

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Jens Ricke

**Perfusions-MRT und ^{18}F -FDG-PET zum Monitoring einer Regorafenib-Therapie im
Kolonkarzinom-Modell der Ratte**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lukas Anton Späth
aus Reutlingen
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Clemens Cyran

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Dendorfer
PD Dr. Kerstin Liebler

Mitbetreuer durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Philipp Kazmierczak

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Einleitung.....	8
3. Material und Methoden	11
3.1 Versuchsaufbau	11
3.2 Tumormodell.....	11
3.3 Versuchsprotokoll	13
3.4 Therapie- und Placebogruppe.....	17
3.5 Regorafenib	17
3.6 Positronenemissionstomographie	17
3.7 Dynamische Magnetresonanztomographie	19
3.7.1 3D-View-Sharing-Technik	21
3.7.2 Auswertung der MRT-Daten und kinetische Analyse.....	25
3.8 Histologie	31
3.8.1 Fixierung und Anfertigung der Schnitte.....	31
3.8.2 Immunhistochemie.....	31
3.8.2.1 Anti-CD31-Färbung.....	31
3.8.2.2 Anti-Ki-67-Färbung.....	33
3.8.3 Auswertung der Immunhistochemie.....	33
3.9 Statistische Analyse	35
4. Ergebnisse.....	36
4.1. Ergebnisse Tumorumfänge.....	36
4.2. Ergebnisse Perfusions-MRT.....	37
4.3. Ergebnisse ¹⁸ F-FDG-PET	41
4.4. Ergebnisse Immunhistochemie	43
4.5. Korrelation MRT-Perfusionsparameter mit ¹⁸ F-FDG-PET	44
4.6. Korrelation MRT-Perfusionsparameter und Immunhistochemie.....	45
4.7. Korrelation ¹⁸ F-FDG-PET und Immunhistochemie.....	46

5. Diskussion	47
5.1. Perfusions-MRT	47
5.2. ¹⁸ F-FDG-PET	51
5.3. Limitationen der Studie.....	54
6. Zusammenfassung.....	57
7. Literaturverzeichnis	60
8. Anhang	74
8.1. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	74
8.2. Eidesstattliche Erklärung.....	75
8.3. Danksagung.....	76

1. Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson murine Leukemia viral oncogene Tyrosinkinase
AIF	Arterial Input Function
AUC	Area under the Curve
CD31	Cluster of Differentiation 31
DCE-MRT	Dynamische Magnetresonanztomographie
DWI	Diffusion-weighted magnetic Resonance Imaging
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FDG	¹⁸ F-Fluordesoxyglukose
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
F _p	Plasmafluss
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
iAUC	Initiale Area under the Curve
Jak	Janus Kinase
Ki-67	Antigen Ki-67
KIT	Tyrosinkinase kodiert durch das KIT-Gen
K _{TRANS}	Endothelialer Transferkoeffizient
MTKI	Multityrosinkinaseinhibitor
MTT	Mean Transit Time

OSEM	Ordered Subset Expectation Maximization
PBS	Phosphate buffered Saline
PDGFR	Platelet-derived Growth Factor Receptor
PET	Positronenemissionstomographie
PMI	Platform for Research in Medical Imaging
PS	Permeability Surface Area Product
RAF	Rapidly accelerated Fibrosarcoma
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RET	Receptor Tyrosine Kinase
ROI	Region of Interest
Scr	Sarcoma Tyrosinkinase
SUV _{max}	Maximum Standardized Uptake Value
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Time-to-Echo
TIE 2	Tyrosine Kinase with immunoglobulin-like and EGF-like Domains 2
TR	Time-to-Repeat
TTB	Tumor-to-Background Ratio
TWIST	Time-resolved Angiography with Stochastic Trajectories
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
V _P	Plasmavolumen

2. Einleitung

Mit der Einführung zielgerichteter, molekularer Therapien unterliegt die Behandlung maligner Tumoren großen Veränderungen. Diese zielgerichteten, molekularen Therapien greifen spezifische zelluläre Strukturen an, die vorwiegend in Tumorzellen und weniger in benignen Zellen vorzufinden sind. Diese Therapeutika sind meist kleine Moleküle oder monoklonale Antikörper, die an der Zelloberfläche oder auf intrazellulärer Ebene wirken. Sie können, indem sie mit intrazellulären Enzymen interagieren, Prozesse wie die Gentranskription blockieren. Die Interaktion der Substanz mit der Tumorzelle führt meist nicht zum Zelltod, sondern zu einer Inhibierung der Gewebepfusion, des Zellmetabolismus und letztendlich der Proliferation (1, 2).

Eine Substanzklasse dieser zielgerichteten Therapien sind die anti-angiogenetisch wirkenden Tyrosinkinaseinhibitoren. Tyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle in der inter- und intrazellulären Kommunikation und sind beteiligt an der Embryonalentwicklung, dem Zellmetabolismus und der Zellproliferation, der Angiogenese und dem Immunsystem (3). Eine Überaktivität dieser Tyrosinkinasen kann zu unkontrollierter Zellproliferation und somit zu Malignomen führen. Weiterhin können Tyrosinkinasen in Rezeptortyrosinkinasen und zelluläre Tyrosinkinasen unterteilt werden. Die Rezeptortyrosinkinasen besitzen eine nach extrazellulär reichende Domäne und können somit mit Wachstumsfaktoren in Interaktion treten, was zu einer Aktivierung der intrazellulären katalytischen Domäne und letztendlich zur Signaltransduktion führt (3). Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen beinhaltet unter anderem Proteine wie den EGFR, den PDGFR und den VEGFR. Zelluläre Tyrosinkinasen wie zum Beispiel Abl-, Src- und Jak-Kinasen können von vorgeschalteten Signalmolekülen unter anderem von Rezeptoren des Immunsystems oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden (3). Der GIST ist der erste Tumor, der erfolgreich mit dem oralen Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, bekannt aus der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie, behandelt

wurde (1, 4). Weitere, unter anderem anti-angiogenetisch wirkende Tyrosinkinaseinhibitoren, zeigten Effektivität in der Behandlung des Mammakarzinoms, des Nierenzellkarzinoms sowie des Kolonkarzinoms (5-7).

Anti-angiogenetische Therapien mit oralen MTKI, wie beispielsweise mit Sorafenib oder dem im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Regorafenib, zeigten in verschiedenen experimentellen Tumormodellen anti-angiogenetische sowie antiproliferative Effekte auf das Nierenzellkarzinom, das medulläre Schilddrüsenkarzinom, das hepatozelluläre Karzinom und Weichteilsarkome wie das Leiomyosarkom und das Synovialsarkom (8-12). Regorafenib ist bereits für die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms in Deutschland zugelassen (13, 14).

Im Gegensatz zu den neueren zielgerichteten Therapeutika zielt die klassische zytotoxische Chemotherapie auf eine Inhibierung der Zellteilung und des Zellwachstums ab. Somit sind von dieser Inhibierung nicht nur maligne Zellen betroffen, sondern generell proliferierende Zellen. Um auch die zuvor nicht in der Metaphase der Zellteilung befindlichen Tumorzellen miterfassen zu können besteht die zytotoxische Therapie typischerweise aus mehreren Zyklen. Der hierdurch induzierte Zelltod führt zu einer Schrumpfung des Tumors. Dies ermöglicht das Ansprechen der Therapie mit morphologiebasierten bildgebenden Verfahren zu erfassen (15). Zur standardisierten Beurteilung des Ansprechens auf eine zytotoxische Behandlung wurden 2000 die RECIST-Kriterien eingeführt (16). Hierbei wird anhand der Tumorgöße durch die Bestimmung von Zielläsionen der Verlauf der Erkrankung bestimmt. Mit der Evaluierung dieser Zielläsionen erfolgt die Kategorisierung in komplettes Ansprechen (Verschwinden aller Zielläsionen), partielles Ansprechen (Reduktion der Tumordurchmesser um mindestens 30 %), fortschreitende Erkrankung (mindestens 20 % Zunahme des Tumordurchmessers) und stabile Erkrankung (weder partielles Ansprechen noch fortschreitende Erkrankung) (15-17).

Die RECIST-Kriterien wurden primär für die Therapieüberwachung zytotoxischer Therapeutika entwickelt. Sie können somit nicht auf alle dieser neuen zielgerichteten Therapien angewandt werden, da sie meist nicht den Zelltod zur Folge haben, sondern auf die Angiogenese und den Zellmetabolismus wirken. Die Folge ist, dass die Tumorgöße meist konstant bleibt oder sich sogar vergrößern kann (1, 18), besonders in den frühen Phasen der Behandlung (19). Um frühe Therapieeffekte und eine Differenzierung des Ansprechens einer solchen molekularen Therapie erfassen zu können, zeigen morphologische Regressionskriterien keine ausreichende Sensitivität (17, 20).

Mit funktionellen und molekularen bildgebenden Verfahren wie der DCE-MRT und der PET können Parameter der Mikrozirkulation und des Glukosemetabolismus dargestellt werden (21).

Das multiparametrische Hybridverfahren, bestehend aus einer Kombination dieser beiden Modalitäten (MRT und PET), ermöglicht eine nicht-invasive Visualisierung eines Tumors auf morphologischer, funktioneller und molekularer Ebene und erlaubt Rückschlüsse auf die Tumurvitalität und die Angiogenese (22, 23).

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die DCE-MRT und PET zum Monitoring der frühen Therapieeffekte einer Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell eingesetzt werden kann. Ziel dieser Studie war die nicht-invasive Evaluierung funktioneller Parameter der Tumormikrozirkulation als Imaging Biomarker für das Ansprechen einer Regorafenib-Therapie auf ein experimentelles Kolonkarzinom-Xenograft-Modell mit immunhistochemischer Validierung.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau



Abbildung 1: **Zeitstrahl der Studie.** Nach Injektion und Kultivierung der Tumoren erfolgte an Tag 0 die Baseline-Messung (DCE-MRT und PET), Therapie (Tag 1-6), Follow-Up-Messung an Tag 7 (DCE-MRT und PET) und Entnahme der Tumoren für die histologische Auswertung.

3.2 Tumormodell

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erfolgte durch die Regierung von Oberbayern (Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Lebensmittelhygiene Sachgebiet 54) unter der Tierversuchsnummer Gz.55.2-1-54-2532-33-10. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte gemäß § 2 des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierordnung.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 17 weibliche, sieben bis acht Wochen alte, athymische Nacktratten (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN). Aufgrund der verminderten T-Zell-vermittelten Immunität bieten athymische Tiere sehr gute Bedingungen für Tumor-Xenografts (24).

Zum Zeitpunkt der Inokulation besaßen die Versuchstiere ein Körpergewicht von 180 bis 200 g. Die Tiere wurden im Tierstall des Labors für Experimentelle Radiologie des Instituts für Klinische Radiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,

FACR, FRCR) in einem Uni Protect Luftstromschrank (EHRET, Emmendingen, Deutschland) bei 29 °C, 50-60 % Luftfeuchtigkeit und einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h gemäß den Leitlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA, 2008) gehalten (25). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser und sterilem Standardfutter für Zuchthaltung (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN).

Als Tumormodell diente die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 (ATTCC HTB-38, Wesel, Deutschland). Alle Arbeiten mit den Tumorzellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in oberflächenbehandelten Zellkulturschalen mit dem Zellmedium Mc Coy 5 A mit 10 Vol.-% fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Kulturen wurden alle zwei Tage passagiert. Hierbei wurden zunächst die adhärenenten Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS pH 7,4; GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung für zwei Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die so von der Kulturschale gelösten Zellen wurden zentrifugiert und das Sediment mit frischem Medium auf neue Zellkulturschalen verteilt.

Vor der Inokulation der Tumorzellen in die Versuchstiere wurden diese einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit Trypsin/EDTA inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden in einer Mischung aus 50 µl Kultivierungsmedium und 50 µl Trypanblau angefärbt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wobei blau angefärbte und somit als apoptotisch erkennbare Zellen nicht mitgezählt wurden.

Zunächst wurden die Versuchstiere mit einem 5 %-Isofluran-Sauerstoffgemisch narkotisiert. Für die Inhalationsnarkose wurde die Schnauze des Versuchstieres in einen kleinen, mit einer Latexmembran bespannten Plastiktrichter mit Anschlüssen für einen Isofluran-Verdampfer und einen CO₂-Absorber gelegt. Die Narkose wurde dann mit

einem 2 %-Isofluran-Sauerstoffgemisch während der Implantation fortgeführt. Nach Desinfektion der Haut wurden 2×10^6 Tumorzellen in einer 0,5 ml 1:1 Mischung aus PBS und Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) subkutan auf Höhe der linken Flanke mit einer 1 ml Insulinspritze appliziert.

Für die Dokumentation des Wachstums wurden die subkutanen Tumoren täglich mit einer Schieblehre vermessen. Das Tumolvolumen wurde mit der Formel Länge x Breite² x 0,5 berechnet. Bei Erreichen einer Größe von 800 mm³ wurde mit dem Versuchsprotokoll (s. 3.3) begonnen.

Vor Beginn der Experimente erfolgten tägliche Gewichtskontrollen, um den Gesundheitszustand der Versuchstiere zu überwachen. Für die korrekte, gewichtsadaptierte Abmessung der zu applizierenden Medikamente und Substanzen, erfolgten an den Therapietagen ebenfalls tägliche Gewichtskontrollen.

3.3 Versuchsprotokoll

60 min vor Beginn der PET-Datenakquisition wurden 50 MBq ¹⁸F-FDG in 500 µl isotoner Kochsalzlösung mit einer 25-G-Kanüle in die Peritonealhöhle der Versuchsratten in kurzer 2 %-Isoflurannarkose appliziert. Anschließend fand eine Gegenmessung genannter Materialien statt, um Restaktivität in der Spritze und Kanüle zu erfassen. Nach erneuter Narkotisierung wurde für die spätere Injektion des MRT-Kontrastmittels ein 25-G-Schwanzvenenkatheter gelegt.

Zur Infektionsprophylaxe der immunschwachen Versuchstiere und um das Risiko einer Kontamination zwischen verschiedenen Tierställen zu vermindern, wurden die Tiere in eine Plexiglasröhre (Spezialanfertigung, Haustechnik Klinikum der Universität München, Deutschland) in Bauchlage gebettet (Abb 2). Diese verfügte über Anschlüsse für einen CO₂-Absorber und für den Isofluran-Verdampfer. Somit konnte

während der PET- und der MRT-Messung die Inhalationsnarkose kontinuierlich aufrechterhalten werden.



Abbildung 2: **Positionierung des Versuchstieres (1) in der Plexiglasröhre (2)** mit Anschlüssen für einen Isofluran-Verdampfer (3) und einen CO₂-Absorber (4) für die Aufrechterhaltung der Narkose während der Versuche.

Nach Transport der Plexiglasröhre mit dem darin befindlichen Versuchstier in die Räumlichkeiten der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. P. Bartenstein) erfolgte die Akquisition der PET-Daten mit Listmodemessung für 30 min (15 min Transmission, 15 min Emission) (Abb. 3). Für die Schwächungskorrektur erfolgte die Akquirierung der Transmissionsdaten mit einer rotierenden ⁵⁷Co-Quelle (26).

