schipper *et al.* untersuchten die Wirkung von  $^{131}\text{I}$  und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  *in vivo* auf stabile NIS transfizierte Zellen eines neuroendokrinen Tumors im Mausxenograftmodell. Die Volumenbestimmung der Tumoren erfolgte an einem klinischen 1.0-Tesla Gerät mit einer speziellen Kleintierspule, weitere funktionelle und morphologische Daten wurden mittels Szintigraphie und SPECT erhoben (Schipper et al. 2007). Eine Validierung mittels multiparametrischer MRT, insbesondere durch DWI, ist bis dato noch nicht erfolgt.

## 2.1 Tumorphänotypisierung mittels multiparametrischer MRT Analyse

Bei der Anwendung multiparametrischer MRT-Untersuchungen werden die Parameter unterschiedlicher MRT-Techniken kombiniert, um eine präzisere Phänotypisierung von Tumoren zu ermöglichen.

Die MRT bietet verschiedenste Techniken, mit denen sich unterschiedliche Gewebeeigenschaften abbilden lassen. Mit der DWI-MRT lässt sich über den quantitativen ADC-Wert die Diffusion von Wasser im Zielgewebe beschreiben (Koh und Collins 2007, Thoeny und De Keyzer 2007, Padhani et al. 2009). Der ADC-Wert erlaubt die Beurteilung der Zelldichte, der Tortuosität des extrazellulären Raumes, der Integrität von Zellmembranen sowie des Nekroseanteils innerhalb eines Gewebes. Die DCE-MRT erfasst die Aufnahme von Kontrastmittel im Zielgewebe und erlaubt Rückschlüsse auf die Perfusion sowie die Transferraten zwischen Plasma und dem extrazellulären Raum (Jackson et al. 2007, Yang und Knopp 2011). Mit semiquantitativen und quantitativen Parametern sind Rückschlüsse auf Kapillardichte, Permeabilität, Perfusion, die Zellfraktion sowie das Plasmavolumen möglich. Der Vollständigkeit halber sind weitere Techniken wie die dynamische Suszeptibilitätskontrast-MRT (*dynamic-susceptibility contrast*, DSC) (Quarles et al. 2009), die <sup>1</sup>H-Spektroskopie-MRT (Kwock et al. 2002), sowie die BOLD-Kontrast MRT (*blood oxygenation level dependent functional magnetic resonance imaging*, BOLD-fMRI) (Harris et al. 2011) zu nennen, die in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Anwendung finden. Die Kombination der genannten Techniken schafft neue Möglichkeiten, um Tumorgewebe zu charakterisieren.

## 2.3 Die Magnetresonanztomographie

### 2.3.1. Funktionsprinzip und Basistechniken

#### 2.3.1.1 Physikalische und technische Grundlagen

Das magnetische Kernmoment ist die Grundlage der magnetischen Resonanz und somit der Magnetresonanztomographie. Das magnetische Kernmoment beruht auf dem Kernspin. Dieser ist eine quantenmechanische Eigenschaft von Atomkernen, dessen Wert durch die Anzahl der Kernteilchen bestimmt wird und der beim Wasserstoffatomkern  $\frac{1}{2}$  beträgt. Bestimmt durch den Kernspin kann das magnetische Kernmoment des Wasserstoffkerns in einem externen Magnetfeld zwei Zustände annehmen:  $+\frac{1}{2}$  und  $-\frac{1}{2}$ , was einer parallelen bzw. antiparallelen Ausrichtung entspricht. Das gyromagnetische Verhältnis beschreibt den Proportionalitätsfaktor zwischen dem Kernspin eines Teilchens und dem dazugehörigen

magnetischen Moment. Aufgrund seiner hohen Dichte in biologischen Geweben sowie einem vorteilhaften gyromagnetischen Verhältnis, bietet Wasserstoff eine hervorragend Grundlage für die Magnetresonanztomographie.

Im feldfreien Raum sind die magnetischen Kernmomente einer Probe völlig ungeordnet, wohingegen sie in einem von außen angelegten statischen Magnetfeld, wie bereits oben erwähnt, einen parallelen bzw. antiparallelen Spinzustand einnehmen. Beide Zustände haben ein unterschiedliches Energieniveau, wobei sich die Energiedifferenz wie folgt definiert:

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0 = \hbar \omega_L$$

$E$  = Energiedifferenz zwischen paralleler und antiparalleler Ausrichtung,  $\omega_L$  = Lamorfrequenz,  $\hbar$  = Plancksches Wirkungsquantum,  $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis,  $B_0$  = magnetische Flussdichte des statischen Magnetfeldes

Die Lamorfrequenz entspricht dabei der Frequenz einer elektromagnetischen Welle, deren Energie genau der energetischen Differenz der beiden Spinzustände entspricht. Es kommt zur Ausbildung eines thermischen Gleichgewichts, bei dem der parallele Zustand aufgrund seines niedrigeren Energieniveaus überwiegt. Das Ungleichgewicht zwischen parallelem und antiparallelem Zustand beträgt bei einer Feldstärke von 1 Tesla nur 6 ppm (*parts per million*) und ist somit im Vergleich zur Gesamtanzahl an Atomkernen verschwindend gering. Trotzdem kommt es zu einer makroskopisch messbaren Magnetisierung der Probe, deren Ausmaß von der Protonendichte sowie Stärke des statischen Magnetfeldes abhängt. Der Zustand der maximalen Magnetisierung im thermischen Gleichgewicht wird als Sättigungsmagnetisierung bezeichnet.

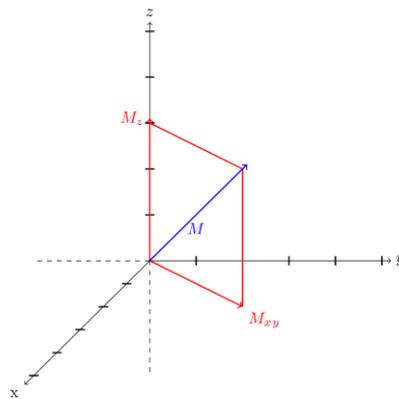
In einem mechanischen Modell kann die Bewegung des Ensembles der magnetischen Kernmomente als Präzessionsbewegung beschrieben werden. Diese kreiselt in einer bestimmten Frequenz in Richtung des statischen Magnetfeldes um die eigene Achse. Die Kreiselfrequenz der magnetischen Kernmomente entspricht dabei genau der Lamorfrequenz, welche vom gyromagnetischen Verhältnis und der Stärke des angelegten Magnetfeldes proportional abhängig ist.

$$\omega_L = \gamma B_0$$

$\omega_L$  = Lamorfrequenz,  $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis,  $B_0$  = magnetische Flussdichte des statischen Magnetfeldes

Die magnetische Wirkung der Kreiselbewegung lässt sich mit Hilfe von Vektoren in einem kartesischen Koordinatensystem beschreiben. Konventionell wird dabei die Orientierung der

Z-Achse parallel der magnetischen Flussdichte  $B_0$  gewählt. In dieser Beschreibung entspricht die Längsmagnetisierung der Probe dem Anteil der Magnetisierung in Orientierung der Z-Achse, wohingegen die Quermagnetisierung in der XY-Ebene liegt. Die Quermagnetisierung ist bei einer nicht angeregten Probe innerhalb eines statischen Magnetfeldes nicht messbar, da sich die Kreisbewegungen einzelner Volumenelemente in unterschiedlichen Phasenlagen befinden, wodurch sich die Wirkungen ihrer magnetischen Kernmomente gegenseitig aufheben.



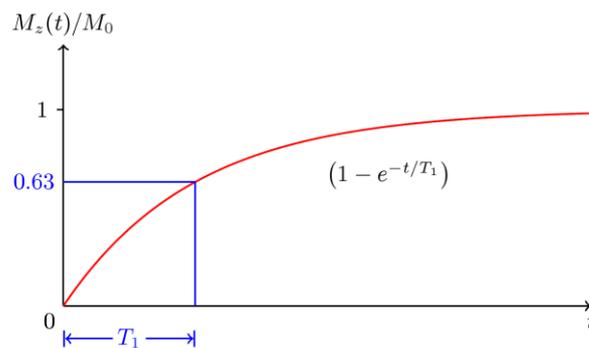
[Abb. 01] Definition der Längs- und Quermagnetisierung.  $M_z$  ist die Richtung der Längsmagnetisierung (roter Pfeil z-Achse) und  $M_{xy}$  die Richtung der Quermagnetisierung (roter Pfeil xy-Achse). Die Nettomagnetisierung  $M$  (blauer Pfeil) ergibt sich aus Längs- und Quermagnetisierung.

Durch einen Hochfrequenzpuls, dessen Frequenz die Larmorfrequenz einschließt, ist es möglich, das thermische Gleichgewicht einer sich in einem statischen Magnetfeld befindlichen Probe zu stören. Dabei hat der Hochfrequenzpuls zwei wesentliche Effekte. Der erste Effekt äußert sich in einer Abnahme der Längsmagnetisierung, da durch die zugeführte Energie mehr Atomkerne die energiereichere antiparallele Ausrichtung annehmen. Dabei ist die makroskopische Magnetisierung als Summe aller magnetischen Kernmomente eine kontinuierliche Größe und zeigt im Unterschied zum Kernmoment des einzelnen Atoms keine Quantifizierungseigenschaften mehr. Die Umbesetzung der Energieniveaus kann dabei als teilweise Verlagerung der Magnetisierung aus der Längsorientierung in die XY-Ebene verstanden werden, wodurch die Quermagnetisierung zunimmt. Das Maß der Verlagerung wird in Winkeln angegeben. Ein  $90^\circ$ -Impuls beispielsweise kippt die gesamte Längsmagnetisierung in die XY-Ebene. Der zweite Effekt des Hochfrequenzpulses ist die Schaffung einer Phasenkohärenz zwischen den kreiselnden magnetischen Kernmomenten, wodurch eine makroskopisch messbare Quermagnetisierung geschaffen wird. Diese

Quermagnetisierung induziert in Detektorspulen eine elektrische Spannung, deren Frequenz gleich der Larmorfrequenz ist: das MR-Signal.

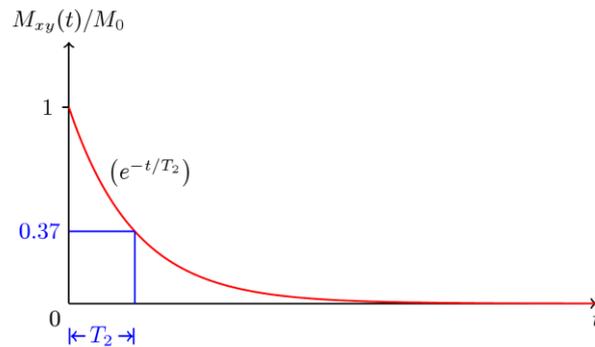
Der Prozess, bei dem das Spinsystem nach einem Hochfrequenzanregungspuls wieder in seinen thermischen Gleichgewichtszustand zurückkehrt, wird als Relaxation bezeichnet. Dabei werden zwei wesentliche Vorgänge unterschieden:

Die T1-Relaxationszeit bezeichnet die Erholung der Längsmagnetisierung nach einem Hochfrequenzpuls. Die Atomkerne kehren wieder in ihren energieärmeren parallelen Ausgangszustand zurück. Der Vorgang ist auf Spin-Gitter Wechselwirkungen zurückzuführen.



[Abb. 02] Längsrelaxationszeit. Die Längsrelaxationszeit ( $T_1$ ) ist die Zeit, in der die Längsmagnetisierung  $M_z$  nach einem  $90^\circ$ -Puls wieder auf 63% des Gleichgewichtswertes  $M_0$  angestiegen ist.

Die T2-Relaxationszeit beschreibt die Dephasierung der durch den Hochfrequenzpuls erzeugten Phasenkohärenz auf Basis von Spin-Spin-Wechselwirkung. Der Zerfall der Quermagnetisierung findet bereits während des Hochfrequenzpulses statt. In einem realistischen System tragen auch lokale Inhomogenität des statischen Magnetfeldes zum Verlust der Phasenkohärenz bei. Bei Verwendung von Gradienten-Echo-Techniken bedingt dies eine verkürzte Zerfallszeit, die als T2\*-Relaxationszeit bezeichnet wird. Das mit T2\* abklingende MR-Signal wird auch als *Free Induction Decay* (FID) bezeichnet. Mit der Spin-Echo-Technik lässt sich die Magnetfeldinhomogenität reduzieren und eine bereinigte T2-Relaxationszeit ermitteln. Die Grundzüge beider Techniken werden folgend erklärt.



[Abb. 03] Querrelaxationszeit. Die Querrelaxationszeit ( $T_2$ ) ist die Zeit, in der die Quermagnetisierung auf 37% ihres Ausgangswertes abgefallen ist.

Die Ortskodierung ist notwendig, um eine örtliche Zuordnung zwischen empfangenem MR-Signal und Probe zu ermöglichen. Es wird die Schicht-, Phasen- und Frequenzkodierung unterschieden. Alle drei Verfahren beeinflussen durch den Einsatz von Gradienten das statische Magnetfeld und damit die Larmorfrequenz innerhalb der Probe. Durch Abstimmung von Larmorfrequenz und Hochfrequenzpuls lassen sich auf diese Weise bestimmte Bereiche innerhalb der Probe gezielt anregen. Die Schichtkodierung dient dabei der Selektion eines dreidimensionalen Blockes innerhalb der Probe. Bei einer zweidimensionalen Betrachtung dieses Blockes lässt sich jeder Punkt innerhalb der Schicht mit einem zweidimensionalen kartesischen Koordinatensystem beschreiben. Entlang der X-Achse wird die Schicht durch die Frequenzkodierung in Spalten geteilt, während die Phasenkodierung die Schicht entlang der Y-Achse in Zeilen unterteilt. Wird die selektierte Schicht mit einer Auflösung von  $256 \times 256$  abgebildet, sind 256 Aufnahmen mit unterschiedlicher Phasen- und gleichbleibender Frequenzkodierung nötig, wodurch sich in der Summe 256 einzelne MR-Signale ergeben. Dabei enthält jedes dieser Signale Informationen über die gesamte Schicht. Zwischen einzelnen Messungen benötigt das Gewebe Zeit zur Relaxation, diese Zeit wird als Repetitionszeit (TR) bezeichnet. Die Messdauer ist somit der größte limitierende Faktor der MRT und es gilt einen Kompromiss zwischen Signalstärke und Messzeit zu finden.

Die empfangenen Echos können als Fouriertransformation der räumlichen Signalverteilung einer Probe verstanden werden. Durch die MR-Signale wird der k-Raum, eine Rohdatenmatrix, gefüllt. In ihm sind die Informationen über die räumliche Verteilung der einzelnen Relaxationszeiten innerhalb der Probe gespeichert. Informationen über den Kontrast sowie die mittlere Intensität werden im Zentrum, Detailinformationen in der Peripherie des k-

Raumes gespeichert. Mittels einer inversen Fouriertransformation lassen sich diese Daten in Bilder umrechnen.

Der Bildkontrast in einem MR-Bild ist auf unterschiedliche Relaxationszeiten zurückzuführen. Bilder, deren Kontrast hauptsächlich von T1 bestimmt wird, werden als T1-gewichtete Bilder (T1w) bezeichnet, sie werden entscheidend von der Repetitionszeit (TR) beeinflusst. Bilder, deren Kontrast hauptsächlich auf T2 beruht, sind dementsprechend T2-gewichtete Bilder (T2w). T2w-Bilder werden hauptsächlich von der Echozeit (TE) beeinflusst. Eine starke T1-Gewichtung wird durch eine kurze TE und eine kurze TR erreicht. Eine starke T2w beruht auf einer langen TE und einer langen TR. Aufgrund einer rascheren Erholung sind Gewebe mit einer kurzen T1-Zeit auf T1w Bildern hell, Gewebe mit einer langen T1-Zeit entsprechend dunkel. Gewebe mit einer kurzen T2 erscheinen im T2w-Bild dunkel, Gewebe mit langem T2 hell. Durch die Anpassung der Repetitions- bzw. Echozeit wird der Kontrast den diagnostischen Anforderungen angepasst (Hendrick et al. 1984).

**Tabelle 1:** <sup>1</sup>H-Relaxationszeiten verschiedener biologischer Gewebe bei 1.5 T nach Bottomley et al. 1984

Gewebe	T2 [ms]	T1 [s]
Skelettmuskel	47	0.87
Leber	43	0.50
Niere	58	0.65
Milz	62	0.78
Fett	84	0.26
Graue Hirnsubstanz	101	0.92
Weißer Hirnsubstanz	92	0.79

### 2.3.1.2 Sequenzfamilien

Die Spin-Echo-Technik und die Gradienten-Echo-Technik unterscheiden sich durch die Erzeugung des MR-Signals und bilden die Grundlage der zwei großen Sequenzfamilien.

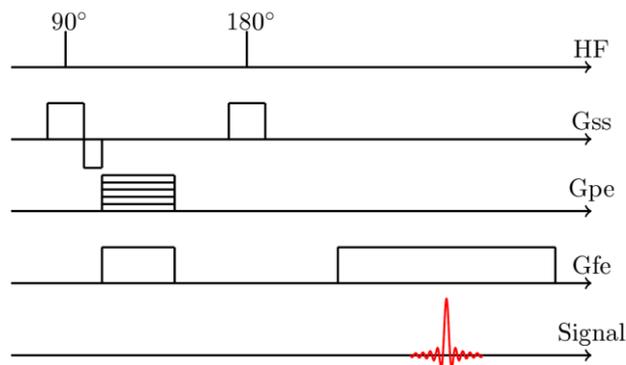
#### Spin-Echo-Technik

Bei der Spin-Echo-Technik wird dem 90°-Anregungspuls ein 180°-Refokussierungspuls nachgeschaltet. Durch den 180°-Refokussierungspuls wird die Ausrichtung der Spins in der Transversalebene gespiegelt, wodurch diese nach der Echozeit (TE) wieder in Phasenkohärenz geraten. Der erneute Aufbau der Quermagnetisierung kann als Spinecho gemessen werden und ist von der gewebetypischen T2-Zeit abhängig. Die Signalintensität

eines Voxel mit den Gewebeparametern,  $\rho$ , T1 und T2 lässt sich mit folgender Gleichung beschrieben:

$$S_{SE} = \rho \left[ 1 - e^{-\frac{TR}{T1}} \right] e^{-\frac{TE}{T2}}$$

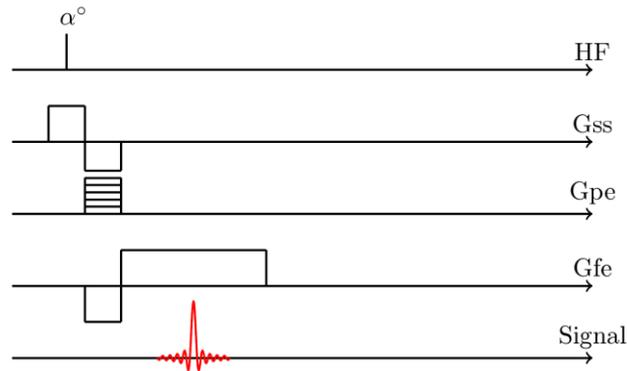
$S_{SE}$ : Signalverlust;  $\rho$ : Dichte; TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; T2: T2-Relaxationszeit



[Abb. 04] Spin-Echo-Sequenz. Spin-Echo-Sequenz mit Gradienten zur Schichtselektion (Gss), zur Phasenkodierung (Gpe) und zur Frequenzkodierung (Gfe). Die Spalte Signal gibt den Zeitpunkt des empfangenen MR-Signals wieder.

### Gradienten-Echo-Technik

Die Gradienten-Echo-Technik erzeugt das Echosignal nicht durch einen 180°-Refokussierungspuls, sondern durch das Schalten eines rephasierenden Gradienten. Die dabei verwendeten niedrigeren Flipwinkel ermöglichen eine schnellere Erholung der Längsmagnetisierung, bieten jedoch im Gegenzug ein geringeres Maß an geschaffener Quermagnetisierung. Dies ermöglicht kürzere TE/TR Zeiten und damit kürzere Scanzeiten. Die gängigen Gradiententechniken unterscheiden sich im Umgang mit der vor dem nächsten Anregungspuls verbleibenden Quermagnetisierung, die entweder zerstört (*spoiled gradient echo* z.B. *fast low angle shot*, FLASH) (Haase 1990) oder maximiert (*fast imaging with steady state precession*, FISP) (Oppelt et al. 1986) werden kann.



[Abb. 05] Gradientenechosequenz. Gradientenechosequenz bei einem beliebigen Flipwinkel ( $\alpha^\circ$ ) und den Gradienten zur Schichtselektion ( $G_{ss}$ ), zur Phasenkodierung ( $G_{pe}$ ) und zur Frequenzkodierung ( $G_{fe}$ ). Die Spalte Signal gibt den Zeitpunkt des empfangenen MR-Signals wieder.

### 2.3.1.3 Weitere Technikgrundlagen

#### „Triggering“ und „Gating“ bei der Bildakquisition

Die ständige Atembewegung und die damit verbundenen Bewegungsartefakte sind ein wesentliches Problem bei MRT-Aufnahmen des Abdomens. Grundsätzlich kann mittels „Triggering“ oder „Gating“ eine Reduktion von Bewegungsartefakten erreicht werden (Lewis et al. 1986).

#### Parallele Bildgebung

Die Techniken der parallelen Bildgebung verwenden mehrere Empfangsspulen. Die Sensitivitätsprofile der einzelnen Spulen werden genutzt, um die Ortskodierung abzukürzen, woraus sich kürzere Akquisitionszeiten bei reduzierter SNR (*signal to noise ratio*, SNR) ergeben. Häufig genutzte Techniken sind GRAPPA (*generalized autocalibrating partially parallel acquisitions*) (Griswold et al. 2002) und SENSE (*sensitivity encoding for fast MRI*) (Pruessmann et al. 1999).

## **2.3.2 Die verschiedenen MRT-Untersuchungen und ihre Interpretation**

### 2.3.2.1 T2-gewichtete Magnetresonanztomographie

#### *2.3.2.1.1 Technische Grundlagen*

##### Turbo-Spin-Echo-Technik (TSE)

Die Turbo-Spin-Echo-Technik verwendet statt eines Refokussierungspulses mehrere Refokussierungspulse (N). Es werden in einer einzigen Anregung N Echos erzeugt und gleichzeitig empfangen. Die Anzahl der Echos (N) wird als Turbo-Faktor bezeichnet und bestimmt die Länge des Echozuges sowie das Maß der Messzeitverkürzung. Die eingesparte Messzeit wird in eine erhöhte Auflösung investiert. Ein weiterer Vorteil der Turbo-Spin-Echo-Technik ist die geringe Anfälligkeit für Suszeptibilitätsartefakte. Deshalb ist sie zur anatomischen Darstellung von Regionen mit großen Unterschieden in den Gewebesuszeptibilitäten besonders geeignet. Das signalintensive Fett erschwert die Interpretation von mittels TSE-Sequenz akquirierten T2-gewichteten Aufnahmen. Fettsuppressionstechniken begegnen diesem Problem.

##### Kontrastverbesserung mit Fettsättigung/Fettsuppression

Um das Fettsignal gezielt zu unterdrücken, wurden verschiedene Verfahren mit jeweiligen Vor- und Nachteilen entwickelt. Die meisten Techniken verwenden eine Präparationssequenz, die der Bildgebungssequenz vorgeschaltet wird. Diese Präparationssequenz vernichtet die Längsmagnetisierung der zu unterdrückenden Gewebekomponente vor der Anregung. Eine Möglichkeit der magnetischen Präparation bietet der 180°-Inversionspuls. Aufgrund der spezifischen T1-Relaxationszeiten weisen die Fettkomponente bzw. der Wasseranteil des Gewebes zu unterschiedlichen Zeitpunkten keine Längsmagnetisierung auf. Dieser Zeitpunkt, oder auch Inversionszeit (*time inversion*, TI), kann durch die T1-Zeit des Fettes vorbestimmt werden. Da Fett eine kurze T1-Zeit besitzt, wird diese Technik STIR (*short tau inversion recovery*) genannt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, gezielt frequenzspezifisch die Protonen der Fettmoleküle zu beeinflussen und die Wasserprotonen unbeeinflusst zu lassen. Aufgrund zunehmend inhomogener Hochfrequenzanregung bei höheren Feldstärken müssen die Inversions-Hochfrequenzpulse robust sein. Dies wird durch adiabatische HF-Pulse gewährleistet, bei denen nicht nur zeitlich die Amplitude, sondern auch die Frequenz variiert wird. Diese Fettunterdrückungstechnik wird SPAIR (*spectral adiabatic inversion recovery*)

genannt und ist auf eine gute Korrektur der Magnetfeldinhomogenitäten durch Shimverfahren angewiesen. Ist die Korrektur unzureichend, verbreitert sich die Resonanzfrequenz der Fettprotonen und eine gezielte Anregung wird unmöglich. Dies hat eine unvollständige Fettunterdrückung zur Folge.

#### 2.3.2.1.2 Interpretation des Tumolvolumens im zeitlichen Verlauf

Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgt häufig mittels T2-gewichteter Magnetresonanztomographie, da diese eine gute anatomische Auflösung liefert. Die Beurteilung des Größenverlaufs eines Tumors ist ein aussagekräftiger Biomarker und spielt bei der Verlaufsbeobachtung von Tumorerkrankungen, wie auch bei der Abschätzung eines möglichen Therapieerfolges, eine zentrale Rolle. Eine Größenabnahme unter Therapie folgt in der Regel dem Untergang von Tumorgewebe, wohingegen eine Größenprogredienz für die Vitalität des Tumorgewebes spricht. Die RECIST (*response evaluation criteria in solid tumors*) Kriterien folgen diesem Ansatz und ermöglichen die Stadieneinteilung von Tumorerkrankungen sowie prognostische Aussagen (Therasse et al. 2000).

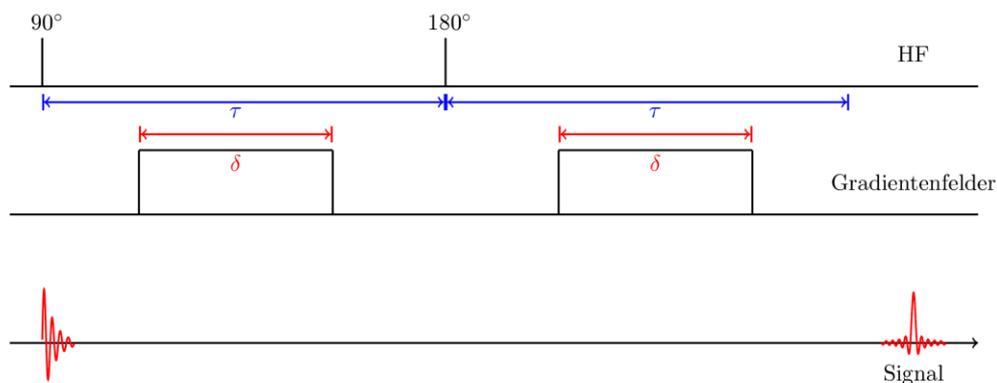
Im präklinischen Tiermodell kann das Tumolvolumen subkutaner Tumore mithilfe von Näherungsformeln auf Basis orthogonaler Längenmessungen mittels Messschiebers (Tomayko und Reynolds 1989) bestimmt werden. Mit steigender Verfügbarkeit können die Größenbestimmungen zunehmend mittels MRT durchgeführt werden. Vorteile ergeben sich hier bei orthotopen bzw. metastatischen Tumormodellen, bei denen eine Größenbestimmung nur *ex vivo* möglich ist (Mazurchuk et al. 1997, He et al. 2000, Partecke et al. 2011). Bei diesen Modellen lassen sich mittels MRT longitudinale Messungen des Größenverlaufs *in vivo* realisieren, wodurch sich die Größe der benötigten Tierkohorten reduziert. Die von Montelius *et al.* durchgeführte Studie zeigte, dass sich 2D MRT-Untersuchungen zur akkuraten Tumorgrößenbestimmung im Mausmodell eignen. Einschränkungen bezüglich der Genauigkeit ergaben sich im direkten Vergleich zwischen verschiedenen Untersuchern und bei sehr kleinen Tumoren mit einer Gesamtmasse von unter 200 mg. Bei einer vermuteten Dichte von 1 g/cm entspräche dies einer Größe von ca. 200 mm<sup>3</sup> (Montelius et al. 2012b).

## 2.3.2.2 Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DWI)

### 2.3.2.2.1 Funktionsprinzip der DWI und technische Grundlagen

#### Funktionsprinzip

Mit der DWI-MRT lässt sich die von der Brownschen Molekularbewegung getriebene Diffusion von Wassermolekülen darstellen und durch die Diffusionskonstante ( $D$ ) quantitativ beschreiben. Die technische Grundlage wurde von Stejskal und Tanner mit einer speziellen Gradiententechnik (Stejskal und Tanner 1965) gelegt. Im weiteren Verlauf konnte die Anwendung der DWI-MRT durch technische Innovationen wie dem *echo planar imaging* (EPI) (Turner et al. 1990), sowie durch Techniken der parallelen Bildgebung (Pruessmann et al. 1999, Griswold et al. 2002) verbessert werden.



[Abb. 06] Stejskal-Tanner-Sequenz. Spin-Echo-Sequenz mit typischen Diffusionsgradienten. Die Spalte Signal gibt den Zeitpunkt des empfangenen MR-Signals wieder.

Abbildung 06 zeigt eine Spin-Echo-Sequenz mit den typischen Diffusionsgradienten. Das Funktionsprinzip beruht auf der Unterscheidung von stationären und mobilen Wassermolekülen. Die Spins der stationären Wassermoleküle bleiben vom Diffusionsgradienten unbeeinflusst, da sie sich im Zeitintervall zwischen den beiden Gradienten nicht bewegen und so vom ersten Gradienten dephasiert und vom zweiten wieder rephasiert werden. Die Spins der mobilen Wassermoleküle hingegen bewegen sich im Zeitintervall zwischen den beiden Gradienten und erfahren deshalb keine vollständige Rephasierung. Das Maß ihrer Dephasierung und die Höhe des Signalverlustes hängt somit vom Ausmaß ihrer Bewegung ab. Bereiche mit hoher Diffusion stellen sich deshalb hypointens und solche mit niedriger Diffusion hyperintens da.

Folgende Gleichung beschreibt den Signalverlust einer diffusionsgewichteten Sequenz:

$$\frac{S(2\tau)}{S_0} = \exp[-\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D]$$

$\frac{S}{S_0}$  Signalverlust;  $\gamma$  gyromagnetisches Moment;  $G$  Stärke des Gradientenpulses;  $\delta$  Dauer des Gradientenpulses;  $\Delta$  Zeit zwischen den beiden Gradientenpulsen;  $D$  Diffusionskonstante;  $\tau$  Zeitkonstante

Das Maß für die Diffusionsgewichtung eines MRT-Bildes ist der b-Wert [s/mm<sup>2</sup>]. Er beinhaltet die Gradientenstärke, die Gradientendauer sowie den Abstand der beiden Diffusionsgradienten zum Refokussierungspuls.

$$b = -\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)$$

b = b-Wert,  $\gamma$  gyromagnetisches Moment;  $G$  Stärke des Gradientenpulses;  $\delta$  Dauer des Gradientenpulses;  $\Delta$  Zeit zwischen den beiden Gradientenpulsen

Bei der Wahl der b-Werte sollte ein guter Kompromiss zwischen Kontrast und SNR angestrebt werden. Hohe b-Werte führen zu einem guten Kontrast zwischen Bereichen mit unterschiedlicher Diffusion, bewirken im Gegenzug jedoch einen Abfall der SNR. Ist der SNR Abfall zu stark, kann das Rauschniveau das Gewebesignal überschreiten. Ein niedriges SNR kann eine Verfälschung der gemessenen Diffusionswerte bedingen und sollte deshalb bei der Signalanalyse beachtet werden (Dietrich et al. 2001). Die effiziente Wahl der b-Werte spielt vor allem im Bereich des Abdomens eine wichtige Rolle und ist Gegenstand zahlreicher Studien (Koh et al. 2011).

### Echo-Planar-Imaging (EPI)

Mit der EPI ist eine schnelle MRT-Bildgebung möglich. Theoretisch kann mit der *single-shot* Technik die Datenakquisition in einem einzigen Gradientenechozug erfolgen. Der Nachteil dieser Technik besteht darin, dass der k-Raum und damit die Bildakquisitionsmatrix in ihrer Größe beschränkt ist. Eine Alternative bietet die *multi-shot* Technik, bei der über mehrere Anregungspulse eine segmentierte Füllung größerer k-Räume erfolgen kann.

Die Vorteile der EPI sind ihre hohe Geschwindigkeit bei der Bildakquisition und die damit verbundene Unempfindlichkeit für Bewegungsartefakte. Nachteile sind eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber magnetischen Suszeptibilitätsunterschieden sowie die hohen

Anforderungen an die Hardwarekomponenten und dabei besonders an das Gradientensystem. Einen guten Überblick zum Thema liefert die Übersichtsarbeit von Tsao *et al.* (Tsao 2010).

#### 2.3.2.2.2 Apparent Diffusion Coefficient (ADC)

Der Begriff des ADC-Wertes (*apparent diffusion coefficient*) wurde von Le Bihan eingeführt (Le Bihan et al. 1988). Er ist der tatsächlich gemessene Diffusionskoeffizient in biologischen Geweben und unterscheidet sich vom Diffusionskoeffizienten des reinen Wassers. Die Berechnung des ADC-Wertes kann entweder direkt oder mittels monoexponentiellen Fittings erfolgen.

Die direkte Berechnung erfolgt auf Basis zweier MRT-Bilder mit unterschiedlicher Diffusionsgewichtung. Dabei wird ein niedriger b-Wert ( $b_0$ ) mit einem hohen b-Wert ( $b$ ) gepaart. Für jeden Pixel wird eine Gradengleichung erstellt, bei der der Logarithmus der Signalintensität gegen den b-Wert aufgetragen wird. Die Steigung der Geraden ergibt den ADC-Wert.

$$\log\left(\frac{S_0}{S_1}\right) = ADC (b - b_0)$$

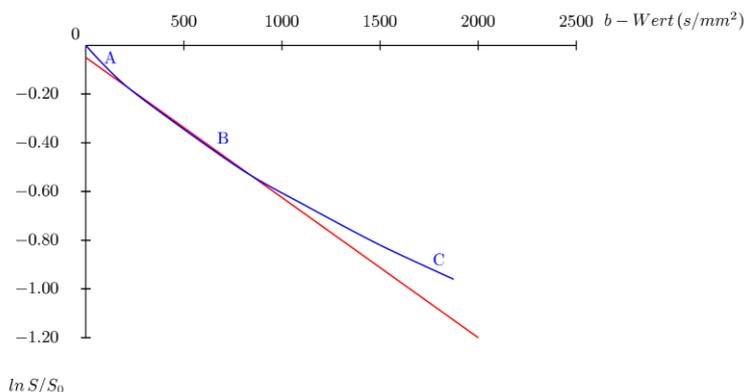
$S/S_0$  = Signalverlust,  $b$  = hoher b-Wert,  $b_0$  = niedriger b-Wert

Die Berechnung durch ein monoexponentielles Fitting geschieht auf Grundlage einer Serie von Aufnahmen mit unterschiedlichen b-Werten ebenfalls unter Verwendung einer Regressionsanalyse.

$$\frac{S}{S_0} = \exp(-b ADC)$$

$S/S_0$  = Signalverlust,  $b$  = b-Wert

Abbildung 07 zeigt die Abhängigkeit zwischen errechnetem ADC-Wert und der Höhe der verwendeten b-Werte.



[Abb. 07] Zusammenhang zwischen ADC-Wert und b-Wert. Bei niedrigen b-Werten (A) ist die Steigung der blauen Kurve höher. Damit liegt der errechnete ADC-Wert über dem Wert des reinen Diffusionsgradienten für Wasser (rote Linie). Bei hohen b-Werten (C) ist die Steigung geringer. Es ergeben sich niedrigere ADC-Werte. Im Mittelteil (B) entspricht der ADC-Wert dem Diffusionskoeffizienten.

Der gekrümmte Kurvenverlauf ist bis dato nicht abschließend erklärbar. Aktuelle Erklärungsansätze gehen davon aus, dass im Bereich hoher b-Werte, also mit steigender Diffusionsgewichtung, diffusionsbegrenzende Faktoren wie Zellmembranen zunehmend ins Gewicht fallen. Mit diesem Problem befasst sich Modell des biexponentiellen Signalverlustes (Niendorf et al. 1996) sowie das Kurtosismodell (Jensen und Helpers 2010). Die erhöhte Steigung im Bereich niedriger b-Werte lässt sich mit dem IVIM-Modell (Le Bihan et al. 1988) beschreiben und ist auf Perfusionseffekte im Kapillarraum zurückzuführen.

### *Anwendung und Interpretation des ADC-Wertes*

Der ADC-Wert ist ein quantitatives Maß für die Diffusionsbewegungen von Wasser innerhalb eines Gewebes. Er wird durch Bindegewebestrukturen, Zellmembranen, Organellen sowie Makromoleküle beeinflusst und erlaubt indirekt Rückschlüsse auf die Zelldichte, die Beschaffenheit des extrazellulären Raumes sowie die Integrität von Zellmembranen.

Den ersten klinischen Erfolg hatte der ADC-Wert bei Diagnose und Therapie des akuten Schlaganfalles (Moseley et al. 1990). Aktuelle klinische Anwendungsbeispiele sind die Korrelation des ADC-Wertes mit einem Tumorproliferationsindex (Wang et al. 2009) oder

dem Gleason-Score (Woodfield et al. 2010), wodurch sich mit dem ADC-Wert Rückschlüsse auf histopathologische Eigenschaften des Gewebes ziehen lassen.

Die Abschätzung der Zelldichte mittels des ADC-Wertes ist bei der Bewertung von Tumoren vielversprechend. Nach aktuellem Verständnis führt eine steigende Zelldichte zu einer eingeschränkten Bewegungsmöglichkeit der Wassermoleküle innerhalb des Gewebes. Daraus resultiert ein Abfall des ADC-Wertes. Auf molekularer Ebene lässt sich diese Bewegungseinschränkung durch die Kombination einer relativen Zunahme des Intrazellularraumes, verbunden mit einer Abnahme des Extrazellularraumes erklären. Im Intrazellularraum ist die Diffusion durch die hohe Viskosität, Makromoleküle und andere Diffusionsbarrieren eingeschränkt. Im extrazellulären Raum ist eine „freiere“ Diffusion möglich, diese wird bei steigender Zelldichte jedoch zunehmend durch dichter liegende Zellmembranen eingeschränkt (Szafer et al. 1995). Die Bewertung der Zelldichte kann beispielsweise zum Grading von Gliomen beitragen (Sugahara et al. 1999).

Der ADC-Wert kann außerdem Hinweise bei der Dignitätsbeurteilung von Tumorgeweben liefern. Ein niedriger ADC-Wert in stark proliferierenden, also zellreichen Geweben kann ein Hinweis auf Malignität sein (Pickles et al. 2006b, Rubesova et al. 2006).

Der ADC-Wert ist dazu geeignet, nekrotisches und vitales Tumorgewebe zu differenzieren. Nekrose verursacht durch die Zerstörung von Zellmembranen und den damit verknüpften Volumenzuwachs des extrazellulären Raumes einen Anstieg des ADC-Wertes, während vitales Tumorgewebe aufgrund seiner hohen Zelldichte einen niedrigen ADC-Wert aufweist. Der ADC-Wert kann das Ausmaß von Nekrose innerhalb eines Tumors erfassen (Lyng et al. 2000) und somit prognostische Aussagen bezüglich eines möglichen Therapieansprechens treffen (Dzik-Jurasz et al. 2002, Swinson et al. 2002).

Beim Therapiemonitoring kann ein steigender ADC-Wert, noch vor der therapiebedingten Größenabnahme des Tumors (Pickles et al. 2006a), zur Validierung eines Therapieeffektes herangezogen werden (Chenevert et al. 1997, Chenevert et al. 2000, Jennings et al. 2002, Theilmann et al. 2004). Die Abnahme beruht vermutlich auf einer apoptotisch bedingten Schrumpfung der Zellen und der damit verbundenen Zunahme des extrazellulären Raumes (Patterson et al. 2008). Der Übergang apoptotischer Areale in Nekrose kann die Abnahme des ADC-Wertes beschleunigen. Ein früher Anstieg des ADC-Wertes unter Therapie kann

prognostische Hinweise bezüglich eines möglichen Therapieerfolges liefern (Mardor et al. 2003). Gelegentlich kommt es bei Therapiebeginn zu einem kurzzeitigen Abfall des ADC-Wertes. Erklärt wird dies durch eine Zellschwellung im akuten Stadium der Zellschädigung (van Gelderen et al. 1994).

Die Interpretation des ADC-Wertes bereitet Schwierigkeiten. Heterogene Tumore können zellreiche, ödematöse, nekrotische, zystische oder hämorrhagische Anteile aufweisen. Problematisch ist dies, wenn der ADC-Wert für den gesamten Tumor erhoben wurde. In diesem Fall können nekrotische Tumoranteile einen Anstieg des ADC-Wertes bewirken und damit vitale Bereiche mit hoher Zellproliferation und niedrigem ADC-Wert kaschieren. Ein ähnliches Problem stellt sich beim Therapiemonitoring. Der Abbau apoptotischer Zellen durch Makrophagen und die anschließende Ersetzung durch Bindegewebe bewirkt genauso wie Repopularisierung von vitalem Tumorgewebe einen Abfall des ADC-Wertes.

#### 2.3.2.2.3 IntraVoxel Incoherent Motion (IVIM)

Bereits 1986 gelangen die ersten Diffusionsmessungen an den Gehirnen lebender Menschen (Le Bihan et al. 1986). In diesem Kontext wurde zeitgleich das Konzept der IVIM vorgestellt.

Das IVIM-Modell beschreibt den Einfluss aller mikroskopisch translationalen Bewegungen auf ein diffusionsgewichtetes MRT-Signal. Diese mikroskopisch translationalen Bewegungen werden durch Diffusion und Mikroperfusion verursacht. Bei der Mikroperfusion vollführen die Wassermolekül, innerhalb der zufällig angeordneten Kapillaren Bewegungen, die mit der freien Diffusion vergleichbar sind. Le Bihan *et al.* gelang es 1988 mithilfe der IVIM, Perfusions- und Diffusionseffekte voneinander zu trennen (Le Bihan et al. 1988). Später gelang eine Verbindung zwischen IVIM und den hämodynamischen Parametern (CBF, CBV, MTT) der klassischen Perfusionsbildgebung (Le Bihan und Turner 1992). Das IVIM-Modell beinhaltet die Parameter Diffusionskonstante ( $D$ ), Pseudodiffusion ( $D^*$ ) und Perfusionsfraktion ( $f$ ). Diese Parameter werden mittels Regressionsanalyse auf Basis folgender Gleichung bestimmt:

$$\frac{S}{S_0} = (1 - f) \exp(-b D) + f \exp(-b D^*)$$

$S/S_0$  = Signalverlust;  $f$  = Perfusionsfraktion;  $b$  =  $b$ -Wert;  $D$  = Diffusionskonstante,  $D^*$  = Pseudodiffusion

Die Diffusionskonstante entspricht im Bereich mittlerer b-Werte dem ADC-Wert. Damit lässt sich die Diffusionskonstante auf einer stabilen Basis im Vorfeld bestimmen. Die Zahl der Unbekannten reduziert sich von drei auf zwei. Dieses Vorgehen entschärft das Problem der Störanfälligkeit von Regressionsanalysen mit mehreren Unbekannten. Eine weitere Vereinfachung besteht darin, die Pseudodiffusion auf einen experimentell bestimmten Wert festzusetzen (Klauss et al. 2011). Die Pseudodiffusion ist gleichzeitig der am schwierigsten genau zu bestimmende Parameter (Pekar et al. 1992).

### *Anwendung und Interpretation des IVIM-Modells*

Das IVIM-Modell erlaubt Rückschlüsse auf die biologischen Eigenschaften eines Gewebes. Die Diffusionskonstante quantifiziert die im Gewebe stattfindende freie Diffusion, während die Pseudodiffusion den durch die Perfusion verursachten Signalverlust in diffusionsgewichteten Aufnahmen beschreibt. Der durch die Pseudodiffusion verursachte Signalverlust ist von der Häufigkeit der Richtungsänderungen der Wassermoleküle abhängig. Die Häufigkeit der Richtungsänderungen wird von der Gefäßlänge, der Anzahl ihrer Krümmungen sowie der Blutflussgeschwindigkeit beeinflusst. Die Perfusionsfraktion dient zur Gewichtung von Perfusions- und Diffusionseffekten.

Das IVIM-Modell kam in Studien im Feld der Tumordiagnostik zur Anwendung. Bei der Bewertung von Lebermetastasen zeigten die Diffusionskonstante und das Nekroseausmaß eine positive Korrelation. Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion brachten bei gleicher Fragestellung keinen Erfolg (Chiaradia et al. 2013). In einer anderen Studie zeigten Diffusionskonstante und ADC-Wert ein höheres Potenzial bei der Charakterisierung von fokalen Leberläsionen als Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion (Watanabe et al. 2013). Die Perfusionsfraktion zeigte signifikante Unterschiede bei der Differenzierung von massebildender chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom (Klauss et al. 2011). Vielversprechende Ergebnisse ergaben sich bei der Klassifizierung von Läsionen der Mamma (Sigmund et al. 2011), der Niere (Chandarana et al. 2012) sowie im Kopf-Hals-Bereich (Sumi und Nakamura 2013). Neben der Tumordiagnostik offeriert das IVIM-Modell weitere Anwendungsgebiete. Beispiele sind die renale Dysfunktion (Ichikawa et al. 2013) oder die Unterscheidung von NASH und Steatose der Leber (Guiu et al. 2012, Joo et al. 2013).

