

Institut für Röntgendiagnostik
Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. E. J. Rummeny)

MULTIMODALE BILDGEBUNG ZUR TUMORCHARAKTERISIERUNG UND THERAPIEKONTROLLE IN ENDOGENEN UND TRANSPLANTIERTEN MAUSMODELLEN DES PANKREATISCH DUKTALEN ADENOKARZINOMS

Manuela R. Eßwein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. P. Henningsen

Prüfer der Dissertation: 1.) Prof. Dr. E. J. Rummeny
2.) Priv.-Doz. Dr. R. Braren
3.) Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 28.09.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für
Medizin am 24.05.2017 angenommen.

Meinen Eltern und meiner Großmutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
2 FRAGESTELLUNG.....	2
3 GRUNDLAGEN	3
3.1 DAS PANKREAS.....	3
3.2 DAS PANKREASKARZINOM	3
3.2.1 Symptome	6
3.2.2 Diagnostik	6
3.2.3 Therapiekonzepte.....	9
3.3 TUMORMODELLE.....	11
3.3.1 Genetisch modifizierte Modelle	11
3.4 BILDGEBENDE VERFAHREN	13
3.4.1 Magnetresonanztomographie	13
3.4.1.1 T2-gewichtete MRT Aufnahmen.....	14
3.4.1.2 Dynamische kontrastverstärkte MRT.....	15
3.4.1.3 Diffusionsgewichtete MRT	15
3.4.1.4 Datenanalyse	17
3.4.2 Positronenemissionstomographie.....	17
3.4.2.1 ¹⁸ F-FDG.....	19
3.4.2.2 ¹⁸ F-FLT.....	19
4 MATERIAL UND METHODIK	20
4.1 TIERE	20
4.1.1 Tierart.....	20
4.1.2 Tierhaltung	20
4.2 ANÄSTHESIE	21
4.3 TUMORMODELLE.....	21
4.3.1 Endogenes Tumormodell.....	21
4.3.2 Subkutanes Tumormodell	22
4.3.2.1 Tumorzelllinien	22
4.3.2.1.1 Zellkultivierung und -passagierung	22
4.3.2.2 Implantation.....	23
4.4 BILDGEBUNG	24
4.4.1 Magnetresonanztomographie	24
4.4.1.1 MRT-Auswertung.....	24
4.4.2 Positronenemissionstomographie.....	26
4.4.2.1 PET-Auswertung	27
4.5 ANATOMISCH-HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG	27
4.5.1 Präparation und Fixierung der Gewebeproben.....	27
4.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
4.5.3 Immunhistochemische Färbungen	28
4.5.3.1 5-Brom-2-desoxyuridin-Färbung	28
4.5.3.2 Cytokeratin 19-Färbung	29
4.5.4 Histologische Auswertung.....	29
4.6 CHEMOTHERAPEUTIKUM.....	29
4.7 SOFTWARE	29

4.8	STATISTISCHE BERECHNUNG.....	30
4.9	DISCLOSURE.....	30
5	ERGEBNISSE	31
5.1	MRT UND HISTOLOGISCHE KORRELATION	31
5.1.1	Subkutanes Tumormodell	31
5.1.1.1	Histologische Korrelation.....	34
5.1.2	Ergebnisse der endogenen Tumormodelle.....	36
5.1.2.1	CKT.....	36
5.1.2.1.1	Histologische Korrelation	38
5.1.2.2	CKP.....	39
5.1.2.2.1	Histologische Korrelation	41
5.1.2.3	CKTP R172H.....	41
5.1.2.3.1	Histologische Korrelation	43
5.1.2.4	CKTP fl+/-	44
5.1.2.4.1	Histologische Korrelation	45
5.1.2.5	Vergleich der endogenen Modelle.....	45
5.2	DWI-MRT	47
5.2.1	Subkutanes Tumormodell	47
5.2.2	Endogene Tumormodelle	47
5.3	¹⁸ F-FDG-PET.....	51
5.3.1	Subkutanes Tumormodell	51
5.3.2	Endogenes Tumormodell.....	52
5.4	¹⁸ F-FLT-PET.....	54
5.5	MULTIMODALE LONGITUDINALE BILDGEBUNG	58
5.6	ERGEBNISSE DER THERAPIEVERLAUFSKONTROLLE.....	60
5.6.1	Subkutanes Tumormodell	60
5.6.2	Endogenes Tumormodell.....	62
6	DISKUSSION	68
6.1	DIE TUMORMODELLE	68
6.2	MRT UND HISTOLOGISCHE KORRELATION	69
6.3	DWI-MRT	71
6.4	PET.....	72
6.5	MULTIMODALE LONGITUDINALE BILDGEBUNG	73
6.6	THERAPIEVERSUCHE.....	74
6.7	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	76
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	78
8	LITERATURVERZEICHNIS	79
9	ANHANG	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-JÜR	Fünf-Jahres-Überlebensrate
5-FU	5-Fluoruracil
ADC	<i>Apparent Diffusion Coefficient</i> (dt.: scheinbarer Diffusionskoeffizient)
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CK	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/LSL-G12D} = Kras^{G12D}$
CK19	Cytokeratin 19
CKP	$Kras^{G12D}; p53^{fl/+}$ Maus (Kreuzung einer $p48^{+/Cre}$ Maus mit einer $Kras^{+/LSL-G12D}; p53^{+/fl}$ Maus)
CKT	$Kras^{G12D}; Ela-TGF\alpha$ Maus (Kreuzung einer $p48^{+/Cre}$ Maus mit einer $Kras^{+/LSL-G12D}; TGF\alpha$ Maus)
CKTP fl+/-	$Kras^{G12D}; Ptf1a-Cre; p53^{+/-}$ Maus (Kreuzung einer $p48^{+/Cre}$ Maus mit einer $Kras^{+/LSL-G12D}; TGF\alpha; p53^{+/-}$ Maus)
CKTP R172H	$Kras^{G12D}; Ptf1a-Cre; p53^{R172H}$ Maus (Kreuzung einer $p48^{+/Cre}$ Maus mit einer $Kras^{+/LSL-G12D}; TGF\alpha; p53^{R172H/+}$ Maus)
CT	Computertomographie
DCE-MRT	<i>dynamic contrast enhanced</i> (dt.: dynamische kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie)
DICOM	<i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i> (dt.: Standard im medizinischen Bilddatenmanagement)
DWI-MRT	<i>diffusion-weighted imaging</i> (dt.: Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (dt.: epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	EGF-Rezeptor
^{18}F -FDG-PET	^{18}F -Fluor-Deoxyglukose-Positronenemissionstomographie
^{18}F -FLT-PET	^{18}F -Fluor-L-Thymidin-Positronenemissionstomographie
FOV	<i>Field-of-View</i> (dt.: Bildfeld)
GEMM	<i>genetically engineered mouse model</i> (dt.: genetisch modifiziertes Mausmodell)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HWZ	Halbwertszeit
IPMN	intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
keV	Kiloelektronenvolt
KM	Kontrastmittel
LSL	<i>Lox-Stop-Lox</i>
M	Magnetisierung
MCN	<i>Mucinous cystic neoplasm</i> (dt.: muzinös zystische Neoplasie)
MR-	Magnetresonanz-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl der Merkmalsausprägung
NaCl	Natriumchlorid
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert (Signifikanzwert)
PACS	<i>Picture Archiving and Communication System</i> (dt.: Bildarchivierungs- und Kommunikationssystem)
PanIN	pankreatisch intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> (dt.: duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
ROI	<i>Region-of-Interest</i> (dt.: „Bereich von Interesse“, Messregion zur Auswertung des Signals)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (dt.: „Umdrehungen pro Minute“)
s.c./sc-	subcutan
SD	<i>Standard Deviation</i> (dt.: Standardabweichung)
SE	Spinecho
SPIR	<i>Spectral Presaturation with Inversion Recovery</i>
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i> (dt.: „standardisierter Aufnahmewert“)
T	Tesla
T1	Längsrelaxationzeit
T2	Querrelaxationzeit
T2-MRT	T2-gewichtete Magnetresonanztomographie
TE	Echozeit
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (dt.: transformierender Wachstumsfaktor)
Tis	<i>Tumor in situ = Carcinoma in situ</i>
TK1	Thymidinkinase-1
T/M-Ratio	Tumor-zu-Muskel-Ratio
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TR	Repetitionszeit
TSE	Turbo-Spinecho
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (dt.: Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (dt.: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

1 EINLEITUNG

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt mit seiner ausgesprochen ungünstigen Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von circa 5 % immer noch eine der letalsten Krebserkrankungen dar (Bohmig und Rosewicz 2004; Freelove und Walling 2006). Trotz intensiver Forschungsanstrengungen in den letzten Jahrzehnten besteht für die überwiegende Anzahl der Betroffenen weiterhin keine Aussicht auf Heilung. Zwei Hauptgründe sind hierfür ursächlich: (i) uncharakteristische oder fehlende Frühsymptome und die daraus resultierende späte Diagnosestellung in einem häufig fortgeschrittenen und metastasierten Tumorstadium sowie (ii) eine relative Therapieresistenz.

Das PDAC zeigt im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten ein sehr inhomogenes Erscheinungsbild. Hierzu gehören ein variabler Stromaanteil des Tumorgewebes, eine variable Anzahl von dukталen Strukturen und Zysten sowie eine geringe Vaskularisierung des Tumors. Ein Grund für die bisher fast ausnahmslos enttäuschenden klinischen Studienergebnisse liegt vermutlich in der Auswahl der präklinischen Mausmodelle, welche diese Heterogenität nicht in genügendem Maße widerspiegeln. Die häufig eingesetzten heterotopen (in der Regel subkutan implantierten) Xenograft-Mausmodelle zeigen zwar in präklinischen Therapiestudien ein gutes Ansprechen, besitzen aber nur einen geringen prädiktiven Wert bzgl. ihrer klinischen Effizienz (Johnson et al. 2001; Kerbel 2003). Ursachen hierfür sind die molekulare und zelluläre Homogenität und das Fehlen einer typischen Tumormatrix.

In der präklinischen Forschung zur Charakterisierung und zur Evaluierung des Therapieansprechens des exogenen Pankreaskarzinoms sollten also Faktoren wie die Vaskularisierung, der Fibrosegehalt und die Zellularität berücksichtigt werden (DeVries et al. 2003; Koster et al. 2005). Insbesondere durch das von *Hruban et al.* etablierte Tumorprogressionsmodell, welches die genetischen und morphologischen Veränderungen der Karzinogenese widerspiegelt, konnten neue Informationen über die Entstehung und Entwicklung des Pankreaskarzinoms gewonnen werden (Hruban et al. 2000). Auf dieser Basis ist es möglich genetisch modifizierte Mausmodelle (genetically engineered mouse models = GEMM) zu entwickeln, welche die Pathologien des humane PDACs in sehr gutem Maße wiedergeben. Weiter eröffnet dieses detaillierte Wissen neue molekularbiologische und gentherapeutische Therapieansätze, wie z.B. sogenannte "targeted therapies", die gezielt an den veränderten Molekülen der entarteten Zellen angreifen.

Bei präklinischen Testungen und der Etablierung einer multimodalen, multiparametrischen Bildgebung sowie bei der Evaluation neuer Therapien ist es also zwingend notwendig, aussagekräftige Tiermodelle zu verwenden, welche die molekularen und histopathologischen Charakteristika des humanen PDAC präzise abbilden. So kann der prädiktive Nutzen präklinischer Forschungsarbeiten verbessert werden. Die Bildgebung spielt eine entscheidende Rolle sowohl bei der Detektion als auch dem Staging des humanen PDACs. Auch in der präklinischen Forschung werden zunehmend unterschiedliche Bildgebungsmodalitäten eingesetzt um eine nicht invasive Charakterisierung des PDACs zu ermöglichen und longitudinale Bildgebungsdaten für eine Verlaufs- oder Therapiekontrolle zu akquirieren (so v.a. (Olive und Tuveson 2006)).

2 FRAGESTELLUNG

Im Einzelnen werden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht und dargestellt:

1. Etablierung der longitudinalen Bildgebung mittels multiparametrischer Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) zur Charakterisierung des PDAC in GEMM.
2. Korrelation von MRT- und PET-Bildgebungsdaten mit der Histopathologie.
3. Testung der multimodalen Bildgebungsplattform zur Überprüfung des Therapieansprechens auf Gemcitabin

Diese Fragestellungen wurden an Tumoren verschiedener GEMM und im Vergleich subkutan (s.c.) implantierter Tumore bearbeitet.

3 GRUNDLAGEN

3.1 DAS PANKREAS

Die Bauchspeicheldrüse, ein Organ endodermalen Ursprungs, liegt retroperitoneal im Oberbauch. Makroskopisch kann das Organ in drei Abschnitte untergliedert werden – Pankreaskopf (*Caput pancreatis*), Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*) und Pankreasschwanz (*Cauda pancreatis*). Das Bindegewebe ist in den Läppchen nur wenig entwickelt, lediglich größere Ausführungsgänge sind von einer dicken Bindegewebsschicht umgeben.

Das Pankreas besitzt exokrine und endokrine Drüsenanteile. Der exokrine Anteil, welcher etwa 80 % der Organmasse ausmacht, ist für die Sekretion wichtiger Verdauungsenzyme (z.B. Trypsinogen, Amylase, Lipase) verantwortlich. Die tubuloazinären Endstücke sezernieren die Pankreasenzyme in das umfangreiche Gangsystem, welches Schleim und Bikarbonat hinzufügt und über den Pankreasgang im Duodenum mündet. Die Repräsentanten der endokrinen Funktion sind die Langerhans-Inseln, diese bestehen aus verschiedenen Zelltypen und sind in das Azinogewebe eingebettet. Diese Zellen bilden unterschiedliche Hormone (u.a. Insulin, Glukagon), die der Aufrechterhaltung der Blutzuckerhomöostase dienen.

3.2 DAS PANKREASKARZINOM

Man unterscheidet Karzinome der exokrinen Anteile, also aus dem Gangepithel oder den Azinuszellen hervorgehend, von solchen der endokrinen Anteile. Unter den exokrinen Pankreastumoren ist das duktal-invasive Adenokarzinom (PDAC) mit einem Anteil von über 85 % das häufigste (Li, D. et al. 2004; Warshaw und Fernandez-del Castillo 1992). Es entsteht auf dem Boden präneoplastischer Läsionen. Bislang wurden drei verschiedene Läsionen beschrieben: pankreatisch intraduktale Neoplasie (PanIN), intraduktal papillär muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös zystische Neoplasie (MCN). Die PanIN Läsionen werden histologisch in Abhängigkeit der Dysplasie und Zytopathologie in drei Klassen eingeteilt. PanIN-1A-Läsionen sind gekennzeichnet durch eine muzinöse Produktion. PanIN-1B-Läsionen sind durch die Entwicklung einer papillären Architektur charakterisiert. Die PanIN-2-Läsionen weisen bereits eine (moderate) Zellkernabnormalität auf. PanIN-3 Läsionen entsprechen einem *Carcinoma-in-situ* und sind durch den Verlust der Zellkernpolarisation und das Vorhandensein nur noch weniger, abnormer Mitosen charakterisiert (Abb. 3-1). (Hruban et al. 2001)

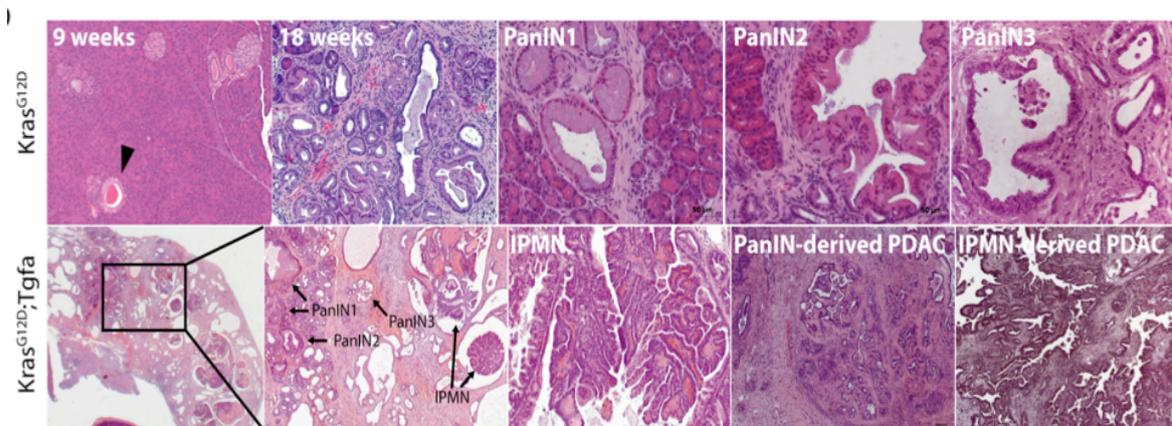


ABB. 3-1 VORLÄUFERLÄSIONEN IN KRAS^{G12D}/KRAS^{G12D};TGF α

HE-Färbung.

Oberer Reihe: *Kras^{G12D}*-Maus – Im Alter von neun Wochen ist eine beginnende azinoduktale Metaplasie (schwarzer Pfeil) zu sehen. Es sind alle drei Stufen von PanINs dargestellt.

Untere Reihe: *Kras^{G12D};Ela-TGF α* -Maus – ist sowohl ein IPMN-, wie auch PanIN-basiertes PDAC zu sehen.

(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hr. Dr. Siveke, II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar).

Basierend auf morphologischen und genetischen Analysen wurde für das Pankreaskarzinom ein Tumorprogressionsmodell entwickelt (Hruban et al. 2000). Dieses Modell beschreibt die Entwicklung eines invasiven Karzinoms über PanIN-Vorläuferläsionen. Die charakteristischen genetischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms können bereits in PanIN-Läsionen nachgewiesen werden (Moskaluk et al. 1997). Die Aktivierung des Onkogens *K-ras* ist die erste genetische Veränderung (Bardeesy und DePinho 2002; Hruban et al. 2000). Die Häufigkeit der Mutation nimmt mit dem Tumorprogress zu und beträgt annähernd 100 % im invasiven PDAC (Rozenblum et al. 1997). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die *K-ras*-Mutation eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese einnimmt. Ebenfalls bereits in frühen Läsionen zu finden ist die Aktivierung des Epidermal-Growth-Factor- (EGF-) Signalwegs, mit Überexpression der Liganden (TGF α und EGF) und der EGF-Rezeptoren (EGFR oder *ERBB2*, auch bekannt als *Her2/neu*) (Friess et al. 1999; Hezel et al. 2006). Diese zusätzliche Aktivierung des EGFR führt zur Entwicklung von IPMN-Läsionen und einem daraus resultierenden Pankreaskarzinom (Siveke et al. 2007). Die Inaktivierung des *Ink4a/Arf*-Lokus, der für die Tumorsuppressorgene *p16^{Ink4a}* und *p19^{ARF}* codiert, ist eine weitere charakteristische genetische Veränderung, die etwas später auftritt. Der Expressionsverlust des auf Chromosomen 9p lokalisierten Gens korreliert gut mit dem Grad der zytologischen und strukturellen Atypien der Läsionen (Wilentz et al. 1998). In der späten Tumorentwicklung kommt es auch zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *p53* (auf Chromosomen 17p) und *Smad4* (auf Chromosomen 18q; früher auch bekannt als *DPC4*), seltener findet sich eine biallele Inaktivierung von *BRCA2* (DiGiuseppe et al. 1994; Goggins et al. 2000; Wilentz et al. 2000; Yamano et al. 2000) (Abb. 3-2).