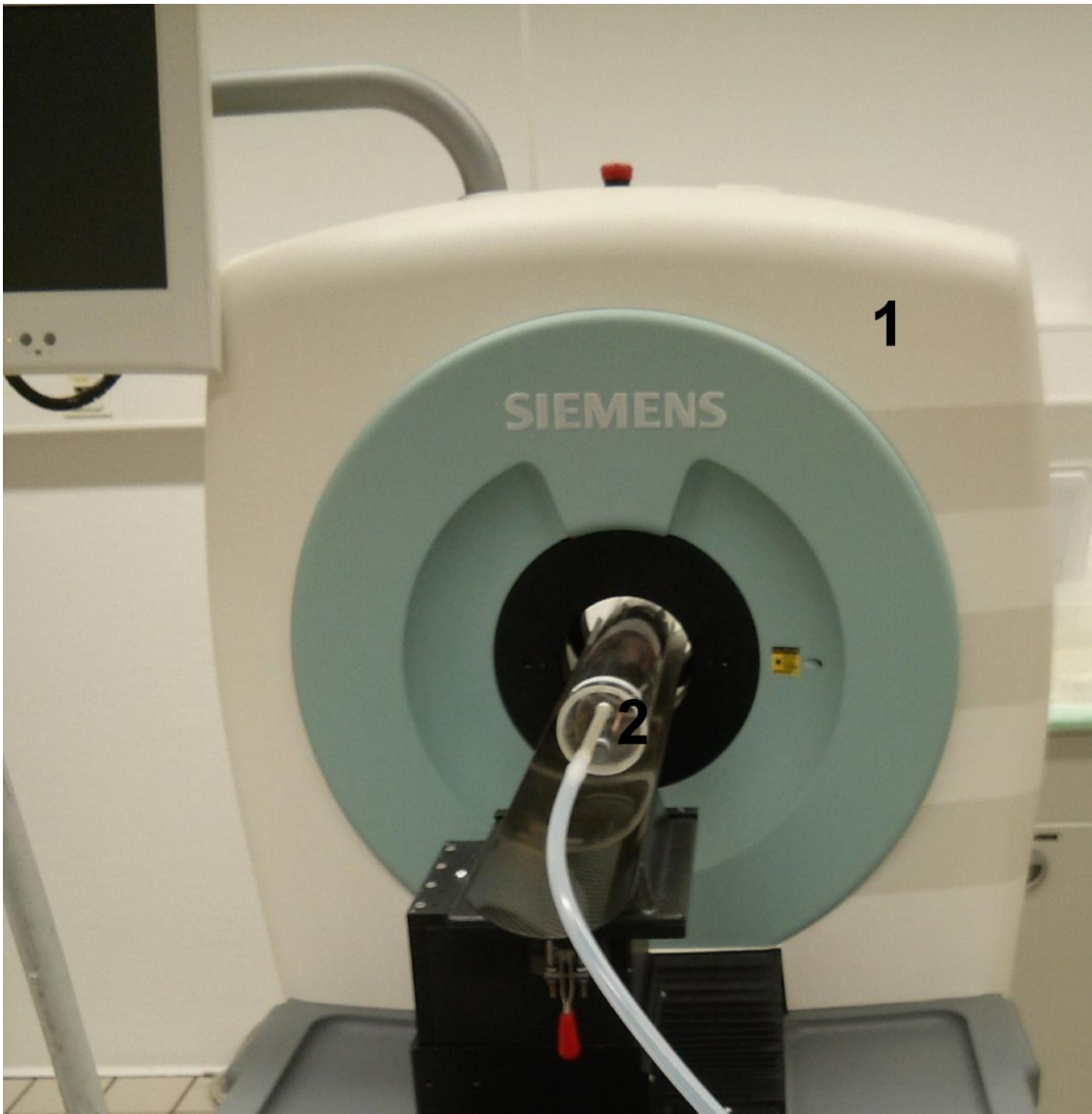


Abbildung 3: **PET-Versuchsaufbau** Inveon Micro PET (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) (1).
Plexiglasröhre mit Versuchstier (2).

Nach Entgegennahme des Versuchstieres an der Schleuse zum Versuchslabor der Nuklearmedizin wurde das Tier, unter ständiger Aufrechterhaltung der Narkose, in die Untersuchungsräumlichkeiten des Instituts für Klinische Radiologie gebracht, wo die DCE-MRT durchgeführt wurde (Abb. 4). Sowohl die PET- als auch die MRT-Untersuchungen wurden an Tag 0 und 7 eines einwöchigen, täglichen Therapieprotokolls mit dem Therapeutikum Regorafenib (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) oder einem Placebo, durchgeführt. Nach Komplettierung der Messungen an Tag 7 wurden die Versuchstiere mit einer kardialen Injektion einer KCl-Lösung getötet. Die Tumoren wurden reseziert und in 4 % wässriger Formaldehydlösung fixiert, anschließend der immunhistochemischen Analyse zugeführt.

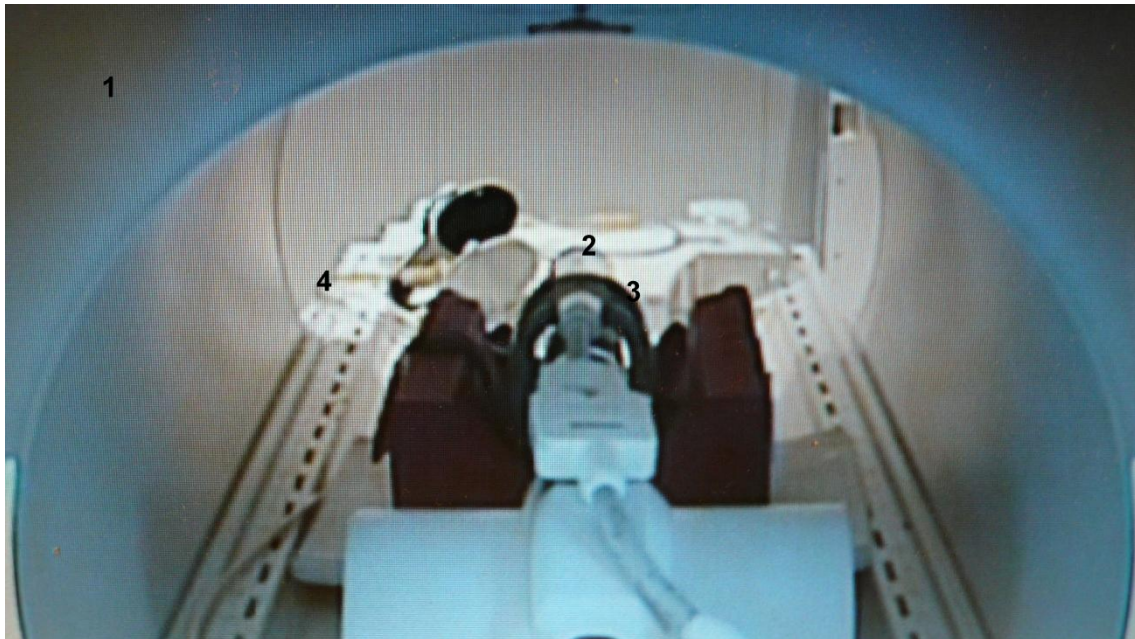


Abb. 4: **MRT-Versuchsaufbau.** Magnetom Verio (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) (1), Plexiglasröhre mit Versuchstier (2), Handgelenk-Spule (3), Leitungen für Kontrastmittel und Narkosegas (4).

3.4 Therapie- und Placebogruppe

Die Zuteilung der Tiere erfolgte randomisiert in die Therapie- (n=10) bzw. Placebogruppe (n=7). Die Therapietiere wurden an Tag 1 bis Tag 6 mit 10 mg/kg KG Regorafenib durch eine 16-G-Magensonde in kurzzeitiger Isoflurannarkose, behandelt. Hierzu wurden 2 mg Regorafenib in 0,35 ml einer Mischung aus Polyethylenglycol (Pluronic F 68, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) und destilliertem Wasser gelöst (Lösungsverhältnis: 42,5/42,5/15 %). Die Kontrollgruppe erhielt eine volumenäquivalente Dosis des Lösungsmittels.

3.5 Regorafenib

Regorafenib (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) ist ein oraler Diphenylharnstoff-Multikinase-Inhibitor, der angiogene VEGFR 1-3, TIE 2, stromale PDGFR- β , FGFR und onkogene KIT-, RET- und RAF-Rezeptortyrosinkinasen inhibiert (9, 27). Hierdurch wird eine anti-angiogenetische und proapoptotische Wirkung induziert mit der Folge einer Reduktion der Tumolvaskularisierung (28). Seit 2013 ist es in Europa für die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen (13).

3.6 Positronenemissionstomographie

Die PET-Untersuchungen erfolgten an einem microPET-Scanner (Inveon, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin (Abb. 3). Die PET-Daten wurden mit einem OSEM 3D-Algorithmus mit einer 128 x 128 Matrix rekonstruiert. Die Prozessierung der Daten erfolgte an einer Inveon-Arbeitsstation (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Die Bilder (Abb. 5) wurden mit Hilfe der Software Vinci 4.07 (Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung, Köln, Deutschland) analysiert. Es wurde ein Verhältnis der

mittleren ^{18}F -FDG-Aufnahme des Tumorgewebes zu Umgebungsgewebe (TTB) berechnet. Hierzu wurde das zu messende Tumorareal (Region-of-Interest, ROI) in einer axialen Schnittebene auf Höhe des maximalen Tumordurchmessers, in die äußeren 3 mm des Tumors eingezeichnet, da dort vitales Tumorgewebe nicht durch einen erhöhten interstitiellen Druck oder Nekrosen, die oft im Zentrum des Tumors nachzuweisen sind, beeinflusst wird (29). Für die Bestimmung der mittleren Aufnahme des Umgebungsgewebes wurde eine zirkuläre, 7 mm im Durchmesser messende ROI in den rechten Leberlappen, ebenfalls in axialer Schnitfführung, gezeichnet.

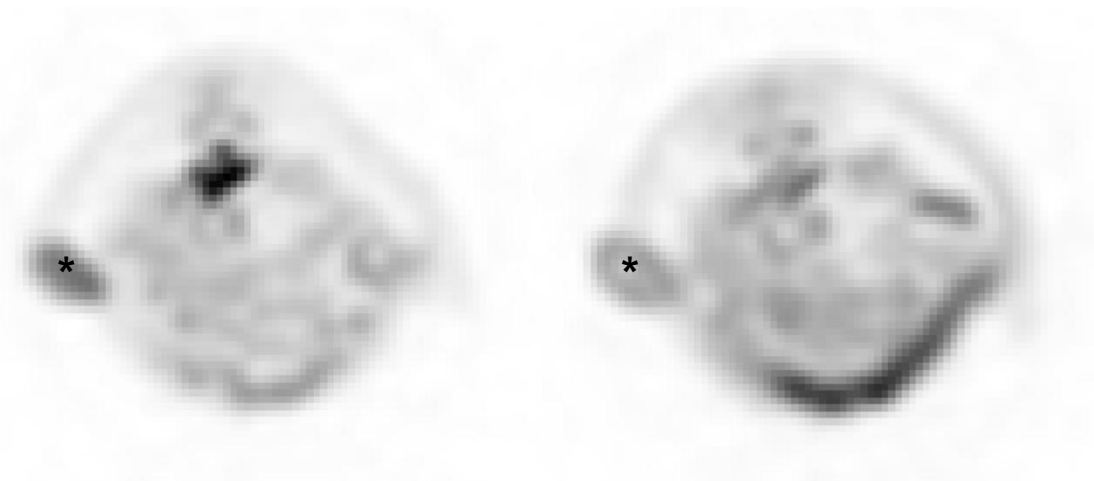


Abbildung. 5: **Repräsentative Bilder der ^{18}F -FDG-PET** des untersuchten humanen Kolonkarzinom-Xenograft-Transplantats (*), in axialer Schnitfführung, vor Therapie (linkes Bild) und nach sechstägiger Therapie mit Regorafenib (rechtes Bild) mit erkennbarer Reduktion des FDG-Uptakes.

3.7 Dynamische Magnetresonanztomographie

Die MRT-Untersuchungen erfolgten an einem klinischen 3-Tesla-Ganzkörpergerät (Magnetom Verio, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Es wurde eine Handgelenk-Spule mit vier Kanälen (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) verwendet (Abb. 4).

Für die MRT-Perfusionsmessung wurde Gadobutrol (Gadovist, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein extrazelluläres, makrozyklisches, paramagnetisches Kontrastmittel mit einem Molekulargewicht von 0,6 kDa (30). Gadolinium-basierte Kontrastmittel bewirken eine Reduktion der T1-Relaxationszeit und eignen sich somit für eine hohe zeitliche Auflösung in der MR-Angiographie (31).

Zu Beginn der Untersuchung wurden Localizer-Aufnahmen des Versuchstieres durchgeführt, um die Lokalisation des Tumors und die Positionierung des zu untersuchenden Areals vornehmen zu können. Hierbei wurde jeweils ein sagittales, coronares und axiales Bild in Single-Shot-Technik akquiriert. Das Untersuchungsareal wurde so gewählt, dass sowohl die Leber als auch die Nieren abgebildet waren.

Für die Bestimmung der Tumorgöße wurde eine T2-gewichtete 2D-Turbo-Spin-Echo-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 5470 ms und einer Echozeit (TE) von 91 ms verwendet. Die Ortsauflösung betrug 0,3 x 0,3 mm bei einer resultierenden Matrixgröße von 192 x 192 (Frequenzkodierung x Phasenkodierungen) und einer rekonstruierten Schichtdicke von 1,5 mm (s.Abb. 6).

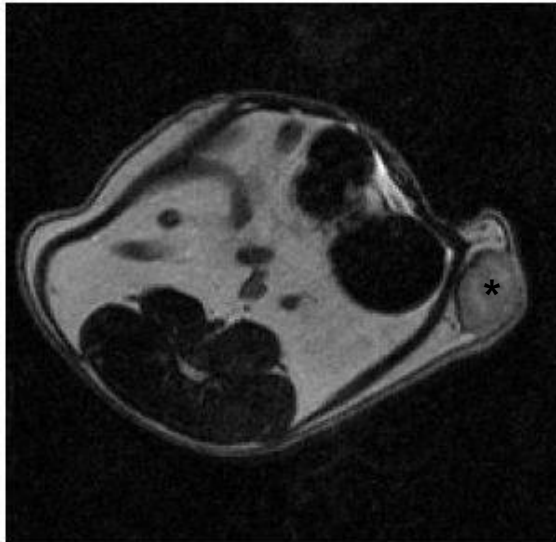


Abbildung 6: **Repräsentatives T2-gewichtetes MRT-Bild des untersuchten humanen Kolonkarzinom-Xenografts (*)**, in axialer Schnitfführung, für die Bestimmung der Tumorgöße.

Im Anschluss wurde eine 3D-View-Sharing-Sequenz (TWIST, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) gestartet. Nach Akquirierung der ersten zehn Datensätze als Nullmessung erfolgte die Applikation eines standardisierten Kontrastmittelbolus von 0,1 mmol/kg Körpergewicht Gadobutrol (s. 3.7.2) mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 7,2 ml/min mit einer automatischen Injektionspumpe (Harvard Apparatus PHD2000 series, Holliston, MA). Für die Leermessung, Messung der Kontrastmittelpassage sowie der Gewebe-Kontrastmittelaufnahme wurden insgesamt 300 3D-Datensätze akquiriert. Die Untersuchungsparameter waren wie folgt: Time-to-Acquisition inklusive Post-Processing 10:13 min davon 6:30 min (300 x 1,3s) Perfusionsmessung, TR 6,34 ms, TE 2,11 ms, Flipwinkel 40°, Messfeld 50 x 50 mm², Messmatrix 128 x 128 und einem Field-of-View von 0,39 x 0,39x 3,0 mm³. Die Empfänger-Bandbreite betrug 180 Hz/Pixel.

3.7.1 3D-View-Sharing-Technik

Die Hauptanforderung an eine DCE-MRT besteht in der Darstellung einer hohen zeitlichen Auflösung bei höchstmöglicher räumlicher Auflösung. Um dies zu gewährleisten, wird bei der View-Sharing-Technik die Methode der partiellen k-Raum-Auslesung verwendet. Der k-Raum ist eine Rohdatenmatrix, in der die digitalisierten MRT-Signale während der Datenakquisition gespeichert werden. Nach Beendigung des Scans werden die Daten des k-Raums durch Fourier-Transformation in das eigentliche MRT-Bild umgewandelt (32). Das Prinzip der partiellen k-Raum-Auslesung beruht darauf, dass während der Akquisition einer dynamischen Serie der äußere Teil der Rohdatenmatrix (Region B), der im Wesentlichen für die räumliche Auflösung des MRT-Bildes bestimmend ist, nur beim ersten oder letzten Bild vollständig ausgelesen wird. Im Gegensatz dazu wird bei allen anderen Bildern der zentrale Anteil des k-Raums (Region A), der hauptsächlich die zeitliche Auflösung kodiert, vollständig, Region B jedoch nur teilweise ausgelesen. Die fehlenden Punkte in Region B werden aus dem vorherigen Bild (forward data-sharing) oder dem nachfolgenden (backward data-sharing) kopiert (Abb. 7). Der Vorteil dieser Technik ist eine Reduktion der Untersuchungszeit und ermöglicht die Darstellung sich schnell verändernder Signale, zum Beispiel während der Kontrastmittelpassage, ohne dabei auf eine hohe räumliche Auflösung verzichten zu müssen (33, 34).