### 2.3.2.3 Dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE)

#### *2.3.2.3.1 Biologische Grundlagen der Tumervaskularisierung*

Der aktuelle Wissensstand zum Thema Angiogenese bei Tumorerkrankungen wird durch in der Übersichtsarbeit von Carmeliet und Jain (Carmeliet und Jain 2000) zusammengefasst. Bei der Entwicklung neuer Therapieansätze ist ein besseres Verständnis in diesem Bereich erforderlich. Verbesserte Methoden der nicht invasiven Darstellung der Tumervaskularisierung stehen im Fokus der Forschung (McDonald und Choyke 2003, Weissleder und Pittet 2008).

Tumorgefäße unterscheiden sich bezüglich ihrer Morphologie und Funktionalität erheblich von normalen Gefäßen. Das Ungleichgewicht von angiogenetischen Regulatoren führt häufig zu einem chaotischen Aufbau der Tumorgefäße. Das Resultat sind Verdrehungen, Dilatationen, Kalibersprünge sowie das exzessive Ausbilden von Shunts und Nebenästen. Diese Charakteristika bedingen beispielsweise bei Lungenkarzinomen (Schor et al. 1998) oder Gliomen (Wyss et al. 2007) eine hochvariable heterogene Durchblutung. Die Folge ist ein ungleiches Versorgungsmuster innerhalb des Tumors (Baish und Jain 2000). Es entstehen Bereiche mit ineffizienter Nährstoffversorgung, niedrigen Sauerstoffpartialdrücken, sowie niedrigem pH-Wert (Helmlinger et al. 1997b). Diese erschwerten Bedingungen bieten proangiogenetischen Phänotypen sowie Tumorzellen, die auf Hypoxie nicht mit Apoptose reagieren, einen direkten Selektionsvorteil (Giaccia 1996). Eine klonale Expansion besonders aggressiver Tumorzellen und eine weitere Zunahme der Tumorerheterogenität ist die Folge (Campbell und Polyak 2007).

Für Tumorgefäße sind eine veränderte Form der Endothelzellen sowie das Fehlen von Perizyten typisch. Das Resultat ist eine defekte endotheliale Barriere mit großen Poren und eine damit verbundene hohe Permeabilität (Hashizume et al. 2000). Die Permeabilität wird zusätzlich von Faktoren wie Tumortyp, Lokalisation, Hormonstatus (Hobbs et al. 1998) und lokalen Mediatoren (Dvorak et al. 1999) beeinflusst.

Einige Tumoren zeigen einen verstärkten Lymphfluss in der Tumorperipherie, während die Anzahl an Lymphbahnen im Tumorzentrum reduziert ist (Leu et al. 2000). Die Erklärung ist eine schnelle Zellproliferation im Tumorzentrum mit der Folge eines erhöhten mechanischen

Druckes. Der erhöhte Druck bewirkt ein Abdrücken neuer Lymphgefäße in der Entstehungsphase (Helmlinger et al. 1997a).

In der Summe haben diese Charakteristika Einfluss auf die Wirksamkeit einer intravenösen Tumorthherapie. Das hohe Maß an Heterogenität bezüglich Permeabilität und Vaskularisierung bewirkt eine unterschiedliche Wirkstoffkonzentration in einzelnen Tumorbereichen (Simpson-Herren et al. 1988). Dies erschwert die Bewertung eines möglichen Therapieerfolges.

#### *2.3.2.3.2 Funktionsprinzip der DCE-MRT und technische Grundlagen*

##### Funktionsprinzip

Die Wechselwirkung zwischen einem i.v. (intravenös) applizierten paramagnetischen Kontrastmittel und den Protonen des Wassers führt zu einem lokalen Anstieg der T1-Relaxationszeit im Kontrastmittelaufnehmenden Gewebe. Dies ist mit einer Signaländerung in T1w-Bildern verbunden. Mit einer Serie von T1w-Aufnahmen lässt sich die dynamische Signaländerung erfassen und in einer Signal-Zeit-Kurve darstellen. Der Verlauf der Kurve ist von Gewebeeigenschaften wie der Gefäßfraktion, der Perfusion, der Permeabilität und dem Volumen des extrazellulären, extravaskulären Raumes abhängig und erlaubt Rückschlüsse auf das zugrundeliegende Gewebe (Professor Dr. Maximilian Reiser 1997).

##### Kontrastmittel

Als Prämisse bei der Verwendung von Kontrastmitteln gilt, dass das Kontrastmittel mit dem Blut eine homogene Mischung bildet und die Gewebepfusion nicht beeinflusst. Der überwiegende Teil der gängigen Kontrastmittel beeinflusst das MRT-Signal über einen spin-paramagnetischen Effekt, der die Wechselwirkungen zwischen freien Elektronen und den Protonen des Wassers beschreibt. Die am häufigsten verwendete Klasse stellen die niedermolekularen extrazellulären gadoliniumhaltigen Kontrastmittel dar, z.B. Gd-DTPA (Gadopentetat-Dimeglumin), welches sich aus dem Chelatbildner DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) und Gadoliniumionen (Gd) zusammensetzt. Die Gadoliniumionen besitzen sieben ungepaarte Elektronenpaare in der äußersten Elektronenschale und besitzen dadurch eine sehr starke paramagnetische Wirkung. Das DTPA bestimmt die pharmakokinetischen Eigenschaften des Moleküls und verhindert eine toxische

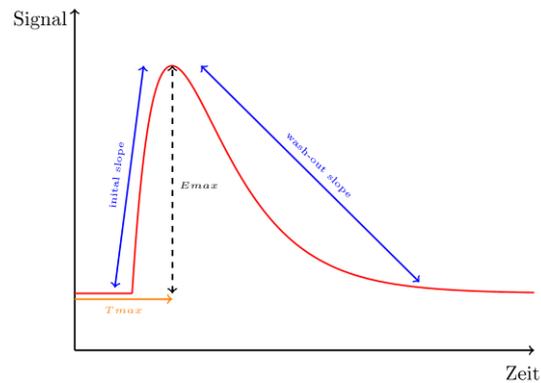
Wirkung freier Gadoliniumionen im Körper. Der intravenösen Injektion folgt ein schneller Anstieg des Kontrastmittels im Plasmaspiegel. Dieser Anflutungsphase folgt eine wenige Minuten andauernde Verteilungsphase, in der sich das Kontrastmittel im extrazellulären Flüssigkeitsraum verteilt. Die Verteilungsphase geht fließend in die Ausscheidungsphase über. Die Ausscheidung dieser Kontrastmittelklasse findet streng über die Nieren statt, weshalb die Halbwertszeit im Körper durch die glomeruläre Filtrationsrate determiniert wird (Weinmann et al. 1984). Die Verteilung gadoliniumhaltiger Kontrastmittel im Kreislauf von Mäusen und Ratten wurde von Tweedle *et al.* beforscht (Tweedle et al. 1995).

### Turbo-FLASH-Technik

Die Turbo-FLASH-Technik kommt bei der dynamischen kontrastmittelgestützten MRT zum Einsatz. Sie wird der Sequenzfamilie der ultraschnellen *spoiled* Gradientenechos zugeordnet und verwendet kleine Flipwinkel bei sehr kurzen TR-Zeiten. Die kleinen Flipwinkel und die kurze TR-Zeit wirken sich nachteilig auf den T1-Kontrast aus. Der T1-Kontrast wird verbessert, indem der Bildgebungssequenz ein 180° Präparationspuls vorangestellt wird. Die Verzögerung zwischen dem Inversionspuls und der ersten Flipwinkelanregung wird als effektive Inversionszeit bezeichnet. Je nach Anwendung wird der k-Raum nach einem Inversionspuls komplett oder nur teilweise gefüllt. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit und des guten T1-Kontrastes eignet sich diese Technik zur Erfassung der Kontrastmittelanflutung bei perfusionsgewichteten Aufnahmen.

#### *2.3.2.3.3 Modellfreie semiquantitative Parameter*

Die semiquantitative Methode beschreibt den zeitlichen Verlauf des MRT-Signals bei einer dynamischen kontrastmittelgestützten MRT-Untersuchung durch modellfreie Parameter. Diese Parameter sind von äußeren Faktoren wie der *arterial input function* (AIF) oder der Injektionsgeschwindigkeit abhängig. Diese Faktoren sind bei jeder Messung verschieden. Aus diesem Grund sind verschiedene Messungen mit modellfreien Parametern nur bedingt vergleichbar. Häufig verwendete Parameter sind in Abbildung 08 dargestellt.



[Abb. 08] Exemplarischer Kurvenverlauf einer Signalintensitäts-Zeit-Kurve nach Kontrastmittelgabe. Die *area under the curve* (AUC) fasst die Fläche unter der Signalintensitätskurve zusammen. Die *initial slope* (blau) bezeichnet die maximale oder durchschnittliche Steigung im initialen Anstieg der Kurve. Die *wash-out slope* (blau) beschreibt den maximalen oder durchschnittlichen Abfall des Signals in der Auswaschphase.  $E_{max}$  (schwarz gestrichelt) gibt den höchsten Punkt der Kurve an.  $T_{max}$  oder *time to peak* (TTP) (orange) meint die Zeit zwischen dem Beginn des Kurvenanstiegs bis zum Maximum der Signalsteigerung.

#### *Anwendung und Interpretation semiquantitativer Parameter*

Die Interpretation semiquantitativer Parameter wird in der Diagnostik angewendet. Die Voraussetzung hierzu ist eine direkte Verbindung zwischen Intensität und Verlauf des Signalanstieges sowie der Permeabilität und Dichte der Tumorgefäße. Diese Annahme macht eine Abschätzung der Dignität von Geweben möglich. Aggressivere Tumoren haben einen erhöhten Blutfluss aufgrund einer höheren Gefäßdichte. Die Folge ist eine schnellere Kontrastmittelanreicherung und eine höhere *wash-out rate*. Diese Annahme bestätigte sich für Läsionen im Brustgewebe, wobei die Permeabilität einen stärkeren Einfluss auf das Muster der Kontrastmittelanreicherung hatte als die unterschiedliche vaskuläre Dichte (Knopp et al. 1999). Es werden typische Kurvenverlaufsformen der Kontrastmittelaufnahme unterschieden. Charakteristische Kurventypen sind der *persistent increase* Typ, der *plateau* Typ und der *decline after initial slope* Typ (Knopp et al. 2001).

Der Verlauf der Signalintensitäts-Zeit-Kurven lässt sich mit verschiedenen Parametern beschreiben. Einige werden im Folgenden exemplarisch vorgestellt. Bei Brustkrebspatienten lässt sich mit Hilfe der *relative signal intensity* (RSI) eine prognostische Aussage bezüglich der 5 Jahres Überlebensrate treffen (Johansen et al. 2009), während sich die *time to peak* (TTP) als Kriterium zur Dignitätsbeurteilung bei Mammakarzinomen eignet (Szabo et al. 2003). Die *wash-out ratio* kann zur Unterscheidung von benignen und malignen

Speicheldrüsentumoren beitragen (Yabuuchi et al. 2003) und die Kombination einer kurzen TPP mit einem schnellen *wash-out* ist typisch für maligne Prostatatumore (Verma et al. 2012).

Semiquantitative Methoden können auch zur Bewertung neuer Tumorthérapien genutzt werden. Bei antivaskulären Therapien gilt ein reduzierter Blutfluss als Zeichen für ein Therapieansprechen. Der Einsatz eines *vascular endothelial growth factor* (VEGF) Rezeptor-Inhibitors in Lebermetastasen führte zu einer Abnahme der AUC um 50 % und korrelierte gleichzeitig mit einer guten Prognose (Mross et al. 2005). Auch der mittlere IAUC-Wert war ein nützlicher Endpunkt bei der Quantifizierung eines antivaskulären Therapieeffektes bei Tumoren (Evelhoch et al. 2004).

#### 2.3.2.3.4 Pharmakodynamisches Modell und quantitative Parameter

Die Erhebung quantitativer Parameter auf Grundlage der DCE-MRT erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt wird die native T1-Relaxationszeit im Gewebe bestimmt und in einer T1-Map abgespeichert. Im zweiten Schritt wird auf Grundlage der T1-Map der Signalanstieg in die Kontrastmittelkonzentration innerhalb des Gewebes umgerechnet. Im letzten Schritt wird die im zeitlichen Verlauf erfasste Kontrastmittelkonzentration mit einem pharmakodynamischen Modell gefittet. Das Modell liefert die quantitativen Parameter.

##### 1) T1-Mapping mit einer Spoiled-Gradient-Echo-Technik (FLASH)

Die Spoiled-Gradient-Echo-Technik zerstört die nach einem Anregungspuls verbleibende Quermagnetisierung mit einem Spoilergradienten. Dies verhindert, dass die verbleibende Quermagnetisierung zum gemessenen MRT-Signal beiträgt und die bestimmte T1-Relaxationszeit bleibt unverfälscht. Die Bestimmung der T1-Zeit im Gewebe erfolgt mit einer Serie von T1w-Aufnahmen unter variierenden Flipwinkeln und gleichbleibender TR (Wang et al. 1987). Die T1-Map wird mit folgender Gleichung berechnet:

$$S_0 = M \sin\alpha \frac{1 - \exp\left(\frac{-TR}{T_{10}}\right)}{1 - \cos\alpha \exp\left(-\frac{TR}{T_{10}}\right)}$$

M: Protonendichte;  $\alpha$ : Flipwinkel; TR: Repetitionszeit;  $T_{10}$ : T1-Relaxationszeit

## 2) Berechnung der Kontrastmittelkonzentration ( $C_1$ )

Bei der Bestimmung der Kontrastmittelkonzentration müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Erstens muss das Kontrastmittel eine messbare Signaländerung erzeugen und zweitens muss zwischen der Signaländerung und der Kontrastmittelkonzentration im Gewebe eine annähernd lineare Beziehung bestehen. Sind beide Prämissen erfüllt, wird mit folgender Formel die Kontrastmittelkonzentration im Gewebe bestimmt:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{10}} + r_1 C$$

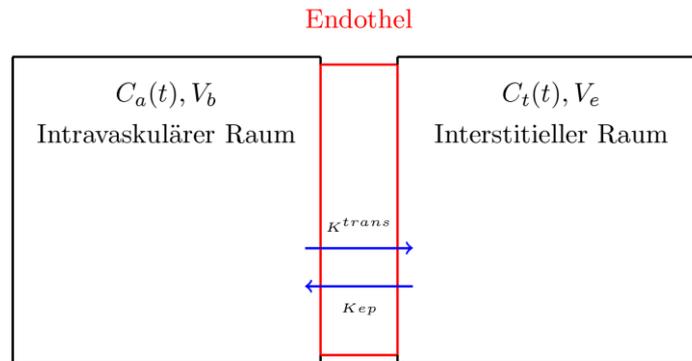
$T_1$ : T1-Relaxationszeit;  $T_{10}$ : T1-Relaxationszeit der T1-Map;  $r_1$ : spezifische Relaxationsrate des KM,  $C$ : Kontrastmittelkonzentration

Die im ersten Schritt erstellte T1-Map wird mit  $T_{10}$  bezeichnet.  $r_1$  steht für die spezifische Relaxationsrate des verwendeten Kontrastmittels und beträgt für Gd-DTPA *in vitro*  $4,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .  $T_1$  ist die gemessene T1-Relaxationszeit im Gewebe nach Kontrastmittelgabe. Die Kontrastmittelkonzentration  $C$  lässt sich unter Kenntnis der Variablen berechnen und in einer Konzentrationsmap abbilden. Dieser Schritt wird für jede Aufnahme der Bilderserie wiederholt. Auf diese Weise lässt sich die Kontrastmittelkonzentration im zeitlichen Verlauf darstellen.

## 3) Pharmakodynamisches Modell nach Tofts und dessen Anwendung

Als Vorgänger der pharmakodynamischen Modelle wird das Zwei-Kompartiment-Modell von Kety *et al.* verstanden (Kety 1951). Das Modell beschreibt den inerten Gasaustausch zwischen Lunge und Körper. Der Ansatz, biologische Gewebe in Kompartimente aufzuteilen, wurde im Toftsmodell von Larsson *et al.* sowie Tofts *et al.* auf die Kontrastmittelanwendung bei MRT-Untersuchungen übertragen (Larsson *et al.* 1990).

Das Toftsmodell nimmt an, dass sich über eine in beide Richtungen gleich permeable Gefäßwand ein Gleichgewichtszustand zwischen der Kontrastmittelkonzentration des Blutplasmas und der Kontrastmittelkonzentration im *extracellular extravascular space* (EES) ausbildet. Abb. 09 zeigt das generalisierte kinetische Modell des entstandenen Gleichgewichts.



[Abb. 09] Tofts-Modell. Im Tofts-Modell werden die beiden Kompartimente des intravaskulären und des interstitiellen Raumes durch das Endothel der Gefäßwände getrennt. Das Endothel ist für Kontrastmittel in beide Richtungen durchlässig. Der Kontrastmittelaustausch über die Gefäßwand lässt sich mit den Konstanten  $K_{ep}$  und  $k^{trans}$  beschreiben.

In einem Konsensuspaper wurde sich auf eine Vereinheitlichung der Parameter des Toftsmodell geeinigt. Diese sind die *transfer constant* ( $k^{trans}$ ), die *rate constant* ( $K_{ep}$ ) sowie die *volume fraction of extracellular and extravascular space* ( $v_e$ ) (Tofts et al. 1999).

Die  $k^{trans}$  beschreibt den Volumentransfer zwischen dem intravaskulären Kompartiment und dem Kompartiment des extrazellulären extravaskulären Raumes mit der Einheit  $\text{min}^{-1}$ . Damit bildet die  $k^{trans}$  gleichzeitig die Permeabilität und den Blutfluss innerhalb des Gewebes ab. Je nach Balance zwischen maximaler Permeabilität und maximalem Blutfluss muss die  $k^{trans}$  unterschiedlich interpretiert werden. Übersteigt die Permeabilitätskapazität den maximalen Blutfluss repräsentiert die  $k^{trans}$  den Blutfluss im Gewebe. Übersteigt der Blutfluss hingegen die maximale Permeabilität, gibt die  $k^{trans}$  die Permeabilität im Gewebes wieder (Tofts et al. 1999). Die  $v_e$  beschreibt den Volumenanteil des Extrazellulärraumes pro Volumeneinheit des Gewebes. Die  $K_{ep}$  beschreibt den Efflux aus dem Kompartiment des extrazellulären extravaskulären Raumes (EES) in das intravaskuläre Kompartiment. Die  $K_{ep}$  wird aus dem Verhältnis von  $k^{trans}$  und  $v_e$  gebildet.

Mittels Regressionsanalysen lässt sich die  $v_e$  und die  $k^{trans}$  bestimmen:

$$C_t(t) = \frac{k^{trans}}{1 - Hct} \{C_a(t) e^{-K_{ep}(t-\tau)}\} + v_b C_a(t)$$

$C_t$ : Kontrastmittelkonzentration im Gewebe;  $C_a$ : Kontrastmittelkonzentration in der Arterie;  $k^{trans}$ : *transfer constant*; Hct: Hämatokrit; t: Zeit,  $K_{ep}$ : *rate constant*;  $\tau$ : *mean residence time*,  $v_b$  Blutvolumen pro Gewebeeinheit

Die Kontrastmittelkonzentration als Zeitfunktion ( $C_t$ ) wird durch die in Schritt 2 errechnete Konzentrationsmap beschrieben. Die *arterial input function* (AIF), also die Kontrastmittelkonzentration als Zeitfunktion innerhalb des Gefäßsystems ( $C_a$ ), ist hingegen problematisch. Die AIF hat großen Einfluss auf die Kontrastmittelaufnahme des Gewebes und wird von der Herzfrequenz, der Injektionsgeschwindigkeit, dem Ort der Injektion, der Streuung des Kontrastmittels bei Lungen und Herzpassage, sowie der renalen Ausscheidungsrate beeinflusst. Im Idealfall müsste die AIF vor jeder Messung individuell bestimmt werden. Abhängig vom Versuchsaufbau ist dies im Mausmodell häufig schwer zu realisieren. Ein Lösungsansatz besteht darin, die AIF im Vorfeld am Herz bei einer Kohorte von Mäusen zu bestimmen und die gemittelte Funktion bei allen Messungen als Standard zu verwenden (Walker-Samuel et al. 2007). Andere Modellansätze verzichten komplett auf die Bestimmung der AIF. Yankeelov *et al.* verglichen das Zielgewebe mit einer Referenzregion in der *transfer constant* und *volume (EES)* bekannt waren (Yankeelov et al. 2005). Das Brixmodell arbeitet mit einer kontinuierlichen Kontrastmittelgabe über einen definierten Zeitraum. Dies macht die Bestimmung einer AIF überflüssig (Brix et al. 1991).

#### *Anwendung und Interpretation quantitativer Parameter*

Einige Arbeiten nutzten pharmakokinetische Parameter, um die Heterogenität der Tumervaskularisation bei verschiedenen Tumorarten zu beschreiben. Häufig sind schnell wachsende Tumoren im Tumorzentrum schlechter durchblutet als am Rand (Checkley et al. 2003). Benjaminsen *et al.* unterteilen Xenotumoren in Schalen und beschreiben anschließend die Perfusion innerhalb der Tumoren (Benjaminsen et al. 2004). Dabei zeigten sich Bereiche mit unterschiedlichem *extraction flow* (EF) (Graff et al. 2005) und *extravascular extracellular space fraction* (EESF) (Benjaminsen et al. 2008) innerhalb der Tumoren. Quantitative Parameter kommen auch bei der Therapieevaluation zum Einsatz. Eine hohe *transfer constant* spricht für eine höhere Durchblutung und kann eine erhöhte Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe bedingen. Eine hohe *transfer constant* führte zu einem besseren Behandlungserfolg und einer gesteigerten Prognose bei mit Angiogeneseinhibitoren therapierten Nierenzellkarzinomen (Flaherty et al. 2008). Lussanet *et al.* konnten die Reduktion von  $K^{PS}$  (*endothelial transfer coefficient*) bei Rektumkarzinomen unter Behandlung nachweisen (de Lussanet et al. 2005).

#### 2.3.2.4 Auswertung und Darstellung erhobener Parameter

##### Region of interest (ROI)

Die ROI legt den zu analysierenden Bereich in einer MRT-Aufnahme fest. Zur Verlaufsbeobachtung kann eine einzelne ROI über den gesamten Tumor gelegt werden (Dowlati et al. 2002). Problematisch dabei ist die Missachtung der Tumorerogenität. Bei der „hot-spot“ Methode wird die ROI auf den Bereich mit der höchsten Kontrastmittelaufnahme begrenzt. Dies soll die Heterogenität der Tumoren bei der Analyse berücksichtigen (Mussurakis et al. 1997). Ein weiterer Ansatz teilt die Tumore in ein schwach kontrastmittelaufnehmendes Zentrum und einen stark kontrastmittelaufnehmenden Rand (Li und Padhani 2012). Wird dieses Modell um weitere radiale ROI erweitert, spricht man vom sogenannten Zwiebelschalenmodell. Dieses eignet sich im besonderen Maße dazu, die Unterschiede in der Perfusion von Xenotumoren zu beschreiben (Benjaminsen et al. 2004).

##### Parameterkarten

Parameterkarten geben die räumliche Verteilung erfasster Parameter graphisch wieder. Zur verbesserten visuellen Darstellung kann auf Pixelbasis eine Farbkodierung der Werte, z.B. rot für hohe, blau für niedrige Werte, erfolgen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Zellen und Zellkultur**

#### **3.1.1 Tumorzelllinien humanen Ursprungs**

In vorliegender Arbeit wurden vier Tumorzelltypen humanen Ursprungs verwendet. Die BxPC-3 Zelllinie entstammte einem primären Adenokarzinom der Pankreas (Tan et al. 1986). Die HT-29 Zelllinie (ATCC®) wurde aus einem primären Adenokarzinom des Kolon, die MCF-7 Zelllinie (ATCC®) aus einem Adenokarzinom der Mamma (Soule et al. 1973) isoliert. Die ML-1 Zelllinie wurde aus dem Rezidiv eines humanen follikulären Schilddrüsenkarzinoms (Schonberger et al. 2000) gewonnen. Die ML-1 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. P. J. Banga (King`s College, London, England) zur Verfügung gestellt. Die übrigen Zellen wurden von der ATCC® (American Type Culture Collection, Manassas, USA) bezogen.

#### **3.1.2 Zellkulturbedingungen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Steril Guard Class II Typ A/B3 Sicherheitsbank (The Baker Company, Sanford, USA) durchgeführt. Es wurden Kulturflaschen (Sarstedt AG&Co Nümbrecht, Deutschland) mit Filterdeckel verwendet. Die Zellen wurden in einem Zellkulturschrank (Hera Cell, Heraeus Instruments GmbH, Hanau Deutschland) unter Standardbedingungen (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Als Kulturmedium wurde für alle Zelllinien, mit Ausnahme der stabil transfizierten Zelllinien (MCF-7/hNIS und HT-29/hNIS), RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies Ltd, Pasley, Schottland) verwendet und dieses mit 10 % FCS (Fötale Kälberserum) und 1 % Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) versetzt. Das Medium der MCF-7/hNIS und HT-29/hNIS Zellen enthielt als Zusatz das Selektivantibiotikum Zeocin™ (Gibco® Life Technologies Ltd, Pasley, Schottland) in den Konzentrationen 250 µg/ml bzw. 200 µg/ml. Das Medium wurde routinemäßig alle 2–3 Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz der Zellen von über 70 % wurden die Zellkulturen routinemäßig 1:10 geteilt und neu ausgesät. Die Konfluenz der Zellen wurde mit einem Mikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) kontrolliert. Alle Zellen wurden regelmäßig für *in-vitro* und *in-vivo* Experimente auf eine Kontamination mit Mycoplasmen getestet (Mycoplasmen-Detection-Kit; Minerva BioLabs, Berlin, Deutschland). Die Ergebnisse waren stets negativ.

### **3.1.3 Transfektion der HT-29 und MCF-7 Zelllinien**

Die stabile Transfektion der MCF-7 und HT-29 Tumorzelllinien wurde von Frau Randi Marisa Pose (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland) etabliert. Die Zellen wurden über einen pcDNA3.1/Zeo/hNIS Expressionsvektor (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) mit dem humanen Natrium-Jodid-Symporter sowie einem Gen für Antibiotikaresistenz stabil transfiziert. Durch die Zugabe des Antibiotikums Zeocin™ (Gibco® Life Technologies Ltd, Paisley, Schottland) erfuhren die Tumorzellen mit erfolgreicher Transfektion eine positive Selektion. Die Stabilität der NIS-Expression konnte auch bei fehlendem Selektionsdruck über einen Zeitraum von 3 Monaten nachgewiesen werden.

## **3.2. Mausxenograftmodell**

### **3.2.1 Versuchstiere**

Die Genehmigung zur Durchführung eines Tierversuches nach § 8a Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes wurde vor Beginn der Studie durch die zuständige Behörde des Landes Hamburg erteilt. Ein gültiger Ethikantrag (G06/11, Behörde für Familie und Soziales, Hamburg, Deutschland) lag vor.

Männliche und weibliche SCID (*severe combined immunodeficient*)-Mäuse im Alter von 8–12 Wochen wurden von folgenden Institutionen bezogen (Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Charles River Laboratories, Walmington, USA; Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, Frankreich). Die Mäuse wurden in einer spezifischen pathogenfreien Umgebung bei konstanten Umweltkonditionen (24-26° C, Luftfeuchtigkeit 30-50 %, Tag-Nacht-Rhythmus durch Kunstlicht im 12-stündigen Wechsel) gehalten. Als Futter wurde pelletiertes Nagetierfutter (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum* angeboten. Alle 2–4 Tage wurde der Gesundheitszustand der Tiere überprüft, zusätzlich wurde wöchentlich eine Gewichtskontrolle durchgeführt. Bei einem Gewichtsverlust von über 20 %, ab einer Tumorgroße von 1500 mm<sup>3</sup>, bei Ulzeration oder struppigem Fell und Lethargie wurde das betroffene Tier durch zervikale Dislokation euthanasiert.

### **3.2.2 Vorbereitung der Zelllinien**

Die unter Selektionsdruck durch Zeocin™ kultivierten Zelllinien wurden mindestens 48 Stunden vor Injektion in ein antibiotikafreies Kulturmedium überführt. Am Tag der Injektion wurden alle Zelllinien mit Dissoziationspuffer (Gibco®, Life Technologies Ltd, Pasley, Schottland) vom Boden der Kulturflaschen gelöst und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen in zusatzfreiem RPMI-Medium resuspendiert.

### **3.2.3 Subkutane Injektion ins Tier**

Die applizierte Menge an Zellen richtete sich nach der Morphologie sowie den Anwachsraten der einzelnen Tumorzelllinien. Bei den Zelllinien BxPC-3, HT-29, ML-1 wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 200 µl zusatzfreiem RPMI-Medium pro Versuchstier injiziert.

Bei der MCF-7 Zelllinie wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 200 µl einer 1:1 RPMI/Matrigel®-Lösung (BD Matrigel, Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, San Jose, USA) suspendiert. Durch gekühlte Lagerung wurde eine frühzeitige Polymerisierung des Matrigel® vermieden. Durch den Einsatz von Matrigel® sollte eine diffuse Verbreitung der Zellen verhindert und eine bessere Anwachsrate erzielt werden (Mullen et al. 1996, Mullen 2004). Um die Proliferationsrate der östrogenrezeptorpositiven MCF-7 Zellen zu fördern, wurde den Tieren subkutan im Nackenbereich ein Östrogenpellet (1,5 mg/Pellet, 90 Tage Release, Innovatives Research of America, Florida, USA) 5 Tage vor Zellinnokulation implementiert.

Die Injektion der Zellen erfolgte mit einer 27G Kanüle (Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsung, Deutschland) subkutan oberhalb der rechten Scapula.

## **3.3 Radiojodtherapie**

Die Radiojodtherapie mit  $^{131}\text{I}$  (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) der NIS-transfizierten MCF-7 und HT-29 Tumorzelllinien fand in Zusammenarbeit mit der Isotopenlabor Facility (ILF) des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf statt. Um die Aufnahme von  $^{131}\text{I}$  in die Tumorzellen zu fördern, erhielten die Tiere eine Woche vor Therapiebeginn jodarmes Futter (LASvendi, Soest, Deutschland). Zum Schutz der Schilddrüse wurde über den gleichen Zeitraum täglich 5-10 µg L-Thyroxin (L-Thyroxin Hennig inject, Sanofi-Aventis, Berlin, Deutschland) substituiert. Bei einer Tumorgröße von 50-100 mm<sup>3</sup> wurde den Tieren ca. 60 MBq  $^{131}\text{I}$  intraperitoneal appliziert, wobei die zu spritzende Menge  $^{131}\text{I}$  im Curiemeter (CRC ® -15BT Dose Calibrator, Capintec Inc., Ramsey, USA) bestimmt wurde.

Die nach Applikation in der Spritze verbleibende Restaktivität wurde im Anschluss gemessen. Die Tiere wurden täglich betrachtet und gegebenenfalls mit Kochsalzlösung versorgt. Während der Versuche verblieben die Tiere in entsprechenden Haltungsschränken im Kontrollbereich des Isotopenlabors und wurden dort *ad libidum* gehalten. Der Transport der Tiere zu den jeweiligen MRT Terminen erfolgte in einem Bleibehältnis.

### **3.4 Tumormonitoring**

#### **3.4.1 SPECT-CT zum Monitoring der NIS-Expression**

Die SPECT-Untersuchungen wurden im Rahmen einer bestehenden Kollaboration mit dem Small Animal Imaging Center (SAIC) Charité Berlin durchgeführt. 45 Minuten nach intravenöser Gabe von 100 MBq <sup>99m</sup>Tc-Pertechnetat wurden die Tiere mit einem 1,5–2,0 % Isofluran/Luft-Gemisch narkotisiert und in einem mit Kleintierkollimatoren (D 1,0 mm, 12 kcps/MBq, Halbwertsbreite 0,7mm) ausgerüsteten nanoSPECT/CT-Gerät (Bioscan Inc., Washington, USA) untersucht. Dabei wurde die Körpertemperatur (37 °C) durch ein Wärmebett aufrechterhalten und die Augen der Tiere mit Bepanthen® Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Das Protokoll startete mit einem CT-Scan zur anatomischen Darstellung der gesamten Maus (45 kVp, 64 mAs, Dauer 1000 ms bei einer Rotation von 360° in 1°-Schritten; Bildrekonstruktion Voxel 150µm/150µm/150µm), gefolgt von einer statischen SPECT-Untersuchung (45 sec/Projektion, Dauer 40 min, Bildrekonstruktion mit HiSPECT Software) zur Bestimmung der Traceraufnahme. Zur Berechnung der maximalen Traceraufnahme im Tumor wurde eine Referenzregion im Muskelgewebe des rechten Hinterlaufes mit der des Tumors verglichen. Dazu wurden mit der Software In-Vivo-Scope™ (Medical Imaging Systems, Kingsbury, England) ROI gezeichnet. Die Traceraufnahme wurde durch den maximalen Wert innerhalb der gezeichneten ROI definiert und mit prozentual injizierter Dosis (%ID) pro Milliliter Gewebe angegeben. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolk (Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

#### **3.4.2 Magnetresonanztomographie**

##### 3.4.2.1 MRT-Gerät

Die MRT Messungen wurden an einem 7-Tesla-Kleintier-MR (ClinScan, Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) in der radiologischen Forschungsabteilung des

Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, durchgeführt. Als Steuerungssoftware wurde syngo MR B15 (Siemens Medical Solutions Inc, USA) verwendet. Das System war mit wassergekühlten Gradientenspulen (maximale Gradientenstärke 630 mT/m) ausgerüstet. Als Sendespule wurde eine *main transmission coil* (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 112 mm und einem Innendurchmesser von 86 mm genutzt. Als Empfangsspule kam eine 4-Kanal *mouse brain coil* (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit quadratischer Spulenordnung zum Einsatz.

### 3.4.2.2 Messprotokoll

#### a) Localizer

Die Localizer Sequenz wurde zur groben anatomischen Erfassungen des Tumors sowie zur anschließenden Planung der T2w-Sequenz verwendet.

**Tabelle 2:** Localizer Sequenz des MRT-Untersuchungsprotokolls bei *in vivo* Messungen

Protokoll	TR (ms)	TE (ms)	FOV (mm)	Voxel (mm)	FA (°)	S	ST (mm)	Gap (mm)	NSA	TA (min)
t1i_loc	874	1,01	40/40	0,227/0,227/1,000	70	7	1	0,75	1	0:19

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; ST: Schichtdurchmesser; Gap: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Akquisitionen; TA: Aufnahmezeit

#### b) T2w Sequenz

Zur Beurteilung der anatomischen Lage sowie der Tumormorphologie wurden 2D-Aufnahmen in transversaler Schichtführung angefertigt. Hierzu wurde eine atemgetriggerte Turbo-spin-echo-Sequenz mit Fettunterdrückung (SPAIR) verwendet.

**Tabelle 3:** T2w Sequenz des MRT-Untersuchungsprotokolls bei *in vivo* Messungen

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FOV (mm)	Voxel (mm)	FA (°)	S*	ST (mm)	Gap (mm)	NSA	TA (min)
t2_TSE_ SPAIR	1480	38	30/ 26,25	0,117/0,117/0,500	180	24	0,5	0,1	8	8:19**

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; ST: Schichtdurchmesser; Gap: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Akquisitionen; TA: Aufnahmezeit \*abhängig von der Tumorgöße werden 24 bzw. 32 Schichten erzeugt \*\* bei einer angestrebten Atemfrequenz von 30 bpm

### c) Diffusionsgewichtete Sequenz

**Tabelle 3:** Diffusionsgewichtete Sequenz des MRT-Untersuchungsprotokolls bei *in vivo* Messungen

Protokoll	TR (ms)	TE (ms)	FOV (mm)	Voxel (mm)	FA (°)	S	ST (mm)	Gap (mm)	NSA	TA (min)
IVIMdiff _ep2d	8000	29	30/ 26,25	0,234/0,234/0,800	180	18	0,8	0,16	2	7:52

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; SD: Schichtdurchmesser; SA: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Akquisitionen; TA: Aufnahmezeit

Die diffusionsgewichtete Sequenz wurde auf Basis der anatomisch hochauflösenden T2w-Sequenz geplant und bestand aus einer 3-*scan-trace* Spin-Echo-Single-Shot-EPI-Sequenz. Es wurden 18 Schichten erfasst und für jede Schicht 10 2D-Aufnahmen mit unterschiedlicher Diffusionsgewichtung (b-Werte: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 400, 800, 1200, 1600 s/mm<sup>2</sup>) erzeugt.

### d) Dynamische Kontrastmittelgestützte MR-Bildgebung und T1-Mapping

**Tabelle 4:** Sequenz des MRT-Untersuchungsprotokolls zur Bestimmung der T1-Map bei *in vivo* Messungen

Protokoll	TR (ms)	TE (ms)	FOV	Voxel (mm)	FA (°)	S	ST (mm)	Gap (mm)	NSA	TA (min)
T1_M192	40	1,98	30/ 26,25	0,156/0,156/0,500	Var.	32	0,5	0,1	1	1:30

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; SD: Schichtdurchmesser; SA: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Akquisitionen; TA: Aufnahmezeit

Zur Erfassung der T1-Relaxationszeiten im Gewebe wurde mit einer Spoiled-Gradienten-Echo-Sequenz eine Serie 3D-Aufnahmen mit den Flipwinkeln 2°, 5°, 8°, 15°, 30°, 50°, 70° angefertigt.

**Tabelle 5:** Sequenz des MRT-Untersuchungsprotokolls zur Erfassung der Kontrastmittelaufnahme bei *in vivo* Messungen

Protokoll	TR (ms)	TE (ms)	FOV	Voxel (mm)	FA (°)	S	SD (mm)	SA (mm)	NSA	Zeit (min)
DynT1_ TR100Te	100	1,98	30/30	0,156/0,156/0,500	20	18	0,5	0,25	1	36:00

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; SD: Schichtdurchmesser; SA: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Akquisitionen

Um die Kontrastmittelaufnahme quantitativ und semiquantitativ auszuwerten, wurde die dynamische Kontrastmittelverstärkung mit einer Serie von 240 3D-Aufnahmen im Abstand

von jeweils 9 Sekunden erfasst. Dafür wurde eine auf Grundlage der T2w-Sequenz geplante Turbo-Flash-Sequenz verwendet.

### 3.4.2.3 Datenakquise

#### a) Tiervorbereitung

Nachdem das Gewicht der Tiere mit einer Präzisionswaage (EK-4000H, A&D Company, Limited, Tokyo, Japan) bestimmt wurde, erfolgte die Narkoseeinleitung durch ein gasverdampftes (Vapor 19.3, Dräger, Lübeck, Deutschland) 1-2 % Isofluran/Luft-Gemisch (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany). Um den Tieren Kontrastmittel zu verabreichen, wurde ein Katheter in die Schwanzvene gelegt und mittels Hansaplast-Sprühpflaster® (Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) fixiert. Die narkotisierten Tiere wurden während der Vorbereitung auf einer Wärmematte (New T/Pump Warm Water Recirculator, Gaymar Kent Scientific Corporation, Torrington, USA) gelagert, um die Körpertemperatur konstant bei 37 °C zu halten.

#### b) In vivo MRT-Untersuchungen

Während der MR-Untersuchung wurde die Atemfrequenz der Tiere durch ein Small Animal Monitoring and Gating System (Model 1025, SA Instruments Inc, New York, USA) kontrolliert und angepasst. Dabei wurde, mit Ausnahme der T2w-Sequenz 30/min, eine konstante Atemfrequenz von 40-60/min angestrebt. Die Körpertemperatur wurde durch ein Wärmesystem (Thermo Scientific SC100, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) aufrechterhalten und die Augen der Tiere mit Bepanthen® Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Der Tumor wurde mit Ultraschallgel bestrichen, um die Artefaktbildung durch störende Lufteinschlüsse zwischen Fell und Spulenoberfläche zu reduzieren. Für die Dynamikmessung wurde den Mäusen nach der 20. Einzelmessung gewichtsadaptiert 0,15 mmol/kg Kontrastmittel (Gd-DTPA 0,5mmol/l, Magnograf® Marotrast GmbH, Jena, Deutschland, Verdünnungsverhältnis 1:10) verabreicht. Am Ende der Messung wurde die Punktionsstelle am Schwanz desinfiziert und mit Bepanthen® Salbe versorgt, zusätzlich erhielten die Tiere subkutan 0.5 ml isotone Kochsalzlösung (B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), um ihren Flüssigkeitshaushalt zu stabilisieren.

### c) Besonderheiten bei MRT-Messungen nach Gabe von Radiojod

Um eine Kontamination der Arbeitsflächen sowie des MRT-Scanners mit  $^{131}\text{I}$  zu verhindern wurden alle Arbeitsflächen abgedeckt und Spule und Schlitten des Scanners in Folie verpackt. Zusätzlich wurden nach Möglichkeit Einwegartikel verwendet und Körperflüssigkeiten mit saugfähigem Material aufgefangen. Das kontaminierte Material wurde gesammelt und den Richtlinien entsprechend entsorgt. Die Freimessung des Scanners und der Arbeitsflächen erfolgte durch einen Strahlenschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

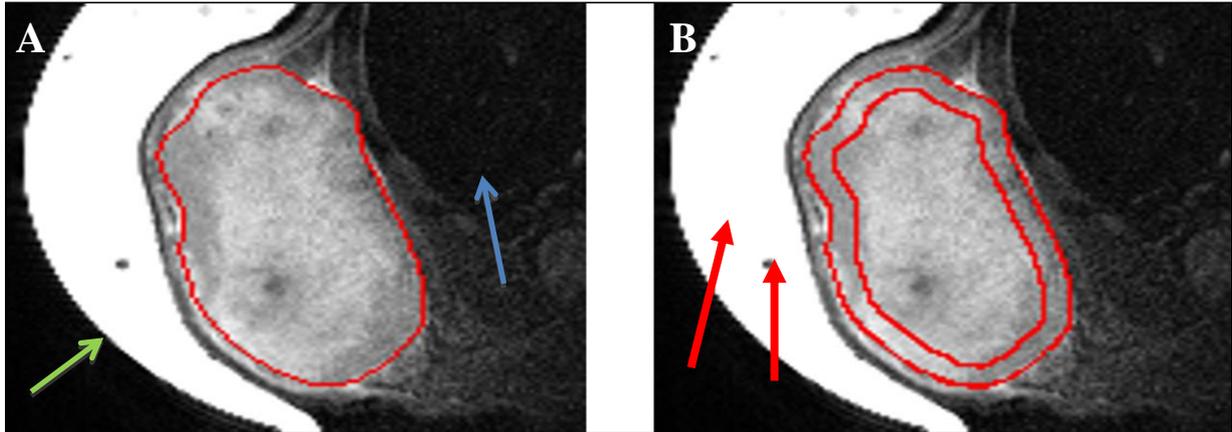


**[Abb. 10]** MRT-Schlitten mit narkotisiertem Versuchstier. Eine Folie um Schlitten und Spule soll eine Kontamination möglicher Kontaktflächen verhindern. Empfangsspule (schwarzer Pfeil). Monitoring (blaues Kabel). Wärmekissen (roter Pfeil). Narkosegaszufuhr (gelber Pfeil).

### 3.4.2.4 Nachbearbeitung der Daten

#### *Festlegung der regions of interest (ROI)*

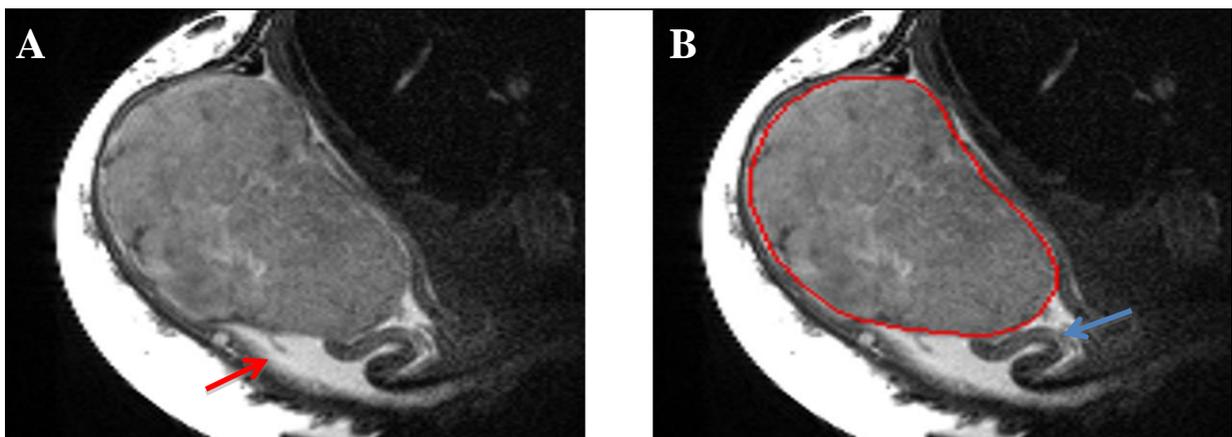
Die Definition der ROI erfolgte auf Basis der T2w-Aufnahmen. Mithilfe von ImageJ wurde zuerst die äußere Kontur des Tumors in jeder Schicht manuell nachgezeichnet. Anschließend wurde in einem Abstand von 700  $\mu\text{m}$  zur äußeren Kontur eine zweite, innenliegende Kontur errechnet. Daraus ergaben sich ROI für den ganzen Tumor, den Tumorrand und das Zentrum des Tumors.