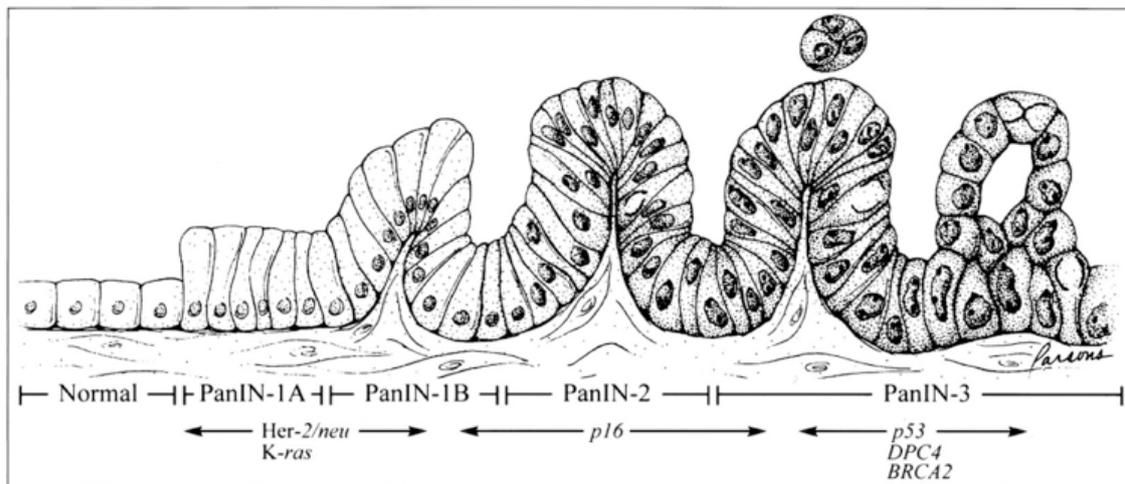


ABB. 3-2 GENETISCHE GRUNDLAGEN DER PANKREASKARZINOMENTSTEHUNG

Nach *Hruban et al.* (Hruban et al. 2000)

Es treten während der Karzinogenese typische genetische Veränderungen auf. Früh kommt es zu Mutationen von *K-ras* und *Her-2-neu*. Erst in einem späten Stadium der Vorläuferläsionen kommt es zur Mutation von *p53*, *DPC4*, *BRCA2*.

Alleinige Inaktivierung von *p16^{Ink4a}*, *p19* oder *p53* induziert kein Tumorwachstum; bei gleichzeitiger *Kras^{G12D}* Expression führt es aber zu einem beschleunigten Tumorwachstum mit früherer Tumورpenetranz (Aguirre et al. 2003; Hingorani et al. 2005).

Das Tumorsuppressorgen *Smad4* codiert den Transkriptionsfaktor TGF β (transforming growth factor- β). TGF β inhibiert das epitheliale Zellwachstum und aktiviert die Apoptose. Gleichzeitige *Kras* Aktivierung führt zu einem beschleunigten Tumorwachstum und zur Ausbildung von IPMNs bei Mäusen (Bardeesy et al. 2006b; Kojima et al. 2007). IPMNs und MCNs gehören zu den zystischen Pankreasläsionen. IPMNs sind die häufigsten zystischen Pankreasläsionen, doch ihre molekularen Veränderungen sind noch weitgehend unbekannt. Es wurden ähnliche genetische Veränderungen gefunden, jedoch in geringerer Häufigkeit.

Der Verlust der X-chromosomalen Deubiquitinase *USP9X* konnte in über 50 % der PDACs nachgewiesen werden. Der *USP9X*-Verlust fördert die Transformation der Zellen und schützt vor einem programmierten Zelltod. (Perez-Mancera et al. 2012) Das PDAC weist eine erhöhte chromosomale Instabilität auf, welche unter anderem mit einer Verkürzung der Telomere assoziiert ist (Gisselsson et al. 2001). Diese Instabilität zusammen mit der hohen genetischen Veränderung könnte ein möglicher Grund für die relative Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms sein.

Ein weiteres Charakteristikum des PDACs ist seine extensive Stromaproliferation und Desmoplasie (Bardeesy und DePinho 2002). Das Stromagewebe besteht unter anderem aus Fibroblasten, Blutgefäßen und entzündlichen Zellinfiltraten. Es handelt sich um den nicht-transformierten Anteil des epithelialen Tumors. Der Begriff Desmoplasie beschreibt die Ausbildung einer kollagenreichen Stromakomponente durch Fibroblasten. Es wird vermutet, dass dies durch TGF β getriggert wird (Lohr et al. 2001). Diese Komponenten

spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Invasivität des Tumors (Bardeesy und DePinho 2002). Die Gefährlichkeit des Pankreaskarzinoms besteht in der Invasivität und Metastasierung des Primarius. Die Fähigkeit zur Metastasierung wird durch das Tumorwachstum, die Ablösung von Tumorzellen, sowie die Angiogenese bestimmt. Die Angiogenese wird durch $TGF\alpha$ und VEGF aktiviert. (Ellenrieder et al. 1999) Die Absiedelung von Tumorzellen erfolgt frühzeitig perineural entlang von Nervenscheiden [siehe unter anderem (Nagai et al. 1986; Nagakawa et al. 1991; Nakao et al. 1996)]. Die lymphogene Metastasierung erfolgt entlang der entsprechenden lymphatischen Abflussbahnen zu den verschiedenen Lymphknotenstationen (Cubilla et al. 1978). Eine hämatogene Metastasierung erfolgt bevorzugt über die Pfortader in die Leber, des Weiteren in die Lunge, aber auch in das Peritoneum, das Skelett und in andere Organe (Kamisawa, T. et al. 1995).

3.2.1 SYMPTOME

Das PDAC ist durch eine lange asymptomatische Latenz gekennzeichnet. Insbesondere bei Karzinomen im Schwanz- oder Korpusbereich treten erst spät Symptome auf. Klassische Symptome sind neu aufgetretene Bauch- oder Rückenschmerzen, ein neu aufgetretener *Diabetes mellitus* in Folge Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen, ein schmerzloser Ikterus durch Konstriktion des Gallengangs oder andere Allgemeinsymptome wie ungewollter Gewichtsverlust oder Übelkeit.

3.2.2 DIAGNOSTIK

Da die Symptome des Pankreaskarzinoms eher unspezifisch sind, werden zur weiteren Diagnostik meist bildgebende Verfahren herangezogen. Häufig ist die Sonographie die zuerst eingesetzte Bildgebungsmodalität, gefolgt von einem Schnittbildverfahren (CT oder MRT). Eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen Läsionen ist für das weitere Procedere und die Prognose wichtig, kann jedoch aufgrund der eingeschränkten Sensitivität und Spezifität der Verfahren häufig nicht getroffen werden, so dass Biopsien notwendig sind. Differentialdiagnostisch muss insbesondere ein Pseudotumor im Rahmen einer Pankreatitis in Betracht gezogen werden, da auch dieser eine verminderte Kontrastmittelaufnahme zeigt.

Sonografie und Endosonografie. Die Oberbauchsonographie stellt meist die primär eingesetzte Untersuchungsmethode dar. Die meisten Pankreaskarzinome erscheinen echoärmer als das Umgebungsgewebe (Brambs und Claussen 1993). Ggf. gelingt bereits der Nachweis von Metastasen.

Die Endosonographie kann zusätzlich zu einer CT- oder MRT-Bildgebung eingesetzt werden um eine genauere Aussage über die lokale Ausdehnung machen zu können (Mertz et al. 2000) oder auch um diese mit einer Biopsie zu kombinieren.

Computertomographie (CT). Die CT-Untersuchung mit Kontrastmittel (KM) zählt noch immer zu der Standarduntersuchungsmethode mit einer hohen Sensitivität (Soriano et al. 2004). Es sollte sich hierbei

mindestens um ein biphasisches, besser um ein triphasisches Protokoll handeln. Das triphasische Protokoll umfasst eine arterielle, eine portalvenöse und eine Parenchymphase. In der arteriellen Phase ist der Kontrast des hypodensen Karzinoms zum hyperdensen Pankreasparenchym am größten. Es ermöglicht ebenfalls eine gute Abgrenzbarkeit von Lebermetastasen sowie die Beurteilung einer Tumordinfiltration in die Gefäße. Die Beurteilung der Tumorausdehnung im KM-CT spielt eine entscheidende Rolle bei der Frage der Resektabilität.

Magnetresonanztomographie (MRT) und Magnetresonanztomographie (MRCP). Das MRT ist mindestens ebenso gut für die Diagnostik geeignet wie das CT; Vorteil der MRT ist die höhere Kontrastauflösung (Irie et al. 1997; Sahani et al. 2008). Im T2-gewichteten Bild sind die Pankreaskarzinome meist hypointenser als das Pankreasparenchym. Das Pankreaskarzinom nimmt erst spät KM auf, weshalb es in den frühen KM-Phasen hypointenser als das Umgebungsgewebe erscheint. Die Diffusionsgewichtete MRT (diffusion-weighted imaging = DWI) wird zunehmend zur Detektion, Charakterisierung und Therapieerfolgskontrolle eingesetzt (Li, S. P. und Padhani 2012). So zeigen einige Forschungsarbeiten, dass mittels DWI benigne Läsionen von PDACs unterscheiden werden können (Fattahi et al. 2009; Kamisawa, Terumi et al. 2010; Sandrasegaran et al. 2011).

Die MRT-Aufnahme sollte mit der MRCP kombiniert werden um Gangveränderungen besser darzustellen. Die nicht-invasive MRCP löst aufgrund ihrer höheren Sensitivität zunehmend die ERCP ab (Adamek et al. 2000).

Positronenemissionstomographie (PET). Der bevorzugte Tracer ist ^{18}F -Fluor-2-Desoxy-Glucose (^{18}F -FDG). Die ^{18}F -FDG-PET-Untersuchung wird eher komplementär eingesetzt. Der Einsatz wird durch eine geringe Verfügbarkeit und hohe Kosten limitiert. (Balci und Semelka 2001) Die aktuelle Studienlage bezüglich der Wertigkeit der ^{18}F -FDG-PET-Untersuchung in der Pankreaskarzinomdiagnostik ist unklar. Eine PET-Untersuchung mit ^{18}F -FDG kann einen frühen Tumor- und auch Metastasennachweis ermöglichen (Mertz et al. 2000). Ein Nachteil der PET-Untersuchung ist die teilweise schlechte Differenzierung von Pseudotumoren und soliden Tumoren (Strauss 1996; Zimny et al. 2000). Derzeit wird die PET-Untersuchung in der S3-Leitlinie: Exokrines Pankreaskarzinom nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2013)).

Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP). Häufig findet man eine Obstruktion des Hauptpankreasganges, welche mittels ERCP diagnostiziert werden kann. Die ERCP wird zunehmend durch die nicht-invasive MRCP verdrängt. In der aktuellen S3-Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2013)) wird die ERCP wegen ihrer zu geringen Sensitivität nicht mehr empfohlen.

Biopsie. Eine Biopsie wird meist als endosonographisch gestützte Feinnadelaspirationsbiopsie durchgeführt, insbesondere bei differentialdiagnostischen Schwierigkeiten. Hierdurch gelingt ein zytologischer bzw. histologischer Nachweis des Pankreaskarzinoms. Alternativ bietet sich eine diagnostische Laparotomie mit Biopsie an.

Blutuntersuchung. Oft findet sich eine Erhöhung des Carbohydrate-Antigens 19-9 (CA 19-9) (Haglund et al. 1986). Da allerdings ein erhöhter Wert auch bei anderen malignen oder benignen Erkrankungen zu finden ist (z.B. Magenkarzinom, Pankreatitis), stellt CA 19-9 eher einen Verlaufsparmeter dar. Seltener findet sich eine unspezifische Erhöhung des Carcinoembyonalen Antigens (CEA).

TNM-Klassifikation. Dabei steht T für Tumor und dessen Ausdehnung, N für Nodes = Lymphknoten und M für Metastasen. Die TNM-Klassifikation für die Einteilung exokriner Pankreastumore beruht auf der 7. Auflage der *American Joint Committee on cancer* (AJCC).

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor auf Pankreas beschränkt, größter Durchmesser ≤ 2 cm
- T2 Tumor auf Pankreas beschränkt, größter Durchmesser > 2 cm
- T3 Tumor überschreitet Pankreas, ohne Beteiligung der Arteria mesenterica superior oder des Truncus coeliacus
- T4 Tumor infiltriert Arteria mesenterica superior oder den Truncus coeliacus

- NX regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 kein Anhalt für Lymphknotenbefall
- N1 regionäre Lymphknotenmetastasen

- M0 keine Fernmetastasen nachweisbar
- M1 Fernmetastasen vorhanden

Nach Vorgabe der 7. Auflage der *Union internationale contre le cancer* (UICC) lässt sich anhand der TNM-Klassifikation die Tumorausdehnung in Stadien einteilen:

TABELLE 1 STADIENEINTEILUNG NACH UICC

Stadium	TNM-System		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

3.2.3 THERAPIEKONZEPTE

Die chirurgische R₀-Resektion stellt nach wie vor die einzige potentiell kurable Therapieoption dar. Doch nur 15-20 % (Ahrendt und Pitt 2002) der Patienten haben einen potentiell resektablen Tumorbefund (Schneider et al. 2005) und die 5-JÜR nach Resektion liegt lediglich bei etwa 25 % (Richter et al. 2003).

Gegebenenfalls erfolgt nach Resektion eine adjuvante Chemotherapie, die in einigen Studien einen Überlebensvorteil zeigte (Oettle et al. 2007). Jedoch existiert weder eine etablierte Standardtherapie, noch ein einheitliches Regime (Newman et al. 2006).

Kriterien der Resektabilität sind das Fehlen von Fernmetastasen sowie fehlende Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior. Weiter unterscheidet man noch von einer grenzwertigen Resektabilität, sogenannte Borderline Tumore. Die Kriterien hierfür wurden in den NCCN-Leitlinien¹ festgelegt:

- keine Fernmetastasen,
- Infiltration der V. mesenterica superior bzw. der Pfortader mit oder ohne Stenosierung des Gefäßlumens,
- Ummauerung der V. mesenterica superior bzw. der Pfortader ohne gleichzeitiges Ummauerung der nahegelegenen Arterien,
- kurzstreckiger venöser Gefäßverschluss durch einen Tumorthrombus oder ein Ummauerung des Tumors, aber mit geeigneten Gefäßen proximal und distal des Gefäßverschlusses, die eine sichere Resektion und Rekonstruktion erlauben,
- Ummauerung der A. gastroduodenalis bis zur A. hepatica mit entweder kurzstreckigem Ummauerung oder direktem Kontakt zur A. hepatica, aber ohne Ausdehnung bis zum Truncus coeliacus,
- Ummauerung der A. mesenterica superior bis max. 180° der Gefäßzirkumferenz.

Bei lokal fortgeschrittenen inoperablen Pankreastumoren oder eventuell auch bei Borderline-Tumoren sollte eine neoadjuvante Therapie begonnen werden, um die Möglichkeit einer Resektabilität zu erreichen. Derzeit wird meist eine sequentielle Therapie, bestehend aus einer reinen Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU und einer kombinierten Radiochemotherapie durchgeführt. (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013)

Bei einem inoperablen Befund wird meist eine palliative Chemotherapie durchgeführt. Patienten mit nicht-resektablen Pankreaskarzinom überleben im Mittel etwa 8 bis 12 Monate, bei Vorliegen von Metastasen sogar nur 3 bis 6 Monate (Richter et al. 2003).

¹ NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*

Zur Chemotherapie stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung:

Gemcitabin. Das Standard-Chemotherapeutikum in der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinomes ist Gemcitabin (2,2'-,2'-Difluorodesoxyzytidin). Es gehört in die Gruppe der Pyrimidinanaloga, ein Antimetabolit, welcher die DNA-Synthese blockiert. *Burriss et al.* zeigten in ihrer Studie ein medianes Überleben von 5,7 Monaten und eine 1-JÜR von 12 % unter Gemcitabin-Therapie (*Burriss et al. 1997*). Während mehr als 90 % der Patienten nicht auf Gemcitabin ansprechen, gibt es auch solche, die auf das Chemotherapeutikum ansprechen (*Schneider et al. 2005*). Dies wirft die Frage auf, ob es vielleicht prädiktive Faktoren für ein Therapieansprechen gibt, wie etwa Tumordifferenzierung, Vaskularität oder spezifische Mutationen.

Die Kombination von Gemcitabin mit platinhaltigen Chemotherapeutika, z.B. Oxaliplatin oder Cisplatin, zeigt keine signifikante Besserung des medianen Überlebens (*Heinemann et al. 2006; Louvet et al. 2005*).

5-Fluoruracil (5-FU). 5-FU zählt, wie Gemcitabin, zu den Pyrimidinanaloga. Es galt lange Zeit als erste Wahl in der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms, bis es von Gemcitabin abgelöst wurde (*Carmichael et al. 1996*).

„**Targeted Therapy**“, die gezielte Krebstherapie, ist eine neuartige Behandlungsoption, die gezielt mit Strukturen des Tumorgewebes interferiert. Dazu gehören z.B. monoklonale Antikörper oder sog. „*small molecules*“. Anders als herkömmliche Chemotherapeutika greifen sie nicht ubiquitär in die Mechanismen der sich schnell teilenden Zellen ein, sondern sind gezielt gegen kleine Strukturen gerichtet, die entscheidend für die Entstehung und das Wachstums eines Tumors sind:

Erlotinib. Erlotinib ist ein selektiver Tyrosinkinaseinhibitor des EGF-Rezeptors. Durch Rezeptorblockade können Wachstumsfaktoren nicht mehr die Proliferation und Angiogenese stimulieren. In einer Phase-III-Studie zeigt Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin eine leichte Überlebensverlängerung (*Moore et al. 2007*).