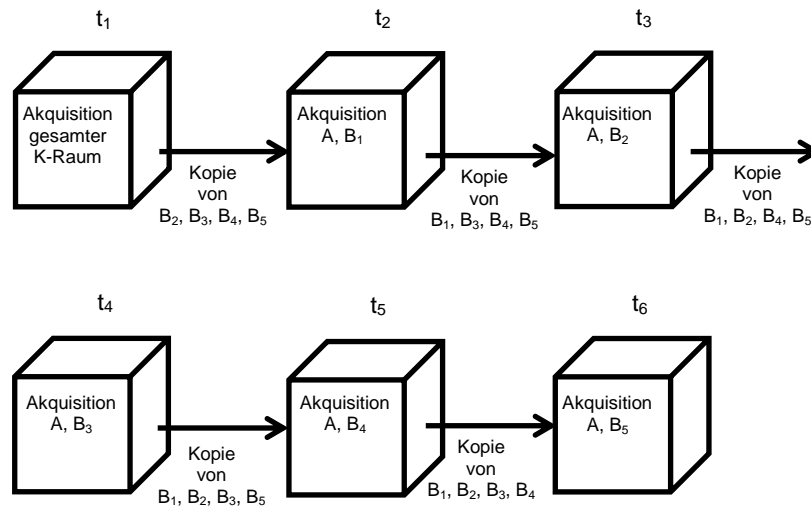


Abbildung 7: **Darstellung einer 3D-Bildserie unter Verwendung der View-Sharing-Technik.** Der gesamte k-Raum wird nur während der ersten Akquisition ($t = t_1$) ausgelesen. Danach wird für jedes Bild die gesamte Region A, aber nur einer der B-Trajektoren ausgelesen. Die fehlenden Bereiche von B werden in diesem beispielhaften Schema aus dem vorherigen Bild kopiert (in Anlehnung an (34)).

Die Auswertung des k-Raumes wird nach Song et al. (34) wie folgt beschrieben. Stellt man sich den k-Raum als dreidimensionales Koordinatensystem vor, erfolgt die Ausleserichtung entlang der x-Koordinate (K_x) und die Richtungen der Phasenkodierung (Phase-Encoding, PE) entlang der y- (K_y) bzw. der z-Koordinaten (K_z). Alle Punkte in der PE-Ebene werden zunächst aufsteigend nach der radiären Entfernung vom Ursprung $k_r = \sqrt{k_y^2 + k_z^2}$, dann aufsteigend nach Größe des Azimutwinkels Θ ($0 \leq \Theta \leq 2\pi$), der entgegengesetzt zum Uhrzeigersinn, ausgehend von K_y gemessen wird, angeordnet. Die auf diese Weise sortierten Punkte werden entlang einer kritischen Distanz vom Ursprung K_c in die zwei Regionen A ($k_r < K_c$) und B ($k_r \geq K_c$) geteilt. Weiterhin wird jeder Punkt in Region B einer separaten Untergruppe (Trajektor) gleicher Größe zugeteilt (B_1, B_2, \dots, B_N) (Abb. 8). Die Auslesung des k-Raums (Abb. 9) beginnt am äußeren Rand von Region A ($k_r \approx K_c$) mit allen ungeraden Punkten (k_r, Θ). Sobald das kleinste k_r erreicht ist, wird die Ausleserichtung umgedreht und alle geraden Punkte werden erfasst bis wiederum der äußere Rand von Region A erreicht ist. Daraufhin werden in Region B alle ungeraden Punkte des Trajektors B_1 bis zum Erreichen des größten k_r -Wertes ausgelesen und auf dem Rückweg zu K_c wiederum nur alle geraden Punkte. Demnach wird Region A zu jedem Zeitpunkt vollständig, Region B nur teilweise ausgelesen (34).

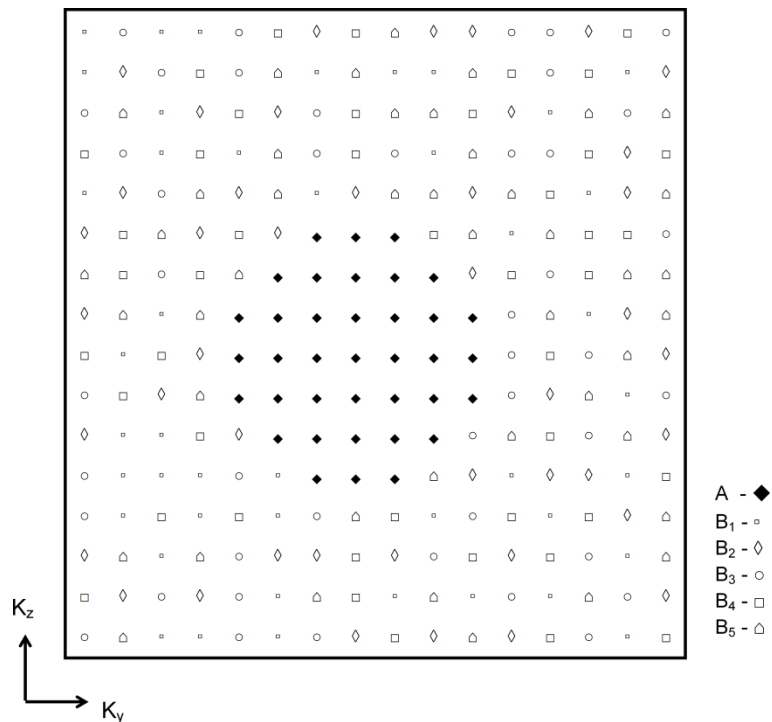


Abbildung 8: **Schematische Darstellung der Phasenkodierungsebene** mit 16 x 16 Punkten unterteilt in Region A und Region B. Region B ist nochmals unterteilt in fünf gleichgroße Trajekturen (B_1, B_2, B_3, B_4, B_5) mit $p_B=0,2$ (in Anlehnung an (34)).

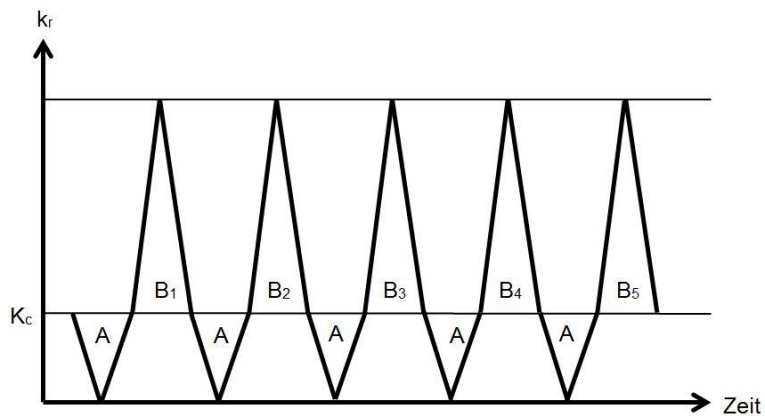


Abbildung 9: **Darstellung des Auslesewegs des k-Raumes während der View-Sharing-Sequenz.** Unterteilung des k-Raums in Region A und Region B anhand einer vorher festgelegten Distanz vom Ursprung (K_c). Die Auslesung beginnt am Rand von Region A ($k_r = K_c$) bis zum Erreichen des kleinsten k_r und geht von dort wieder zurück bis K_c . Die Punkte in Region B werden zuerst mit ansteigendem k_r , anschließend in gegengesetzter Richtung ausgelesen. Region B wird nur partiell, ein Trajektor ($B_1 - B_n$) pro vollständig ausgelesener Region A, ausgelesen (in Anlehnung an (34))

Der Grad der partiellen Auslesung des k-Raumes wird also bestimmt durch die Größe des Anteils der zentralen Region A ($pA = \frac{K_c}{\max(K_y, K_z)}$), sowie der Ausleserate von Region B, ausgedrückt als $pB = \frac{1}{N}$. Die Time-to-Acquisition der View-Sharing-Sequenz (TA_{View}) kann ausgedrückt werden durch die Erfassungszeit des k-Raumes (TA_{gesamt}), pB , der Größe von Region A (S_A) und der Gesamtfläche der PE-Ebene (S_{PE}):

$$TA_{View} = TA_{gesamt} \left(\frac{S_A}{S_{PE}} + \left(1 - \frac{S_A}{S_{PE}} \right) pB \right)$$

Demzufolge bietet die View-Sharing-Technik zwei Möglichkeiten die zeitliche Auflösung zu optimieren, durch die Größenreduktion von Region A (Verminderung von pA) und durch eine niedrigere Auslesedichte von Region B (Verminderung von pB) (34). Für die Untersuchungen am Rattenmodell im Rahmen dieser Dissertation wurde ein MRT-Protokoll verwendet mit $pA = 0,17$ und $pB = 0,2$. Somit konnte eine zeitliche Auflösung von 1,3 s pro 3D-Datensatz erreicht werden (35).

3.7.2 Auswertung der MRT-Daten und kinetische Analyse

Vielen DCE-MRT-Methoden wird eine kinetische Theorie eines linearen und stationären Systems zu Grunde gelegt. Linearität bedeutet, dass sich die Gewebeantwort proportional zu der verabreichten Dosis eines Kontrastmittels verhält. Stationär, dass die Antwort unabhängig ist vom Zeitpunkt der Injektion. Nimmt man diese Annahmen als Grundvoraussetzung, so steht die Konzentration in einem Gewebe, in Abhängigkeit von der Zeit $c_t(t)$, in Beziehung mit der Konzentration in einem zuführenden Blutgefäß $c_a(t)$, gefaltet (*) mit einer Restfunktion:

$$R(t) : c_t(t) = F_P \times R(t) * c_a(t)$$

F_P steht hierbei für den Plasmafluss, durch welchen das Kontrastmittel das Gewebe erreicht. $c_a(t)$, wird auch als AIF bezeichnet. $R(t)$ ist eine gewebeabhängige Funktion,

die die Verteilung der Kontrastmittel-Durchgangszeiten darstellt. Das Integral von $R(t)$ ist die MTT. Ohne weitere Annahmen vornehmen zu müssen, können F_p und MTT durch numerische Entfaltung abgeleitet werden. $R(t)$ enthält jedoch zusätzliche Informationen, die mit Hilfe von kinetischen Modellen in der DCE-MRT berechnet werden können. Dies sind Berechnungen der Gewebevaskularisierung und der Permeabilität des Endothels (36). Um die Veränderungen während der Kontrastmittelpassage erfassen zu können, wird eine hohe zeitliche Auflösung von mindestens 2 s empfohlen (36-38), was mit der Verwendung einer 3D-View-Sharing-Sequenz erreicht wurde.

Zur Beschreibung des verwendeten Tumormodells wurde ein 2-Compartment-Uptake-Modell herangezogen. Die zwei Kompartimente bestehen aus dem Plasmaraum mit dem Volumen V_p und dem interstitiellen Raum V_e . Ein Kompartiment ist definiert als ein Volumen, in dem die Kontrastmittel-Konzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt flächenhomogen verteilt ist und der Ausstrom aus diesem direkt proportional zu dessen Konzentration ist (36). In folgender Gleichung steht $c_p(t)$ für die Kontrastmittel-Konzentration des Plasmavolumens (V_p). Der Zustrom durch das zuführende Gefäß wird mit $F_p c_a(t)$ beschrieben, der Zufluss zum interstitiellen Kompartiment mit $PS c_e(t)$, wobei $c_e(t)$ die interstitielle Kontrastmittel-Konzentration ist:

$$V_p \frac{dc_p}{dt}(t) = F_p c_a(t) - F_p c_p(t) + PS c_e(t) - PS c_p(t) \quad (36)$$

Dies bedeutet für das 2-Compartment-Uptake-Modell, dass ein Kontrastmittel-Austausch nur zwischen V_e und V_p stattfindet, wobei der Ausstrom aus einem der beiden Kompartimente gleich dem Einstrom in dieses ist (Abb. 9). Der Ausstrom aus dem Plasmaraum wird hier mit PSc_p der aus dem Interstitium mit PSc_e bezeichnet. Setzt man die Differenz zwischen Ein- und Ausstrom mit der Austauschrate gleich, erhält man die Erhaltungsgleichung für das Kontrastmittel im interstitiellen Kompartiment:

$$v_e \frac{dc_e}{dt}(t) = PSc_p(t) - PSc_e(t) \quad (36, 38-41)$$

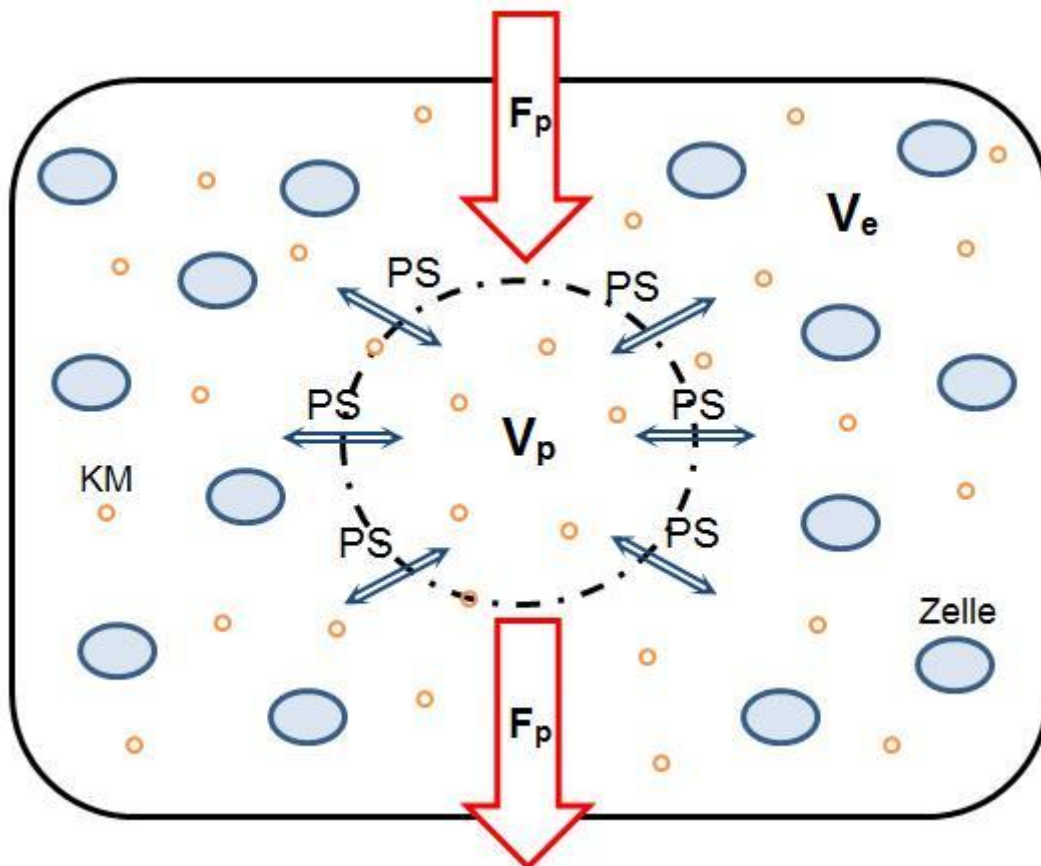


Abbildung 9: **Schematische Darstellung der Mikrozirkulation des Tumors anhand des 2-Compartment-Modells.** Das Kontrastmittel (KM) wird mit dem Plasmafluss (F_p) in den Tumor transportiert. Der Austausch von Kontrastmittel findet nur zwischen dem Plasmavolumen (V_p) und dem interstitiellen Volumen (V_e) entlang des Kapillarendothels (PS) statt (in Anlehnung an (36)).

Die Auswertung erfolgte an einem externen PMI-Computerarbeitsplatz mit der Software IDL 6.4 (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO). Für die Messung der AIF wurde eine ROI in das Lumen der Vena cava inferior auf Höhe der Leber gezeichnet. Für die Berechnung der Parameter der Tumormikrozirkulation wurden semiquantitative AUC-Karten erstellt. Die ROI wurde im Randbereich des Tumors platziert, da dort vitales Tumorgewebe nicht beeinflusst wird durch einen erhöhten interstitiellen Druck oder Nekrosen, die oft im Zentrum des Tumors angetroffen werden können (Abb. 10) (29).