[Abb. 11] Beispiel für ROI Festlegung an einem HT-29 Tumor. **A:** Erfassung des Tumolvolumens durch eine manuell gezeichnete ROI (rote Linie). Das hyperintense Ultraschallgel (rote Pfeile) in der Kavität der Spule (grüner Pfeil) soll die Artefaktbildung durch störende Lufteinschlüsse zwischen Fell und Spulenoberfläche verhindern. Lungengewebe (blauer Pfeil). **B** Berechnung der inneren ROI mittels ImageJ.

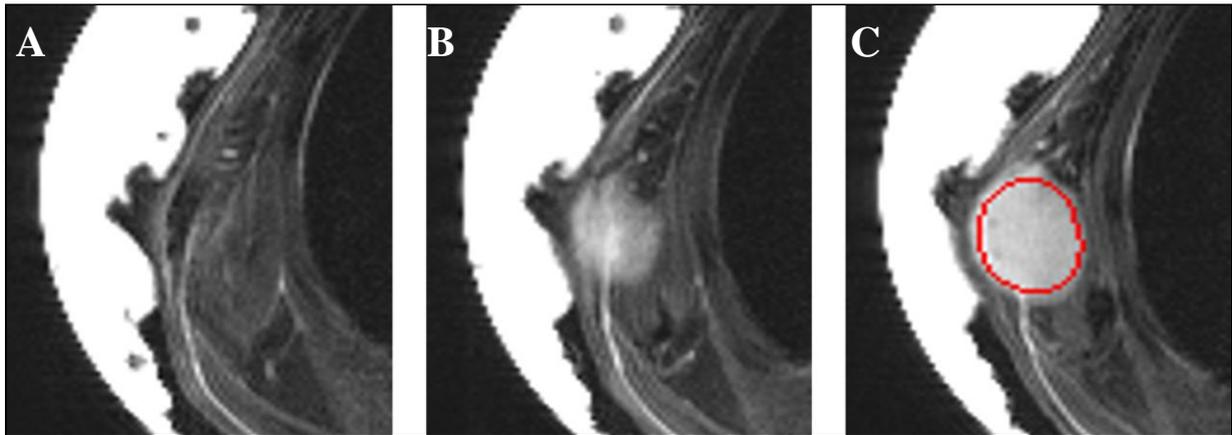
Um das Zeichnen der ROI zu standardisieren und somit die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messungen zu ermöglichen, wurden folgende Kriterien festgelegt.

#### a) Ausschluss von ödematösem Gewebe



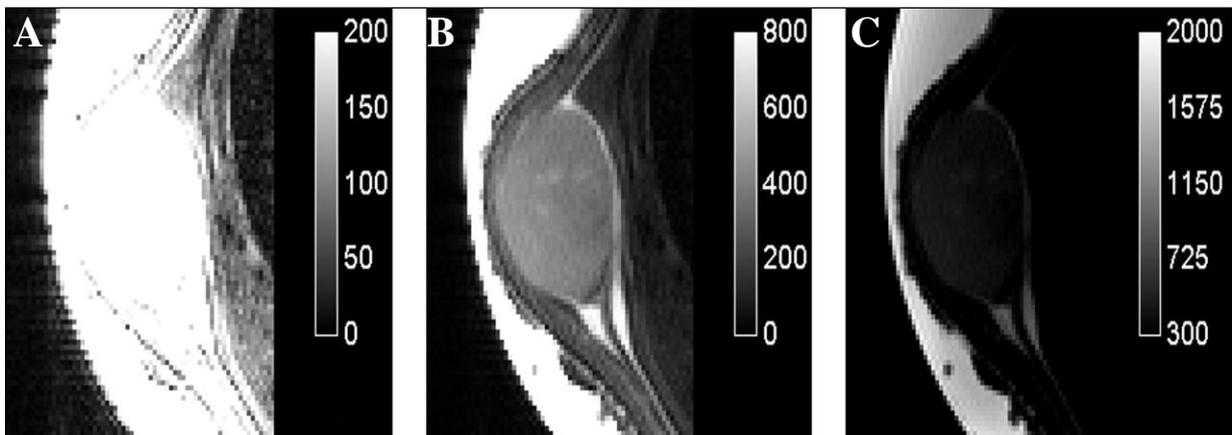
[Abb. 12] Darstellung eines subkutanen BxPC3-Tumors und Einzeichnung der ROI. **A** Ödematös verändertes Gewebe (roter Pfeil): am Tumorunterpol. **B:** Erfassung des Tumolvolumens durch eine manuell gezeichnete ROI (rote Linie). Ödematöses Gewebe wurde bei der ROI-Festlegung ausgeschlossen. Tumorgefäß (blauer Pfeil).

## b) Ausschluss von angeschnittenen Tumorschichten



[Abb. 13] Darstellung des Partialvolumeneffektes. Drei angrenzende Schichten eines ML-1 Tumors, die sich aufsteigend von A nach C dem Tumorzentrum annähern. **A:** Subkutangewebe ohne Tumor **B:** Partialvolumeneffekt durch Anschnitt von Tumorgewebe. Solche Schichten wurden bei der manuellen ROI Festlegung ausgeschlossen. **C:** Erfassung des Tumolvolumens durch eine manuell gezeichnete ROI (rote Linie).

## c) Manuelle Einstellung des Kontrastes



[Abb. 14]. Die genaue Festlegung der ROI erforderte ein Kontrastverhältnis, bei dem einzelne Strukturen deutlich zu trennen waren. Die Einstellung des Kontrastes erfolgte durch manuelle Fensterung. **A:** Kontrast zu hell. **B:** ausreichendes Kontrastverhältnis **C:** Kontrast zu dunkel.

## *Bestimmung des Tumolvolumens*

$$\text{Tumolvolumen} = \text{Summe der Flächen der ROI} \times \text{Schichtdicke} + \text{Gapvolumen}$$

Das Gesamttumolvolumen wurde auf Grundlage der gezeichneten ROI bestimmt. Durch ImageJ wurden Tabellen im xls.-Format (Microsoft Excel, spreadsheet) mit den Flächenwerten der ROI in den entsprechenden Schichten erzeugt. Die Flächenwerte wurden aufaddiert und mit der Schichtdicke multipliziert. Anschließend wurde dem berechneten

Tumorvolumen das sog. Gapvolumen hinzuaddiert, welches den durch die verwendete Messtechnik nicht erfassten Bereich zwischen zwei Schichten beschreibt und 20% des Tumorvolumens betrug.

#### *Quantitative Analyse der erhobenen Messdaten*

Für die quantitative Analyse der Daten wurde eine im Haus entwickelte Routine für ImageJ mit den Plugins DicomSortnSelect und qMapit verwendet (ImageJ, 1.46r National Institutes of Health, USA). Die Erstellung der Parameterkarten für ADC, D, D\* f erfolgte mittels ImageJ direkt aus den im DICOM Format vorliegenden, diffusionsgewichteten Messrohdaten. Zur Analyse der semiquantitativen und quantitativen Parameter waren mehrere Schritte nötig. In einem ersten Schritt wurde mit einem hauseigenen Plug-In für ImageJ eine T1-Map aus einer Serie 3D-Aufnahmen mit variierenden Flipwinkeln berechnet. Anschließend wurde aus der T1-Map sowie einer Serie dynamisch kontrastmittelgestützter MRT-Bildern eine Konzentrationsmap erstellt. Auf Grundlage dieser Konzentrationsmap wurden schließlich Parameterkarten für eine Reihe semiquantitativer sowie für die quantitativen Parameter  $k^{\text{trans}}$ ,  $K_{ep}$ , und  $v_e$  berechnet. Die Berechnung erfolgte auf Pixelbasis unter Anwendung des pharmakodynamischen Modells nach Tofts und unter Verwendung einer in Vorversuchen ermittelte AIF ( $a_1 = 30.6$  g/ml;  $a_2 = 14.0$  g/ml;  $m_1 = 1.301$  1/min;  $m_2 = 0.077$  1/min).

#### *Auswertung der erhobenen Messdaten*

Die gute anatomische Darstellung der T2-gewichteten Aufnahmen wurde zur genauen Platzierung der ROI innerhalb der Parameterkarten genutzt. Dazu wurden unter Verwendung eines Alignment-Tools für ImageJ die T2-gewichteten Aufnahmen mit den Parameterkarten auf Pixelbasis übereinandergelegt. Die Übertragung der in den T2-gewichteten Aufnahmen festgelegten ROI geschah mit Hilfe des Plugins qMapit. In einem nächsten Schritt wurden durch ImageJ Tabellen im xls.-Format erzeugt, diese enthielten die Werte der einzelnen Parameter innerhalb der drei in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen ROI für Zentrum, Rand und gesamten Tumor. Mithilfe des Softwareprogrammes R (Version 2.15.3 und dem Plugin RStudio™ Version 0.97.511, RStudio Inc., Boston, USA) wurden die Tabellen automatisiert, nach Parametern geordnet und für jeden Parameter und Schicht gesondert die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die mittleren Standardabweichungen berechnet.

### *Erstellung der verwendeten Abbildungen*

Die Bearbeitung der Bilder wurde mit ImageJ durchgeführt. Der gewünschte Bildausschnitt wurde mit einer ROI ausgeschnitten. Anschließend wurde ein Maßstabsbalken eingefügt. Die Farbskalierung der Parameterkarten sollte einen möglichst guten Kontrast innerhalb der Tumoren erzeugen und wurde entsprechend gewählt. Zur groben Orientierung wurden die zur Phänotypisierung der Tumoren erfassten Werte verwendet. Als Richtwert für die untere Grenze diente der niedrigste Mittelwert eines Parameters abzüglich der doppelten Standardabweichung. Respektive wurde die obere Grenze durch den höchsten Mittelwert plus die doppelte Standardabweichung festgelegt. Abschließend wurden die Bilder im PNG-Format abgespeichert (Portable Network Graphics). Die endgültige Skalierung und Nachbearbeitung wurde mit GIMP 2.6.11 durchgeführt.

## **3.5 Histologie des Tumorgewebes**

### **3.5.1 Probengewinnung**

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Unter Verwendung eines Präparationsbesteckes wurde die Haut oberhalb des Tumors eröffnet und der subkutan liegende Tumor freipräpariert und entnommen. Zur genaueren Schichtkorrelation wurde bei einigen Tieren vor der letzten Messung zunächst das Fell in der Tumorregion entfernt und unter Beibehaltung der Lagerungsposition im MRT die Schichtführung der MRT-Untersuchung auf dem Tumor aufgezeichnet. Nach Tötung wurden die Tiere schockgefroren und der Tumor analog zur MRT Schichtführung in Scheiben geschnitten.



**[Abb. 15]** Subkutaner Tumor mit aufgezeichneter Schichtführung. Im Anschluss an die Messung wurde die Schichtführung der MRT dem subkutan liegenden Tumor aufgezeichnet. Das Fell wurde vor Messbeginn entfernt.

### 3.5.2 Gewebebehandlung

Die Tumorgewebeschnitte wurden in 4% Formalin fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet. Hierfür wurde das Gewebe über Nacht in 4% Formalin fixiert und anschließend für mindestens 24 Stunden in 0.1 M Phosphatpuffer getaucht, bevor es schließlich in Paraffin eingebettet wurde. Zur Färbung wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die deparaffiniert und rehydriert wurden.

### 3.5.3 Färbemethoden

Die histologischen Färbungen wurden von Frau Agnieszka Tarkowska (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland) sowie in der *Core Facility* für Mauspathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

#### 3.5.3.1 Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE)

Die HE Färbung dient zur orientierenden histologischen Klassifikation von Geweben. Kerne stellen sich blau, Knorpel blau-violett, Erythrozyten, Zytoplasma und Muskulatur rot dar. Die Färbung der Paraffinschnitte erfolgte nach folgendem Protokoll:

**Tabelle 6:** Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosinfärbung

Arbeitsschritt	Dauer (min)	Reagenz:
Hämatoxylin nach Harris (frisch filtriert)	5 min	Hämatoxylin nach Harris Roth, # x903.1
Wässern	5 min	
Differenzieren in HCl Wasser		HCl-Wasser: 2.5 ml HCl 37%ig in 500 ml Aqua dest.
Bläuen in fließendem Leitungswasser	5 min	
Alkohol 70%	2-3 min	Alkohol aufsteigende Reihe Apotheke, UKE
Eosin Gebrauchslösung	bis 3 min	Gebrauchslösung*
Nicht gebundenen Farbstoff herauswaschen in 100%igem Alkohol in 3 Küvetten	1-2 min	Alkohol aufsteigende Reihe Apotheke, UKE
Xylol in 3 Küvetten	2 min	Xylol SDS, # 0750021
Eindecken mit Sakura GLC		Sakura GLC 468253

\*Stammlösungen:           **Lösung A:** 3 g Eosin (Merck, # 1.15935.0100) gelblich wasserlöslich in 300 ml Aqua dest.

**Lösung B:** 0,5 g Phloxin B in 50 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:           50 ml Lösung A + 5 ml Lösung B + 390 ml 96% Alkohol + 2 ml konz. Essigsäure

### 3.5.3.2 Immunhistochemie (IHC)

Die IHC wurde zur Darstellung des NIS-Expressionslevel verwendet. Dabei kamen zwei unterschiedliche Färbeverfahren zum Einsatz.

#### a) manuelle IHC:

Zur Demaskierung des Antigens wurden die Schnitte für 10 min in eine 1:10 Dako Target Retrieval Solution: 1699 (Dako, Glostrup, Dänemark) gegeben, nachdem sie für 10 min in einem Druckkocher (1 bar, 121°C) vorbehandelt wurden. Anschließend wurde eine Blockierung mit Rabbit Serum X0902 (Dako, Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Die Schnitte wurden dann entweder mit Human Sodium Jodide Symporter Ab-1 Clone FP5A (1:150, Thermo Scientific, Waltham, USA), welches an der aa625-643 Domäne des NIS-Proteins bindet oder mit Control Mouse IgG1 (1:17, X 0931, Dako, Glostrup, Dänemark) in Dako Diluent (Antibody Diluent with Background Reducing Components S3022, Dako, Glostrup, Dänemark) über Nacht bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit dem biotinierten sekundären Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulins/Biotinylated (verdünnt 1:200 in TBS, E 0464; Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert und mit Vectastain Universal ABC- AP Kit AK- 5000 (Vector Laboratories LTD., Peterborough, England) entwickelt. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxilin bevor die Schnitte eingedeckelt wurden. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Schnitte mit TBS gewaschen (Tris-buffered saline (TBS), 50 mM Tris Base (Sigma, St. Louis, USA), 150 mM NaCl (J. T. Baker, Deventer, Niederlande), 2 N HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland), pH 7.6).

#### b) automatisierte IHC

Die Schnitte wurden 60 Minuten mit Citrat vorbehandelt. Dann erfolgte die automatisierte IHC mit einem BenchMark XT Gerät (Ventana Medical Systems, Inc., Member of the Roche Group, 1910 Innovation Park, Tucson, USA). Zur Färbung wurde der Human Sodium Jodide Symporter Ab-1 Clone FP5A (Thermo Scientific, Waltham, USA) Antikörper in der Verdünnung von 1:200 verwendet. Die Gefäßfärbung (CD31) erfolgte nach einer Vorbehandlung durch einen CC1 Puffer „mild“ (30 min) mit dem Clone SZ31- (Dianova GmbH; Hamburg, Deutschland) Antikörper in der Verdünnung von 1:100. Die Apoptosefärbung (Caspase 3) erfolgte nach einer Vorbehandlung durch einen CC1 Puffer

„standard“ (60 min) mit dem AF835- (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) Antikörper in der Verdünnung von 1:100.

### **3.5.4 Akquisition der histologischen Aufnahmen**

Die Bildaufnahmen wurden an einem Mikroskop (AxioVert 35, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer Kamera (AxioVision, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die Bilder wurden mittels der AxioVision Release 4.6.3 SP1 Software (Version 11-2007, Carl Zeiss AG, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) analysiert.

## **3.6 Statistik**

a) Therapiemonitoring zweier unterschiedlicher NIS-positiver Tumorzelllinien mittels multiparametrische MRT

Aufgrund der geringen Gruppenstärke wurde auf die Anwendung statistischer Testverfahren verzichtet. Es wurden die Mittelwerte für den gesamten Tumor berechnet und deren relative Änderung zum Ausgangswert deskriptiv beschrieben.

b) Phänotypisierung verschiedener Tumorentitäten mittels multiparametrischer MRT

Zur statistischen Auswertung wurden jeweils 5 Messungen von jedem Tumortyp (BxPC-3, HT-29, MCF-7, ML-1) aus allen verfügbaren Messungen ausgewählt. Auswahlkriterium war, ein möglichst ähnliches Tumolvolumen (BxPC-3  $78 \pm 33$ , HT-29  $128 \pm 25$ ; MCF-7  $57 \pm 26$ ; ML-1  $170 \pm 99$  [mm<sup>3</sup>]). Mittelwerte und Standardabweichung wurden für den gesamten Tumor, das Tumorzentrum sowie den Tumorrand in jeder Gruppe separat berechnet. Mithilfe eines gemischten Modells wurde die Abhängigkeit von Tumorgröße und einzelner Parameter geprüft.

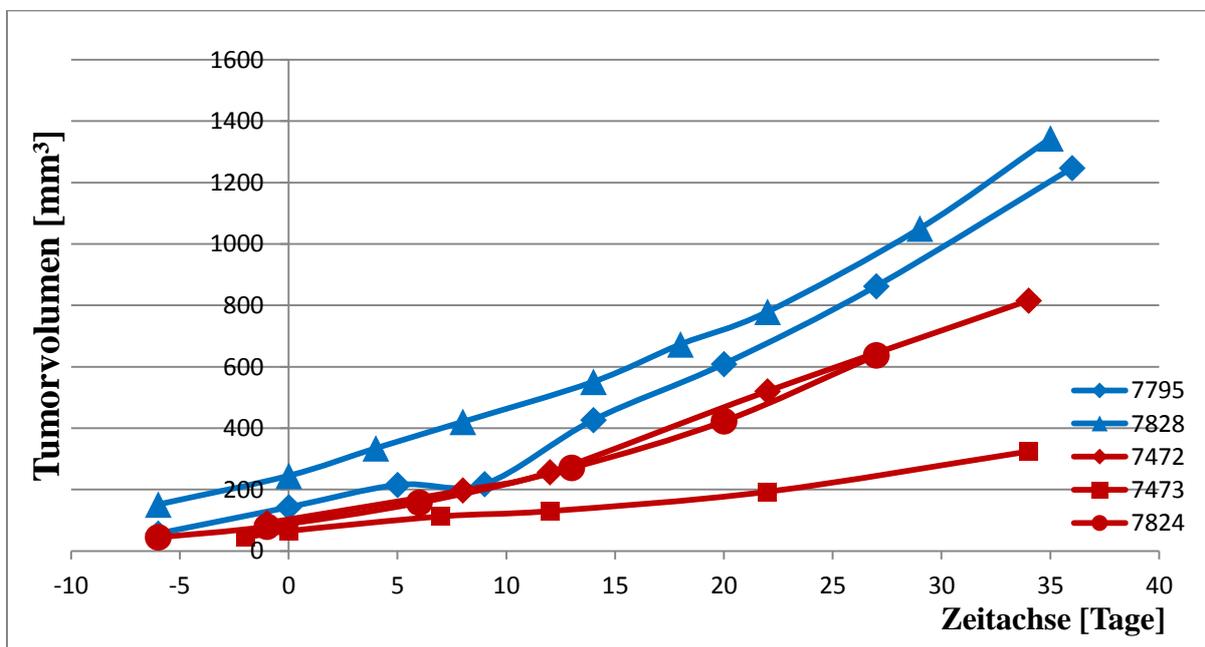
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Therapiemonitoring zweier unterschiedlicher NIS-positiver Tumorzelllinien durch multiparametrische MRT

#### 4.1.1 Größenverlauf der HT-29 und MCF-7 Tumoren

##### Größenverlauf der HT-29 Tumoren

Im Untersuchungszeitraum über 35 Tage hatten die HT-29 Tumoren der Kontrollgruppe (n = 2, blau) eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit als jene der Therapiegruppe (n = 3, rot). Abbildung 16 zeigt die Wachstumskurven der HT-29 Tumoren. Die Kontrollgruppe erreichte zu vergleichbaren Zeitpunkten mit ca. 1350 mm<sup>3</sup> größere Endvolumina als die Therapiegruppe mit ca. 800 mm<sup>3</sup>. Alle Tumoren zeigten ein kontinuierliches Wachstum mit Ausnahme von Tumor 7795 (Messung 4). Ursächlich für das punktuell abfallende Tumolvolumen waren Partialvolumeneffekte bei der Volumenbestimmung. In Tabelle 7 sind die Tumolvolumina zu den jeweiligen Messpunkten aufgetragen. Tag 0 markiert den Therapiebeginn. Messungen vor Therapiebeginn haben ein negatives Vorzeichen.

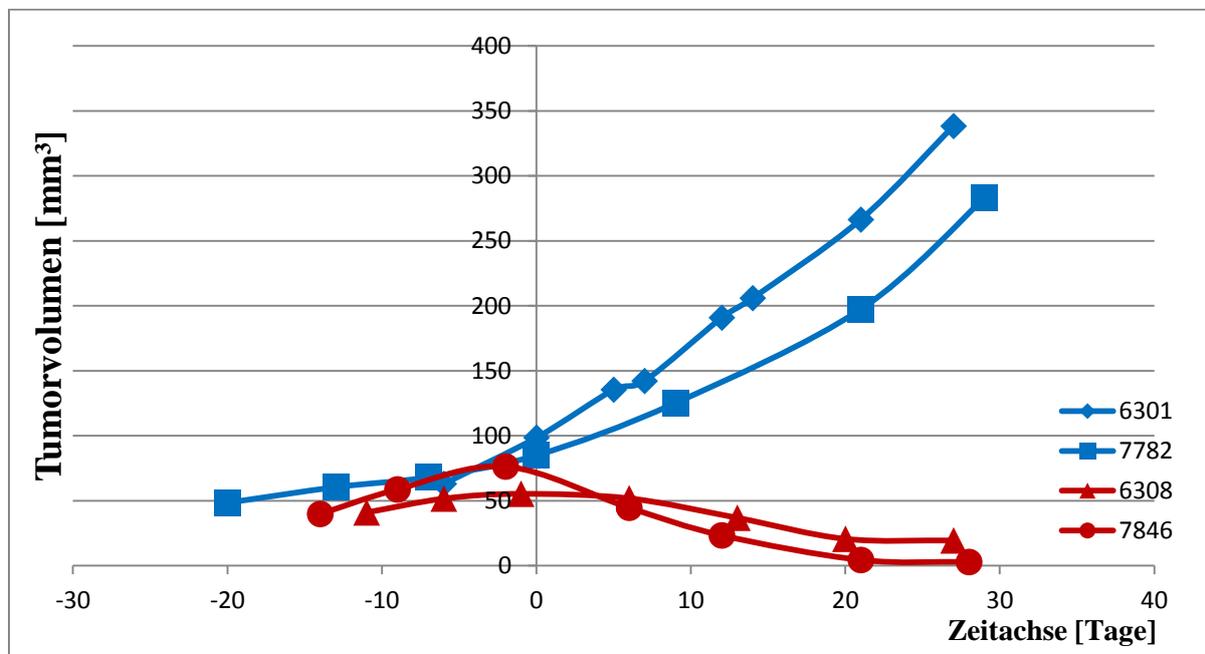


[Abb. 16] Volumenverlauf der HT-29 Tumoren [mm<sup>3</sup>] über die Zeitachse [Tage]. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Maus Kennziffern aufgetragen. Im zeitlichen Verlauf über ca. 35 Tage wiesen die HT-29 Tumoren der Kontrollgruppe (n = 2, blau) eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit als jene der Therapiegruppe (n = 3, rot) auf. Die Kontrollgruppe erreichte mit ca. 1350 mm<sup>3</sup> größere Endvolumina als die Therapiegruppe mit ca. 800 mm<sup>3</sup>.

**Tabelle 7:** Volumen der HT-29 Tumoren an den einzelnen Messpunkten

HT29_7795 Kontrolle		HT29_7828 Kontrolle		HT29_7472 Therapie		HT29_7473 Therapie		HT29_7824 Therapie	
Tage	Volumen [mm <sup>3</sup> ]	Tage	Volumen [mm <sup>3</sup> ]	Tage	Volumen [mm <sup>3</sup> ]	Tage	Volumen [mm <sup>3</sup> ]	Tage	Volumen [mm <sup>3</sup> ]
-6	56	-6	151	-1	91	-2	44	-6	44
0	142	0	245	8	197	0	65	-1	79
5	215	4	334	12	256	7	112	6	157
9	218	8	420	22	520	12	130	13	271
14	426	14	551	34	815	22	193	20	422
20	608	18	673			34	324	27	637
27	862	22	779						
36	1247	29	1050						
		35	1344						

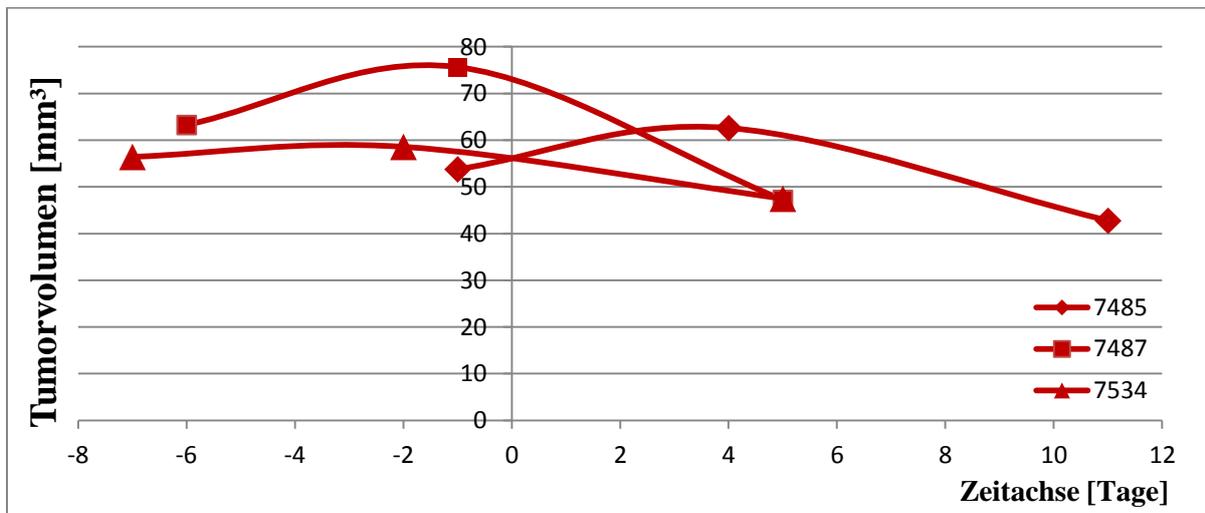
Größenverlauf der MCF-7 Tumoren



**[Abb. 17]** Volumenverlauf der MCF-7 Tumoren [mm<sup>3</sup>] über die Zeitachse [Tage]. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Das Wachstumsverhalten der MCF-7 Tumoren wurde über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen untersucht. Nach Therapiebeginn (Tag 0) zeigten die MCF-7 Tumoren der Kontrollgruppe (n = 2, blau) ein kontinuierliches Wachstum, während in der Therapiegruppe (n = 2, rot) eine Reduktion des Tumorzvolumens auftrat. Vor Therapiebeginn zeigten beide Gruppen ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Tumoren der Kontrollgruppe erreichten Volumina von ca. 350 mm<sup>3</sup>, bei der Therapiegruppe kam es zu einer Volumenreduktion auf ca. 5 mm<sup>3</sup>.

Abbildung 17 zeigt die Wachstumskurven der MCF-7 Tumoren mit  $n = 4$  Messpunkten nach Therapiebeginn. Das Wachstumsverhalten der MCF-7 Tumoren wurde über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen untersucht. Nach Therapiebeginn (Tag 0) zeigten die MCF-7 Tumoren der Kontrollgruppe ( $n = 2$ , blau) ein kontinuierliches Wachstum, während in der Therapiegruppe ( $n = 2$ , rot) eine Reduktion des Tumorumfanges auftrat. Vor Therapiebeginn zeigten beide Gruppen ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Tumoren der Kontrollgruppe erreichten Volumina von ca.  $350 \text{ mm}^3$ , bei der Therapiegruppe kam es zu einer Volumenreduktion auf ca.  $5 \text{ mm}^3$ .

Einige Untersuchungsreihen mussten frühzeitig abgebrochen werden. Die Ursachen waren Abbruchkriterien im Rahmen des Tierschutzes oder der Tod des Versuchstiers. Aus Gründen der Übersicht ist in Abbildung 18 der Volumenverlauf dieser MCF-7 Tumoren aus der Therapiegruppe mit  $n \leq 2$  Messpunkten nach Therapiebeginn gesondert dargestellt. Alle Tumoren zeigten 4 Tage bzw. 11 Tage nach Therapiebeginn eine Reduktion des Tumorumfanges. In Tabelle 8 sind entsprechend Tabelle 7 die Werte der MCF-7 Tumoren aufgetragen.



[Abb. 18] Volumenverlauf der MCF-7 Tumoren [ $\text{mm}^3$ ] über die Zeitachse [Tage]. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. In der Legende sind die individuellen Mauskenntziffern aufgetragen. Alle Tumoren zeigten 4 Tage bzw. 11 Tage nach Therapiebeginn eine Reduktion des Tumorumfanges.

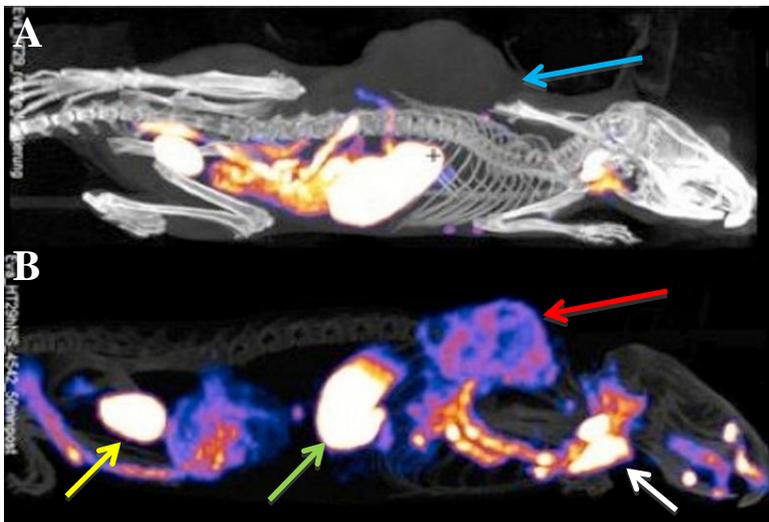
**Tabelle 8:** Volumen der MCF-7 Tumoren an den einzelnen Messpunkten

MCF7_6301 Kontrolle		MCF7_7782 Kontrolle		MCF7_6308 Therapie		MCF7_7846 Therapie		MCF7_7485 Therapie		MCF7_7487 Therapie		MCF7_7534 Therapie	
Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]	Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]	Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]	Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]	Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]	Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]	Tag	Vol. [mm <sup>3</sup> ]
-6	63	-20	48	-11	41	-14	39	-1	53	-6	63	-7	56
0	98	-13	60	-6	51	-9	58	4	62	-1	75	-2	58
5	135	-7	68	-1	55	-2	76	11	42	5	47	5	47
7	142	0	84	6	51	6	44						
12	191	9	125	13	36	12	23						
14	206	21	197	20	20	21	4						
21	266	29	282	27	19	28	3						
27	338												

Die HT-29 Tumoren der Kontrollgruppe erreichten aufgrund einer höheren Wachstumsgeschwindigkeit höhere Endvolumina als vergleichbare MCF-7 Tumoren. Unter Therapie zeigten die HT-29 Tumoren lediglich eine Wachstumsverzögerung, während es bei den MCF-7 Tumoren zu einer deutlichen Volumenreduktion kam.

#### 4.1.2. SPECT/CT-Darstellung der HT-29 und MCF-7 Tumoren

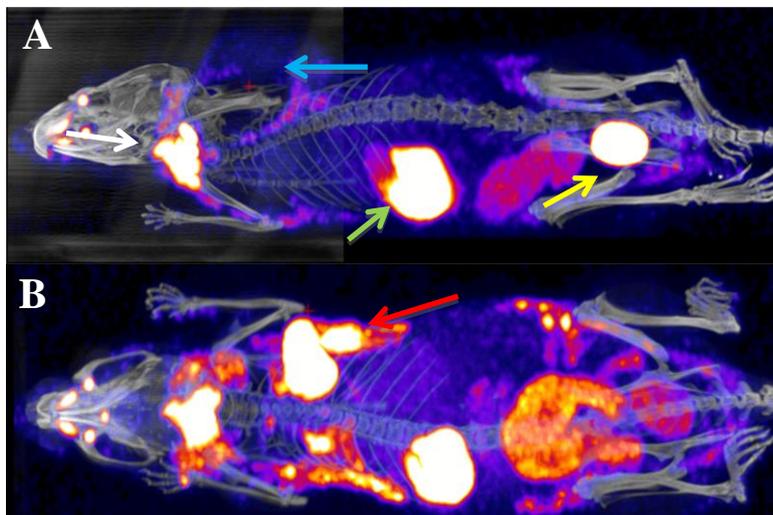
SPECT/CT der HT-29 Tumoren



**[Abb. 19]** <sup>99m</sup>Tc-SPECT/CT Darstellung von HT-29 Tumoren im Mausxenograftmodell. **A:** nativer, NIS-negativer HT-29 Tumor über der rechten Schulter (blauer Pfeil) als Negativkontrolle. Es findet keine <sup>99m</sup>Tc-Speicherung im Tumorgewebe statt. **B:** NIS-positiver HT-29 Tumor (roter Pfeil) in selber Lokalisation mit <sup>99m</sup>Tc-Speicherung (lila-bläulicher Farbton). <sup>99m</sup>Tc-Speicherung findet auch in den Referenzorganen Magen (grüner Pfeil), Blase (gelber Pfeil) und Schilddrüse (weißer Pfeil) statt. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolok zur Verfügung gestellt.

Zur Darstellung der NIS-positiven Tumore wurde ein SPECT/CT jeweils 45 min nach Applikation von ca. 100 MBq des NIS-spezifischen Radionuklids Technetium-pertechnetate ( $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate) durchgeführt. Strukturen mit  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung sind im Bild hell dargestellt. Abbildung 19A zeigt einen nativen, NIS-negativen HT-29 Tumor, der nach Applikation von  $^{99m}\text{Tc}$ , im Gegensatz zu einem NIS-positiven HT-29 Tumor in Abbildung 19B, kaum  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherungen aufwies. Unabhängig vom NIS-Expressionsstatus der Tumoren zeigten Speicheldrüsen, Schilddrüse, Magen, Anteile des Intestinums sowie die Blase eine  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung. Die gemittelte  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung (Uptake) ist für beide Tumortypen in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.

#### SPECT/CT der MCF-7 Tumoren



**[Abb. 20]**  $^{99m}\text{Tc}$ -SPECT/CT Darstellung eines MCF-7 Tumors im Mausxenograftmodell. **A:** nativer, NIS-negativer MCF-7 Tumor über der rechten Schulter (blauer Pfeil) als Negativkontrolle. Es findet keine  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung im Tumorgewebe statt. Anreicherung von  $^{99m}\text{Tc}$  in der Schilddrüse (weißer Pfeil), im Magen (grüner Pfeil) sowie in der Blase (gelber Pfeil) **B:** NIS-positiver MCF-7 Tumor über der rechten Schulter mit starker NIS-Expression (roter Pfeil). Zusätzlich zu Schilddrüse und Magen sind Teile des Interstitiums stärker speichernd. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolok zur Verfügung gestellt.

Abbildung 20A zeigt einen nativen, NIS-negativen MCF-7 Tumor, der nach Applikation von  $^{99m}\text{Tc}$  im Gegensatz zu einem NIS-positiven MCF-7 Tumor in Abbildung 20B kaum  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherungen aufwies. Unabhängig vom NIS-Expressionsstatus der Tumoren zeigten Speicheldrüsen, Schilddrüse, Magen, Anteile des Intestinums sowie die Blase eine  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung. Die gemittelte  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung (Uptake) ist für beide Tumortypen in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 9:** gemittelter  $^{99m}\text{Tc}$  Uptake der nativen und NIS-transfizierten HT-29 und MCF-7 Tumoren

$^{99m}\text{Tc}$ Uptake	HT-29	MCF-7
nativ (n =2)	1,4 %ID/ml	1,55 %ID/ml
NIS-positiv (n =5)	6,0 %ID/ml	20,0 %ID/ml

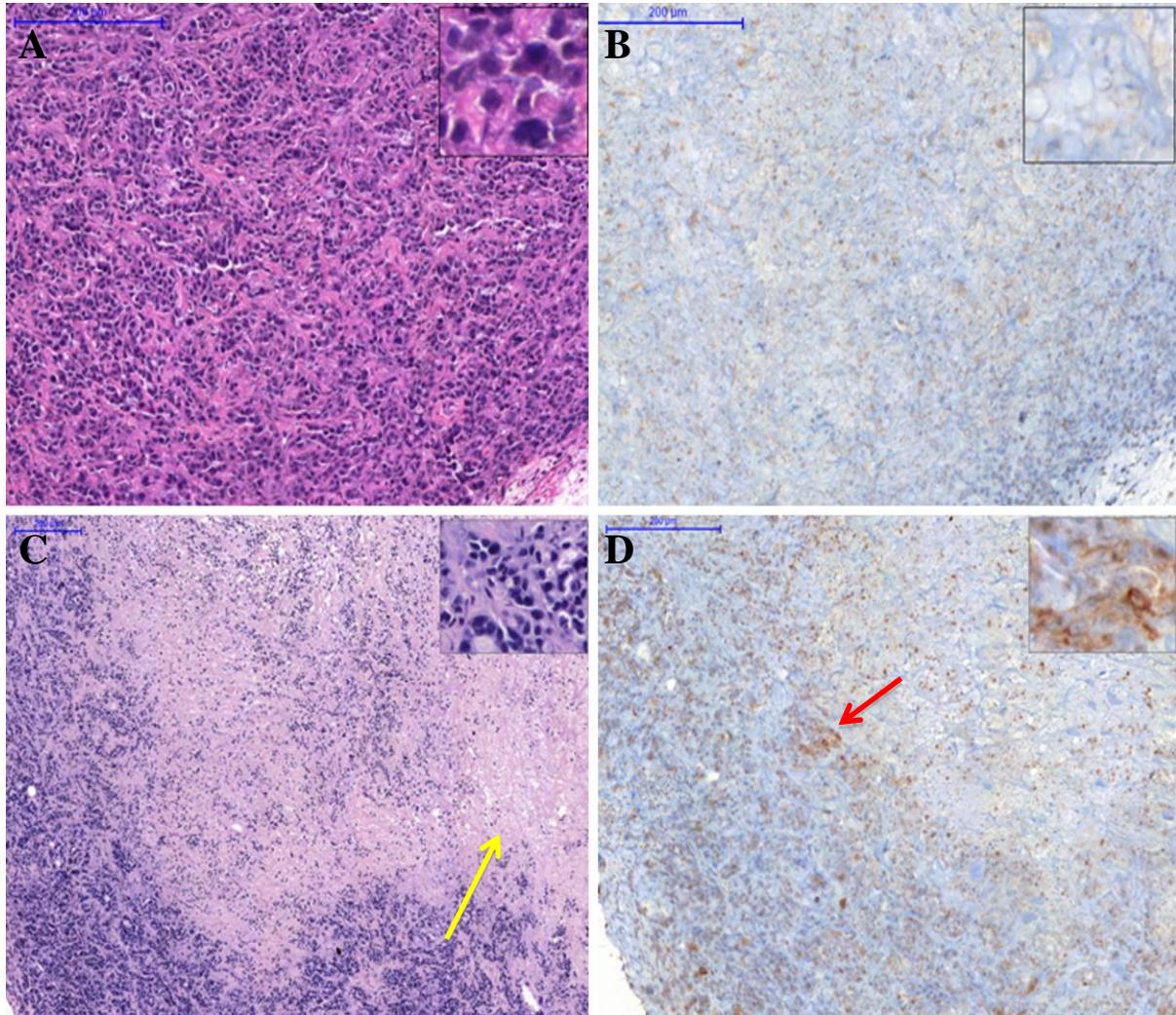
*In vivo* zeigten die MCF-7/hNIS Tumoren eine stärkere Tracerspeicherung als vergleichbare HT-29/hNIS Tumoren. Eine höhere Transfektionsrate der MCF-7/hNIS Zellen ist dabei als primäre Ursache anzusehen. Zusätzlich besaßen die MCF-7 Zellen, als Isolat aus einem Adenokarzinom der Mamma, die Fähigkeit, NIS selbst zu exprimieren. Diese phänotypische Eigenschaft trug ebenfalls zur höheren NIS-Expression bei. Ein weiterer Faktor waren die größeren, nekrotischen Areale der HT-29 Tumoren, die zudem früher auftraten. Diese abgestorbenen Areale exprimierten kein NIS und zeigten folglich keine Tracerspeicherung. Die höhere Nekrosedichte war auf das schnellere Wachstum der HT-29 Tumore zurückzuführen.

Im Allgemeinen zeigten die Körper nativer und NIS-positiver MCF-7 Xenograftmäuse eine höhere  $^{99m}\text{Tc}$ -Speicherung als entsprechende HT-29 Xenograftmäuse. Zurückzuführen ist dies auf die Verwendung weiblicher Tiere im etablierten Mammaxenograftmodell und männlicher Tiere im etablierten Kolonxenograftmodell. Die Mehrspeicherung beruht auf einer konstitutiven NIS-Expression im Brustdrüsengewebe weiblicher Tiere. Physiologisch exprimieren Brustgewebezellen geringe Mengen an NIS auf ihren Zelloberflächen, um in der laktierenden Phase das Neugeborene mit Jod über die Muttermilch zu versorgen.

### 4.1.3 Histologie zur Therapieevaluation

#### 4.1.3.1 NIS-Expression der HT-29 Tumore und MCF-7

##### NIS-Expression der HT-29 Tumoren

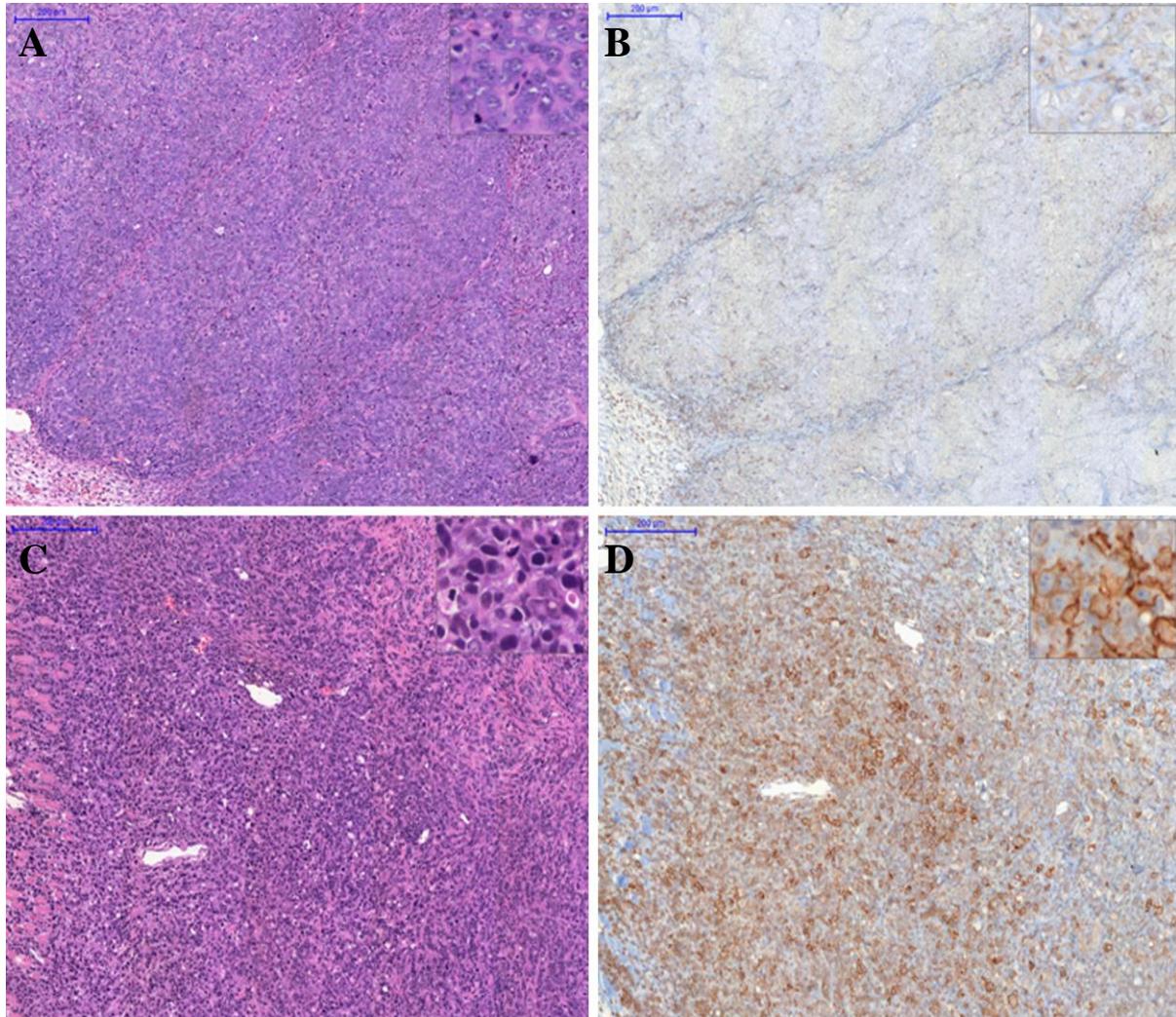


[Abb. 21] Darstellung der NIS-Expression in nativen und NIS-positiven HT-29 Tumoren. Zellkerne sind in der HE-Färbung blau, NIS-exprimierende Areale in IHC-Färbung (roter Pfeil) stark braun dargestellt. **A und B:** HE- und NIS-Färbung eines nativen HT-29 Tumors. **C und D:** HE- und NIS -Färbung eines NIS-positiven HT-29 Tumors. Im Vergleich zeigten NIS-positive HT-29 Tumoren clusterartige Anreicherung von NIS-exprimierenden Zellen, wohingegen native HT-29 Tumoren keinerlei NIS-Expression aufweisen. Die leicht bräunliche Einfärbung resultiert aus einem verstärkten Backgroundsignal, der auch in den NIS-positiven Tumoren vorherrscht. Richtung Tumorzentrum verstärkten sich die nekrotischen Areale (gelber Pfeil). Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolok zur Verfügung gestellt.

