
Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Annexin-basierte optische Fluoreszenzbildgebung und Perfusions-MRT zum
Monitoring der frühen Effekte einer Regorafenibtherapie im experimentellen
humanen Kolonkarzinom**

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

vorgelegt von

Dr. med. Egon Burian
aus Reschitz, Rumänien

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Clemens Cyran

Mitberichterstatter:

PD Dr. med. Kerstin Liebler
Prof. Dr. med. Anno Graser

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Philipp Kazmierczak

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

05.02.2020

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Charakterisierung des Therapieansprechens bei medikamentöser Therapie von soliden Tumoren (RECIST-Kriterien)	3
1.2 Antiangiogenetische Tumorthapeutika	4
1.3 Multimodale Biomarker des Therapieansprechens.....	6
1.4 Fragestellung.....	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Versuchstiere	8
2.2 Tumorzelllinie.....	8
2.2 Antikörper und Detektionssysteme	9
2.3 Verbrauchsmaterialien	10
2.4 Arzneimittel, Kontrastmittel und Tracer	12
2.5 Geräte und Programme.....	12
2.6 Kultivierung der Tumorzellen	14
2.7 Inokulation der Versuchstiere mit der Tumorzelllinie	15
2.8 Regorafenibtherapie und Placeboapplikation	15
2.9 Bildgebung.....	16
2.9.1 Versuchsaufbau	16
2.9.2 Optical Imaging Protokoll	17
2.9.3 Perfusions-MRT Protokoll.....	20
2.10 Vermessung der Tumorgößen	24
2.11 Immunhistochemie.....	24
2.11.1 Entparaffinierung.....	24
2.11.2 Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL).....	24
2.11.3 Nachweis der Mikrogefäßdichte und Zellproliferation	25
2.12 Statistik.....	26
3 Ergebnisse	28
3.1 Optical Imaging	28
3.2 Perfusions-MRT.....	31
3.3 Immunhistochemie.....	34
3.4 Korrelation zwischen Bildparametern und Immunhistochemie	37
4 Diskussion	38
4.1 Evaluation der erhobenen Datensätze des Optical Imaging	38
4.2 Evaluation der Perfusions-MRT Messungen.....	42
4.3 Diskussion der Immunhistochemie.....	44
4.4 Limitationen der durchgeführten Studie und der verwendeten Modalitäten.....	45

4.4.1	Limitationen des Versuchsaufbaus und der Methodik	45
4.4.2	Limitationen des Optical Imaging	45
4.4.3	Limitationen des verwendeten Tracers	46
4.4.4	Limitationen der Perfusions-MRT	48
4.5	Schlussfolgerung	49
5	Zusammenfassung	51
	Abkürzungsverzeichnis	53
	Tabellenverzeichnis	57
	Abbildungsverzeichnis	58
	Literaturverzeichnis	59
	Danksagung	73
	Publikationen	74
	Eidesstattliche Erklärung	77

1 Einleitung

1.1 Charakterisierung des Therapieansprechens bei medikamentöser Therapie von soliden Tumoren (RECIST-Kriterien)

Die stetigen Veränderungen in der pharmakologischen Tumorthherapie im Laufe der letzten Jahre erfordern eine Weiterentwicklung der bildgebenden Modalitäten, um sowohl ein Ansprechen als auch Versagen des angewendeten Therapieregimes im Verlauf exakter beurteilen und bei Bedarf rechtzeitig verändern zu können. Es stehen zunehmend neuartige molekulare Pharmaka zur Verfügung, wie monoklonale Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren, die heutzutage zu den Standardtherapien in der Behandlung metastasierter Malignome zählen¹⁻³. Im Gegensatz zu etablierten Chemotherapieregimen wirken diese Pharmaka allenfalls sekundär zytotoxisch²⁻⁴. Sie beeinflussen in erheblichem Maße sowohl die Pathophysiologie des Tumors, den Tumormetabolismus als auch die Neoangiogenese, weniger ausgeprägt hingegen die Tumormorphologie⁵. In frühen Tumorstadien und bei Therapiebeginn stellt sich die Beurteilung der Wirksamkeit dieser neuartigen Substanzen schwierig dar, da es bei vergleichsweise später Größenregredienz kaum möglich ist ein morphologisches Korrelat für die Veränderung auf molekularer Ebene zu finden.

Das erste standardisierte Manual zur Interpretation der Größenveränderung messbarer Tumorerläsionen wurde 1979 von der World Health Organisation (WHO) in Genf veröffentlicht. Aufgrund der Zunahme bzw. Abnahme der Größe der im Verlauf beobachteten Neoplasien wurde eine Einteilung der Erkrankung modalitätsübergreifend in vier Stadien vorgenommen: komplette Remission, partielle Remission, stabil und Progress^{6,7}.

Im Zuge der Weiterentwicklung dieser elementaren Klassifizierung im Bereich der onkologischen Bildgebung entstanden die im Jahre 2000 aufgesetzten und 2009 modifizierten RECIST (Response Criteria in Solid Tumors)-Kriterien^{5,8-11}. In diesen ersten Versuchen eine vereinheitlichte Version zur Ermittlung der Tumorentwicklung im Verlauf zu erstellen wurden ausschließlich morphologische Parameter als Evaluationskriterien herangezogen, welche heute noch modalitätsübergreifend- und dabei im Wesentlichen in der Computertomographie (CT)-Anwendung finden. Als Kernpunkte seien die Vermessung von Target-, Non-Target- und neuen Läsionen genannt, die es ermöglichen das Gesamtansprechen der Tumorerkrankung zu ermitteln. Diese Kriterien ermöglichen eine inter- und intraindividuelle Vergleichbarkeit bei der Befundung und sorgen für Transparenz in der klinisch-onkologischen Bildgebung¹²⁻¹⁴.

Der größte Nachteil dieser Methodik ist jedoch die unzureichende und verzögerte Beurteilbarkeit neuerer Medikamentengruppen, die in ihrem Wirkmechanismus primär in den Apoptosezyklus und in die Neoangiogenese der Tumorzelle eingreifen und dabei erst in späteren Therapiestadien zu einer Reduktion der Tumormasse führen¹⁵⁻¹⁸. Dies legt die Notwendigkeit der Entwicklung neuer molekularer Marker nahe, die ein Monitoring in der Initialphase der und eine individuelle Steuerung der Therapie ermöglichen.

1.2 Antiangiogenetische Tumorthapeutika

Die Entwicklung neuer Chemotherapeutika verschiebt sich prospektiv gesehen in Richtung von spezifischen niedermolekularen Medikamenten, die Proteine binden, die während der Angiogenese und der Zellteilung exprimiert werden und damit Zyklen der Tumorprogression inhibieren. Zunehmend stehen damit neuartige molekulare Pharmaka in der klinischen Tumorthherapie zur Verfügung, wie monoklonale Antikörper und Multityrosinkinaseinhibitoren (MTKI), deren Wirksamkeit bei diversen malignen Neoplasien bereits beschrieben wurde¹⁻³.

Regorafenib wirkt antiangiogenetisch und antiproliferativ ^{16,19,20}. Experimentell wird Regorafenib im Gliom-, Brust-, Kolon- und Nierenzellkarzinomxenograftmodell eingesetzt ^{16,19,20}. Seit 2013 ist eine Regorafenibtherapie beim metastasierten Kolonkarzinom und beim Gastrointestinalem Stromatumor (GIST) im Falle eines Nichtansprechens von Sunitinib und Imatinib zugelassen ^{18,21}. Seit 2017 ist Regorafenib auch für die Zweitlinienbehandlung des Hepatozellulären Karzinoms zugelassen. In Deutschland wurde Regorafenib jedoch 2016 aufgrund eines fehlenden Zusatznutzens nach einer Entscheidung des Gemeinsamen Bundesausschusses vom Markt genommen.

Der pharmakologische Wirkmechanismus von Regorafenib wurde im Detail in zellulären Kinase-Phosphorylierungsassays beschrieben. Durch Bindung verschiedener angiogenetisch wirksamer Faktoren wie BRAF, BRAFV600E, DDR2, Eph2A, FGFR-1, KIT, FGFR-2, PDGFR- α , PDGFR- β , PTK5 RAF-1, RET, SAPK2, TIE2, TrkA, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR -3 kommt es zu einer Hemmung der Neoangiogenese und zu einer Gefäßstabilisierung im Bereich des Tumors ¹⁸. Dadurch bewirkt Regorafenib molekularbiologisch eine Hemmung der weiteren Metastasierung und des Tumorwachstums. Die proapoptotischen Effekte erzielt Regorafenib über die Induktion eines p53 hochregulierenden Mechanismus zur Modulation der Apoptose (PUMA) und über die Steigerung der SHP-1 Aktivität getriggerten Hemmung von STAT3 ²². Die klinische Verifizierung der beschriebenen Wirkungsweise fand im Rahmen einer multizentrischen, randomisierten Phase 3 Studie statt ²³.

In frühen Tumorstadien und bei Therapiebeginn stellt sich die Beurteilung der Wirksamkeit dieser neuartigen Substanzen, wie bereits beschrieben, schwierig dar. Dadurch tritt die alleinige Anwendung der RECIST-Kriterien zugunsten von funktionellen und molekularen Biomarkern generiert durch verschiedene Modalitäten, die wie im Falle des Optical Imaging (OI) teilweise noch präklinisch untersucht werden, teilweise hingegen schon klinisch etabliert sind,

in den Hintergrund. In diesem Sinne definieren sowohl die PERCIST (PET Response Criteria in Solid Tumors)- als auch die Lugano-Kriterien weitere Parameter, die zur validen Evaluation des Therapieansprechens der Behandlung solider Tumoren, bzw. Lymphomen im Speziellen, herangezogen werden können²⁴⁻²⁶. Sowohl mit den PERCIST- als auch mit den Lugano-Kriterien werden dabei quantitative bzw. semiquantitative Parameter definiert, die es erlauben die metabolische Aktivität (FDG-uptake) von Neoplasien im Verlauf kriterienbasiert zu beurteilen.

1.3 Multimodale Biomarker des Therapieansprechens

Bei der Darstellung der medikamentös induzierten Veränderungen im Tumormetabolismus initialer Therapiephasen sind sensitive funktionelle Biomarker von großer diagnostischer Bedeutung. Um möglichst zu Beginn einer medikamentösen Tumorthherapie eine verlässliche Evaluation der molekularen, pathophysiologischen Prozesse gewährleisten zu können, untersuchen viele Arbeitsgruppen weiterhin im präklinischen und klinischen Rahmen das Potential funktioneller, multimodaler Parameter. Zur Beantwortung spezifischer klinischer Fragestellungen, wie der postoperativen Verlaufskontrolle von hochgradigen Gliomen, werden bereits Protokolle der Perfusions-MRT in der neuroradiologischen Diagnostik eingesetzt²⁷. Über generierte Surrogatparameter der Tumorperfusion, wie dem zerebralen Blutvolumen und dem zerebralen Blutfluss, können Rückschlüsse auf die Tumorbiologie und Wachstumsdynamik von Gliomen gezogen werden^{27,28}.

Das wissenschaftliche Interesse am Optical Imaging (OI) als strahlungsfreie Modalität in der experimentellen, onkologischen Bildgebung ist im Laufe der letzten Jahre kontinuierlich gestiegen. So zeigten Schellenberger et al., dass es das OI in einem präklinischen Setting nach Injektion eines Phosphatidylserin-spezifischen Tracers ermöglicht apoptotische Zellverbände

nach Durchführung einer Chemotherapie in vivo darzustellen ²⁹. Durch Weiterentwicklung dieses Konzepts der Erzeugung non-invasiver Korrelate der Bildgebung für pathophysiologische Prozesse, beschrieben Christensen et al. im Rahmen der präoperativen Bildgebung in einem Zungenkarzinomxenograftmodell der Maus die Möglichkeit einer fluoreszenzbasierten, Urokinase-like Plasminogen Activator Receptor-spezifischen Tumordarstellung ³⁰. Darüber hinaus wurde bereits von Lederle et al. die Anwendung des OI in einem Epidermoidkarzinomxenograftmodell zum Therapiemonitoring und zur Evaluation frühtherapeutischer Effekte von Sunitinib untersucht ³¹.

1.4 Fragestellung

In der präklinischen, experimentellen und der klinischen Bildgebung steht mit dem Perfusions-MRT eine Modalität zur Verfügung, die in der Lage ist Parameter zu generieren, die als Korrelate für pathophysiologische Mechanismen in vivo dienen können ^{20,32-34}. Mit der vorliegenden Studie soll evaluiert werden, ob OI mit dem fluoreszenzmarkierten Tracer Annexin A5 zum nicht-invasiven Monitoring der proapoptotischen Effekte einer antiangiogenetischen Therapie im Xenograftmodell der Ratte herangezogen werden kann. Dazu sollen die Ergebnisse dieser auf fluoreszenzoptischen Verfahren basierenden Bildgebung mit den molekularen Markern für die Tumorperfusion (Plasmafluss und Plasmavolumen) der Perfusions-MRT korreliert und immunhistochemisch validiert werden.

Die experimentelle Untersuchung dieser molekularen Imaging Biomarker des Therapieansprechens wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Dabei soll untersucht werden, ob eine zuverlässige Beurteilung des frühen Therapieansprechens unter antiangiogenetischer Therapie möglich ist. Dies steht im Gesamtkontext des modalitätenübergreifenden Versuchs prospektiv eine personalisierte und zielgerichtete Tumorthherapie anbieten und deren Effektivität nicht invasiv und in vivo visualisieren zu können ³².

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Tiere wurden gemäß den Richtlinien des National Institute of Health gehalten und versorgt. Die Versuche wurden nach Genehmigung durch das Sachgebiet für Veterinärwesen der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Gz.55.2-54-2532-33-10). Für die Studie wurden 7-8 Wochen alte, athymische Nacktratten (Foxn1^{nu}, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN) verwendet. Durch eine homozygote Mutation im FOXN1-Gen (forkhead box N1) des Chromosoms 10, welches die Keratinexpression reguliert, sind die Ratten athym, und weisen Formen kongenitaler Alopezie und Nageldystrophie auf. Sie verfügen über eine stark eingeschränkte T-zellvermittelte Immunabwehr³⁵. Die Tiere wurden in belüfteten Käfigen (n=4 Ratten pro Käfig), bei einer konstanten Raumtemperatur von 26 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 %, mit 18 Raumlftwechselln pro Stunde und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten. Die Tiere wurden ad libitum mit Wasser und dediziertem sterilem Standardfutter für Zuchthaltung (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN) ernährt.

2.2 Tumorzelllinie

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 (ATCC® HTB-38TM, Wesel, Deutschland) wurde 1964 einer 44-jährigen, an einem kolorektalen Adenokarzinom erkrankten Patientin entnommen. Die Tumorzellen sind epithelialen Ursprungs und wachsen adhären³⁶.

2.2 Antikörper und Detektionssysteme

Antikörper/ Detektionssysteme	Beschreibung	Verdünnung
Anti-CD31	Primärantikörper Polyclonal Rabbit Anti-CD31 (Abcam ab28364)	1:50
Anti-Ki-67	Primärantikörper polyklonal Kaninchen Anti-Ki67 SP6 (Abcam ab 16667)	1:100
Anti-Anti-CD31	Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (DAKO Envision + System)	-
Anti-Anti-Ki-67	Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (DAKO Envision + System)	-
TUNEL	In situ cell death detection Kit, Fluorescein (SIGMA Aldrich)	-
HE	Mounting Medium EuKitt (DAKO)	-

Tabelle 1. Antikörper

2.3 Studiendesign

Zu Beginn der durchgeführten Studie wurden 7-8 Wochen alte athymische Nacktratten mit der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 subkutan (s. c.) über der linken Flanke inokuliert. Sobald die Tumoren ein Volumen von 800 mm^3 (Länge x Breite² x 0,5) erreichten, fand die randomisierte Gruppeneinteilung und die Baseline Messung durch das Optical Imaging (OI) und Perfusions- MRT statt (Tag 0). Nach sechstägiger Regorafenibtherapie- bzw. Placeboapplikation wurden an Tag 7 die Follow-up Messungen erneut mit OI und Perfusions-MRT durchgeführt. Daraufhin folgte die Tumorentnahme.

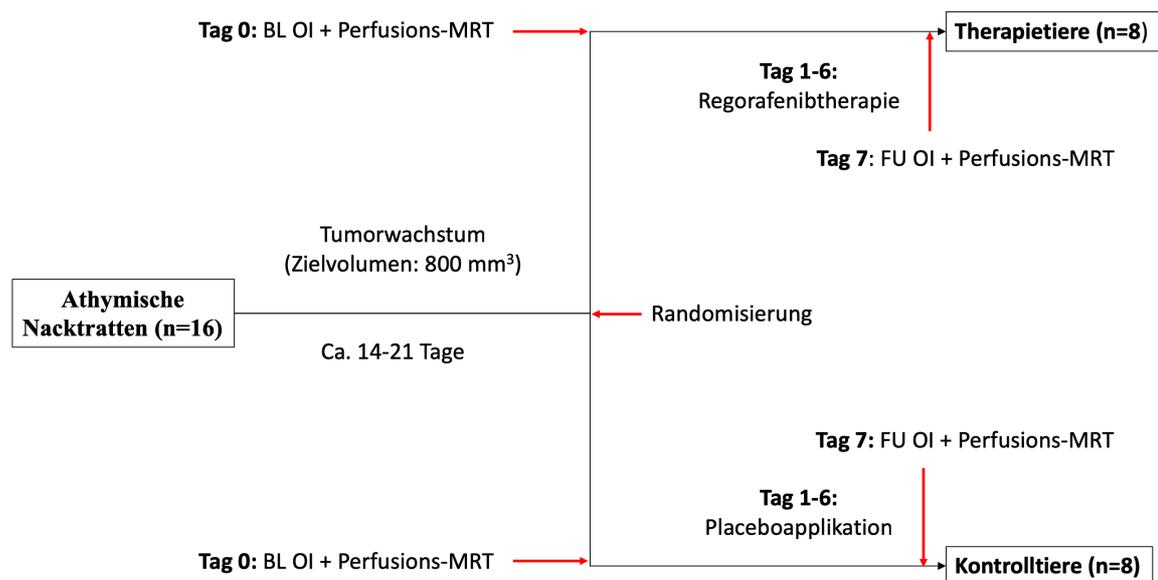


Abbildung 1. Graphische Darstellung des Versuchsablaufs. Schematisch zu sehen ist der zeitliche Verlauf des Versuchsaufbaus. An Tag 0 erfolgt jeweils die Baseline Messung (BL) mit OI und Perfusions-MRT. Dann wird den Tieren der Therapiegruppe über 6 Tage Regorafenib bzw. den Tieren der Kontrollgruppe ein Placebo verabreicht. An Tag 7 erfolgt die Follow-up Messung (FU).