Cetuximab. Dies ist ein monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor. In einer Phase-II-Studie konnte in Kombination mit Gemcitabin bei EGFR-exprimierendem PDAC ein medianes Überleben von 7,1 Monaten erzielt werden (*Xiong et al. 2004*).

Bevacizumab. Bevacizumab bindet irreversibel an den *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* und verhindert die Gefäßneubildung von Tumoren. Es handelt sich um einen monoklonalen VEGF-Antikörper. Eine Phase-II-Studie mit Gemcitabin plus Bevacizumab ergab eine Ansprechrate von 21 % und eine mediane Überlebensrate von 9,0 Monaten (*Kindler et al. 2005*). Eine Phase-III-Studie konnte die guten Ergebnisse nicht bestätigen. Das progressionsfreie Überleben betrug 3,8 Monate vs. 2,9 Monate, das mediane Gesamtüberleben 5,8 Monate vs. 5,9 Monate, jeweils für Bevacizumab und Kontrollgruppe. (*Kindler et al. 2010*)

Sorafenib. Dies ist ein Hemmer des VEGF-Signalweges und der Raf-Signalkaskade, demgemäß kommt es zu einer verminderten Angiogenese durch den Tumor und einer Abnahme der Zellteilung (Liu et al. 2006). In einer Phase-II-Studie zeigt sich kein Vorteil von Sorafenib in Kombination mit Gemcitabin im Vergleich zu einer Gemcitabin-Monotherapie (Kindler et al. 2012).

Kombinationstherapien

Als Kombinationstherapie ist derzeit vor allem eine Kombination aus 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin unter dem sogenannten FOLFIRINOX-Schema in Verwendung. *Conroy et al.* zeigten eine Verlängerung des medianen Überlebens von 6,8 auf 11,1 Monate ($p < 0,0001$; HR 0,57). Das progressionsfreie Überleben wurde von 3,3 auf 6,4 Monate verlängert. Nachteile der Kombinationstherapie sind eine erhöhte Toxizität und eine Einschränkung der Lebensqualität. (Conroy et al. 2011)

Ebenfalls kommen Abwandlungen des Schemas zum Einsatz (FOLFIRI: ohne Oxaliplatin, FOLFOX: ohne Irinotecan. Beide Schemata verzichten auf den 5-FU-Bolus).

In einer neuen Phase-III-Studie aus dem Jahr 2013 wurde die Kombination von Gemcitabin und nab-Paclitaxel getestet. Das mediane Gesamtüberleben betrug bei 8,5 Monate vs. 6,7 Monate (Gemcitabin mono) ($p < 0,001$). Das mediane progressionsfreie Überleben lag bei 5,5 Monaten vs. 3,7 Monate (Gemcitabin mono) ($p < 0,001$). Als Nebenwirkungen traten eine vermehrte Hämatotoxizität und eine Neuropathie auf. (Von Hoff et al. 2013)

3.3 TUMORMODELLE

Häufig werden zu Studienzwecken Xenograft-Tumormodelle in immundefizienten Mäusen verwendet. Xenograft-Modelle werden durch Implantation einer kleinen Tumormasse oder durch Injektion kultivierter Tumorzellen generiert. Trotz guter Wirksamkeit einiger therapeutischer Substanzen in Xenograft-Modellen sind die Ergebnisse klinischer Studien meist enttäuschend (Johnson et al. 2001). GEMM ähneln der humanen Erkrankung bzgl. ihrer genetischen und molekularen, sowie der daraus sich ableitenden histopathologischen Heterogenität. In den letzten Jahren konnten verschiedene GEMM etabliert werden.

3.3.1 GENETISCH MODIFIZIERTE MODELLE

GEMM sind die neuen Hoffnungsträger der Tumorforschung. Die Veränderung des Genoms einer Maus dahingehend, dass es wichtige Faktoren der humanen Onkogenese widerspiegelt, ist erst durch ein detailliertes Verständnis der Tumorentstehung möglich. Aussagekräftige präklinische Tumormodelle sind also solche, deren Genommanipulation zu Mutationen führen, die möglichst genau die Tumorgenese im Menschen wiedergeben. Idealerweise resultieren daraus Tumoren, welche auf pathophysiologischer,

histologischer sowie molekularer Ebene die Eigenschaften des humanen PDACs abbilden. Zu diesen typischen Eigenschaften zählen: Entwicklung von Vorläuferläsionen und ein daraus hervorgehender invasiver und metastasierender Tumor, welcher reichlich kollagenreiches Stromagewebe und Entzündungszellen enthält - eine sogenannte Desmoplasie - und eine geringe Vaskularisierung aufweist (Hruban et al. 2006; Olive und Tuveson 2006).

In *Ela-TGF α* Mäusen wird TGF α durch den pankreatischen Elastase-Promotor überexprimiert; daraus resultiert eine pankreatische Metaplasie, bei manchen Mäusen entwickelt sich nach über einem Jahr ein multifokales, homogenes azinär-duktales Karzinom (Bardeesy et al. 2001; Sandgren et al. 1990; Wagner et al. 1998). In Kombination mit *p53* zeigt sich ein beschleunigtes Tumorstadium (Wagner et al. 2001). Das Karzinom entsteht jedoch unabhängig von Vorläuferläsionen. Für ein Tumormodell, welches die Komplexität des humanen PDACs widerspiegelt, sind aber weitere Mutationen notwendig. Aktuell weisen nur *Cre/lox*-basierte genetisch manipulierte Mausmodelle mit einer pankreasspezifischen *Kras^{G12D}*-Allel Aktivierung humantypische PanIN-Läsionen und Metastasen auf und rekapitulieren somit die komplette humane Tumorentwicklung (Guerra et al. 2003; Hingorani et al. 2003). Ein onkogenes *Kras* knock-in Allel wird durch die Entfernung einer geflochtenen Stop-Kassette (so genanntes Lox-Stop-Lox = *LSL*) aktiviert (Jackson et al. 2001). Werden *LSL-Kras*-Mäuse mit *Ptf1a-Cre*-Mäusen gekreuzt, deren Cre-Rekombinase-Expression unter dem pankreasspezifischen Promotor *Ptf1a* steht, wird *Kras* nur im Pankreas exprimiert (Mazur und Siveke 2012; Olive und Tuveson 2006) (Abb. 3-3)

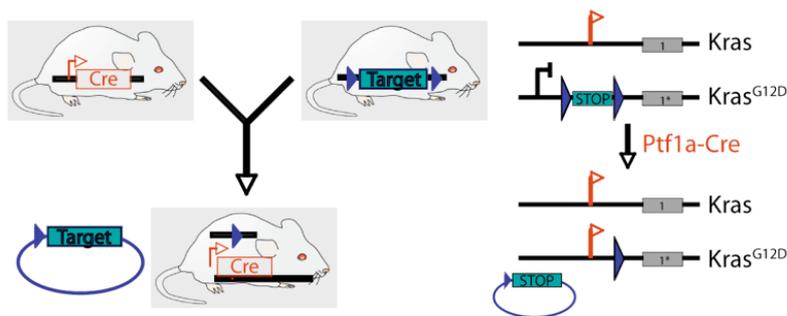


ABB. 3-3 CRE/LOX MODELL

Nach Mazur/Siveke (Mazur und Siveke 2012)

Cre/lox abhängige Aktivierung von Pankreas-spezifischen *Kras* durch Kreuzung von *Ptf1a-Cre* Mäusen mit *LSL-Kras*-Mäusen.

Dieses Modell zeigt PanIN-1- und PanIN-2-Läsionen sowie vereinzelte PanIN-3-Läsionen. Ein invasives Karzinom entwickelt sich langsam und zeigt sich erst nach etwa einem Jahr. Zusätzliche Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *p16/Ink4a*, *p19/Arf* bzw. *p53*, welche gehäuft auch im menschlichen PDAC gefunden wurden, führen zu einer schnelleren malignen Transformation und einer vermehrten Metastasierung. (Aguirre et al. 2003; Bardeesy et al. 2006a; Hingorani et al. 2005; Siveke und Schmid 2005)

Kras^{G12D};Ela-TGF α basierte Tumormodelle entstehen auf dem Boden von IPMN Vorläuferläsionen (Siveke et al. 2008). Während der Karzinogenese verlieren *Kras^{G12D}* Mäuse *p16/Ink4A* und *p53* und führen somit zu

einem Modell, welches die humanen PDAC-Eigenschaften gut widerspiegelt: maligne Transformation im Alter von 3 bis 6 Monaten, chromosomale Instabilität und vermehrte Metastasierung [Übersicht in (Hezel et al. 2006; Siveke und Schmid 2005)] .

Um die Aussagekraft eines solchen Modells zu verifizieren empfiehlt es sich, eine Therapiekontrolle mit einem klinisch etablierten Chemotherapeutikum durchzuführen. Dazu eignet sich z.B. Gemcitabin, das bei Menschen mit Pankreaskarzinom als Standardchemotherapeutikum eingesetzt wird. Es erzielt jedoch nur eine geringe Ansprechrates beim Menschen. Zeigen sich im Mausmodell deutlich höhere Ansprechrates, ist der Nutzen dieses Tumormodells für spätere klinische Studien im Menschen zweifelhaft.

3.4 BILDGEBENDE VERFAHREN

Bildgebende Verfahren ermöglichen eine nicht-invasive Tumorverlaufskontrolle und erlauben, je nach verwendeter Modalität, Aussagen bezüglich Lokalisation, Größe, Invasivität, Perfusion, sowie Gewebekomposition.

3.4.1 MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE

Bei der Magnetresonanztomographie, auch Kernspintomographie genannt, handelt es sich um ein Schnittbildverfahren. Die physikalische Grundlage dieser Methode basiert auf dem Prinzip der Kernspinresonanzspektroskopie.

Das Verfahren beruht auf der Anregung bestimmter Teilchen, meist Wasserstoffkerne (= Protonen), im Organismus durch ein starkes Magnetfeld und nutzt elektromagnetische Wechselwirkungen im Radiofrequenzbereich. Es werden also keine Röntgenstrahlen benötigt – im Gegensatz zu der Computertomographie. Die Magnetisierung und Entmagnetisierung („Relaxation“) der angeregten Teilchen sowie die Protonendichte sind ausschlaggebend für den Bildkontrast. (Weishaupt et al. 2006)

Eine charakteristische Eigenschaft von Wasserstoffatomen ist ihr Spin (= Eigendrehung des Protons). Wirkt eine äußere Kraft, z.B. ein äußeres Magnetfeld (B_0) ein, so verändert der Spin die Lage seiner Rotationsachse, auch bezeichnet als Präzessionsbewegung. Die charakteristische Frequenz dieser Bewegung wird Lamorfrequenz genannt. Diese ist exakt proportional zur Stärke des Magnetfelds B_0 und wird durch folgende Gleichung berechnet:

$$\omega_0 = \gamma_0 \cdot B_0$$

Dabei ist ω_0 die Lamorfrequenz (in MHz), γ_0 das gyromagnetische Verhältnis, das für jedes Element einen konstanten Wert besitzt und B_0 die Stärke des Magnetfelds (in Tesla = T). (Laubenberger und Laubenberger 1999) Durch das Magnetfeld B_0 des MR-Tomographen baut sich durch Addition der Magnetvektoren der

einzelnen Spins eine Längsmagnetisierung in Z-Richtung (M_z) auf. Anhand eines Hochfrequenzimpulses (HF-Impuls) kann beispielsweise eine Auslenkung um genau 90° erzielt werden. Dabei kippt die gesamte Magnetisierung in die XY-Ebene um und wird dann als M_{xy} bezeichnet. Die angeregten Teilchen bewegen sich nun also in XY-Ebene und senden als Resonanz messbare Schwingung (mit gleicher Frequenz wie der des eingestrahlten Hochfrequenzimpulses) aus.

Die rotierende Quermagnetisierung erzeugt das MR-Signal. Zwei unabhängige Vorgänge bewirken, dass es schnell wieder abfällt. Man unterscheidet hierbei zwischen:

- Wiederzunahme der Längsmagnetisierung (M_z): longitudinale Relaxation oder T1-Relaxation und
- Abnahme der Quermagnetisierung (M_{xy}) des ausgelenkten Gesamtvektors: transversale Relaxation oder T2-Relaxation.

In der Regel muss eine Schicht mehrmals nacheinander angeregt werden. Die Zeit zwischen zwei solchen Anregungen wird als Repetitionszeit (TR) bezeichnet. Je länger diese Zeit gewählt wird, desto länger haben Spins Zeit, in Z-Ebene zurückzukippen und bei einer erneuten Anregung viel Signal abzugeben. Wird die TR kurz gewählt, erzeugen Gewebe mit kurzem T1, die rasch relaxieren, ein hohes Signal. (Vogl et al. 2011; Weishaupt et al. 2006)

- Kurzes TR → starke T1-Gewichtung

Die Zeitspanne zwischen Anregung und Signal-Messung wird als Echozeit (TE) bezeichnet.

- Langes TE → starke T2-Gewichtung

Im Tomographen werden in X-, Y- und Z-Richtung Gradientenspulen betrieben. Diese Spulen sind jeweils paarweise angeordnet; die eine Spule erhöht das statische Magnetfeld, die gegenüberliegende Spule verringert es. Das Magnetfeld B_0 besitzt somit einen linearen Gradienten. Entsprechend ist in der gewählten Richtung die Kernspin-Präzession unterschiedlich, die Spins kreiseln hier mit unterschiedlich hoher Larmofrequenz. Das heißt, dass mit einer bestimmten Frequenz eine ganz bestimmte Schicht angeregt werden kann. Dank des Schichtwahlgradienten kann eine Schicht beliebig im Raum positioniert werden. Außerhalb dieser Schicht bleiben die Kernspins vom HF-Puls unbeeinflusst. (Weishaupt et al. 2006)

3.4.1.1 T₂-GEWICHTETE MRT AUFNAHMEN

Die T₂-Relaxationszeit beschreibt das Abklingen der Transversalmagnetisierung einzelner Gewebe nach Abschalten eines HF-Impulses. Für T₂-gewichtete MRT-Aufnahmen (T₂W-MRT) wählt man eine lange TE und eine lange TR. Gewebe mit kurzem T₂ haben einen raschen Signalverlust und stellen sich dadurch hypointens (dunkel) dar. Stationäre Flüssigkeiten haben ein langes T₂ und stellen sich im T₂-gewichteten MRT hyperintens (hell) dar.

Spinecho-(SE-)Sequenz

Die SE-Sequenz beginnt mit einem 90° HF-Impuls. Nach der Hälfte der gewünschten Echozeit wird ein 180°-Impuls eingeschaltet, der für die Erzeugung des Spinechos verantwortlich ist. Diese Sequenz geht mit einer langen Messdauer einher. Sie wird fast nur bei T1-gewichteten oder protonendichte-gewichteten Aufnahmen eingesetzt. (Weishaupt et al. 2006)

Turbo-Spinecho-(TSE-) Sequenz = Fast-Spinecho-Sequenz

Bei dieser Sequenz handelt es sich um eine modifizierte SE-Sequenz mit mehreren 180° Impulsen pro TR. Zwischen den einzelnen Impulsen wird der Phasengradient kurz eingeschaltet. Dies ermöglicht eine deutliche Reduzierung der Aufnahmezeit, was eine Verminderung von Bewegungs- bzw. Atemartefakten zur Folge hat. Diese Sequenz eignet sich vor allem für T2-Aufnahmen. (Weishaupt et al. 2006)

3.4.1.2 DYNAMISCHE KONTRASTVERSTÄRKTETE MRT

Kontrastmittel werden zur verbesserten Darstellung der Gewebekontraste verwendet. In der MRT kommen verschiedene Kontrastmittel zur Anwendung. Häufig wird im klinischen Bereich Gadolinium verwendet. Da Gadolinium selbst toxisch ist, wird es an ein Chelatmolekül gebunden. Gadoliniumkomplexe verkürzen aufgrund ihrer paramagnetischen Eigenschaft die Relaxationszeit, was zu einer Signalanhebung der umgebenden Strukturen in T1-Aufnahmen führt. Um es von fettreichen Strukturen zu unterscheiden, sollte eine fettsupprimierte T1-gewichtete Aufnahme erfolgen.

Es wird in der Regel in einer Dosis von 0,05 - 0,3 mmol/kg i.v. verabreicht. Nach Injektion verteilt es sich rasch intravasal, nach 3 bis 5 Minuten ist ein Konzentrationsausgleich zwischen Gefäß- und interstitiellem Raum erfolgt. (Kauffmann et al. 2006; Weishaupt et al. 2006)

3.4.1.3 DIFFUSIONSGEWICHTETE MRT

Die DWI beruht auf der Braun'schen Molekularbewegung der Wassermoleküle im Gewebe. Die Eigenbewegung der Wassermoleküle in flüssigen Lösungen wird durch die Faktoren „Temperatur“ und „Dichte“ der Lösung bestimmt. In biologischen Geweben wird die freie Wasserdiffusion durch (intakte) Zellmembranen und andere Makromoleküle begrenzt (Abb. 3-4). (Laun et al. 2011)

Die Signalstärke der diffusionsgewichteten Bilder hängt von der mittleren Distanz, die die Wassermoleküle pro Zeiteinheit zurücklegen, ab. Der Signalverlust ist desto größer, je weiter das Wassermolekül vom Ursprungsort wegdiffundiert.

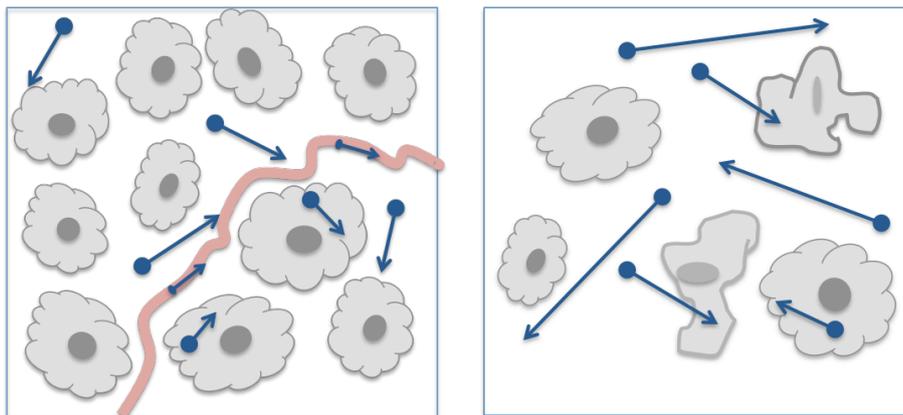


ABB. 3-4 DIFFUSION DER WASSERMOLEKÜLE

nach Koh und Collins (Koh und Collins 2007)

Links: eingeschränkte Diffusion: Wassermoleküle (\rightarrow) bewegen sich im Extra- wie auch im Intrazellularraum und in den Blutgefäßen. Freie Beweglichkeit ist aber durch die hohe Zellzahl und die intakte Zellmembran limitiert.