In der HE-Färbung zeigten sich keine Unterschiede zwischen nativen und NIS-positiven HT-29 Tumoren. Die IHC-Färbung konnte die unterschiedliche NIS-Expression in nativen und NIS-positiven HT-29 Tumoren nachweisen. NIS-positive HT-29 Tumoren zeigten eine teils membranöse, teils diffuse NIS-Expression (intensive, braune Färbung, Abb. 21D), während bei den nativen HT-29 Tumoren (Abb. 21B) keinerlei spezifische und membranöse

Braunfärbung erkennbar ist. In Abbildung 21C ist nekrotisches zellarmes Areal mit abgebildet.

#### NIS-Expression der MCF-7 Tumoren

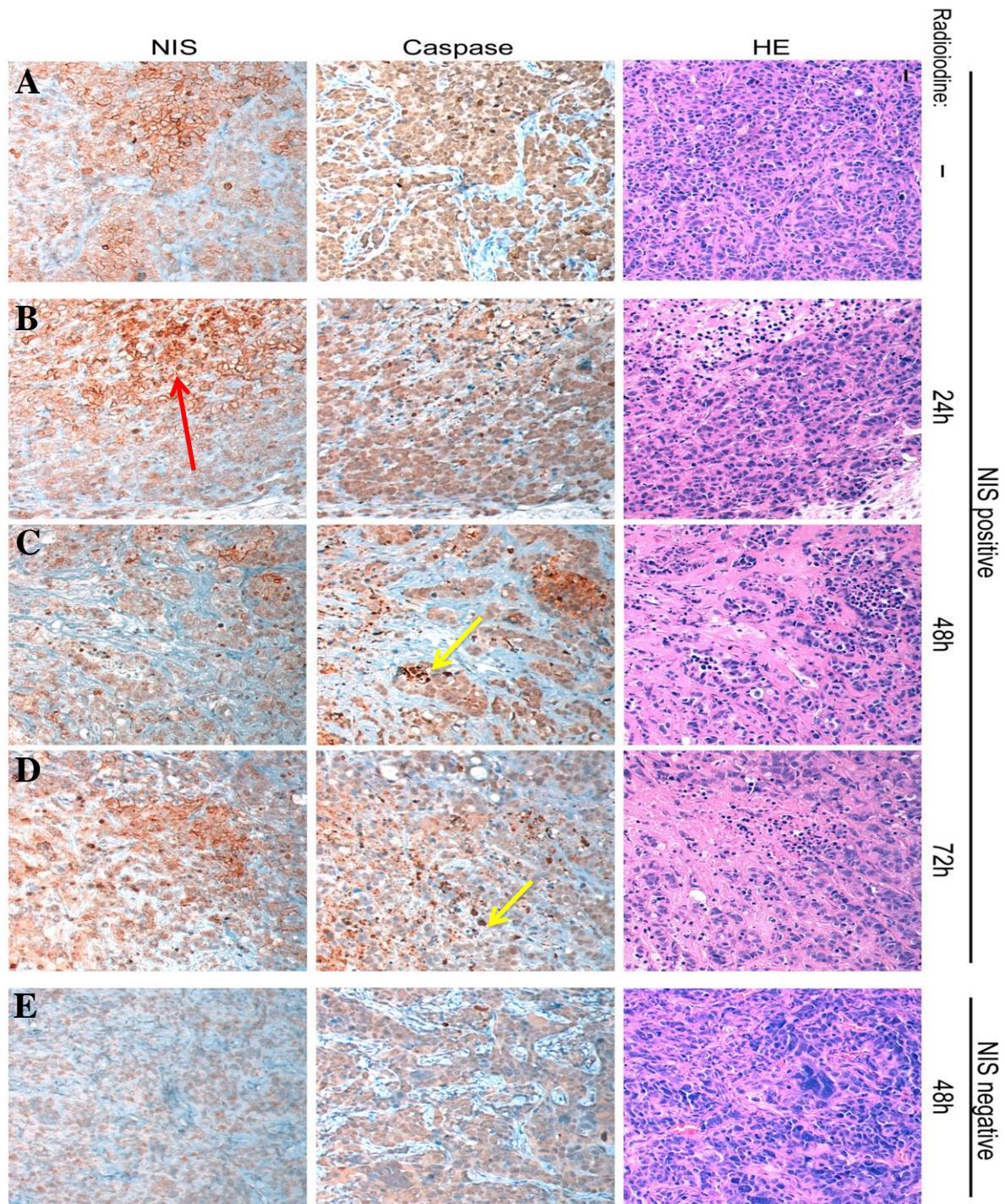


[Abb. 22] Darstellung der NIS-Expression in nativen und NIS-positiven MCF-7 Tumoren. Zellkerne sind in der HE-Färbung blau, NIS-exprimierende Areale in IHC-Färbung stark braun dargestellt. **A und B:** HE- und NIS-Färbung eines nativen MCF-7 Tumors. **C und D:** HE- und NIS-Färbung eines NIS-positiven MCF-7 Tumors. Im Vergleich zeigten NIS-positive MCF-7 Tumoren eine großflächige und membranöse NIS-Expression (Abb. 22D), die nativen MCF-7 Tumoren hingegen zeigten keinerlei spezifische Membrananfärbung. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolek zur Verfügung gestellt

In der HE-Färbung zeigten sich keine Unterschiede zwischen nativen und NIS-positiven MCF-7 Tumoren. Der Nachweis der unterschiedlich starken NIS-Expression in nativen und NIS-positiven MCF-7 Tumoren wurde durch IHC-Färbung erbracht. NIS-positive MCF-7 Tumoren zeigten eine großflächige und membranöse NIS-Expression (Abb. 22D), die nativen MCF-7 Tumoren hingegen zeigten keinerlei spezifische Membrananfärbung (Abb. 22B).

Zusammenfassend präsentierten, wie erwartet und bereits auf Seite 57 erläutert, die NIS-positiven MCF-7 Tumoren eine stärkere NIS-Expression als vergleichbare NIS-positiven HT-29 Tumoren. Vergleiche hierzu Abbildung 21D und Abbildung 22D.

#### 4.1.2.2 Histologische Darstellung der Therapieeffekte



[Abb. 23] Histologische Darstellung der Apoptoseinduktion nach Radiojodapplikation. **A:** NIS-positiver MCF-7 Tumor ohne Therapie. **B bis D:** Zur Validierung des Radiojodeffektes wurden Tumorxenograftmäuse, die einen NIS-positiven MCF7-

Tumoren trugen, mit jeweils 65 MBq I131 behandelt (Intraperitoneale Injektion). **B:** 24h **C:** 48h und **D:** 72h nach Radiojodtherapie wurden die Tiere euthanasiert und der Tumor zur histologischen Aufarbeitung entnommen. **E:** Als Kontrolltumoren wurden parallel dazu NIS-negative Schilddrüsenkarzinome (ML-1) mit Radiojod behandelt. Die Tiere wurden zu gleichen Zeitpunkten euthanasiert und die Tumoren histologisch aufgearbeitet. Die NIS-Färbung konnte NIS-positive Zellpopulationen innerhalb der Tumormasse von MCF7-Tumoren identifizieren (hellbraune Areale, roter Pfeil). Die parallel dazu durchgeführte Apoptosefärbung (Caspase) zeigt, dass 48h nach Radiojodgabe die Apoptose in den NIS-positiven Arealen am stärksten induziert wurde (dunkelbraune Zellen, gelber Pfeil). Der Kontrolltumor ML-1 dagegen zeigt keine NIS-abhängige Apoptoseinduktion. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziol zur Verfügung gestellt.

Der Therapieeffekt der Radiojodtherapie ließ sich mittels HE-Färbung, IHC-Färbung sowie einer spezifischen Apoptosefärbung (Caspase) nachweisen. NIS-positive MCF-7 Tumoren, die keine Radiojodtherapie erhielten, zeigten eine ähnliche Apoptoserate wie NIS-positive MCF-7 Tumoren 24h nach Radiojodgabe. 48h nach Radiojodgabe zeigten die untersuchten MCF-7 Tumoren in Arealen mit hoher NIS-Expression eine verstärkte Apoptose, exemplarisch markiert durch den gelben Pfeil in Abbildung 23C. 72h nach Radiojodgabe hatte die Apoptoserate bereits abgenommen. NIS-negative ML-1 Tumoren zeigten nach Radiojodgabe keine vermehrte Apoptose, da diese keinerlei Radiojod speichern können.

#### **4.1.4 Ergebnisse der diffusionsgewichteten MRT**

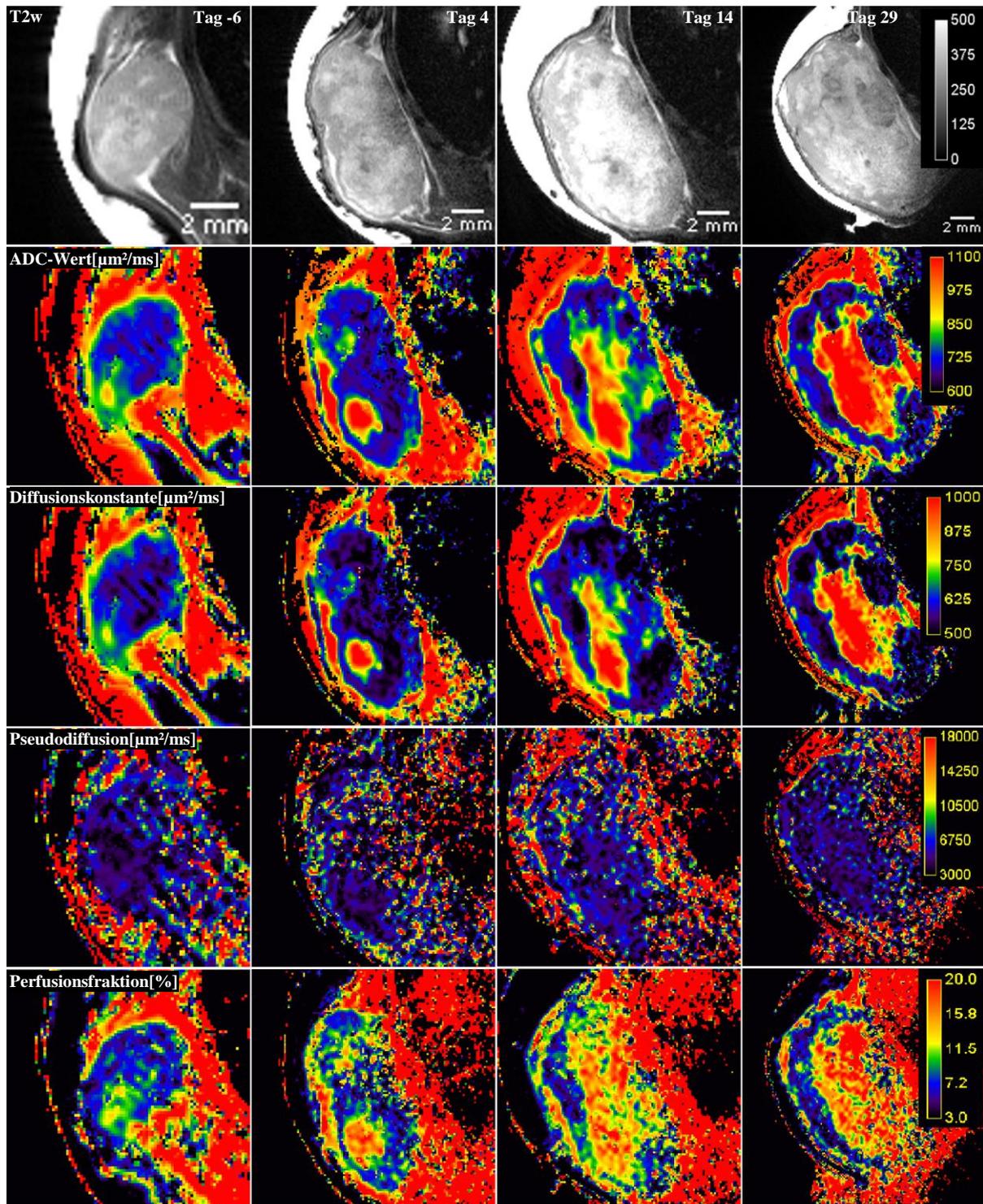
##### 4.1.4.1 Zeitlicher Verlauf der DWI-MRT Parameter bei HT-29 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe

Für zwei native HT-29 Tumoren (7795, 7828) aus der Kontrollgruppe sowie für drei NIS-positive HT-29/hNIS Tumoren (7472, 7473, 7824) aus der Therapiegruppe wurde mittels DWI-MRT der ADC-Wert, die Diffusionskonstante, die Pseudodiffusion sowie die Perfusionsfraktion bestimmt.

Abbildung 24 zeigt den nativen Tumor HT-29 7828 aus der Kontrollgruppe. Die Abbildung enthält ein T2-gewichtetes Bild sowie die Parameterkarten für oben genannte Parameter an den Tagen -6, 4, 14 und 29. Tag 0 markiert den Therapiebeginn. Aus dem Bestreben, die Tumorumfänge zwischen Kontroll- und Therapiegruppe für Tag 0 anzugleichen, ergaben sich für einzelne Messpunkte negative Vorzeichen. Diese Messpunkte lagen die entsprechende Anzahl an Tagen vor angenommenem Therapiebeginn in der Kontrollgruppe und vor realem Therapiebeginn in der Therapiegruppe. Die Kontrollgruppe zeigte eine kontinuierliche Zunahme des Tumorumfanges. Zentrale Tumornekrosen waren in den T2-gewichteten Bildern schwer abgrenzbar. Auf den Parameterkarten von ADC-Wert und Diffusionskonstante zeigte sich im Verlauf ein Fortschreiten der zentralen Nekrose, die sich durch zunehmende Areale hoher ADC-Werte abgrenzen ließ. Gleichzeitig kam es zu einem Abfall des ADC-Wertes im Randbereich. Die Werte der Diffusionskonstanten verhielten sich hierzu analog. Auf den Parameterkarten der Pseudodiffusion war keine zentrale Nekrose abgrenzbar. Die Perfusionsfraktion zeigte ebenfalls hohe Werte in den nekrotischen Arealen.

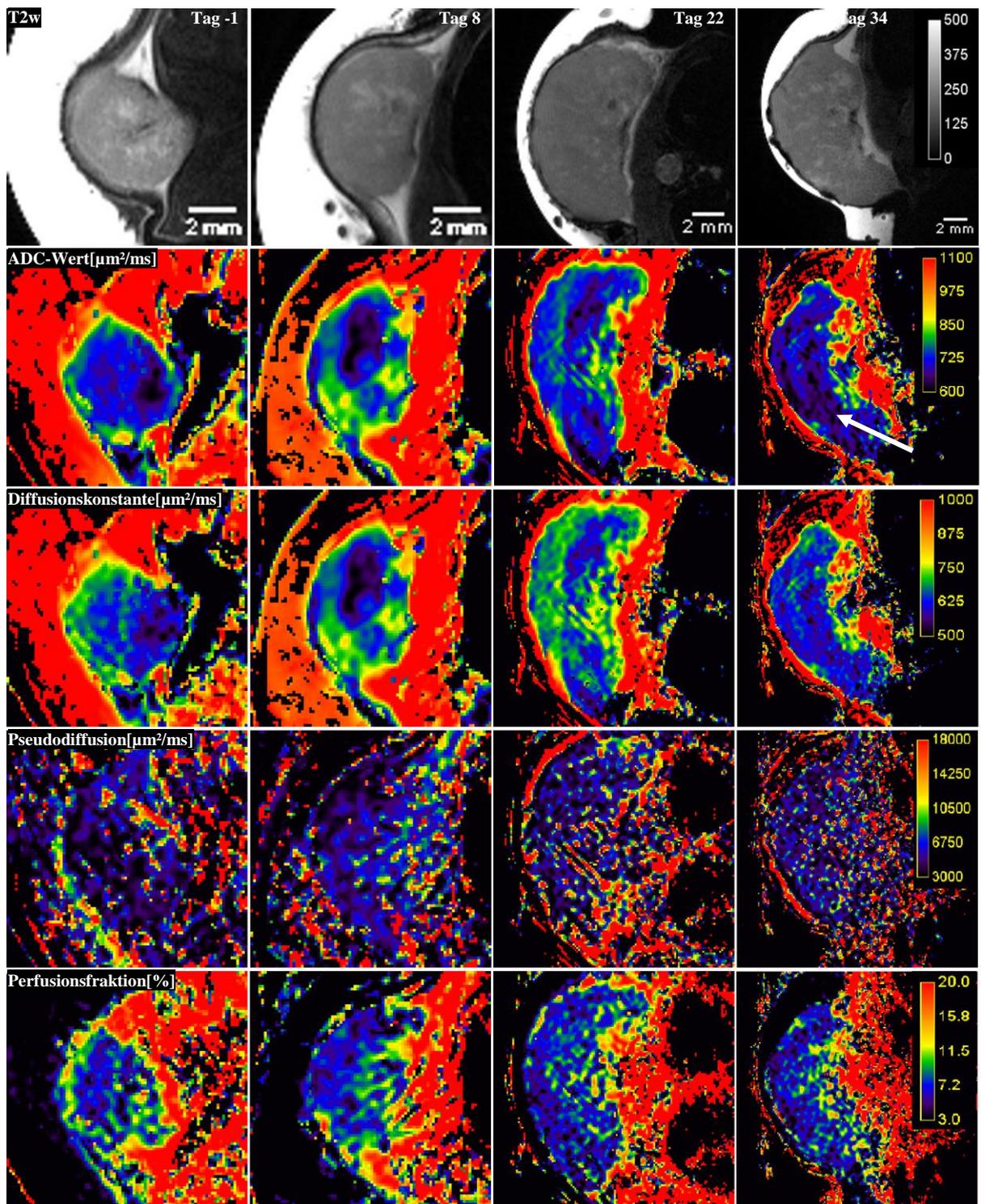
Analog zu Abbildung 24 zeigt Abbildung 25 den NIS-positiven HT-29/hNIS Tumor 7472 aus der Therapiegruppe. Die Messpunkte lagen hier an Tag -1, 8, 22 und 34. Die Therapiegruppe zeigte eine kontinuierliche, wenn auch langsamere Zunahme des Tumorumfanges. In den T2-gewichteten Bildern waren die zentralen Tumornekrosen nicht abgrenzbar. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigte sich in diesem Beispiel keine zentrale Nekrose. Die Tumorumfänge mit niedrigen ADC-Werten schienen im Verlauf zuzunehmen, wohingegen sich Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion konstant verhielten.

Parameterkarten eines nativen HT-29 Tumors aus der Kontrollgruppe



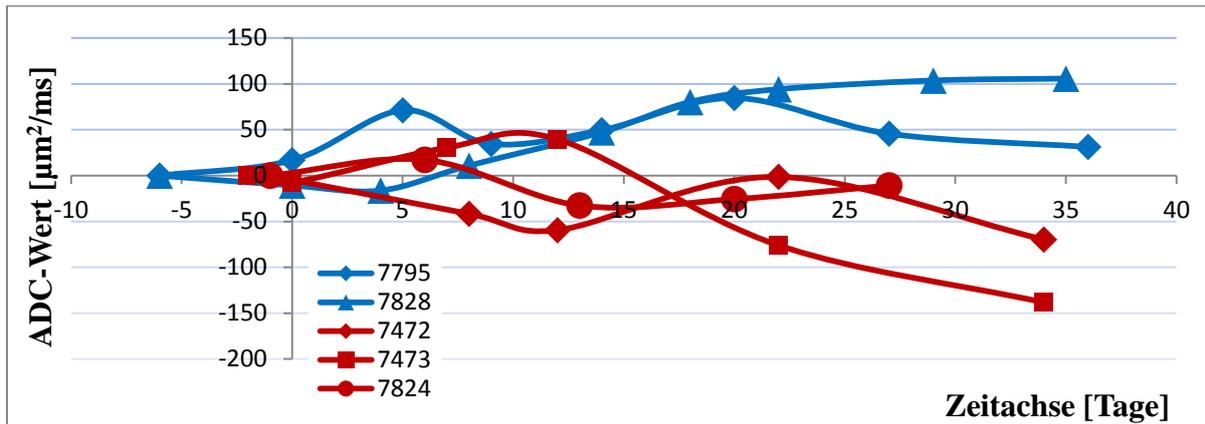
[Abb. 24] **Zeile 1:** T2-gewichtetes Bild des nativen HT-29 Tumors 7828 aus der Kontrollgruppe **Zeile 2-5:** Parameterkarten von ADC-Wert, Diffusionskonstante, Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion. **Reihe 1-4:** Parameterkarten entsprechender Parameter an Tag -6, 4, 14 und 29. In den T2-gewichteten Bildern waren die zentralen Tumornekrosen nicht eindeutig abgrenzbar. Der ADC-Wert sowie die Diffusionskonstante zeigten im Verlauf ein Fortschreiten der zentralen Nekrosen, die sich durch Areale hoher Werte abgrenzen ließen. Mittels Pseudodiffusion waren die zentralen Nekrosen nicht abzugrenzen. Die Perfusionsfraktion zeigte hohe Werte in den nekrotischen Arealen.

## Parameterkarten eines HT-29/hNIS Tumors aus der Therapiegruppe



[Abb. 25]. **Zeile 1:** T2-gewichtetes Bild des HT-29/hNIS Tumors 7472 aus der Therapiegruppe. **Zeile 2-5:** Parameterkarten von ADC-Wert, Diffusionskonstante, Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion. **Reihe 1-4:** Parameterkarten der entsprechenden Parameter an Tag -1, 8, 22 und 34. Zentrale Nekrosen waren in den T2-gewichteten Bildern nicht abgrenzbar. An Tag 8 und 22 zeigte sich ein angeedeuteter Anstieg von ADC-Werten und Diffusionskonstante. An Tag 34 zeigten Großteile des Tumors wieder niedrige ADC-Werte (weißer Pfeil). Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion verhielten sich konstant.

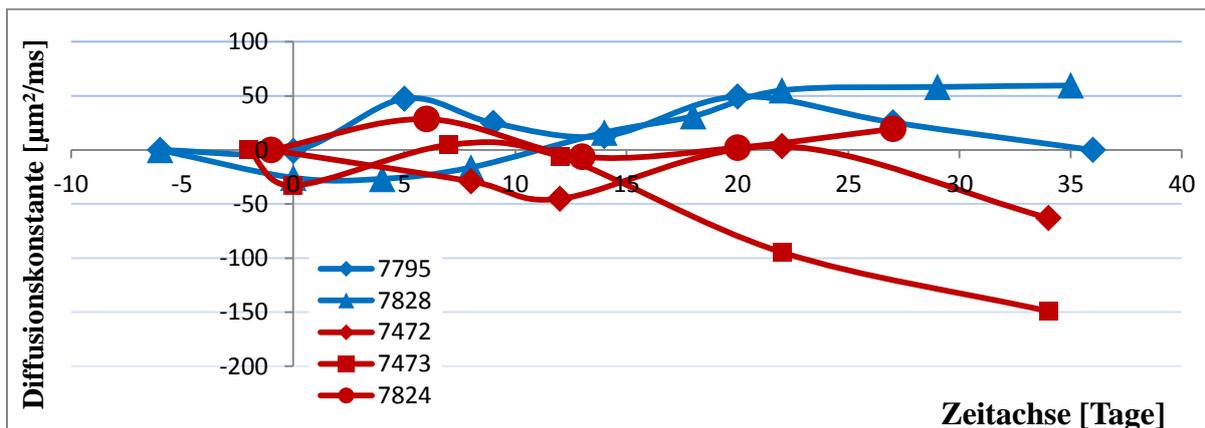
## ADC-Wert



[Abb. 26] Relative Änderung des ADC-Wertes bei nativen und HT-29h/NIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn, Messpunkte vor Therapiebeginn liegen im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mausekennziffern aufgetragen. Unter Schwankungen zeigten die nativen Tumoren der Kontrollgruppe einen Anstieg der ADC-Werte. Dies ist am ehesten durch ausgedehnte zentrale Nekrosen zu erklären. Die HT-29h/NIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten unter Schwankungen einen stetigen Abfall des ADC-Wertes für die Tumoren 7473 und 7472 und einen relativ konstanten Verlauf für 7824.

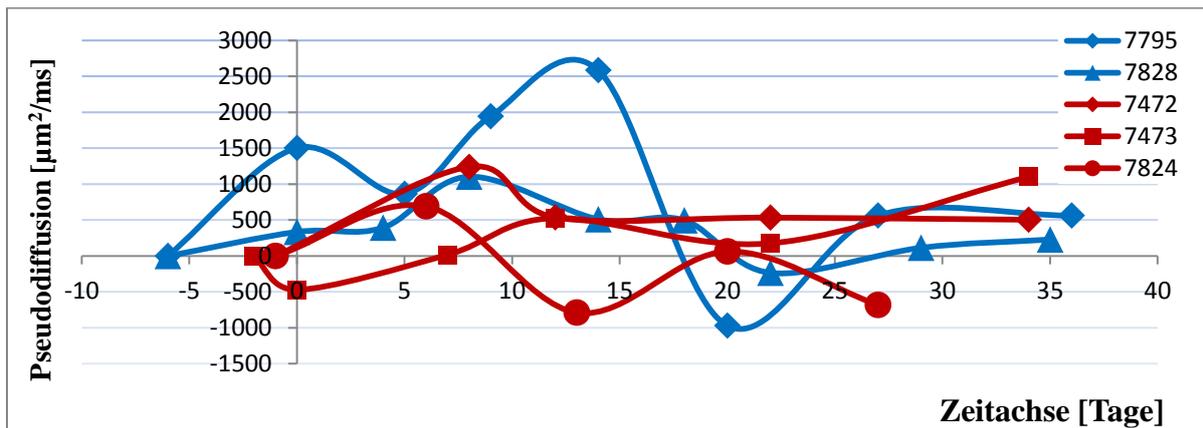
Die nativen HT-29 Kontrolltumoren zeigten im Gesamtbild eine stetige Erhöhung des ADC-Wertes. Im Gegensatz hierzu kam es bei den HT-29h/NIS Tumoren 7473 und 7472 der Therapiegruppe- mit Ausnahme eines kurzzeitigen Anstiegs zwischen Tag 5 und 15- zu einem stetigen Abfall des ADC-Wertes. Einzig der HT-29h/NIS Tumor 7824 zeigte einen relativ konstanten Verlauf. Der Verlauf der Diffusionskonstanten verhielt sich analog zum ADC-Wert.

## Diffusionskonstante (D)



[Abb. 27] Relative Änderung der Diffusionskonstanten bei nativen und HT-29h/NIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn, die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mausekennziffern aufgetragen. Die Diffusionskonstante verhielt sich analog zum ADC-Wert.

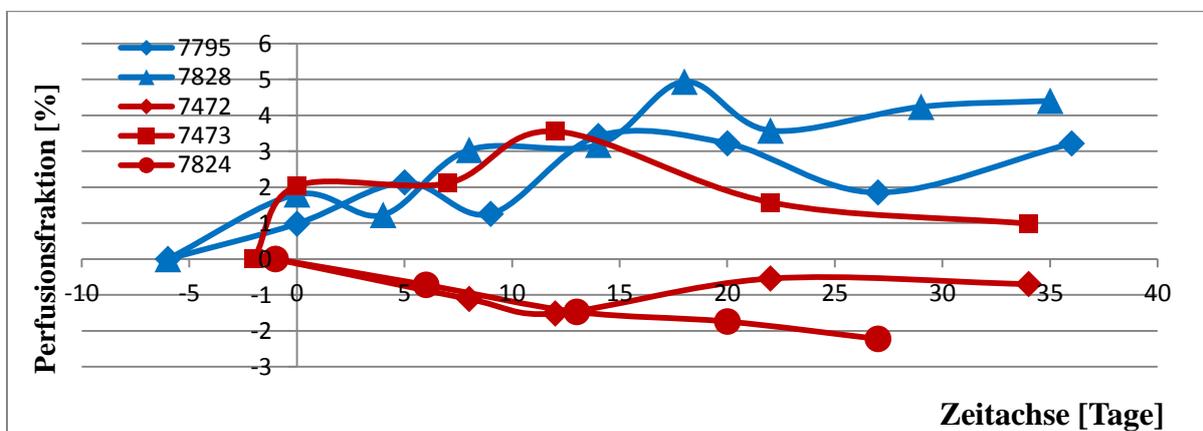
## Pseudodiffusion ( $D^*$ )



[Abb. 28] Relative Änderung der Pseudodiffusion bei nativen und HT-29h/NIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe.

Die Pseudodiffusion zeigte keine Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe nativer HT-29 Tumoren stieg die Perfusionsfraktion unter Schwankungen stetig an. Die HT-29h/NIS Tumoren 7472 und 7824 der Therapiegruppe zeigten einen Abfall der Perfusionsfraktion. Der HT-29h/NIS Tumor 7473 zeigte einen abweichenden Verlauf, mit Anfangs steigenden und später fallenden Werten.

## Perfusionsfraktion (f)



[Abb. 29] Relative Änderung der Perfusionsfraktion bei nativen und HT-29h/NIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Die nativen HT-29 Tumoren der Kontrollgruppe zeigten einen stetigen Anstieg der Werte. Die HT-29h/NIS Tumoren 7472 und 7824 der Therapiegruppe hingegen zeigten einen Abfall der Perfusionsfraktion. Der Werte des HT-29h/NIS Tumor 7473 verliefen abweichend, mit anfangs steigenden und später fallenden Werten.

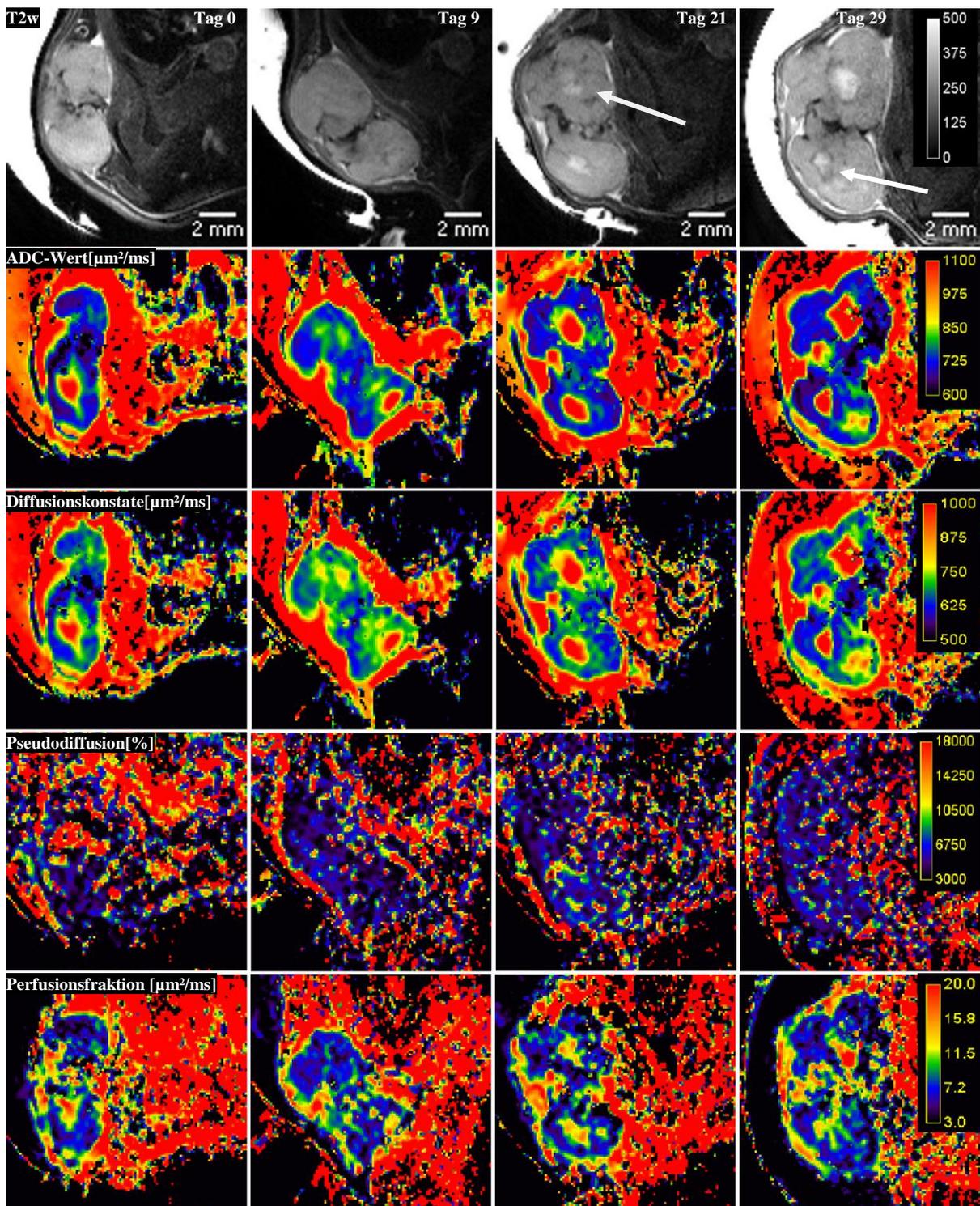
#### 4.1.4.2 Zeitlicher Verlauf der DWI-MRT Parameter bei MCF-7 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe

Für zwei native MCF-7 Tumoren (6301, 7782) aus der Kontrollgruppe sowie für zwei NIS-positive MCF-7h/NIS Tumoren (6308, 7846) aus der Therapiegruppe wurde mittels DWI-MRT der ADC-Wert, die Diffusionskonstante, die Pseudodiffusion sowie die Perfusionsfraktion bestimmt.

Abbildung 30 zeigt den Tumor nativen MCF-7 7782 aus der Kontrollgruppe. Die Abbildung enthält T2-gewichtete Bilder sowie die Parameterkarten für oben genannte Parameter an den Tagen 0, 9, 21 und 29. Tag 0 markiert den Therapiebeginn. Analog zum Vorgehen bei den HT-29 Tumoren besitzen Messpunkte vor Therapiebeginn negative Vorzeichen. Die Kontrollgruppe zeigte eine kontinuierliche Zunahme des Tumolvolumens. In den T2-gewichteten Bildern waren die zentralen Tumornekrosen besser abgrenzbar als im Beispiel des nativen MCF-7 Tumor aus Abbildung 24. Die Parameterkarten von ADC-Wert und Diffusionskonstante zeigten übereinstimmend konstante Areale hoher ADC-Werte, die den zentralen Nekrosen entsprachen. Auf der Parameterkarte der Pseudodiffusion waren keine Nekrosezonen abgrenzbar. Die Parameterkarten der Perfusionsfraktion wiesen in den nekrotischen Arealen ebenfalls hohe Werte auf.

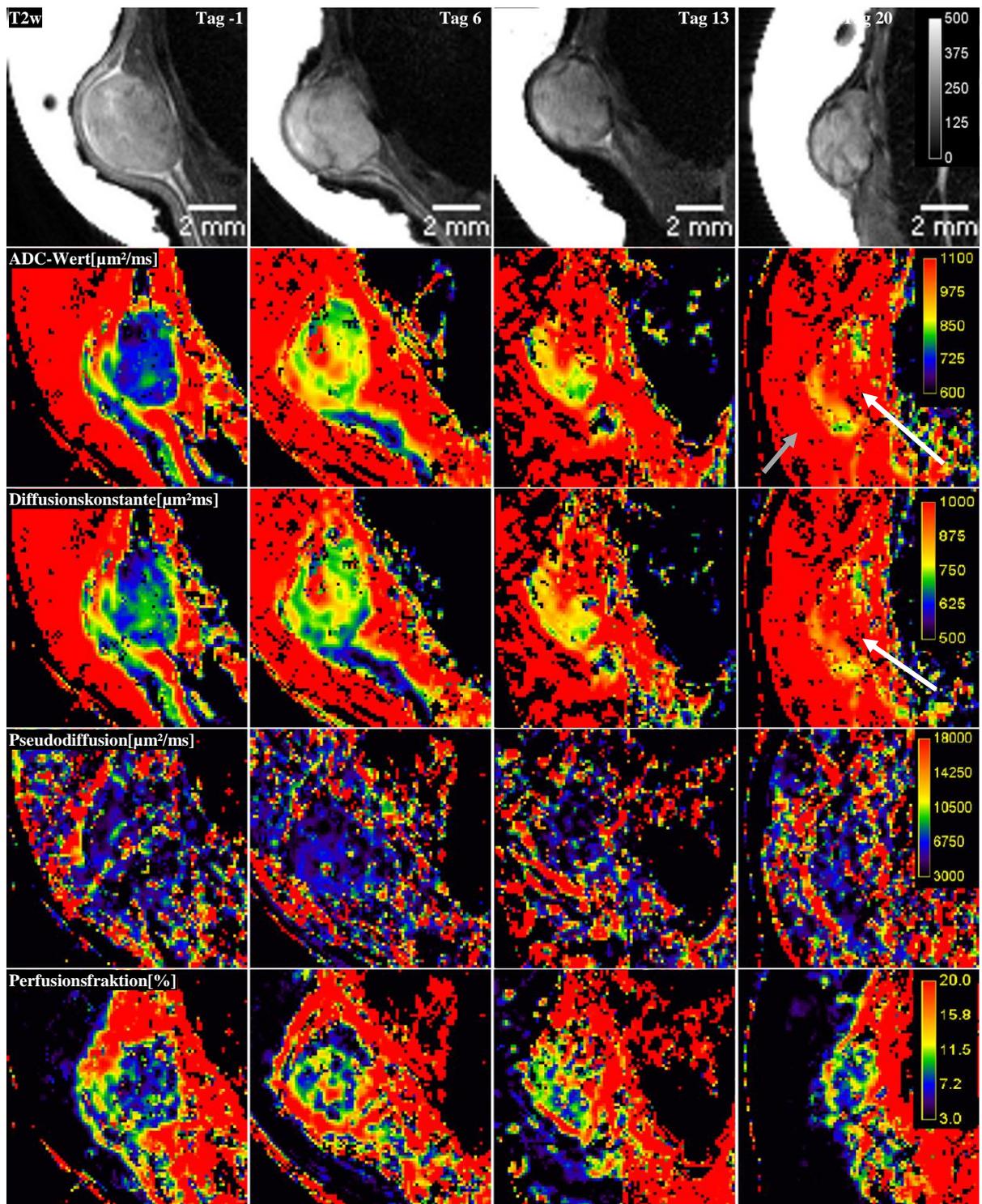
Abbildung 31 zeigt den MCF-7h/NIS Tumor 6308 aus der Therapiegruppe. Die Messpunkte lagen an Tag -1, 6, 13 und 21. In den T2-gewichteten Aufnahmen zeigte sich ein fortschreitender Zerfall von Tumorgewebe, der sich in einer deutlichen Reduktion des Tumolvolumens äußerte. Dementsprechend zeigten die Parameterkarten von ADC-Wert und Diffusionskonstante einen Anstieg der Werte, mit den jeweils höchsten Werten gegen Therapieende. Die Abgrenzbarkeit des Tumors wurde zunehmend schwieriger und war an Tag 20 nur noch rudimentär möglich. Die hohen ADC-Werte des Ultraschallgels wirkten unter diesen Umständen erschwerend. Die Parameterkarten von Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion ließen keine eindeutige Verlaufsbeurteilung zu.

Parameterkarten eines nativen MCF-7 Tumors aus der Kontrollgruppe



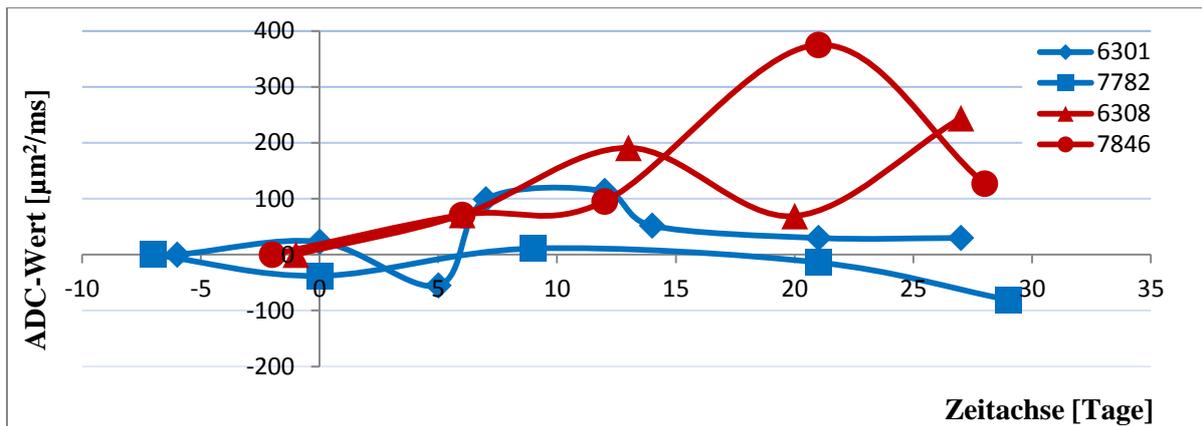
[Abb. 30] **Zeile 1:** T2-gewichtetes Bild des nativen MCF-7 Tumors 7782 aus der Kontrollgruppe. **Zeile 2-5:** Parameterkarten von ADC-Wert, Diffusionskonstante, Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion. **Reihe 1-4:** Parameterkarten der entsprechenden Parameter an Tag 0, 9, 21 und 29. In den T2-gewichteten Bildern waren die zentralen Tumornekrosen teilweise abgrenzbar (weiße Pfeile). Im zeitlichen Verlauf imponierten die Areale hoher ADC-Werte konstant. Die Werte der Diffusionskonstanten verhielten sich analog. Mittels Pseudodiffusion war keine zentrale Nekrose abgrenzbar. Die Perfusionsfraktion zeigte erhöhte Werte in den nekrotischen Arealen.

## Parameterkarten der MCF-7h/NIS Tumoren aus der Therapiegruppe



[Abb. 31] **Zeile 1:** T2-gewichtetes Bild des MCF-7h/NIS Tumors 6308 aus der Therapiegruppe. **Zeile 2-5:** Parameterkarten von ADC-Wert, Diffusionskonstante, Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion. **Reihe 1-4:** Parameterkarten der entsprechenden Parameter an Tag -1, 6, 13 und 21. Der fortschreitende Zerfall von Tumorgewebe zeigte sich bereits in den T2-gewichteten Aufnahmen deutlich. Im Verlauf kam es zu einem Anstieg des ADC-Wertes und der Diffusionskonstanten, mit den höchsten Werten gegen Therapieende. An Tag 20 ließ sich der Tumor nur noch rudimentär gegen die Umgebung abgrenzen (weiße Pfeile), dabei wirkten die hohen ADC-Werte des Ultraschallgels zusätzlich erschwerend (grauer Pfeil). Pseudodiffusion und Perfusionsfraktion erlaubten bildmorphologisch keine sichere Interpretation.

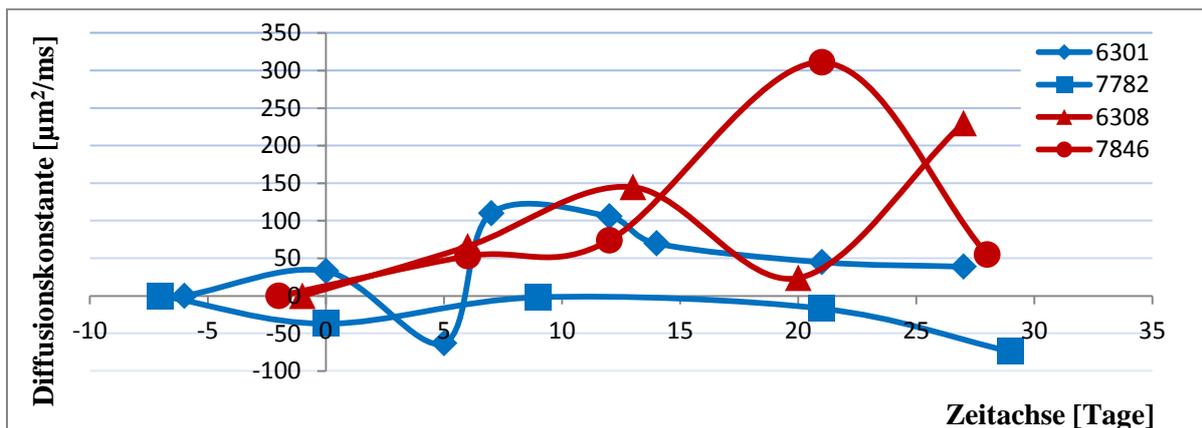
## ADC-Wert



[Abb. 32] Relative Änderung des ADC-Wertes bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn, Messpunkte vor Therapiebeginn liegen im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskezziffern aufgetragen. Die nativen MCF-7 Kontrolltumoren zeigten im Gesamtbild einen relativ konstanten Verlauf des ADC-Wertes. Im Gegensatz dazu zeigten die MCF-7h/NIS Tumoren der Therapiegruppe einen stetigen Anstieg des ADC-Wertes. Auffallende Ausnahme war die letzten Messung des MCF-7/hNIS Tumors 7846 an Tag 28. Die höchsten Werte ergaben sich an Tag 21 für Tumor 7846 und an Tag 27 für Tumor 6308.