2.3 Verbrauchsmaterialien

Azeton	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC-Farbstoff	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
Butterfly-Katheter Venofix® 24-G	Braun, Melsungen, Deutschland
Corning®Costar®Stripette (5, 10, 25 ml)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cytospinkammern BioRad	Hettich, Kirchlengern, Deutschland
Desinfektionsspray (Propan-2-ol)	Bode, Hamburg, Deutschland
DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorf Reagenzgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einstreu Ratten	Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN
Eosinlösung 0,5 %	Klinikumsapotheke, München, Deutschland

Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Rattenfutter Irradiated Laboratory Animal Diet	Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN
Glucose 5 %	Braun, Melsungen, Deutschland
H ₂ O ₂ 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe, puderfrei	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Hematoxylin Gill's Formula H-3401	Vector, Burlingame, Kanada
Injektionsnadeln Microlance	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kaiser's Glycerin-Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
OP-Haube	Barrie, Göteborg, Schweden
Matrigel® Growth Factor Reduced 354230	Becton Dickinson, Bedford, England
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mundschutz	Barrier, Göteborg, Schweden
Na-Acetat-Puffer 0,1 M	Klinikapotheke des Klinikums der Universität München, München, Deutschland
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen, Deutschland
O ₂	Linde, Pullach, Deutschland
Objektträger Thermo Scientific	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma- Aldrich, München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen	Nunclon™Surface, Roskilde, Dänemark
PBS 0,1 M	Klinikapotheke, München, Deutschland
Pipetboy®Comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Skalpell	Feather, Osaka, Japan

Stickstoff flüssig	Messer, Krefeld, Deutschland
Tris-HCL-Puffer 0,5 mol/ l	Klinikapotheke, München, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Xylol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
6-Well-Plats Multiwett™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Microtest™ U-Bottom	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.4 Arzneimittel, Kontrastmittel und Tracer

Annexin Vivo 750	Perkin Elmer, Waltham, MA
Bepanthen® Augensalbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Gadobutrol (Gadovist®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Isofluran Forene 100 % (v/v)	Isofluran Forene 100 % (v/v)
Kaliumchlorid 26,1 %	Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin 50 mg/m	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Regorafenib (Stivarga®)	Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland
Ulcogant®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (Rompun®) 2 %	Bayer, Leverkusen, Deutschland

2.5 Geräte und Programme

3T MRT (Magnetom Verio)	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Analysenwaage Pioneer™	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Analysenwaage PM4600	Mettler, Giessen, Deutschland

CO ₂ - Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Digitale Waage	Soehnle, Nassau, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop TCS-SP2	Leica, Solms, Deutschland
IDL 6.4	ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO
Kleintierpumpe für KM (Harvard Apparatus)	Instech Lab. Inc., Plymouth Meeting, PA
Kühlschrank 5° C (K5)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kyrostatmodell CM 1900	Leica, Bensheim, Deutschland
Luftstromschrank Uni Protect	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Mikroskop Standard 25	Zeiss, Ulm, Deutschland
Mikrowellengerät	Sharp, Hamburg, Deutschland
Mobiles Narkosesystem UniVet®	Groppler, Deggendorf, Deutschland
Optical Imaging Gerät (In-Vivo FX PRO)	Bruker Corp., Billerica, MA
Optical Imaging Bildanalyse Software	Bruker Corp., Billerica, MA
pH- Messsonde MR3001K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
PMI	PMI Software und Datenkommunikations-GmbH, Klagenfurt, Österreich
SPSS 21.0	IBM, Washington, WA
Sterilwerkbank LaminAir HLB2448GS/ HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Temperaturmessgerät	Rapid, Rimpfing, Deutschland
TWIST	Siemens, Erlangen, Deutschland
Vier-Kanal-Kleintierspule	RAPID MR International, Columbus, OH
Wärmelampe Ceramic Infrared 300W	Beurer, Ulm, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Cytospin Universa

Hettich, Kirchlengern, Deutschland

Zentrifuge Rotanda 46R

Hettich, Kirchlengern, Deutschland

2.6 Kultivierung der Tumorzellen

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Es wurden humane Kolonkarzinomzellen der Zellreihe HT-29 verwendet. Diese besitzen die Morphologie von Epithelzellen und können *in vivo* in Xenograftmodellen verwendet werden³⁶. Die HT-29-Zellen wurden in McCoy-5A-Medium mit 10 % (v/v) FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 5 % CO₂, 85 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C kultiviert.

Die zu einer Konfluenz von 80-90 % gewachsenen Zellen wurden passagiert, um eine weitere Zellproliferation zu ermöglichen. Zunächst wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden darauf durch eine zweiminütige Inkubation in 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C abgelöst. Nachdem alle Zellen gleichmäßig abgelöst waren, erfolgte die Zugabe des McCoy 5A Mediums, um das Trypsin zu neutralisieren. Die abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Nach Zellzählung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in den gewünschten Konzentrationen auf Zellkulturschalen verteilt.

Bei ausreichender Zellzahl konnten einige Zellen auch für einen späteren Verwendungszweck in flüssigem Stickstoff asserviert werden. Dazu wurde dem Zellmedium DMSO (10 %) versetzt. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (Haereus Zentrifuge, 800 rpm, 2 min, RT). Darauf erfolgte eine Zellzählung und die anschließende Einstellung auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. Danach wurden die Einfriereröhrchen langsam in den flüssigen Stickstoff abgesenkt.

2.7 Inokulation der Versuchstiere mit der Tumorzelllinie

Die humanen HT-29 Kolonkarzinomzellen (2×10^6 Zellen pro Ratte; ATCC HTB- 38) wurden in 0,5 ml PBS (GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Germany) bei pH=7,0 und im Verhältnis von 1:1 zu Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) gelöst. Zu Beginn der Implantation wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Dazu wurden die Ratten bei 5 % Isofluranzufuhr in einem abgedeckten Plexiglas-Behälter platziert. Die Narkosetiefe wurde durch die Untersuchung des Zwischenzehenreflexes überprüft. Dann wurden die Tiere auf eine Arbeitsunterlage gelegt. Die Isofluranzufuhr wurde daraufhin auf 2 % reduziert und eine Atemmaske verwendet.

Anschließend erfolgte die subkutane Applikation der Emulsion mit einer 1 ml Spritze und einer 20 G-Kanüle (Sterican®, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) in die linke Flanke der Ratten. Eine intravasale Injektion wurde jeweils durch Aspiration ausgeschlossen. Die Tumoren benötigten zwischen 14 und 21 Tage um auf ein Volumen von 800 mm^3 (Länge x Breite² x 0,5) zu wachsen. Mit einem Messschieber wurde die Tumorgöße täglich bestimmt. Darauf wurden die Tiere randomisiert der Therapie oder Kontrollgruppe zugeteilt.

2.8 Regorafenibtherapie und Placeboapplikation

Als Therapeutikum wurde der MTKI Regorafenib (BAY 73-4506, Stivarga®, Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland) eingesetzt. Nachdem die Tumoren auf das bereits beschriebene Volumen angewachsen waren, wurde von Tag 1 bis Tag 6 therapiert. Dabei wurde der Therapiegruppe unter Isoflurannarkose täglich 10 mg Regorafenib pro Kilogramm Körpergewicht peroral (p. o.) verabreicht. An Tag 7 wurde die Therapie nach sechsmaliger Gabe des Therapeutikums bzw. des Placebos beendet. Die Basislösung für die Therapie- und die Placebogruppe wurde wie im Folgenden beschrieben hergestellt. Zunächst wurden 3,4 ml von

1,2 Propylenglykol mit 3,4 ml PEG 400 und 1,2 ml Pluronic F68 vermischt und auf ca. 50 °C erhitzt. An dieser Stelle wurden zur Herstellung der Therapie unter Verwendung eines Magnetrührers 50 mg Regorafenibpulver hinzugegeben und vollständig gelöst. Für die Placebo-Lösung wurde dieser Teil weggelassen und mit dem für beide Gruppen nächsten Schritt fortgeföhren. Es wurden 200 µl destilliertes Wasser hinzugegeben und mit dem Magnetrührer eingeröhrt. Die fertige Lösung enthielt 5 mg/ml Regorafenib. Jede Ratte erhielt abhängig von ihrem Körpergewicht die entsprechende Menge der Therapie-Lösung (durchschnittlich 0,35 ml bei 100 mg Körpergewicht). Die Ratten der Placebogruppe erhielten eine volumenäquivalente Placebolösung.

2.9 Bildgebung

2.9.1 Versuchsaufbau

Zur Kontrastmittel- bzw. Tracerapplikation wurde vor Perfusions-MRT bzw. OI Messungen jedem Tier ein intravenöser Zugang gelegt. Unter Isoflurannarkose (Isofluran 2 %) über eine Atemmaske wurde das Tier auf einer Arbeitsfläche platziert. Zur Stauung wurde am proximalen Abschnitt des Schwanzes ein Tourniquet platziert. Anschließend wurde eine 25-Gauge-Butterfly-Kanüle (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) in die laterale Schwanzvene gelegt und fixiert. Eine mobile Sauerstoff-Isofluran-Einheit ermöglichte das Aufrechterhalten der Narkose während des Transports der Ratten. Nachdem an Tag 7 die Perfusions-MRT- und OI Messungen abgeschlossen waren, erfolgte die isofluranbegleitete Einschläferung der Tiere. Dazu wurde Isofluran zu einer Konzentration von 5 % verabreicht. Bei ausreichend tiefer Narkose wurden die Tiere mittels intrakardialer Applikation von 3,5 ml Kaliumchlorid euthanasiert. Das Tumorgewebe wurde dargestellt, abgesetzt, explantiert und in 4 % PFA fixiert.

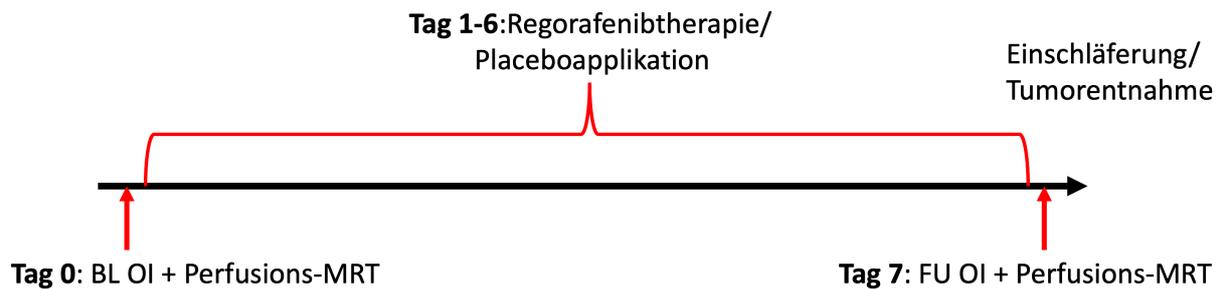


Abbildung 2. An Tag 0 erfolgt die Baseline Messung (BL) des Optical Imaging (OI) bzw. der Perfusions-MRT. Es folgen 6 Tage Regorafenibtherapie bzw. Placeboapplikation. An Tag 7 wird die Follow-up Messung (FU) des Optical Imaging bzw. der Perfusions-MRT mit anschließender Einschläferung und Tumorentnahme durchgeführt.

2.9.2 Optical Imaging Protokoll

Der dem OI zu Grunde liegende Mechanismus beruht auf der Detektion der von verschiedenen Gewebetypen emittierten Photonen. Die Messungen des OI wurden an einem vollautomatischen, für die präklinische Kleintierbildgebung hergestellten System unter der Verwendung einer CCD-Kamera durchgeführt (max. Auflösung 2048x 2048 Pixel, In-Vivo FX PRO, Bruker Corp., Billerica, MA).

Annexin Vivo 750, der in dieser Studie verwendete Fluoreszenztracer, besteht aus einem Fluorochrom mit Absorptionsmaximum im nahen Infrarotbereich (NIR), an welches Annexin A5 gekoppelt ist. Jede Fluorophorgruppe besitzt charakteristische Eigenschaften hinsichtlich Exzitations- und Emissionswellenlänge, Quantenausbeute und Helligkeit³⁷. Die Hüllenelektronen der Fluorophore werden durch Einstrahlung von Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau gebracht bzw. angeregt (Exzitationswellenlänge). Im Zuge der Relaxation dieser Elektronen werden Photonen emittiert (Emissionswellenlänge), die von einer speziellen Kamera in sichtbares Licht umgewandelt werden können. Die Quantenausbeute und die Helligkeit eines Fluorophors hängen maßgeblich vom Anteil der Moleküle ab, die nach Exzitation ein Photon emittieren.

Annexin A5 ist ein zelluläres Protein, das selektiv an Phosphatidylserin bindet, welches in frühen Phasen der Apoptose an der Außenseite der Phospholipid-Doppelschicht exprimiert wird³⁸. Im Rahmen der Frühphase der Apoptose findet eine Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran zur Außenseite statt³⁹. Die gemeinsame Endstrecke der Apoptose kernhaltiger Zellen und der Eryptose ist die Aktivierung des Enzyms Scramblase nach erhöhtem Calcium-Einstrom. Anschließend kommt es zur extrazellulären Phosphatidylserinexposition, der Bindung von Makrophagen und letztendlich zur Phagozytose⁴⁰⁻⁴². Bevor dieser pathophysiologische Prozess eintritt, bindet Annexin Vivo 750, das zwei Stunden vor der Messung über den in der lateralen Schwanzvene gelegten Zugang appliziert wurde, dieses Molekül spezifisch. Dabei wurden zuerst 0,8 ml Annexin Vivo 750 manuell injiziert, gefolgt von 0,5 ml einer NaCl Lösung, um Tracerrestmengen aus dem Schlauchsystem zu mobilisieren.

Streuung, Signalabschwächung durch Gewebeabsorption und Autofluoreszenz lassen sich bei in vivo Messungen nicht komplett vermeiden, lediglich minimieren, indem man Fluorophore wählt, deren Exzitationsmaxima nahe am Infrarotbereich (near infrared range, NIR) liegen^{43,44}. Da jedoch selbst Licht aus dem NIR von Körperhaaren absorbiert und gestreut wird und zu Artefakten bei den Messungen führt, war es notwendig sämtliche Restbehaarung der athymischen Nacktratten vor der Untersuchung zu entfernen. Anschließend wurden die Tiere mit dem subkutan gelegenen Tumor direkt auf der Untersuchungskassette positioniert und an die Isofluranmaske angeschlossen.

Das daraufhin initiierte multimodale OI-Bildgebungsprotokoll bestand aus 3 Schritten. Begonnen wurde mit einem konventionellen Röntgenbild (1. Schritt, 30 s Belichtungszeit), es folgte eine Weißlichtaufnahme (2. Schritt, Exzitationsfilter 410 nm, kein Emissionsfilter,

Sichtfeld 200 mm, focal plane 11 mm, Auflösung 260 ppi x 260 ppi, 30 s Belichtungszeit) und abschließend eine Fluoreszenzaufnahme (3. Schritt, Exzitationsfilter 730 nm, Emissionsfilter 790 nm, Sichtfeld 200 mm, focal plane 11 mm, 2x x-binning, 2x y-binning, Auflösung 130 ppi x 130 ppi, 30 s Belichtungszeit). Die Gesamtuntersuchungszeit betrug 7 min und beinhaltete die Bildrekonstruktion und Darstellung. Vor der eigentlichen Messaufnahme erfolgte die Durchführung einer Leermessung, um die Messung an die Hintergrund- und Autofluoreszenz zu kalibrieren.

Die anschließende Bildanalyse erfolgte durch die systemeigene Software zur Nachbearbeitung der generierten Datensätze (Bruker Molecular Imaging Software MI 7.2, Billerica, MA). Zur Ermittlung der Signalintensität die vom Tumorgewebe ausgeht wurden drei Regions of Interest (ROI) in den Datensatz der Fluoreszenzmessung eingezeichnet. Dabei wurde eine ROI über dem Tumor platziert, der das eigentliche Zielgewebe darstellt, eine weitere über der Hüft- bzw. Oberschenkelmuskulatur und eine dritte ROI über dem Hintergrund neben der Ratte. Die Berechnung der signal-to-noise ratio (SNR) erfolgte unter Verwendung der Formel: $SNR = \frac{SI_{\text{Tumor}} - SI_{\text{Hüftmuskulatur}}}{SD_{\text{Hintergrund}}}$.

In dieser Formel stellt SI die durchschnittliche Signalintensität und SD die Standardabweichung im Sinne des Hintergrundrauschens in einer definierten ROI dar. Die Signalintensität besitzt die Einheit a.u. für arbiträre Einheiten. Die SNR kann durch die Berücksichtigung der erläuterten biophysikalischen Eigenschaften optimiert und die Sensitivität erhöht werden. Dies ermöglicht eine genaue Darstellung selbst kleiner Zellgruppierungen⁴⁵.