Rechts: freie Diffusion: geringe Zelldichte, deshalb erhöhtes extrazelluläres Volumen. Defekte Zellmembranen erlauben eine Diffusion der Moleküle zwischen Intra- und Extrazellularraum.

Diffusionsgewichtete Bilder werden meist mit einer Echoplanar-Sequenz aufgenommen. Es werden zwei Gradientenimpulse mit gleichem Vorzeichen geschaltet, dazwischen wird ein 180° -Radiofrequenz-Inversionsimpuls eingestrahlt.

Die Sensitivität der Diffusion (b-Wert) beschreibt den Signalverlust des MR-Signals. Er trägt die Einheit s/mm^2 . Durch Messung der Diffusion mit unterschiedlichen b-Werten bestimmt man die Diffusionskonstante, welche oft als *Apparent Diffusions Coefficient* (ADC) bezeichnet wird. Der T2-Effekt, der in den Diffusionssequenzen miterfasst wurde, wird auf diese Weise eliminiert. Der ADC-Wert wird mit der Einheit mm^2/s angegeben. Bilder, deren Graustufen den mittleren ADC-Wert der abgebildeten Voxel repräsentieren, werden als ADC-Maps bezeichnet.

Der ADC-Wert ermöglicht eine Aussage bezüglich der Zellularität in einer untersuchten Region (Sugahara et al. 1999). Ein Tumor ist meist zellreicher als sein Ursprungsgewebe. Durch die hohe Zelldichte und den Fibrosegehalt sind die Wassermoleküle in ihrer freien Beweglichkeit limitiert; folglich erhält man eine relativ hohe Signalintensität und demzufolge einen niedrigeren ADC-Wert als im gesunden Gewebe (Muraoka et al. 2008). Im Gegensatz dazu ist in Zysten die Diffusion kaum eingeschränkt. Daraus resultiert ein höherer ADC-Wert als in malignen Läsionen mit höherer Zellularität (Wang et al. 2011b).

Die Diffusionsbildgebung ist eine wichtige Technik zur Tumoridentifizierung, Tumorcharakterisierung und auch zur Beurteilung des Therapieansprechens (Fattahi et al. 2009; Galons et al. 1999; Koh und Collins 2007; Muraoka et al. 2008). Eine erfolgreiche Antitumor-Therapie führt zum Absterben der Tumorzellen (Apoptose oder Nekrose). Die Folgen sind Tumorlyse, Verlust der Zellmembranintegrität und Vergrößerung des

Extrazellularraums; demzufolge kommt es zu einem Anstieg der Wassermolekül-Bewegung mit Anstieg des ADC-Wertes (Galons et al. 1999; Morse et al. 2007).

3.4.1.4 DATENANALYSE

Eine Segmentierung T2-gewichteter Aufnahmen ermöglicht die Unterscheidung der unterschiedlichen Gewebe innerhalb des Tumors. Somit wird eine Differenzierung zwischen zystischen und soliden Tumoranteilen ermöglicht. Es existieren verschiedene Verfahren zur Segmentierung von Bildern. Häufig wird die Threshold-basierte-Segmentierung verwendet. Diese erfolgt durch manuelle oder automatisierte Bestimmung eines Schwellenwertes (Threshold). Dabei wird u.a. das Histogramm eines Bildes zur Bestimmung des Schwellenwertes verwendet. (Pham et al. 2000)

3.4.2 POSITRONENEMISSIONSTOMOGRAPHIE

Die PET ist ein nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren zur Darstellung biochemischer und physiologischer Funktionen.

Zu Beginn der PET-Untersuchung wird ein Radiopharmakon intravenös appliziert. Radiopharmaka sind Substanzen, die mit einem Radionuklid markiert sind, welches bei Zerfall ein Positron emittiert (β^+ -Strahlung). Trifft ein solches Positron im Körper auf sein Antiteilchen, ein Elektron, entstehen zwei hochenergetische Photonen (γ -Quanten) mit jeweils einer Energie von 511 keV (Vernichtungs- oder Annihilationsstrahlung). Aus energetischen Gründen werden die beiden γ -Quanten in einem Winkel von 180° , also in entgegengesetzter Richtung, ausgesendet (Abb. 3-5). (Ziegler 1999)

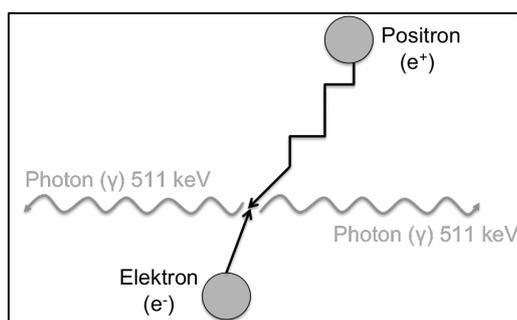


ABB. 3-5 VERNICHTUNGSTRAHL

Beim Aufeinandertreffen eines Positrons auf ein Elektron werden zwei Photonen frei, die in entgegengesetzte Richtungen ausgesendet werden.

Das am häufigsten verwendete Radionuklid ist das radioaktive Isotop von Fluor ^{18}F , weitere verwendete Nuklide sind ^{11}C , ^{13}N oder ^{15}O . Alle genannten radioaktiven Tracer müssen in einem Zyklotron hergestellt werden. Neben diesen gibt es aber auch Isotope (^{68}Ga , ^{82}Rb), die in sogenannten Nuklidgeneratoren hergestellt werden. Das Radioisotop entsteht hierbei durch Zerfall eines instabilen Mutterisotops, das sich in dem Generator anreichert.

Zur Detektion der emittierten Photonen werden heutzutage Vollring-PET-Systeme mit mehreren Detektor-Ringen verwendet. Die Kristalle der Detektoren bestehen z.B. aus Bismutgermanat ($\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$) oder Natriumiodid (NaI). Die Messung der emittierten Vernichtungsstrahlung erfolgt nach dem Koinzidenzverfahren. Hierbei werden nur γ -Strahlen registriert, die zum gleichen Zeitpunkt von zwei gegenüberliegenden Detektoren erfasst werden. Dabei entsteht in den Kristallen ein Szintillationslicht, welches auf Photomultiplier übertragen und dort in elektrische Impulse umgewandelt wird. Mittels mathematischer Berechnung kann der exakte Ort der Photonenentstehung ermittelt und dreidimensional dargestellt werden. Anhand der Anzahl der empfangenen Strahlensignale kann zusätzlich die Höhe der Stoffwechselaktivität bemessen werden. (Moser 2006; Ziegler 1999)

Zusätzlich wird anhand der sogenannten Transmissionsmessung die Photonenabschwächung ermittelt. Dies wird mit einer 511 keV-Photonen emittierenden Radioaktivitätsquelle (meistens $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$) durchgeführt (Herzog und Hichwa 1999). Die so gewonnenen Werte werden mit einer Leermessung (d.h. eine Transmissionsmessung ohne Patient) verrechnet. Daraus ergibt sich dann der Schwächungsfaktor, der eine Reduktion der Bildverzerrung und somit eine bessere regionale Quantifizierung der Tracerverteilung ermöglicht.

TABELLE 2 VERSCHIEDENE RADIOPHARMAKA UND IHR NUKLID

Nuklid	Radiopharmakon
^{11}C	[^{11}C]-Cholin
	[^{11}C]-S-Methyl-L-Methionin
^{18}F	[^{18}F]-Fluor-2-Desoxy-Glucose
	[^{18}F]-Fluoruracil
	[^{18}F]-Cholin
	[^{18}F]-3'-deoxy-3'-Fluorothymidin
^{68}Ga	DOTATOC
^{82}Rb	[^{82}Rb]-Chlorid

3.4.2.1 ^{18}F -FDG

Die breiteste Anwendung findet derzeit ^{18}F markierte Glukose (^{18}F -Fluor-2-Desoxy-Glucose = ^{18}F -FDG), zum einen aufgrund der relativ langen HWZ des ^{18}F von 110 min, zum anderen aufgrund des Umstandes, dass Glukose fast jeder Körperzelle als Energielieferant dient und somit in beinahe allen Geweben den regionalen Energiebedarf widerspiegeln kann. ^{18}F -FDG wird wie Glukose über die zellulären Glukose-Transporter in die Zelle aufgenommen, zu Fluorodeoxyglukose-6-Phosphat phosphoryliert, dann aber nicht weiter metabolisiert. In Tumoren besteht ein erhöhter Glukosebedarf und ein gesteigerter Einbau von Glukosetransportern in die Zellmembran. Als Malignitätsnachweis gilt eine lokal gesteigerte Traceranreicherung. Jedoch findet sich dieser auch bei Heilungsprozessen und entzündlichen Veränderungen (Strauss 1996).

Eine semiquantitative Bestimmung der Anreicherung erfolgt mittels dem sogenannten *standard uptake value* (SUV) unter Berücksichtigung der lokal gemessenen Radioaktivitätskonzentration, der injizierten Dosis und dem Körpergewicht. Ein SUV von 1,0 würde eine Gleichverteilung des Radiopharmakons bedeuten.

Maligne Pankreasprozesse können mittels ^{18}F -FDG-PET detektiert werden. Die Sensitivität beträgt in den meisten Studien über 80 % und die Spezifität liegt meist über 70 % (Keogan et al. 1998; Mertz et al. 2000). Es zeigt sich ein deutlich höherer ^{18}F -FDG-Uptake in malignen Tumoren, aber auch benigne PanIN-Läsionen zeigen bereits einen erhöhten Uptake (Fendrich et al. 2011). Bei der Berechnung des SUV zeigen sich höhere Werte für maligne (SUV = 5,1) als für benigne Prozesse (SUV = 2,1) (Keogan et al. 1998).

3.4.2.2 ^{18}F -FLT

Das Thymidinanalogon 3'-deoxy-3'- ^{18}F -Fluorothymidin (^{18}F -FLT) dient insbesondere dem Nachweis hochproliferativen Zellen (Buck et al. 2003; Wagner et al. 2003). ^{18}F -FLT wird durch die Thymidinkinase 1 (TK1) phosphoryliert und dadurch in der Zelle gehalten. Die TK1 Aktivität ist während der späten G1- und S-Phase des Zellzykluses proliferativer Zellen maximal. (Munch-Petersen et al. 1995) Dadurch wird ^{18}F -FLT vermehrt phosphoryliert und akkumuliert in malignen Zellen. Physiologisch reichert sich ^{18}F -FLT in der Leber, dem Knochenmark und dem Harntrakt an, hingegen nicht in Gehirn, Myokard oder in der Skelettmuskulatur, wie dies bei ^{18}F -FDG der Fall ist. *Herrmann et al.* konnten zeigen, dass ^{18}F -FLT sich in malignen Pankreasläsionen des Menschen anreichert und eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen Läsionen möglich ist (Spezifität 100 %, Sensitivität 81 %) (Herrmann et al. 2008). Eine andere Studie zeigte einen signifikanten ^{18}F -FLT-Uptake in allen Tumoren eines Xenograft-Mausmodells des PDACs. Der ^{18}F -FDG-Uptake der Tumoren war in dieser Studie gering und nicht in allen Tieren nachweisbar. (von Forstner et al. 2008)

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 TIERE

Alle tierexperimentellen Versuche wurden durch die lokale Ethikkommission bewilligt.

4.1.1 TIERART

Die C57 Black Six N Wildtyp-Mäuse wurden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Für die Versuche der endogenen Tiermodelle wurden zusätzlich 129/SV Mäuse verwendet.

4.1.2 TIERHALTUNG

Die Haltung der Tiere erfolgte in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Maxi-Meiser-System, Thoren-Caging-System oder Tecniplast-IVC). 4 bis 6 Mäuse wurden dabei in einem Käfig (Grundfläche 16 x 37 cm) und bis zu 10 Mäuse in einem Käfig (Grundfläche 27 x 42 cm) auf entkeimtem Weichholzgranulat gehalten. Dieses spezielle Holzgranulat dient als Einstreu bei halbwöchentlichem bis zweiwöchigem Wechsel. Nestbaumaterial wurde als autoklavierter Zellstoff zur Verfügung gestellt.

Ernährt wurden die Mäuse mit Alleinfutter-Pellets (autoklaviertes Mäusefutter, Fa. Altromin Spezialfutter GmbH & Co.KG, Lage) und Leitungswasser (autoklaviertes Trinkwasser mit zweimaligem Flaschenwechsel pro Woche) aus Nippeltränken ad libitum.

Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert mit personenlimitierter Zutrittskontrolle, einer Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je zwölf Stunden, einschließlich Dämmerungsphase. Die Raumtemperatur der Tierhaltungsräume betrug 20 bis 25 °C und die Luftfeuchtigkeit 60 bis 70 %.

Das Hygienemanagement erfolgt gemäß den Empfehlungen der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) und basiert auf der regelmäßigen Untersuchung von Sentineltieren.

Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

Alle Tiere erhielten Ohrmarkierungen um die Identifizierung der Tiere sicherzustellen, hierfür wurden die Tiere in Narkose gelegt und es wurden kleine Löcher in die Ohrmuscheln gestanzt.

4.2 ANÄSTHESIE

Zur Anästhesie waren zwei Verfahren im Gebrauch:

- 1.) Eine intramuskuläre Injektion einer vollständig antagonistischen Kombination aus Midazolam (7,14 mg/kg), Medetomidin (0,714 mg/kg) und Fentanyl (0,07 mg/kg). Zur Antagonisierung wurde verwendet: Atipamezol (3,57 mg/kg), Flumazenil (0,714 mg/kg) und Naloxon (DeltaSelect GmbH, München) (1,7 mg/kg).
- 2.) Kontinuierliche Inhalationsanästhesie mit Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethylidifluoromethylether; Forene®, Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden). Die Narkose wurde über ein veterinäres Anästhesie-System (Vetland Medical Sales and Services, Louisville, KY, USA) mit 5 % Isofluran eingeleitet und mit 2 % Isofluran aufrechterhalten.

Die Augen wurden mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) geschützt. Während der Narkose wurde die Temperatur der Mäuse überwacht. Um eine Auskühlung während der Narkose zu vermeiden, wurden die Mäuse auf eine spezielle Wärmematte platziert, welche mit einem temperaturregulierenden Wassertopf verbunden ist (*Circulating Thermostat*, Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen) bzw. vier Untersuchungshandschuhe mit warmem Wasser gefüllt und neben die Maus platziert. Zusätzlich wurde die Maus mit einer Krankenunterlage² abgedeckt.

4.3 TUMORMODELLE

4.3.1 ENDOGENES TUMORMODELL

Es wurden vier verschiedene genetisch manipulierte endogene Mausmodelle verwendet.

Bei allen Modellen handelt es sich um *Cre/lox*-basierte Mausmodelle, mit pankreasspezifischer Aktivierung des endogenen Onkogens *Kras*^{G12D}. Durch Entfernung einer geflochtenen Stop-Kassette wird das *Kras*^{G12D} Knock-in-Allel aktiviert (sogenannte lox-Stop-lox (*LSL*) Methode). Die *LSL-Kras*^{G12D} Mäuse wurden mit *p48*^{+/*Cre*} Mäusen rekombiniert (*p48* ist auch bekannt als *Ptf1a*). Diese *p48*^{+/*Cre*} Mäuse funktionieren in ähnlicher Weise wie *p48/Ptf1a-Cre* Mäuse (Kawaguchi et al. 2002). In diesen *p48*^{+/*Cre*} Mäusen steht die *Cre*-Rekombinase unter einem pankreasspezifischen Promotor. Durch die Kreuzung entsteht ein Mausmodell, welches das Onkogen *Kras*^{G12D} nur im Pankreas exprimiert. *p48*^{+/*Cre*};*Kras*^{+/*LSL-G12D*} wird fortan als *Kras*^{G12D} bezeichnet. Um den konkomitierenden Effekt der Expression von *Kras*^{G12D} und *TGFα* zu beurteilen, wurden *Kras*^{G12D} Mäuse mit *Ela-TGFα* Mäusen gekreuzt.

Daraus resultieren die in dieser Arbeit verwendeten Tumormausmodelle:

² Dabei handelt es sich um einen Einmalartikel, bestehend aus mehreren Lagen Zellstoff und einer mit einer vollflächigen wasserundurchlässigen Folie beschichteten Rückseite.

CKT Tumormodell. $p48^{+/Cre}$ Mäuse wurden mit $Kras^{+/LSL-G12D};TGF\alpha$ Mäusen gekreuzt. Daraus resultiert eine $p48^{+/Cre};Kras^{+/LSL-G12D};Ela-TGF\alpha$ Maus. Dieser Genotyp wird fortlaufend als CKT bezeichnet.

CKP Tumormodell. $p48^{+/Cre}$ Mäuse wurden mit $Kras^{+/LSL-G12D};p53^{+/fl}$ Mäusen gekreuzt. Dabei entsteht eine $p48^{+/Cre};Kras^{+/LSL-G12D};p53^{+/fl}$ Maus. Dieser Genotyp wird fortwährend als CKP bezeichnet.

CKTP R172H Tumormodell. $p48^{+/Cre}$ Mäuse wurden mit $Kras^{+/LSL-G12D};TGF\alpha;p53R172H/+$ Mäusen gekreuzt. Daraus resultiert eine $p48^{+/Cre};Kras^{+/LSL-G12D};TGF\alpha;p53R172H/+$ Maus. Dieser Genotyp wird fortwährend als CKTP R172H bezeichnet.

CKTP fl+/- Tumormodell. $p48^{+/Cre}$ Mäuse wurden mit $Kras^{+/LSL-G12D};TGF\alpha;p53^{+/-}$ Mäusen gekreuzt. Daraus resultiert ein $p48^{+/Cre};Kras^{+/LSL-G12D};TGF\alpha;p53^{+/-}$ Genotyp. Dieser Genotyp wird fortlaufend als CKTP fl+/- bezeichnet.

4.3.2 SUBKUTANES TUMORMODELL

4.3.2.1 TUMORZELLINIEN

Es wurde eine murine Zelllinie aus Pankreastumoren des endogenen Mausmodells generiert. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Dr. J. Siveke (2. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie T510481 wurde aus einer $p48^{+/Cre};Kras^{+/LSL-G12D};Ela-TGF\alpha$ (CKT) Maus gewonnen.