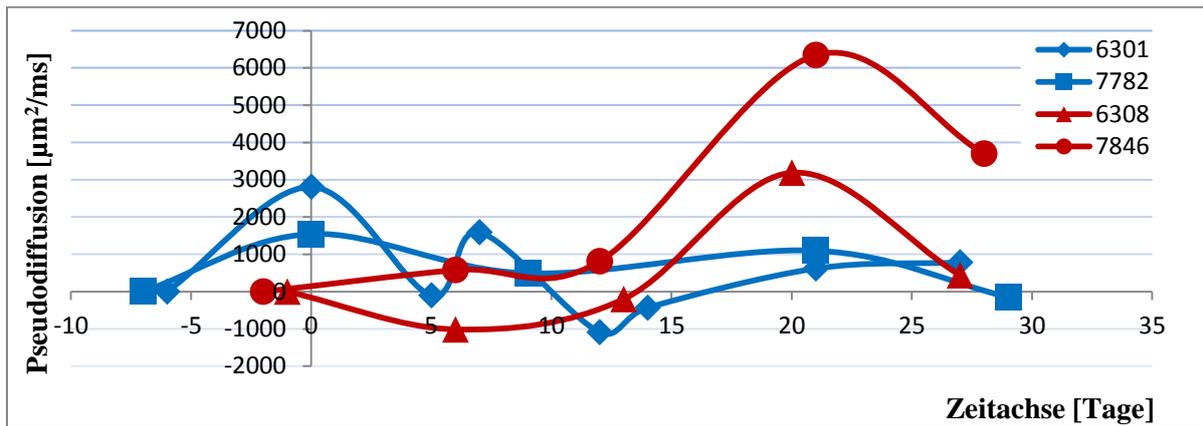
Die nativen MCF-7 Kontrolltumoren zeigten im Gesamtbild einen relativ konstanten Verlauf des ADC-Wertes. Im Gegensatz dazu zeigten die MCF-7h/NIS Tumoren der Therapiegruppe einen stetigen Anstieg des ADC-Wertes. Als Ausnahme ist hierbei die letzte Messung des MCF-7/hNIS Tumors 7846 an Tag 28 zu nennen. Die höchsten Werte ergaben sich an Tag 21 für Tumor 7846 und an Tag 28 für Tumor 6308. Die Diffusionskonstante verhielt sich analog zum ADC-Wert.

## Diffusionskonstante (D)



[Abb. 33]. Relative Änderung der Diffusionskonstanten bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn, die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskezziffern aufgetragen. Die Kurven illustrieren die Änderung der Diffusionskonstanten in Bezug auf den Ausgangswert über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen. Die Diffusionskonstante verhielt sich analog zum ADC-Wert.

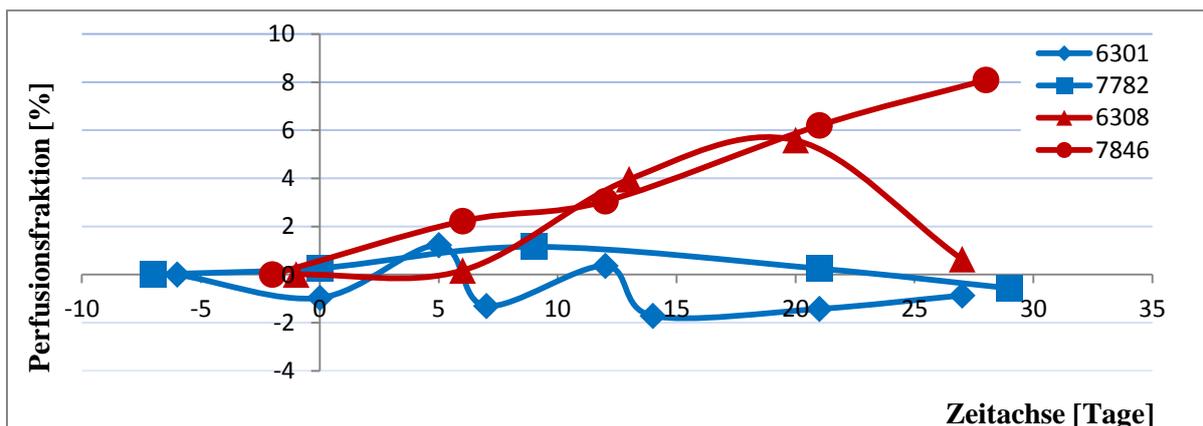
### Pseudoperfusion ( $D^*$ )



[Abb. 34] Relative Änderung der Pseudodiffusion bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskennciffern aufgetragen. Die Pseudodiffusion zeigte bis Tag 13 keine wesentlichen Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die MCF-7/hNIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten an Tag 20 bzw. 21 einen kurzzeitigen Werteanstieg, gefolgt von einem Abfall der Werte an Tag 27 bzw. 28.

Bezüglich der Pseudodiffusion ergaben sich bis Tag 13 keine wesentlichen Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die MCF-7/hNIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten an Tag 20 bzw. 21 einen kurzzeitigen Werteanstieg, gefolgt von einem Abfall der Werte an Tag 27 bzw. 28. Die Perfusionsfraktion zeigte analog zu ADC-Wert und Diffusionskonstanten einen stetigen Anstieg der Werte. Einzige Ausnahme war die letzte Messung des MCF-7/hNIS Tumors 6308 an Tag 27.

### Perfusionsfraktion ( $f$ )



[Abb. 35] Relative Änderung der Pseudodiffusion bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskennciffern aufgetragen. Die Perfusionsfraktion verhielt sich analog zum ADC-Wert und der Diffusionskonstanten. Einzige Ausnahme bildete die letzte Messung des MCF-7/hNIS Tumors 6308 an Tag 27.

## 4.1.5 Ergebnisse der dynamischen kontrastmittelverstärkten MRT

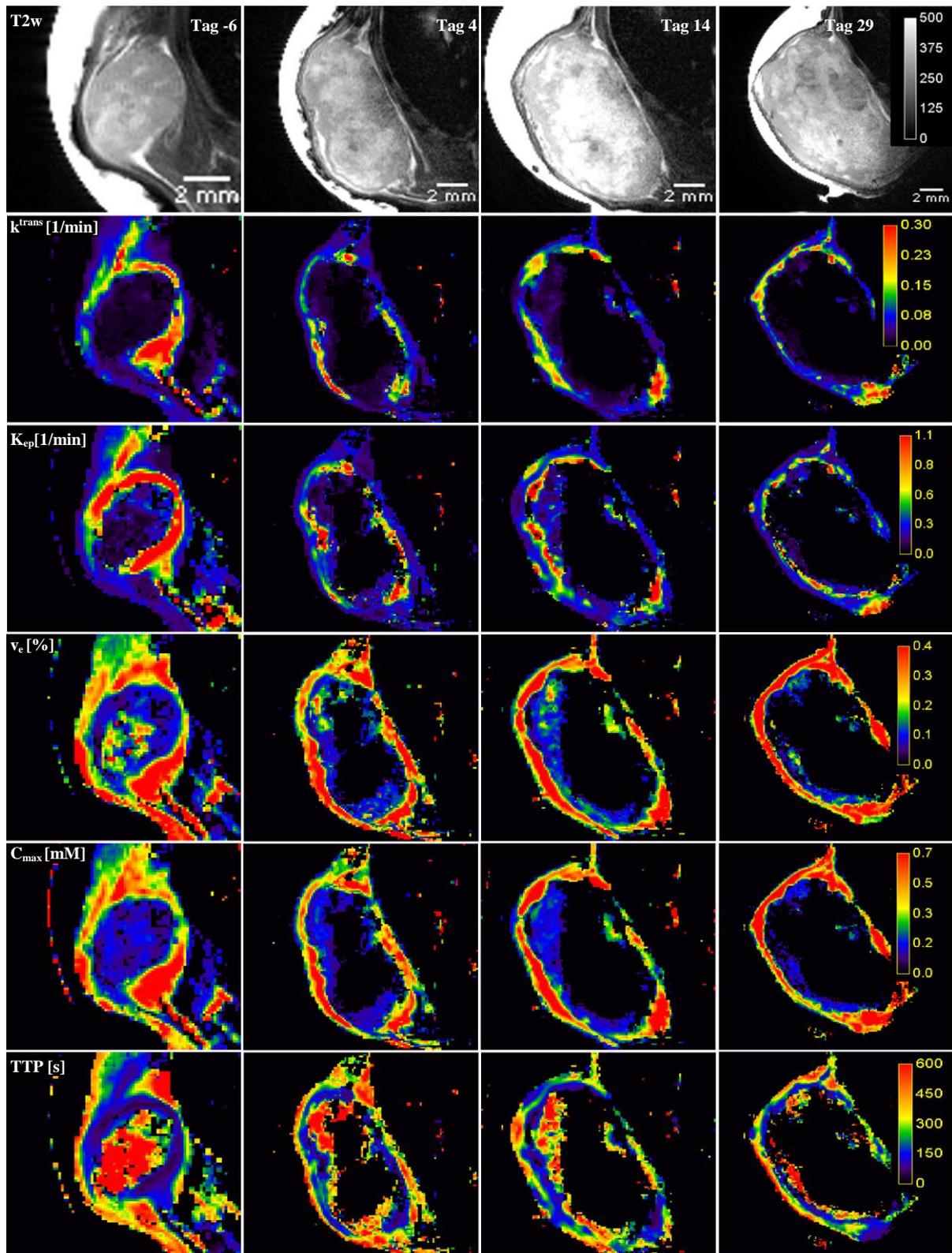
### 4.1.5.1 Zeitlicher Verlauf der DCE-MRT Parameter bei HT-29 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe

Für zwei native HT-29 Tumoren (7795, 7828) aus der Kontrollgruppe sowie für drei NIS-positive HT-29/hNIS Tumoren (7472, 7473, 7824) aus der Therapiegruppe wurden mittels DCE-MRT die Parameter *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ), das Leckagevolumen ( $v_e$ ), die maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie die *time to peak* (TTP) bestimmt.

Abbildung 36 zeigt den nativen HT-29 Tumor 7828 aus der Kontrollgruppe. Die Abbildung enthält ein T2-gewichtetes Bild sowie die entsprechenden Parameterkarten an den Tagen -6, 4, 14 und 29. Die Messpunkte vor Therapiebeginn haben ein negatives Vorzeichen. Die T2-gewichteten Bilder zeigen entsprechend Abb. 24 eine Größenzunahme des Tumors. Zentrale Tumornekrosen waren in den T2-gewichteten Bildern schwer abgrenzbar. Die Parameterkarten von  $k^{\text{trans}}$  und  $K_{\text{ep}}$  zeigten hohe Werte am Tumorrand. Die reduzierte Kontrastmittelaufnahme im Tumorzentrum erlaubte ab Tag 4 kein Fitting in zentralen Tumorregionen, diese Bereiche verblieben schwarz. Die Parameterkarten von  $v_e$  verhielten sich analog zu  $k^{\text{trans}}$  und  $K_{\text{ep}}$ . Die Parameterkarten für  $C_{\text{max}}$  und TTP zeigten ebenfalls hohe Werte am Tumorrand. An Tag -6 waren die hohen TTP Werte im Tumorzentrum auffällig.

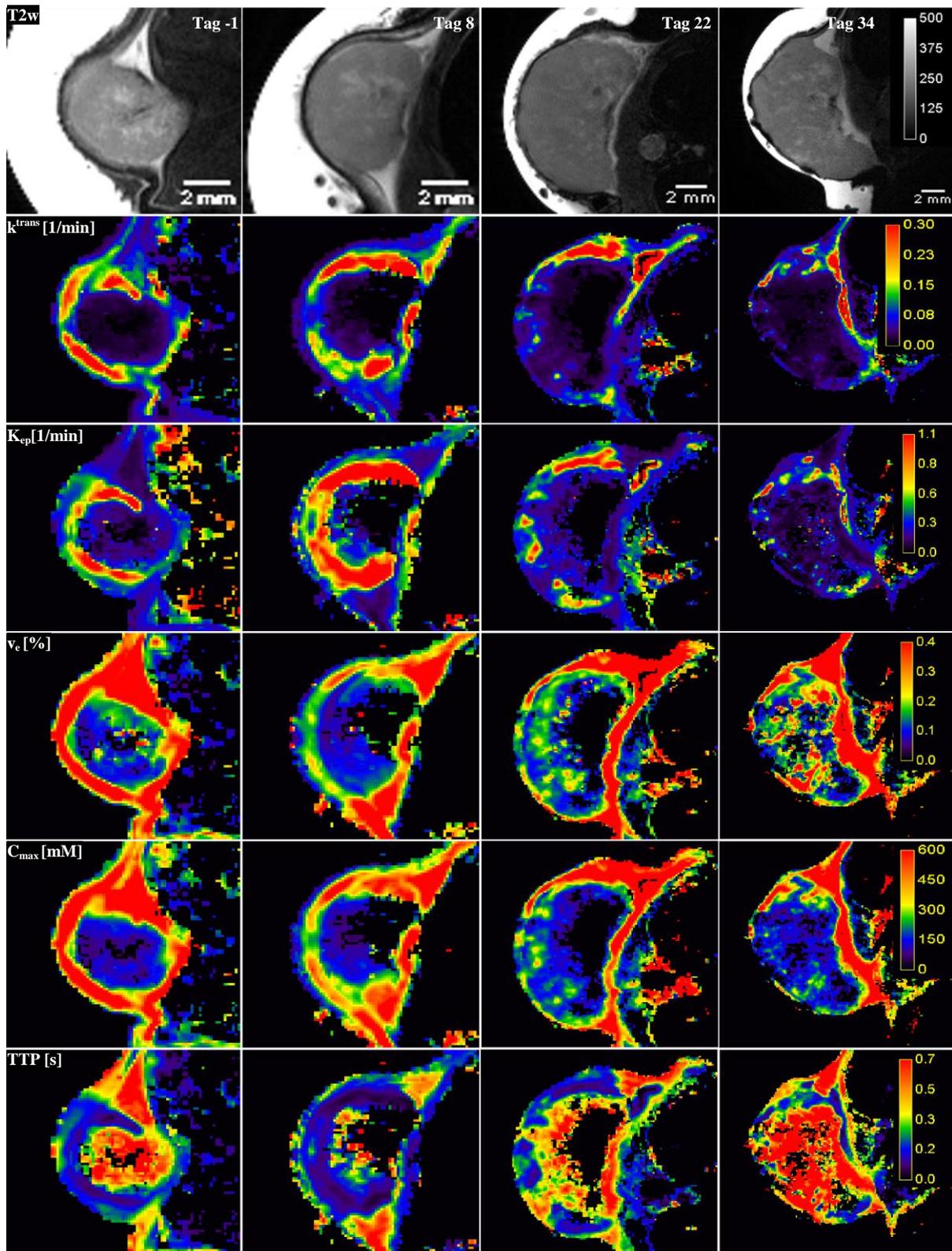
In Abbildung 37 ist der HT-29/hNIS Tumor 7472 aus der Therapiegruppe dargestellt. Die Messpunkte lagen an Tag -1, 8, 22 und 34. Die T2-gewichteten Bilder entsprechen jenen aus Abbildung 25 und zeigten keine Nekrosen. Die Parameterkarten von  $k^{\text{trans}}$  und  $K_{\text{ep}}$  zeigten ähnlich der Kontrollgruppe erhöhte Werte am Tumorrand. In den zentralen Tumoranteilen war kein Fitting möglich.  $v_e$  zeigte hohe Werte am Tumorrand und fokale erhöhte Werte im Tumorzentrum. Die Parameterkarten für  $C_{\text{max}}$  zeigten hohe Werte am Tumorrand und ebenfalls fokale erhöhte Werte im Tumorzentrum. Die TTP zeigte erhöhte Werte im Tumorzentrum, bei niedrigeren Werten am Tumorrand.

Parameterkarten eines nativen HT-29 Tumors aus der Kontrollgruppe



[Abb. 36] Zeile 1: T2-gewichtetes Bild des nativen HT-29 Tumors 7828 aus der Kontrollgruppe. Zeile 2-6: Parameterkarten der *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ), *Leckagevolumen* ( $v_e$ ), *maximale Kontrastmittelkonzentration* ( $C_{\text{max}}$ ) sowie *time to peak* (TTP). Reihe 2-6: Parameterkarten der entsprechenden Parameter an Tag -6, 4, 14 und 29. Weiteres siehe \*Ergänzung Abb. 37.

Parameterkarten eines HT-29/hNIS Tumors aus der Therapiegruppe

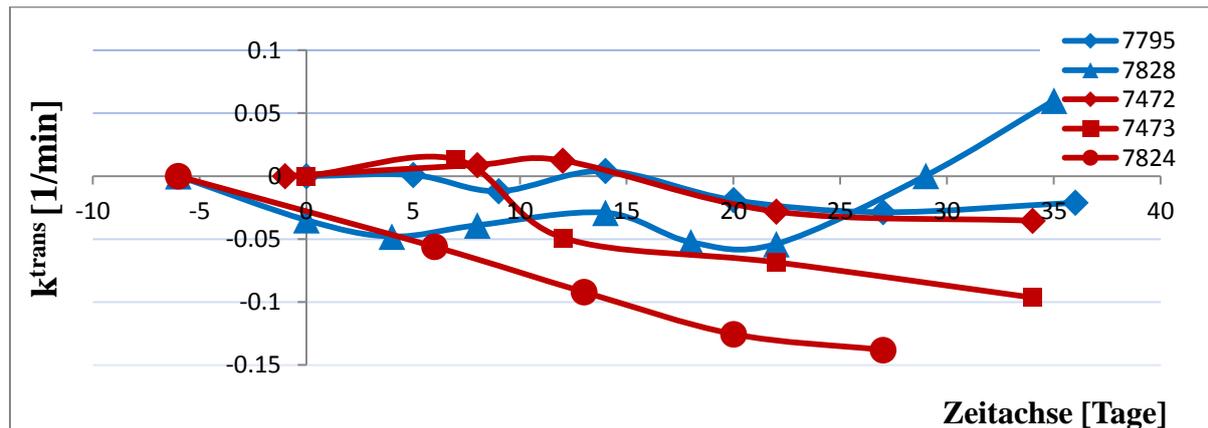


[Abb. 37] Zeile 1: T2-gewichtetes Bild des HT-29h/NIS Tumors 7472 aus Therapiegruppe. Zeile 2-6: Parameterkarten von transfer constant ( $k^{\text{trans}}$ ), rate constant ( $K_{\text{ep}}$ ), Leckagevolumen ( $v_e$ ), maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie time to peak (TTP). Reihe 2-6: Parameterkarten entsprechender Parameter an Tag -1, 8, 22 und 34. Zentrale Tumornekrosen waren in den T2-gewichteten Bildern nicht abgrenzbar. Im Tumorzentrum war teilweise kein Fitting möglich, diese Areale

verblieben schwarz.  $k^{trans}$  und  $K_{ep}$  zeigten hohe Werte am Tumorrand.  $v_e$  zeigte hohe Werte am Tumorrand, bei fokal erhöhten Werten im Tumorzentrum.  $C_{max}$  verhielt sich ähnlich, mit hohen Werten am Tumorrand und punktförmige erhöhten Werten im Tumorzentrum. Die TTP zeigte erhöhte Werte im Tumorzentrum, bei niedrigeren Werten am Tumorrand.

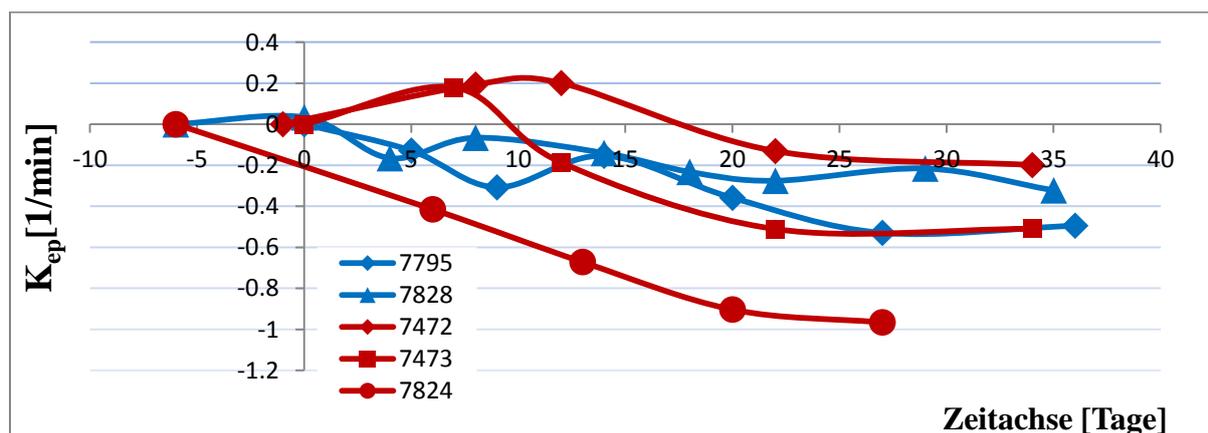
**\*Ergänzung [Abb. 36]** In den T2-gewichteten Bildern waren keine Nekrosen abgrenzbar.  $k^{trans}$  und  $K_{ep}$  zeigten am Tumorrand hohe Werte. Im Tumorzentrum war teilweise kein Fitting möglich, diese Areale verblieben schwarz.  $v_e$ ,  $C_{max}$  und TTP besaßen hohe Werte am Tumorrand und niedrige bzw. fehlende Werte im Tumorzentrum. An Tag -6 waren die hohen TTP Werte im Tumorzentrum auffällig. Dieser Trend schien sich, soweit bei fehlenden Daten in zentralen Tumoranteilen beurteilbar, fortzusetzen.

### Transfer constant ( $k^{trans}$ )



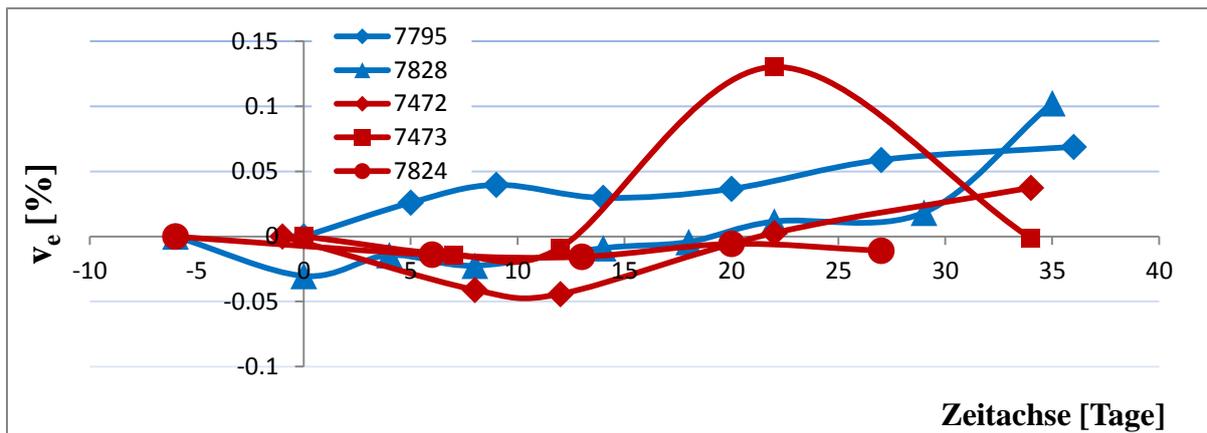
**[Abb. 38]** Relative Änderung der *transfer constant* bei nativen und HT-29/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskennciffern aufgetragen. Der HT-29h/NIS Tumor 7824 aus der Therapiegruppe zeigte als einziger Tumor eine stetige Abnahme von  $k^{trans}$ . Die übrigen Tumoren zeigten relativ konstante Verläufe. Zusammenfassend ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontroll- und Therapiegruppe erkennen.

### Rate constant ( $K_{ep}$ )



**[Abb. 39]** Relative Änderung der *rate constant* bei nativen und HT-29/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskennciffern aufgetragen. Der HT-29h/NIS Tumor 7824 aus der Therapiegruppe zeigte als einziger Tumor eine stetige Abnahme von  $K_{ep}$ . Die übrigen Tumoren zeigten relativ konstante Verläufe. Zusammenfassend ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontroll- und Therapiegruppe erkennen.

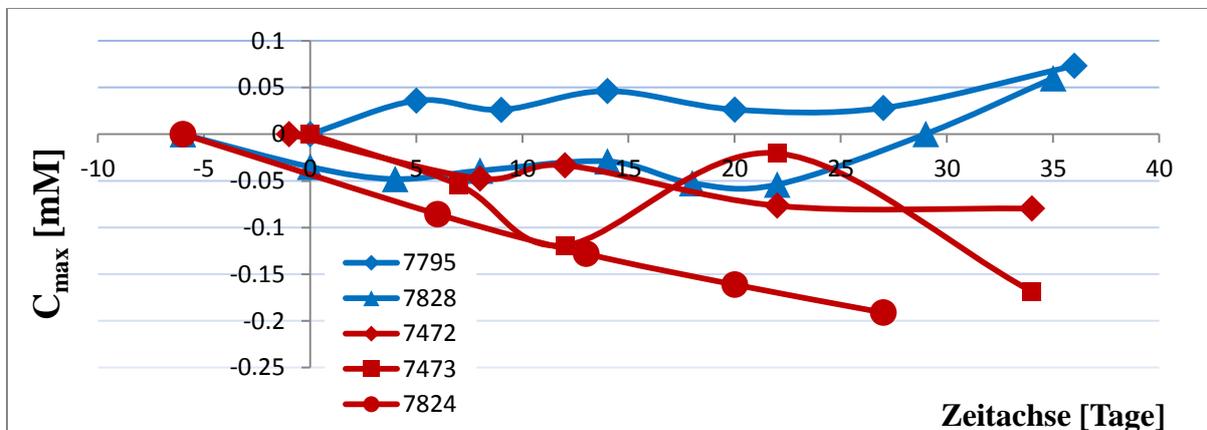
## Leckagevolumen ( $v_e$ )



[Abb. 40] Relative Änderung des Leckagevolumen bei nativen und HT-29/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Zusammenfassend ließen sich keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe erkennen.

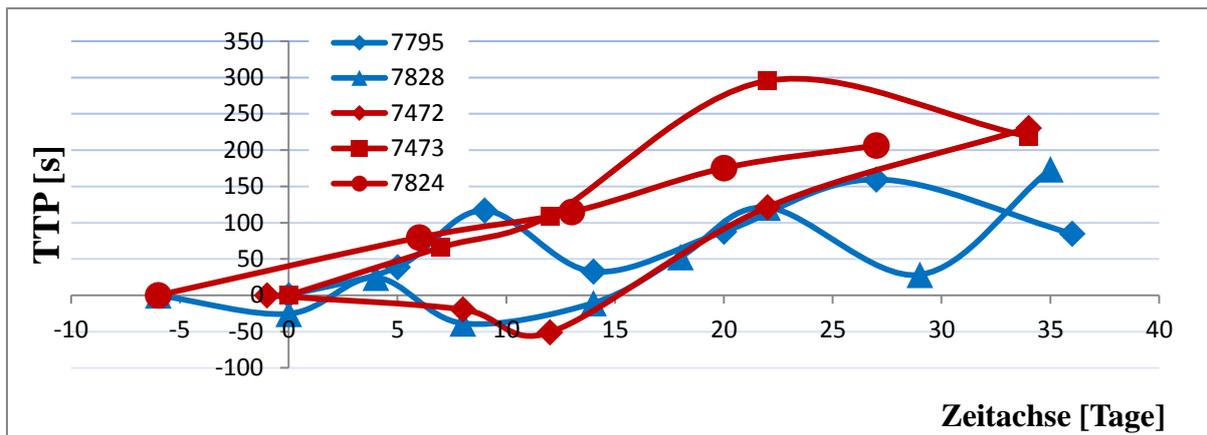
Der HT-29h/NIS Tumor aus der Therapiegruppe zeigte als einziger Tumor eine stetige Abnahme von  $k^{\text{trans}}$  und  $K_{ep}$ , während die übrigen Tumoren konstante Verläufe aufwiesen.  $v_e$  zeigte keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe.

## Maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ )



[Abb. 41] Relative Änderung der maximalen Kontrastmittelkonzentration bei nativen und HT-29/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Die nativen HT-29 Tumoren aus der Kontrollgruppe zeigten relativ konstante Verläufe mit einem Anstieg der Werte ab Tag 28. Die deutlichste Reduktion von  $C_{\text{max}}$  zeigte ebenfalls der HT-29/hNIS Tumor 7824 aus der Therapiegruppe.

### Time to peak (TTP)



[Abb. 42] Relative Änderung der *time to peak* bei nativen und HT-29/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Therapie- und Kontrollgruppe zeigten einen stetigen Anstieg der *time to peak*.

Die nativen HT-29 Tumoren aus der Kontrollgruppe zeigten relativ konstante Verläufe mit einem Anstieg der Werte ab Tag 28. Die deutlichste Reduktion von  $C_{\max}$  zeigte ebenfalls der HT-29/hNIS Tumor 7824 aus der Therapiegruppe. Die TTP zeigte in Kontroll- und Therapiegruppe einen stetigen Anstieg.

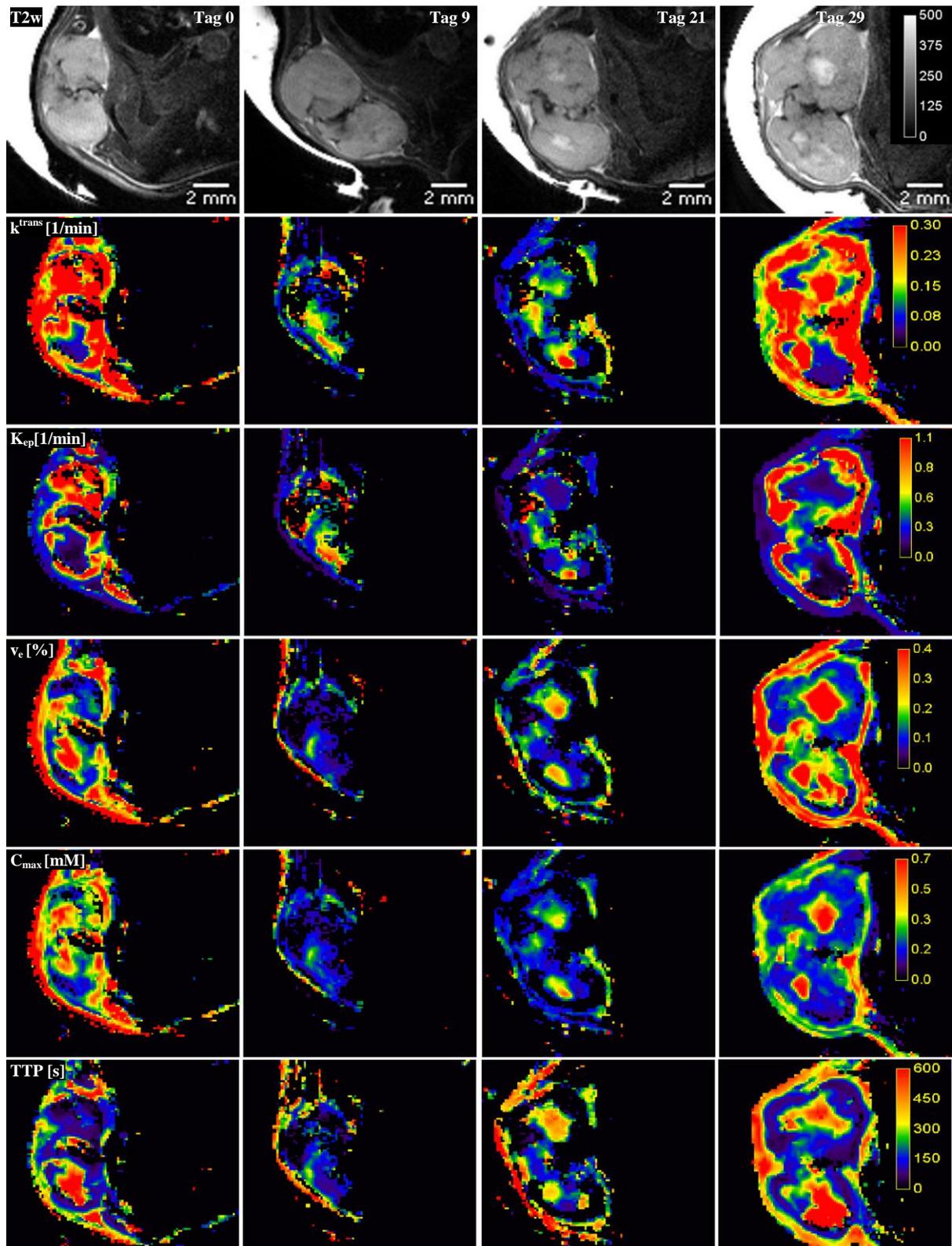
#### 4.1.5.2 Zeitlicher Verlauf der DCE-MRT Parameter bei MCF-7 Tumoren in Kontroll- und Therapiegruppe

Für zwei native MCF-7 Tumoren (6301, 7782) aus der Kontrollgruppe sowie für zwei NIS-positive MCF-7h/NIS Tumoren (6308, 7846) aus der Therapiegruppe wurde mittels DCE-MRT die *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), die *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ), das Leckagevolumen ( $v_e$ ), die maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie die *time to peak* (TTP) bestimmt.

Abbildung 43 zeigt den nativen MCF-7 Tumor 7782 aus der Kontrollgruppe. Die Abbildung enthält T2-gewichtete Bilder sowie Parameterkarten der einzelnen Parameter an den Tagen 0, 9, 21 und 29. Tag 0 markiert den Therapiebeginn. Messpunkte vor Therapiebeginn haben ein negatives Vorzeichen. Die T2-gewichteten Bilder entsprechen jenen aus Abbildung 30. Unter kontinuierlicher Volumenzunahme bildete der Tumor zwei über eine Gewebebrücke verbundene Knoten. Die Parameterkarten von  $k^{\text{trans}}$  und  $K_{\text{ep}}$  zeigten im gesamten Tumor hohe Werte an Tag 0 und 29. An Tag 9 und 21 ließen sich im Randbereich keine Werte erfassen, diese Tumorregionen verblieben schwarz.  $v_e$  zeigte hohe Werte am Rand sowie in nekrotischen Tumorarealen.  $C_{\text{max}}$  und TTP zeigten hohe Werte am Tumorrand sowie in Nekrosearealen.

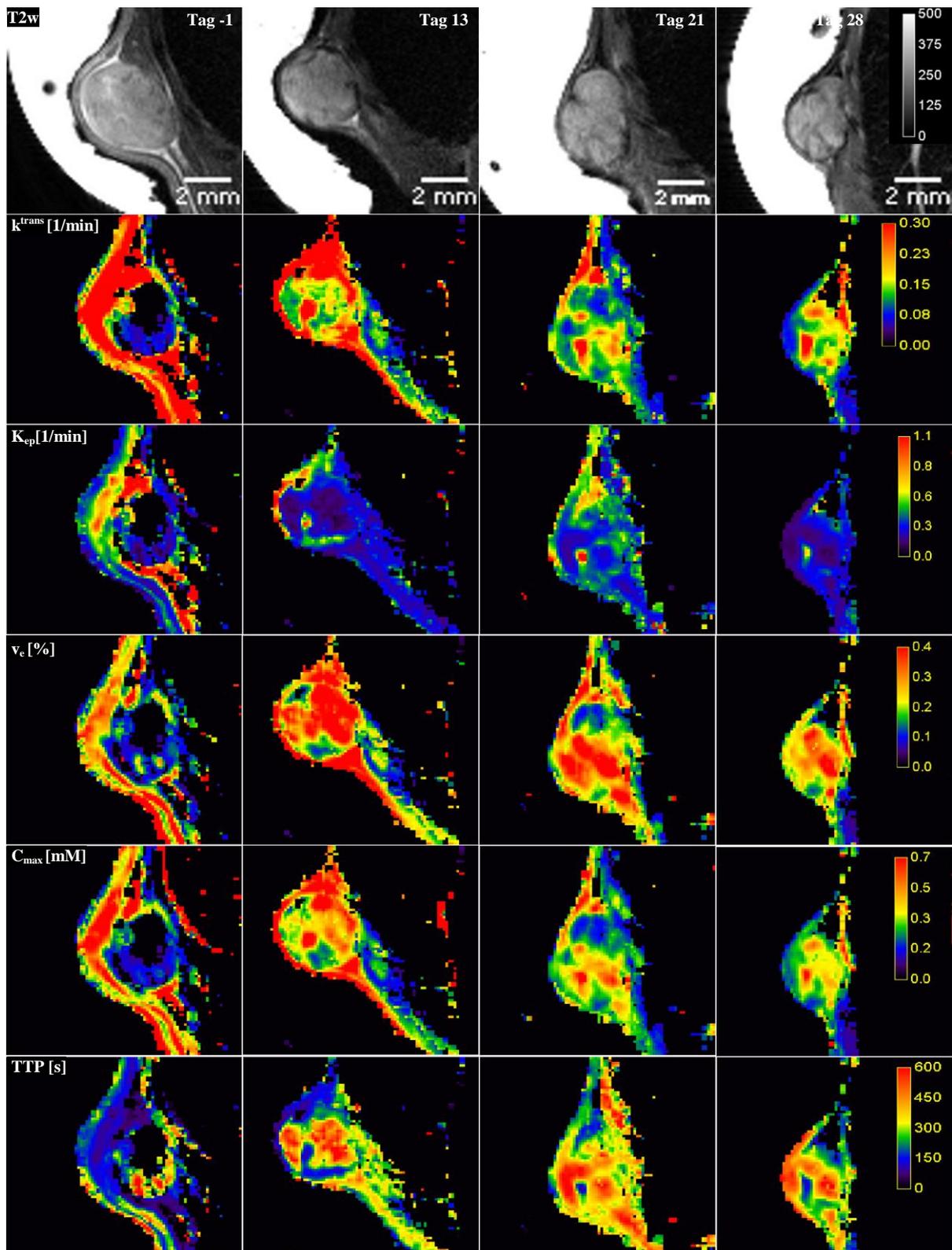
In Abbildung 44 ist der MCF-7/hNIS Tumor 6308 aus der Therapiegruppe dargestellt. Die Messpunkte lagen an Tag -1, 13, 21 und 28. Aufgrund fehlender DCE-Daten an Tag 8 ist ersatzweise die Messung an Tag 28 abgebildet. Die Therapiegruppe zeigte eine Abnahme des Tumolvolumens. Die T2-gewichteten Bilder entsprechen bis auf Reihe 4 jenen aus Abbildung 31. Die Parameterkarte von  $k^{\text{trans}}$  zeigte im Verlauf abnehmende Werte am Tumorrand.  $K_{\text{ep}}$  zeigte niedrige Werte am Tumorrand sowie im Tumorzentrum. Die Parameterkarten von  $v_e$ ,  $C_{\text{max}}$  und TTP zeigten nach Therapiebeginn kontinuierlich hohe Werte im gesamten Tumor.

Parameterkarten eines nativen MCF-7 Tumors aus der Kontrollgruppe



[Abb. 43] Zeile 1: T2-gewichtetes Bild des nativen MCF-7 Tumors 7782 aus der Kontrollgruppe. Zeile 2-6: Parameterkarten von *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ), Leckagevolumen ( $v_e$ ), maximaler Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie *time to peak* (TTP). Reihe 2-6: Parameterkarten der entsprechenden Parameter an Tag 0, 9, 21 und 29. Weiteres siehe \*Ergänzung Abb. 44.

Parameterkarten eines MCF-7h/NIS Tumors aus der Therapiegruppe

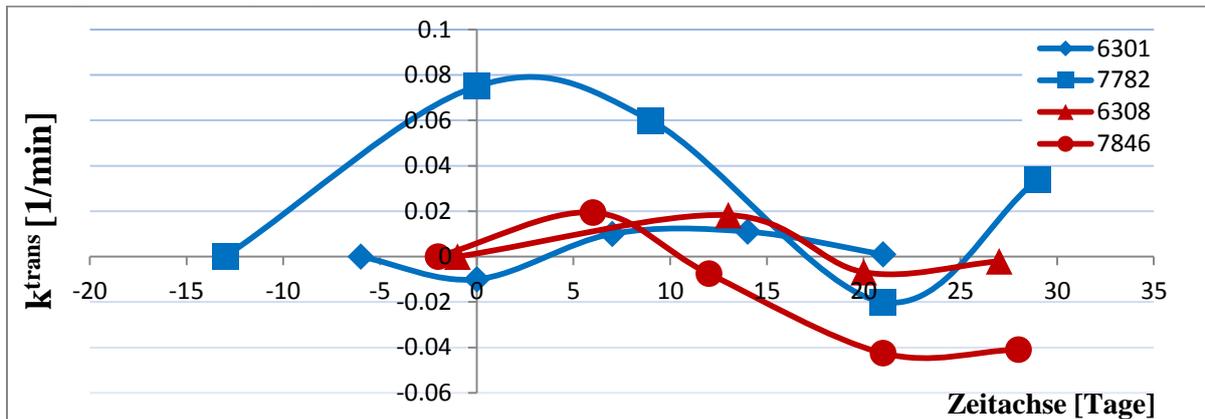


[Abb. 44] Zeile 1: T2-gewichtetes Bild des MCF-7h/NIS Tumors 6308 aus der Therapiegruppe. Zeile 2-6: Parameterkarten von *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ), Leckagevolumen ( $v_e$ ), maximaler Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie *time to peak* (TTP). Reihe 2-6: Parameterkarten der entsprechenden Parameter an Tag -1, 13, 21 und 28. Die T2-gewichteten Bilder zeigen eine Abnahme des Tumorsvolumens in der Therapiegruppe. Die Parameterkarte von  $k^{\text{trans}}$  zeigte im Verlauf

abnehmende Werte am Tumorrand.  $K_{ep}$  zeigte niedrige Werte am Tumorrand sowie im Tumorzentrum. Die Parameterkarten von  $v_e$ ,  $C_{max}$  und TTP zeigten nach Therapiebeginn kontinuierlich hohe Werte im gesamten Tumor.

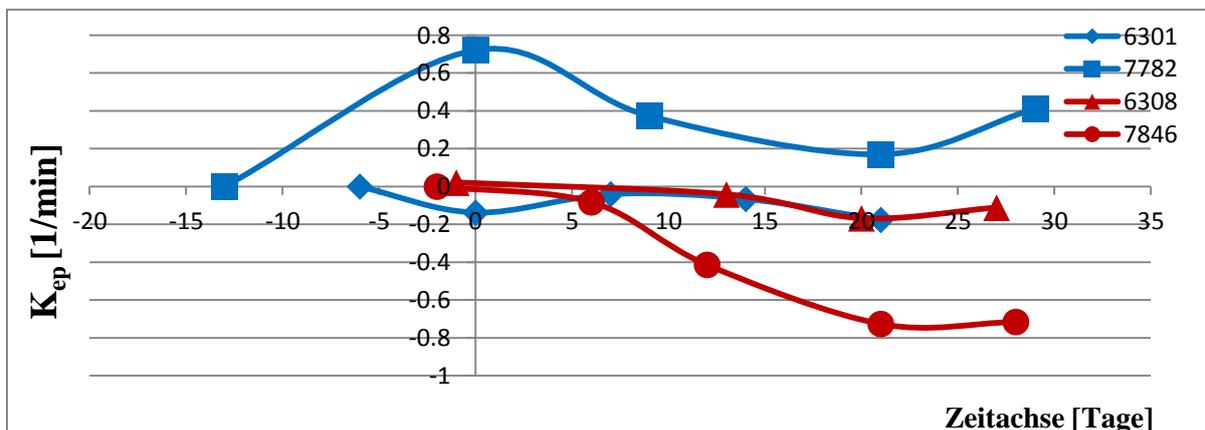
**Ergänzung [Abb. 43]** Unter kontinuierlicher Volumenzunahme bildete der Tumor zwei über eine Gewebebrücke verbundene Knoten. Die Parameterkarten von  $k^{trans}$  und  $K_{ep}$  zeigten im gesamten Tumor hohe Werte an Tag 0 und 29. An Tag 9 und 21 ließen sich im Randbereich keine Werte erfassen, diese Tumorregionen verblieben schwarz.  $v_e$  zeigte hohe Werte am Rand sowie in nekrotischen Tumorarealen.  $C_{max}$  und TTP zeigten ebenfalls hohe Werte am Tumorrand sowie in Nekrosearealen.