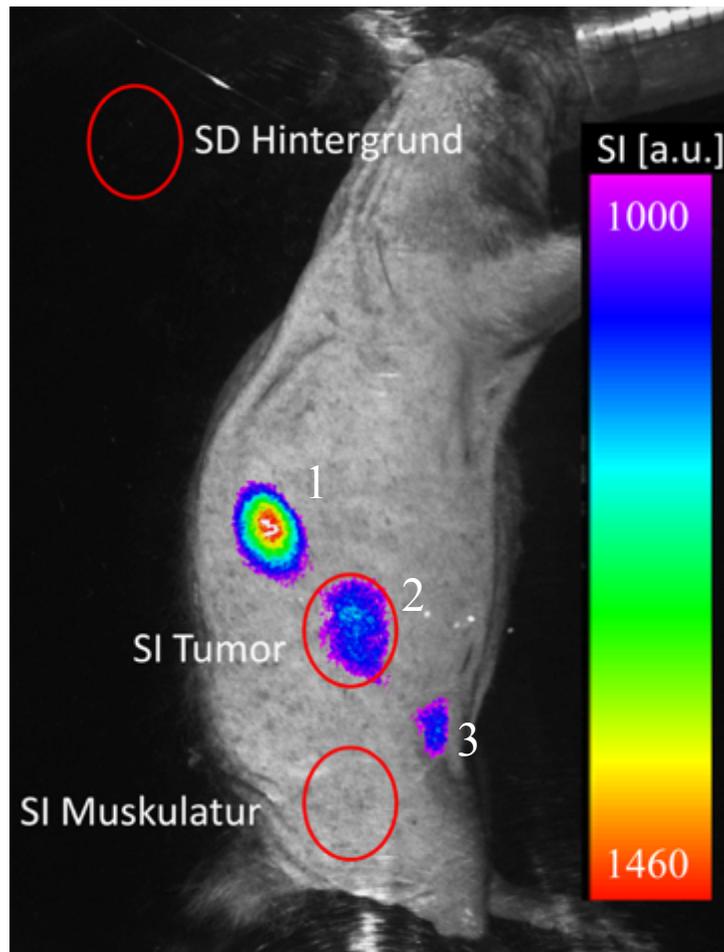


Abbildung 3. Fusioniertes Weißlicht- und Annexinbild mit farbkodierter Fluoreszenzanreicherung. ROI Bestimmung zur Berechnung der SNR. Rot markiert sind die ROI für SI_{Tumor} , $SI_{\text{Hüftmuskulatur}}$ und $SD_{\text{Hintergrund}}$. In der Abbildung zu erkennen sind die ROI für den Hintergrund, den Tumor und die Muskulatur. In den jeweiligen Bereichen wird die SI gemessen. Die Nieren, der Tumor und die Blase sind die Regionen, in denen eine Traceranreicherung stattfindet. Die Nieren (1) stellen die Lokalisation der größten Traceranreicherung dar. Der subkutan in der Flanke des Tieres liegende Tumor (2) zeigt eine von peripher nach zentral zunehmende Traceranreicherung. In der Harnblase (3) lässt sich durch Tracerverstoffwechslung- und Ausscheidung ebenso eine erhöhte Tracerkonzentration erkennen.

2.9.3 Perfusions-MRT Protokoll

Die Perfusions-MRT generiert Korrelate für die Perfusion mikro- und makrovaskulärer Strukturen *in vivo* ⁴⁶⁻⁴⁸. Die Untersuchung durch die dynamische, kontrastmittelverstärkte Perfusions-MRT wurde auf einem klinischen 3-Tesla MRT (Magnetom Verio, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die Ratten befanden sich dabei in Rückenlage in einer speziellen Vier-Kanal-Kleintierspule. Als Kontrastmittel wurde das auch klinisch zur Anwen-

dung kommende, extrazelluläre, makrozyklische Gadobutrol (Gadovist®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Gadobutrol besitzt eine Masse von 605 kD, ist paramagnetisch und verkürzt die T1-Relaxationszeit von umgebenden Wassermolekülen. Nach intravasaler Applikation tritt es nach kurzer Zeit aus den Gefäßen in das Interstitium über ⁴⁹. Gadobutrol wurde durch eine spezielle Kleintierinjektionspumpe (Harvard Apparatus PHD 2000 Series, Insteck, Plymouth Meeting, PA) in einer Dosierung von 0,1 mmol/kg Körpergewicht mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 7,2 ml/min verabreicht. Darauf folgte die Nachinjektion von 0,5 ml NaCl ^{32,46}.

Nach der Erfassung der Position des Tieres durch den einen Localizer erfolgte die Akquisition der TWIST-Sequenz (Time-Resolved Angiography With Stochastic Trajectories) mit einer zeitlichen Auflösung von 1,3 s. Die dabei verwendete View-Sharing-Technik beruht auf einer selektiv häufigeren Auslesung des Zentrums des k-Raums im Vergleich zu dessen Peripherie. Durch die Anpassung der Auslesehäufigkeiten des Zentrums und der Peripherie des k-Raums können die Signalstärke, die Kontrastierung und Bildschärfe als auch die zeitliche Auflösung der Messungen an die Fragestellung angepasst werden ⁵⁰. Bei dieser Sequenz wurde nach 10 nativen Schnittebenen und 13 s Messzeit das Kontrastmittel intravenös verabreicht und anschließend 290 weitere Kontrastmittel-verstärkte Schnittbilder akquiriert. Das Ergebnis für jedes Tier waren 300 hochaufgelöste 3D Datensätze, die jeweils folgende Parameter besaßen: räumliche Auflösung von 0,39 mm x 0,39 mm x 3,0 mm, Repetitionszeit/Echozeit 6,34/2,11 ms, 128 x 128 matrix, Field-of-View 50 mm x 50 mm, Anregungswinkel 40°, Messdauer 6:30 min.

Die Datenverarbeitung und Analyse wurden an einem PMI (Platform for Research in Medical Imaging) Arbeitsplatz mit einer klinikintern in IDL 6.4 (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO) programmierten Software vorgenommen. Um eine Funktion des arteriellen

Flusses (AIF) zu erhalten, wurde eine ROI in der Vena cava inferior auf Höhe der Leber platziert. Diese Vorgehensweise ist speziell im Kleintiermodell sowohl aus physiologischer Sicht aufgrund der Shuntbildung zwischen der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior als auch methodisch aufgrund der Flussartefakte in der Aorta. Die Tumor ROI wurde über die Tumorperipherie gelegt, welche den äußeren 2 mm des Tumors entspricht. Methodisch liegt die Platzierung der ROI in der veränderten Kontrastmittelkinetik begründet, die im Tumorzentrum vorliegt und nicht mehr vitalem Tumorgewebe entspricht ⁵¹. Zur exakten Bestimmung von Tumorausdehnung wurden semiquantitative area under the curve maps (AUC) verwendet (Abbildung 3)

Zur Approximation der Tumorperfusion und der Tumorvaskularität in arbiträren Systemen können verschiedene Perfusionsmodelle verwendet werden. Bekannten Perfusionsmodellen wie dem 2-compartment-exchange Modell, dem tissue-homogeneity Modell und dem distributed parameters Modell liegen die gleichen Parameter zu Grunde. Physiologische Zellräume wie der Intra- und Extrazellularraum und der Intravasalraum werden als Kompartimente abstrahiert, zwischen welchen der Austausch einer Indikatorsubstanz stattfindet um eine Quantifizierung des Ein- und Ausstroms interkompartimentär zu ermöglichen. In dieser Studie wurde das 2-compartment uptake Modell verwendet. Dieses Modell ist eine Unterform des 2-compartment exchange Modells und wurde erstmals 2003 von Pradel et al. im Perfusions-MRT angewandt ⁵². Das Prinzip dieses Modells beruht auf der Bestimmung der Aufnahme der Indikatorsubstanz aus dem Intravasalraum in das Interstitium bei vernachlässigbarem Ausstrom (Abbildung 4).

Folgende Formel beschreibt den Zusammenhang der Tracerkonzentration im Gewebe ($c(t)$):

$$c(t) = F_p(\exp(-t/TP)) + E(1 - \exp(-t/TP)) \times c_a(t)$$

F_p stellt hierbei den Plasmafluss, E die extraction fraction und TP die Plasmatransitzeit dar ⁵³.

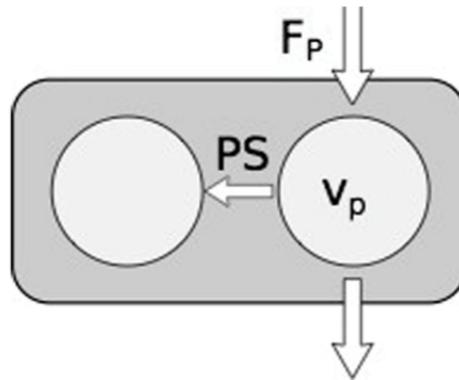


Abbildung 4. Schematische Darstellung des 2-compartment uptake Modells zur Beschreibung der Tracerkinetik. In diesem Modell wird der applizierte Tracer mit einem definierten Plasmavolumen (F_p) und unter einem definierten arteriellen Blutfluss (V_p) dem Kapillarnetz zugeführt. Von dort aus tritt der Tracer bei einem bestimmten Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt in das Interstitium über. Bei einer konstant niedrigen interstitiellen Konzentration wird in diesem Modell aufgrund der Kürze der Messzeit die Rückdiffusion als vernachlässigbar angenommen⁵³.

Um eine Näherung von der Kontrastmittelkonzentration in Verhältnis zur relativen Kontrastmittelanreicherung vornehmen zu können, wurde die Signalintensität gegen die Zeit aufgetragen. Nach dem Transfer der generierten Daten in das beschriebene Modell ließen sich die Werte für Plasmafluss (PF, ml/100 ml/min) und Plasmavolumen (PV, %) berechnen. Diese stellen Surrogate für die Tumorperfusion und die Tumervaskularität dar.

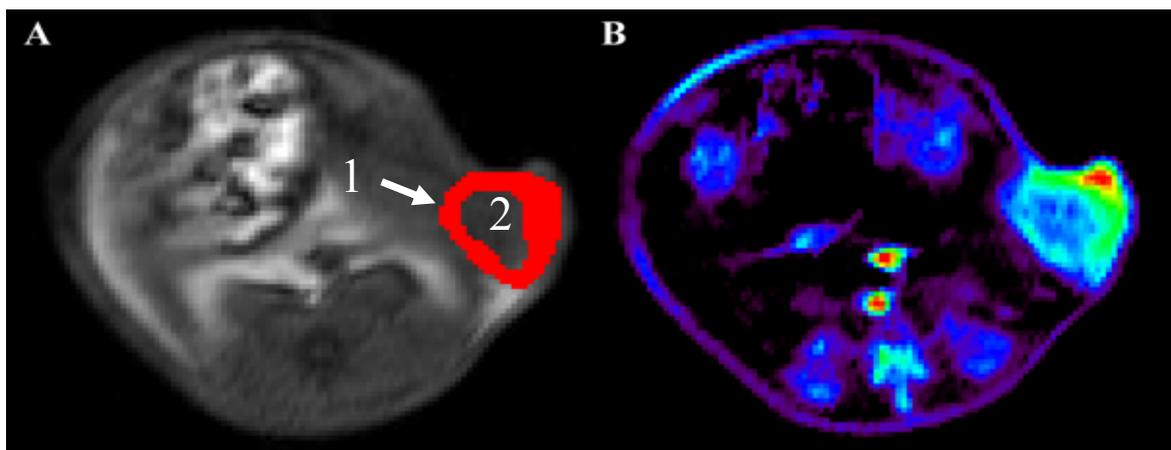


Abbildung 5. Berechnung der Perfusionswerte. T1 gewichtete Sequenz (A) und Parameter Map (B) in axialer Schnittführung auf Höhe des Tumors, die den Plasmafluss darstellt. Zu sehen ist die ROI zur Bestimmung der Messwerte der Perfusions-MRT (1 -> in A). In (B) werden die farbkodierten semiquantitativen Matrices verwendet um vitale von nekrotischen Tumoranteilen zu unterscheiden. Der Bereich der Peripherie entspricht dem gut vaskularisierten, vitalen Tumoranteil und ist mit 1-> gekennzeichnet. Die zentrale Nekrosezone ist mit 2 markiert.

2.10 Vermessung der Tumorgrößen

Das Tumolvolumen wurde ermittelt in dem unter Verwendung einer Schieblehre die Tumurlänge und Tumorbreite vermessen wurde und gemäß der Formel Länge x Breite² x 0,5 berechnet.

2.11 Immunhistochemie

2.11.1 Entparaffinierung

Initial wurden alle Gewebeschnitte entparaffiniert. Dann wurde von den in Paraffin eingebettetem Geweben Schnitte von ca. 4 µm Dicke angefertigt. Die Schnittpräparate wurden auf SuperFrost+ Objektträger (Thermo Scientific, Menzel, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Die Präparate wurden für 10 min bei 60 °C inkubiert. Vor Durchführung der H&E Färbung wurden die Schnittpräparate zweimal für je 10 min in Xylol-Ersatz (Neo-Clear®, Merck, Darmstadt) überführt. Die Gewebeschnitte wurden darauf in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert (5 min in 100 %, 3 min in 96 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol) und eine einmalige Spülung mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O). Zur Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden diese in 100 % Ethanol inkubiert. Zur Verhinderung der Ablösung der Gewebeschnitte von den Objektträgern während der Hitzedemaskierung, wurden die Präparate für eine Minute mit 0,05 % Celloidinlösung behandelt. Daraufhin wurden die Präparate getrocknet und für 5 min in 70 % Ethanol gestellt und abschließend mit destilliertem Wasser für jeweils 5 min gespült.

2.11.2 Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL)

Der TUNEL-Assay (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) ermöglicht die Darstellung von DNA-Einzelstrangbrüchen, die durch die Aktivität von

Nukleasen entstehen. Nach der Entparaffinierung der Präparate wurden diese für 30 min bei 37 °C in Pepsin-Lösung inkubiert. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Objektträger für 30 min bei 100 °C in Citrat-Puffer inkubiert, daraufhin für 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt und zweimal 3 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die TUNEL-Färbung (In situ cell death detection Kit, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Darauf erfolgte die Inkubation der Proben für 60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer im Dunkeln. Zuletzt wurden die Präparate dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und für mindestens eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln inkubiert (Vecta shield (DAPI); VectorLabs). Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte im Fluoreszenzmikroskop mit einem Standardfluoreszenzfilter von 520±20 nm (Leica DM, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Bei einer 200fachen Vergrößerung wurden dabei 10 zufällig ausgewählte high power fields ausgewertet

2.11.3 Nachweis der Mikrogefäßdichte und Zellproliferation

Zur Freilegung der CD31 und Ki-67 Epitope und Ermöglichung der Antikörperbindung erfolgte anfangs die Erhitzung der entparaffinierten Präparate in der Mikrowelle. Hierbei wurden die Gewebeschnitte in mit Citratpuffer gefüllten Plastikkuvetten für 20 min bei 600 W gekocht. Nach Abkühlen der Präparate für 20 min bei Raumtemperatur wurden sie jeweils für 10 min in ddH₂O und TBS-Tween gewaschen. Beide Färbemethoden sind Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)- Verfahren. Dadurch war es notwendig die endogene Peroxidase durch Zugabe eines Peroxidase-Blockierungsreagenz für 10 min zu blocken. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper anti-Ki-67 (Antikörper Polyclonal Rabbit anti-Ki-67 SP6 Abcam ab 16667, Verdünnung: 1:100 in Tris-HCL mit 1 % BSA) bzw. mit dem Primärantikörper anti-CD31 (Antikörper Polyclonal Rabbit, anti-CD31, Abcam ab28364, Verdünnung 1:50 in Tris-HCL mit 1 % BSA) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und darauf zweimal für 10 min mit TBS-Tween (0,05 %) gewaschen. 24 Stunden später wurden

die Präparate erneut zweimal für 10 min in TBS-Tween (0,05 %) Puffer gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt) inkubiert. Danach erfolgte erneut ein zehnminütiges Waschen mit TBS-Tween.

Daraufhin wurden für die Ki-67 Färbung 20 µl des DAB-Chromogen in 1ml Puffersubstrat (Dako EnVision+ System HRP (DAB), DAKO, Germany) hinzugefügt und für 5 bis 30 min inkubiert. Für die CD31-Färbung wurde das AEC-Chromogen verwendet (EnVision+ System HRP (AEC) (DAKO Diagnostika, Eching, Germany) und für 30 min inkubiert. Nach Spülung der Präparate mit 10 min in ddH₂O, erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne für 12 s mit Hämalaun-Lösung und anschließendem Bläuen für 10 min unter fließendem Wasser. Abschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal für 10 min in ddH₂O geschwenkt, bevor sie in Kaisers Glycerin Gelatine eingebettet wurden. Die Schnitte wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DM, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Die durchschnittliche Anzahl an CD31- und Ki-67- positiven wurde in 10 high power fields bei 200facher Vergrößerung bestimmt.

2.12 Statistik

Zielparameter waren SNR (OI), Plasmafluss (PF) (ml/100 ml/min), Plasmavolumen (PV) (%) und die durchschnittliche Anzahl positiv gefärbter Zellstrukturen wurde in 10 high power fields bestimmt. Die Ergebnisse der jeweiligen Untersuchung werden als Mittelwerte mit Standardfehler und einem Konfidenzintervall von 95 % wiedergegeben. Des Weiteren wurden zur besseren Vergleichbarkeit individueller, modalitätenübergreifender Entwicklungen von Kontroll- und Therapietieren die genannten Parameter in Form von Differenzen der prä- und posttherapeutischen Messwerte dargestellt (Δ SNR, Δ PF, Δ PV).

Für die Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe und zwischen den jeweiligen Gruppen wurde der Wilcoxon signed-rank test angewendet. Die Korrelationen zwischen den Parametern der Bildgebung und denen der Immunhistochemie wurden mit Spearman's ρ bestimmt. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Statistics 21.0 (IBM, Washington, WA).

3 Ergebnisse

Die OI-Messungen, die Perfusions-MRT und die immunhistochemische Analyse wurden bei insgesamt 16 Tieren erfolgreich durchgeführt (Therapiegruppe, n = 8; Kontrollgruppe, n = 8).

3.1 Optical Imaging

Die Regorafenibtherapie führte zu einem signifikanten Anstieg der Tracerbindung in allen Tieren der Therapiegruppe (mittlere SNR von $27,6 \pm 4,7$ a.u. auf $35,3 \pm 5,9$ a.u., $p = 0,012$) (Tabelle 2). In der Kontrollgruppe jedoch entwickelten sich die Werte der Follow-up Messung im Vergleich zur Baseline Messung heterogen und zeigten keine statistisch signifikante Veränderung (die durchschnittliche SNR sank von $26,3 \pm 1,6$ a. u. auf $25,5 \pm 3,1$ a. u., $p = 0,674$). Der Vergleich der Differenzen der Baseline- und Follow-up Messung von Therapie- zu Kontrollgruppe (Δ SNR) ergab einen signifikanten Unterschied (durchschnittliche Δ SNR: Therapiegruppe $+7,8 \pm 2,9$ a.u., Kontrollgruppe $-0,8 \pm 2,5$ a.u., $p = 0,021$). Abbildung 7 zeigt den Signalanstieg in Form der Tracerakkumulation im Tumor. Neben der Signalzunahme im Tumor war aufgrund der renalen Elimination des Tracers eine vermehrte Signalintensität im Bereich der ableitenden Harnwege zu beobachten. Die im Anschluss durchgeführte Messung der einzelnen explantierten Organe zur Bestimmung der lokalen organbezogenen Signalintensität bestätigte diese selektive Anreicherung (Abbildung 9). Dabei zeigten die Nieren und der Tumor die höchsten Signalintensitäten. Die individuellen Werte der Therapie- und Kontrollgruppe können der Tabelle 2 entnommen werden. Die Entwicklung der individuellen OI-Signalintensitäten in Therapie- und Kontrollgruppe kann den Liniendiagrammen in Abbildung 6 entnommen werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Baseline-Signalintensitäten der Therapie- und Kontrollgruppe (mittlere SNR: Therapiegruppe $27,6 \pm 4,7$ a.u., Kontrollgruppe $26,3 \pm 1,6$ a.u., $p = 0,401$).