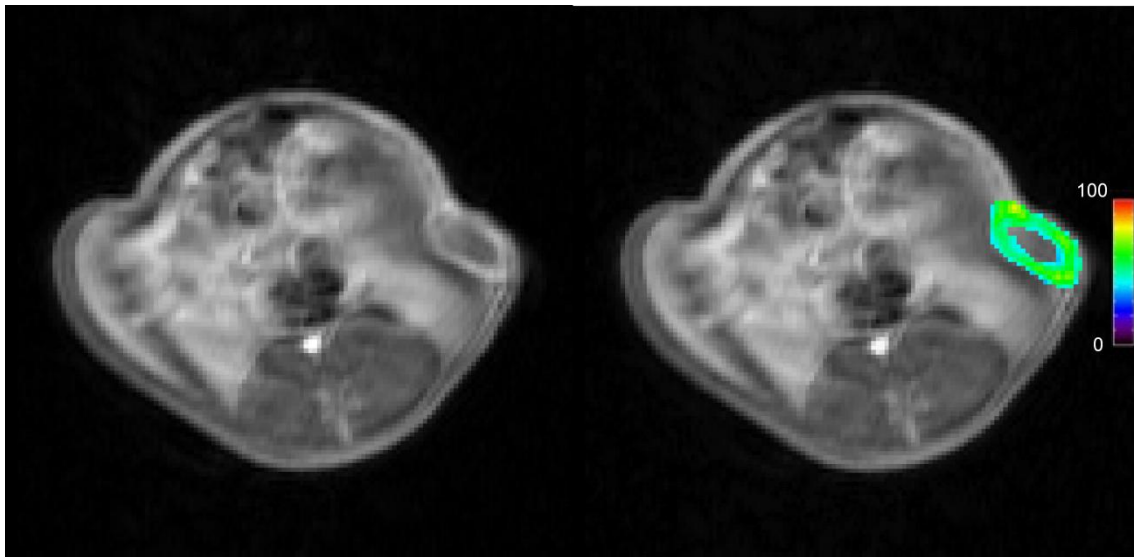


Abbildung 10: **Repräsentative MRT-Bilder in View-Sharing-Technik** in axialer Schnitfführung einer Ratte mit einem subkutan über der linken Flanke implantierten Kolonkarzinom-Xenograft, nach sechs Tagen Behandlung mit Regorafenib. Die Hypointensität im Zentrum des Tumors korrespondiert mit der beginnenden Nekrose und folglich einer veränderten Kontrastmittelanflutung. Für die Bestimmung der Tumormikrozirkulation wurde eine ROI (grünes Areal) über die vitalen Bereiche in der Tumorperipherie gezeichnet unter Verwendung einer semiquantitativen AUC-Karte.

Im nächsten Schritt wurden die Kontrastmittel-Konzentrationen aus den durchschnittlichen Signalintensitäten der definierten ROIs berechnet unter der Annahme, dass die Signalstärke proportional zur Kontrastmittel-Konzentration zu- bzw. abnimmt: $c(t) = S(t) - S_0$. S_0 ist hier das Signal vor Kontrastmittel-Anflutung als arithmetisches Mittel, berechnet aus den ersten zehn Leermessungs-Datensätzen (36).

Abschließend wurden die so erhaltenen Konzentrations-Zeit-Kurven an das 2-Compartment-Uptake-Modell angepasst. Die Anpassung erfolgte nach der Methode der kleinsten Quadrate (42). Hierbei werden die Modellparameter so bestimmt, dass die Summe der quadratischen Residuen, also die Abweichungen der Kurve von den beobachteten Punkten, möglichst klein gehalten werden (Abb. 11). Als Ergebnis erhält man eine sehr genaue Schätzung der Parameter F_p , V_p , V_e und PS . (36). Zusammenfassend steht F_p [ml/100ml/min] für den zu- bzw. abfließenden Plasmafluss eines Gewebes, V_p [ml/100ml] für das Plasmavolumen innerhalb des Gefäßsystems, V_e [ml/100ml] für das interstitielle Plasmavolumen und PS [ml/100ml/min] für den Fluss der entlang des Kapillarendothels stattfindet, als Marker für die Kapillarpermeabilität.

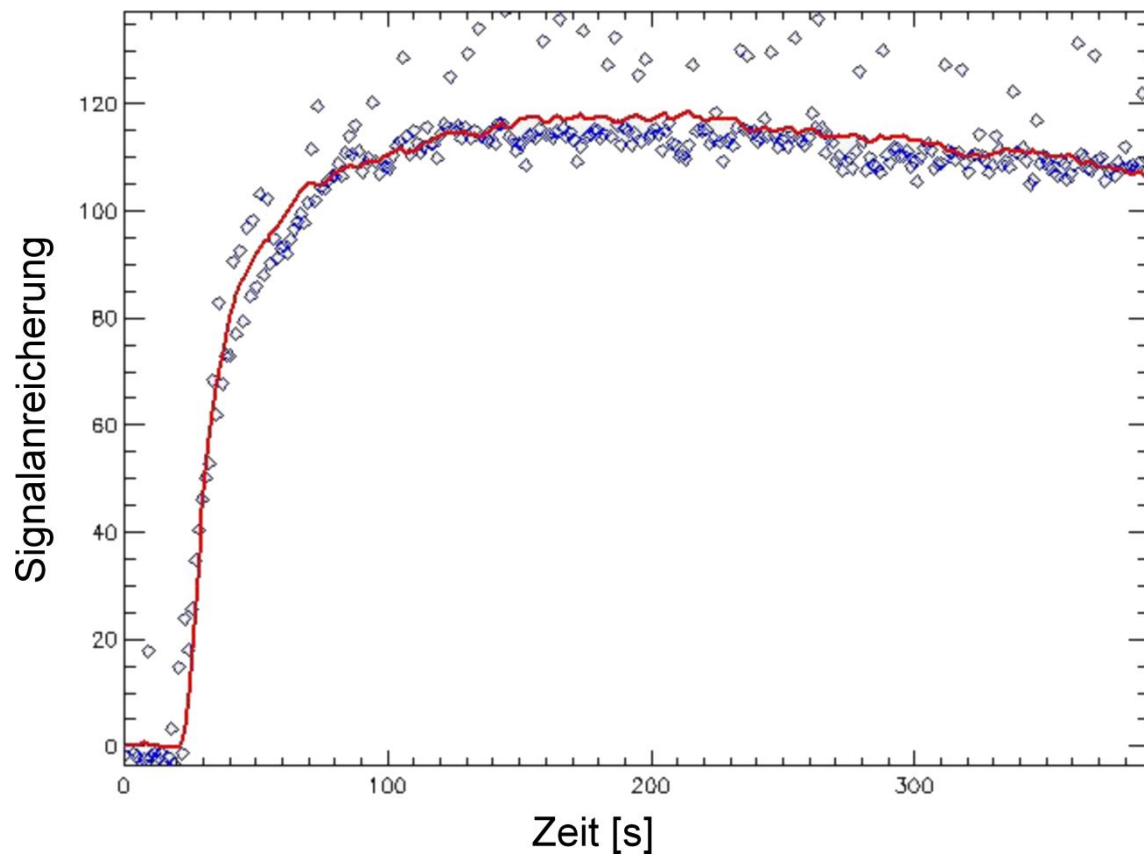


Abbildung 11: **Repräsentative Anpassungskurve des 2-Compartment-Uptake-Modells.** Die Graphik zeigt die Signalanreicherung des Tumors über die Zeit (blau) mit zugehöriger Anpassungskurve des 2-Compartment-Uptake-Modells (rot).

3.8 Histologie

3.8.1 Fixierung und Anfertigung der Schnitte

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Tumoren nach Explantation zunächst in 4 % wässriger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 % - 80 % - 95 %) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Zur Herstellung von 4 µm dicken Schnitten wurde ein halbmotorisches Rotationsmikrotom (RM2245, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Nach Auftragen auf einen Objektträger und Trocknen der Schnitte über 24 h bei 37 °C konnte mit dem Färbeprotokoll begonnen werden.

3.8.2 Immunhistochemie

3.8.2.1 Anti-CD31-Färbung

Die Färbung von CD31 (Cluster of Differentiation 31) wird in der Pathologie für die Quantifizierung der Endothelzellichte und somit zur Bestimmung der Tumorangiogenese eingesetzt (43). Um die Schnitte mit Anti-CD31 markieren und anschließend färben zu können, wurden sie zunächst entparaffiniert und rehydriert. Die Entparaffinierung erfolgte mit Xylol/Xylolersatz (Neo-Clear®, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) über 2 x 5 min. Die Rehydrierung erfolgte mit einer absteigenden Ethanolreihe über 2 x 3 min 100 % Ethanol und je 3 min 95 %, 80 % und 70 % Ethanol.

Um die Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte anschließend in Citrat-Puffer pH6 (Target Retrieval Solution (10x), DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) für 20 min mit Mikrowellen bei 600 W gekocht, danach 20 min bei Raumtemperatur im Citratpuffer abgekühlt.

Nach Abkühlung des Materials wurde es für 10 min in destilliertem Wasser, danach für 10 min in TBS-Tween-Waschpuffer, bestehend aus 61 g Trizma-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 90 g NaCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 1000 ml destilliertem Wasser und 0,05 % Tween20Solution (BioRad, Hercules, CA) gewaschen. Nach Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit Peroxidase-Block (EnVision+System-HRP (AEC) For Use With Rabbit Primary Antibodies, DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) wurden die Schnitte nochmals für 2 x 10 min mit TBS-Tween gewaschen.

Über Nacht erfolgte die Inkubation in einer feuchten Kammer mit dem primären polyklonalen IgG-Kaninchen-Anti-CD31-Antikörper (Abcam ab28364, Cambridge, England) in einer Verdünnung von 1:50 in Trizma-Base, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,5 mit HCl, und 1 % bovinem Serumalbumin, um freie Proteine zu blockieren. Am nächsten Morgen erfolgte nach Baden (2 x 10 min) in TBS-Tween-Waschpuffer die Inkubation (30 min) mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-Antikörper, DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland). Nach einem weiteren Spülschritt mit TBS-Tween wurde nun 30 min mit dem Farbstoff AEC Chromogen (DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) inkubiert, bevor nochmals mit destilliertem Wasser gespült wurde.

Zur Kenntlichmachung der Zellstrukturen wurde 10 s mit Mayers-Hämalaun (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Wasser gespült, in Kaisers-Glycerin-Gelatine (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet und eingedeckelt.

3.8.2.2 Anti-Ki-67-Färbung

Die Färbung des Antigens Ki-67 wird als Marker für die Quantifizierung der Tumorzellproliferation eingesetzt (44). Die Färbung mit Hilfe des Antikörpers Anti-Ki-67 unterschied sich von der Färbung mit Anti-CD31 nur in der Wahl des primären Antikörpers und war ansonsten mit ihr identisch (s. 3.7.2.1). Hier wurde der polyklonale Kaninchen-Anti-Ki-67-Antikörper (SP6, Abcam ab 16667 1:100, Cambridge, England) verwendet.

3.8.3 Auswertung der Immunhistochemie

Für die histologische Aufarbeitung der Tumoren wurden die gefärbten Schnittpräparate mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (DM 2500, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung und einem Fluoreszenzfilter, eingestellt auf eine Wellenlänge zwischen 520 nm und 620 nm, digital aufgezeichnet (Abb. 12).

Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurden die antikörpermarkierten Bilder mit einer Threshold-Technik computergestützt (Matlab, Natick, MA) ausgezählt. Hierzu wurde jeweils die durchschnittliche Anzahl an proliferierenden Zellen (Anti-Ki-67) und Endothelzellen (Anti-CD31) bestimmt (Abb. 12).

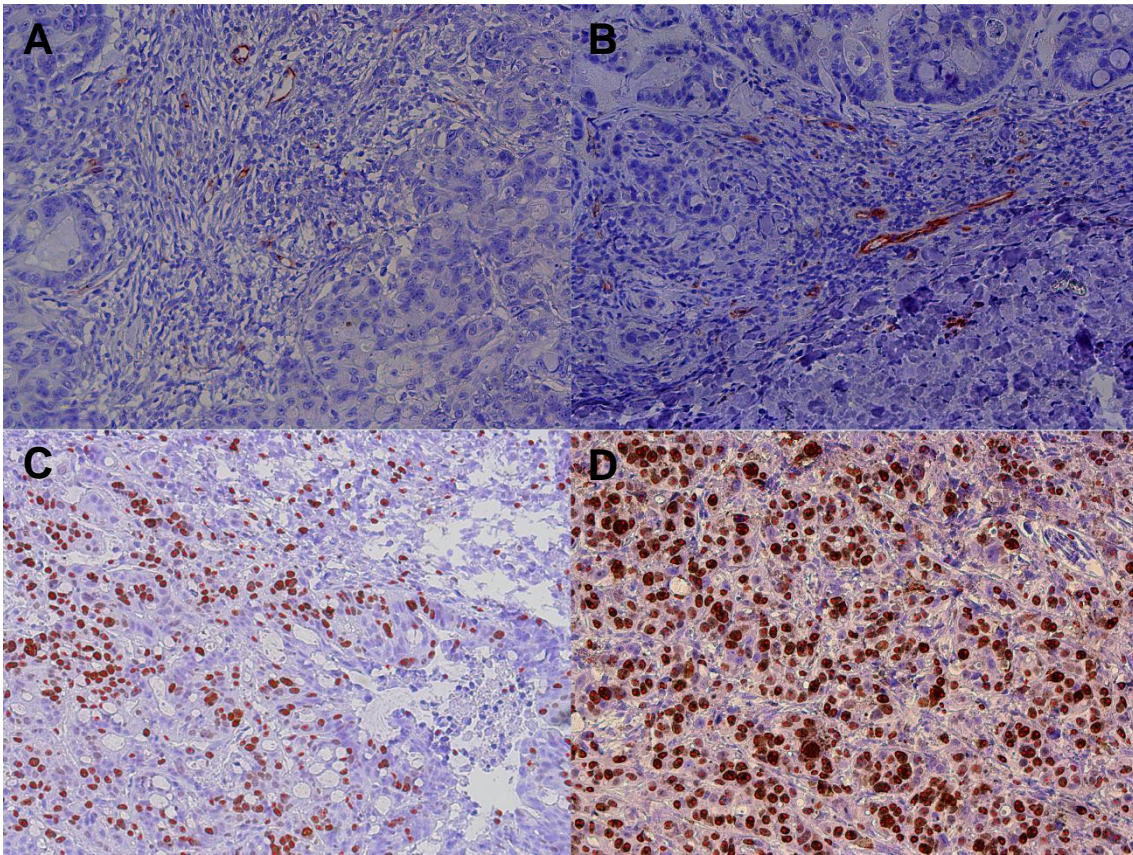


Abbildung 12: **Repräsentative Schnitte eines Kolonkarzinom-Xenografts mit der immunohistochemischen Anti-CD31-Färbung (obere Reihe) und der Anti-Ki-67-Färbung (untere Reihe).** Die Braunfärbung der Rezeptoren (CD31, obere Reihe) befindet sich hochspezifisch ausschließlich an den Gefäßen. Höhere Anzahl an CD31 positiven Endothelzellen in der Kontrollgruppe (B) gegenüber der Therapiegruppe (A). Deutlicher Unterschied in der Anzahl an proliferierenden Zellen (Ki-67, untere Reihe) zwischen Therapie-(C) und Kontrollgruppe (D).

3.9 Statistische Analyse

Normalverteilte, stetige Variablen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Vergleiche der MRT-Perfusionsparameter, der PET-TTB und der immunhistochemischen Werte zwischen der voneinander unabhängigen Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests vorgenommen. Für den Vergleich innerhalb einer Gruppe zwischen der Baseline- an Tag 0 und der Folow-Up-Untersuchung an Tag 7 wurde für die nicht normalverteilten, gepaarten MRT- und PET-Daten ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Die Korrelationen sowohl der MRT-Perfusionsdaten zu den PET-TTB als auch der MRT-Perfusionsdaten zur Immunhistochemie wurden mit der Korrelation nach Spearman berechnet. Korrelationen von $r > 0,4$ wurden als mäßig, $r > 0,6$ als gut und $r > 0,8$ als sehr gut angesehen. p -Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant, p -Werte $< 0,01$ als statistisch hochsignifikant gewertet. Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS für Microsoft Windows (Version 21.1, IMB, Armonk, NY) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse Tumorumina

Das Versuchsprotokoll mit multiparametrischer Bildgebung und der Immunhistochemie wurde erfolgreich an $n = 17$ Tieren durchgeführt. Die Tiere tolerierten alle Prozeduren. Die Tumorumina wurden mit Hilfe T2-gewichteter MRT-Bilder bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Baseline-Untersuchung beobachtet werden. In der Therapiegruppe konnte kein signifikanter Unterschied des mittleren Tumorumens zwischen Tag 0 ($581 \pm 131 \text{ mm}^3$) und Tag 7 ($780 \pm 235 \text{ mm}^3$; $p > 0,05$) festgestellt werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme des mittleren Tumorumens zwischen Tag 0 ($235 \pm 30 \text{ mm}^3$) und 7 ($442 \pm 51 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$).

4.2 Ergebnisse Perfusions-MRT

In der Therapiegruppe nahm F_P hochsignifikant ab von $81,1 \pm 7,5$ ml/100ml/min während der Baseline-Untersuchung auf $50,6 \pm 16,0$ ml/100ml/min während der Follow-Up-Untersuchung ($p < 0,01$).