### Transfer constant ( $k^{trans}$ )



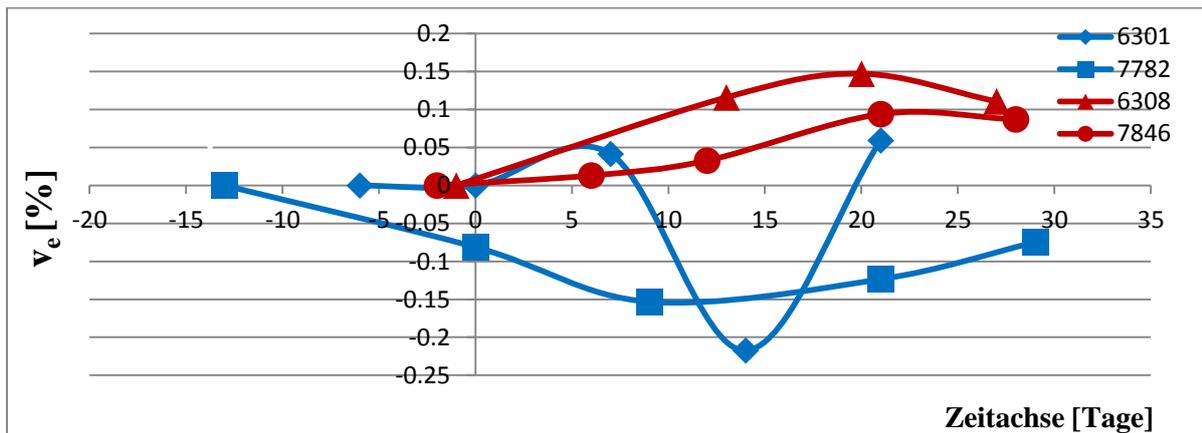
[Abb. 45] Relative Änderung der *transfer constant* bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskezziffern aufgetragen. Der MCF-7/hNIS Tumor 7846 zeigte eine Abnahme von  $k^{trans}$ , während der MCF-7/hNIS Tumor 6308 einen relativ konstanten Verlauf aufwies. Der native MCF-7 Tumor 6301 zeigte einen konstanten Verlauf, während der native MCF-7 Tumor 7782 wechselnd hohe und niedrige Werte aufwies.

### Rate constant ( $K_{ep}$ )



[Abb. 46] Relative Änderung der *rate constant* bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskezziffern aufgetragen. Der native MCF-7 Tumor 6308 sowie der MCF-7/hNIS Tumor 6301 zeigten konstante Verläufe. Bei MCF-7/hNIS Tumor 7846 kam es zu einer Abnahme von  $K_{ep}$ , während der native MCF-7 Tumor 6301 einen Anstieg von  $K_{ep}$  verzeichnete.

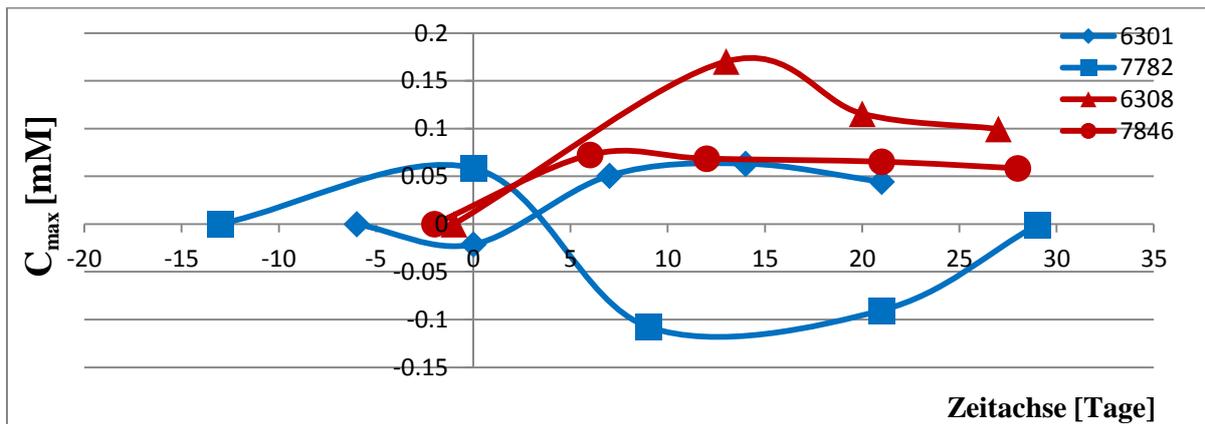
## Leckagevolumen ( $v_e$ )



[Abb. 47] Relative Änderung des Leckagevolumens bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskezziffern aufgetragen.  $v_e$  zeigte in der Therapiegruppe einen stetigen Anstieg. Die Kontrollgruppe zeigte unterschiedliche Verläufe mit einem geringen Abfall bei dem nativen Tumor 7782. Der native MCF-7 Tumor 6301 hingegen zeigte, mit Ausnahme an Tag 14, einen leichten Anstieg.

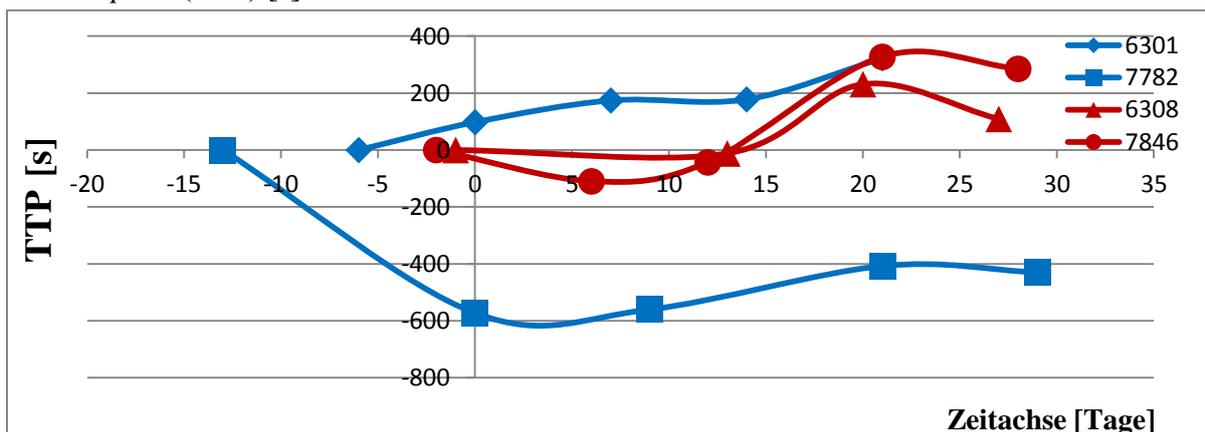
Der Parameter  $k^{\text{trans}}$  zeigte in der Kontrollgruppe unterschiedliche Verläufe. Der native MCF-7 Tumor 6301 zeigte einen konstanten Verlauf, während der native MCF-7 Tumor 7782 wechselnd hohe und niedrige Werte aufwies. Ähnlich präsentierte sich die Therapiegruppe, mit fallenden  $k^{\text{trans}}$  Werten beim MCF-7/hNIS Tumor 7846 und einem konstanten Verlauf beim MCF-7/hNIS Tumor 6308. Der Parameter  $K_{ep}$  zeigte konstante Verläufe bei dem nativen MCF-7 Tumor 6308 aus der Kontrollgruppe sowie dem NIS-positiven MCF-7/hNIS Tumor 6301 aus der Therapiegruppe. Der MCF-7/hNIS Tumor 7846 zeigte einen Abfall von  $K_{ep}$ , während der native MCF-7 Tumor 6301 einen Anstieg verzeichnete. Der Parameter  $v_e$  zeigte einen stetigen Anstieg in der Therapiegruppe. Die Kontrollgruppe zeigte unterschiedliche Verläufe mit einem geringen Abfall bei dem nativen MCF-7 Tumor 7782 und einem wechselhaften Verlauf bei dem nativen MCF-7 Tumor 6301.

### Maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\max}$ )



[Abb. 48]. Relative Änderung der maximalen Kontrastmittelkonzentration bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen.  $C_{\max}$  stieg in der Therapiegruppe stetig an. Die Kontrollgruppe zeigte unterschiedliche Verläufe mit einem geringen Abfall und Wiederanstieg bei dem nativen MCF-7 Tumor 7782 bzw. einem konstanten Verlauf bei dem nativen MCF-7 Tumor 6301.

### Time to peak (TTP) [s]



[Abb. 49] Relative Änderung der *time to peak* bei nativen und MCF-7/hNIS Tumoren in Bezug zum Ausgangswert über die Zeitachse. Der Nullpunkt der Zeitachse markiert den Therapiebeginn. Die Messpunkte vor Therapiebeginn liegen auf der Zeitachse im negativen Bereich. Die Kontrollgruppe ist blau dargestellt, die Therapiegruppe rot. In der Legende sind die individuellen Mauskenziffern aufgetragen. Therapie- und Kontrollgruppe zeigten einen Anstieg der TTP, mit Ausnahme des nativen MCF-7 Tumors 7782 aus der Kontrollgruppe bei dem es an Tag 0 zu einem Abfall von TTP kam.

Der Parameter  $C_{\max}$  zeigte eine Erhöhung in der Therapiegruppe. Die Kontrollgruppe zeigte unterschiedliche Verläufe mit einem geringen Abfall und Wiederanstieg bei dem nativen MCF-7 Tumor 7782 bzw. einem leichten Anstieg mit anschließend konstantem Verlauf bei Tumor 6301. Therapie- und Kontrollgruppe zeigten einen Anstieg der TTP, mit Ausnahme des nativen MCF-7 Tumors 7782 aus der Kontrollgruppe, bei dem es an Tag 0 zu einem Abfall von TTP kam.

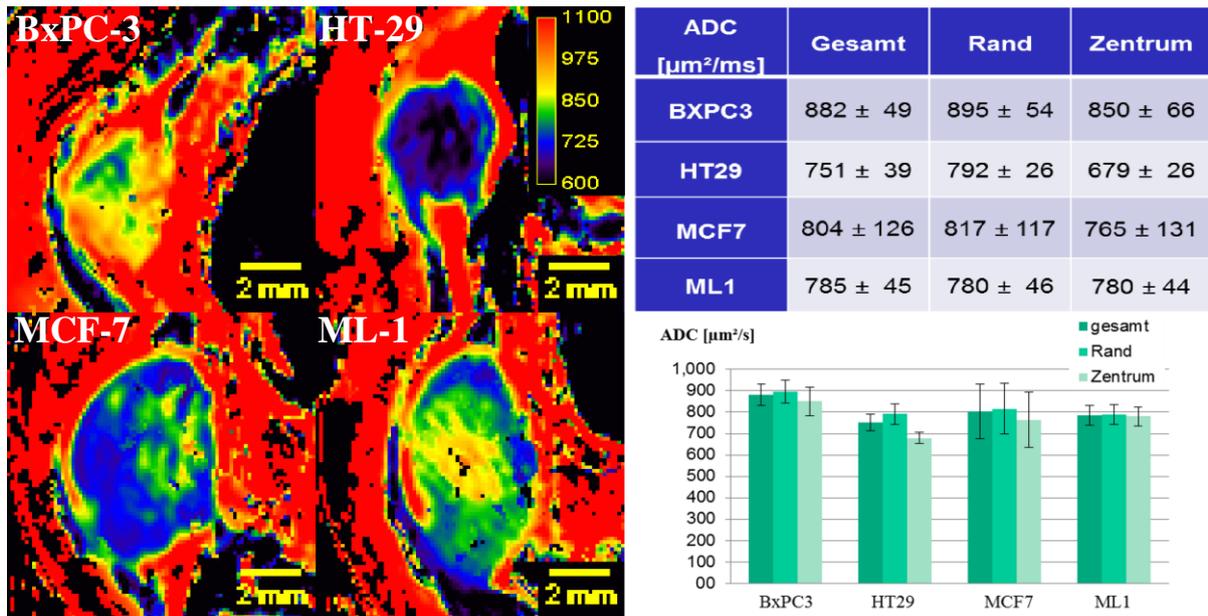
## 4.2 Phänotypisierung verschiedener Tumorentitäten mittels MRT

### 4.2.1 Ergebnisse der diffusionsgewichteten MRT

Für jeweils 5 Tumore von jedem Tumortyp wurde mittels DWI-MRT der ADC-Wert, die Diffusionskonstante, die Pseudodiffusion sowie die Perfusionsfraktion für den gesamten Tumor, den Tumorrand sowie das Tumorzentrum bestimmt. Auswahlkriterium waren Tumoren mit ähnlichem Volumen (BxPC-3  $78 \pm 33$ , HT-29  $128 \pm 25$ ; MCF-7  $57 \pm 26$ ; ML-1  $170 \pm 99$  [mm<sup>3</sup>]).

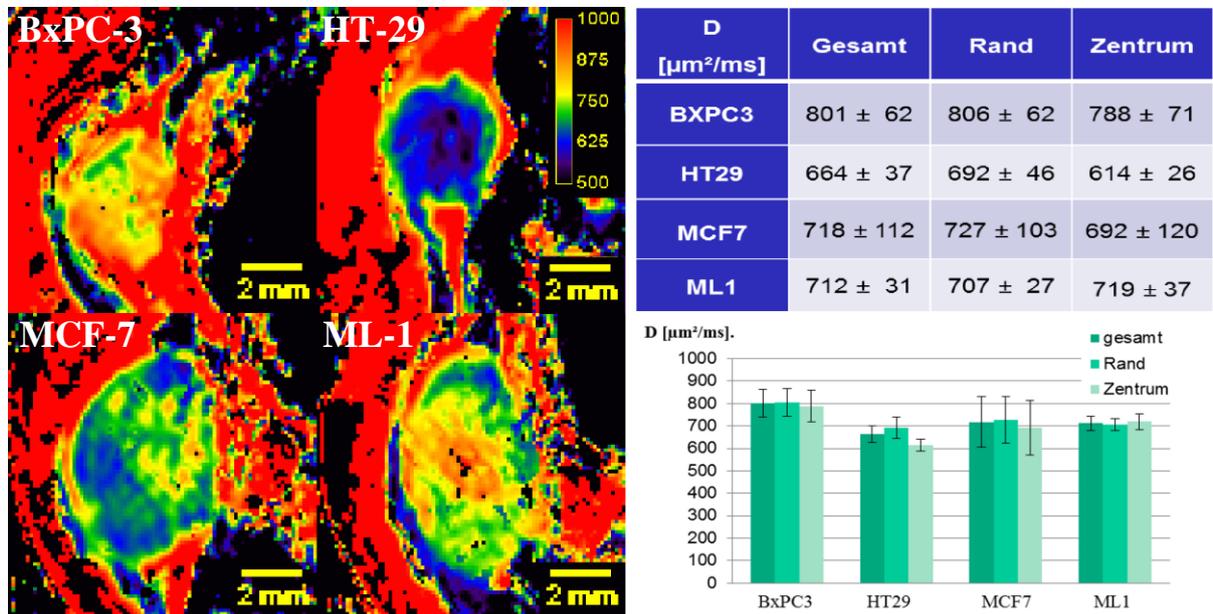
Die ADC-Werte sind als Parameterkarten für jeden Tumortyp exemplarisch in Abbildung 50 dargestellt. Bei den verwendeten Beispielen handelt es sich um die Tumoren BxPC3\_7777\_2nd; Schicht 20; HT29\_7794K\_2nd, Schicht 13; MCF7\_6301K\_3rd, Schicht 13 sowie Thyroid\_7793\_3rd, Schicht 9 (ML-1). In selbiger Abbildung finden sich in der Tabelle rechts oben die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen für alle Tumortypen in den jeweiligen ROI. Die Balkendiagramme rechts unten zeigen die Tabellenwerte als Histogramm. Die ADC-Werte der BxPC-3 Tumoren waren im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten in allen ROI am höchsten, wohingegen die MCF-7 Tumoren für alle ROI die höchste Standardabweichung aufwiesen. Den deutlichsten Unterschied zwischen Tumorrand und Tumorzentrum zeigten die HT-29 Tumoren. Analog wurden mithilfe des IVIM-Modells die Diffusionskonstante, die Perfusionsfraktion sowie die Pseudodiffusion bestimmt. Die Ergebnisse sind nach gleichem Schema in den Abbildungen 51-53 dargestellt. Bezüglich der Diffusionskonstanten zeigten die ML-1 Tumoren eine ca. 3-fach niedrigere Standardabweichung als die MCF-7 Tumoren. Die BxPC-3 Tumoren zeigten die höchste Pseudodiffusion. Die Perfusionsfraktion war bei allen Tumortypen am Tumorrand höher als im Tumorzentrum, wobei die HT-29 Tumoren den größten Unterschied zwischen Tumorrand und Tumorzentrum aufwiesen. Die HT-29 Tumoren hatten die niedrigste Standardabweichung.

ADC-Wert [ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ]



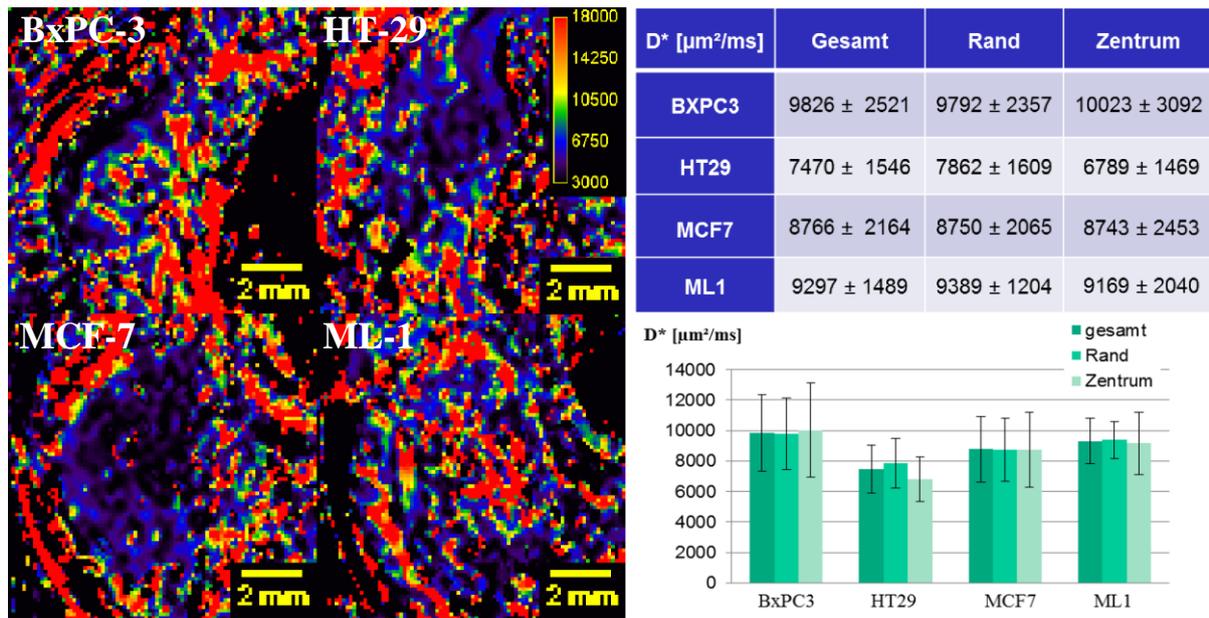
[Abb. 50] Links: ADC-Parameterkarte eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen des ADC-Wertes für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die BxPC-3 Tumoren zeigten für alle ROI die höchsten ADC-Werte. Die MCF-7 Tumoren hatten für alle ROI die höchste Standardabweichung. Der deutlichste Unterschied zwischen Tumorrand und Tumorzentrum zeigten die HT-29 Tumoren.

Diffusionskonstante D [ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ]



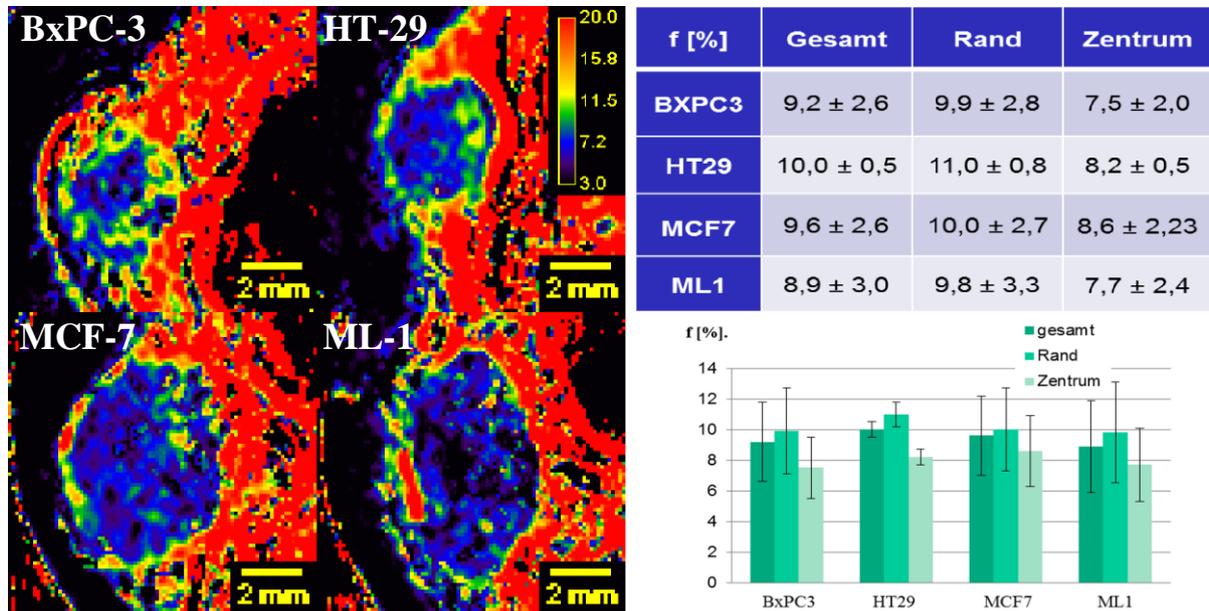
[Abb. 51] Links: Parameterkarte der Diffusionskonstanten eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Diffusionskonstanten für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die ML-1 Tumoren zeigten eine ca. 3-fach niedrigere Standardabweichung als die MCF-7 Tumoren

## Pseudodiffusion $D^*$ [ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ]



[Abb. 52] Links: Parameterkarte der Pseudodiffusion eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Pseudodiffusion für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die BxPC-3 Tumoren zeigten für alle ROI die höchste Pseudodiffusion.

## Perfusionsfraktion $f$ [%]



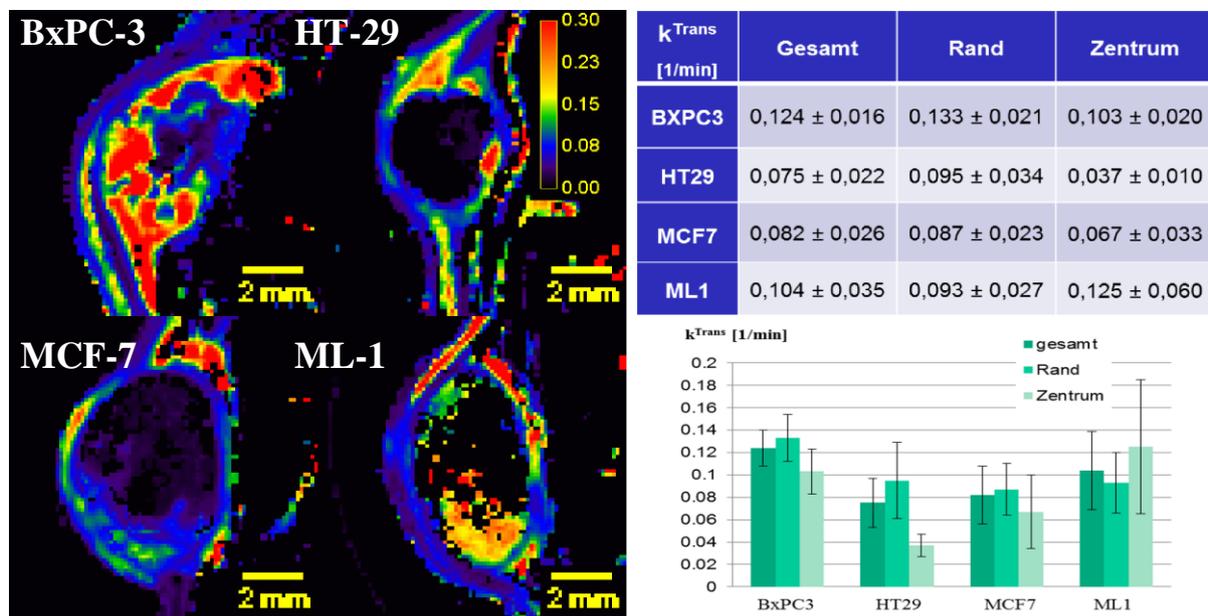
[Abb. 53] Links: Parameterkarte der Perfusionsfraktion eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Perfusionsfraktion für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die Perfusionsfraktion war bei allen Tumortypen am Tumorrand höher als im Tumorzentrum, wobei die HT-29 Tumoren den größten Unterschied zwischen Tumorrand und Tumorzentrum aufwiesen. Die HT-29 Tumoren zeigten die geringste Standardabweichung.

#### 4.2.2 Ergebnisse der dynamischen kontrastmittelverstärkten MRT

Unter Verwendung der DCE-MRT und des Tofts-Modelles wurden die Parameter *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ) und Leckagevolumen ( $v_e$ ) bestimmt. Der Aufbau der Abbildungen sowie die exemplarisch abgebildeten Tumoren entsprechen jenen aus Kapitel 4.2.1. Mit Ausnahme der ML-1 Tumoren zeigten alle Tumoren im Randbereich eine höhere  $k^{\text{trans}}$ . Die HT-29 Tumoren zeigten den größten Unterschied zwischen Tumorzentrum und Tumorrand. Die ML-1 Tumoren besaßen im Tumorzentrum die größte Standardabweichung. Die ML-1 Tumoren zeigten eine ca. 4-fach höhere  $K_{\text{ep}}$  im Tumorzentrum und eine ca. 2-fach höhere  $K_{\text{ep}}$  im Randbereich. Zusätzlich zeigten die ML1-Tumoren das geringste  $v_e$ .

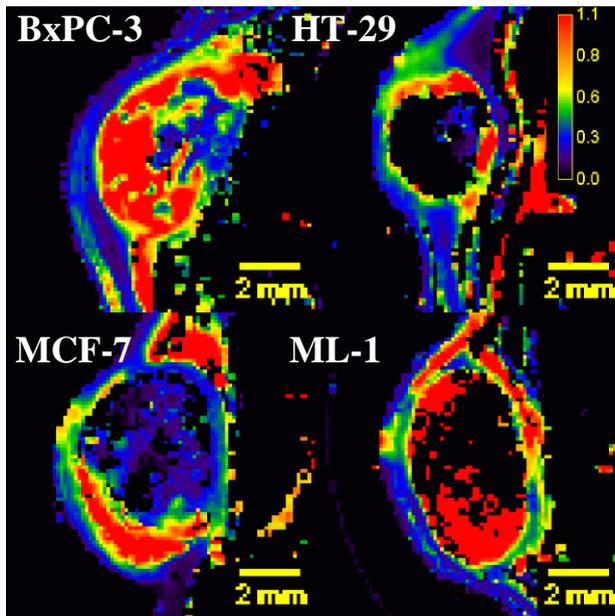
Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene semiquantitative Parameter auf Unterschiede zwischen den einzelnen Tumortypen untersucht. Die maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie die *time to peak* (TTP) zeigten hierbei die deutlichsten Unterschiede. Die BxPC-3 Tumoren hatten die höchste  $C_{\text{max}}$ , die ML-1 Tumoren die niedrigste. Die HT-29 Tumoren zeigten die längste TPP mit gleichzeitig der höchsten Standardabweichung. Die M Tumoren hatten die kürzeste TPP.

*Transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ )

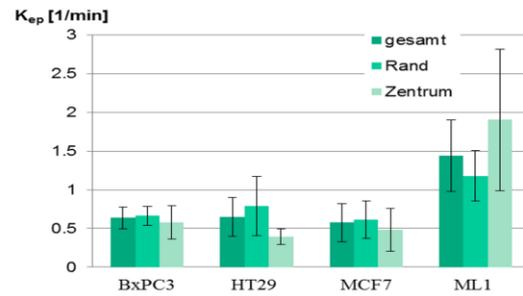


[Abb. 54] Links: Parameterkarte der *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ) eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen von  $k^{\text{trans}}$  für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Mit Ausnahme der ML-1 Tumoren zeigten alle Tumoren im Randbereich eine höhere  $k^{\text{trans}}$ . Die HT-29 Tumoren zeigten den größten Unterschied zwischen Tumorzentrum und Tumorrand. Die ML-1 Tumoren besaßen im Tumorzentrum die größte Standardabweichung.

Rate constant ( $K_{ep}$ )

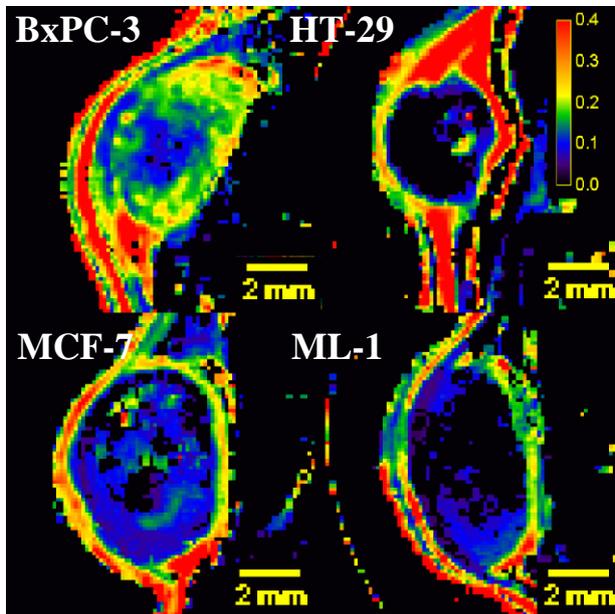


$K_{ep}$ [1/min]	Gesamt	Rand	Zentrum
BXPC3	0,638 ± 0,139	0,663 ± 0,12	0,580 ± 0,217
HT29	0,648 ± 0,252	0,788 ± 0,380	0,397 ± 0,100
MCF7	0,577 ± 0,247	0,614 ± 0,239	0,478 ± 0,277
ML1	1,440 ± 0,463	1,180 ± 0,323	1,902 ± 0,911

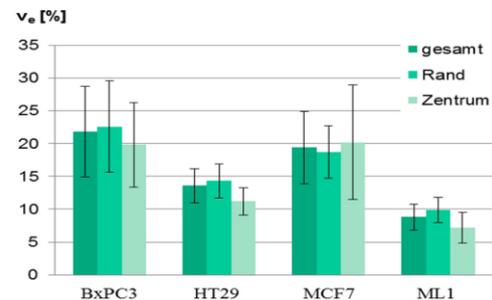


[Abb. 55] Links: Parameterkarte der *rate constant* ( $K_{ep}$ ) eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen von  $K_{ep}$  für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die ML-1 Tumoren zeigten eine ca. 4-fach höhere  $K_{ep}$  im Tumorzentrum und eine ca. 2-fach höhere  $K_{ep}$  im Randbereich.

Leckagevolumen ( $v_e$ )

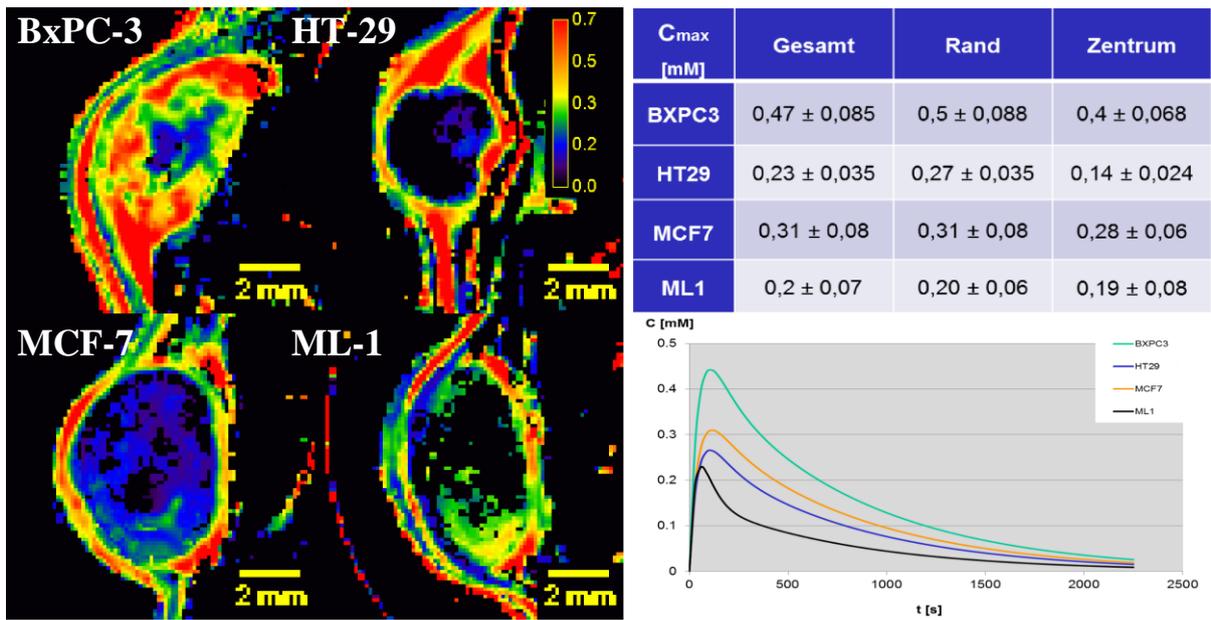


$v_e$ [%]	Gesamt	Rand	Zentrum
BXPC3	21,8 ± 6,9	22,6 ± 7,0	19,8 ± 6,4
HT29	13,6 ± 2,6	14,3 ± 2,6	11,2 ± 2,1
MCF7	19,4 ± 5,5	18,7 ± 4,0	20,2 ± 8,7
ML1	8,8 ± 2,0	9,9 ± 1,9	7,2 ± 2,3



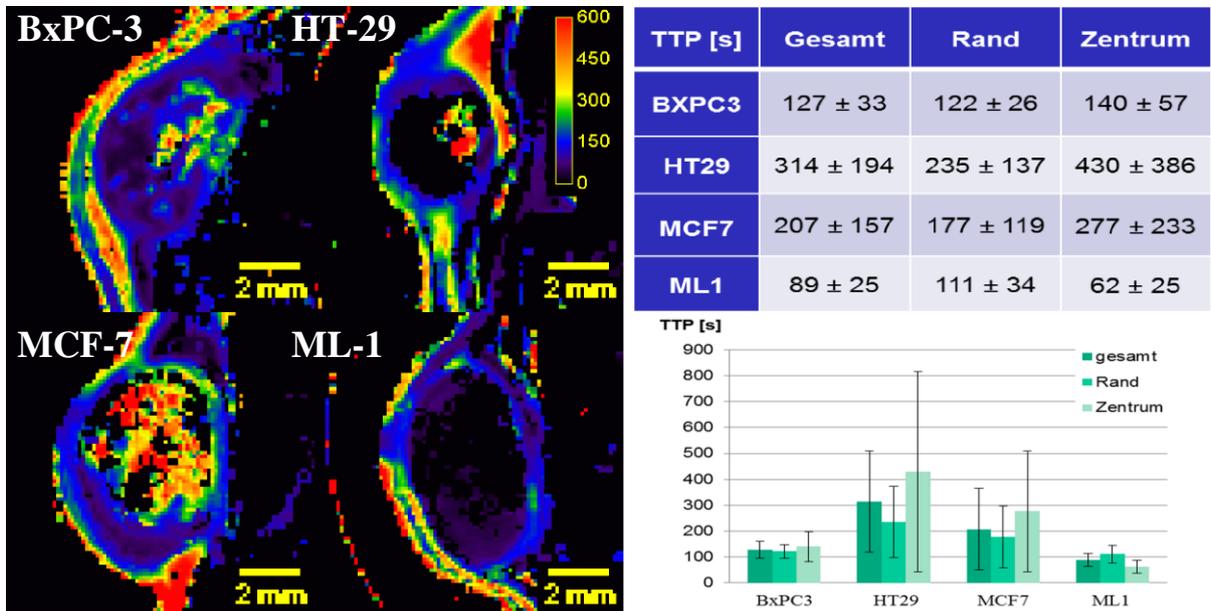
[Abb. 56] Links: Parameterkarte des Leckagevolumens ( $v_e$ ) eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen von  $v_e$  für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die ML1-Tumoren zeigten die geringste  $v_e$ .

## Maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{max}$ )



[Abb. 57] Links: Parameterkarte der maximalen Kontrastmittelkonzentration ( $C_{max}$ ) eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen von  $C_{max}$  für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die BxPC-3 Tumoren hatten die höchste  $C_{max}$ , die ML-1 Zelllinie die geringste.

## Time to peak (TTP)



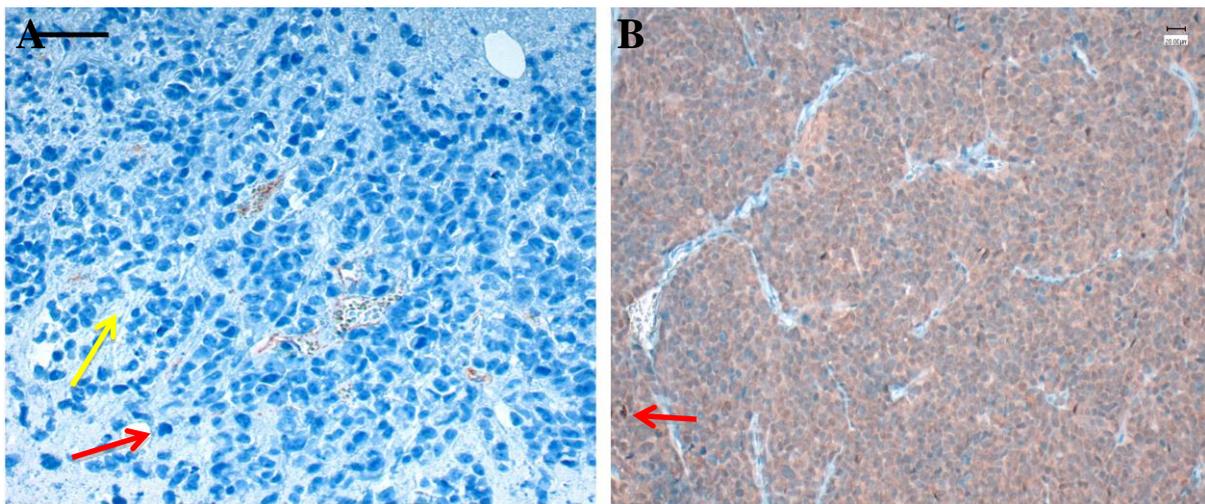
[Abb. 58] Links: Parameterkarte der *time to peak* (TTP) eines BxPC-3, eines HT-29, eines MCF-7 sowie eines ML-1 Tumors. Rechts: Tabelle und Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen der TTP für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum. Die HT-29 Tumoren zeigten die längste TTP und gleichzeitig die höchste Standardabweichung. Die ML1-Tumoren hatten die kürzeste TTP.

### 4.2.3 Histologie zur Phänotypisierung

In der Histologie zeigten die BxPC-3 Tumoren eine geringere Zelldichte als vergleichbare ML-1 Tumoren. Abbildung 62A zeigt einen BxPC-3 Tumor in Gefäßfärbung. Die Zellkerne sind blau, der interstitielle Raum hellblau. Abbildung 62B zeigt einen ML-1 Tumor mit dichtgepackten Zellen. Der hellbraune interstitielle Raum erschien flächenmäßig kleiner.

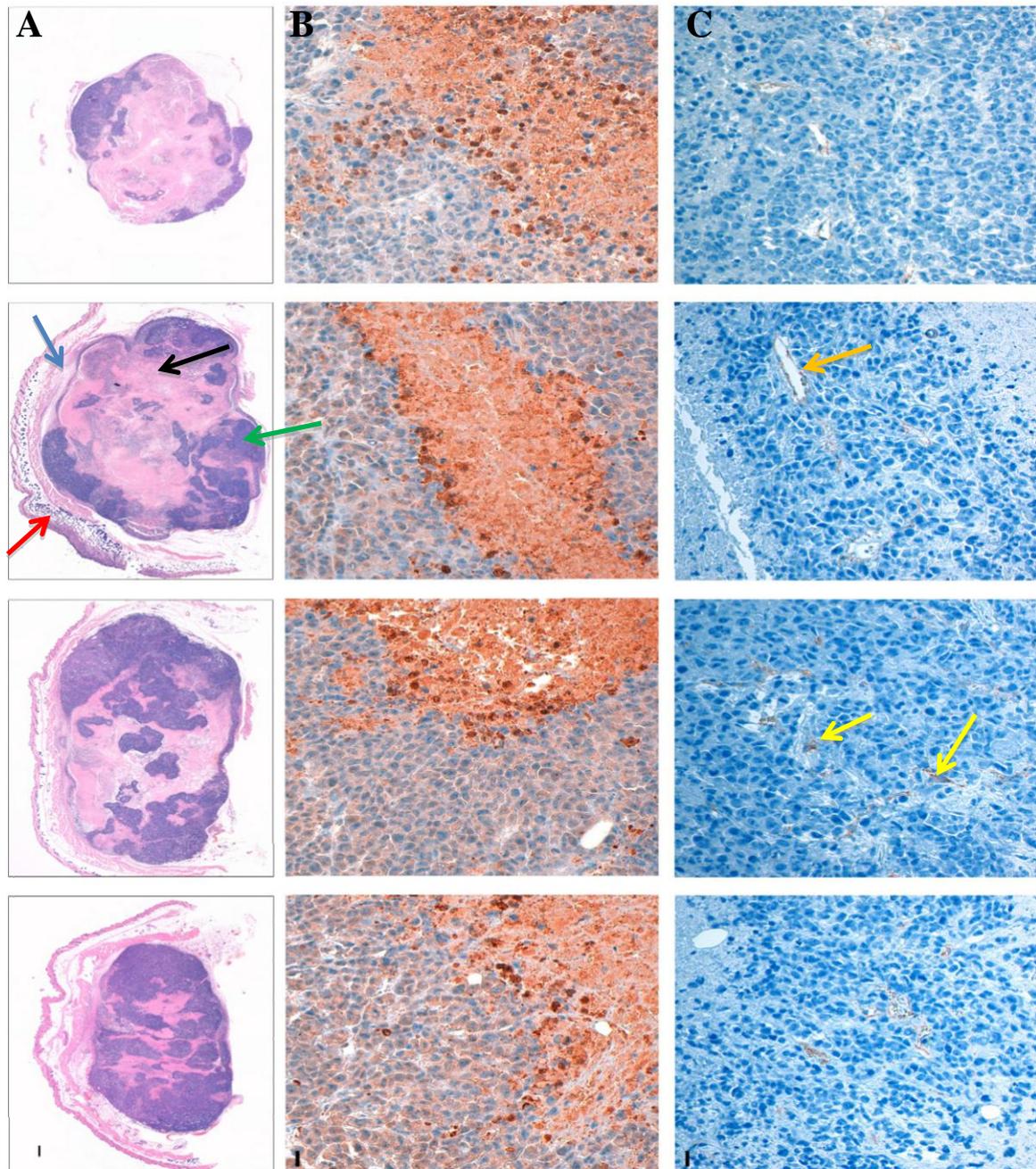
Abbildung 63A zeigt die makroskopische Darstellung eines BxPC-3 Tumors in HE-Färbung. Mitabgebildet sind Haut, subkutanes Fettgewebe, nekrotische Areale und vitales Tumorgewebe. Abbildung 63B bildet einen Ausschnitt aus selbigem Tumor in Apoptosefärbung (Caspase) ab. Nekrose ist hellbraun. Zellkerne sind bläulich. Die apoptotischen, dunkelbraunen Areale bildeten die Grenze zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe. Abbildung 63C zeigt die Verteilung der Tumorgefäße in CD31-Färbung (gelber Pfeil). Die Gefäße imponieren durch die hohe Zelldichte komprimiert. Areale mit geringerer Zelldichte zeigten offene Gefäßlumen.

Histologische Aufnahmen eines BxPC-3 und eines ML-1 Tumors



[Abb. 62] Histologische Unterschiede zwischen einem BxPC-3 und einem ML-1 Tumor. **A:** Mikroskopische Darstellung eines BxPC-3 Tumors in Gefäßfärbung (CD31). Zellkerne sind blau (roter Pfeil). Der interstitielle Raum ist hellblau (gelber Pfeil) **B:** Mikroskopische Darstellung eines ML-1 Tumors in Apoptosefärbung (Caspase). Die Zellkerne sind bläulich, das Interstitium hellbraun. Apoptotische Zellen sind dunkelbraun (roter Pfeil). Im Vergleich zu Abbildung A zeigt sich hier eine höhere Zelldichte, woraus eine Abnahme des interstitiellen Volumens resultiert. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolok zur Verfügung gestellt.