Therapie	^a OI	^b OI	Kontrolle	^a OI	^b OI
1	48,3	64,5	1	35,4	35,3
2	48,5	50,2	2	23,0	26,8
3	21,4	46,2	3	28,9	40,1
4	20,6	24,8	4	25,2	27,5
5	20,0	20,6	5	24,9	20,6
6	18,4	23,1	6	20,3	20,1
7	15,1	19,5	7	25,8	14,9
8	28,3	33,9	8	26,8	18,6
Mittelwert	27,6*	35,3*	Mittelwert	26,3	25,5*
Standardfehler	4,8	5,9	Standardfehler	1,6	3,0

Tabelle 2. Individuelle Werte der OI Messungen. ^aOI: Signalintensität vor Therapie, ^bOI: Signalintensität nach Therapie. Mit * ist der signifikante Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe nach sechstägiger Regorafenibtherapie bzw. nach Placeboapplikation markiert. Darüber hinaus zeigt sich nach Therapie ein signifikanter Anstieg der Tracerbindung.

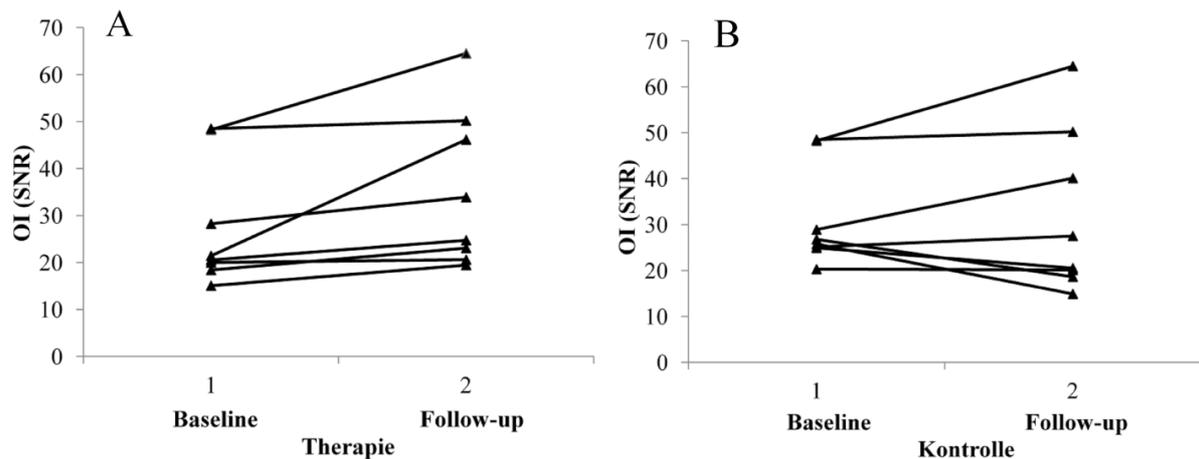


Abbildung 6. Liniendiagramme zu den OI-Signalintensitäten. Entwicklung der individuellen OI-Werte vor und nach Regorafenib- (A) bzw. Placebothherapie (B). Die Liniendiagramme stellen die unidirektionale Zunahme der SNR von Baseline- zu Follow-up Messung in der Therapiegruppe (A) dar. In der Kontrollgruppe (B) hingegen veränderte sich die SNR omnidirektional.

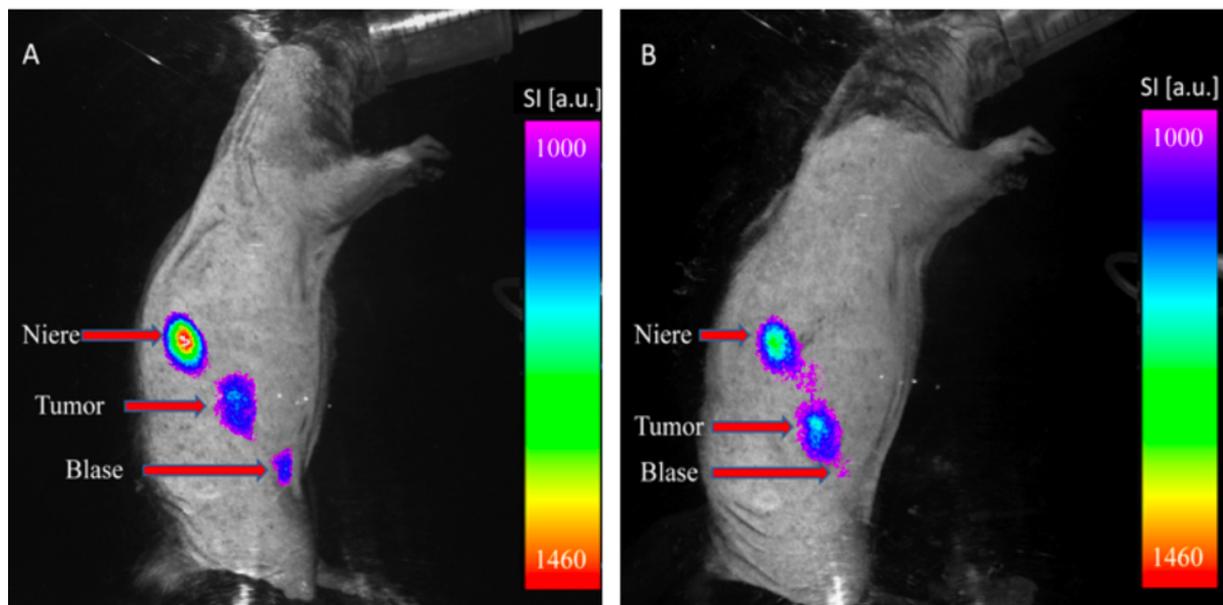


Abbildung 7. Das OI-Fusionsbild vor und nach sechsstägiger Regorafenibtherapie in der Therapiegruppe. Abgebildet ist eine Bildfusion der farbcodierten Fluoreszenzaufnahme und der Weißlichtaufnahme eines exemplarischen Tieres vor (A) und nach (B) sechsstägiger Regorafenibgabe. Es ist eine deutliche Zunahme der Signalintensität (SI) von Baseline- zu Follow-up-Messung im Tumor, insbesondere im Zentrum, erkennbar. Dies spricht für eine Tracerbindung im Tumor und im Bereich der ableitenden Harnwege. Eine hohe SI konnte in der Kontrollgruppe im Bereich der Niere und der Blase beobachtet werden und ist auf die renale Elimination des Tracers zurückzuführen³².

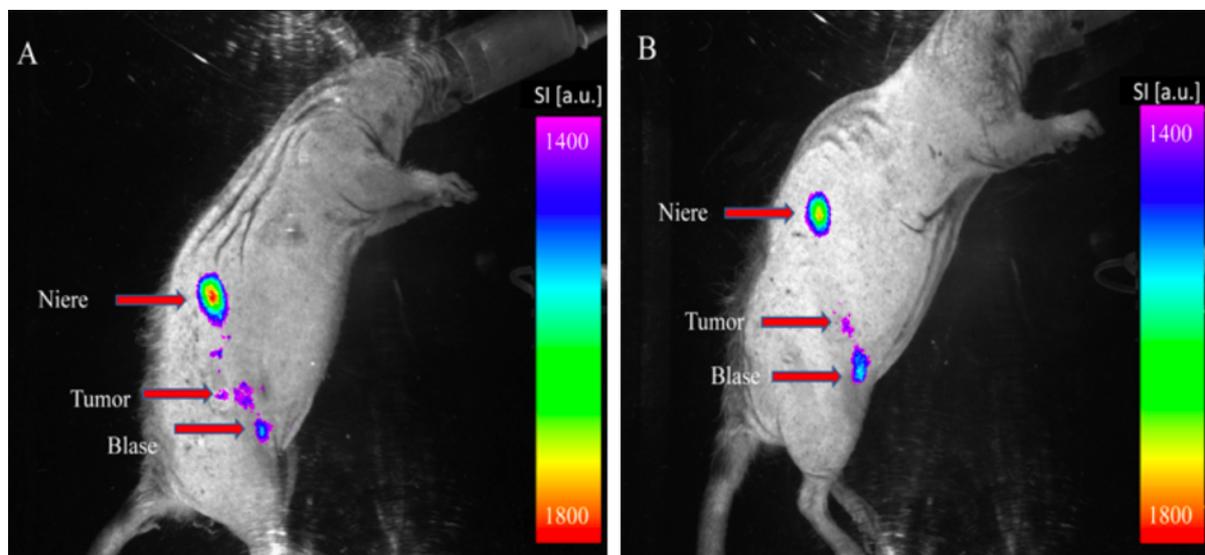


Abbildung 8. Die Annexin-basierte OI vor und nach Placebothherapie in der Kontrollgruppe. Abgebildet ist eine Bildfusion der farbcodierten Fluoreszenzaufnahme und der Weißlichtaufnahme eines exemplarischen Tieres vor (A) und nach (B) sechsstägiger Placebogabe. Es war eine diskrete Abnahme der Signalintensität (SI) von Baseline- zu Follow-up-Messung im Tumor erkennbar. Eine hohe SI konnte im Bereich der Niere und der Blase beobachtet werden und ist auf die renale Elimination des Tracers zurückzuführen.

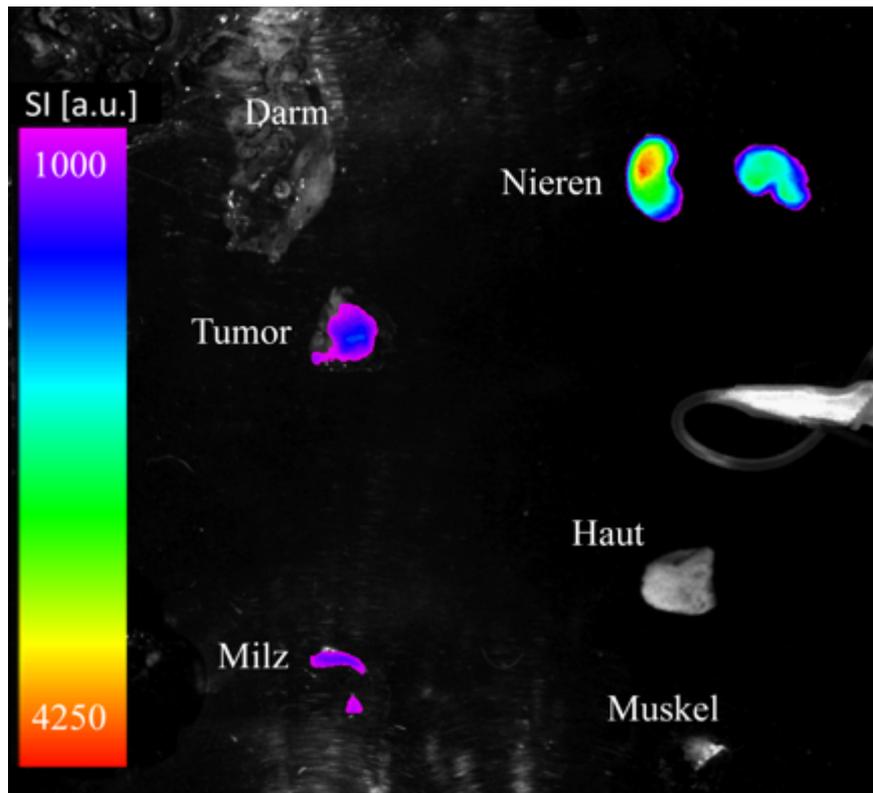


Abbildung 9. Ex vivo OI Messung der explantierten inneren Organe zur Darstellung der Biodistribution des Fluoreszenztracers. Fusionsbild der farbkodierten Fluoreszenzaufnahme und des Weißlichtbildes. Das Ergebnis dieser Messung bestätigt die Tracerverteilung der in vivo Messungen. In den Nieren und im Tumor ist analog zur in vivo Messung die Signalintensität am größten. Die entnommene Milz zeigt in ihrer physiologischen Funktion als Blood-Pool-Organ ebenso eine erhöhte Signalintensität. Dies ist mit der verlängerten Verweildauer der Erythrozyten zur Differenzierung und deren Abbau zu erklären. Geringere Signalintensitäten waren bei den Proben des Darms, der Haut und des Muskels zu beobachten ³².

3.2 Perfusions-MRT

In der Therapiegruppe wurde eine signifikante unidirektionale Reduktion der Tumorperfusion von Tag 0 im Vergleich zu Tag 7 beobachtet (Durchschnittswerte PF: Baseline $18,3 \pm 2,5$ ml/100 ml/min, Follow-up $10,2 \pm 1,6$ ml/100 ml/min, $p = 0,012$). In der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messungen ermittelt werden. Die Werte dieser Gruppe entwickelten sich heterogen und omnidirektional (Durchschnittswerte PF: Baseline $14,3 \pm 3,3$ ml/100 ml/min, Follow-up $14,2 \pm 1,4$ ml/100 ml/min, $p = 0,674$). Der Vergleich der Differenzen zwischen BL- und FU-Messungen der Therapie- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Plasmaflusses (Δ PF) zeigte signifikante Unterschiede der beiden Gruppen

(Durchschnittswerte Δ PF: Therapiegruppe $-8,2 \pm 2,3$ ml/100 ml/min, Kontrollgruppe $-0,1 \pm 3,4$ ml/100 ml/min, $p = 0,036$). Die individuellen Werte der einzelnen Tiere können Tabelle 3 entnommen werden. Verdeutlicht wird die unidirektionale Entwicklung von PF bei der Follow-up Messung an Tag 7 in den Liniendiagrammen in Abbildung 10. Das PV zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (Abbildung 11). Veranschaulicht wird die reduzierte Tumorperfusion an einem repräsentativen Tier der Therapiegruppe in Abbildung 12.

In der Perfusions-MRT gab es ebenso wie in den OI Messungen keinen signifikanten Unterschied der Baselinewerte der Therapie- und Kontrollgruppe (Durchschnittswert des PF: Therapiegruppe $18,3 \pm 2,5$ ml/100 ml/min, Kontrollgruppe $14,3 \pm 3,3$ ml/100 ml/min, $p = 0,172$).

Therapie	^aPF	^bPF	^aPV	^bPV	Kontrolle	^aPF	^bPF	^aPV	^bPV
1	34,7	14,5	10,1	8,7	1	34,8	15,1	8,0	15,8
2	13,2	2,5	5,4	4,6	2	7,0	13,6	17,4	7,9
3	12,9	9,8	19,9	10,6	3	17,9	9,0	7,6	4,7
4	18,0	15,0	7,3	3,2	4	9,6	16,4	8,2	20,4
5	14,8	8,7	19,6	7,8	5	7,9	10,7	9,5	14,0
6	14,4	9,8	22,6	11,7	6	8,3	10,5	9,0	8,7
7	21,6	6,4	6,9	9,7	7	10,6	18,5	23,8	35,6
8	17,0	14,6	14,0	13,9	8	18,5	19,9	10,7	8,8
Mittelwert	18,3*	10,2*	13,2	8,8	Mittelwert	14,3	14,2*	11,8	14,5
Standardfehler	2,6	1,6	2,4	1,3	Standardfehler	3,3	1,4	2,1	3,5

Tabelle 3. Individuelle Werte der Perfusions-MRT Messungen. ^aPF: Plasmafluss vor Therapie, ^bPF: Plasmafluss nach Therapie, ^aPV: Plasmavolumen vor Therapie, ^bPV: Plasmavolumen nach Therapie. Mit * ist der signifikante Unterschied im Plasmafluss zwischen Therapie- und Kontrollgruppe nach sechstägiger Regorafenibtherapie bzw. nach Placeboapplikation markiert. Darüber hinaus zeigt sich nach Therapie eine signifikante Reduktion des Plasmaflusses.

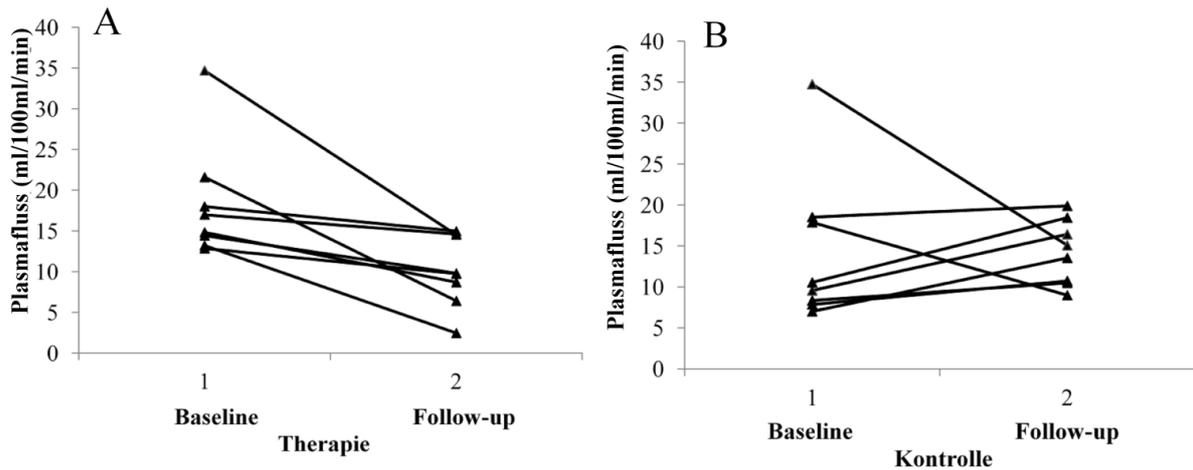


Abbildung 10. Liniendiagramme zum PF. Entwicklung der individuellen Werte des PF vor und nach Regorafenibtherapie (A) bzw. Placeboapplikation (B). Die Liniendiagramme stellen die unidirektionale Abnahme des PF von Baseline- zu Follow-up-Messungen in der Therapiegruppe (A) dar. In der Kontrollgruppe (B) hingegen verändert sich der PF omnidirektional.