4.3.2.1.1 ZELLKULTIVIERUNG UND -PASSAGIERUNG

Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (HERAcell®, Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 5 % CO₂ angereicherter und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einer Temperatur von 37°C. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (HERAsafe KS 18, Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Regelmäßig wurden die Zelllinien auf Mykoplasmen mittels PCR-Analysen überprüft.

Für die Generierung der einzelnen primären pankreatischen Tumorzelllinien wurden drei 3 mm³ Fragmente aus verschiedenen Tumor-Regionen mit einem Skalpell zerkleinert und dreimalig in je 10 ml Digestionspuffer für je 20 Minuten bei 37 °C Wasserbad verdaut. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das verdaute

Gewebe bei 1200 rpm (*revolutions per minute*; „Umdrehungen pro Minute“) für je 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die noch bestehenden Zellverbände mittels eines 100 µm Siebs herausfiltriert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Digestionspuffer und unter Zugabe von Trypsin-Inhibitor gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspension in *DMEM* (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin) und 1 % Penicillin/Streptomycin (die Stammlösung enthält 5000 Units Penicillin G/ml und 5000 µg Streptomycin/ml in 0,85 % NaCl [Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika]). Anschließend wurden die Zellen in eine Gewebe-Kulturschale transferiert. Nach 3 bis 10 Passagen wurden die Zellen expandiert. Das Medium wurde abgesaugt, mit einer phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline* = PBS) gewaschen, mit 0,05 % Trypsin-EDTA (GIBCO, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) trypsiniert und in PBS zu der gewünschten Konzentration resuspendiert und anschließend in die Tiere transplantiert.

4.3.2.2 IMPLANTATION

Zur Generierung des subkutanen PDAC-Modells wurden 20 - 25 g schwere (10 - 16 Wochen alte) männliche Wildtyp C57/Black6-Mäuse verwendet (gekauft bei Charles River Laboratories oder geboren in unserem Labor). Die Implantation der Tumorzellen erfolgte in speziellen, aseptischen Operationsbereichen. Die Narkose erfolgte mittels Isofluran. Zur Einleitung wurde die Maus in eine Box mit 5 % Isofluran und 2 l O₂/min gelegt. Anschließend wurde die Maus auf eine Wärmematte platziert und die Narkose mittels Nasenkammer mit 2 % Isofluran und 1 l O₂/min aufrechterhalten. Die Augen wurden mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) geschützt.

Es wurden 2 - 5x10⁵ T510481 Tumorzellen der 13. Passage in 100 µl PBS mit einer Hamiltonspritze (705 CT 50 µl 22S, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) und 30G-Kanüle (Sterican®, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke) subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. Zur späteren Identifizierung der Tiere wurden den Mäusen in der selben Sitzung Ohrlöcher gestanzt. Anschließend wurde das jeweilige Tier von der Nasenkammer entfernt.

Zusätzlich wurde eine präemptive Analgesie mit dem Opioid Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München) (0,05 mg/kg s.c.) und dem nicht-steroidalen Analgetikum Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) (4 mg/kg s.c.) gegeben.

Die analgetische Therapie wurde am Folgetag wiederholt und bei Anzeichen von Schmerzen so lange wiederholt bis sich die Tiere schmerzfrei zeigten.

Mit der multiparametrischen Untersuchung wurde etwa 2 bis 4 Wochen nach Implantation begonnen. Die Tiere wurden dann etwa wöchentlich im MRT und etwa zweiwöchentlich im PET untersucht. Der Abstand zwischen den beiden Untersuchungen betrug maximal 2 Tage.

4.4 BILDGEBUNG

4.4.1 MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE

Die erste MRT-Untersuchung erfolgte in Abhängigkeit von der vermuteten Tumorentstehung. Bei fehlendem Tumornachweis wurde die Maus nach 4 Wochen erneut untersucht. Bei Tumornachweis wurden ein- bis zweiwöchentliche MRT-Untersuchungen durchgeführt.

Sämtliche MRT-Untersuchungen wurden in einem klinischen 1,5T Scanner (1,5T Achieva, Philips Medical Systems, Best, Niederlande) durchgeführt. Um eine höhere Auflösung der Mausanatomie zu erzielen, wurde zusätzlich eine 47 mm MR-Oberflächenspule verwendet. Die Maus wurde in Prone-Position in den MR-Scanner gelegt.

Zur Lageorientierung und zur weiteren Planung der folgenden Sequenzen wurde zunächst ein *Survey Scan* durchgeführt (TE so kurz wie möglich; TR so kurz wie möglich; α -Winkel 20°; Schichtdicke 3 mm).

Ebenfalls wurde eine T1-gewichtete schnelle Gradientenecho-Sequenz durchgeführt (TE = 4,6 ms; TR = 41 ms; α -Winkel = 30°; Schichtdicke = 0,7 mm; Bildausschnitt (Field-of-view = FOV) = 0,3 x 0,2 mm² mindestens 35 Schichten; zusätzliche Fett-Suppression mittels SPIR).

Mit Hilfe einer multi-slice T2-gewichteten TSE-Sequenz (TE = 90 ms; TR > 3 s; α -Winkel = 90°; Schichtdicke = 0,7 mm; FOV = 0,3 x 0,2 mm²; mindestens 35 Schichten) wurden anatomische Informationen bezüglich der Tumorlokalisation und -größe gewonnen.

Anhand der aus der T2-gewichteten Aufnahme gewonnenen anatomischen Informationen wurde die Diffusionsbildgebung (DWI-MRT) geplant. Die DWI-MRT bedient sich einer Spin-Echo-Sequenz mit drei b-Faktoren (b20, b200, b600). Die Aufnahmen wurden mit Fettsuppression SPIR durchgeführt (TE = 59 ms; TR = 3000 ms; TSE-Faktor = 43; α -Winkel = 90°; Schichtdicke = 1,5 mm; FOV = 0,38 x 0,71 mm²).

4.4.1.1 MRT-AUSWERTUNG

AUSWERTUNG T₂-MRT

Die Auswertungen der MRT-Aufnahmen erfolgte mittels OsiriX DICOM³ Viewer (Open Source Programm unter <http://www.osirix-viewer.com>) beziehungsweise mittels ImageJ 64-Bit Version (Open Source Programm unter <http://rsb.info.nih.gov>) und ein im Haus geschriebenes Segmentierungs-Tool.

³ DICOM = *Digital Imaging and Communications in Medicine*: ist ein Standard im medizinischen Bilddatenmanagement

Zur genaueren Bestimmung des Tumolvolumens und zum Zweck der Unterscheidung zwischen soliden und nicht-soliden Tumoranteilen wurde intern ein Plug-in zur Threshold-basierten Segmentierung für ImageJ entwickelt. DICOM-Dateien wurden aus dem PACS (*Picture Archiving and Communication System* = Bildarchivierungs- und Kommunikationssystem) auf eine Workstation übertragen und dann in ImageJ geladen.

Die Bilder werden zunächst in RGB (RGB steht für Rot, Grün, Blau – diese werden bei diesem Farbmodell additiv gemischt, d.h. eine helle Farbe entsteht durch das Mischen mehrerer Farben miteinander) konvertiert. Dichteinhomogenitäten, auch zwischen verschiedenen Akquisitionen des gleichen Objekts, werden zunächst mit einer Histogramm-Equalisierung korrigiert, anschließend folgt eine Grauwert-Skalierung (Bereich: 0 – 10000). Zur Bestimmung des Thresholds, also dem Schwellenwert welcher den soliden Tumoranteil von dem zystischen Anteil trennen soll, wurde zunächst der solide Tumoranteil visuell identifiziert. Anschließend wurden 3D-ROIs in mehrere homogene, nicht-zystische *TGF α* -Tumoren gelegt. Anhand der Histogramme konnten die höchsten Pixelwerte ermittelt werden und anhand der ermittelten Werte konnte ein fixer Threshold auf einen Grauwert von 9000 festgelegt werden. Dieser Threshold wurde fortan für die Segmentierung aller Tumoren angewendet. Alle Tumoranteile, deren Pixelwerte oberhalb des Schwellenwertes liegen, werden als nicht-karzinomatös (wie z.B. Nekrosen oder Zysten, die im T2-MRT-Bild hyperintens imponieren) gewertet und alle Anteile der Pixelwerte, die unterhalb liegen, werden als solides Tumorgewebe gewertet.

Der Tumor wird visuell in den T2-gewichteten MRT-Aufnahmen identifiziert. 2D-ROIs werden in jeder Schicht, in welcher der Tumor identifizierbar ist, manuell gezeichnet. Das Tool errechnet aus den einzelnen ROIs und der Angabe der Pixelgröße das Gesamtvolumen des Tumors. Die Segmentierung erfolgt automatisch anhand des im Vorfeld eingestellten Thresholds. (Abb. 4-1)

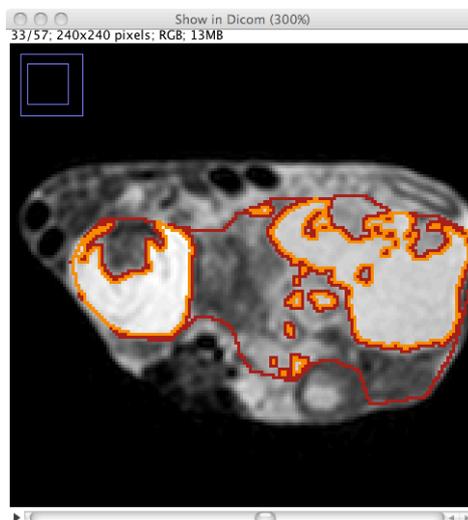


ABB. 4-1 SEGMENTIERUNG IN IMAGEJ

Manuell gezeichnete region-of-interest (ROI), welche den kompletten Tumor beinhaltet. Mittels Segmentierung erfolgt die Differenzierung zwischen den beiden Tumoranteilen. **Rot** = solider Tumoranteil, **orange** = nicht-solider Tumoranteil (durch histologische Korrelationen als Zysten identifiziert).

Die ermittelten Tumervolumina der einzelnen Mäuse wurden über die Zeit erfasst.

AUSWERTUNG DWI

Die Auswertungen wurden alle mit OsirX DICOM Viewer (Open Source Programm unter <http://www.osirix-viewer.com>) durchgeführt.

Zur Generierung von ADC-Maps wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$ADC = \ln(S_2/S_0)/(b_0/b_2)$$

mit $S_0 = S(b_0)$ und $S_2 = S(b_2)$

mit $S(b_2) = 600 \text{ s/mm}^2$ und $S(b_0) = 20 \text{ s/mm}^2$

Ein b-Faktor von 20 s/mm^2 (= b20) ist dabei eine eher schwache Diffusionsgewichtung, ein b-Faktor von 600 s/mm^2 (= b600) eine starke Diffusionsgewichtung.

Das Tumorareal wurde visuell erfasst und durch Korrelation mit dem passenden T2-gewichteten Bild sowie gelegentlich mittels histologischer Korrelation bestätigt. Aufnahmen mit starken Distorsionsartefakten wurden nicht in die Auswertung aufgenommen. In den b20- und b600-Bildern wurden in das Tumorareal 2D-ROIs manuell gezeichnet.

4.4.2 POSITRONENEMISSIONSTOMOGRAPHIE

Sobald in der MRT-Aufnahme ein Tumor nachweisbar war, erhielten einige Mäuse ebenfalls eine PET-Untersuchung. Der Abstand zwischen den PET- und MRT-Untersuchungen betrug maximal 2 Tage. Vor Durchführungsbeginn hatten die Mäuse 4 Stunden gefastet. Die Mäuse wurden mittels inhalativem Isofluran anästhesiert. Anschließend wurde ihnen ein Katheter in die Schwanzvene gelegt. 5 bis 10 MBq ^{18}F -FDG beziehungsweise ^{18}F -FLT wurden über diesen Katheter injiziert. Während einer 15-minütigen (bei ^{18}F -FLT) bzw. 45-minütigen (bei ^{18}F -FDG) dauernden Anreicherungsphase wurde die Maus aus der Isofluran-Narkose aufgeweckt und sie konnte sich innerhalb ihres Käfigs frei bewegen. Zur Versuchsdurchführung wurde die Maus erneut mit einer Isofluran-Inhalations-Narkose anästhesiert. Zur Durchführung der PET-Experimente wurde ein Kleintier PET-Scanner (INVEON dPET, Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA) verwendet. Das Tier wurde in die Mitte des FOV platziert und es wurden statische Aufnahmen über einen Zeitraum von 15 Minuten gewonnen.

Es wurden keine Korrekturen für Streuung oder Schwächung vorgenommen.

4.4.2.1 PET-AUSWERTUNG

Die Analyse der gewonnenen Bilddaten erfolgte mittels INVEON Research Workplace (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA). Physiologische Traceranreicherungen wurden bei der Datenauswertung berücksichtigt. ^{18}F -FDG reichert sich physiologisch in Gehirn, Herz, Darm, Harntrakt inklusive Blase, braunem Fettgewebe sowie der Leber an. ^{18}F -FLT reichert sich physiologisch im Knochenmark, in der Gallenblase, dem Harntrakt inklusive Blase sowie der Leber an. Durch Fusionierung mit einem anatomischen T2-gewichteten MRT-Scan konnte die genaue Platzierung einer manuell gezeichneten dreidimensionalen ROI des soliden Tumors ermöglicht werden. Zusätzlich wurde eine zweidimensionale Referenz-ROI in die Spinalmuskulatur gezeichnet.

Durch einen automatisierten Threshold-Prozess werden in der manuell gezeichneten ROI die 50 % der Pixelwerte identifiziert, welche die höchsten Signalintensität besitzen (sog.: Isocontour 50). Daraus werden die Mean-Werte berechnet. Die daraus resultierenden Mean-Werte der ROIS wurden in SUV-Werte umgewandelt. Dabei wurden Kalibrierungsfaktoren, das Gewicht der Maus sowie die injizierte Dosis berücksichtigt.

Dabei gilt folgende Formel:

$$\text{SUV-Wert} = \frac{\text{Mean-Wert} \times 220527000}{203961000} \times \text{Gewicht (in g)} \div \text{injizierte Dosis} \times 37000000$$

Anschließend wurde die Tumor-zu-Muskel Ratio (T/M-Ratio) aus dem SUV-Wert berechnet.

Dabei gilt:

$$\text{T/M-Ratio} = \frac{\text{SUV (Tumor)}}{\text{SUV (Spinalmuskel)}}$$

4.5 ANATOMISCH-HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG

4.5.1 PRÄPARATION UND FIXIERUNG DER GEWEBEPROBEN

Die für die histologische Aufarbeitung bestimmten Proben wurden in 4%-iger Paraformaldehyd (Paraformaldehyd = PFA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) fixiert.

Alle histologischen Schnitte wurden mit den T2-gewichteten Aufnahmen korreliert.

4.5.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG

Direkt nach der Tötung wurden alle inneren Organe entnommen und für 24 bis 48 Stunden in 4% PFA/PBS Lösung bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Dehydratation unter Standardbedingungen und eine Einbettung in Paraffin. Serielle Schnitte wurden alle 500 µm angefertigt, rehydriert und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die HE-Färbung an Paraffinschnitten zur histologischen Beurteilung wurde nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt:

1. Xylol 2 Min. - zweimal
2. 100 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1 Min.
3. 96 % Ethanol 1 Min.
4. 70 % Ethanol 1 Min.
5. entsalztes Wasser 30 s
6. Mayer's Hämatoxylin 7,5 Min.
7. Waschen mit Leitungswasser 10 Min.
8. 0,33 % Alkoholische Eosinlösung (Stammlösung 1,7 % 1:5 mit 96 % Ethanol) 5 Min.
9. 96 % Ethanol 25 s
10. Isopropanol 25 s
11. Xylol 1,5 Min.

Die histologischen Präparate wurden mit den T2-MRT-Aufnahmen korreliert, um die Präzision der MRT-Aufnahmen zu überprüfen und die exakte Tumorlokalisierung für weitere histologische Analysen zu bestimmen.

4.5.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

Für die immunhistochemische Färbung wurde das Gewebe direkt nach der Euthanasie in 4 % PFA/PBS-Lösung für 24 bis 48 Stunden bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe unter Standardbedingungen entwässert und in Paraffin eingebettet.

Serielle Schnitte mit einer Dicke von 3 µm wurden alle 500 µm gewonnen und weiteren histologischen Analysen zugeführt.

4.5.3.1 5-BROM-2-DESOXYURIDIN-FÄRBUNG

Für die Proliferationsanalyse wurde eine immunhistochemische Färbung mit 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) durchgeführt. Hierfür wurden Antikörper (Spezies: Ratte) mit einer Verdünnung von 1:250 verwendet (Serotec, Oxford, Großbritannien). Es wurden den Mäusen 100 mg/kg BrdU (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) 2 Stunden vor der Euthanasie i.p. injiziert.

Serielle Schnitte wurden alle 500 µm angefertigt, drei Paraffinschnitte pro Maus wurden mit anti-BrdU-Antikörper gefärbt. BrdU-positive Zellkerne konnten durch den inkorporierten roten Farbstoff detektiert werden.

4.5.3.2 CYTOKERATIN 19-FÄRBUNG

Es wurde eine immunhistochemische Färbung mit Cytokeratin 19 (CK19) durchgeführt. Dafür wurden CK19-Antikörper der Spezies Ratte verwendet. Die Verdünnung betrug 1:200. (DSHB, Iowa, USA).

4.5.4 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

Die histologischen Schnitte wurden mit dem Axio Imager.A2 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) betrachtet. Mittels AxioVision Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) konnten über die Mikroskopkamera Bilder der mikroskopischen Schnitte gewonnen werden.

Die Bearbeitung und Zusammenfügung der Bilder erfolgte mit Photoshop Elements 9 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA).

Die Beurteilung der histologischen Schnitte wurde freundlicherweise unterstützt durch Herrn PD Dr. J. Siveke; er analysierte die Zelldichte der histologischen Schnitte und teilte diese prozentual ein (in Zehnerschritten). Diese wurde bei der Korrelation der ADC-Werte mit der histologischen Zelldichte verwendet.

4.6 CHEMOTHERAPEUTIKUM

Die Therapieversuche wurden mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin (Gemcitabinhydrochlorid, Gemzar®, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg) 120 mg/kg in 500 µl 0,9 % NaCl zweimal wöchentlich i.p. durchgeführt.

Für die Therapiestudie wurden nur Mäuse eingeschlossen, die in der MRT-Untersuchung eine Tumorgroße von mindestens 5 mm² zeigten.

Die Kontrollgruppe erhielt Injektionen mit 0,9 % NaCl.