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg des F_P von $69,9 \pm 14,3$ ml/100ml/min an Tag 0 auf $93,1 \pm 19,4$ ml/100ml/min an Tag 7 ($p < 0,03$). Die Einzelwerte zeigten einen einseitig gerichteten Abfall des F_P in der Therapiegruppe und einen einseitig gerichteten Anstieg in der Kontrollgruppe (Abb. 13). Die Einzelwerte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

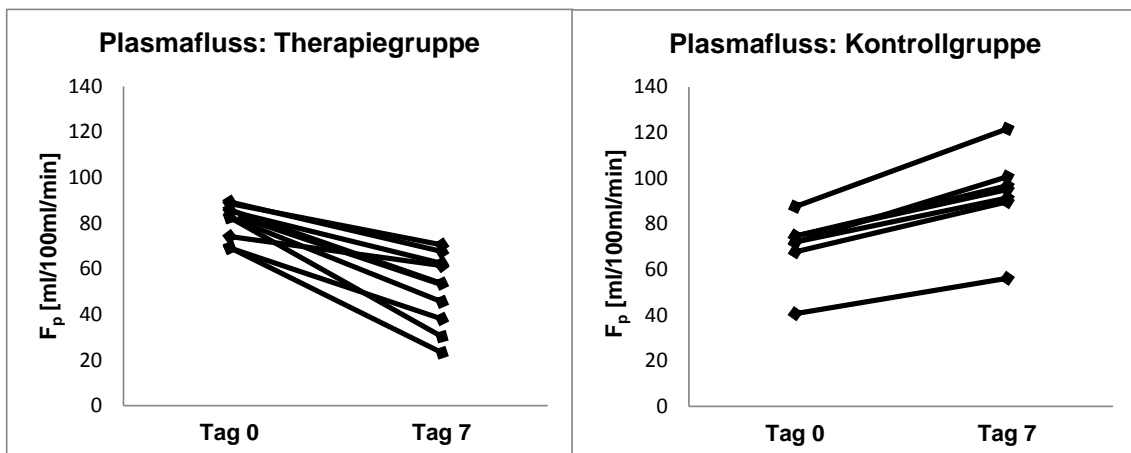


Abbildung 13: Liniendiagramme zur Darstellung des Verlaufs der Individualwerte von F_P . Einseitig gerichteter, hochsignifikanter ($p < 0,01$) Abfall in der Therapiegruppe (links). Einseitig gerichteter, signifikanter ($p < 0,03$) Anstieg in der Kontrollgruppe (rechts).

V_P nahm in der Therapiegruppe hochsignifikant von $12,1 \pm 3,6$ % während der Baseline-Untersuchung auf $7,5 \pm 1,6$ % bei der Follow-Up-Untersuchung ab ($p < 0,01$). In der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung des V_P der Baseline-Untersuchung ($9,4 \pm 2,3$ %) im Vergleich zur Follow-Up-Untersuchung ($11,6 \pm 3,0$ %) ($p > 0,05$). Die Einzelwerte der Baseline- und der Follow-Up-Untersuchung zeigten einen einseitig gerichteten Abfall der Tumervaskularisierung in der Therapiegruppe und nicht uniform gerichtete Veränderungen in der Kontrollgruppe (Abb. 14).

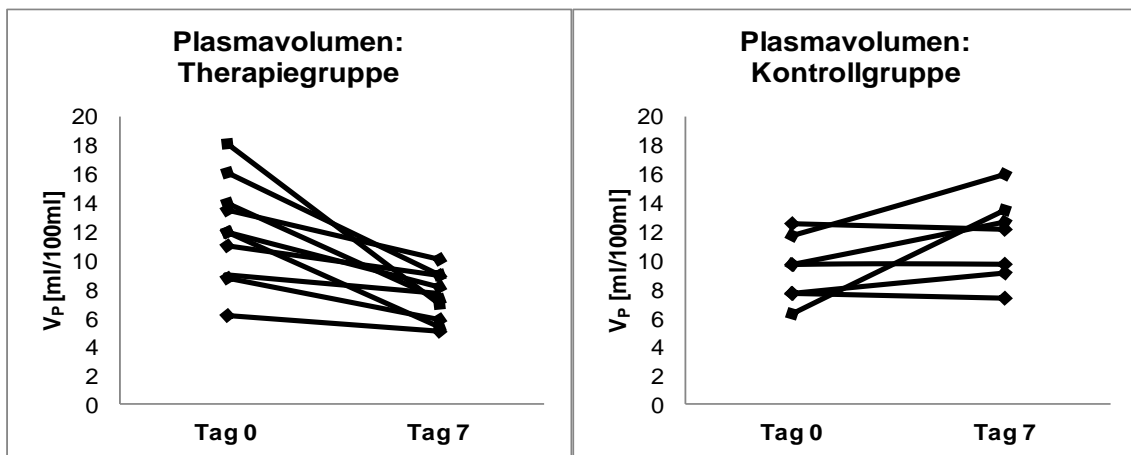


Abbildung 14: Liniendiagramme zur Darstellung des Verlaufs der Individualwerte von V_P .

Signifikanter ($p < 0,01$), einseitig gerichteter Abfall in der Therapiegruppe (links), sowie nicht uniform gerichtete Veränderungen in der Kontrollgruppe (rechts).

Das Permeabilitäts-Oberflächenprodukt (PS) zeigte einen hochsignifikanten Abfall von $13,6 \pm 3,2$ ml/100ml/min an Tag 0 auf $7,9 \pm 2,3$ ml/100ml/min an Tag 7 ($p < 0,01$). In der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Veränderungen des PS zwischen der Baseline- ($13,0 \pm 4,4$ ml/100ml/min) und der Follow-Up-Untersuchung ($13,0 \pm 4,0$ ml/100ml/min) beobachtet werden ($p > 0,05$). Die Einzelwerte zeigten einen einseitig gerichteten Abfall der endothelialen Permeabilität in der Therapiegruppe und nicht uniform gerichtete Veränderungen in der Kontrollgruppe (Abb. 15).

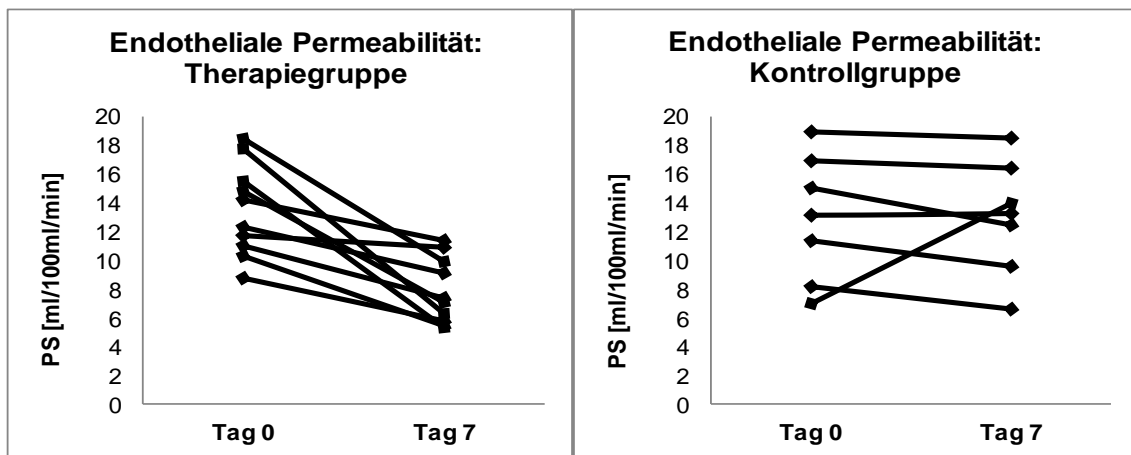


Abbildung 15: Liniendiagramme zur Darstellung des Verlaufs der Individualwerte von PS. Einseitig gerichteter, hochsignifikanter ($p < 0,01$) Abfall in der Therapiegruppe (links), sowie nicht uniform gerichtete Veränderungen in der Kontrollgruppe (rechts).

Tier Nr.	Plasmafluss			Plasmavolumen			Permeabilitäts-Oberflächenprodukt		
	[ml/100ml/min]			[ml/100ml]			[ml/100ml/min]		
	Tag 0	Tag 7	Delta F _p	Tag 0	Tag 7	Delta V _p	Tag 0	Tag 7	Delta PS
Therapiegruppe									
1	84,0	53,0	-31,0	18,2	7,0	-11,1	15,5	5,4	-10,2
2	85,3	62,4	-22,9	9,0	7,7	-1,3	14,9	7,2	-7,7
3	69,2	38,1	-31,1	16,1	9,0	-7,1	17,8	6,4	-11,4
4	69,3	23,3	-46,0	12,0	8,2	-3,8	8,9	5,9	-3,0
5	82,5	30,3	-52,2	8,9	6,0	-2,9	14,3	11,5	-2,8
6	82,7	45,6	-37,1	12,0	5,4	-6,6	10,4	5,6	-4,8
7	88,6	70,5	-18,1	6,2	5,2	-1,1	11,1	7,4	-3,6
8	89,4	67,7	-21,7	13,5	10,1	-3,4	11,7	10,9	-0,8
9	85,9	53,6	-32,3	14,1	7,4	-6,7	18,5	10,0	-8,5
10	74,2	61,4	-12,8	11,1	9,1	-2,1	12,4	9,2	-3,2
Mittelwert	81,1 ⁺	50,6 ⁺	-30,5 [★]	12,1 ⁺	7,5 ⁺	-4,6 [★]	13,6 ⁺	7,9 ⁺	-5,6 [★]
SD	7,5	16,0	12,3	3,6	1,6	3,2	3,2	2,3	3,6
Kontrollgruppe									
1	40,6	56,2	15,6	6,4	13,5	7,2	8,3	6,7	-1,6
2	72,0	91,4	19,4	9,9	9,8	-0,1	7,1	14,0	7,0
3	67,7	89,7	22,0	9,8	12,8	3,0	17,0	16,5	-0,5
4	74,6	96,7	22,1	7,8	7,4	-0,3	13,2	13,4	0,2
5	87,6	121,7	34,2	12,6	12,3	-0,4	19,0	18,5	-0,4
6	74,7	95,0	20,3	11,8	16,1	4,3	15,1	12,5	-2,6
7	71,9	100,7	28,8	7,8	9,2	1,4	11,5	9,7	-1,8
Mittelwert	69,9 [●]	93,1 [●]	23,2 [★]	9,4	11,6	2,1	13,0	13,0	0,0 [★]
SD	14,3	19,4	6,3	2,3	3,0	2,8	4,4	4,0	3,2
⁺ Hochsignifikanter Unterschied (p<0,01) zwischen Baseline und Follow-Up [●] Signifikanter Unterschied (p<0,03) zwischen Baseline und Follow-Up [★] Hochsignifikanter Unterschied (p<0,01) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe									

Tabelle 1: **Individuelle DCE-MRT-Parameter der Tumormikrozirkulation** mit Plasmafluss (ml/100ml/min), Plasmavolumen (ml/100ml) und Permeabilitäts-Oberflächenprodukt (ml/100ml/min) der Baseline- an Tag 0 und der Follow-Up-Untersuchung an Tag 7 für die Therapie- und Kontrollgruppe.

4.3 Ergebnisse ^{18}F -FDG PET

In der Behandlungsgruppe zeigten die Daten der ^{18}F -FDG-PET einen hochsignifikanten Abfall der TTB, von $3,4 \pm 0,6$ an Tag 0 auf $1,9 \pm 1,1$ an Tag 7 ($p < 0,01$). In der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg von $3,4 \pm 1,5$ auf $4,7 \pm 1,4$ ($p < 0,03$) (Abb. 16). Die Einzelwerte werden in Tabelle 2 aufgeführt.

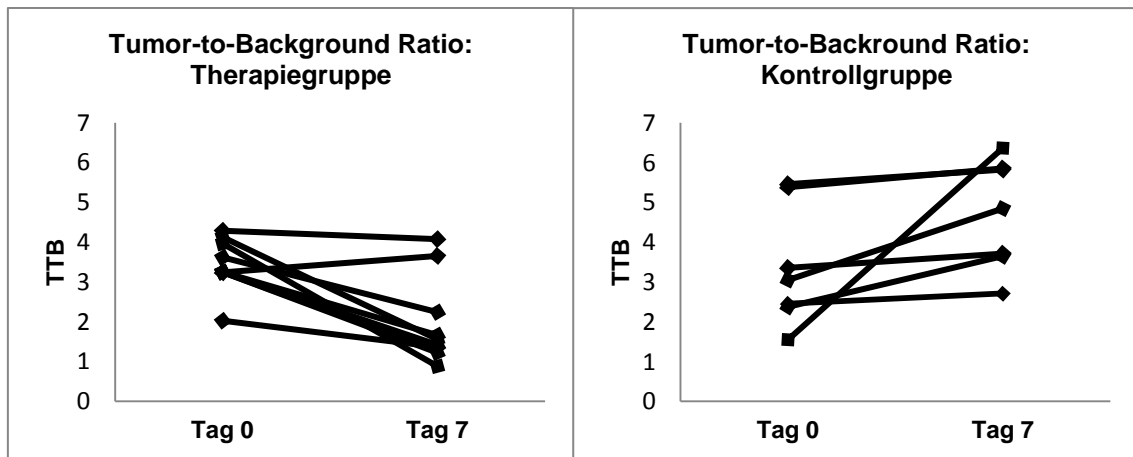


Abbildung. 16: Liniendiagramme zur Darstellung des Verlaufs der Individualwerte der Tumor-to-Background Ratio. Bis auf einen Tumor zeigt sich in der Therapiegruppe ein einseitig gleichgerichteter Abfall der TTB, sowie eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme der mittleren TTB zwischen Tag 0 und 7 (links). In der Kontrollgruppe zeigt sich ein gleichgerichteter, signifikanter ($p < 0,03$) Anstieg der mittleren TTB zwischen Tag 0 und 7 (rechts).

Tier Nr.	Tumor-to-Background Ratio		
	Tag 0	Tag 7	Delta TTB
Therapiegruppe			
1	4,0	0,9	-3,1
2	3,2	1,3	-2,0
3	4,1	1,6	-2,6
4	2,0	1,4	-0,7
5	3,3	1,2	-2,0
6	3,3	1,4	-1,8
7	3,3	1,7	-1,6
8	3,6	2,3	-1,4
9	3,2	3,7	0,4
10	4,3	4,1	-0,2
Mittelwert	3,4 ✦	1,9 ✦	-1,5 ★
SD	0,6	1,1	1,1
Kontrollgruppe			
1	2,5	2,7	0,3
2	3,4	3,7	0,4
3	2,4	3,7	1,3
4	3,1	4,9	1,8
5	1,6	6,4	4,8
6	5,5	5,8	0,4
7	5,4	5,9	0,5
Mittelwert	3,4 ●	4,7 ●	1,3 ★
SD	1,5	1,4	1,6
✦ Hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Baseline und Follow-Up ● Signifikanter Unterschied ($p < 0,03$) zwischen Baseline und Follow-Up ★ Hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe			

Tabelle 2: **Individualparameter der TTB** zum Zeitpunkt der Baseline- an Tag 0, sowie der Follow-Up-Untersuchung an Tag 7 für die Therapie- und Kontrollgruppe.

4.4 Ergebnisse Immunhistochemie

In den untersuchten Kolonkarzinom-Xenografts zeigte sich eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Mikrogefäßdichte (Anti-CD31) in der Behandlungsgruppe ($7,0 \pm 2,4$) als in der Kontrollgruppe ($16,1 \pm 5,9$) (s. Tab. 3). Ebenso zeigte die Therapiegruppe eine signifikant ($p < 0,03$) niedrigere Anzahl an proliferierenden Zellen (Anti-Ki-67) ($434,0 \pm 62,9$) als in der Kontrollgruppe ($663,0 \pm 98,3$). (s. Tab. 3).

Tier Nr.	Immunhistochemie	
	Anti-Ki-67	Anti-CD31
Therapiegruppe		
1	470,8	4,5
2	388,6	7,9
3	407,6	5,1
4	397,2	6,1
5	543,2	4,8
6	528,9	8,4
7	362,1	5,8
8	379,3	10,2
9	454,0	11,3
10	408,5	5,6
Mittelwert	434,0 ✦	7,0 ●
SD	62,9	2,4
Kontrollgruppe		
1	842,8	14,7
2	679,6	22,5
3	581,5	5,7
4	566,2	17,8
5	583,6	14,3
6	670,3	14,1
7	717,3	23,3
Mittelwert	663,0 ✦	16,1 ●
SD	98,3	5,9
✦ Signifikanter Unterschied ($p < 0,03$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe		
● Signifikanter Unterschied ($p < 0,03$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe		

Tabelle 3: Individualwerte der untersuchten immunhistochemischen Parameter der Tumorzellproliferation (Ki-67) und der mikrovaskulären Dichte (CD31).