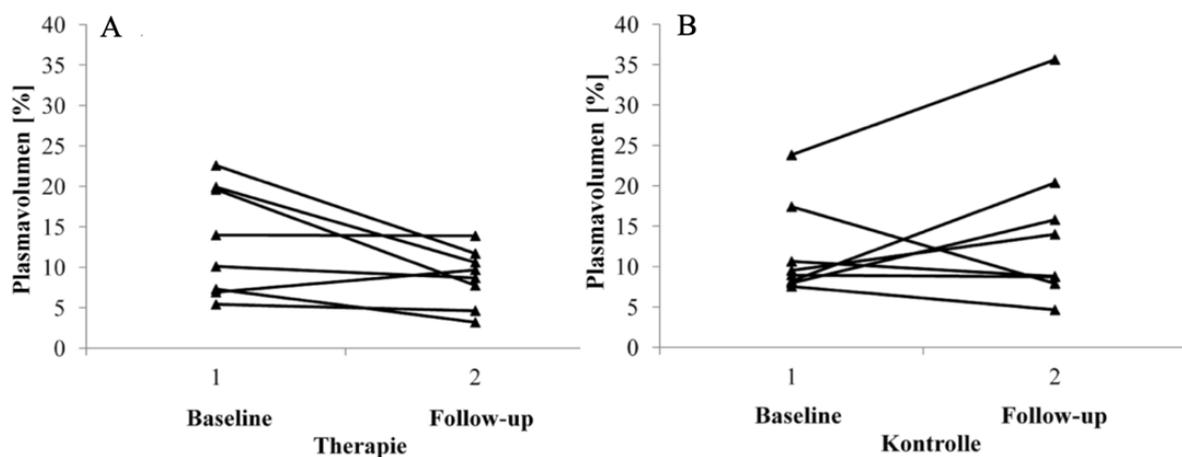


Abbildung 11. Liniendiagramme zum PV. Entwicklung der individuellen Werte von PV vor und nach Regorafenibtherapie (A) bzw. Placeboapplikation (B). Die Liniendiagramme stellen die unidirektionale Abnahme von PV von Baseline- zu Follow-up-Messungen in der Therapiegruppe (A) dar. Die einzige Ausnahme dieser Tendenz ist Tiernummer 15, bei welchem eine Zunahme des PV zu erkennen ist. In der Kontrollgruppe (B) hingegen verändert sich die PV omnidirektional.

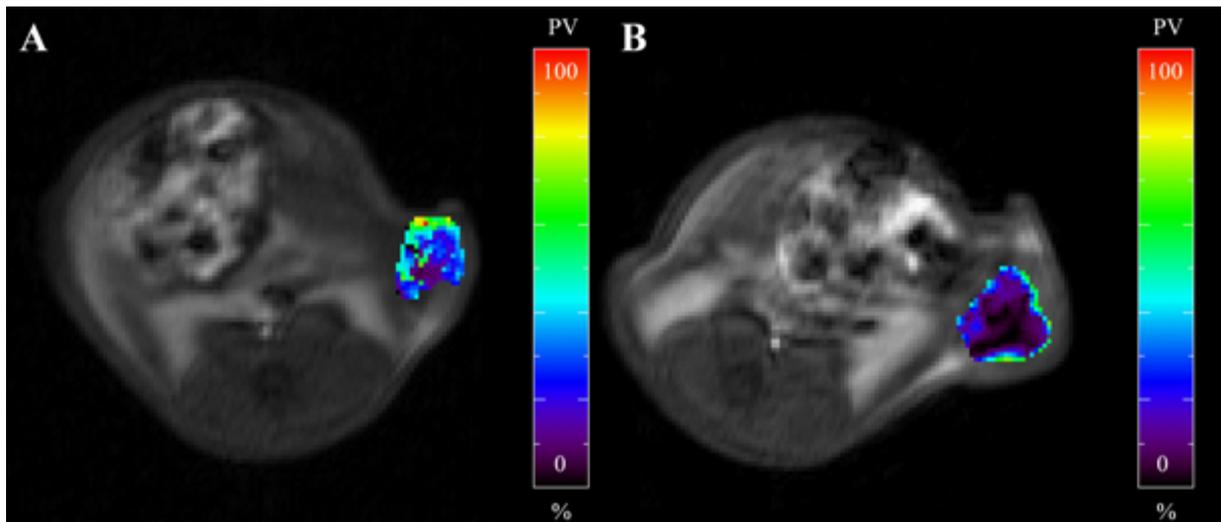


Abbildung 12. Rückgang des Plasmavolumens nach sieben-tägiger Regorafenibtherapie im Vergleich von Baseline- (A) zur Follow-up-Messung (B). An der linken Flanke des Therapie-tieres befindet sich der subkutan implantierte Kolonkarzinomxenograft. Nach Therapie ist eine deutliche Reduktion der Tumorkonzentration zu erkennen.

3.3 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie zeigte sich die Apoptose in der Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Anzahl der TUNEL-positiven Zellen: Therapiegruppe 11392 ± 1486 , Kontrollgruppe 2921 ± 334 , $p = 0,001$). Die Tumorkonzentration war in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Durchschnittswerte für CD31 positive Zellen: Therapiegruppe 107 ± 10 , Kontrollgruppe 182 ± 22 , $p = 0,006$). Gleichermäßen konnte eine signifikant niedrigere Tumorzellproliferation in der Therapiegruppe nachgewiesen werden (Anzahl der Ki-67-positiven Zellen: Therapiegruppe 1754 ± 184 , Kontrollgruppe 2883 ± 323 , $p = 0,012$) (Tabelle 4, Abbildung 13 und Abbildung 14).

Therapie	TUNEL	CD31	Ki67	Kontrolle	TUNEL	CD31	Ki-67
1	6239	144	1299	1	2020	203	2699
2	7614	79	1336	2	2902	162	2488
3	8010	101	1639	3	2551	282	3821
4	10791	160	2245	4	2269	124	1975
5	18505	98	2536	5	2206	174	3204
6	11983	85	1458	6	4923	134	1566
7	15762	100	2293	7	3514	114	4331
8	12301	93	1233	8	2982	261	2982
Mittelwert	11392*	107*	1754*	Mittelwert	2921*	182*	25*
Fehler	1486	22	184	Fehler	334	22	4

Tabelle 4. Individuelle Werte der Immunhistochemie. Mit * ist die signifikanten Unterschiede in der Zellapoptose, der Mikrogefäßdichte und Tumorzellproliferation zwischen Therapie- und Kontrollgruppe nach sechstägiger Regorafenibtherapie bzw. nach Placeboapplikation markiert

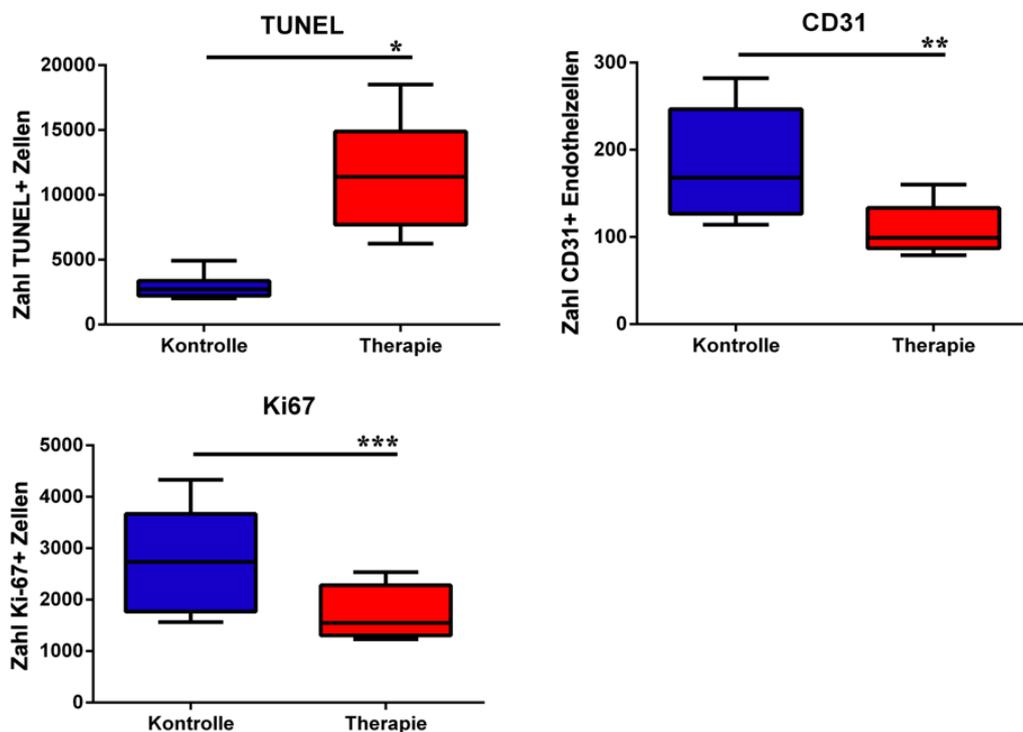


Abbildung 13. Box-Plot Diagramme der immunhistochemischen Parameter im Vergleich. Es konnten eine signifikant höhere Apoptose (TUNEL)- und Nekroserate (HE) als auch die niedrigere Gefäßdichte (CD31) und Zellproliferation (Ki-67) nachgewiesen werden. (*) p = 0,001; (**) p = 0,006; (***) p = 0,012;

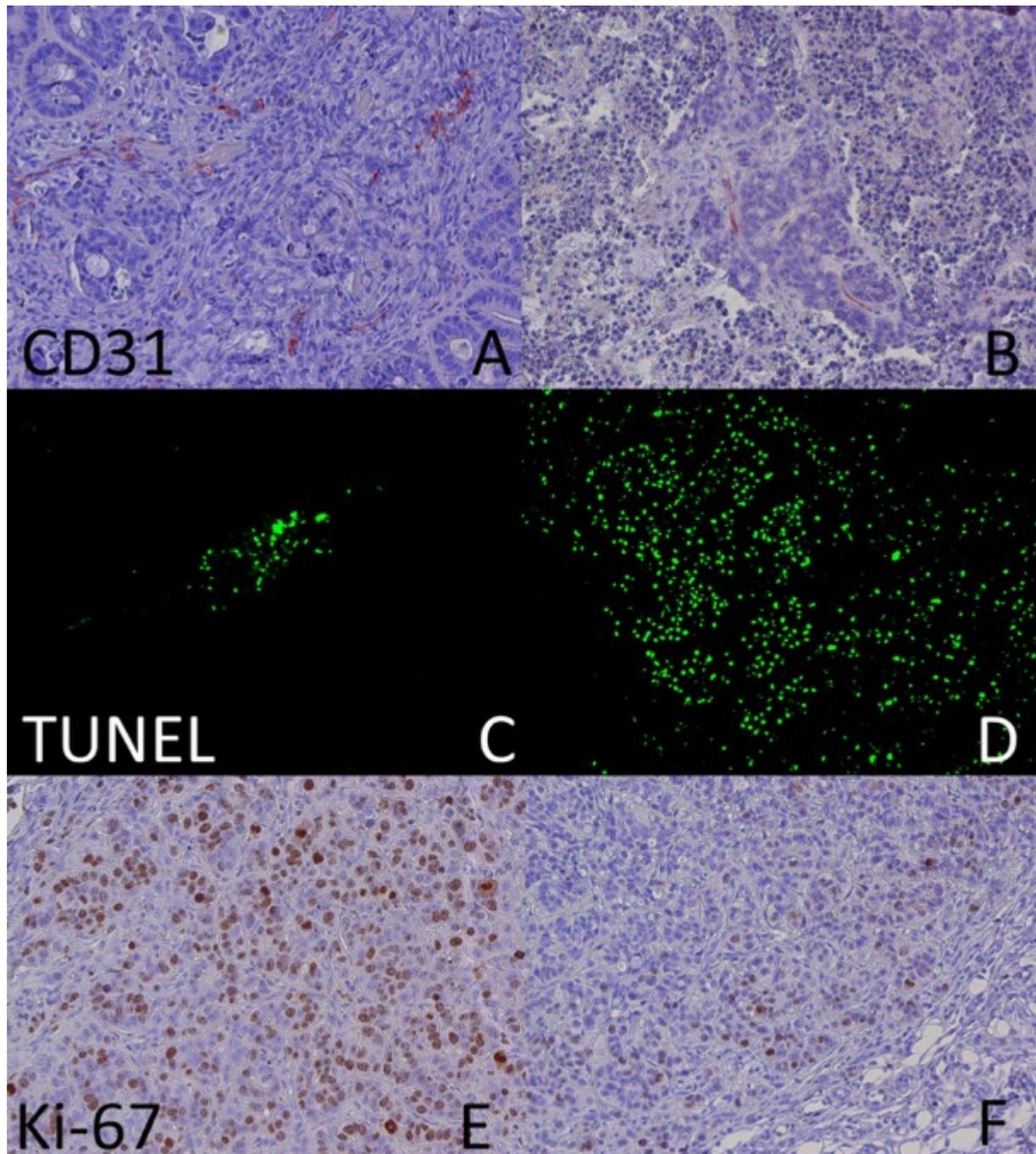


Abbildung 14. Repräsentative Schnitte der immunhistochemischen Färbungen. A und B: Mikrogefäßdichte (CD31), C und D: Tumorzellapoptose (TUNEL), E und F: Tumorzellproliferation (Ki-67). Die Kontrollgruppe befindet sich jeweils auf der linken Seite (A, C, E) und die Therapiegruppe auf der rechten Seite (B, D, F). Es konnte eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Zellen ($D > C$) in der Therapiegruppe nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine signifikant höhere Anzahl CD31 positiver Zellen ($A > B$) und eine erhöhte Tumorzellproliferation ($E > F$) in der Kontrollgruppe nachgewiesen³².

3.4 Korrelation zwischen Bildparametern und Immunhistochemie

Es konnte eine moderate inverse Korrelation zwischen Δ SNR des OI und der Tumorzellproliferation (Ki-67) ermittelt werden (Spearman's $\rho = -0,538$, $p = 0,031$). Δ SNR zeigte eine moderate, aber nicht signifikante Korrelation zur Tumorzellapoptose (TUNEL) (Spearman's $\rho = 0,385$; $p=0,141$). Die moderate inverse Korrelation zwischen Δ SNR und Δ PF zeigte einen Trend zur Signifikanz (Spearman's $\rho = -0,474$; $p = 0,64$).

4 Diskussion

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde das OI zum Monitoring frühapoptotischer Effekte einer Regorafenibtherapie *in vivo* evaluiert und mit der Perfusions-MRT und multiparametrischen Immunhistochemie korreliert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert, in den Kontext des gegenwärtigen Forschungsstandes gesetzt und auf methodisch limitierende Aspekte eingegangen ^{20,32}.

4.1 Evaluation der erhobenen Datensätze des Optical Imaging

Wie durch den TUNEL Assay bestätigt, generiert das OI valide Korrelate in Form fluoreszierender Tumoranteile und ermöglicht die Darstellung der frühapoptotischen Wirkung einer Regorafenibtherapie. Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse werden durch weitere OI Untersuchungen untermauert, die Annexin zur Darstellung von zytotoxischen und gegen EGFR gerichteten Therapieansätzen *in vivo* untersuchten ^{29,54}. In Analogie zu den Ergebnissen der von Quin et al. und Lehner et al. durchgeführten präklinischen Studien im Lungenkarzinom- bzw. Myokardinfarktmodell gelang es in dieser Arbeit apoptotische Prozesse durch die Applikation von Annexin A5 *in vivo* zu visualisieren ^{55,56}.

Im Gegensatz dazu steht die von Lederle et al. durchgeführte präklinische Versuchsanordnung, die die Wirksamkeit des MTKI Sunitinib in einem Epidermoidkarzinomxenograftmodell in Mäusen untersuchte. In der aus einem *in vivo* und einem *ex vivo* Teil bestehenden Untersuchung wurde nach viertägiger Sunitinibapplikation die Apoptose innerhalb der Tumoren durch Annexin-spezifische Fluoreszenzbildgebung und γ -Zählung evaluiert. Beide angewendeten Bildgebungsmodalitäten, das OI mit Annexin als Tracer und die auf mit ^{99m}Tc-6-Hydrazin-Nikotin radioaktiv markiertem Annexin basierte γ -Zählung, konnten die zu erwar-

tenden, frühtherapeutischen, proapoptotischen Effekte von Sunitinib bildgebend nicht bestätigen³¹. Es wurde daher geschlussfolgert, dass Annexin in einem Studiendesign, dessen Therapieregime eine starke Reduktion der Durchblutung des Tumors aufgrund der antiangiogenetischen Effekte des verwendeten MTKI bewirkt, nicht geeignet ist den Therapieeffekt zu monitoren³¹. Ein möglicher Erklärungsansatz, den die Autoren dafür anführten ist die reduzierte Penetration des Tracers in zentral nekrotische Tumorareale³¹. Analog zur hier vorliegenden Arbeit, wurden in der Studie von Lederle et al. die therapeutischen Effekte des eingesetzten MTKI durch eine CD31- und TUNEL-Färbung nachgewiesen. Die disruptive Wirkung von Sunitinib auf das im Rahmen der Tumorangiogenese entstandene Gefäßnetzwerk und die damit in Verbindung stehende Tracerdistribution wurden als führende Gründe für die fehlende, posttherapeutische Akkumulation angeführt.