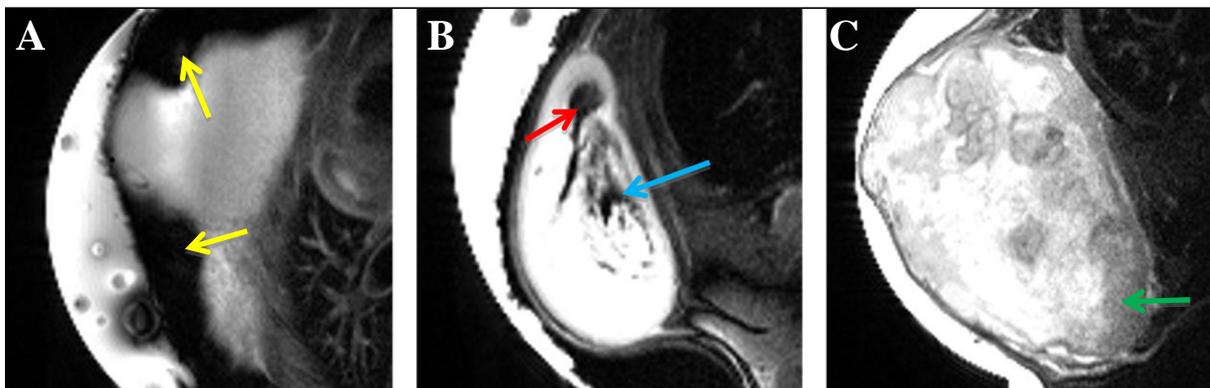
## Histologie eines BxPC-3 Tumors



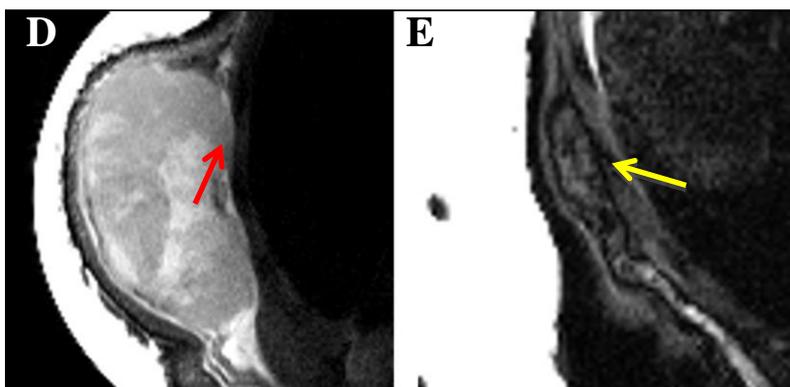
**[Abb. 63]** Histologische Aufarbeitung eines BxPC-3 Tumors. **A:** Makroskopische Darstellung eines BxPC-3 Tumors in HE-Färbung. Mitabgebildet sind Haut (roter Pfeil), subkutanes Fettgewebe (blauer Pfeil), nekrotische Areale (schwarzer Pfeil) und vitales Tumorgewebe (grüner Pfeil) **B:** Mikroskopische Darstellung eines Ausschnitt aus selbigem Tumor in Apoptosefärbung (Caspase). Apoptotische Areale sind dunkelbraun und bilden die Grenze zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe. Nekrose ist hellbraun. Zellkerne sind bläulich. **C:** CD31 Färbung zur Darstellung von Tumorgefäßen (gelber Pfeil). Aufgrund der hohen Zelldichte im Tumor erscheinen die Gefäße komprimiert (Gefäßlumen nicht sichtbar), in aufgelockerten zellärmeren Arealen scheint das Gefäßlumen offen (orangener Pfeil). Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolok zur Verfügung gestellt.

### 4.3 Problemfälle

Abbildung 64A zeigt großflächige Suszeptibilitätsartefakte an den Tumorgrenzen. Diese wurden durch Lufteingüsse zwischen Ultraschallgel und Tumoroberfläche im Fell des Versuchstieres verursacht. Eine ROI-Festlegung war in solchen Fällen nicht möglich und die betroffenen Schichten wurden ausgeschlossen. Abbildung 64B zeigt Matrigel® Rückstände im Zentrum eines Tumors. Durch Abbau des Matrigel® kam es zu einer zwischenzeitlichen Schrumpfung der Tumoren mit Vortäuschung eines Therapieeffektes. Abbildung 64C und D zeigen eine reduzierte SNR in spulernen Tumoranteilen, wodurch das Fitting in entsprechenden Arealen erschwert wurde. Abbildung 64E demonstriert die Schwierigkeit der Tumorabgrenzung bei stark geschrumpften Tumoren.



[Abb. 64] **Problematische Messungen I.** **A:** Großflächige Suszeptibilitätsartefakte (gelbe Pfeile) durch Lufteingüsse zwischen Ultraschallgel und Tumoroberfläche im Fell des Versuchstieres. **B:** Matrigel® (blauer Pfeil) im Zentrum des Tumors mit angrenzendem Hohlraum (roter Pfeil). **C:** Großer Tumor mit reduzierter SNR im spulernen Anteil (grüner Pfeil).



[Abb. 65] **Problematische Messungen II.** **D:** Großer Tumor mit reduzierter SNR im spulernen Anteil (roter Pfeil) **E:** Kaum abgrenzbare Tumorresiduen eines MCF-7/hNIS Tumors 28 Tage nach Therapiebeginn (gelber Pfeil).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Multiparametrische MRT zur Therapieevaluation**

#### **5.1.1 Das Tumolvolumen als valider Parameter**

Die Reduktion von Tumorgewebe ist meist auf ein Absterben von Tumorzellen zurückzuführen. Aktuell ist das Tumolvolumen zur Abschätzung des Therapieerfolges der am häufigsten verwendete und aussagekräftigste Parameter. Das Volumen von subkutan gelegenen Tumoren im Mausmodell wird überwiegend durch die Verwendung von Messschiebern und Näherungsformeln bestimmt. Insbesondere bei großen Tumoren ist die geringe Genauigkeit ein wesentlicher Nachteil dieser Methode (Tomayko und Reynolds 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Volumenbestimmung der Tumore mit einem 7T-MRT-Gerät durchgeführt. Das verwendete MRT-Gerät erreicht mit einer entsprechenden T2w-Sequenz eine hohe anatomische Auflösung (Voxelgröße  $0,117 \times 0,117 \times 0,500 \text{ mm}^3$ ), wodurch eine präzise Volumenbestimmung der Tumore möglich wurde. In anderen Arbeiten konnte die Genauigkeit dieser Methode durch einen Vergleich zwischen der mittels MRT ermittelten Größe und dem nach Resektion bestimmten Gewicht verifiziert werden. Unter Verwendung unterschiedlicher Protokolle ergab sich bei He *et al.* eine Korrelation von  $R^2=0.96$  ( $n=7$ ) für Tumoren zwischen 0.2-2.0 g (He et al. 2000) und bei Montelius *et al.* eine Korrelation von  $R^2=0.96$  ( $n=9$ ) bei kleineren Tumoren zwischen 0.01-0.2 g (Montelius et al. 2012b). Einen zusätzlichen Vorteil bietet die Abbildung der kompletten Tumormorphologie, wodurch in der vorliegenden Arbeit Matrigel®-bedingte Schrumpfungseffekte erfasst und eine Fehlinterpretation durch Ausschluss solcher Tumore verhindert werden konnte (Kapitel 4.3, Abb. B). Problematisch war die Volumenbestimmung bei sehr großen Tumoren mit ungünstiger Morphologie, da diese gelegentlich den optimalen Sensitivitätsbereich der Spule überschritten (Kapitel. 4.3, Abb. C). Weitere Probleme bereiteten Suszeptibilitätsartefakte (Morelli et al. 2011), die durch Luftblasen im Fell der Versuchstiere verursacht wurden (Kapitel 4.3, Abb. A). Dieses Problem ließ sich mit dem Aufbringen von Ultraschallgel reduzieren. Dem *partial volume effect* (PVE) als Folge von Anschnitt des Tumors im Randbereich wurde mit gänzlichem Ausschluss solcher Schichten begegnet. Dies sollte eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen gewährleisten. Die daraus resultierende

Verfälschung des bestimmten Tumolvolumens war aufgrund der geringen Schichtdicken von 0,5 mm zu vernachlässigen. Ebenfalls kritisch zu bewerten ist die Festlegung der ROI durch einen Untersucher. Montelius *et al.* untersuchte die untersucherabhängige Varianz bei der Volumenbestimmung von Tumoren. Unter Verwendung von 2D Sequenzen betrug diese bei Tumoren unter 200 mm<sup>3</sup> bis zu 23% (Montelius et al. 2012b). Bezüglich der Messgenauigkeit kann der Einsatz von 3D-Sequenzen die eigene Methodik verbessern. Nachteilig ist die verlängerte Messzeit, die gleichzeitig den limitierenden Faktor im Tierversuch darstellt. Der untersucherabhängige Einfluss lässt sich durch eine Auswertung durch zwei Personen reduzieren.

Die RECIST-Kriterien bewerten die Reduktion von Tumormasse als Therapieansprechen (Therasse et al. 2000, Eisenhauer et al. 2009). Die MCF-7/hNIS Tumoren zeigten unter Therapie einen deutlichen Verlust von Tumormasse. Die hohe Wirksamkeit der Radiojodtherapie ist dabei auf den hohen Uptake von 20,0 %ID/ml der MCF-7/hNIS Tumorzellen zurückzuführen. Die HT-29/hNIS Zelllinie hingegen zeigte keinen Verlust von Tumormasse, sondern lediglich ein verlangsamtes Wachstum unter Therapie. Das geringere Therapieansprechen ist die Folge einer geringeren NIS-Expression und damit eines reduzierten Uptake von 6,0 %ID/ml. Zusätzlich wirkt die höhere Wachstumsgeschwindigkeit der HT-29 Tumoren einer möglichen therapiebedingten Schrumpfung entgegen.

### **5.1.2 Die DWI-MRT eignet sich zur Erfassung radiojod-induzierter Änderungen im Tumorgewebe, kann dabei aber nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden**

Der Wirkmechanismus einer Radiojodtherapie ist die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose im Zielgewebe (Sopotyk et al. 2004, Marx et al. 2006). Diese strukturellen Änderungen können mit der DWI-MRT erfasst und anschließend zur Therapieevaluation genutzt werden. Die Tatsache, dass sich Effekte auf molekularer Ebene häufig noch vor einer makroskopischen Größenabnahme erfassen lassen (Pickles et al. 2006a), ist gegenüber der einfachen Volumenbestimmung von Vorteil.

Die eingesetzte DWI Sequenz verwendete zur Optimierung des SNR die *3-scan-trace* Technik von Siemens, Fettsättigung, multiple Akquisitionen (2) sowie parallele Bildgebung (GRAPPA) bei einer kurzen TE-Zeit von 29 ms. Damit erfüllte sie zum Zeitpunkt der Experimente die aktuellen Empfehlungen zur Erzeugung qualitativ hochwertiger DWI Aufnahmen (Padhani et al. 2009). Zur Wahl der b-Werte existiert keine allgemeingültige

Empfehlung, weswegen die eingesetzten b-Werte gezielt den Anforderungen angepasst wurden. In anderen Studien kamen zur Erfassung perfusionsabhängiger Informationen (IVIM Modell) 4 bis >10 unterschiedliche b-Werte im Bereich von 0-200 s/mm<sup>2</sup> (Koh et al. 2011) zum Einsatz. Dabei sollte der maximale b-Wert der zu untersuchenden anatomischen Region angepasst werden. Bei der Prostatabildgebung werden höhere b-Werte von 0-3500 s/mm<sup>2</sup> (Mulkern et al. 2006, Shinmoto et al. 2009) als bei der Leberbildgebung (0-1100 s/mm<sup>2</sup>) (Yamada et al. 1999, Koh et al. 2006) oder bei der Nierenbildgebung (0-1300 s/mm<sup>2</sup>) (Thoeny et al. 2005, Zhang et al. 2010) genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die perfusionsabhängigen Informationen mit 6 b-Werten im Bereich von 0-200 s/mm<sup>2</sup> ausreichend erfasst, der maximaler b-Werte von 1600 s/mm<sup>2</sup> war zur Darstellung eines subkutan gelegenen Tumors ebenfalls ausreichend. Ein wesentlicher Kritikpunkt beim verwendeten Versuchsaufbau besteht in dem für große Tumoren nicht optimalen Spulensetting. Die verwendete 4-Kanal *mouse brain coil*-Empfangsspule lieferte im rückwärtigen Bereich dieser Tumoren eine deutlich schlechtere SNR mit der Folge eines lokal erschwerten Fittings (Kapitel 4.3, Abb. C). Die Verwendung einer angepassten Spule kann zur Lösung dieses Problems beitragen. Ebenfalls problematisch war die Abgrenzbarkeit von Tumorresiduen. Ein exaktes Zeichnen der ROI war bei gutem Therapieansprechen nicht immer möglich (Kapitel 4.3, Abb. E).

In der Literatur wird ein Anstieg des ADC-Wertes bei Mammakarzinomen (Pickles et al. 2006a, Yankeelov et al. 2007), primären und metastatischen Tumoren der Leber (Theilmann et al. 2004, Kamel et al. 2007), primären Osteosarkomen (Uhl et al. 2006) und Malignitäten des ZNS (Mardor et al. 2003) unter erfolgreicher Therapie beobachtet. Eine histopathologische Korrelation konnte den Anstieg des ADC-Wertes auf Basis einer Zerstörung der Mikrostruktur im Gewebe aufgrund von Nekrose und Apoptose nachweisen (Moffat et al. 2006, Seierstad et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigten ADC-Wert und Diffusionskonstante analoge Verläufe, weshalb im Folgenden der Begriff ADC-Wert stellvertretend Verwendung findet. Die MCF-7/hNIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten als Hinweis auf ein gutes Therapieansprechen eine Erhöhung des ADC-Wertes. In der Kontrollgruppe nativer MCF-7 Tumoren verhielten sich die Werte konstant. Korrelierend zu oben erwähnter Arbeit von Moffat *et al.* ist der Anstieg des ADC-Wertes als Folge eines Tumorzerfalls mit entsprechender Abnahme der Zelldichte aufgrund von Apoptose und Nekrose zu werten. Die HT-29/hNIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten als Korrelat eines

reduzierten Therapieansprechens eine beständige Abnahme des ADC-Wertes. Dabei ist anzunehmen, dass es trotz Therapie- zu einer stetigen Zunahme der Zelldichte kam. Auffällig war, dass der HT-29/hNIS Tumor aus Abb. 25 keine zentrale Nekrose aufwies. Möglicherweise führte die therapiebedingte Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit, eine zentrale Nekrose auszubilden. Die Kontrollgruppe der nativen HT-29 Tumoren zeigte auch ohne Therapie einen Anstieg des ADC-Wertes. Dieser Anstieg ist durch die ausgedehnten zentralen Nekrosen aufgrund des schnellen Tumorwachstums erklärbar.

Die Pseudoperfusion zeigte weder bei HT-29 Tumoren noch bei den MCF-7 Tumoren verwertbare Verläufe. Diese Beobachtung mag der Komplexität und Fehleranfälligkeit dieses Parameters geschuldet sein.

Die Perfusionsfraktion wird durch den vaskulären Anteil im Gewebe beeinflusst (Lemke et al. 2010). Der Anstieg der Perfusionsfraktion bei MCF-7 Tumoren unter Therapie kann sowohl die Zunahme des vaskulären Anteils als auch eine gesteigerte Perfusion beschreiben. Eine Hyperperfusion des Gewebes ließe sich durch eine akute Entzündungsreaktion nach therapiebedingtem Zelluntergang erklären, während der vaskuläre Anteil aufgrund der reduzierten Zelldichte eine Ausdehnung erfährt. Dem gleichen Erklärungsansatz folgt die Arbeit von Hauser *et al.*, die bei Karzinomen im Kopf- und Halsbereich eine Zunahme des ADC-Wertes, der Diffusionskonstanten und der Perfusionsfraktion unter erfolgreicher Therapie verzeichnete (Hauser et al. 2013). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bezüglich des Werteverlaufes bei MCF-7/hNIS Tumoren der Therapiegruppe. Inwieweit das Tumorgewebe aktiv mit einer Neovaskularisation reagiert, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Die HT-29/hNIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten in 2 von 3 Fällen eine Abnahme der Perfusionsfraktion, was sich, unter Verwendung des gleichen Erklärungsansatzes mit einer Abnahme des vaskulären Anteils, aufgrund zunehmender Zelldichte erklären lässt.

Zusammenfassend kann bei den MCF-7/hNIS Tumoren der Therapiegruppe der Anstieg des ADC-Wertes, der Diffusionskonstanten sowie der Perfusionsfraktion als Nachweis eines Therapieerfolges gewertet werden. Die HT-29/hNIS Tumoren hingegen zeigten aufgrund schlechteren Therapieansprechens einen Abfall selbiger Parameter aufgrund weiter steigender Zelldichte. Die nativen MCF-7 Tumoren der Kontrollgruppe zeigten bei ADC-Wert,

Diffusionskonstante und Perfusionsfraktion einen relativ konstanten Verlauf. Die Kontrollgruppe der nativen HT-29 Tumoren verzeichnete einen geringen Anstieg selbiger Parameter. Grund hierfür waren am ehesten zentrale Nekrosen.

Die fehlende Möglichkeit, Nekrose und Apoptose mittels DWI-MRT zu unterscheiden, ist eine wesentliche Limitation der Methodik. Problematisch war die Unterscheidung von Apoptose und Nekrose vor allem bei nativen HT-29 Tumoren, die aufgrund der hohen Wachstumsgeschwindigkeit häufig zentrale Nekrosen (Kapitel 4.3, Abb. D) ausbilden (Lorke et al. 2001). Erfasst die festgelegte ROI den gesamten Tumor, lässt sich der Einfluss von Therapieeffekten und struktureller Nekrose auf den ADC-Wert nicht trennen. Deshalb könnte die gezielte Darstellung von Apoptose eine sinnvolle Ergänzung der eigenen Arbeit bedeuten. Zu diesem Zweck würde sich die  $H^1$ -Spektroskopie (Kettunen und Brindle 2005, Liimatainen et al. 2009), der Einsatz des Avidin Moleküls (Neves et al. 2007) oder die Verwendung von Apoptosemarkern anbieten (Schellenberger et al. 2002, Jung et al. 2004). Bei der Betrachtung des IVIM Modell könnte in zukünftigen Arbeiten die Abhängigkeit der erhobenen Parameter von der Wahl der ROI näher untersucht werden. Anregungen diesbezüglich liefert die Arbeit von Montelius *et al.*, welche die Abhängigkeit zwischen ROI-Größe und erhobenen Parametern untersucht (Montelius et al. 2012a). Ein wichtiger Ansatz aktueller Arbeiten (Bauerle et al. 2013) besteht darin, die erhobenen Parameter durch histopathologische Untersuchungen zu validieren. Für zukünftige Studien empfiehlt sich dies ebenso, da eine gezielte histologische Aufarbeitung bei einem nicht unerheblichen Teil der DWI Studien fehlt. Die Korrelation von Histologie und MRT ist zum weiteren Verständnis der einzelnen MRT-Parameter bezüglich ihrer biologischen Korrelate jedoch unbedingt erforderlich.

### **5.1.3 Welchen Nutzen hat die DCE bei der Evaluation einer Radiojodtherapie?**

Vaskularisation und Perfusion eines Tumors haben Einfluss auf Tumorstadium und Metastasierungstendenz. Die Erfassung und Bewertung von Vaskularisation und Perfusion kann deshalb neue Ansätze zur Therapieevaluation liefern. Konventionell lässt sich die Tumorstadium mit immunhistochemischen Färbungen bestimmen und mittels *microvessel density* (MVD) beschreiben (Barnes et al. 2012). Die invasive Histologie erfasst jedoch nur Teile eines Tumors und eignet sich nicht zur Beschreibung funktioneller Eigenschaften wie Blutfluss oder Gefäßpermeabilität (Li und Padhani 2012). Die

nichtinvasive DCE-MRT hingegen kann Aussagen über Gewebeeigenschaften wie Perfusion und Permeabilität treffen.

Der Einsatz der DCE-MRT zur Evaluation einer Radiojodtherapie muss kritisch betrachtet werden. Die DCE-MRT erfasst vaskuläre Effekte und eignet sich deshalb insbesondere zur Evaluation von Therapien, die entweder antiangiogenetisch wirken oder gezielt das Tumorgefäßsystem angreifen (Padhani 2003). Bereits 2007 kam die DCE-MRT in über 30 Studien mit entsprechender Fragestellung zum Einsatz (Jackson et al. 2007). Eine Radiojodtherapie hingegen wirkt primär über die Induktion von Apoptose und hat somit keinen direkten Effekt auf die Tumervaskularisation.

Die Anwendung der DCE-MRT bei der präklinischen Kleintierforschung birgt zusätzliche Probleme. Die Verwendung des Tofts-Modells erfordert eine AIF, die idealerweise für jedes Individuum bzw. jeden Tumor eigens bestimmt werden sollte. Eine direkte Bestimmung der AIF am Tumor war aufgrund fehlender, deutlich abgrenzbarer Tumorgefäße nicht möglich. Zudem verhinderte die anatomische Lage der Tumore eine gleichzeitige Abbildung von Herz und Tumor, wodurch eine parallele Bestimmung der AIF während der routinemäßigen Untersuchungen nicht möglich war. Zur Lösung dieses Problems wurde eine idealisierte AIF im Rahmen von Vorversuchen bestimmt (Walker-Samuel et al. 2007). Dieses Vorgehen ignoriert jedoch die hohe interindividuelle Varianz der AIF und kann deshalb zur Verfälschung einzelner Messergebnisse führen. Weitere Probleme verursachte die Applikation des Kontrastmittels. Zum einen war es nicht immer möglich, einen suffizienten Schwanzvenenkatheter zu legen, was gelegentlich zu einer Paravasation oder erschwerter Kontrastmittelgabe bei abgeknickter Katheternadel führte. Zum anderen führte die manuelle Gabe des Kontrastmittels zu einer unterschiedlich schnellen Kontrastmittelapplikation. Bezüglich letzterem ist der Einfluss auf die Messergebnisse bei einer geschätzten manuellen Applikationsdauer von ca. 4 s und einem Messintervall von 9 s in der DCE-Sequenz als gering zu werten. Mit einer Verfälschung der Werte ist nur dann zu rechnen, wenn die Kontrastmittelapplikation auf den Übergang zweier Messintervalle fällt. Besonders kritisch ist dies hinsichtlich des Parameters  $k^{\text{trans}}$ , da dieser Parameter explizit die Kontrastmittelanflutung wiedergibt. Zur Verbesserung der Methodik könnte der Einsatz eines Perfusors zur Vereinheitlichung der Applikationsgeschwindigkeit und zur gezielten Gabe am Anfang eines Messintervalls beitragen. Problematisch ist die geringe Verfügbarkeit von

MRT- tauglichen Perfusoren, die den speziellen Bedürfnissen einer Kontrastmittelapplikation bei Kleintieren gerecht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit können die eigens erhobenen Parameter nicht abschließend interpretiert werden. Begründet ist dies durch das Fehlen direkter Vergleichsstudien, die die Wirkung einer Radiojodtherapie mittels DCE-MRT untersucht haben. Zum anderen kommen Arbeiten mit ähnlicher Fragestellung zu widersprüchlichen Ergebnissen. Beispielsweise zeigten Studien von de Lussanet *et al.* (de Lussanet et al. 2005) bzw. Intven *et al.* (Intven et al. 2014) eine Abnahme von  $k^{\text{trans}}$  unter Strahlentherapie bzw. neoadjuvanter Chemoradiatio. Diese Ergebnisse würden sich mit der Abnahme von  $k^{\text{trans}}$  und  $K_{\text{ep}}$  eines NIS-positiven MCF-7/hNIS sowie eines NIS-positiven HT-29/hNIS Tumors aus den Therapiegruppen decken. Dem entgegen steht eine Studie von Kim *et al.*, die eine Erhöhung von  $k^{\text{trans}}$  und  $v_e$  bei Zervixkarzinomen unter kombinierter Radiochemotherapie (Kim et al. 2012) aufzeigte. In vorliegender Arbeit zeigten die MCF-7/hNIS Tumoren der Therapiegruppe einen Anstieg von  $v_e$ . Diese Beobachtung entspricht jener von Kim *et al.*, widerspricht aber gleichzeitig einer Arbeit von Ceelen *et al.*, in der eine Abnahme von  $v_e$  unter Therapie beschrieben wird (Ceelen et al. 2006). Die HT-29 Tumoren zeigten keine Abnahme von  $v_e$ . Der abweichende Verlauf der einzelnen Parameter dürfte sich in erster Linie auf die unterschiedliche Wirkung der einzelnen Therapieansätze sowie auf die verschiedenen biologischen Eigenschaften der Tumore zurückführen lassen. Eine Strahlentherapie schädigt abhängig vom Dosis-Zeit-Volumen alle Blutgefäße. Akute Effekte sind erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität aufgrund von endothelialer Zellschädigung und lokaler Entzündung. Chronische Effekte hingegen sind erniedrigte Permeabilität aufgrund einer Verdickung der Zellmembran und extrakapillarer Fibrose mit reduziertem Blutfluss (Byhardt R.W. 1994). Bei Therapieansätzen, die zu einer direkten Zellschädigung bzw. Zerstörung führen, wäre mit einer entzündungsbedingten Hypervaskularisierung im Gewebe bzw. einer Permeabilitätssteigerung durch eine direkte Schädigung der Tumorgefäße zu rechnen. Folglich wäre eine Steigerung von  $k^{\text{trans}}$  zu erwarten, da  $k^{\text{trans}}$  sowohl von der Permeabilität wie auch von der Perfusion abhängig ist (Tofts et al. 1999). Es ist anzunehmen, dass die Effekte einer Chemotherapie denen einer Radiojodtherapie ähneln, da beide eine unmittelbare Zellschädigung verursachen. Hinsichtlich der eigenen Ergebnisse wäre somit am ehesten mit einer Zunahme von  $k^{\text{trans}}$  zu rechnen gewesen, widersprechend zeigten einige Tumoren eine Abnahme von  $k^{\text{trans}}$ . Die im Vorfeld vielversprechenden Parameter maximale

Kontrastmittelkonzentration und Time to Peak brachten in der Auswertung keine Zusatzinformationen.

Bei zukünftigen Studien könnte die Anwendung des *vessel size imaging* (VSI) bedacht werden. Diese Technik kann nichtinvasiv die mittlere Gefäßgröße in soliden Xenotumoren im Mausmodell ermitteln (Persigehl et al. 2013). Damit könnten die in der aktuellen Arbeit erhobenen Parameter zur Abschätzung der Tumervaskularisation und deren Änderung unter Therapie um einen spezifischen Parameter ergänzt werden. Zusätzlich könnte der Einsatz eines makromolekularen Kontrastmittels bedacht werden, da diese hyperpermeable neoplastische Gefäße besser zu charakterisieren vermögen (Ceelen et al. 2006).

Als Konsequenz der diskutierten Sachverhalte ist vom Einsatz der DCE-MRT bei vorliegendem Versuchsaufbau und der gegebenen Fragestellung abzuraten. Die DCE-MRT erfasst primär Veränderungen in der Tumervaskularisation, während eine Radiojodtherapie Apoptose in den Tumorzellen auslöst. Die erfassten Parameter sind deshalb nur bedingt zur Erfassung der zu erwarteten Gewebeparameter geeignet. Neben technischen Problemen bezüglich der Kontrastmittelapplikation sowie der umfangreichen Rohdatenmenge pro Messung ist vor allem die Mehrbelastung der Tiere durch eine stark verlängerte Messzeit- bei eingeschränkter Aussagekraft der erfassten Parameter- kritisch zu betrachten.

## **5.2 Multiparametrische MRT zur Phänotypisierung von Tumoren**

Die verwendete Methodik (DWI und DCE-MRT) zur Phänotypisierung der Tumorentitäten entsprach jener aus Kapitel 5.1. Vor- und Nachteile dieser Techniken sowie mögliche Verbesserungsansätze werden in Kapitel 5.1 diskutiert.

Ziel der Arbeit war es, strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tumortypen mittels multiparametrischer MRT aufzuzeigen und wenn möglich histologisch zu korrelieren.

### **5.2.1 Das Festlegen der ROI und ihr Einfluss auf die erhobenen Parameter**

Die Festlegung der ROI ist bei der Erfassung möglicher phänotypischer Eigenschaften ein entscheidender Schritt. Die ROIs bestimmen die zu vergleichenden Tumorareale und beeinflussen damit maßgeblich die erfassten Unterschiede. Zur optimalen Anlage der ROI zwecks Phänotypisierung von Tumoren besteht bis dato keine Empfehlung. Die daraus resultierende, uneinheitliche Verwendung erschwert die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien. Ein oft verwendeter Ansatz nimmt Bezug auf das sogenannte „*rim enhancing*“ von Tumoren, das durch eine erhöhte Perfusion bzw. Permeabilität im Randbereich des Tumors verursacht wird. Ein Beispiel ist die Arbeit von Galbraith *et al.*, die Tumoren in einen Randbereich (< 2.0 mm vom Rand) und ein Zentrum (> 5.0 mm vom Rand) unterteilt (Galbraith *et al.* 2003) Yuan *et al.* verwenden ein festes Verhältnis zwischen Tumorrand und Zentrum (50/50) (Yuan *et al.* 2011). Aufgrund von eigenen Erfahrungswerten und unter Beachtung vergleichbarer Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit der Randbereich auf 700 µm festgelegt.

Ergänzend könnte in einem zukünftigen Projekt die erneute Auswertung der Daten auf Basis eines „Zwiebelschalenmodells“ (Benjaminsen *et al.* 2004) erfolgen. Das Modell gliedert Tumore in 100 µm breite Schalen, was- im Vergleich zur relativ groben Einteilung zwischen Zentrum und Rand- eine feinere Erfassung möglicher Strukturmerkmale ermöglicht. Zur Beurteilung von Xenotumoren, die in der Regel ein rundes und gleichmäßiges Wachstumsmuster aufweisen, eignet sich dieses Modell im besonderen Maße. Eine weitere Überlegung bestünde darin, ein festes Verhältnis zwischen Rand und Zentrum zu bilden um unterschiedliche Tumolvolumina in die Betrachtung mit einzubeziehen. Die statistische Auswertung eines gemischten Modells zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Abhängigkeiten zwischen Tumorgröße und erfasster Parameter.

### 5.2.2 Ist eine Phänotypisierung mit DCE-MRT und DWI-MRT möglich und korrelieren die gewonnenen Informationen mit der Histologie?

Die DWI-MRT erlaubt Aussagen zur Zelldichte und der Größe des extrazellulären Raumes und findet Anwendung in zahlreichen Studien (Padhani et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit zeigte die BxPC-3 Zelllinie den höchsten ADC-Wert ( $882 \pm 49 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ), während der ADC-Wert für HT-29 ( $751 \pm 39 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) sowie für ML-1 ( $785 \pm 45 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) Tumoren niedriger ausfiel. Dieselbe Tendenz zeichnete sich beim Diffusionsgradienten ab. Ein höherer ADC-Wert ist die Folge einer gesteigerten Diffusionskapazität der Wassermoleküle, die auf einer niedrigeren zellulären Dichte und einer konsekutiven Vergrößerung des extrazellulären Raumes beruht. Die Korrelation zwischen Zelldichte und ADC-Wert konnte von Manenti *et al.* (Manenti et al. 2008) gezeigt werden. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In der Histologie zeigten die ML-1 Tumore Areale mit höherer Zelldichte als entsprechende BxPC-3 Tumoren und korrelierend dazu einen vergleichsweise niedrigeren ADC-Wert ( $882 \pm 49 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  vs.  $785 \pm 45 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ).

Die DCE-MRT ermöglicht Rückschlüsse auf Gewebeeigenschaften wie Angiogenese und Vaskularisation (Jackson et al. 2007). Alle Tumoren zeigten im Randbereich eine erhöhte Perfusionsfraktion, als Folge des oben erwähnten *rim enhancing*. Die Korrelation zwischen der histologisch gewonnenen *microvessel density* (MVD) und verschiedenen DCE-Parametern kam in einer Reihe von Arbeiten zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Barnes et al. 2012). Egeland *et al.* konnten eine hohe Korrelation zwischen histologisch erfasstem und mittels MRT erhobenem Leckagevolumen ( $v_e$ ) nachweisen (Egeland et al. 2009). Bei Auswertung der eigenen Daten unterschied sich die ML-1 Zelllinie am eindrucklichsten von den übrigen Tumorentitäten. Sie zeigte das kleinste  $v_e$  ( $8,8 \pm 2,0 \%$ ) in Verbindung mit der schnellsten Kontrastmittelabflutung  $K_{ep}$  ( $1,440 \pm 0,463 \text{ 1/min}$ ). Zusätzlich zeigten die ML-1 Tumore im Vergleich die kürzeste TTP ( $89 \pm 25 \text{ s}$ ) sowie die niedrigste  $C_{max}$  ( $0,2 \pm 0,07 \text{ mM}$ ). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtungen basiert auf der histologisch gesicherten hohen Zelldichte und dem damit verbundenen kleineren extrazellulären Raum. Diese Eigenschaften haben ein geringeres  $v_e$  zur Folge, das bei vergleichbarer Permeabilität der Tumorgefäße schneller „aufgefüllt“ wird. Dieser Erklärungsansatz würde die kurze TTP sowie die niedrigere  $C_{max}$  erklären. Korrelierend dazu zeigen die BxPC-3 Tumore passend zur niedrigsten Zelldichte den höchsten ADC-Wert sowie das größte  $v_e$  und die höchste  $C_{max}$ . Entgegen der Erwartung und im Widerspruch zur oben

genannten Theorie zeigen die BxPC-3 Tumoren jedoch eine wesentlich kürzere TPP als vergleichbare HT-29 bzw. MCF-7 Tumoren.

Die Zusammenhänge zwischen histologischem Aufbau und erfassten MRT-Parametern können nur durch weitere histologische Aufarbeitung geklärt werden. Dabei ist die Korrelation zwischen MRT-Schichtführung und der histologischen Schnittführung ein wesentliches Problem. Zur Lösung dieses Problems existieren bereits vielversprechende Lösungsansätze (Meyer et al. 2006, Zanzonico 2006, Sinha et al. 2008), die in zukünftigen Projekten zum Einsatz kommen könnten. Ein weiteres Problem besteht in der intermodalen Vergleichbarkeit histologischer Schnitte und funktioneller MRT-Aufnahmen. Die MVD ist ein Maß für die Anzahl histologisch sichtbarer Gefäße. Als Momentaufnahme kann sie keine Aussagen über die dynamisch funktionelle Perfusion treffen, da diese durch temporäre Effekte, wie z.B. durch reaktive Vasokonstriktion, beeinflusst wird. Dementsprechend kann die mittels DCE-MRT erfasste funktionelle Perfusion von der nach histologischer Betrachtung erwarteten Perfusion abweichen, ohne dass die erhobenen DCE-MRT Parameter falsch sein müssen (Mayr et al. 1999, Cheng et al. 2007).

Die vorliegende Arbeit kann das Potenzial multiparametrischer MRT zur Erfassung struktureller Unterschiede einzelner Tumortypen aufzeigen. Dabei unterschieden sich die strukturellen Eigenschaften der ML-1 Tumoren am eindrucklichsten von den übrigen Tumortypen. Zusätzlich gelang es, die mittels MRT erfassten Unterschiede mit histologischen Beobachtungen zu korrelieren. Verbesserte Techniken sowie ein zunehmender Erfahrungsschatz könnten zukünftig wichtige Informationen zur Klassifizierung von Tumoren liefern. Die herausgearbeiteten phänotypischen Unterschiede der Xenotumoren können jedoch nur bedingt auf humane Tumoren übertragen werden, da sie aufgrund ihrer Lokalisation im subkutanen Gewebe ein anderes Wachstumsverhalten aufweisen. Xenotumoren zeigen beispielsweise eine geringere Metastasierungsrate als orthotop wachsende Tumoren (Fogh et al. 1980, Mohammad et al. 1998), darüber hinaus unterscheidet sich das Wachstumsverhalten in der Maus von dem in einem menschlichen Organismus (Frese und Tuveson 2007).

## **6 Zusammenfassung**

### **6.1 Therapiemonitoring zweier unterschiedlicher NIS-positiver Tumorzelllinien durch multiparametrische Magnetresonanztomographie**

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ansprechen einer Radiojodtherapie bei NIS-positiven HT-29/hNIS und MCF-7/hNIS Tumoren mittels multiparametrischer MRT evaluiert. Der Therapieansatz bestand in der spezifischen Aufnahme von  $I^{131}$  über den NIS-Symporter, um in den NIS-positiven Zielzellen Apoptose zu induzieren. Die Apoptoseinduktion ließ sich mittels Histologie nachweisen. Durch die SPECT-CT sowie mittels Histologie konnte in den MCF-7/hNIS Tumoren eine höhere NIS-Expressionsrate als in vergleichbaren HT-29/hNIS Tumoren nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß zeigten die MCF-7/hNIS Tumoren ein besseres Therapieansprechen aufgrund einer höheren  $I^{131}$  Aufnahme. Die MRT gestützte Volumetrie konnte eine deutliche Reduktion der Tumormasse bei MCF-7h/NIS Tumoren nachweisen, wohingegen bei den HT-29/hNIS Tumoren nur eine Wachstumsverzögerung erreicht wurde.

Mit DWI-MRT wurden der ADC-Wert, die Diffusionskonstante, die Pseudodiffusion sowie die Perfusionsfraktion bestimmt. Erwartungsgemäß hatte der ADC-Wert als am besten etablierter Parameter die höchste Aussagekraft. Die MCF-7/NIS Tumoren der Therapiegruppe zeigten einen deutlichen Anstieg des ADC-Wertes, was nach aktuellem Wissensstand einer therapiebedingten Abnahme der Zelldichte entspricht. Bei den HT-29/hNIS Tumoren hingegen führte eine unter Therapie weiterhin zunehmende Zelldichte zu einem Abfall des ADC-Wertes.

Die DCE-MRT lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Begründet ist dies durch ihre Methodik, die primär Änderungen der Tumorvaskularisation erfasst, wohingegen eine Radiojodtherapie mittels Apoptose unmittelbar auf die Zielzellen wirkt. Zusätzlich waren Uneinigigkeiten in der aktuellen Literatur bezüglich der Interpretation der mittels DCE-MRT erhobenen Parameter, sowie die teilweise schwierige technische Umsetzbarkeit im Kleintiermodell problematisch.

Zusammenfassend ist die Tumorvolumetrie nach wie vor der verlässlichste und aussagekräftigste Parameter. Unter den mittels DWI-MRT erhobenen Parametern scheint der ADC-Wert als etablierter und verlässlicher Parameter zum Nachweis einer erfolgreichen

Radiojodtherapie geeignet. Vom Einsatz der DCE-MRT ist bei vorliegender Fragestellung abzuraten.

### **Treatment monitoring of two different NIS-positive tumor cells by multiparametric magnetic resonance imaging**

In this study the response of NIS-positive HT-29 / hNIS and MCF-7 / hNIS tumors treated with radioiodine was evaluated by using multiparametric MRI. The therapeutic approach consisted in the specific uptake of  $I^{131}$  over the NIS symporter to induce apoptosis in the NIS-positive target cells. The induction of apoptosis was proven by histology. Using SPECT-CT and histology, a higher NIS expression rate was detected in the MCF-7 / hNIS tumors than in comparable HT-29 / hNIS tumors. As expected the MCF-7 / hNIS tumors showed a better treatment response due to a higher  $I^{131}$  uptake. The volumetry by MRI was able to demonstrate a significant reduction in tumor mass in MCF-7h / NIS tumors, whereas only a slower growth rate occurred in the HT-29 / hNIS tumors. The ADC value, the diffusion coefficient, the pseudodiffusion and the perfusion fraction were determined with DWI-MRI. Here, the ADC value had the highest significance as the most established parameter. The MCF-7 / NIS tumors in the treatment group showed a significant increase of the ADC value, which corresponds to a therapy induced decrease in cell density. The HT-29 / hNIS tumors however showed an increasing cell density under therapy, resulting in a further drop of the ADC value. Due to the methodology the results of DCE-MRI were inconclusive. The reason for this is that DCE-MRI primarily detects the changes of tumor vascularisation, whereas radioiodine directly affects the targets cells by inducing apoptosis. In addition, disagreements in the current literature regarding the interpretation of the DCE-MRI parameters as well as difficulties concerning the technical feasibility of DCE-MRI in a small animal model were problematic. In summary, the tumor volumetry is still the most reliable and most informative parameter. Among the parameters recorded with DWI-MRI the ADC value, as a well-established parameter, seems suitable for the detection of a successful radioiodine therapy. DCE-MRI has no use in detecting therapy response in the given setting.

## 6.2 Phänotypisierung verschiedener Tumorentitäten mittels multiparametrischer MRT

Die vorliegende Arbeit konnte durch multiparametrische MRT die strukturellen Unterschiede zwischen einzelnen Tumortypen aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurden die vier humanen Tumortypen BxPC-3 (Pankreas), HT-29 (Kolon), MCF-7 (Mamma) sowie ML-1 (Schilddrüse) im Mausxenograftmodell etabliert. Mittels DWI-MRT wurde unter Verwendung des IVIM-Modells der ADC-Wert, die Diffusionskonstante, die Pseudodiffusion sowie die Perfusionsfraktion bestimmt. Auf Basis der DCE-MRT sowie mittels des Tofts-Modell wurden die *transfer constant* ( $k^{\text{trans}}$ ), die *rate constant* ( $K_{\text{ep}}$ ), das Leckagevolumen ( $v_e$ ), die maximale Kontrastmittelkonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) sowie die *time to peak* (TTP) erfasst.

Die BxPC-3 Tumoren zeigten den höchsten ADC-Wert. Ein hoher ADC-Wert drückt eine gesteigerte Diffusionskapazität der Wassermoleküle aus. Diese wiederum ist die Folge einer niedrigeren zellulären Dichte und damit einer konsekutiven Vergrößerung des extrazellulären Raumes. Diese Annahme ließ sich durch eine vergleichsweise geringere Zelldichte der BxPC-3 Tumoren histologisch stützen.

Bezüglich der DCE-MRT Parameter unterschied sich die ML-1 Zelllinie am eindrucklichsten von den übrigen Tumorentitäten. Sie zeigte das kleinste  $v_e$  in Verbindung mit der schnellsten  $K_{\text{ep}}$ . Zusätzlich zeigten die ML-1 Tumoren im Vergleich die kürzeste TTP sowie die niedrigste  $C_{\text{max}}$ . Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtungen stützt sich auf der histologisch gesicherten hohen Zelldichte der ML-1 Tumoren. Die hohe Zelldichte bedingt einen kleineren extrazellulären Raum, welcher durch das Leckagevolumen ( $v_e$ ) repräsentiert wird. Dieser wird bei einer vergleichbaren Permeabilität der Tumorgefäße schneller „aufgefüllt“. Dies würde die kurze TTP sowie die niedrigere  $C_{\text{max}}$  der ML-1 Tumoren erklären. Passend dazu zeigen die BxPC-3 Tumoren mit der niedrigsten Zelldichte, das größte  $v_e$  sowie die höchste  $C_{\text{max}}$ . Entgegen der Erwartung und im Widerspruch zur oben genannten Theorie zeigen die BxPC-3 Tumoren jedoch eine kürzere TPP als vergleichbare HT-29 bzw. MCF-7 Tumoren. Zusammenfassend unterschieden sich die ML-1 Tumoren am eindrucklichsten von den übrigen Tumortypen. Die erfassten DCE-Parameter konnten jedoch nur teilweise mit histologischen Erkenntnissen korreliert werden.

## Phenotyping of different tumors using multiparametric MRI

The present study was able to show structural differences between individual tumor types by using multiparametric MRI. For this purpose four human tumor types e.g. pancreatic (BxPC-3), colon (HT-29), breast (MCF-7) and thyroid (ML-1) were established in a mouse model. For phenotyping, the ADC value, the diffusion coefficient, the pseudodiffusion and the perfusion fraction were determined by using the IVIM model and DWI-MRI. Using DCE-MRI and the Tofts model the transfer constant ( $k^{\text{trans}}$ ), the rate constant ( $K_{\text{ep}}$ ), the leakage volume ( $v_e$ ), the maximum contrast agent concentration ( $C_{\text{max}}$ ) and the time to peak (TTP) were recorded. The BxPC-3 tumors showed the highest ADC value. A high ADC is the expression of an increased diffusion capacity of water molecules based on a lower cellular density and a consecutive increase in the extracellular space. Accordingly, the BxPC-3 tumors showed a lower cell density than comparable ML-1 tumors in histology. Regarding DCE-MRI parameters, the ML-1 cell line differed most clearly from the other tumor entities. It showed the lowest  $v_e$  in combination with the highest  $K_{\text{ep}}$ . In addition, the ML-1 tumors had the shortest TTP and the lowest  $C_{\text{max}}$ . This observation can possibly be explained with a histological confirmed high cell density of the ML-1 tumors. This high cell density results in a smaller extracellular space. The extracellular space that is represented by the leakage volume ( $v_e$ ) is "filled up" faster if the permeability of the tumor vessels is higher, which explains the short TTP and lower  $C_{\text{max}}$  of the ML-1 tumors. Accordingly the BxPC-3 tumors showed the lowest cell density, the highest ADC value, the biggest  $v_e$  and the highest  $C_{\text{max}}$ . Contrary to expectation and opposing to the above-mentioned theory the BxPC-3 tumors showed a shorter TTP than similar HT-29 and MCF-7 tumors. In summary, the ML-1 tumors differed most clearly from the other types of tumors and the acquired MRI parameters could be partially correlated with histological findings.