4.5 Korrelation MRT-Perfusionsparameter mit ¹⁸F-FDG-PET

Es zeigten sich hochsignifikante, gute Korrelationen zwischen ΔF_p und ΔTTB ($r = 0,78$; $p < 0,01$), zwischen ΔV_p und ΔTTB ($r = 0,67$; $p < 0,01$) und zwischen ΔPS und ΔTTB ($r = 0,75$; $p < 0,01$) (s. Tab. 4).

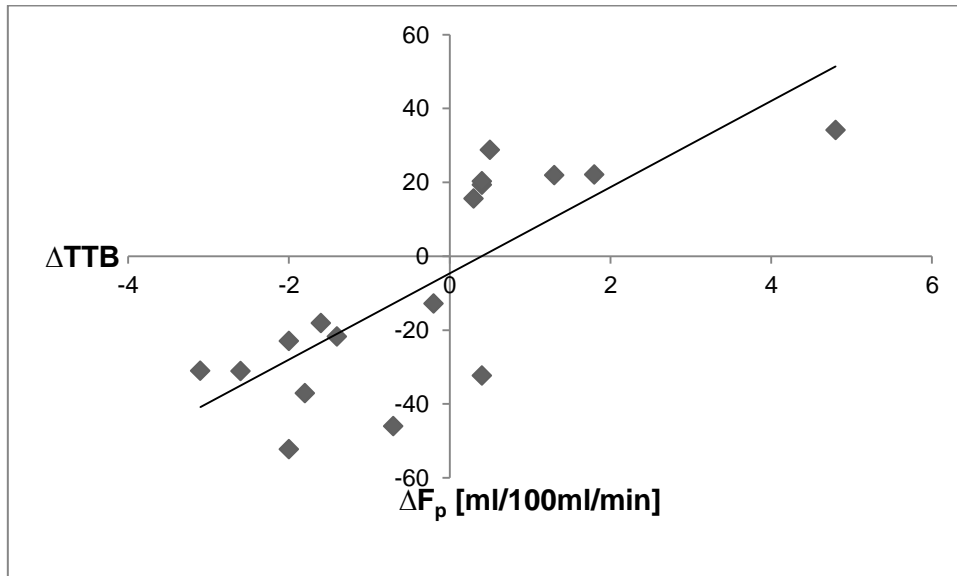


Abbildung 17: **Lineare Regressionsgerade** für den Korrelationskoeffizienten der Parameter ΔF_p und ΔTTB nach Spearman.

Korrelation	Spearman's Korrelationskoeffizient	p-Wert
$\Delta F_p/\Delta TTB$	$r = 0,78$ ★	<0,01
$\Delta V_p/\Delta TTB$	$r = 0,67$ ★	<0,01
$\Delta PS/\Delta TTB$	$r = 0,75$ ★	<0,01
★ Hochsignifikante Korrelationen		

Tabelle 4: **Korrelationen der DCE-MRT-Parameter mit dem PET-Parameter.** Gute, hochsignifikante Korrelationen zwischen den MRT-Parametern der Tumor-Mikrozirkulation und dem PET-Parameter des Glukosemetabolismus.

4.6 Korrelation MRT-Perfusionsparameter und Immunhistochemie

Es zeigten sich mäßige, aber signifikante Korrelationen zwischen ΔF_p und der Ki-67-Färbung ($r = 0,57$; $p < 0,03$), sowie der CD31-Färbung ($r = 0,51$; $p < 0,05$). Ebenso konnten hochsignifikante gute Korrelationen zwischen ΔV_p und Ki-67 ($r = 0,67$; $p < 0,01$), sowie mäßige, aber signifikante Korrelationen zwischen ΔV_p und CD31 ($r = 0,55$; $p < 0,03$) beobachtet werden. Außerdem zeigten sich mäßige, aber signifikante Korrelationen zwischen ΔPS und Ki-67 ($r = 0,57$; $p < 0,03$), als auch zwischen ΔPS und CD31 ($r = 0,49$; $p < 0,05$, s. Tab. 5).

Korrelation	Spearman's Korrelationskoeffizient	p-Wert
ΔF_p /Ki-67	$r = 0,57$ ●	<0,03
ΔF_p /CD31	$r = 0,51$ ●	<0,05
ΔV_p /Ki-67	$r = 0,67$ ✦	<0,01
ΔV_p /CD31	$r = 0,55$ ●	<0,03
ΔPS /Ki-67	$r = 0,57$ ●	<0,03
ΔPS /CD31	$r = 0,49$ ●	<0,05
✦ Hochsignifikante Korrelationen ● Signifikante Korrelationen		

Tabelle 5: **Korrelationen der DCE-MRT-Parameter mit der Immunhistochemie.** Signifikante, mäßige Korrelationen zwischen den MRT-Parametern der Tumor-Mikrozirkulation und den immunhistochemischen Markern für Tumor-Zellproliferation (Ki-67) und dem Marker für die mikrovaskuläre Dichte (CD31).

4.7 Korrelation ^{18}F -FDG-PET und Immunhistochemie

Zwischen ΔTTB und Ki-67 konnte eine mäßige, aber signifikante Korrelation beobachtet werden ($r = 0,56$; $p < 0,03$), ebenso zwischen ΔTTB und CD31 ($r = 0,51$; $p < 0,05$) (s. Tab. 6).

Korrelation	Spearman's Korrelationskoeffizient	p-Wert
$\Delta\text{TTB}/\text{Ki-67}$	$r = 0,56$ ●	$<0,03$
$\Delta\text{TTB}/\text{CD31}$	$r = 0,51$ ●	$<0,05$
● Signifikante Korrelationen		

Tabelle 6: **Korrelationen der TTB mit der Immunhistochemie.** Signifikante, mäßige Korrelationen zwischen dem Parameter des Tumor-Glukosemetabolismus (ΔTTB) und den immunhistochemischen Markern für Tumor-Zellproliferation (Ki-67) und für die mikrovaskuläre Dichte (CD31)

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde ein multimodales Bildgebungsprotokoll mit dynamischer, kontrastverstärkter MRT und ^{18}F -FDG-PET zum Monitoring einer Regorafenib-Monotherapie in einem humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Detektion früher Therapieeffekte von Regorafenib mit einem nicht-invasiven MRT/PET-Protokoll in vivo möglich ist, validiert durch multiparametrische Immunhistochemie (45).

5.1 Perfusions-MRT

Die Ergebnisse der Studie im Rahmen dieser Dissertation zeigen, dass unter anti-angiogenetischer Therapie mit Regorafenib eine signifikante Abnahme der DCE-MRT-Perfusionsparameter nachgewiesen werden kann. Auch die signifikante Korrelation mit den immunhistochemischen Parametern für Zellproliferation und Mikrogefäßdichte untermauert die Hypothese, dass sich F_p und V_p als nicht-invasive Imaging Biomarker der Therapieresponse für die Evaluation der frühen Effekte von Regorafenib auf das verwendete Tumormodell eignen (s. 4.6).

Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Abou-Elkacem et al. (28) bestätigt. Sie verglichen die Effekte von Regorafenib mit dem ebenfalls anti-angiogenetisch wirkenden VEGFR2-Inhibitor DC101 mit DCE-MRT und immunhistochemischer Analyse der Mikrogefäßdichte mit CD31-Färbung in einem orthotopen Kolonkarzinom-Modell der Maus. Sie konnten in beiden Therapiegruppen einen signifikanten Abfall der MRT-Perfusionsparameter nachweisen. Außerdem konnten sie einen stärkeren Abfall der Tumorperfusion in der Regorafenib-Gruppe gegenüber der DC101-Gruppe beobachten, was sich auch in einer niedrigeren, immunhistochemisch nachgewiesenen Mikrogefäßdichte widerspiegelte (28). Dies bestätigt die Hypothese, dass sich die

DCE-MRT eignet die frühen Therapieeffekte sowie Unterschiede zwischen ähnlich wirkenden Therapeutika auf ein Kolonkarzinom-Modell zu erfassen.

Die Eignung der Perfusionsparameter F_P und V_P als bildgebende, nicht-invasive Biomarker konnte bereits in einigen anderen Studien unter Verwendung verschiedener anti-angiogenetischer Therapeutika und Tumormodelle gezeigt werden. So konnten beispielsweise Cyran et al. (35) und Sterzik et al. (46) mit DCE-MRT vergleichbare Ergebnisse in der Reduktion des Plasmaflusses und Plasmavolumens in der anti-angiogenetischen Behandlung eines Prostatakarzinom-Modells bzw. eines Plattenepithelkarzinom-Modells der Ratte nachweisen (35, 46).

Zudem konnte eine signifikante Abnahme des Parameters für die Gefäßpermeabilität (PS) nachgewiesen werden. Unterstützung erhalten diese Ergebnisse durch die Studien von Tentler et al. (47) und Haney et al. (48) Sie konnten ebenfalls eine signifikante Abnahme dieses Parameters, unter Therapie mit dem MTKI ENMD-2076 bzw. Sorafenib in einem Kolonkarzinom-Modell nachweisen (47, 48). Bezüglich dieses Parameters konnten ebenfalls signifikante Korrelationen mit dem immunhistochemischen Goldstandard nachgewiesen werden.

Es konnte kein signifikanter Abfall des Tumolvolumens in der Therapiegruppe beobachtet werden. Unter alleiniger Annahme morphologischer Therapieresponse-Kriterien wäre demnach kein Therapieansprechen nachweisbar gewesen. Die Perfusionsparameter generierten somit essentielle Informationen für das frühe Therapieansprechen einer Regorafenib-Therapie im Kolonkarzinom-Modell in Ergänzung zur Morphologie-basierten Bildgebung.

Es gibt jedoch eine große Vielfalt verschiedener MRT-Techniken und Herangehensweisen, die es ermöglichen Informationen über die Mikrovaskularisierung eines Tumors zu generieren. Dies erschwert die Objektivierung im Vergleich von Daten unterschiedlicher Techniken, Gewebearten und unterschiedlicher Zentren (49). Die Reproduzierbarkeit der mit DCE-MRT quantifizierten Parameter der Gewebe-

Mikrozirkulation ist somit sehr stark abhängig von der Standardisierung der Datenakquirierung und Nachbearbeitung je nachdem welche MRT-Sequenz, welches Kontrastmittel und welche Auswertungs-Software verwendet wird (50-53). Auch wird für die Berechnung von Perfusionsdaten die Annahme eines bestimmten physikalischen Tumormodells vorausgesetzt. Neben dem in dieser Studie verwendeten 2-Compartment-Uptake-Modell gibt es noch weitere Modelle, welche die An- und Abflutung von Kontrastmittel in einem Gewebe beschreiben (36). Weitere Modelle sind das erweiterte Tofts-Modell (54), das 2-Compartment-Exchange-Modell (55, 56), das Tissue-Homogeneity-Modell (57), das AATH-Modell (adiabatic approximation to the tissue homogeneity model) (58) und das Distributed-Parameter-Modell (59). Durch die große Vielfalt besteht zum einen die Gefahr, dass die akquirierten Tumordaten nicht exakt an das ausgewählte Tumormodell angepasst werden können und zum anderen dass die Annahmen, die für jedes Modell getroffen werden, nicht auf die untersuchte Gewebeart zutreffen (60). Da die Zusammensetzung des Tumorgewebes zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bekannt ist, kann das Tumormodell als das beste angesehen werden, an welches sich die jeweilige Konzentrations-Zeit-Kurve mit den niedrigsten X^2 -Werten (s. 3.7.2) anpassen lässt (36). Die noch vorherrschende mangelnde Standardisierung auf diesem Gebiet erschwert jedoch den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Zentren.

Obwohl die DCE-MRT bereits in der Schlaganfalldiagnostik sowie in der Diagnostik von Hirn- (61) und Prostatatumoren (62) routinemäßig eingesetzt wird können die fehlende Standardisierung und unterschiedlichen Herangehensweisen in der Akquirierung und Nachbearbeitung der DCE-MRT-Daten als die Hürde der letzten Jahre angesehen werden, die funktionelle Perfusionsbildgebung in die onkologisch-klinische Anwendung umzusetzen. Obwohl schon Versuche unternommen worden sind, konnte noch kein allgemeiner Konsens erreicht werden (63).

Vorteile der nicht-invasiven DCE-MRT-gestützten Verfahren gegenüber anderen dynamischen, bildgebenden Verfahren wie der CT, sind die Strahlungsneutralität und in Kombination mit morphologischen Sequenzen, der höhere Weichteilkontrast (64). Gegenüber der kontrastverstärkten Sonographie (CEUS) liegt der Vorteil in der niedrigeren Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers und in der besseren Darstellung tief gelegener, sonographisch nicht erfassbarer Tumoren (65) .

Aktuelle klinische Daten weisen darauf hin, dass die DCE-MRT im Vergleich zu den RECIST-Kriterien sensitiver in der Bestimmung einer frühen Therapieantwort ist, da zu Beginn einer anti-angiogenetischen Therapie die Tumorgöße meist konstant bleibt (1) wenn bereits eine Abnahme von Perfusionsparametern nachzuweisen ist. So konnten Sahani et al. (66) in einer Phase-II-Studie an 23 Patienten mit HCC unter Therapie mit dem MTKI Sunitinib zeigen, dass Veränderungen in der DCE-MRT innerhalb von zwei Wochen auftraten ohne dass eine signifikante Abnahme der Tumorgöße nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnten sie zeigen, dass größere Abfälle der DCE-MRT-Parameter bei konstanter Tumorgöße mit einem längeren progressionsfreien Überleben einhergehen (66).

In der onkologischen Diagnostik besitzen dynamische Bildgebungen somit großes Potential, insbesondere in der Evaluation eines Therapieansprechens anti-angiogenetischer Therapeutika, da es hierbei oft nicht zu einer zytotoxisch bedingten Volumenabnahme des Tumors, sondern zu Veränderungen auf zellulärer Ebene kommt (1). Gängige Methoden des Therapie-Monitorings wie die RECIST-Kriterien, die lediglich morphologische Regressionsparameter berücksichtigen, sind somit nicht sensitiv genug, um früh auftretende anti-angiogenetische Therapieeffekte zu erfassen (17). Mit der MRT, PET, CT und CEUS wurden bereits verschiedene funktionelle Parameter entwickelt, die es ermöglichen nicht-invasiv den Tumormetabolismus zu erfassen (49, 67-69). Funktionelle und molekulare Biomarker der Therapieresponse werden mit zunehmender Entwicklung neuer zielgerichteter Therapeutika und deren

Einsatz in der Krebstherapie eine entscheidende Rolle in der Evaluation eines Therapieansprechens und zur Erfassung von Tumorresistenzen spielen. Somit werden sie auch potenziell einen maßgeblichen Beitrag leisten die Kosten der personalisierten Medizin zu reduzieren, indem teure, ineffektive und nebenwirkungsreiche Therapien bei fehlender Wirksamkeit frühzeitig angepasst werden können (70).

5.2 ¹⁸F-DG-PET

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten eine signifikante Abnahme der TTB, sowie hochsignifikante Korrelationen der TTB mit allen DCE-MRT-Perfusionsparametern und signifikante Korrelationen mit den immunhistochemischen Parametern gezeigt werden.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Ergebnissen einer Studie von Kristian et al. (71). Sie konnten, an einem Mammakarzinom-Modell in athymischen Mäusen zeigen, dass sich die Anwendung einer ¹⁸F-FDG-PET eignet, um frühe anti-angiogenetische Therapieeffekte des Anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab darzustellen (71). Auch Meier et al. konnten zeigen, dass sich ein multiparametrisches Protokoll bestehend aus DCE-MRT, DWI und ¹⁸F-FDG-PET zur Evaluation des frühen Therapieansprechens einer anti-angiogenetischen Therapie auf ein Rhabdomyosarkom-Modell der Maus eignet. Sie konnten bereits zwei Tage nach Therapiebeginn signifikante Unterschiede in der iAUC (DCE-MRT), den ADC-Werten (DWI) und der FDG-Aufnahme (PET) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. Ebenso zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen den Perfusions-MRT-Daten der Mikrozirkulation und des Glukosemetabolismus gemessen mit der ¹⁸F-FDG-PET. Auch histopathologisch zeigte sich eine signifikante Abnahme der mikrovaskulären Gefäßdichte in der CD31-Färbung (69).