Wie durch das OI gezeigt, kam es hingegen in dem Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit bei einer medikamentös induzierten und durch die Perfusions-MRT verifizierten Suppression der Mikroperfusion des Tumors zu einem Anstieg der SNR bei der Follow-up Messung. Neben den voneinander abweichenden Untersuchungszeiträumen könnte sowohl die unterschiedliche therapeutische Potenz des jeweils täglich verabreichten MTKI als auch die gewählte Tumor-Therapeutikum-Kombination eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse sein. Das würde die erhöhte lokale Bioverfügbarkeit des Annexins und die erhöhte Signalintensität bei der Follow-up Messung erklären. Hinzukommend können sich das Ansprechen antiangiogenetischer Tumorthérapien innerhalb verschiedener Tumormodelle stark voneinander unterscheiden. Dabei besitzt Sunitinib ein breites Wirkprofil. Es hemmt sowohl die VEGF- als auch die PDGF-Expression. Trotz der Überschneidungen im Wirkprofil der MTKI Regorafenib und Sunitinib scheint Sunitinib möglicherweise in dem untersuchten Epidermoidkarzinommodell eine höhere Affinität zu zentralen, neoplastischen Gefäßformationen zu haben als Regorafenib zu dem in dieser Studie verwendeten Kolonkarzinommodell und

dadurch eine vergleichsweise erhöhte antiangiogenetische Wirksamkeit aufweisen ^{16,19,31,57}. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die stärkere Inhibition der Angiogenese ^{58,59}.

In weiteren präklinischen Studien wurden sowohl der Einsatz von optischer Fluoreszenzbildgebung mit tumorantigenspezifischen Tracern als Diagnostikum in der Detektion von Karzinomen im Kopf- und Halsbereich, zur Bestimmung der Tumorlast bei der Peritonealkarzinose oder als intraoperatives Hilfsmittel zu deren Resektion beschrieben ^{30,60}. Unter Verwendung der optischen Fluoreszenzbildgebung zur Beurteilung der Tumorgrenzen in Echtzeit ließen sich dabei die diagnostische Genauigkeit verbessern, Eingriffszeiten verkürzen und die Wahrscheinlichkeit einer R0 Resektion zu erhöhen. Klinische Anwendung fand die Fluoreszenzbildgebung bereits in der Viszeralchirurgie bei der intraoperativen Visualisierung von kolorektalen Lebermetastasen. Dabei konnten selbst kleinere Tumormanifestationen präzise dargestellt werden ⁶¹. Dabei ist die intraoperative Fluoreszenzbildgebung als komplementäre Modalität zum CT oder Ultraschall insbesondere dazu geeignet oberflächliche Raumforderungen geringer Eindringtiefe darzustellen. Van der Vorst et al. zeigten darüber hinaus, dass es durch die intraoperative Bildgebung allein gelingt Lebermetastasen mit einer oberflächlichen Lage (<6,2 mm Tiefe) darzustellen. Die begrenzte Eindringtiefe der Fluoreszenzbildgebung ist im Kontext der intraoperativen Bildgebung als größter limitierender Faktor anzusehen und die Darstellung tieferliegender Tumormanifestationen durch eine adäquate Schnittbildgebung mit CT und MRT von hoher diagnostischer Aussagekraft ⁶¹⁻⁶³.

Als Ausblick bleibt somit die klinische Implementierung von tumorantigenspezifischen Fluorophoren zur selektiven Bindung und Visualisierung von kleinen Tumoren in Form von fachgebietsübergreifenden prospektiven Studien zu nennen. In Zukunft gilt es im Sinne der personalisierten Medizin zum einen geeignete Tracersubstanzen für die jeweilige Neoplasie zu etablieren, zum anderen jedoch auch standardisierte Signalintensitäten zu definieren, die

eine Resektion bzw. weitere Nachsorgeuntersuchungen empfehlen. So gelang es Mery et al. in einer kürzlich veröffentlichten, präklinischen Studie durch intraoperative OI mit einem $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Tracer Brust- bzw. Ovarialakarzinometastasen zu visualisieren und reseziieren⁶⁴. Die vermutete hohe Spezifität des OI wurde von Liberale et al. durch intraoperative Injektion von Indocyaningrün und Visualisierung tumorsuspekter Läsionen in einer klinischen Studie bestätigt. Gleichzeitig warf diese Studie jedoch auch Fragen hinsichtlich der als tumorsuspekt klassifizierten Grenzsinalwerte auf, da bei 10 der 53 Resektate durch die Histopathologie Benignität des resezierten Gewebes nachgewiesen wurde⁶⁵. Die heterogene Studienlage erlaubt bis jetzt noch keine Definition standardisierter, pathologischer Signalintensitäten, die es erlauben allgemeingültige Empfehlungen zur Resektion auszusprechen. Bei je nach Tumorentität und neoadjuvant applizierter, die Angiogenese modulierender Medikation, sind abhängig von der lokalen Vaskularisierung und damit von der damit verbundenen Bioverfügbarkeit Unterschiede in Tracerkinetik und -konzentrationen zu erwarten, die eine Standardisierung trotz der bisherigen positiven Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen weiter erschweren^{64,66}. Darüber hinaus bleibt das OI a priori eine auf oberflächliche Strukturen limitierte Modalität, so dass ein infiltratives Tumorwachstum in tiefere Gewebsschichten nicht suffizient abgebildet werden kann⁶⁷. Der klinische Nutzen des OI ist hinsichtlich des diagnostischen und therapeutischen Algorithmus beim Mammakarzinom jedoch begrenzt, da tumorsuspekte Befunde stets Ultraschall-gesteuert biopsiert werden und die in vivo Charakterisierung daher von untergeordneter Bedeutung ist.

Die Frage nach einem prospektiven klinischen Einsatz des fluoreszenzmarkierten Annexins ist aufgrund der beschriebenen Eigenschaften differenziert zu betrachten. Zum einen ist Annexin ein Tracer der eine langsame Eliminationskinetik besitzt, jedoch nicht immunogen ist und bereits als PET-Tracer klinisch eingesetzt wurde^{38,68}. Zum anderen gilt es die limitierte

Eindringtiefe der optischen Fluoreszenzbildgebung und das unspezifische Bindungsverhalten des Annexin an Phosphatidylserin zu beachten, das sowohl während der Apoptose als auch während der Nekrose entsteht ⁶⁹. Der Einsatz des OI unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten Annexins ist somit bei oberflächennahen Raumforderungen denkbar, die keine ausgeprägten Nekrosezonen aufweisen. Letztlich ist das Translationspotential des fluoreszenzmarkierten Annexins im OI aufgrund der tumorspezifischen und Therapeutika-assoziierten Variabilität der generierten Parameter derzeit noch begrenzt.

4.2 Evaluation der Perfusions-MRT Messungen

Die Perfusions-MRT ist eine klinisch bereits in der neuroonkologischen Verlaufsbildgebung etablierte Modalität. So können Perfusionsmessungen in der Neuroradiologie bei Verlaufskontrollen von Gliomen unter Radiochemotherapie zusätzliche Parameter (wie das zerebrale Blutvolumen oder den zerebralen Blutfluss) generieren, die es ermöglichen das Therapieansprechen zu evaluieren ^{27,28}. Vor einigen Jahren erschienen die ersten klinischen prospektiven Studien zur Evaluation der Perfusions-MRT als Modalität zur Beurteilung des Therapieansprechens bei Patienten, die an einem Kolon-, Rektum- oder Nasopharynxkarzinom erkrankt waren ⁷⁰⁻⁷². Diese zeigten, dass durch die Perfusions-MRT sowohl prädiktive Parameter zur Einschätzung der prospektiven Effektivität einer Chemo- bzw. Radiochemotherapie generiert als auch das letztendliche Therapieansprechen noch vor morphologischen Veränderungen des Tumors funktionell dargestellt werden können ⁷⁰⁻⁷². Einschränkungen in der Vergleichbarkeit der Studien untereinander bestehen durch die unterschiedlichen Messprotokolle, Parameter und der zur Auswertung verwendeten pharmakokinetischen Modelle. Die Interpretation der ermittelten Messwerte und deren zeitlicher Verlauf sollte in Kenntnis des klinischen und molekularbiologischen Kontexts vorgenommen werden. Die Abnahme der Tumorperfusion kann für eine Unterbrechung der erhöhten Neoangiogenese bei einem Tumor sprechen ^{73,74}. Ein

Anstieg der Perfusionsparameter kann bei bestimmten Tumorentitäten pathophysiologisch isoliert betrachtet jedoch ebenso ein Korrelat für eine Normalisierung der Gefäßarchitektur von fragilen neoplastischen hin zu physiologischen, stabileren Gefäßen sein ⁷⁵. Beide Entwicklungen deuten auf ein Therapieansprechen hin. Zu diskutieren gilt bei den genannten Beobachtungen die jeweils abgeleitete Kausalität. Dazu werden weitere klinische interdisziplinäre Studien benötigt.

Neben der untersuchten Tumorentität und der damit verbundenen Aggressivität im Wachstum nimmt die Heterogenität in der Tumororganisation (Verhältnis der apoptotischen zentralen Anteile zu den äußeren Bereichen der Neoangiogenese) Einfluss auf die Einordnung der Messwerte in den Gesamtkontext der Tumorpathophysiologie ^{70,76}. Neben der bereits erwähnten posttherapeutischen Perfusionsreduktion bzw. dem relativen Perfusionsabfall zeigten Intven et al. einen prädiktiven Zusammenhang zwischen erhöhten prätherapeutischen Perfusionswerten und dem Ansprechen einer 5-FU und Capeticabin Therapie beim Rektumkarzinom auf. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür kann in der im Zuge der erhöhten Perfusion gesteigerten medikamentösen Bioverfügbarkeit liegen ⁷⁶. Die Abnahme der ermittelten Perfusionsparameter (Δ PF) von Baseline- zu Follow-up Messung in dieser Studie bestätigten die Ergebnisse von Thomas et al. und Koh et al., die die Wirksamkeit der Regorafenibtherapie im Sinne einer Inhibition der Neoangiogenese und eines Untergangs proliferativer Gefäßformationen im Tumor belegten ^{72,73}. Die in diesen Studien beschriebene Therapie-assoziierte Reduktion der Perfusionsparameter in der MRT konnte von Eschbach et al. und Kazmierczak et al. in weiteren präklinischen Studien analog zu der hier vorliegenden Arbeit reproduziert werden ^{32,33,77}.

4.3 Diskussion der Immunhistochemie

Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten sowohl eine signifikante Reduktion der mikrovaskulären Gefäßdichte (CD31) und der Tumorzellproliferation (Ki-67) als auch einen signifikanten Anstieg der apoptischen Zellen (TUNEL). Die starke proapoptotische Wirkung (TUNEL) von Regorafenib wurde immunhistochemisch validiert und bestätigt die von Cyran et al. und Abou-Elkacem et al. beobachteten Effekte^{20,78}. Die ermittelten Werte der Immunhistochemie zeigten die antiangiogenetische Wirkung von Regorafenib auf die äußeren Bereiche des Tumors, die in der Regel weniger Nekroseareale aufwiesen. Dabei kam es zu einer signifikanten Reduktion von CD31 und Ki-67. Neben der Reduktion von CD31, Ki-67 und dem signifikanten Anstieg von TUNEL bestätigte auch die signifikante, inverse Korrelation von Δ SNR im OI und Ki-67 in der Therapiegruppe die Validität des OI beim Therapiemonitoring. Die erhobenen immunhistochemischen Parameter stützen die Hypothese, dass das Annexin-basierte OI auch im frühen Intervall verlässliche Surrogatparameter generiert, die zur Evaluation der Wirksamkeit einer Regorafenibtherapie komplementär zur Schnittbildgebung durch die MRT herangezogen werden können.

Zur weiterführenden immunhistochemischen Charakterisierung der Randbereiche des Tumors hinsichtlich der Beurteilung der Neoangiogenese wäre die Detektion der VEGFR-Expression additiv zu CD31 denkbar. Dies würde einen Vergleich der neu gebildeten, VEGFR-positiven Gefäße zu der mikrovaskulären Gefäßdichte ermöglichen und die Aussagekraft zur antiangiogenetischen Wirkung der Medikation hinsichtlich gefäßnormalisierender bzw. gefäßrupturierender Tendenzen erhöhen⁷⁷. Hierbei gilt es jedoch bei der konsekutiven Dateninterpretation die unspezifische VEGFR-Expression zu bedenken. Eine Verlaufsbeurteilung der VEGFR-Expression im Laufe der Therapie würde hier additive Parameter hinsichtlich der Dynamik der Neoangiogenese generieren.

4.4 Limitationen der durchgeführten Studie und der verwendeten Modalitäten

4.4.1 Limitationen des Versuchsaufbaus und der Methodik

Bei der Interpretation der erhobenen Daten sollten verschiedene methodisch limitierende Aspekte beachtet werden, die im Folgenden erläutert werden. Zum einen kann die menschliche Pathophysiologie durch ein Tumoxenograftmodell nur eingeschränkt modelliert werden. Ein orthotopes Tumormodell wie bei Abou-Elkacem et al. würde es erlauben, den Einfluss der Metastasierung auf das Therapieergebnis in einen klinisch realitätsnäheren Kontext zu untersuchen ⁷⁸. Zum anderen würde eine breitere immunhistochemische Analyse, die die verwendeten Methoden um molekularbiologische Techniken, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den Western Blot als auch um weitere Parameter wie β -Catenin, E-cadherin und Ras ergänzt, das Tumormikromilieu und die Tumorentwicklung noch detaillierter abbilden.

Dies würde einen Schritt hin zur Verbesserung der molekularbiologischen Evaluation der Tumordynamik im Verlauf der antiangiogenetischen Therapie darstellen. Die Beschreibung der Entwicklung und der Veränderung in der Verteilung der Imaging Biomarker von der Baseline- zur Follow-up Messung ist durch zwei definierten Untersuchungszeitpunkte nur begrenzt möglich. Die immunhistochemische Aufarbeitung der Tumoren nach Einschläferung der Tiere am Ende der Follow-up Messung lässt keinen Vergleich zur zeitlichen Veränderung der molekularbiologischen Parameter zu.

4.4.2 Limitationen des Optical Imaging

Die größte Limitation des OI ist seine niedrige Eindringtiefe von wenigen Zentimetern, die auf die Absorption, Streuung und Reflexion des einfallenden Lichts durch die umliegenden, tieferen Gewebeschichten zurückzuführen ist ^{79,80}. Damit ist das Spektrum der klinischen Anwendbarkeit auf oberflächlich liegende Strukturen beschränkt. In Kenntnis dieser Ein-

schränkung wurden bereits mehrere Annäherungen zur Lösung des Problems unternommen. Unter Zuhilfenahme von Kathetern, Zystoskopie, Endoskopie und Laparoskopie wurde bereits versucht das OI so nah wie möglich an die zu untersuchende Region bringen⁷⁹⁻⁸⁴. Intraoperativ wurde das OI wie bereits beschrieben erfolgreich zur Dignitätsbeurteilung von im Operationsgebiet liegenden Strukturen verwendet⁸⁴⁻⁸⁷. So zeigten Sheth et al., dass es unter Verwendung des OI möglich ist, hepatische Metastasen einer humanen Kolonkarzinomzelllinie in einem Mausmodell nach Injektion von Indocyaningrün zu lokalisieren und transkutan zu punktieren⁸⁴. Im selben Jahr gelang Kondo et al. die klinische Implementation des OI in die Viszeralchirurgie als innovative Methodik zur spezifischen Visualisierung peritonealer Metastasen nach Aminolävulinapplikation⁸⁸.

Um das Translationspotential des in dieser Studie verwendeten heterotopen Tumormodells zu erhöhen, wäre die Etablierung eines Metastasenmodells sinnvoll, wie es bereits von Abou-Elkacem verwendet wurde. Ein pathophysiologisch realitätsnäheres, orthotopes Tumormodell mit Metastasierungstendenzen könnte ein mögliches experimentelles Anwendungsgebiet des OI darstellen⁸⁹. Hierbei muss jedoch, je nach anatomischer Metastasenlokalisation, mit vermehrtem Auftreten von Artefakten durch Atembewegung in der MRT und Überlagerung der umgebenden knöchernen Strukturen beim OI zu rechnen sein. Dabei erschweren sowohl die der Methodik inhärente, limitierte Eindringtiefe als auch mögliche Überlagerung durch Luftkolektionen in Darmschlingen die Qualität der Bildgebung durch das OI.

4.4.3 Limitationen des verwendeten Tracers

Annexin A5 ist in der Bindung an Phosphatidylserin spezifisch. Dieses Protein wird jedoch nicht nur im Rahmen der Zellapoptose kernhaltiger Zellen extrazellulär exponiert, sondern auch im Rahmen der Eryptose exprimiert. Als Eryptose wird der programmierte Zelltod von Erythrozyten bezeichnet. Darüber hinaus ist Phosphatidylserin an der zellulären Kommunika-

tion als Signalmolekül wie z.B. bei inflammatorischen Prozessen, der Blutgerinnung und der intrazellulären Pathogenaufnahme beteiligt^{19,90-92}.

Hinzukommend können Mikrotraumata, die durch die Nahrungspassage, mechanische Überbelastung oder Entzündungen verursacht werden, mögliche Ursachen einer diffusen Anreicherung von Annexin A5 im Gastrointestinaltrakt, in der Haut und im Muskelgewebe der Versuchstiere sein. Die erhöhte Tracerbindung in der Milz in der ex vivo Messung lässt sich zum einen mit der Funktion der Milz als blood-pool Organ, zum anderen mit der lokal konzentrierten Eryptose erklären⁹³. Weiterhin müssen bei Annexin A5 eine protrahierte Tracerretention in den ableitenden Harnwegen und erhöhte Werte für das Hintergrundsignal bei der Datenanalyse berücksichtigt werden^{94,95}. Zusammenfassend als nachteilig in der Verwendung von Annexin A5 mit dem Ziel der selektiven Visualisierung der Traceranreicherung ist seine unspezifische Bindung an Abdominalorgane.

Neben der Limitation hinsichtlich der Bestimmung der pathophysiologischen Ursache als Anfangspunkt einer Phosphatidylserinexposition in den Extrazellularraum, kann durch die Annexinanreicherung ebenso wenig die Art des Zelltods als Endpunkt ermittelt werden. Es kann nicht zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod differenziert werden. In den initialen Prozessen der Apoptose kommt es neben der Zellkern- und DNA-Fragmentierung zur Externalisierung von zellmembrangebundenem Phosphatidylserin^{96,97}. Bei Initiierung der entsprechenden, pathophysiologischen Signalkaskade kann es im weiteren Verlauf im Rahmen einer sekundären Nekrose zur fortgeschrittenen Karyorrhexis bzw. Karyolyse, Verlust der Integrität der Zellmembran und konsekutiven Autolyse kommen^{69,98}. In beschriebener Konstellation strömt das Phosphatidylserin ins Interstitium. Das spezifische Bindungsverhalten des Annexin A5 erlaubt keine weitere Klassifizierung des zugrundeliegenden Prozesses.