## **7 Anhang**

### **7.1 Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
%ID	Prozent injizierte Dosis
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADC	apparent diffusion coefficient
AIF	arterial input function
aRta	all- <i>trans</i> -retinoic acid
AUC	area under the curve
CBF	cerebral blood flow
CBV	cerebral blood volume
BOLD	blood oxygenation level dependent functional magnetic resonance imaging
bpm	beats per minute
cm	Zentimeter
D	Diffusionskoeffizient
D*	Pseudodiffusion
DCE	dynamic contrast enhanced
DSC	dynamic-susceptibility contrast
DTPA	Diethylenetriaminpentaessigsäure
DWI	diffusion weighted imaging
EES	extracellular, extravascular space
EESF	extravascular extracellular space fraction
EF	extraction flow
e.g.	exempli gratia
EPI	echo planar imaging
f	Perfusionsfraktion
FA	flip angel
FID	free induction decay
FISP	fast imaging with steady state precession
FLASH	fast low angle shot
FOV	field of view
FSE	fast spin echo

G	Gauge
g	Gramm
Gd	Gadolinium
GRAPPA	generalized autocalibrating partially parallel acquisitions
GvE	Elastica van Gieson
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Hochfrequenz
I	Jod
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
IVIM	IntraVoxel Incoherent Motion
kcps	kilocycle per second
$K_{ep}$	rate constant
kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
$k^{trans}$	transfer constant
$K^{PS}$	endothelial transfer coefficient
MBq	Megabequerell
mg	Milligramm
$mm^3$	Kubikmillimeter
mM	Minimol
mm	Millimeter
MRT	magnet resonance tomography
mT/m	millitesla per meter
MTT	mean transit time
MVD	microvessel density
N	Normalität
NSA	number of signals averaged
NIS	Natrium-Jod-Symporter
PET	positron emission tomography
ppm	parts per million
PER	peak enhancement ratio
PRED	Prednison
$Re^{188}$	Rhenium
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
ROI	region of interest
RSI	relative signal intensity
s	Sekunde
SCID	severe combined immunodeficient

SENSE	sensitivity encoding for fast
SNR	signal to noise ratio
SPAIR	spectral adiabatic inversion recovery
SPECT	single photon emission computed tomography
ST	slice thickness
STIR	short tau inversion recovery
T2w	T2-gewichtet
T	Tesla
TA	time acquisition
Tc	Technetium
TE	time echo
TI	time inversion
TR	time repetition
TSE	turbo spin echo
TTP	time to peak
$V_e$	volume fraction of extracellular, extravascular space
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSI	vessel size imaging

## 7.2 Literaturverzeichnis

- Baish, J. W. and R. K. Jain (2000). "Fractals and cancer." *Cancer Res* **60**(14): 3683-3688.
- Barnes, S. L., J. G. Whisenant, M. E. Loveless and T. E. Yankeelev (2012). "Practical dynamic contrast enhanced MRI in small animal models of cancer: data acquisition, data analysis, and interpretation." *Pharmaceutics* **4**(3): 442-478.
- Bauerle, T., L. Seyler, M. Munter, A. Jensen, K. Brand, K. H. Fritzsche, A. Kopp-Schneider, M. Schussler, H. P. Schlemmer, B. Stieltjes and M. Ganten (2013). "Diffusion-weighted imaging in rectal carcinoma patients without and after chemoradiotherapy: a comparative study with histology." *Eur J Radiol* **82**(3): 444-452.
- Benjaminsen, I. C., K. G. Brurberg, E. B. Ruud and E. K. Rofstad (2008). "Assessment of extravascular extracellular space fraction in human melanoma xenografts by DCE-MRI and kinetic modeling." *Magn Reson Imaging* **26**(2): 160-170.
- Benjaminsen, I. C., B. A. Graff, K. G. Brurberg and E. K. Rofstad (2004). "Assessment of tumor blood perfusion by high-resolution dynamic contrast-enhanced MRI: a preclinical study of human melanoma xenografts." *Magn Reson Med* **52**(2): 269-276.
- Bottomley, P. A., T. H. Foster, R. E. Argersinger and L. M. Pfeifer (1984). "A review of normal tissue hydrogen NMR relaxation times and relaxation mechanisms from 1-100 MHz: dependence on tissue type, NMR frequency, temperature, species, excision, and age." *Med Phys* **11**(4): 425-448.
- Brix, G., W. Semmler, R. Port, L. R. Schad, G. Layer and W. J. Lorenz (1991). "Pharmacokinetic parameters in CNS Gd-DTPA enhanced MR imaging." *J Comput Assist Tomogr* **15**(4): 621-628.
- Byhardt R.W., M. W. T. (1994). *The heart and blood vessels*. St. Louis, Mosby.
- Campbell, L. L. and K. Polyak (2007). "Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?" *Cell Cycle* **6**(19): 2332-2338.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-257.

Ceelen, W., P. Smeets, W. Backes, N. Van Damme, T. Boterberg, P. Demetter, I. Bouckenooghe, M. De Visschere, M. Peeters and P. Pattyn (2006). "Noninvasive monitoring of radiotherapy-induced microvascular changes using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) in a colorectal tumor model." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64**(4): 1188-1196.

Chandarana, H., S. K. Kang, S. Wong, H. Rusinek, J. L. Zhang, S. Arizono, W. C. Huang, J. Melamed, J. S. Babb, E. F. Suan, V. S. Lee and E. E. Sigmund (2012). "Diffusion-weighted intravoxel incoherent motion imaging of renal tumors with histopathologic correlation." *Invest Radiol* **47**(12): 688-696.

Checkley, D., J. J. Tessier, J. Kendrew, J. C. Waterton and S. R. Wedge (2003). "Use of dynamic contrast-enhanced MRI to evaluate acute treatment with ZD6474, a VEGF signalling inhibitor, in PC-3 prostate tumours." *Br J Cancer* **89**(10): 1889-1895.

Chenevert, T. L., P. E. McKeever and B. D. Ross (1997). "Monitoring early response of experimental brain tumors to therapy using diffusion magnetic resonance imaging." *Clin Cancer Res* **3**(9): 1457-1466.

Chenevert, T. L., L. D. Stegman, J. M. Taylor, P. L. Robertson, H. S. Greenberg, A. Rehemtulla and B. D. Ross (2000). "Diffusion magnetic resonance imaging: an early surrogate marker of therapeutic efficacy in brain tumors." *J Natl Cancer Inst* **92**(24): 2029-2036.

Cheng, H. L., C. Wallis, Z. Shou and W. A. Farhat (2007). "Quantifying angiogenesis in VEGF-enhanced tissue-engineered bladder constructs by dynamic contrast-enhanced MRI using contrast agents of different molecular weights." *J Magn Reson Imaging* **25**(1): 137-145.

Chiaradia, M., L. Baranes, J. T. Van Nhieu, A. Vignaud, A. Laurent, T. Decaens, A. Charles-Nelson, P. Brugieres, S. Katsahian, M. Djabbari, J. F. Deux, I. Sobhani, M. Karoui, A. Rahmouni and A. Luciani (2013). "Intravoxel incoherent motion (IVIM) MR imaging of colorectal liver metastases: Are we only looking at tumor necrosis?" *J Magn Reson Imaging*.

de Lussanet, Q. G., W. H. Backes, A. W. Griffioen, A. R. Padhani, C. I. Baeten, A. van Baardwijk, P. Lambin, G. L. Beets, J. M. van Engelshoven and R. G. Beets-Tan (2005).

"Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of radiation therapy-induced microcirculation changes in rectal cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**(5): 1309-1315.

Dietlein, M., J. Dressler, J. Farahati, F. Grunwald, B. Leisner, E. Moser, C. Reiners, H. Schicha, O. Schober and M. German Society of Nuclear (2004a). "[Procedure guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer (version 2)]." *Nuklearmedizin* **43**(4): 115-120.

Dietlein, M., J. Dressler, F. Grunwald, B. Leisner, E. Moser, C. Reiners, H. Schicha, P. Schneider and O. Schober (2004b). "[Guideline for radioiodine therapy for benign thyroid diseases (version 3)]." *Nuklearmedizin* **43**(6): 217-220.

Dietrich, O., S. Heiland and K. Sartor (2001). "Noise correction for the exact determination of apparent diffusion coefficients at low SNR." *Magn Reson Med* **45**(3): 448-453.

Dingli, D., K. W. Peng, M. E. Harvey, P. R. Greipp, M. K. O'Connor, R. Cattaneo, J. C. Morris and S. J. Russell (2004). "Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter." *Blood* **103**(5): 1641-1646.

Dingli, D., S. J. Russell and J. C. Morris, 3rd (2003). "In vivo imaging and tumor therapy with the sodium iodide symporter." *J Cell Biochem* **90**(6): 1079-1086.

Dowlati, A., K. Robertson, M. Cooney, W. P. Petros, M. Stratford, J. Jesberger, N. Rafie, B. Overmoyer, V. Makkar, B. Stambler, A. Taylor, J. Waas, J. S. Lewin, K. R. McCrae and S. C. Remick (2002). "A phase I pharmacokinetic and translational study of the novel vascular targeting agent combretastatin a-4 phosphate on a single-dose intravenous schedule in patients with advanced cancer." *Cancer Res* **62**(12): 3408-3416.

Dvorak, H. F., J. A. Nagy, D. Feng, L. F. Brown and A. M. Dvorak (1999). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* **237**: 97-132.

Dzik-Jurasz, A., C. Domenig, M. George, J. Wolber, A. Padhani, G. Brown and S. Doran (2002). "Diffusion MRI for prediction of response of rectal cancer to chemoradiation." *Lancet* **360**(9329): 307-308.

Egeland, T. A., T. G. Simonsen, J. V. Gaustad, K. Gulliksrud, C. Ellingsen and E. K. Rofstad (2009). "Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of tumors: preclinical validation of parametric images." *Radiat Res* **172**(3): 339-347.

Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe and J. Verweij (2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." *Eur J Cancer* **45**(2): 228-247.

Evelhoch, J. L., P. M. LoRusso, Z. He, Z. DelProposto, L. Polin, T. H. Corbett, P. Langmuir, C. Wheeler, A. Stone, J. Leadbetter, A. J. Ryan, D. C. Blakey and J. C. Waterton (2004). "Magnetic resonance imaging measurements of the response of murine and human tumors to the vascular-targeting agent ZD6126." *Clin Cancer Res* **10**(11): 3650-3657.

Flaherty, K. T., M. A. Rosen, D. F. Heitjan, M. L. Gallagher, B. Schwartz, M. D. Schnall and P. J. O'Dwyer (2008). "Pilot study of DCE-MRI to predict progression-free survival with sorafenib therapy in renal cell carcinoma." *Cancer Biol Ther* **7**(4): 496-501.

Fogh, J., T. Orfeo, J. Tiso, F. E. Sharkey, J. M. Fogh and W. P. Daniels (1980). "Twenty-three new human tumor lines established in nude mice." *Exp Cell Biol* **48**(3): 229-239.

Frese, K. K. and D. A. Tuveson (2007). "Maximizing mouse cancer models." *Nat Rev Cancer* **7**(9): 645-658.

Giacca, A. J. (1996). "Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest." *Semin Radiat Oncol* **6**(1): 46-58.

Goel, A., S. K. Carlson, K. L. Classic, S. Greiner, S. Naik, A. T. Power, J. C. Bell and S. J. Russell (2007). "Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(Delta51)-NIS, an attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene." *Blood* **110**(7): 2342-2350.

Graff, B. A., I. C. Benjaminsen, K. G. Brurberg, E. B. Ruud and E. K. Rofstad (2005). "Comparison of tumor blood perfusion assessed by dynamic contrast-enhanced MRI with tumor blood supply assessed by invasive imaging." *J Magn Reson Imaging* **21**(3): 272-281.

Griswold, M. A., P. M. Jakob, R. M. Heidemann, M. Nittka, V. Jellus, J. Wang, B. Kiefer and A. Haase (2002). "Generalized autocalibrating partially parallel acquisitions (GRAPPA)." *Magn Reson Med* **47**(6): 1202-1210.

Grunwald, G. K., K. Klutz, M. J. Willhauck, N. Schwenk, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, C. Zach, B. Goke, P. S. Holm and C. Spitzweg (2013). "Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy of hepatocellular cancer using a conditionally replicating adenovirus." *Gene Ther* **20**(6): 625-633.

Guiu, B., J. M. Petit, V. Capitan, S. Aho, D. Masson, P. H. Lefevre, S. Favelier, R. Loffroy, B. Verges, P. Hillon, D. Krause and J. P. Cercueil (2012). "Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in nonalcoholic fatty liver disease: a 3.0-T MR study." *Radiology* **265**(1): 96-103.

Haase, A. (1990). "Snapshot FLASH MRI. Applications to T1, T2, and chemical-shift imaging." *Magn Reson Med* **13**(1): 77-89.

Harris, J. J., C. Reynell and D. Attwell (2011). "The physiology of developmental changes in BOLD functional imaging signals." *Dev Cogn Neurosci* **1**(3): 199-216.

Hashizume, H., P. Baluk, S. Morikawa, J. W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain and D. M. McDonald (2000). "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness." *Am J Pathol* **156**(4): 1363-1380.

Hauser, T., M. Essig, A. Jensen, L. Gerigk, F. B. Laun, M. Munter, D. Simon and B. Stieltjes (2013). "Characterization and therapy monitoring of head and neck carcinomas using diffusion-imaging-based intravoxel incoherent motion parameters-preliminary results." *Neuroradiology* **55**(5): 527-536.

He, Z., J. L. Evelhoch, R. M. Mohammad, N. V. Adsay, G. R. Pettit, V. K. Vaitkevicius and F. H. Sarkar (2000). "Magnetic resonance imaging to measure therapeutic response using an orthotopic model of human pancreatic cancer." *Pancreas* **21**(1): 69-76.

Helmlinger, G., P. A. Netti, H. C. Lichtenbeld, R. J. Melder and R. K. Jain (1997a). "Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids." *Nat Biotechnol* **15**(8): 778-783.

- Helmlinger, G., F. Yuan, M. Dellian and R. K. Jain (1997b). "Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation." *Nat Med* **3**(2): 177-182.
- Hendrick, R. E., T. R. Nelson and W. R. Hendee (1984). "Optimizing tissue contrast in magnetic resonance imaging." *Magn Reson Imaging* **2**(3): 193-204.
- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin and R. K. Jain (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4607-4612.
- Ichikawa, S., U. Motosugi, T. Ichikawa, K. Sano, H. Morisaka and T. Araki (2013). "Intravoxel incoherent motion imaging of the kidney: alterations in diffusion and perfusion in patients with renal dysfunction." *Magn Reson Imaging* **31**(3): 414-417.
- Intven, M., O. Reerink and M. E. Philippens (2014). "Dynamic contrast enhanced MR imaging for rectal cancer response assessment after neo-adjuvant chemoradiation." *J Magn Reson Imaging*.
- Jackson, A., J. P. O'Connor, G. J. Parker and G. C. Jayson (2007). "Imaging tumor vascular heterogeneity and angiogenesis using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging." *Clin Cancer Res* **13**(12): 3449-3459.
- Jennings, D., B. N. Hatton, J. Guo, J. P. Galons, T. P. Trouard, N. Raghunand, J. Marshall and R. J. Gillies (2002). "Early response of prostate carcinoma xenografts to docetaxel chemotherapy monitored with diffusion MRI." *Neoplasia* **4**(3): 255-262.
- Jensen, J. H. and J. A. Helpert (2010). "MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis." *NMR Biomed* **23**(7): 698-710.
- Johansen, R., L. R. Jensen, J. Rydland, P. E. Goa, K. A. Kvistad, T. F. Bathen, D. E. Axelson, S. Lundgren and I. S. Gribbestad (2009). "Predicting survival and early clinical response to primary chemotherapy for patients with locally advanced breast cancer using DCE-MRI." *J Magn Reson Imaging* **29**(6): 1300-1307.

Joo, I., J. M. Lee, J. H. Yoon, J. J. Jang, J. K. Han and B. I. Choi (2013). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Intravoxel Incoherent Motion Diffusion-weighted MR Imaging--An Experimental Study in a Rabbit Model." *Radiology*.

Jung, H. I., M. I. Kettunen, B. Davletov and K. M. Brindle (2004). "Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin I." *Bioconjug Chem* **15**(5): 983-987.

Kamel, I. R., D. K. Reyes, E. Liapi, D. A. Bluemke and J. F. Geschwind (2007). "Functional MR imaging assessment of tumor response after 90Y microsphere treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma." *J Vasc Interv Radiol* **18**(1 Pt 1): 49-56.

Kettunen, M. I. and K. M. Brindle (2005). "Apoptosis detection using magnetic resonance imaging and spectroscopy." *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **47**(3-4): 175-185.

Kety, S. S. (1951). "The theory and applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues." *Pharmacol Rev* **3**(1): 1-41.

Kim, J. H., C. K. Kim, B. K. Park, S. Y. Park, S. J. Huh and B. Kim (2012). "Dynamic contrast-enhanced 3-T MR imaging in cervical cancer before and after concurrent chemoradiotherapy." *Eur Radiol* **22**(11): 2533-2539.

Klauss, M., A. Lemke, K. Grunberg, D. Simon, T. J. Re, M. N. Wente, F. B. Laun, H. U. Kauczor, S. Delorme, L. Grenacher and B. Stieltjes (2011). "Intravoxel incoherent motion MRI for the differentiation between mass forming chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma." *Invest Radiol* **46**(1): 57-63.

Klutz, K., M. J. Willhauck, C. Dohmen, N. Wunderlich, K. Knoop, C. Zach, R. Senekowitsch-Schmidtke, F. J. Gildehaus, S. Ziegler, S. Furst, B. Goke, E. Wagner, M. Ogris and C. Spitzweg (2011a). "Image-guided tumor-selective radioiodine therapy of liver cancer after systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene." *Hum Gene Ther* **22**(12): 1563-1574.

Klutz, K., M. J. Willhauck, N. Wunderlich, C. Zach, M. Anton, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Goke and C. Spitzweg (2011b). "Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radionuclide ((131)I, (188)Re) therapy of liver cancer after transcriptionally targeted intratumoral in vivo NIS gene delivery." *Hum Gene Ther* **22**(11): 1403-1412.

Knoop, K., M. Kolokythas, K. Klutz, M. J. Willhauck, N. Wunderlich, D. Draganovici, C. Zach, F. J. Gildehaus, G. Boning, B. Goke, E. Wagner, P. J. Nelson and C. Spitzweg (2011). "Image-guided, tumor stroma-targeted <sup>131</sup>I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery." *Mol Ther* **19**(9): 1704-1713.

Knopp, M. V., F. L. Giesel, H. Marcos, H. von Tengg-Kobligk and P. Choyke (2001). "Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in oncology." *Top Magn Reson Imaging* **12**(4): 301-308.

Knopp, M. V., E. Weiss, H. P. Sinn, J. Mattern, H. Junkermann, J. Radeleff, A. Magener, G. Brix, S. Delorme, I. Zuna and G. van Kaick (1999). "Pathophysiologic basis of contrast enhancement in breast tumors." *J Magn Reson Imaging* **10**(3): 260-266.

Koh, D. M. and D. J. Collins (2007). "Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology." *AJR Am J Roentgenol* **188**(6): 1622-1635.

Koh, D. M., D. J. Collins and M. R. Orton (2011). "Intravoxel incoherent motion in body diffusion-weighted MRI: reality and challenges." *AJR Am J Roentgenol* **196**(6): 1351-1361.

Koh, D. M., E. Scurr, D. J. Collins, A. Pirgon, B. Kanber, N. Karanjia, G. Brown, M. O. Leach and J. E. Husband (2006). "Colorectal hepatic metastases: quantitative measurements using single-shot echo-planar diffusion-weighted MR imaging." *Eur Radiol* **16**(9): 1898-1905.

Kwock, L., J. K. Smith, M. Castillo, M. G. Ewend, S. Cush, T. Hensing, M. Varia, D. Morris and T. W. Bouldin (2002). "Clinical applications of proton MR spectroscopy in oncology." *Technol Cancer Res Treat* **1**(1): 17-28.

Larsson, H. B., M. Stubgaard, J. L. Frederiksen, M. Jensen, O. Henriksen and O. B. Paulson (1990). "Quantitation of blood-brain barrier defect by magnetic resonance imaging and gadolinium-DTPA in patients with multiple sclerosis and brain tumors." *Magn Reson Med* **16**(1): 117-131.

Le Bihan, D., E. Breton, D. Lallemand, M. L. Aubin, J. Vignaud and M. Laval-Jeantet (1988). "Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging." *Radiology* **168**(2): 497-505.

- Le Bihan, D., E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis and M. Laval-Jeantet (1986). "MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders." *Radiology* **161**(2): 401-407.
- Le Bihan, D. and R. Turner (1992). "The capillary network: a link between IVIM and classical perfusion." *Magn Reson Med* **27**(1): 171-178.
- Lemke, A., F. B. Laun, D. Simon, B. Stieltjes and L. R. Schad (2010). "An in vivo verification of the intravoxel incoherent motion effect in diffusion-weighted imaging of the abdomen." *Magn Reson Med* **64**(6): 1580-1585.
- Leu, A. J., D. A. Berk, A. Lymboussaki, K. Alitalo and R. K. Jain (2000). "Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation." *Cancer Res* **60**(16): 4324-4327.
- Lewis, C. E., F. S. Prato, D. J. Drost and R. L. Nicholson (1986). "Comparison of respiratory triggering and gating techniques for the removal of respiratory artifacts in MR imaging." *Radiology* **160**(3): 803-810.
- Li, H., K. W. Peng, D. Dingli, R. A. Kratzke and S. J. Russell (2010). "Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy." *Cancer Gene Ther* **17**(8): 550-558.
- Li, S. P. and A. R. Padhani (2012). "Tumor response assessments with diffusion and perfusion MRI." *J Magn Reson Imaging* **35**(4): 745-763.
- Liimatainen, T., J. M. Hakumaki, R. A. Kauppinen and M. Ala-Korpela (2009). "Monitoring of gliomas in vivo by diffusion MRI and (1)H MRS during gene therapy-induced apoptosis: interrelationships between water diffusion and mobile lipids." *NMR Biomed* **22**(3): 272-279.
- Lorke, D. E., M. Kruger, R. Buchert, K. H. Bohuslavizki, M. Clausen and U. Schumacher (2001). "In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multidrug-resistant human colon cancer cell line." *J Nucl Med* **42**(4): 646-654.
- Lyng, H., O. Haraldseth and E. K. Rofstad (2000). "Measurement of cell density and necrotic fraction in human melanoma xenografts by diffusion weighted magnetic resonance imaging." *Magn Reson Med* **43**(6): 828-836.

Manenti, G., M. Di Roma, S. Mancino, D. A. Bartolucci, G. Palmieri, R. Mastrangeli, R. Miano, E. Squillaci and G. Simonetti (2008). "Malignant renal neoplasms: correlation between ADC values and cellularity in diffusion weighted magnetic resonance imaging at 3 T." *Radiol Med* **113**(2): 199-213.

Mardor, Y., R. Pfeffer, R. Spiegelmann, Y. Roth, S. E. Maier, O. Nissim, R. Berger, A. Glicksman, J. Baram, A. Orenstein, J. S. Cohen and T. Tichler (2003). "Early detection of response to radiation therapy in patients with brain malignancies using conventional and high b-value diffusion-weighted magnetic resonance imaging." *J Clin Oncol* **21**(6): 1094-1100.

Marx, K., D. Moka, K. Schomacker, T. Fischer, B. Gabruk-Szostak, C. Kobe, M. Dietlein and H. Schicha (2006). "Cell death induced by <sup>131</sup>I in a differentiated thyroid carcinoma cell line in vitro: necrosis or apoptosis?" *Nucl Med Commun* **27**(4): 353-358.

Mayr, N. A., H. Hawighorst, W. T. Yuh, M. Essig, V. A. Magnotta and M. V. Knopp (1999). "MR microcirculation assessment in cervical cancer: correlations with histomorphological tumor markers and clinical outcome." *J Magn Reson Imaging* **10**(3): 267-276.

Mazurchuk, R., D. Glaves and D. Raghavan (1997). "Magnetic resonance imaging of response to chemotherapy in orthotopic xenografts of human bladder cancer." *Clin Cancer Res* **3**(9): 1635-1641.

McDonald, D. M. and P. L. Choyke (2003). "Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic." *Nat Med* **9**(6): 713-725.

Meyer, C. R., B. A. Moffat, K. K. Kuszpit, P. L. Bland, P. E. McKeever, T. D. Johnson, T. L. Chenevert, A. Rehemtulla and B. D. Ross (2006). "A methodology for registration of a histological slide and in vivo MRI volume based on optimizing mutual information." *Mol Imaging* **5**(1): 16-23.

Moffat, B. A., T. L. Chenevert, C. R. Meyer, P. E. McKeever, D. E. Hall, B. A. Hoff, T. D. Johnson, A. Rehemtulla and B. D. Ross (2006). "The functional diffusion map: an imaging biomarker for the early prediction of cancer treatment outcome." *Neoplasia* **8**(4): 259-267.

Mohammad, R. M., A. Al-Katib, G. R. Pettit, V. K. Vaitkevicius, U. Joshi, V. Adsay, A. P. Majumdar and F. H. Sarkar (1998). "An orthotopic model of human pancreatic cancer in

severe combined immunodeficient mice: potential application for preclinical studies." *Clin Cancer Res* **4**(4): 887-894.

Montelius, M., M. Ljungberg and E. Forssell-Aronsson (2012a). "Optimal ROI Size for Parameter Determination in IVIM Imaging." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **39**: S389-S389.

Montelius, M., M. Ljungberg, M. Horn and E. Forssell-Aronsson (2012b). "Tumour size measurement in a mouse model using high resolution MRI." *BMC Med Imaging* **12**: 12.

Morelli, J. N., V. M. Runge, F. Ai, U. Attenberger, L. Vu, S. H. Schmeets, W. R. Nitz and J. E. Kirsch (2011). "An image-based approach to understanding the physics of MR artifacts." *Radiographics* **31**(3): 849-866.

Moseley, M. E., J. Kucharczyk, J. Mintorovitch, Y. Cohen, J. Kurhanewicz, N. Derugin, H. Asgari and D. Norman (1990). "Diffusion-weighted MR imaging of acute stroke: correlation with T2-weighted and magnetic susceptibility-enhanced MR imaging in cats." *AJNR Am J Neuroradiol* **11**(3): 423-429.

Mross, K., J. Dreves, M. Muller, M. Medinger, D. Marme, J. Hennig, B. Morgan, D. Lebowitz, E. Masson, Y. Y. Ho, C. Gunther, D. Laurent and C. Unger (2005). "Phase I clinical and pharmacokinetic study of PTK/ZK, a multiple VEGF receptor inhibitor, in patients with liver metastases from solid tumours." *Eur J Cancer* **41**(9): 1291-1299.

Mulkern, R. V., A. S. Barnes, S. J. Haker, Y. P. Hung, F. J. Rybicki, S. E. Maier and C. M. Tempany (2006). "Biexponential characterization of prostate tissue water diffusion decay curves over an extended b-factor range." *Magn Reson Imaging* **24**(5): 563-568.

Mullen, P. (2004). "The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts." *Methods Mol Med* **88**: 287-292.

Mullen, P., A. Ritchie, S. P. Langdon and W. R. Miller (1996). "Effect of Matrigel on the tumorigenicity of human breast and ovarian carcinoma cell lines." *Int J Cancer* **67**(6): 816-820.

Mussurakis, S., D. L. Buckley and A. Horsman (1997). "Dynamic MRI of invasive breast cancer: assessment of three region-of-interest analysis methods." *J Comput Assist Tomogr* **21**(3): 431-438.

Neves, A. A., A. S. Krishnan, M. I. Kettunen, D. E. Hu, M. M. Backer, B. Davletov and K. M. Brindle (2007). "A paramagnetic nanoprobe to detect tumor cell death using magnetic resonance imaging." *Nano Lett* **7**(5): 1419-1423.

Niendorf, T., R. M. Dijkhuizen, D. G. Norris, M. van Lookeren Campagne and K. Nicolay (1996). "Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue: implications for diffusion-weighted imaging." *Magn Reson Med* **36**(6): 847-857.

Oppelt, A., R. Graumann, H. Barfuß, H. Fischer, W. Hartl and W. Schajor (1986). "FISP: eine neue schnelle Pulssequenz für die Kernspintomographie." *Electromedica* **54**: 15-18.

Padhani, A. R. (2003). "MRI for assessing antivasular cancer treatments." *Br J Radiol* **76 Spec No 1**: S60-80.

Padhani, A. R., G. Liu, D. M. Koh, T. L. Chenevert, H. C. Thoeny, T. Takahara, A. Dzik-Jurasz, B. D. Ross, M. Van Cauteren, D. Collins, D. A. Hammoud, G. J. Rustin, B. Taouli and P. L. Choyke (2009). "Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations." *Neoplasia* **11**(2): 102-125.

Partecke, I. L., A. Kaeding, M. Sendler, N. Albers, J. P. Kuhn, S. Speerforck, S. Roese, F. Seubert, S. Diedrich, S. Kuehn, U. F. Weiss, J. Mayerle, M. M. Lerch, S. Hadlich, N. Hosten, C. D. Heidecke, R. Puls and W. von Bernstorff (2011). "In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model." *BMC Cancer* **11**: 40.

Patterson, D. M., A. R. Padhani and D. J. Collins (2008). "Technology insight: water diffusion MRI--a potential new biomarker of response to cancer therapy." *Nat Clin Pract Oncol* **5**(4): 220-233.

Peerlinck, I., A. Merron, P. Baril, S. Conchon, P. Martin-Duque, C. Hindorf, J. Burnet, M. Quintanilla, M. Hingorani, R. Iggo, N. R. Lemoine, K. Harrington and G. Vassaux (2009). "Targeted radionuclide therapy using a Wnt-targeted replicating adenovirus encoding the Na/I symporter." *Clin Cancer Res* **15**(21): 6595-6601.

Pekar, J., C. T. Moonen and P. C. van Zijl (1992). "On the precision of diffusion/perfusion imaging by gradient sensitization." *Magn Reson Med* **23**(1): 122-129.

Penheiter, A. R., S. J. Russell and S. K. Carlson (2012). "The sodium iodide symporter (NIS) as an imaging reporter for gene, viral, and cell-based therapies." *Curr Gene Ther* **12**(1): 33-47.

Penheiter, A. R., T. R. Wegman, K. L. Classic, D. Dingli, C. E. Bender, S. J. Russell and S. K. Carlson (2010). "Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer." *AJR Am J Roentgenol* **195**(2): 341-349.

Persigehl, T., J. Ring, T. Budny, A. Hahnenkamp, S. Stoeppler, L. H. Schwartz, H. U. Spiegel, W. Heindel, S. Remmele and C. Bremer (2013). "Vessel size imaging (VSI) by robust magnetic resonance (MR) relaxometry: MR-VSI of solid tumors in correlation with immunohistology and intravital microscopy." *Mol Imaging* **12**(7): 1-11.

Pickles, M. D., P. Gibbs, M. Lowry and L. W. Turnbull (2006a). "Diffusion changes precede size reduction in neoadjuvant treatment of breast cancer." *Magn Reson Imaging* **24**(7): 843-847.

Pickles, M. D., P. Gibbs, M. Sreenivas and L. W. Turnbull (2006b). "Diffusion-weighted imaging of normal and malignant prostate tissue at 3.0T." *J Magn Reson Imaging* **23**(2): 130-134.

Pinke, L. A., D. S. Dean, E. R. Bergert, C. Spitzweg, C. M. Dutton and J. C. Morris (2001). "Cloning of the mouse sodium iodide symporter." *Thyroid* **11**(10): 935-939.

Professor Dr. Maximilian Reiser, D. D. W. S. (1997). *Magnetresonanztomographie*, Springer Berlin Heidelberg. **3. Auflage**.

Pruessmann, K. P., M. Weiger, M. B. Scheidegger and P. Boesiger (1999). "SENSE: sensitivity encoding for fast MRI." *Magn Reson Med* **42**(5): 952-962.

Quarles, C. C., D. F. Gochberg, J. C. Gore and T. E. Yankeelov (2009). "A theoretical framework to model DSC-MRI data acquired in the presence of contrast agent extravasation." *Phys Med Biol* **54**(19): 5749-5766.

Rubesova, E., A. S. Grell, V. De Maertelaer, T. Metens, S. L. Chao and M. Lemort (2006). "Quantitative diffusion imaging in breast cancer: a clinical prospective study." *J Magn Reson Imaging* **24**(2): 319-324.

Schellenberger, E. A., D. Hogemann, L. Josephson and R. Weissleder (2002). "Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI." *Acad Radiol* **9 Suppl 2**: S310-311.

Schipper, M. L., C. G. Riese, S. Seitz, A. Weber, M. Behe, T. Schurrat, N. Schramm, B. Keil, H. Alfke and T. M. Behr (2007). "Efficacy of 99mTc pertechnetate and 131I radioisotope therapy in sodium/iodide symporter (NIS)-expressing neuroendocrine tumors in vivo." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**(5): 638-650.

Schonberger, J., J. Bauer, T. Spruss, G. Weber, I. Chahoud, C. Eilles and D. Grimm (2000). "Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1." *J Mol Med (Berl)* **78**(2): 102-110.

Schor, A. M., S. Pazouki, J. Morris, R. L. Smither, L. M. Chandrachud and N. Pendleton (1998). "Heterogeneity in microvascular density in lung tumours: comparison with normal bronchus." *Br J Cancer* **77**(6): 946-951.

Seierstad, T., K. Roe and D. R. Olsen (2007). "Noninvasive monitoring of radiation-induced treatment response using proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a colorectal tumor model." *Radiother Oncol* **85**(2): 187-194.

Shinmoto, H., K. Oshio, A. Tanimoto, N. Higuchi, S. Okuda, S. Kuribayashi and R. V. Mulkern (2009). "Biexponential apparent diffusion coefficients in prostate cancer." *Magn Reson Imaging* **27**(3): 355-359.

Sigmund, E. E., G. Y. Cho, S. Kim, M. Finn, M. Moccaldi, J. H. Jensen, D. K. Sodickson, J. D. Goldberg, S. Formenti and L. Moy (2011). "Intravoxel incoherent motion imaging of tumor microenvironment in locally advanced breast cancer." *Magn Reson Med* **65**(5): 1437-1447.

Simpson-Herren, L., P. E. Noker and S. D. Wagoner (1988). "Variability of tumor response to chemotherapy. II. Contribution of tumor heterogeneity." *Cancer Chemother Pharmacol* **22**(2): 131-136.

Sinha, T. K., S. Khatib-Shahidi, T. E. Yankeelov, K. Mapara, M. Ehtesham, D. S. Cornett, B. M. Dawant, R. M. Caprioli and J. C. Gore (2008). "Integrating spatially resolved three-dimensional MALDI IMS with in vivo magnetic resonance imaging." *Nat Methods* **5**(1): 57-59.

Smanik, P. A., K. Y. Ryu, K. S. Theil, E. L. Mazzaferri and S. M. Jhiang (1997). "Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter." *Endocrinology* **138**(8): 3555-3558.

Sopotyk, A. J., F. Rogowski and A. Parfienczyk (2004). "Apoptosis: its pathophysiology and monitoring. The role of apoptosis in the radioiodine therapy of hyperthyroidism." *Nucl Med Rev Cent East Eur* **7**(1): 53-58.

Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert and M. Brennan (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1409-1416.

Spitzweg, C. (2003). "[The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance]." *Internist (Berl)* **44**(4): 396-402, 404-398, 410-391.

Stejskal, E. O. and J. E. Tanner (1965). "Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient." *Journal of Chemical Physics* **42**(1): 288-+.

Sugahara, T., Y. Korogi, M. Kochi, I. Ikushima, Y. Shigematu, T. Hirai, T. Okuda, L. Liang, Y. Ge, Y. Komohara, Y. Ushio and M. Takahashi (1999). "Usefulness of diffusion-weighted MRI with echo-planar technique in the evaluation of cellularity in gliomas." *J Magn Reson Imaging* **9**(1): 53-60.

Sumi, M. and T. Nakamura (2013). "Head and neck tumors: assessment of perfusion-related parameters and diffusion coefficients based on the intravoxel incoherent motion model." *AJNR Am J Neuroradiol* **34**(2): 410-416.

Swinson, D. E., J. L. Jones, D. Richardson, G. Cox, J. G. Edwards and K. J. O'Byrne (2002). "Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables." *Lung Cancer* **37**(3): 235-240.

Szabo, B. K., P. Aspelin, M. K. Wiberg and B. Bone (2003). "Dynamic MR imaging of the breast. Analysis of kinetic and morphologic diagnostic criteria." *Acta Radiol* **44**(4): 379-386.

Szafer, A., J. Zhong and J. C. Gore (1995). "Theoretical model for water diffusion in tissues." *Magn Reson Med* **33**(5): 697-712.

Tan, M. H., N. J. Nowak, R. Loo, H. Ochi, A. A. Sandberg, C. Lopez, J. W. Pickren, R. Berjian, H. O. Douglass, Jr. and T. M. Chu (1986). "Characterization of a new primary human pancreatic tumor line." *Cancer Invest* **4**(1): 15-23.

Theilmann, R. J., R. Borders, T. P. Trouard, G. Xia, E. Outwater, J. Ranger-Moore, R. J. Gillies and A. Stopeck (2004). "Changes in water mobility measured by diffusion MRI predict response of metastatic breast cancer to chemotherapy." *Neoplasia* **6**(6): 831-837.

Therasse, P., S. G. Arbuck, E. A. Eisenhauer, J. Wanders, R. S. Kaplan, L. Rubinstein, J. Verweij, M. Van Glabbeke, A. T. van Oosterom, M. C. Christian and S. G. Gwyther (2000). "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." *J Natl Cancer Inst* **92**(3): 205-216.

Thoeny, H. C. and F. De Keyzer (2007). "Extracranial applications of diffusion-weighted magnetic resonance imaging." *Eur Radiol* **17**(6): 1385-1393.

Thoeny, H. C., F. De Keyzer, R. H. Oyen and R. R. Peeters (2005). "Diffusion-weighted MR imaging of kidneys in healthy volunteers and patients with parenchymal diseases: initial experience." *Radiology* **235**(3): 911-917.

Tofts, P. S., G. Brix, D. L. Buckley, J. L. Evelhoch, E. Henderson, M. V. Knopp, H. B. Larsson, T. Y. Lee, N. A. Mayr, G. J. Parker, R. E. Port, J. Taylor and R. M. Weisskoff (1999). "Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols." *J Magn Reson Imaging* **10**(3): 223-232.

Tomayko, M. M. and C. P. Reynolds (1989). "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice." *Cancer Chemother Pharmacol* **24**(3): 148-154.

Trujillo, M. A., M. J. Oneal, S. McDonough, R. Qin and J. C. Morris (2010). "A probasin promoter, conditionally replicating adenovirus that expresses the sodium iodide symporter (NIS) for radiovirotherapy of prostate cancer." *Gene Ther* **17**(11): 1325-1332.

- Tsao, J. (2010). "Ultrafast imaging: principles, pitfalls, solutions, and applications." *J Magn Reson Imaging* **32**(2): 252-266.
- Turner, R., D. Le Bihan, J. Maier, R. Vavrek, L. K. Hedges and J. Pekar (1990). "Echo-planar imaging of intravoxel incoherent motion." *Radiology* **177**(2): 407-414.
- Tweedle, M. F., P. Wedeking and K. Kumar (1995). "Biodistribution of radiolabeled, formulated gadopentetate, gadoteridol, gadoterate, and gadodiamide in mice and rats." *Invest Radiol* **30**(6): 372-380.
- Uhl, M., U. Saueressig, M. van Buijen, U. Kontny, C. Niemeyer, G. Kohler, K. Ilyasov and M. Langer (2006). "Osteosarcoma: preliminary results of in vivo assessment of tumor necrosis after chemotherapy with diffusion- and perfusion-weighted magnetic resonance imaging." *Invest Radiol* **41**(8): 618-623.
- van Gelderen, P., M. H. de Vleeschouwer, D. DesPres, J. Pekar, P. C. van Zijl and C. T. Moonen (1994). "Water diffusion and acute stroke." *Magn Reson Med* **31**(2): 154-163.
- Verma, S., B. Turkbey, N. Muradyan, A. Rajesh, F. Cornud, M. A. Haider, P. L. Choyke and M. Harisinghani (2012). "Overview of dynamic contrast-enhanced MRI in prostate cancer diagnosis and management." *AJR Am J Roentgenol* **198**(6): 1277-1288.
- Walker-Samuel, S., C. C. Parker, M. O. Leach and D. J. Collins (2007). "Reproducibility of reference tissue quantification of dynamic contrast-enhanced data: comparison with a fixed vascular input function." *Phys Med Biol* **52**(1): 75-89.
- Wang, H. Z., S. J. Riederer and J. N. Lee (1987). "Optimizing the precision in T1 relaxation estimation using limited flip angles." *Magn Reson Med* **5**(5): 399-416.
- Wang, X. Z., B. Wang, Z. Q. Gao, J. G. Liu, Z. Q. Liu, Q. L. Niu, Z. K. Sun and Y. X. Yuan (2009). "Diffusion-weighted imaging of prostate cancer: correlation between apparent diffusion coefficient values and tumor proliferation." *J Magn Reson Imaging* **29**(6): 1360-1366.
- Watanabe, H., M. Kanematsu, S. Goshima, K. Kajita, H. Kawada, Y. Noda, Y. Tatabashi, N. Kawai, H. Kondo and N. Moriyama (2013). "Characterizing focal hepatic lesions by free-breathing intravoxel incoherent motion MRI at 3.0 T." *Acta Radiol*.

Weinmann, H. J., R. C. Brasch, W. R. Press and G. E. Wesbey (1984). "Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent." *AJR Am J Roentgenol* **142**(3): 619-624.

Weissleder, R. and M. J. Pittet (2008). "Imaging in the era of molecular oncology." *Nature* **452**(7187): 580-589.

Woodfield, C. A., G. A. Tung, D. J. Grand, J. A. Pezzullo, J. T. Machan and J. F. Renzulli, 2nd (2010). "Diffusion-weighted MRI of peripheral zone prostate cancer: comparison of tumor apparent diffusion coefficient with Gleason score and percentage of tumor on core biopsy." *AJR Am J Roentgenol* **194**(4): W316-322.

Wyss, M. T., S. Hofer, M. Hefti, E. Bartschi, C. Uhlmann, V. Treyer and U. Roelcke (2007). "Spatial heterogeneity of low-grade gliomas at the capillary level: a PET study on tumor blood flow and amino acid uptake." *J Nucl Med* **48**(7): 1047-1052.

Yabuuchi, H., T. Fukuya, T. Tajima, Y. Hachitanda, K. Tomita and M. Koga (2003). "Salivary gland tumors: diagnostic value of gadolinium-enhanced dynamic MR imaging with histopathologic correlation." *Radiology* **226**(2): 345-354.

Yamada, I., W. Aung, Y. Himeno, T. Nakagawa and H. Shibuya (1999). "Diffusion coefficients in abdominal organs and hepatic lesions: evaluation with intravoxel incoherent motion echo-planar MR imaging." *Radiology* **210**(3): 617-623.

Yang, X. and M. V. Knopp (2011). "Quantifying tumor vascular heterogeneity with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a review." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 732848.

Yankeelov, T. E., M. Lepage, A. Chakravarthy, E. E. Broome, K. J. Niermann, M. C. Kelley, I. Meszoely, I. A. Mayer, C. R. Herman, K. McManus, R. R. Price and J. C. Gore (2007). "Integration of quantitative DCE-MRI and ADC mapping to monitor treatment response in human breast cancer: initial results." *Magn Reson Imaging* **25**(1): 1-13.

Yankeelov, T. E., J. J. Luci, M. Lepage, R. Li, L. Debusk, P. C. Lin, R. R. Price and J. C. Gore (2005). "Quantitative pharmacokinetic analysis of DCE-MRI data without an arterial input function: a reference region model." *Magn Reson Imaging* **23**(4): 519-529.

Yuan, A., C. Y. Lin, C. H. Chou, C. M. Shih, C. Y. Chen, H. W. Cheng, Y. F. Chen, J. J. Chen, J. H. Chen, P. C. Yang and C. Chang (2011). "Functional and structural characteristics of tumor angiogenesis in lung cancers overexpressing different VEGF isoforms assessed by DCE- and SSCE-MRI." *PLoS One* **6**(1): e16062.

Zanzonico, P. B. (2006). "Broad-spectrum multi-modality image registration: from PET, CT, and MRI to autoradiography, microscopy, and beyond." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **1**: 1584-1588.

Zhang, J. L., E. E. Sigmund, H. Chandarana, H. Rusinek, Q. Chen, P. H. Vivier, B. Taouli and V. S. Lee (2010). "Variability of renal apparent diffusion coefficients: limitations of the monoexponential model for diffusion quantification." *Radiology* **254**(3): 783-792.

### **7.3 Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Marc Regier sowie Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Adam für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besondere Dankesworte möchte ich an den Betreuer dieser Arbeit, Herrn Michael Kaul, richten, der sowohl bei fachlichen wie auch persönlichen Problemen stets ein offenes Ohr hatte und mir in dieser Zeit zum Freund wurde. Großer Dank geht an Frau Dr. Eva Koziolk, die trotz wiederholten Fragens und teilweise manuellen Unzulänglichkeiten der meinigen Person (Katheter legen) nur selten verzweifelte. Nicht zu vergessen ist Herr Thomas Ernst, der das Pech hatte, aufgrund räumlicher Nähe viel zu oft Opfer von Fragen bezüglich Formatierung, Formeln und Einheiten zu werden und dennoch niemals die Geduld verlor. Thomas, ohne Dich würde ich noch heute zitieren. Danke Euch Dreien, dass mir das Jahr 2013 in Hamburg, trotz schlimmer persönlicher Tragödien, in guter Erinnerung bleiben wird.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung das Projekt Hamburg nie möglich gewesen wäre.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Philip Konietzke
Geburtsdatum	6. September 1985
Geburtsort	Wiesbaden

### Ausbildung:

1992-2005	Grundschule und Gymnasium in Saarbrücken
08/2005-05/2006	Zivildienst; Deutsches Rotes Kreuz
2006-2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Szeged, Ungarn 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2008-2012	Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.11.2012	Erteilung der Approbation als Arzt
03/2013-06/2016	Promotion am Universitätsklinikum Hamburg „Quantitative Magnetresonanztomographie zur Phänotypisierung und zum Therapiemonitoring verschiedener Tumorarten im Mausxenograftmodell“
02/2014-	Assistenzarzt am Universitätsklinikum Heidelberg; Abteilung, Diagnostische und Interventionelle Radiologie

### **7.5 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....