4.7 SOFTWARE

Die in dieser Arbeit selbst erstellten Graphiken und Tabellen wurden in Microsoft Excel 2008 für Mac (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Microsoft Power Point 2008 für Mac (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), sowie Prism 5.0a für Mac OS X (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt.

4.8 STATISTISCHE BERECHNUNG

Zur statistischen Auswertung wurde Prism 5.0a für Mac OS X (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet.

Zur Überprüfung der Signifikanz zweier verbundener Merkmale wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Bei diesem Test ist der Median-Wert entscheidend und nicht die Verteilung der Merkmale. Im zweiseitigen Test gilt ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$. Ein P-Wert (p) $< 0,05$ wird somit als statistisch signifikant angesehen.

Zur Überprüfung der Signifikanz bei mehr als zwei Merkmalen wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Auch hier gilt ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$. Ein P-Wert (p) $< 0,05$ gilt somit als statistisch signifikant.

Um den Zusammenhang zweier Zufallsvariablen zu bestimmen wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Güte der Regression wurde durch Berechnung des Bestimmtheitsmaßes r^2 bestimmt. Ein $r^2 = 0$ bedeutet keinen Zusammenhang, je näher r^2 an 1 liegt, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen besteht. Zusätzlich wurde ein t-Test durchgeführt und ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Maier.

Zum Vergleich mehrerer Merkmale wurden jeweils der Mittelwert (Mean) und die Standardabweichung (SD) berechnet und zum Teil graphisch dargestellt.

4.9 DISCLOSURE

Diese Arbeit wurde in der Studiengruppe um Herrn PD Dr. R. Braren durchgeführt. Aufgrund des großen Umfanges an untersuchten Tieren wurden im weiteren Verlauf durch Frau Dr. I. Heid und Frau Dr. M. Trajkovic-Arsic ebenfalls MRT-Daten akquiriert und ausgewertet. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden jedoch nur von der Verfasserin persönlich ausgewertet.

Des Weiteren wurden die histologischen Präparate auch durch Frau Dr. I. Heid angefertigt. Die Auswertung der histologischen Präparate wurde durch Herrn PD Dr. J. Siveke unterstützt.

Die tierärztliche Betreuung u.a. zur Sedierung, Analgesie und Euthanisierung der Tiere wurde durch Frau Dr. Y. Kosanke unterstützt.

5 ERGEBNISSE

5.1 MRT UND HISTOLOGISCHE KORRELATION

Zur Erzielung einer möglichst hohen Ortsauflösung der MRT Aufnahmen wurde eine spezielle Konstruktion für die Platzierung der Spule und der Maus entwickelt. Um Artefakte durch Bewegungen zu vermeiden wurde die Konstruktion auf eine schaumstoffhaltige Matte gesetzt. Die Konstruktion bestehend aus einer kleinen Box und der Spule sowie der Wärmematte bzw. einem Stück Karton auf der Spule (damit die Maus während der Untersuchung nicht in die Spule durchhängt, sondern gerade liegt und die spätere Fusion mit den PET-Aufnahmen erleichtert wird). Diese Konstruktion wurde dann mit Tapeband an der Patientenliege fixiert. Die Maus wurde mittig und gerade auf der Spule platziert und am Schwanz ebenfalls mit einem kleinen Stück Tapeband fixiert.

Da insbesondere die inhomogenen Tumore des endogenen PDACs die Volumenauswertung im T2-Bild erschwerten wurde in einem zweiten Durchgang alle T2-MRT Volumina erneut in ImageJ gezeichnet und mit einem zuvor im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Segmentierungstool (siehe Material und Methoden) segmentiert um eine Unterscheidung von zystischen und soliden Tumoren zu ermöglichen und eine genauere Analyse des Tumorverlaufs zu ermöglichen.⁴

5.1.1 SUBKUTANES TUMORMODELL

Es wurden 10 Tiere untersucht. Es wurden jeweils in die linke und in die rechte Flanke Tumorzellen subkutan implantiert. Bei 4 Tieren wurden in die rechte Flanke 2×10^5 Tumorzellen ($n = 4$) und in die linke Flanke 5×10^5 Tumorzellen ($n = 4$) implantiert. Bei 6 Tieren wurden in beide Flanken 3×10^5 Tumorzellen implantiert, in dieser Kohorte musste ein Tier ausgeschlossen werden, da keine Endpunktmessung durchgeführt wurde, somit konnten in dieser Gruppe 5 Tiere und 10 Tumoren longitudinal beurteilt werden ($n = 10$).

Alle 10 Tiere entwickelten jeweils an der linken und an der rechten Flanke einen Tumor. Die aus dem subkutanen Tiermodell hervorgegangenen Tumoren konnten alle mittels T2-gewichteter MRT leicht identifiziert werden.

⁴ Die Daten der ersten Volumenauswertung in OsirX werden in dieser Arbeit nicht dargestellt. Die Volumenangaben in dieser Dissertation beziehen sich nur auf die Daten der in ImageJ ermittelten Volumina.

Der erste Scan erfolgte 7 bis 10 Tage nach Implantation der Tumorzellen. In allen 10 Tieren konnten bereits in der ersten MRT-Aufnahme Tumormassen an beiden Flanken nachgewiesen werden. Diese imponierten als rundliche, homogene, im T2-MRT als hypointense, Strukturen. Die Tumoren dieses Tiermodells konnten aufgrund ihrer Lokalisation leicht identifiziert und von Umgebungsstrukturen abgegrenzt werden. Im Verlauf waren die Tumoren rasch größenprogredient und entwickelten in der Regel bildmorphologisch ein hyperintenses Tumorzentrum. Diese hyperintensen Areale wurden bildmorphologisch am ehesten als zystische Nekrosen gesehen (Abb. 5-1).

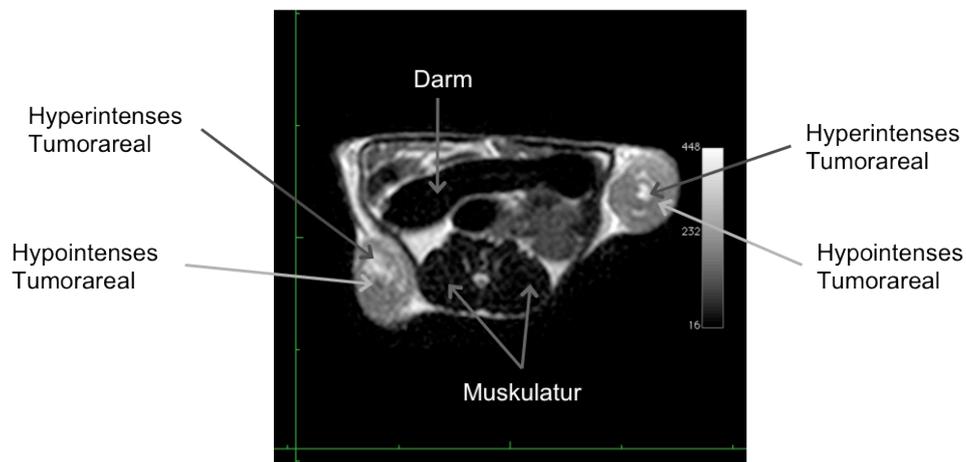


ABB. 5-1 T2-MRT EINER SC-MAUS (#43)

An der linken und rechten Flanke erkennt man jeweils einen hypointensen Tumor. Mittig befindet sich je ein hyperintenses Areal, das bildmorphologisch am ehesten mit nekrotischem Gewebe zu vereinbaren ist.

Das Volumen der Tumoren, das anhand T2-gewichteter MRT-Aufnahmen bestimmt wurde, zeigt einen relativ kontinuierlichen und homogenen Anstieg über den Beobachtungszeitraum. (Abb. 5-2)

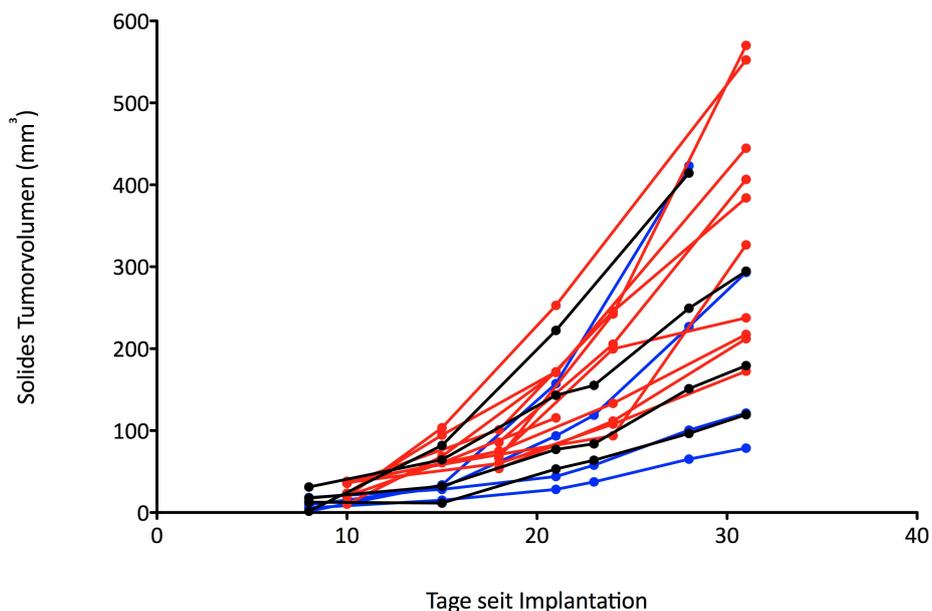


ABB. 5-2 SC-MAUSMODELL: VERLAUF SOLIDES TUMORVOLUMEN

Das Diagramm zeigt den Verlauf des soliden Tumoranteils in mm^3 nach der Tumorzellimplantation. Man sieht einen exponentiellen Verlauf über die Zeit. Rote Linien 5×10^5 Tumorzellen, blaue Linie 3×10^5 Tumorzellen, schwarze Linien 2×10^5 Tumorzellen.

9 Tiere mit 18 Tumoren ($n = 18$) wurden in der Berechnung der Endvolumina berücksichtigt. Das solide Tumorendvolumen variierte zwischen $78,6 \text{ mm}^3$ und $570,1 \text{ mm}^3$ (Mean: $302,7 \text{ mm}^3$; SD: 147,1). Der nicht-solide Tumoranteil variierte zwischen 0,1 bis 33,2 % (Mean: 7,7 %; SD: 8,7). (Abb. 5-3)

In der Gruppe der mit 2×10^5 Zellen implantierten Tiere, variierte das solide Tumolvolumen zwischen $78,6$ und $423,3 \text{ mm}^3$ (Mean $240,5 \text{ mm}^3$; SD: 135,3). In der Gruppe der mit 3×10^5 Zellen implantierten Tumor variierte das solide Volumen zwischen $172,5$ und $570,1 \text{ mm}^3$ (Mean: $352,5 \text{ mm}^3$; SD: 142,9). In der Gruppe der mit 5×10^5 implantierten Tumoren variierte das solide Tumolvolumen zwischen $119,5$ und $414,5 \text{ mm}^3$ (Mean: $252,0 \text{ mm}^3$; SD: 130,5). (Abb. 5-3)

Der Unterschied der 3 Gruppen hinsichtlich ihrer soliden Endvolumina ist nicht signifikant $p = 0,3133$.

Der nicht-solide Tumoranteil betrug in der Gruppe, der mit 2×10^5 implantierten Tiere 0,1 und 4,7 % (Mean 1,5 %; SD: 2,2). In der Gruppe der mit 3×10^5 implantierten Tiere variierte das nicht-solide Endvolumen zwischen 2,3 und 33,2 % (Mean: 12,5 %; SD: 9,0). In der Gruppe der mit 5×10^5 implantierten Tumoren variierte das nicht-solide Endvolumen zwischen 0,1 und 3,3 % (Mean: 1,7 %; SD: 1,7). (Abb. 5-3)

Das nicht-solide Endvolumen variierte signifikant ($p = 0,005$), jedoch zeigte die Gruppe der mit 3×10^5 Zellen implantierten Tumoren den größten nicht-soliden Anteil.

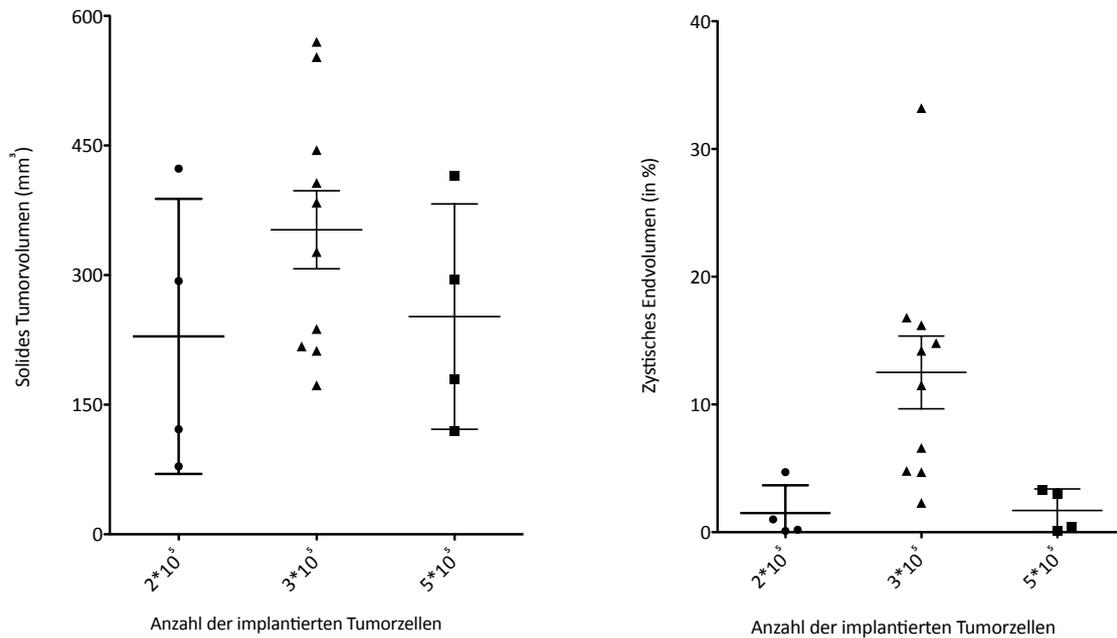


ABB. 5-3 SC-MAUSMODELL: ENDPUNKT-MRT - SOLIDES UND NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN

Es werden jeweils die Tumoren mit unterschiedlicher Anzahl der implantierten Tumorzellen gegenübergestellt.

Links: Solides Tumorumvolumen in mm³ in der Endpunkt-MRT. Die Volumina variieren zwischen 78,6 mm³ und 570,1 mm³ (Mean: 302,7 mm³; SD: 147,1). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den soliden Tumorumvolumina innerhalb der 3 Gruppen.

Rechts: Relativer Anteil des zystischen Tumors in %. Der nicht-solide Anteil variiert zwischen 0,1 und 33,2 % (Mean: 7,7 %; SD: 8,7). Die Gruppe der mit 3x10⁵ Zellen implantierten Tumoren zeigt den größten Anteil nicht-soliden Tumorumvolumens.

5.1.1.1 HISTOLOGISCHE KORRELATION

Eine HE-Färbung wurde durchgeführt um Aussagen bezüglich Tumorzellmenge, Differenzierungsgrad, Stroma, Ducti, etc. zu gewinnen. Alle Tumoren wurden histologisch aufgearbeitet und eine HE-Färbung durchgeführt. In der mikroskopischen Betrachtung der Tumoren bestätigte sich die Annahme der morphologischen Homogenität des subkutanen Tumormodells. Die Tumoren zeigen eine hohe Zellularität mit wenig Stroma. Die Tumoren weisen keine Zysten auf. (Abb. 5-4, Abb. 5-5)

Die in der T2-MRT abgrenzbaren hyperintensiven Areale konnten alle histologisch als Nekrosen gesichert werden. Diese Nekrosen befinden sich meist zentral im Tumor. (Abb. 5-4, Abb. 5-5)

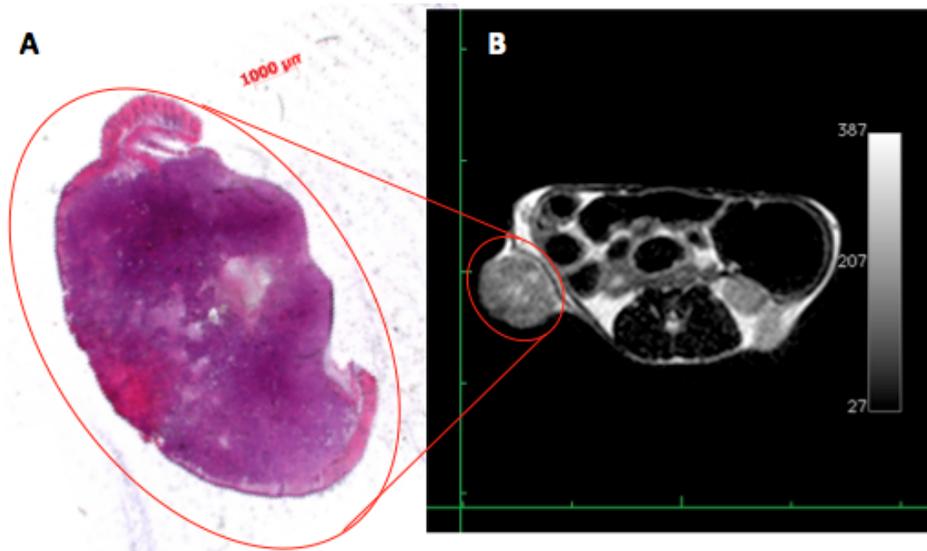


ABB. 5-4 HISTOLOGIE UND T2-MRT EINER SC-MAUS (#40)

A = HE gefärbtes Präparat, **B** = korrelierte T2-Aufnahme.

In der T2-Aufnahme erkennt man zentral ein hyperintenses Areal, dies entspricht dem in der HE-Färbung weniger stark gefärbten Bereich einer Nekrose. Lateral erkennt man in der T2W ein hypointenses keilartiges Areal, histologisch entspricht dieses Areal narbigem Gewebe.