Einige immunhistochemische Techniken wurden zur weiterführenden Untersuchung dieses Sachverhalts ex vivo vorgeschlagen, wie z.B. der Einsatz von Propidiumiodid (PI) und Necrostatin. Die von Krysko und Sawai durchgeführten Studien konnten nach Färbung mit den genannten Substanzen eine schematische Aufteilung in Nekrose und Apoptose vornehmen^{99,100}. Inwieweit diese Substanzen in vivo verwendet werden können, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4.4.4 Limitationen der Perfusions-MRT

Den potentiellen Anwendungsfeldern und modalitätenbezogenen Stärken stehen gewisse Limitationen der Perfusions-MRT sowohl in der experimentellen als auch in der klinischen Anwendung gegenüber. Die Perfusions-MRT stellt eine etablierte Methodik zur Visualisierung von Veränderungen des Blutflusses im klinischen Setting und im experimentellen Tumormodell dar¹⁰¹. Dabei soll die frühtherapeutische Wirkung von antiangiogenetischen Medikamenten nicht invasiv und in vivo quantifiziert werden. Analog zum OI hat die Perfusions-MRT ebenso gewisse Limitationen, die bedacht werden sollten.

Die erste modalitätsbezogene Ungenauigkeit bei der Datenakquise liegt in der Notwendigkeit der Kontrastmittelapplikation nach Untersuchungsbeginn. Die spezifischen Sequenzen des Perfusions-MRT erfordern die Applikation eines Gadolinium-basierten Kontrastmittels, welches über die Verkürzung der T1-Relaxationszeit lokaler Wassermoleküle zu einer Signalverstärkung führt. Bei vergleichsweise kleinen Injektionsvolumina im Kleintiermodell können intra- und interindividuelle Messabweichungen durch schwankende lokale und systemische Kontrastmittelkonzentrationen entstehen¹⁰². Zudem schränken sowohl die Unterschiede hinsichtlich des genauen Akquisitions- und Auswerteprotokolls als auch differierende Messwerte bei Verwendung verschiedener Scanner die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der Perfusions-MRT ein.

Optional und komplementär zu der diskutierten Methodik ist das kontrastmittelfreie Bildgebungsverfahren der diffusionsgewichteten MRT alternativ zu diskutieren ¹⁰³. Die Grundlage des Verfahrens der diffusionsgewichteten MRT bildet die Brownsche Molekularbewegung. Beim Eintreten pathophysiologische Vorgänge, die zu einer lokal ischämischen Zuständen führen, kommt es zu einer Reduktion der freien Diffusion der Wassermoleküle, welche bildgebend mit einem erhöhten Signal in der diffusionsgewichteten Sequenz einher geht. Die diffusionsgewichtete MRT stellt in diesem Sinne eine Alternative v.a. in der Visualisierung von Veränderungen der Gefäßmikroarchitektur und von therapeutischen Effekten ¹⁰⁴. So zeigten bereits Wang et al. und Zakhari et al., dass die diffusionsgewichtete MRT Nekrosen nach Radio- bzw. Radiochemotherapie von einem Tumorprogress über einen erniedrigten ADC-Wert (apparent diffusion coefficient) unterscheiden kann ^{105,106}.

Die Signalintensität ist neben den genannten modalitätsspezifischen Gegebenheiten von weiteren physiologischen Faktoren wie der Gewebs- bzw. Tumorperfusion, der Kapillaroberfläche und Kapillarpermeabilität abhängig. Hinzukommend sind durch die vom Untersucher individuell festgelegten Messgrößen, AIF und ROI, Ungenauigkeiten in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse denkbar. Durch die engen anatomischen Beziehungen der vaskulären und tumorösen Strukturen zum umliegenden Gewebe in dem beschriebenen Kleintiermodell kann es je nach Voxelselektion bei der Bestimmung der AIF oder ROI zu einer Messwertvarianz kommen ^{51,107-109}.

4.5 Schlussfolgerung

Das Annexin-basierte OI ermöglicht die frühtherapeutische und nicht invasive Beurteilung des frühen therapieinduzierten Zelltods unter Regorafenibtherapie im experimentellen Kolonkarzinommodell der Ratte. Dies wurde ex vivo durch die multiparametrische Immunhistochemie validiert. In Korrelation zur Immunhistochemie erlaubt die Perfusions-MRT zudem

das Monitoring der frühen antiangiogenetischen Therapieeffekte. Das große wissenschaftliche und klinische Potential des OI wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen in multiparametrischen Studien und interdisziplinären Fragestellungen untermauert ^{79,110-116}.

Die Kombination aus morphologischer Schnittbildgebung mit MRT oder CT und komplementären Modalitäten der molekularen Bildgebung wie OI könnte im Sinne eines multimodalen, nicht invasiven Untersuchungsprotokolls eine genauere frühzeitige Charakterisierung des Tumormikroenvironments in vivo erlauben. Vor erfolgreicher Translation des OI in die klinische Routinediagnostik sind jedoch noch weitere präklinische und klinische in vivo Studien zur Validierung der funktionellen und molekularen Imaging Biomarker in Korrelation zu klinischen Endpunkten erforderlich.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Annexin-basierte optische Fluoreszenzbildgebung und die Perfusions-MRT in einem multimodalen Bildgebungsansatz zur Beurteilung des Therapieansprechens einer Regorafenibtherapie eingesetzt und anschließend mit den Ergebnissen der Immunhistochemie korreliert. Als Tumormodell diente ein auf einer humanen Kolonkarzinomlinie (HT-29) basierendes Xenograftmodell in der Ratte. Nach zwei bis drei Wochen Tumorstadium wurden die Versuchstiere randomisiert der Therapie- bzw. Kontrollgruppe zugeteilt und die multimodale Baseline Messung durchgeführt. Nach sechstägiger Regorafenibtherapie- bzw. Placeboapplikation erfolgte am siebten Tag die Follow-up Messung mit anschließender Einschläferung der Tiere und immunhistochemischer Aufarbeitung der Tumoren.

Das Annexin-basierte Optical Imaging ermöglichte eine nicht invasive Quantifizierung therapeutischer Effekte von Regorafenib *in vivo* als Surrogatparameter der Tumorzellapoptose. Die beschriebenen proapoptotischen Therapieeffekte korrespondierten mit der signifikanten Reduktion der Tumorperfusion in der Perfusions-MRT. Mit der Immunhistochemie ließen sich die proapoptotischen (TUNEL), antiangiogenetischen (CD31) und antiproliferativen Effekte der Regorafenibtherapie nachweisen. Das Optical Imaging eignet sich damit als komplementäre Bildgebung zum Einsatz bei der Evaluation des Zelltods im Rahmen einer antiangiogenetischen Therapie im Kleintiermodell. Diese Modalität erlaubt es frühtherapeutisch Aussagen über das Tumormilieu und das Therapieansprechen zu treffen. Darüber hinaus ermöglicht das OI eine frühe Charakterisierung des Tumormikroenvironments *in vivo*.

Vor der standardisierten klinischen Implementierung des OI müssen Nachteile des Verfahrens, wie Eindringtiefe und Absorptions- und Streuungseffekte minimiert werden und die Tracerkinetik in weiteren präklinischen und klinischen Studien optimiert werden. Neuere klinische Studien zeigen heute schon die Applikationsmöglichkeiten dieser Methodik zur Verbesserung der intraoperativen Diagnostik und der Resektionsergebnisse in der Tumorchirurgie sowohl im Tiermodell als auch bei klinischen Fragestellungen.

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Differenz
Abb.	Abbildung
AIF	Arterial input function
ATCC	American Type Culture Collection
a.u.	Arbitrary units \cong arbiträre Einheiten
AUC	Area und the Curve
BL	Baseline
BRAF	B-Raf produzierendes Gen
B-Raf	Isoform des rapidly accelerated fibrosarcoma Proteins
bzw.	Beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	Circa
CCD	Charge-coupled device
Cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DCE	dynamic contrast-enhanced
ddH ₂ O	Doppel-destilliertes Wasser
DDR2	discoidin domain receptor 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EphA2	erythropoietin-producing hepatocellular receptor tyrosine kinase class A

etc.	et cetera
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calvf Serum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FITC	Fluorescein conjugated Affiniture Goat
FU	Follow-up
G	Schwerebeschleunigung
gr.	Gramm
G	Gauge
HE	Hämatoxylin-Eosin
HCL	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
L	Liter
M	Mikro
M	Milli
M	molare Masse
min.	Minuten

MTKI	Multityrosinkinase-Inhibitor
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NIR	Nahinfrarot (-spektroskopie)
O ₂	Sauerstoff
OI	Optical Imaging
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PF	Plasmaflow
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
PI	Propidiumiodid
PMI	Platform for Research in Medical Imaging
PTK5	Protein tyrosine kinase 5
PV	Plasmavolumen
Rcf	Relative centrifugal force
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RET	rearranged during transfection proto-oncogen
ROI	Region of interest
RT	Raumtemperatur
SAPK2	Stress-activated protein kinase 2
s.c.	Subkutan
SE	Standard error $\hat{=}$ Standardfehler
sec.	Sekunden
SI	Signalintensität

SNR	Signal-to-noise ratio
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Stabw	Standardabweichung
T	Tesla
TIE2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TRIS	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TWIST	Time-resolved Angiography With Stochastic Trajectories
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
W	Watt
WHO	World Health Organization

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Antikörper

Tabelle 2. Individuelle Werte der OI Messungen

Tabelle 3. Individuelle Werte der Perfusions-MRT Messungen

Tabelle 4. Individuelle Werte der Immunhistochemie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Graphische Darstellung des Versuchsablaufs.

Abbildung 2. Zeitstrahl zum Versuchsaufbau

Abbildung 3. ROI Bestimmung zur Berechnung der SNR

Abbildung 4. Schematische Darstellung des 2-compartment uptake Modells zur Beschreibung der Tracerkinetik

Abbildung 5. Berechnung der Perfusionswerte durch farbkodierte semiquantitative Matrices

Abbildung 6. Liniendiagramme zu den OI Signalintensitäten in Therapie- und Kontrollgruppe

Abbildung 7. Das OI-Fusionsbild vor und nach siebentägiger Regorafenibtherapie in der Therapiegruppe

Abbildung 8. Die Annexin-basierte OI vor und nach Placebothherapie in der Kontrollgruppe

Abbildung 9. Ex vivo OI Messung der explantierten inneren Organe zur Darstellung der Biodistribution des Fluoreszenztracers.

Abbildung 10. Liniendiagramme zum PF in der Therapie- und Kontrollgruppe

Abbildung 11. Liniendiagramme zum PV in der Therapie- und Kontrollgruppe

Abbildung 12. Rückgang des PV nach Regorafenibtherapie von Baseline- zur Follow-up Messung.

Abbildung 13. Boxplotdiagramme der Immunhistochemie im Vergleich

Abbildung 14. Repräsentative Schnitte der Immunhistochemische Färbungen repräsentativer Tumorschnitte

Literaturverzeichnis

1. Figlin R, Sternberg C, Wood CG. Novel agents and approaches for advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 2012;188:707-15.
2. Holubec L, Liska V, Matejka VM, et al. The role of cetuximab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2012;32:4007-11.
3. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. mTOR inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2012;127:662-72.
4. Diederich S. Imaging beyond RECIST: CT and MRI in molecular therapies. *Cancer Imaging* 2012;12:347-50.
5. Ratain MJ, Eckhardt SG. Phase II studies of modern drugs directed against new targets: if you are fazed, too, then resist RECIST. *J Clin Oncol* 2004;22:4442-5.
6. Organization WH. Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment. WHO Publication 1979;48:45.
7. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981;47:207-14.
8. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
9. James K, Eisenhauer E, Christian M, et al. Measuring response in solid tumors: unidimensional versus bidimensional measurement. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:523-8.
10. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47.
11. Sohaib A. RECIST rules. *Cancer Imaging* 2012;12:345-6.

12. Coche E. Evaluation of lung tumor response to therapy: Current and emerging techniques. *Diagn Interv Imaging* 2016;97:1053-65.
13. Lycan TW, Pardee TS, Petty WJ, et al. A Phase II Clinical Trial of CPI-613 in Patients with Relapsed or Refractory Small Cell Lung Carcinoma. *PLoS One* 2016;11:e0164244.
14. Xu Y, Wang Z, Liu G, et al. The efficacy and safety of simultaneous integrated boost intensity-modulated radiation therapy for esophageal squamous cell carcinoma in Chinese population: A single institution experience. *J Cancer Res Ther* 2016;12:82-8.
15. Ohhara Y, Fukuda N, Takeuchi S, et al. Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2016;8:642-55.
16. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 2011;129:245-55.
17. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000;60:2178-89.
18. Demetri GD, Reichardt P, Kang YK, et al. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381:295-302.
19. Carter NJ. Regorafenib: a review of its use in previously treated patients with progressive metastatic colorectal cancer. *Drugs Aging* 2014;31:67-78.
20. Cyran CC, Kazmierczak PM, Hirner H, et al. Regorafenib effects on human colon carcinoma xenografts monitored by dynamic contrast-enhanced computed tomography with immunohistochemical validation. *PLoS One* 2013;8:e76009.

21. Mross K, Frost A, Steinbild S, et al. A phase I dose-escalation study of regorafenib (BAY 73-4506), an inhibitor of oncogenic, angiogenic, and stromal kinases, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18:2658-67.
22. Fan LC, Teng HW, Shiau CW, et al. SHP-1 is a target of regorafenib in colorectal cancer. *Oncotarget* 2014;5:6243-51.
23. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381:303-12.
24. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 1:122S-50S.
25. Costelloe CM, Chuang HH, Madewell JE, Ueno NT. Cancer Response Criteria and Bone Metastases: RECIST 1.1, MDA and PERCIST. *J Cancer* 2010;1:80-92.
26. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014;32:3059-68.
27. Wiestler B, Kluge A, Lukas M, et al. Multiparametric MRI-based differentiation of WHO grade II/III glioma and WHO grade IV glioblastoma. *Sci Rep* 2016;6:35142.
28. Kickingreder P, Radbruch A, Burth S, et al. MR Perfusion-derived Hemodynamic Parametric Response Mapping of Bevacizumab Efficacy in Recurrent Glioblastoma. *Radiology* 2016;279:542-52.
29. Schellenberger EA, Bogdanov A, Jr., Petrovsky A, Ntziachristos V, Weissleder R, Josephson L. Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy. *Neoplasia* 2003;5:187-92.

30. Christensen A, Juhl K, Persson M, et al. uPAR-targeted optical near-infrared (NIR) fluorescence imaging and PET for image-guided surgery in head and neck cancer: proof-of-concept in orthotopic xenograft model. *Oncotarget* 2017;8:15407-19.
31. Lederle W, Arns S, Rix A, et al. Failure of annexin-based apoptosis imaging in the assessment of antiangiogenic therapy effects. *EJNMMI Res* 2011;1:26.
32. Kazmierczak PM, Burian E, Eschbach R, et al. Monitoring Cell Death in Regorafenib-Treated Experimental Colon Carcinomas Using Annexin-Based Optical Fluorescence Imaging Validated by Perfusion MRI. *PLoS One* 2015;10:e0138452.
33. Eschbach RS, Fendler WP, Kazmierczak PM, 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:e0115543.
34. Paprottka PM, Zengel P, Cyran CC, et al. Evaluation of multimodality imaging using image fusion with MRI and CEUS in an experimental animal model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015;61:143-50.
35. Cash JM, Remmers EF, Goldmuntz EA, et al. Genetic mapping of the athymic nude (RNU) locus in the rat to a region on chromosome 10. *Mamm Genome* 1993;4:37-42.
36. Valdes-Varela L, Alonso-Guervos M, Garcia-Suarez O, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Screening of Bifidobacteria and Lactobacilli Able to Antagonize the Cytotoxic Effect of *Clostridium difficile* upon Intestinal Epithelial HT29 Monolayer. *Front Microbiol* 2016;7:577.
37. Snoeks TJ, Khmelinskii A, Lelieveldt BP, Kaijzel EL, Lowik CW. Optical advances in skeletal imaging applied to bone metastases. *Bone* 2011;48:106-14.
38. Neves AA, Brindle KM. Imaging cell death. *J Nucl Med* 2014;55:1-4.

39. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
40. Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 2002;99:4030-8.
41. Messmer UK, Pfeilschifter J. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 2000;22:878-81.
42. Fadeel B, Karpova MB, Enoksson M, Orrenius S. Phosphatidylserine externalization in cardiolipin-deficient cells. *Blood* 2004;104:1582-3; author reply 3-4.
43. Lin Y, Weissleder R, Tung CH. Novel near-infrared cyanine fluorochromes: synthesis, properties, and bioconjugation. *Bioconjug Chem* 2002;13:605-10.
44. Pansare V, Hejazi S, Faenza W, Prud'homme RK. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores and Multifunctional Nano Carriers. *Chem Mater* 2012;24:812-27.
45. Alsibai W, Hahnenkamp A, Eisenblatter M, et al. Fluorescent non-peptidic RGD mimetics with high selectivity for $\alpha V\beta 3$ vs $\alpha IIb\beta 3$ integrin receptor: novel probes for in vivo optical imaging. *J Med Chem* 2014;57:9971-82.
46. Cyran CC, Paprottka PM, Schwarz B, et al. Perfusion MRI for monitoring the effect of sorafenib on experimental prostate carcinoma: a validation study. *AJR Am J Roentgenol* 2012;198:384-91.
47. De Visschere PJ, De Meerleer GO, Futterer JJ, Villeirs GM. Role of MRI in follow-up after focal therapy for prostate carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2010;194:1427-33.