Bezüglich der Korrelation von DCE-MRT-Parametern und der Quantifizierung der ^{18}F -FDG-Aufnahme im Tumor gibt es jedoch auch gegensätzliche Ergebnisse. So konnten De Bruyne et al. (72) in einer klinischen Studie zur Beurteilung des diagnostischen Wertes von dynamischen MRT-Messungen in Kombination mit ^{18}F -FDG-PET für die Therapieevaluierung des Antikörpers Bevacizumab in Kombination mit FOLFOX/FOLFIRI bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen bestätigen, dass sich die dynamischen Parameter beider Modalitäten für die Vorhersage des progressionsfreien Überlebens eignen. Hier wurden für die Quantifizierung der dynamischen MRT-Parameter die AUC, die iAUC und der endotheliale Transferkoeffizient (K_{trans}) verwendet. Die PET-Ergebnisse wurden durch eine Berechnung des maximalen standardisierten FDG-Aufnahmewertes (SUV_{max}) quantifiziert. Eine Korrelation zwischen den Parametern der dynamischen MRT und der SUV konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. In einer weiteren klinischen Studie zur Untersuchung von metabolischen und vaskulären Charakteristika von HNO-Tumoren und deren Beziehung zueinander mit dynamischer MRT und PET-CT konnten Bisdas et al (73) Korrelationen zwischen Parametern der Tumorperfusion, -vaskularisierung und des Glukosemetabolismus beobachten, jedoch keine Korrelation zwischen Parametern der endothelialen Permeabilität und des Glukosemetabolismus.

Die fehlende Korrelation zwischen einigen Parametern der dynamischen MRT und der standardisierten FDG-Aufnahme bei De Bruyne et al. (72) und Bisdas et al. (73) muss in erster Linie mit der Heterogenität der verschiedenen Tumormodelle begründet werden. So entstehen die meisten Tumoren zwar aus der gleichen Tumorzelle, jedoch führen Mutationen während des Tumorwachstums zu erheblichen interindividuellen Unterschieden in der Invasivität, dem Differenzierungsgrad, der Zellproliferation und der Metastasenbildung und somit auch zu Unterschieden in der Therapieresponse (74). Zumindest bei dem im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Kolonkarzinom-Modell scheint ein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme der Tumor-Vaskularisierung und dem Glukosemetabolismus zu bestehen. Weitere Autoren wie

Daldrup-Link et al. (75), Smeets et al. (76) und Ehling et al. (77) sind sich einig, dass eine Kombination aus morphologischer und funktioneller MRT-Bildgebung mit einer ^{18}F -FDG-PET in einem multimodalen und multiparametrischen Akquirierungsprotokoll eine vielfältige, umfangreiche und nicht-invasive Charakterisierung eines Tumors ermöglicht. Außerdem stellt sie Informationen über Veränderungen der Mikrovaskularisierung und des Metabolismus eines Tumors unter einer Therapie bereit (75-77).

Zudem gibt es bereits einige klinische Studien zum Einsatz der ^{18}F -FDG-PET, unter anderem von Woff et al. (78), Avallone et al. (79) oder Murcia et al. (80), und zum Einsatz der DCE-MRT, unter anderem von Coenegrachts et al. (81), Kim et al. (82) oder Hirashima et al. (83), für das Monitoring der Therapieresponse des kolorektalen Karzinoms. Die Anwendung dieser beiden Modalitäten in einem Hybridverfahren gibt somit zusätzliche funktionelle Daten zu den hochauflösenden morphologischen Bildinformationen. Dies kann nicht nur die Überwachung einer frühen Antwort auf eine molekulare Therapie ermöglichen, sondern auch neue Sichtweisen auf die Rolle dieser bildgebenden Verfahren in der Vorhersage eines Therapieansprechens bei neoadjuvanter Chemotherapie eröffnen. Für eine Differenzierung zwischen Ansprechen und Nichtansprechen auf eine Therapie, liefern möglicherweise ergänzende Informationen beider Verfahren zusätzliche Sicherheit, wenn die alleinige PET oder MRT nicht aussagekräftig genug ist (84, 85).

Andererseits ist die Umsetzung einer Kombination dieser beider Verfahren in der klinischen Routine zum jetzigen Zeitpunkt nur bedingt realisierbar. Prinzipiell stehen hier zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen die Akquisition eines MRT- und PET-Datensatzes an zwei voneinander separaten Geräten (sequentiell) mit der Möglichkeit einer nachträglichen Bildfusion, zum anderen die Durchführung an einem kombinierten PET-MRT-Gerät (simultan). Nachteil der sequentiellen Methodik ist die sehr lange Untersuchungszeit für Untersuchungen eines größeren Zielvolumens und

die unvermeidbaren Lageänderungen beim Wechsel zwischen den einzelnen Geräten. Schon minimale Positionierungsunterschiede können eine nachträgliche Koregistrierung der Bilddaten erheblich erschweren und zu Ungenauigkeiten bei der Bildfusion führen (86). Mit der Einführung integrierter PET-MRT-Systeme eröffnen sich neue Möglichkeiten in der klinischen Anwendung und Forschung. Durch die simultane Akquisition der MRT- und PET-Bilddaten können die Untersuchungszeiten erheblich minimiert und eine sehr genaue Bildfusion erreicht werden. Auch werden im onkologischen Staging Ganzkörper-MRT-Protokolle eingesetzt, die im Vergleich zur PET-CT in vereinzelt Studien eine ähnlich hohe diagnostische Genauigkeit aufweisen (87). Diese etablierten Protokolle können auf jedes Hybridsystem übertragen werden. Ebenso ist es möglich DCE-MRT-Sequenzen an jedem Hybridscanner einzusetzen. Die Herausforderung wird zukünftig darin bestehen ein einheitliches Verfahrensprotokoll zu implementieren.

5.3 Limitationen der Studie

Die Durchführung der Versuche fand an voneinander getrennten MRT- und PET-Geräten statt. Deshalb wurden die Versuchstiere für die Messungen in einer Plexiglasröhre platziert. Dies sollte Lageveränderungen der Ratten minimieren und die Lokalisation identischer Schichtpositionen bei der Auswertung der MRT- und PET-Daten erleichtern. Außerdem wurde bei der Auswertung der MRT-Bilder die ausgewählte Schicht auf der Längsachse markiert, um die Lokalisation der identischen Schichtposition für die Auswertung der PET-Bilder zu garantieren. Dennoch waren geringe Lageveränderungen der Versuchstiere während des Transports zwischen den Geräten nicht zu vermeiden. Eine Bildfusion der MRT- und PET-Daten war demnach nur mit Einschränkungen möglich. Letztendlich konnte nicht sichergestellt werden, ob die Auswertungen der MRT- und PET-Daten in exakt der gleichen Tumorschicht durchgeführt wurden und somit Vaskularisierungsdifferenzen innerhalb des Tumors

ausreichend berücksichtigt wurden. Die Verwendung eines Kleintier-MRT und dessen höhere Schichtauflösung würde die Identifizierung der gleichen Tumorschicht verbessern und somit eine exakte Koregistrierung ermöglichen. Auch würde ein Untersuchungsverfahren an einem kombinierten PET-MRT-Gerät, bei simultaner Akquirierung beider Parameter, zu einer höheren Messbeständigkeit der Daten und zu einer möglicherweise höheren Übereinstimmung zwischen den einzelnen PET- und MRT-Parametern, aufgrund von einheitlichen Bedingungen während des Experiments führen. Mutmaßlich wird der Unterschied in einer optimierten Koregistrierung bestehen. Auch wird in Zukunft die Entwicklung verbesserter Software zur Korrektur von Bewegungsartefakten beitragen dieses Problem zu minimieren (88).

Weiterhin schränken Unterschiede zwischen der Physiologie des Menschen und der der Versuchstiere sowie die heterotope Lage des Tumor-Xenografts die klinische Translation unserer Ergebnisse ein. Auch ist es möglich, dass im Rahmen dieser Studie nicht das volle Ausmaß der Therapieeffekte und Nebenwirkungen von Regorafenib dargestellt wurden, da diese teils erst nach mehreren Monaten zum Tragen kommen (89). Dennoch war es das Ziel dieser Arbeit die frühen Therapieeffekte nachzuweisen. Somit kann die kurze Zeitspanne zwischen der Baseline- und der Follow-Up-Untersuchung als hinreichend angesehen werden (45).

Für die immunhistochemische Validierung ist limitierend, dass sie nur Aussagen über die Gewebezusammensetzung zu einem Zeitpunkt, nämlich am Ende der Studie nach Explantation der Tumoren zulässt. Sie bietet im Gegensatz zu den PET- und MRT-Parametern somit keine dynamischen Informationen zur Erfassung des Therapieverlaufs. So werden beispielsweise nicht alle immunhistochemisch erfassten Tumorgefäße im vitalen Tumorgewebe unter anti-angiogenetischer Therapie perfundiert, was eine mögliche Erklärung für die signifikante, aber nur mäßige Korrelation zwischen den dynamischen Parametern der Tumolvaskularisierung und den immunhistochemischen Ergebnissen dieser Studie darstellt (46). Auch könnten für

die immunhistochemische Validierung der Parameter der funktionellen Bildgebung zusätzliche immunhistochemische Färbungen weitere Informationen liefern. Dennoch stellen die verwendeten Färbungen wichtige Aspekte der Tumorphysiologie dar und werden oft mit dem klinischen Verlauf von Krebserkrankungen korreliert (90, 91).

6. Zusammenfassung

Molekulare Krebstherapien werden seit mehreren Jahren erfolgreich im klinischen Alltag eingesetzt. Zu diesen gehören auch die unter anderem anti-angiogenetisch wirkenden Tyrosinkinaseinhibitoren. Für Regorafenib, einem oralen Multityrosinkinaseinhibitor, konnte die Wirksamkeit bereits in mehreren experimentellen Karzinomen nachgewiesen werden und es ist bereits für die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen. Da diese molekularen Therapeutika meist nicht zum Zelltod der Tumorzellen führen, sondern die Tumorpathophysiologie beeinflussen, können objektive, Morphologie-basierte Therapie-Evaluationskriterien wie die RECIST-Kriterien, die bei der klassischen Chemotherapie Anwendung finden, nicht eingesetzt werden. Es stellt sich somit die Frage nach geeigneten Monitoring-Verfahren für diese zielgerichteten Therapien.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die anti-angiogenetischen und antiproliferativen Effekte von Regorafenib, nicht-invasiv, mit einer Kombination aus MRT und ^{18}F -FDG-PET nachzuweisen. Untersucht wurden Veränderungen der Mikrozirkulation und des Glukosemetabolismus an subkutan in athymische Ratten implantierten humanen Kolonkarzinom-Xenografts. Die Messung des ^{18}F -FDG-Metabolismus erfolgte nach dessen Applikation mit einem microPET-Scanner. Für die Bestimmung der Parameter der Mikrozirkulation wurde ein klinischer 3-Tesla-MRT verwendet. Somit konnte eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung erzielt werden. Unter Verwendung eines niedermolekularen Kontrastmittels konnten die Konzentrations-Zeit-Kurven der Vena cava inferior sowie im Tumor über einen Zeitraum von zehn Minuten gemessen werden. Diese waren Grundlage für die anschließende Berechnung des kinetischen 2-Compartment-Uptake-Modells. Nach Abschluss der Messungen wurden die Tumoren für die histologische Aufarbeitung entnommen. Als Parameter der Proliferation der Tumorzellen diente die Anti-Ki-67-

Färbung. Zur Beurteilung der Gefäßdichte wurde eine Anti-CD31-Färbung durchgeführt.

Die Ergebnisse der PET-Untersuchung ergaben in der Therapiegruppe einen signifikanten Abfall zwischen Baseline- und Follow-Up-Untersuchung der TTB als Parameter des Glukosemetabolismus, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Evaluation der Konzentrations-Zeitkurven ergab einen signifikanten Abfall zwischen Baseline- und Follow-Up-Untersuchung von V_p , F_p und PS, als Parameter der Tumormikrozirkulation, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die histologische Untersuchung erbrachte eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte in den Anti-CD31-gefärbten Schnitten, sowie eine signifikant niedrigere Anzahl an proliferierenden Zellen in der Anti-Ki-67-Färbung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnten signifikante, gute bis mäßige Korrelationen von V_p , F_p und PS mit der TTB beobachtet werden. Des Weiteren zeigten sich signifikante, aber mäßige Korrelationen der Perfusionsparameter mit den immunhistochemischen Parametern der mikrovaskulären Gefäßdichte und der Tumorzellproliferation.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Hybridverfahren aus ^{18}F -FDG-PET und MRT eine frühe und zuverlässige Beurteilung des Therapieansprechens von Regorafenib auf das untersuchte Kolonkarzinom-Modell zulässt. Auch unterstützen die signifikanten Korrelationen zwischen den MRT-Parametern und dem PET-Parameter die Hypothese einer biologischen Beziehung zwischen Veränderungen der Tumormikrozirkulation und des Glukosemetabolismus.

Somit ermöglicht dieses multimodale und multiparametrische Bildgebungsverfahren eine nicht-invasive, umfangreiche und vielseitige Charakterisierung der Tumorphysiologie in vivo. Die untersuchten MRT-Parameter der Tumormikrozirkulation und PET-Parameter zum Glukosemetabolismus der untersuchten humanen Kolonkarzinom-Xenografts konnten als nicht-invasive Imaging Biomarker der Therapiereponse in vivo validiert werden. Klinische Untersuchungen müssen zeigen,

ob sich eine Kombination dieser beiden Modalitäten an einem integrierten PET-MRT-Gerät für ein Monitoring anti-angiogenetischer Therapieeffekte in der Krebsdiagnostik eignet und somit die diagnostische Präzision in der Versorgung von Krebspatienten verbessern wird.

7. Literaturverzeichnis

1. Diederich S. Imaging beyond RECIST: CT and MRI in molecular therapies. *Cancer imaging*. 2012;12:347-50.
2. Marques I, Araujo A, de Mello RA. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer: current and future perspectives. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(44):7955-71.
3. Levitzki A, Mishani E. Tyrosine kinase inhibitors and other tyrosine kinase inhibitors. *Annual review of biochemistry*. 2006;75:93-109.
4. Yamamoto H, Oda Y. Gastrointestinal stromal tumor: Recent advances in pathology and genetics. *Pathology international*. 2014.
5. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. mTOR inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Gynecologic oncology*. 2012;127(3):662-72.
6. Figlin R, Sternberg C, Wood CG. Novel agents and approaches for advanced renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2012;188(3):707-15.
7. Holubec L, Liska V, Matejka VM, Fiala O, Dreslerova J, Mrazkova P, et al. The role of cetuximab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Anticancer research*. 2012;32(9):4007-11.
8. Lam ET, Ringel MD, Kloos RT, Prior TW, Knopp MV, Liang J, et al. Phase II clinical trial of sorafenib in metastatic medullary thyroid cancer. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(14):2323-30.

9. Ettrich TJ, Seufferlein T. Regorafenib. Recent results in cancer research. 2014;201:185-96.
10. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schutz G, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. International journal of cancer. 2011;129(1):245-55.
11. Chang YS, Adnane J, Trail PA, Levy J, Henderson A, Xue D, et al. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2007;59(5):561-74.
12. Healey JH. Regorafenib: efficacy in multiple refractory sarcoma types. The Lancet Oncology. 2016;17(12):1633-4.
13. Andre T, Dumont SN. Regorafenib approved in Metastatic Colorectal cancer. Bulletin du cancer. 2013;100(10):1027-9.
14. Komatsu Y, Harada K, Fukushima H, Yuki S. New molecular targeting drugs for metastatic colorectal cancer. Japanese journal of clinical medicine. 2014;72(1):120-6.
15. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(3):205-16.

16. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009;45(2):228-47.
17. Sohaib A. RECIST rules. *Cancer imaging*. 2012;12:345-6.
18. Kalkmann J, Zeile M, Antoch G, Berger F, Diederich S, Dinter D, et al. Consensus report on the radiological management of patients with gastrointestinal stromal tumours (GIST): recommendations of the German GIST Imaging Working Group. *Cancer imaging*. 2012;12:126-35.
19. Ratain MJ, Eckhardt SG. Phase II studies of modern drugs directed against new targets: if you are fazed, too, then resist RECIST. *Journal of clinical oncology*. 2004;22(22):4442-5.
20. Huellner MW, Henedige TP, Winterhalder R, Zander T, Venkatesh SK, Yong WP, et al. Prognostic value of different CT measurements in early therapy response evaluation in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer imaging*. 2012;12:212-24.
21. Calcagno C, Ramachandran S, Izquierdo-Garcia D, Mani V, Millon A, Rosenbaum D, et al. The complementary roles of dynamic contrast-enhanced MRI and 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT for imaging of carotid atherosclerosis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2013;40(12):1884-93.
22. Nikolaou K, Cyran CC, Lauber K, Reiser MF, Clevert DA. Preclinical imaging in animal models of radiation therapy. *Der Radiologe*. 2012;52(3):252-62.