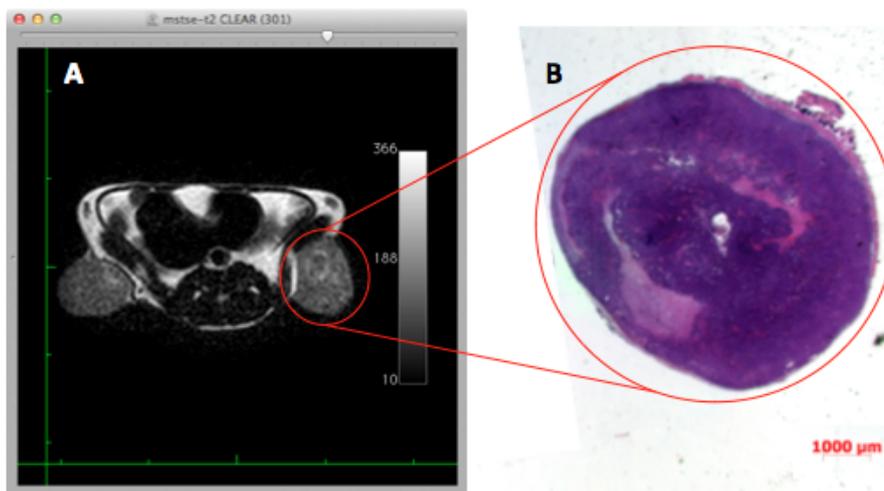


ABB. 5-5 HISTOLOGIE UND T2-MRT EINER SC-MAUS (#1)

A = T2-Aufnahme, **B** = HE gefärbtes Präparat.

Der Tumor erscheint in der T2-Aufnahme, wie auch in der histologischen Betrachtung sehr homogen. Man erkennt perizentral zwei Areale die sich in der T2-Aufnahme hyperintens zeigen, diese korrelieren mit den histologisch nachgewiesenen Nekrosen.

5.1.2 ERGEBNISSE DER ENDOGENEN TUMORMODELLE

Auch in den endogenen Tumormodellen entwickelten alle Tiere einen Tumor. Die Penetranz betrug folglich für alle Genotypen 100 %. Es wurden insgesamt 37 Tiere untersucht. In der Gruppe CKT wurden 15 Tiere, in der CKP Gruppe 11 Tiere, 2 Tiere in der CKTP fl+/- Gruppe und in der CKTP R172H Gruppe wurden 10 Tiere untersucht.

5.1.2.1 CKT

Ab einem Alter von 1 - 3 Monaten wurden die Mäuse mit einer multimodalen Bildgebung untersucht. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere bereits einen mittels MRT nachweisbaren Tumor. Das Pankreas erschien stark verändert. Die Tumoren zeigten zystische und solide Anteile. Die soliden Tumoren konnten zum Teil nur schwer im T2-gewichteten MRT identifiziert und abgegrenzt werden. Sie stellten sich hyperintensiver als das gesunde Umgebungsgewebe dar. Zusätzlich konnten Areale identifiziert werden, die sich relativ hypointensiver als das Tumorgewebe darstellten. Durch histologische Korrelationen konnten diese Areale als präneoplastische IPMN-Läsionen identifiziert werden. Die MRT ermöglicht also eine Unterscheidung zwischen hyperintensiven, soliden Tumoren und hypointenseren, präneoplastischen Geweben (Abb. 5-9).

Insgesamt wurden 15 Tiere untersucht. Jedoch konnte nur von 14 Tieren das Volumen im Verlauf beobachtet werden, da bei einem Tier die MRT-Aufnahme auf Tumorrhöhe abgeschnitten wurde und dadurch keine genaue Aussage bezüglich des Volumens gemacht werden konnte. Die Gruppe zeigt sich sehr heterogen im Verlauf der Tumorumfänge. Der Zeitpunkt der Tumorentstehung war interindividuell sehr variabel. Die mittels T2W-MRT ermittelten Tumorumfänge wiesen eine deutliche interindividuelle Schwankung auf. Im Vergleich zu den anderen endogenen Tumormodellen war die Wachstumskinetik im CKT Modell geringer. Die Karzinome der CKT-Mäuse wiesen das größte Volumen in den untersuchten endogenen Tumormodellen auf. Das Endvolumen variierte zwischen 366,0 mm³ und 3692 mm³ deutlich (Mean: 1833 mm³; SD: 1098) (Abb. 5-6). Die Tumoren der CKT Mäuse wiesen mehr und größere Zysten auf, als die anderen endogenen Tumoren. Der zystische Anteil nahm mit der Zeit zu. Innerhalb der Gruppe war der nicht-solide Anteil relativ homogen und variierte von 27,6 bis 39,9 % im Endpunkt-MRT (Mean: 34,1 %; SD: 4,3). (Abb. 5-7)

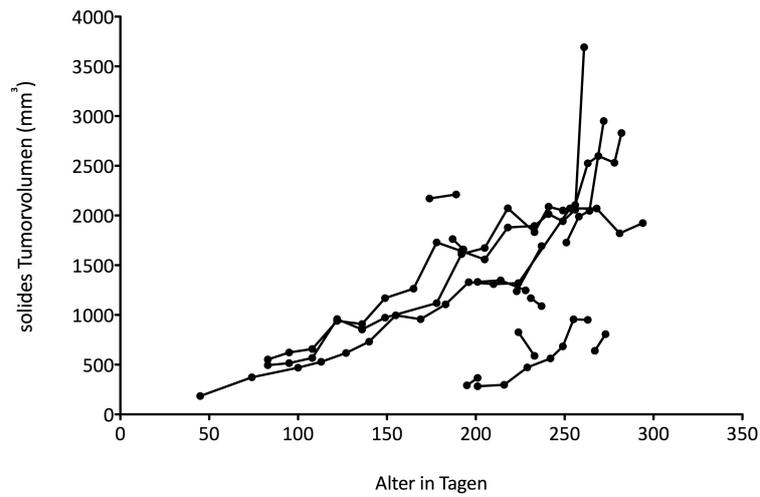


ABB. 5-6 CKT MODELL: VERLAUF SOLIDES TUMORVOLUMEN

Die soliden Tumorumvolumina steigen relativ homogen über die Zeit an.

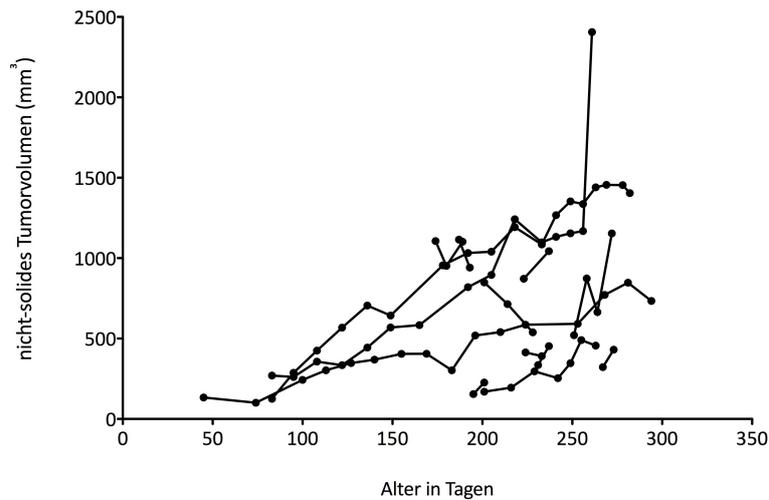


ABB. 5-7 CKT MODELL: VERLAUF NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN

Das absolute nicht-solides Volumen steigt im Verlauf meist an.

In einem fortgeschrittenen Tumorstadium traten bei einer Maus Aszites und bei einer anderen Maus Pleuraergüsse auf. Bei einem Tier trat ein Harnstau mit Nierenbeckenerweiterung auf. Des Weiteren traten Metastasen in Leber und Lunge auf. Es wurden bei fünf Tieren Lungenmetastasen, bei einem Tier wurden Lebermetastasen identifiziert. Bei einem Tier kam es zur Infiltration der Milz.

Die Mäuse des CKT-Modells zeigten das längste Überleben. Die mediane Überlebensdauer lag bei 245 Tagen (Abb. 5-22).

5.1.2.1.1 HISTOLOGISCHE KORRELATION

In der histologischen Untersuchung zeigten sich invasive PDACs mit zystischen und duktalem Läsionen. Die Karzinome waren schlecht bis mäßig differenziert (G3 bis G2). Es zeigte sich eine mittelgradige desmoplastische Stromakomponente. Es konnten sowohl PanIN-1A- und PanIN-2-Läsionen sowie vereinzelt PanIN3-Läsionen nachgewiesen werden, aber auch zystisch-papilläre Läsionen, die den humanen IPMNs ähneln. Histologisch ließen sich die in der T2-Bildgebung abgrenzbaren IPMN-Läsionen bestätigen. Es zeigten sich viele Zysten unterschiedlicher Größe.



ABB. 5-8 HE-PRÄPARAT EINER CKT-MAUS

Das HE-Präparat zeigt einen soliden Tumor einer CKT-Maus mit multiplen Zysten unterschiedlicher Größe.

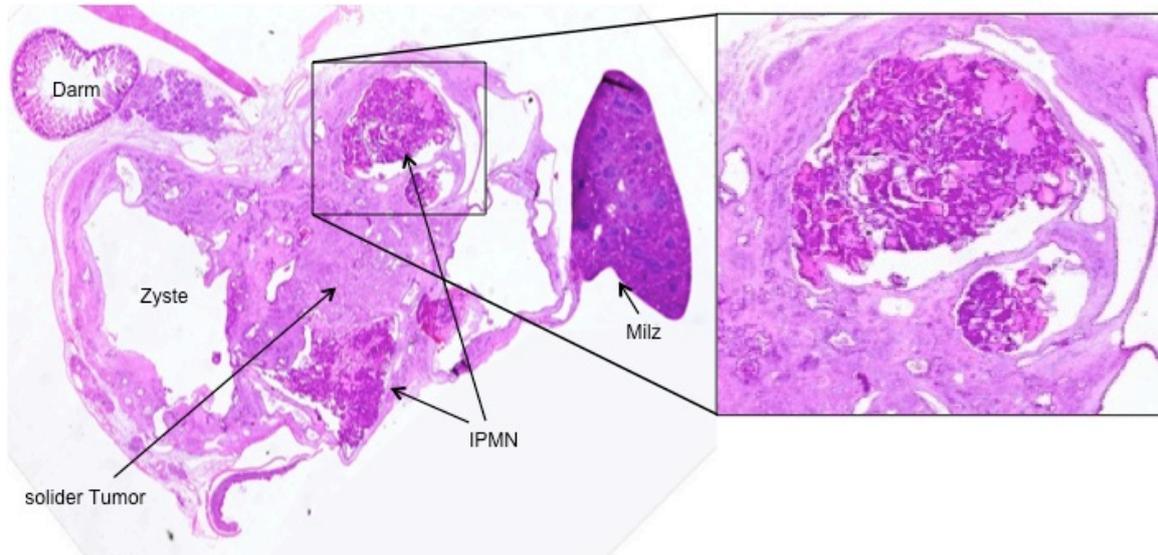


ABB. 5-9 HE-PRÄPARAT EINER CKT-MAUS MIT AUSSCHITTSVERGRÖßERUNG

PDAC mit soliden Tumoranteilen, einer großen Zyste und IPMN-Vorläuferläsionen. In der Ausschnittsvergrößerung erkennt man IPMN.

Eine Maus entwickelte zusätzlich einen sarkomatoiden, anaplastischen Tumoranteil. Dieser Tumor zeigte eine hohe Zelldichte und keine Stromakomponente.

Auch histologisch konnten die bildmorphologisch entdeckten Metastasen vor allem in der Leber, der Lunge und der Milz nachgewiesen werden. Auch eine Beteiligung des Bauchfells im Sinne einer Peritonealkarzinose konnte in einigen Fällen gesehen werden.

5.1.2.2 CKP

Es wurden 11 Tiere untersucht. Die Tumoren des CKP-Mausmodells entwickelten erst mit der Zeit bildmorphologisch solide Tumoranteile. Meist begann das Karzinom zentral im Pankreaskopf zu wachsen. Der Beginn des Tumorwachstums war relativ spät, sodann zeigte sich aber ein rascher Verlauf mit schneller Zunahme des soliden Tumolvolumens. Das Endvolumen der CKP Tumore schwankte zwischen 213,6 mm³ und 1132 mm³ (Mean: 540,0 mm³; SD: 358,3). (Abb. 5-10, Abb. 5-20). Im Vergleich zu dem raschen Anstieg des soliden Tumoranteils zeigte der nicht-solide Anteil keine wesentliche Zunahme. Nur in einem Fall nahm der nicht-solide Anteil deutlich über die Zeit zu. Ansonsten zeigte er einen heterogenen Verlauf über die Zeit, mit inter- und intraindividuellen Schwankungen. Der nicht-solide Anteil war in den fortgeschrittenen Tumorstadien im Vergleich zu den anderen endogenen Modellen am geringsten. In der Endpunkt-MRT variierte der Anteil zwischen 2,2 und 26,50 % (Mean: 9,2 %; SD: 6,7). (Abb. 5-11, Abb. 5-21)

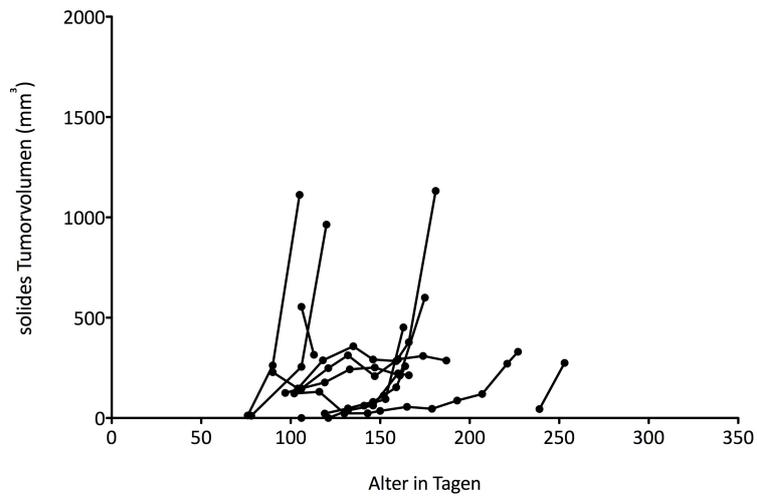


ABB. 5-10 CKP MODELL: VERLAUF SOLIDES TUMORVOLUMEN

Relativ später Beginn der Tumorentwicklung, dann aber rasche Zunahme des soliden Tumolvolumens.

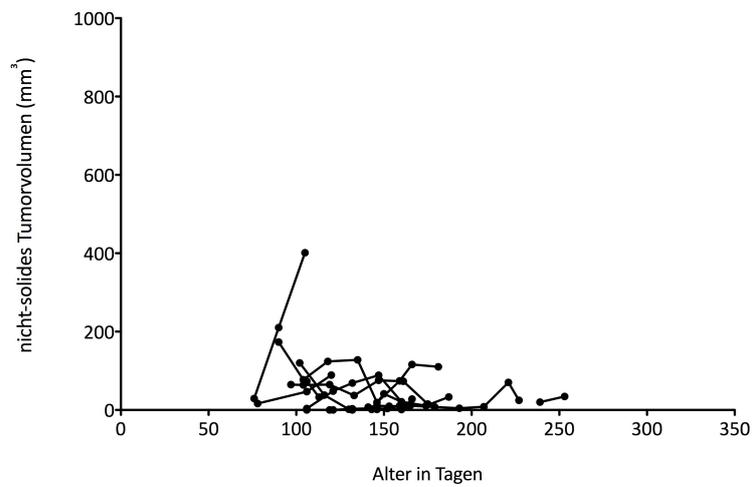


ABB. 5-11 CKP MODELL: VERLAUF NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN

Deutliche inter- und intraindividuelle Schwankungen des nicht-soliden Anteils über die Zeit. Insgesamt aber geringster Anteil an nicht-soliden Strukturen innerhalb der endogenen Tumormodelle.

In einem späteren Tumorstadium traten bei drei Mäusen Aszites und bei einer Maus eine Paralyse auf. Es wurden in den anatomischen MRT-Aufnahmen keine Metastasen identifiziert.

Die mediane Überlebensdauer betrug 172,5 Tage (Abb. 5-22).

5.1.2.2.1 HISTOLOGISCHE KORRELATION

Alle Tumorknoten konnten auch histologisch gesichert werden.

Die Tumoren imponierten histologisch vor allem als schlecht differenzierte G2 bis G3 Adenokarzinome mit einer mittlere bis geringe Desmoplasie. Der Anteil an zystischen Strukturen war geringer als in den anderen Tumormodellen.

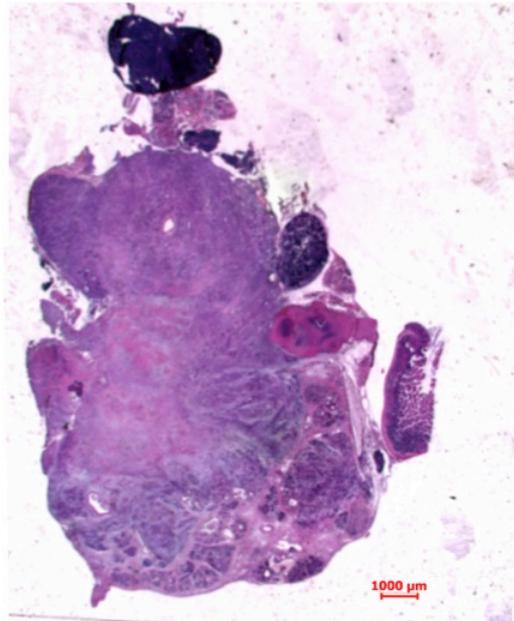


ABB. 5-12 HE-PRÄPARAT EINER CKP-MAUS

Solider Tumor mit nur wenigen kleinen Zysten.

Auch in der makroskopischen Betrachtung konnten in den untersuchten Tieren keine Metastasen gefunden werden.

5.1.2.3 CKTP R172H

In dieser Gruppe wurden 10 Tiere untersucht (n = 10). CKTP R172H zeigten einen deutlich früheren Beginn der Tumorentstehung (<30 Tage nach Geburt) als die anderen Tumormodelle. Die CKTP R172H Mäuse zeigten ein Endvolumen zwischen 365,1 mm³ und 1116 mm³ (Mean: 687,8 mm³; SD: 265,1) und lagen damit deutlich unter dem Endvolumen der CKTP fl +/- Mäuse. (Abb. 5-13, Abb. 5-20). Der nicht-solide Anteil in diesem Tumormodell zeigte sich relativ variabel zwischen 4,4 und 43,7 % (Mean: 27,1 %; SD:11,9). (Abb. 5-14, Abb. 5-21).