48. Palmowski M, Schifferdecker I, Zwick S, et al. Tumor perfusion assessed by dynamic contrast-enhanced MRI correlates to the grading of renal cell carcinoma: initial results. *Eur J Radiol* 2010;74:e176-80.
49. O'Connor JP, Jackson A, Parker GJ, Jayson GC. DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. *Br J Cancer* 2007;96:189-95.
50. Johnson CP, Polley TW, Glockner JF, Young PM, Riederer SJ. Buildup of image quality in view-shared time-resolved 3D CE-MRA. *Magn Reson Med* 2013;70:348-57.
51. 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. *Eur J Radiol* 2012;81:3870-6.
52. Pradel C, Siauve N, Bruneteau G, et al. Reduced capillary perfusion and permeability in human tumour xenografts treated with the VEGF signalling inhibitor ZD4190: an in vivo assessment using dynamic MR imaging and macromolecular contrast media. *Magn Reson Imaging* 2003;21:845-51.
53. Cyran CC, von Einem JC, Paprottka PM, et al. Dynamic contrast-enhanced computed tomography imaging biomarkers correlated with immunohistochemistry for monitoring the effects of sorafenib on experimental prostate carcinomas. *Invest Radiol* 2012;47:49-57.
54. Manning HC, Merchant NB, Foutch AC, et al. Molecular imaging of therapeutic response to epidermal growth factor receptor blockade in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7413-22.

55. Qin H, Zhang MR, Xie L, et al. PET imaging of apoptosis in tumor-bearing mice and rabbits after paclitaxel treatment with (18)F(-)Labeled recombinant human His10-annexin V. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2015;5:27-37.
56. Lehner S, Todica A, Vanchev Y, et al. In Vivo Monitoring of Parathyroid Hormone Treatment after Myocardial Infarction in Mice with [(68)Ga]Annexin A5 and [(18)F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Mol Imaging* 2014;13:7290201400035.
57. Garcia-Alfonso P, Grande E, Polo E, et al. The role of antiangiogenic agents in the treatment of patients with advanced colorectal cancer according to K-RAS status. *Angiogenesis* 2014;17:805-21.
58. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003;9:327-37.
59. Palmowski M, Huppert J, Hauff P, et al. Vessel fractions in tumor xenografts depicted by flow- or contrast-sensitive three-dimensional high-frequency Doppler ultrasound respond differently to antiangiogenic treatment. *Cancer Res* 2008;68:7042-9.
60. Cheng H, Chi C, Shang W, et al. Precise integrin-targeting near-infrared imaging-guided surgical method increases surgical qualification of peritoneal carcinomatosis from gastric cancer in mice. *Oncotarget* 2017;8:6258-72.
61. van der Vorst JR, Schaafsma BE, Hutteman M, et al. Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer* 2013;119:3411-8.
62. Handgraaf HJM, Boogerd LSF, Hoppener DJ, et al. Long-term follow-up after near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases: A retrospective multicenter analysis. *Eur J Surg Oncol* 2017;43:1463-71.

63. Boogerd LS, Handgraaf HJ, Lam HD, et al. Laparoscopic detection and resection of occult liver tumors of multiple cancer types using real-time near-infrared fluorescence guidance. *Surg Endosc* 2017;31:952-61.
64. Mery E, Golzio M, Guillermet S, et al. Fluorescence-guided surgery for cancer patients: a proof of concept study on human xenografts in mice and spontaneous tumors in pets. *Oncotarget* 2017;8:109559-74.
65. Liberale G, Vankerckhove S, Caldon MG, et al. Fluorescence Imaging After Indocyanine Green Injection for Detection of Peritoneal Metastases in Patients Undergoing Cytoreductive Surgery for Peritoneal Carcinomatosis From Colorectal Cancer: A Pilot Study. *Ann Surg* 2016;264:1110-5.
66. Dutour A, Josserand V, Jury D, et al. Targeted imaging of alpha(v)beta(3) expressing sarcoma tumor cells in vivo in pre-operative setting using near infrared: a potential tool to reduce incomplete surgical resection. *Bone* 2014;62:71-8.
67. Kaibori M, Matsui K, Ishizaki M, et al. Intraoperative Detection of Superficial Liver Tumors by Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and 5-aminolevulinic Acid. *Anticancer Res* 2016;36:1841-9.
68. Nguyen QD, Challapalli A, Smith G, Fortt R, Aboagye EO. Imaging apoptosis with positron emission tomography: 'bench to bedside' development of the caspase-3/7 specific radiotracer [(18)F]ICMT-11. *Eur J Cancer* 2012;48:432-40.
69. Silva MT. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* 2010;584:4491-9.
70. Tong T, Sun Y, Gollub MJ, et al. Dynamic contrast-enhanced MRI: Use in predicting pathological complete response to neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *J Magn Reson Imaging* 2015;42:673-80.

71. Zheng D, Chen Y, Liu X, et al. Early response to chemoradiotherapy for nasopharyngeal carcinoma treatment: Value of dynamic contrast-enhanced 3.0 T MRI. *J Magn Reson Imaging* 2015;41:1528-40.
72. Koh TS, Thng CH, Hartono S, et al. A comparative study of dynamic contrast-enhanced MRI parameters as biomarkers for anti-angiogenic drug therapy. *NMR Biomed* 2011;24:1169-80.
73. Thomas AL, Morgan B, Horsfield MA, et al. Phase I study of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of PTK787/ZK 222584 administered twice daily in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:4162-71.
74. Wong AL, Sundar R, Wang TT, et al. Phase Ib/II randomized, open-label study of doxorubicin and cyclophosphamide with or without low-dose, short-course sunitinib in the pre-operative treatment of breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:64089-99.
75. Sorensen AG, Emblem KE, Polaskova P, et al. Increased survival of glioblastoma patients who respond to antiangiogenic therapy with elevated blood perfusion. *Cancer Res* 2012;72:402-7.
76. Intven M, Reerink O, Philippens ME. Dynamic contrast enhanced MR imaging for rectal cancer response assessment after neo-adjuvant chemoradiation. *J Magn Reson Imaging* 2015;41:1646-53.
77. Eschbach RS, Clevert DA, Hirner-Eppeneder H, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound with VEGFR2-Targeted Microbubbles for Monitoring Regorafenib Therapy Effects in Experimental Colorectal Adenocarcinomas in Rats with DCE-MRI and Immunohistochemical Validation. *PLoS One* 2017;12:e0169323.
78. Abou-Elkacem L, Arns S, Brix G, et al. Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model. *Mol Cancer Ther* 2013;12:1322-31.

79. Zhang CC, Yan Z, Giddabasappa A, et al. Comparison of dynamic contrast-enhanced MR, ultrasound and optical imaging modalities to evaluate the antiangiogenic effect of PF-03084014 and sunitinib. *Cancer Med* 2014;3:462-71.
80. Eisenblatter M, Holtke C, Persigehl T, Bremer C. Optical techniques for the molecular imaging of angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37 Suppl 1:S127-37.
81. Kobat D, Horton NG, Xu C. In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex. *J Biomed Opt* 2011;16:106014.
82. Witjes JA, Babjuk M, Gontero P, et al. Clinical and cost effectiveness of hexaminolevulinate-guided blue-light cystoscopy: evidence review and updated expert recommendations. *Eur Urol* 2014;66:863-71.
83. Metildi CA, Kaushal S, Luiken GA, Hoffman RM, Bouvet M. Advantages of fluorescence-guided laparoscopic surgery of pancreatic cancer labeled with fluorescent anti-carcinoembryonic antigen antibodies in an orthotopic mouse model. *J Am Coll Surg* 2014;219:132-41.
84. Sheth RA, Heidari P, Esfahani SA, Wood BJ, Mahmood U. Interventional optical molecular imaging guidance during percutaneous biopsy. *Radiology* 2014;271:770-7.
85. Behbahaninia M, Martirosyan NL, Georges J, et al. Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: a review. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115:517-28.
86. Orosco RK, Tsien RY, Nguyen QT. Fluorescence imaging in surgery. *IEEE Rev Biomed Eng* 2013;6:178-87.
87. Koch M, Glatz J, Ermolayev V, et al. Video-rate optical flow corrected intraoperative functional fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 2014;19:046012.

88. Kondo Y, Murayama Y, Konishi H, et al. Fluorescent detection of peritoneal metastasis in human colorectal cancer using 5-aminolevulinic acid. *Int J Oncol* 2014;45:41-6.
89. Kim SY, Myung SJ. Optical molecular imaging for diagnosing intestinal diseases. *Clin Endosc* 2013;46:620-6.
90. Lang E, Lang F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol* 2015;39:35-42.
91. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* 2003;42:423-38.
92. Azab W, Gramatica A, Herrmann A, Osterrieder N. Binding of alphaherpesvirus glycoprotein H to surface alpha4beta1-integrins activates calcium-signaling pathways and induces phosphatidylserine exposure on the plasma membrane. *MBio* 2015;6:e01552-15.
93. Qadri SM, Mahmud H, Lang E, et al. Enhanced suicidal erythrocyte death in mice carrying a loss-of-function mutation of the adenomatous polyposis coli gene. *J Cell Mol Med* 2012;16:1085-93.
94. Carnec X, Meertens L, Dejarnac O, et al. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. *J Virol* 2015;90:92-102.
95. Reshef A, Shirvan A, Akselrod-Ballin A, Wall A, Ziv I. Small-molecule biomarkers for clinical PET imaging of apoptosis. *J Nucl Med* 2010;51:837-40.
96. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
97. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.

98. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* 2010;17:922-30.
99. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008;44:205-21.
100. Sawai H, Domae N. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411:569-73.
101. O'Connor JP, Jackson A, Parker GJ, Roberts C, Jayson GC. Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical trials of antivasular therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:167-77.
102. Salem A, O'Connor JP. Assessment of Tumor Angiogenesis: Dynamic Contrast-enhanced MR Imaging and Beyond. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2016;24:45-56.
103. Shi C, Liu D, Xiao Z, et al. Monitoring Tumor Response to Antivasular Therapy Using Non-Contrast Intravoxel Incoherent Motion Diffusion-Weighted MRI. *Cancer Res* 2017;77:3491-501.
104. Loveless ME, Lawson D, Collins M, et al. Comparisons of the efficacy of a Jak1/2 inhibitor (AZD1480) with a VEGF signaling inhibitor (cediranib) and sham treatments in mouse tumors using DCE-MRI, DW-MRI, and histology. *Neoplasia* 2012;14:54-64.
105. Zakhari N, Taccone MS, Torres C, et al. Diagnostic Accuracy of Centrally Restricted Diffusion in the Differentiation of Treatment-Related Necrosis from Tumor Recurrence in High-Grade Gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 2017.
106. Wang S, Chen Y, Lal B, et al. Evaluation of radiation necrosis and malignant glioma in rat models using diffusion tensor MR imaging. *J Neurooncol* 2012;107:51-60.

107. Kratochvila J, Jirik R, Bartos M, Standara M, Starcuk Z, Jr., Taxt T. Distributed capillary adiabatic tissue homogeneity model in parametric multi-channel blind AIF estimation using DCE-MRI. *Magn Reson Med* 2016;75:1355-65.
108. Wang S, Fan X, Medved M, et al. Arterial input functions (AIFs) measured directly from arteries with low and standard doses of contrast agent, and AIFs derived from reference tissues. *Magn Reson Imaging* 2016;34:197-203.
109. Shi L, Wang D, Liu W, et al. Automatic detection of arterial input function in dynamic contrast enhanced MRI based on affinity propagation clustering. *J Magn Reson Imaging* 2014;39:1327-37.
110. Abuelmakarem HS, Sliem MA, El-Azab J, Farghaly MMA, Ahmed WA. Toward Highly Efficient Cancer Imaging and Therapy Using the Environment-Friendly Chitosan Nanoparticles and NIR Laser. *Biosensors (Basel)* 2019;9.
111. Hartman RK, Hallam KA, Donnelly EM, Emelianov SY. Photoacoustic imaging of gold nanorods in the brain delivered via microbubble-assisted focused ultrasound: a tool for in vivo molecular neuroimaging. *Laser Phys Lett* 2019;16.
112. Zettlitz KA, Waldmann CM, Tsai WK, et al. A dual-modality linker enables site-specific conjugation of antibody fragments for (18)F-immunoPET and fluorescence imaging. *J Nucl Med* 2019.
113. Richey T, Foster JS, Williams AD, et al. Macrophage-Mediated Phagocytosis and Dissolution of Amyloid-Like Fibrils in Mice, Monitored by Optical Imaging. *Am J Pathol* 2019.
114. Zhang Y, Wang M, Liu W, Peng X. Optical Imaging of Triple-Negative Breast Cancer Cells in Xenograft Athymic Mice Using an ICAM-1-Targeting Small-Molecule Probe. *Mol Imaging Biol* 2019.

115. Chen YS, Zhao Y, Yoon SJ, Gambhir SS, Emelianov S. Miniature gold nanorods for photoacoustic molecular imaging in the second near-infrared optical window. *Nat Nanotechnol* 2019.
116. Hernandez Vargas S, Ghosh SC, Azhdarinia A. New Developments in Dual-labeled Molecular Imaging Agents. *J Nucl Med* 2019.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben. Ich bedanke mich bei dem Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Jens Ricke für die Möglichkeit der Promotion an seinem Lehrstuhl. Ich möchte mich auch beim ehemaligen Klinikdirektor und Dekan der Medizinischen Fakultät Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Reiser bedanken.

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Clemens Cyran. Ich schulde ihm meine tiefste Dankbarkeit, nicht nur für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die allzeit tatkräftige Hilfe bei allen Problemen, die im Laufe der Arbeit auftraten, sondern auch und ganz besonders für die ausgezeichnete persönliche Betreuung.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. Philipp Kazmierczak herzlichst für seine stetige Präsenz, seinen Einsatz und seine Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit und für das Korrekturlesen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Radiologie der Klinik und Poliklinik für Radiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke) des Klinikums der Universität München bedanken.

Meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin gilt ein ganz besonderer Dank. Sie halfen mir durch ihre stete Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Publikationen

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

1. Kazmierczak PM, **Burian E**, Eschbach R, et al. Monitoring Cell Death in Regorafenib-Treated Experimental Colon Carcinomas Using Annexin-Based Optical Fluorescence Imaging Validated by Perfusion MRI. PLoS One 2015;10:e0138452.

Weitere Veröffentlichungen

2. **Burian E**, Franz D, Greve T, Dieckmeyer M, Holzapfel C, Drabsch T, Sollmann N, Probst M, Kirschke JS, Rummeny EJ, Zimmer C, Hauner H, Karampinos DC and Baum T. Age- and gender-related variations of cervical muscle composition using chemical shift encoding-based water-fat MRI. European Journal of Radiology. 2020

3. **Burian E**, Inhuber S, Schlaeger S et al. Association of thigh and paraspinal muscle composition in healthy adults using chemical shift encoding-based water-fat MRI. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery. 2019.

4. **Burian E**, Probst FA, Weidlich D et al. Visualization of the inferior alveolar nerve and the lingual nerve with new MRI sequences. Clinical Oral Investigations. 2019.

5. **Burian E**, Rohrmeier A., Schlaeger S, et al. Lumbar Muscle and Vertebral Bodies Segmentation of Chemical Shift Encoding-Based Water-Fat MRI: the reference database MyoSegmentTUM Spine. BMC Musculoskeletal Disorders. 2019

6. **Burian E**, Subburaj K, Mookiah MRK, et al. Texture analysis of vertebral bone marrow using chemical shift encoding-based water-fat MRI: a feasibility study. Osteoporosis International. 2019

7. **Burian E**, Syvari J, Holzapfel C, et al. Gender- and Age-Related Changes in Trunk Muscle Composition Using Chemical Shift Encoding-Based Water-Fat MRI. *Nutrients* 2018;10 (12).
8. **Burian E**, Probst F, Palla B, et al. Effect of hypoxia on the proliferation of porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells in 2- and 3-dimensional culture. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45:414-9.
9. **Burian E**, Schulz C, Probst F, et al. Fluorescence based characterization of early oral squamous cell carcinoma using the Visually Enhanced Light Scope technique. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45:1526-30.
10. Inhuber S, Sollmann N, Schlaeger S, Dieckmeyer M, **Burian E** et al. Associations of thigh muscle fat infiltration with isometric strength measurements based on chemical shift encoding-based water-fat magnetic resonance imaging. *European Radiology Experimental*.
11. Sollmann N, Zoffl A, Franz D, Syväri J, Dieckmeyer M, **Burian E** et al. Regional variation in paraspinal muscle composition using chemical shift encoding-based water-fat MRI. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*.
12. Sollmann N, Franz D, **Burian E**, Löffler M, Probst M, Gersing A, Schwaiger B, Pfeiffer D, Kirschke JS, Baum T, Riederer I. Assessment of paraspinal muscle characteristics, lumbar BMD, and their associations in routine multi-detector CT of patients with and without osteoporotic vertebral fractures: *Eur J Radiol*
13. Palla B, **Burian E**, Fliefel R, Otto S. Systematic review of oral manifestations related to hyperparathyroidism. *Clin Oral Investig* 2018;22:1-27.
14. Palla B, **Burian E**, Klecker JR, Fliefel R, Otto S. Systematic review of oral ulceration with bone sequestration. *J Craniomaxillofac Surg* 2016;44:257-64.

Publikationen

15. Cornelsen M, Probst FA, Schwarz C, et al. Mechanical and biological effects of infiltration with biopolymers on 3D printed tricalciumphosphate scaffolds. *Dent Mater J* 2017;36:553-9.
16. Probst F, **Burian E**, Fliefel R, Ehrenfeld M, Otto S. Zukünftige Optionen zur Rekonstruktion bei ausgedehnten knöchernen Defekten im Kiefer-, Gesichts- und Schädelbereich mittels CAD/CAM-gefertigter bioaktiver Leitschienen. *OP-Journal* 2013;29:200-4.
17. Otto S, Kleye C, **Burian E**, Ehrenfeld M, Cornelius CP. Custom-milled individual allogeneic bone grafts for alveolar cleft osteoplasty-A technical note. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45:1955-61.
18. Otto S, **Burian E**, Troeltzsch M, Kaeppler G, Ehrenfeld M. Denosumab as a potential treatment alternative for patients suffering from diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible-A rapid communication. *J Craniomaxillofac Surg* 2018;46:534-7.
19. Otto S, Troeltzsch M, **Burian E**, et al. Ibandronate treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible: Pain relief and insight into pathogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43:1837-42.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dr. med. Egon Burian, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Annexin-basierte optische Fluoreszenzbildgebung und Perfusions-MRT zum Monitoring der frühen Effekte einer Regorafenibtherapie im experimentellen humanen Kolonkarzinom

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, 05.02.2020

Egon Burian

(Ort, Datum)

(Dr. med. Egon Burian)