23. Gatidis S, Schmidt H, Claussen CD, Schwenger NF. Multiparametric imaging with simultaneous MR/PET. Methodological aspects and possible clinical applications. *Der Radiologe*. 2013;53(8):669-75.
24. Povlsen CO, Rygaard J. Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant Nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section A, Pathology*. 1971;79(2):159-69.
25. Guillen J. FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2012;51(3):311-21.
26. El Ali HH, Bodholdt RP, Jorgensen JT, Myschetzky R, Kjaer A. Importance of Attenuation Correction (AC) for Small Animal PET Imaging. *Diagnostics*. 2012;2(4):42-51.
27. Chen D, Wei L, Yu J, Zhang L. Regorafenib inhibits colorectal tumor growth through PUMA-mediated apoptosis. *Clinical cancer research*. 2014;20(13):3472-84.
28. Abou-Elkacem L, Arns S, Brix G, Gremse F, Zopf D, Kiessling F, et al. Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(7):1322-31.
29. Preda A, Turetschek K, Daldrup H, Floyd E, Novikov V, Shames DM, et al. The choice of region of interest measures in contrast-enhanced magnetic resonance image characterization of experimental breast tumors. *Investigative Radiology*. 2005;40(6):349-54.

30. Cheng KT. Gadobutrol. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004.
31. Huppertz A, Rohrer M. Gadobutrol, a highly concentrated MR-imaging contrast agent: its physicochemical characteristics and the basis for its use in contrast-enhanced MR angiography and perfusion imaging. *European radiology*. 2004;14(5):12-8.
32. Twieg DB. The k-trajectory formulation of the NMR imaging process with applications in analysis and synthesis of imaging methods. *Medical physics*. 1983;10(5):610-21.
33. Lim RP, Shapiro M, Wang EY, Law M, Babb JS, Rueff LE, et al. 3D time-resolved MR angiography (MRA) of the carotid arteries with time-resolved imaging with stochastic trajectories: comparison with 3D contrast-enhanced Bolus-Chase MRA and 3D time-of-flight MRA. *American journal of neuroradiology*. 2008;29(10):1847-54.
34. Song T, Laine AF, Chen Q, Rusinek H, Bokacheva L, Lim RP, et al. Optimal k-space sampling for dynamic contrast-enhanced MRI with an application to MR renography. *Magnetic resonance in medicine*. 2009;61(5):1242-8.
35. Cyran CC, Paprottka PM, Schwarz B, Sourbron S, Ingrisich M, von Einem J, et al. Perfusion MRI for monitoring the effect of sorafenib on experimental prostate carcinoma: a validation study. *American journal of roentgenology*. 2012;198(2):384-91.
36. Ingrisich M, Sourbron S. Tracer-kinetic modeling of dynamic contrast-enhanced MRI and CT: a primer. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2013;40(3):281-300.

37. Ingrisich M, Sourbron S, Morhard D, Ertl-Wagner B, Kumpfel T, Hohlfeld R, et al. Quantification of perfusion and permeability in multiple sclerosis: dynamic contrast-enhanced MRI in 3D at 3T. *Investigative radiology*. 2012;47(4):252-8.
38. Sourbron S. Technical aspects of MR perfusion. *European journal of radiology*. 2010;76(3):304-13.
39. Koh TS, Bisdas S, Koh DM, Thng CH. Fundamentals of tracer kinetics for dynamic contrast-enhanced MRI. *Journal of magnetic resonance imaging*. 2011;34(6):1262-76.
40. Sourbron S, Ingrisich M, Siefert A, Reiser M, Herrmann K. Quantification of cerebral blood flow, cerebral blood volume, and blood-brain-barrier leakage with DCE-MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2009;62(1):205-17.
41. Sourbron SP, Buckley DL. Tracer kinetic modelling in MRI: estimating perfusion and capillary permeability. *Physics in medicine and biology*. 2012;57(2):1-33.
42. Ahearn TS, Staff RT, Redpath TW, Semple SI. The use of the Levenberg-Marquardt curve-fitting algorithm in pharmacokinetic modelling of DCE-MRI data. *Physics in medicine and biology*. 2005;50(9):85-92.
43. Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *Journal of clinical pathology*. 1992;45(2):143-8.

44. Johnston PG, O'Brien MJ, Dervan PA, Carney DN. Immunohistochemical analysis of cell kinetic parameters in colonic adenocarcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Human pathology*. 1989;20(7):696-700.
45. Eschbach RS, Fendler WP, Kazmierczak PM, Hacker M, Rominger A, Carlsen J, et al. Correlation of perfusion MRI and 18F-FDG PET imaging biomarkers for monitoring regorafenib therapy in experimental colon carcinomas with immunohistochemical validation. *PloS one*. 2015;10(2):e0115543.
46. Sterzik A, Paprottka PM, Zengel P, Hirner H, Rosspunt S, Eschbach R, et al. DCE-MRI biomarkers for monitoring an anti-angiogenic triple combination therapy in experimental hypopharynx carcinoma xenografts with immunohistochemical validation. *Acta radiologica*. 2015;56(3):294-303
47. Tentler JJ, Bradshaw-Pierce EL, Serkova NJ, Hasebroock KM, Pitts TM, Diamond JR, et al. Assessment of the in vivo antitumor effects of ENMD-2076, a novel multitargeted kinase inhibitor, against primary and cell line-derived human colorectal cancer xenograft models. *Clinical cancer research*. 2010;16(11):2989-98.
48. Haney CR, Fan X, Markiewicz E, Mustafi D, Karczmar GS, Stadler WM. Monitoring anti-angiogenic therapy in colorectal cancer murine model using dynamic contrast-enhanced MRI: comparing pixel-by-pixel with region of interest analysis. *Technology in cancer research & treatment*. 2013;12(1):71-8.
49. Padhani AR, Leach MO. Antivascular cancer treatments: functional assessments by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Abdominal imaging*. 2005;30(3):324-41.

50. Pujol JL, Breton JL, Gervais R, Tanguy ML, Quoix E, David P, et al. Phase III double-blind, placebo-controlled study of thalidomide in extensive-disease small-cell lung cancer after response to chemotherapy: an intergroup study FNCLCC cleo04 IFCT 00-01. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(25):3945-51.
51. Bianchi G, Loibl S, Zamagni C, Salvagni S, Raab G, Siena S, et al. Phase II multicenter, uncontrolled trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer. *Anti-cancer drugs*. 2009;20(7):616-24.
52. Blumenschein GR, Jr., Gatzemeier U, Fossella F, Stewart DJ, Cupit L, Cihon F, et al. Phase II, multicenter, uncontrolled trial of single-agent sorafenib in patients with relapsed or refractory, advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(26):4274-80.
53. Aragon-Ching JB, Jain L, Gulley JL, Arlen PM, Wright JJ, Steinberg SM, et al. Final analysis of a phase II trial using sorafenib for metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU international*. 2009;103(12):1636-40.
54. Sourbron SP, Buckley DL. On the scope and interpretation of the Tofts models for DCE-MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2011;66(3):735-45.
55. Donaldson SB, West CM, Davidson SE, Carrington BM, Hutchison G, Jones AP, et al. A comparison of tracer kinetic models for T1-weighted dynamic contrast-enhanced MRI: application in carcinoma of the cervix. *Magnetic resonance in medicine*. 2010;63(3):691-700.

56. Brix G, Kiessling F, Lucht R, Darai S, Wasser K, Delorme S, et al. Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magnetic resonance in medicine*. 2004;52(2):420-9.
57. Garpebring A, Ostlund N, Karlsson M. A novel estimation method for physiological parameters in dynamic contrast-enhanced MRI: application of a distributed parameter model using Fourier-domain calculations. *IEEE transactions on medical imaging*. 2009;28(9):1375-83.
58. Buckley DL, Roberts C, Parker GJ, Logue JP, Hutchinson CE. Prostate cancer: evaluation of vascular characteristics with dynamic contrast-enhanced T1-weighted MR imaging-initial experience. *Radiology*. 2004;233(3):709-15.
59. Koh TS, Thng CH, Hartono S, Tai BC, Rumpel H, Ong AB, et al. A comparative study of dynamic contrast-enhanced MRI parameters as biomarkers for anti-angiogenic drug therapy. *NMR in biomedicine*. 2011;24(9):1169-80.
60. Padhani AR, Dzik-Jurasz A. Perfusion MR imaging of extracranial tumor angiogenesis. *Topics in magnetic resonance imaging*. 2004;15(1):41-57.
61. Bergamino M, Bonzano L, Levrero F, Mancardi GL, Roccatagliata L. A review of technical aspects of T1-weighted dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) in human brain tumors. *Physica medica*. 2014;30(6):635-43.
62. Zhang X, Quan X, Lu S, Huang F, Yang J, Chan Q, et al. The clinical value of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging at 3.0T to detect prostate cancer. *The Journal of international medical research*. 2014;42(5):1077-84.

63. Cai W, Chen X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis. *Journal of nuclear medicine*. 2008;49 Suppl 2:113-28.
64. Shah LM, Flanders AE. Update on New Imaging Techniques for Trauma. *Neurosurgery clinics of North America*. 2017;28(1):1-21.
65. Wilson SR, Greenbaum LD, Goldberg BB. Contrast-enhanced ultrasound: what is the evidence and what are the obstacles? *American journal of roentgenology*. 2009;193(1):55-60.
66. Sahani DV, Jiang T, Hayano K, Duda DG, Catalano OA, Ancukiewicz M, et al. Magnetic resonance imaging biomarkers in hepatocellular carcinoma: association with response and circulating biomarkers after sunitinib therapy. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:51.
67. Malhi H, Grant EG, Duddalwar V. Contrast-enhanced ultrasound of the liver and kidney. *Radiologic clinics of North America*. 2014;52(6):1177-90.
68. Cyran CC, Kazmierczak PM, Hirner H, Moser M, Ingrisich M, Havla L, et al. Regorafenib effects on human colon carcinoma xenografts monitored by dynamic contrast-enhanced computed tomography with immunohistochemical validation. *PloS one*. 2013;8(9):e76009.
69. Meier R, Braren R, Kosanke Y, Bussemer J, Neff F, Wildgruber M, et al. Multimodality multiparametric imaging of early tumor response to a novel antiangiogenic therapy based on anticalins. *PloS one*. 2014;9(5):e94972.

70. Arnedos M, Soria JC, Andre F, Tursz T. Personalized treatments of cancer patients: a reality in daily practice, a costly dream or a shared vision of the future from the oncology community? *Cancer treatment reviews*. 2014;40(10):1192-8.
71. Kristian A, Revheim ME, Qu H, Maelandsmo GM, Engebraten O, Seierstad T, et al. Dynamic (18)F-FDG-PET for monitoring treatment effect following anti-angiogenic therapy in triple-negative breast cancer xenografts. *Acta oncologica*. 2013;52(7):1566-72.
72. De Bruyne S, Van Damme N, Smeets P, Ferdinande L, Ceelen W, Mertens J, et al. Value of DCE-MRI and FDG-PET/CT in the prediction of response to preoperative chemotherapy with bevacizumab for colorectal liver metastases. *British journal of cancer*. 2012;106(12):1926-33.
73. Bisdas S, Seitz O, Middendorp M, Chambron-Pinho N, Bisdas T, Vogl TJ, et al. An exploratory pilot study into the association between microcirculatory parameters derived by MRI-based pharmacokinetic analysis and glucose utilization estimated by PET-CT imaging in head and neck cancer. *European radiology*. 2010;20(10):2358-66.
74. Prasetyanti PR, Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. 2017;16(1):41.
75. Daldrup-Link HE, Simon GH, Brasch RC. Imaging of tumor angiogenesis: current approaches and future prospects. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(21):2661-72.
76. Smeets P, Ceelen W. Functional response imaging following neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Surgical technology international*. 2009;18:93-7.

77. Ehling J, Lammers T, Kiessling F. Non-invasive imaging for studying anti-angiogenic therapy effects. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(3):375-90.
78. Woff E, Hendlisz A, Garcia C, Deleporte A, Delaunoy T, Marechal R, et al. Monitoring metabolic response using FDG PET-CT during targeted therapy for metastatic colorectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2016;43(10):1792-801.
79. Avallone A, Aloj L, Caraco C, Delrio P, Pecori B, Tatangelo F, et al. Early FDG PET response assessment of preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer: correlation with long-term outcome. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2012;39(12):1848-57.
80. Murcia Durendez MJ, Frutos Esteban L, Lujan J, Frutos MD, Valero G, Navarro Fernandez JL, et al. The value of 18F-FDG PET/CT for assessing the response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2013;40(1):91-7.
81. Coenegrachts K, Bols A, Haspelslagh M, Rigauts H. Prediction and monitoring of treatment effect using T1-weighted dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in colorectal liver metastases: potential of whole tumour ROI and selective ROI analysis. *European journal of radiology*. 2012;81(12):3870-6.
82. Kim YE, Joo B, Park MS, Shin SJ, Ahn JB, Kim MJ. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging as a Surrogate Biomarker for Bevacizumab in Colorectal Cancer Liver Metastasis: A Single-Arm, Exploratory Trial. *Cancer research and treatment*. 2016;48(4):1210-21.

83. Hirashima Y, Yamada Y, Tateishi U, Kato K, Miyake M, Horita Y, et al. Pharmacokinetic parameters from 3-Tesla DCE-MRI as surrogate biomarkers of antitumor effects of bevacizumab plus FOLFIRI in colorectal cancer with liver metastasis. *International journal of cancer*. 2012;130(10):2359-65.
84. Ng TS, Bading JR, Park R, Sohi H, Procissi D, Colcher D, et al. Quantitative, simultaneous PET/MRI for intratumoral imaging with an MRI-compatible PET scanner. *Journal of nuclear medicine*. 2012;53(7):1102-9.
85. Kwee RM, Kwee TC. Role of imaging in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(7):1650-6.
86. Delso G, Ziegler S. PET/MRI system design. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2009;36(1):86-92.
87. Schmidt GP, Baur-Melnyk A, Herzog P, Schmid R, Tiling R, Schmidt M, et al. High-resolution whole-body magnetic resonance image tumor staging with the use of parallel imaging versus dual-modality positron emission tomography-computed tomography: experience on a 32-channel system. *Investigative radiology*. 2005;40(12):743-53.
88. Metz S, Ganter C, Lorenzen S, van Marwick S, Herrmann K, Lordick F, et al. Phenotyping of tumor biology in patients by multimodality multiparametric imaging: relationship of microcirculation, alphavbeta3 expression, and glucose metabolism. *Journal of nuclear medicine*. 2010;51(11):1691-8.

89. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9863):303-12.

90. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(3):311-22.

91. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*. 2000;289(5482):1197-202.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Eschbach RS, Fendler WP, Kazmierczak PM, Hacker M, Rominger A, Carlsen J, Hirner-Eppeneder H, Schuster J, Moser M, Havla L, Schneider MJ, Ingrisich M, Spaeth L, Reiser MF, Nikolaou K, Cyran CC. Correlation of Perfusion MRI and ¹⁸F-FDG PET Imaging Biomarkers for Monitoring Regorafenib Therapy in Experimental Colon Carcinomas with Immunohistochemical Validation. Plos one. 2015;10(2):e0115543.

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lukas Anton Späth, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende
Dissertation mit dem Thema:

„Perfusions-MRT und ¹⁸F-FDG-PET zum Monitoring einer Regorafenib-Therapie im
Kolonkarzinom-Modell der Ratte“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 28.05.2018

Unterschrift

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med Konstantin Nikolaou und PD Dr. med. Clemens Cyran für die Ausarbeitung und Überlassung meines Dissertationsthemas.

Des Weiteren möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Clemens Cyran für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung meiner Promotion sowie für die große Hilfsbereitschaft nicht nur bei fachlichen Themen herzlich danken.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Dr. med. Philipp Kazmierczak für sein unermüdliches Engagement und seine Geduld für wissenschaftliche Fragen und Diskussionen sowie seine große Hilfsbereitschaft bei der Abfassung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser FACR, FRCR dafür danken die Versuche im Rahmen dieser Dissertation am Institut für Klinische Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt haben zu dürfen.

In gleichem Maße Danke ich Herrn Prof. Dr. med. P. Bartenstein die PET-Untersuchungen in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgenommen haben zu dürfen.

Bei Herrn Lukas Havla M. Sc. Biom. Eng. möchte ich mich für seine Unterstützung und Geduld bei der Auswertung der MRT-Daten und bei Herrn Dr. med. Wolfgang Fendler für die große Hilfe bei der Auswertung der PET-Daten bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Frau Dr. hum. biol. Heidrun Hirner, Elisabeth Baloch, Frau Dr. med. vet. Jessica Schuster, Matthias Moser und Ralf Eschbach für den hervorragenden Umgang mit den Versuchstieren, die Geduld während der nächtlichen Messungen und die ausgezeichneten Kenntnisse bei der statistischen Auswertung.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Verlobten Anna für ihre moralische Unterstützung und ihren Optimismus, die mich all die Jahre begleiteten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. med. Ingeborg Späth und Prof. Dr. med. Georg Späth, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen, mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.