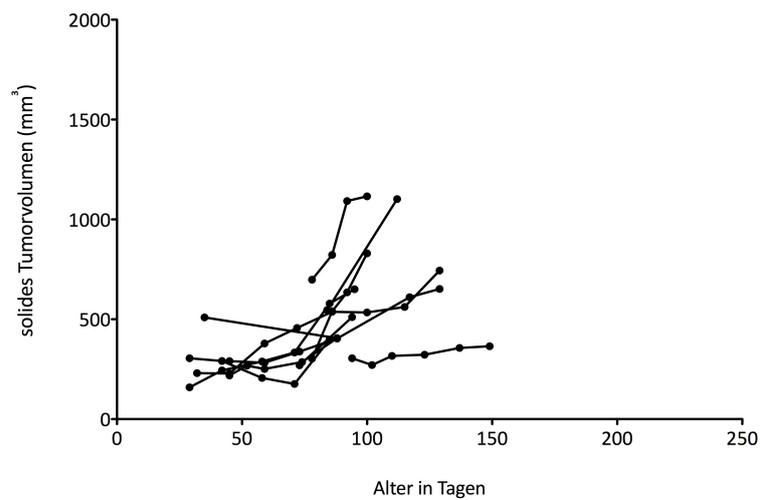


ABB. 5-13 CKTP R172H MODELL: VERLAUF SOLIDES TUMORVOLUMEN

Früher Beginn der Tumorgenese mit geringen Endvolumina.

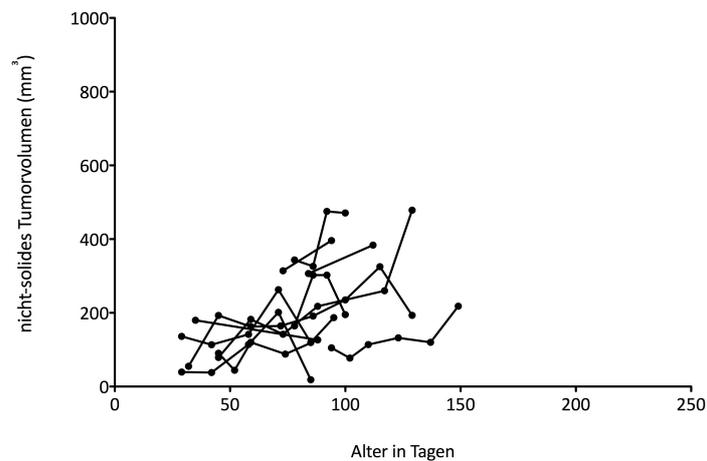


ABB. 5-14 CKTP R172H MODELL: VERLAUF NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN

Variabler Verlauf des absoluten nicht-soliden Volumens mit deutlichen inter- wie auch intraindividuellen Schwankungen.

Im weiteren Verlauf entwickelte eine Maus eine Tumorkachexie und eine andere Maus eine Paralyse. In den MRT-Aufnahmen konnten keine Metastasen identifiziert werden.

Die mediane Überlebenszeit war mit 102 Tagen die kürzeste unteren den eingesetzten Modellen (Abb. 5-22).

5.1.2.3.1 HISTOLOGISCHE KORRELATION

In der histologischen Untersuchung fand man invasive PDACs. Die Tumoren waren zystisch durchsetzt, wie dies auch bei den anderen $TGF\alpha$ -basierten Tumormodellen der Fall war. Es konnten PanIN Vorläuferläsionen sowie IPMN-Läsionen nachgewiesen werden. Die Tumoren waren fibrotisch und sehr zellreich. Die Karzinome waren mäßig bis schlecht differenziert (G2 bis G3).



ABB. 5-15 HE-PRÄPARAT EINER CKTP R172H-MAUS

Solider Tumor mit zystischen Anteilen.

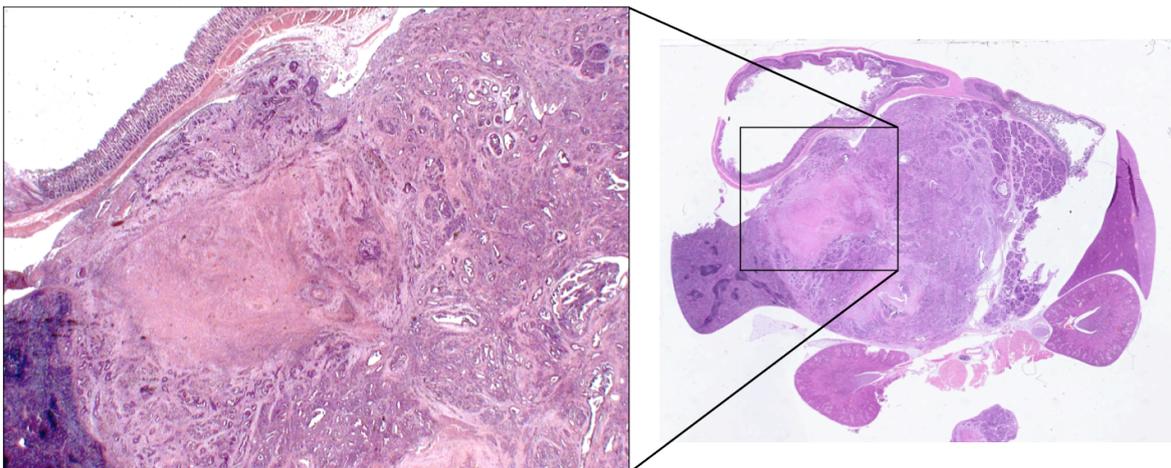


ABB. 5-16 HE-PRÄPARAT EINER CKTP R172H-MAUS MIT AUSSCHNITTSVERGRÖßERUNG

Solider Tumor mit einer großen Nekrose. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Nekrose.

5.1.2.4 CKTP FL+/-

Es wurden 2 Tieren untersucht. In der T2-Aufnahme zeigte sich zunächst ein Befall des zentralen Pankreaskopfes. Im weiteren Verlauf breitete sich der Tumor weiter aus und gewann schnell an Größe.

Das Endvolumen der CKTP fl+/- Mäuse variierte zwischen 1234 mm³ und 1251 mm³ (Mean: 1242 mm³; SD: 11,8) und lag damit höher als bei den CKTP R172H Tieren. (Abb. 5-17, Abb. 5-20)

Der nicht-solide Anteil war mit 23,3 bis 24,8 % (Mean 24,05 %; SD: 1,1) relativ hoch. (Abb. 5-18, Abb. 5-21)

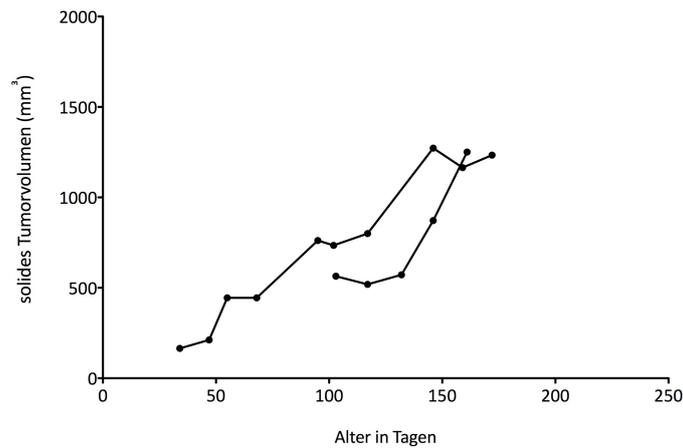


ABB. 5-17 CKTP FL+/- MODELL: VERLAUF SOLIDES TUMORVOLUMEN

Das solide Tumorvolumen steigt über die Zeit an.

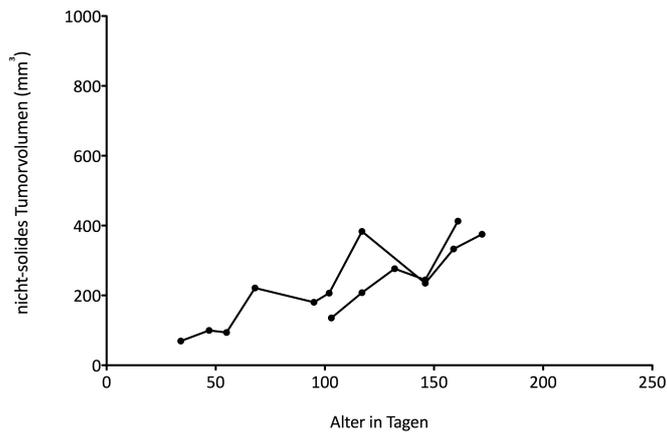


ABB. 5-18 CKTP FL+/- MODELL: VERLAUF NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN

Das nicht-solide Tumorvolumen nimmt über die Zeit etwas zu.

In den beiden untersuchten Mäusen wurden in den MRT-Aufnahmen keine Metastasen gesehen.

CKTP fl+/- zeigten ein etwas längeres Überleben als CKTP R172H Mäuse mit 170 Tagen (Abb. 5-22).

5.1.2.4.1 HISTOLOGISCHE KORRELATION

Die Tumore der MRT-Untersuchungen wurden alle histologisch korreliert und bestätigt.

Wie die anderen $TGF\alpha$ Tiere, waren auch die Tumoren der CKTP fl+/- Mäuse von multiplen Zysten durchsetzt und wiesen zahlreiche IPMN-Läsionen auf. Wie die anderen $TGF\alpha$ -basierten Modelle entwickelten auch diese ein mäßig bis schlecht differenziertes Adenokarzinom (G2 bis G3) mit einer mittelgradigen Desmoplasiekomponente.

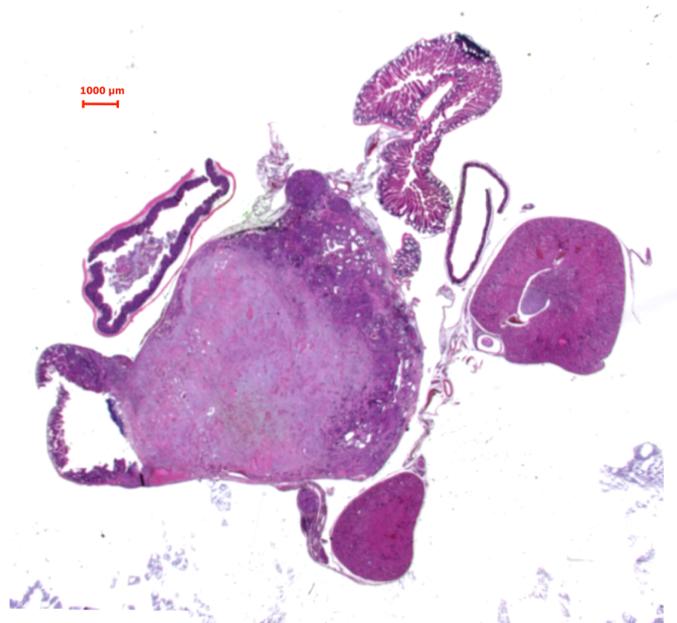


ABB. 5-19 HE-PRÄPARAT EINER CKTP FL+/- MAUS

Das HE-Präparat zeigt einen relativ soliden Tumor.

In den beiden untersuchten Tieren konnten histologisch keine Metastasen identifiziert werden.

5.1.2.5 VERGLEICH DER ENDOGENEN MODELLE

Das CKT-Modell brachte die größten soliden Tumore hervor, doch war die Streubreite innerhalb dieser Gruppe sehr groß. Die soliden Tumoren des CKP- und CKTP R172H-Modells waren etwa gleich groß mit einer geringeren Streuung als dies bei den CKT-Tieren der Fall war. Die solide Tumorgroße des CKTP fl+/- Modells lag zwischen denen des CKT- und denen des CKP- bzw. CKTP R172H-Modells. Jedoch umfasste die Gruppe der CKT fl+/- Mäuse lediglich 2 Tiere und die Volumina sind somit nicht repräsentativ. (Abb. 5-20)

Bei prozentualer Betrachtung des nicht-soliden Anteils erkannte man die große interindividuelle Schwankung innerhalb des CKTP R172H+ Modells. Die Tiere des CKT-Modells wiesen durchschnittlich den größten nicht-soliden Anteil auf. Die Tiere des CKP-Modells wiesen deutlich weniger Zysten auf als die Mäuse der anderen Tumormodelle – mit einer Ausnahme. Das CKTP fl+/- Modell umfasste nur zwei Tiere, soweit bei dieser

geringen Anzahl beurteilbar, war der nicht-solide Tumoranteil in etwa so hoch wie beim CKTP R172H+ Modell. (Abb. 5-21)

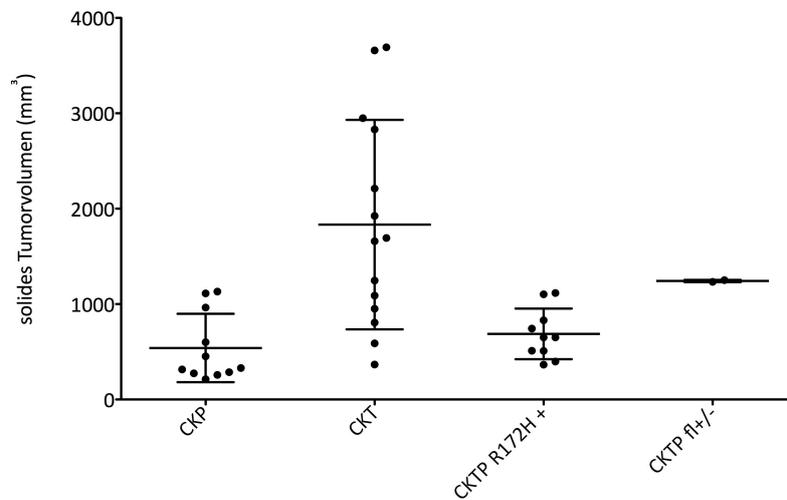


ABB. 5-20 VERGLEICH SOLIDES ENDEVOLUMEN DER ENDOGENEN TUMORMODELLE

Die Abbildung zeigt, dass das CKT Tumormodell die größten Tumoren hervorbringt, diese aber die größten interindividuellen Schwankungen aufweisen. Die anderen Tumormodelle sind homogener in ihrem soliden Endvolumen, zudem zeigen die soliden Tumore der anderen Tumormodelle ein geringeres Endvolumen.

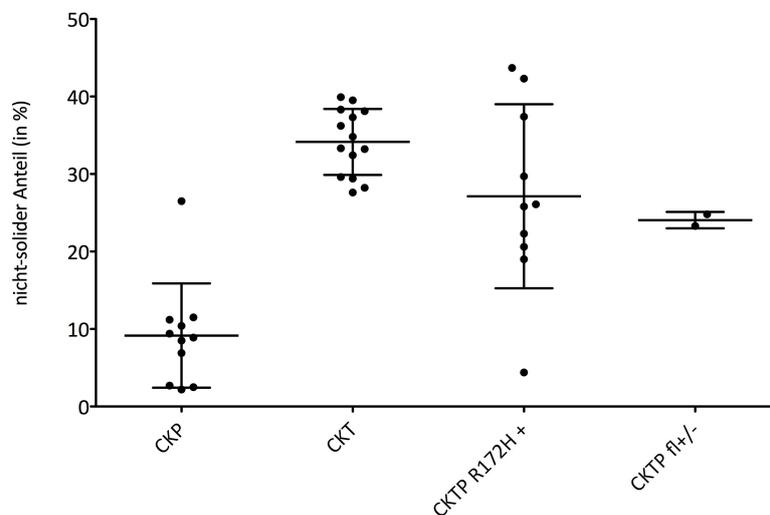


ABB. 5-21 VERGLEICH NICHT-SOLIDER ANTEIL AM ENDEVOLUMEN DER ENDOGENEN TUMORMODELLE

Die Abbildung zeigt den relativen nicht-soliden Anteil am Endvolumen in %. Das CKP Modell weist den geringsten nicht-soliden Anteil auf. Das CKT Modell zeigt den größten Anteil nicht-soliden Strukturen am Gesamttumor. Das CKTP R172H + Modell weist die größte interindividuelle Schwankung auf.

Heterogen zeigten sich die Tumormodelle auch hinsichtlich ihres medianen Überlebens (Abb. 5-22). Die mediane Überlebensdauer war mit 245 Tagen am längsten bei den Tieren des CKT Modells. Dieses Tumormodell wies auch das größte Tumolvolumen auf.

Bei den CKTP R172H + Mäusen betrug das mediane Überleben nur 102 Tage und somit die kürzeste Überlebensdauer aller untersuchten Tumormodelle. Die mediane Überlebensdauer war bei den CKTP fl+/- Mäusen mit 170 Tage im mittleren Bereich, jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig.

Das Tumorwachstum begann bei den CKP-Mäusen spät, der Tumor wuchs jedoch rasch. Das mediane Überleben war mit 172,5 Tagen im mittleren Bereich.

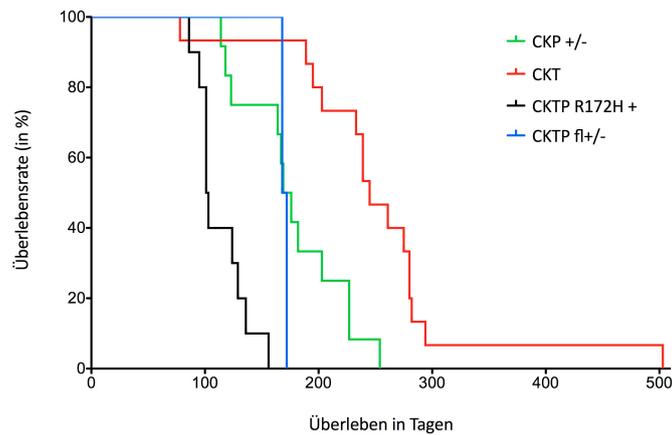


ABB. 5-22 ÜBERLEBENSKURVEN DER ENDOGENEN TUMORMODELLE

Die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zeigt, dass die CKT Mäuse am längsten überleben und die CKTP R172H Mäuse am kürzesten.

5.2 DWI-MRT

5.2.1 SUBKUTANES TUMORMODELL

Bei subkutanen Tumoren gibt es im Bereich der Tumoren Gewebe-Luft-Übergänge, diese führen in der Diffusionsbildgebung zu starken Suszeptibilitätsartefakten. Die gewonnenen Werte waren daher nicht verwertbar und werden deshalb nicht dargestellt.

5.2.2 ENDOGENE TUMORMODELLE

Die Tumoren der endogenen Mausmodelle konnten mittels DWI-Bildgebung erfasst werden. Anhand der Korrelation der b20-, b200- und b600-Aufnahmen mit dem T2-MRT-Bild und ggf. unter Zuhilfenahme der histologischen Schnitte konnte der solide Tumoranteil identifiziert werden (Abb. 5-23). Zur Berechnung der ADC-Werte wurden die b20- und b600-Aufnahmen herangezogen.

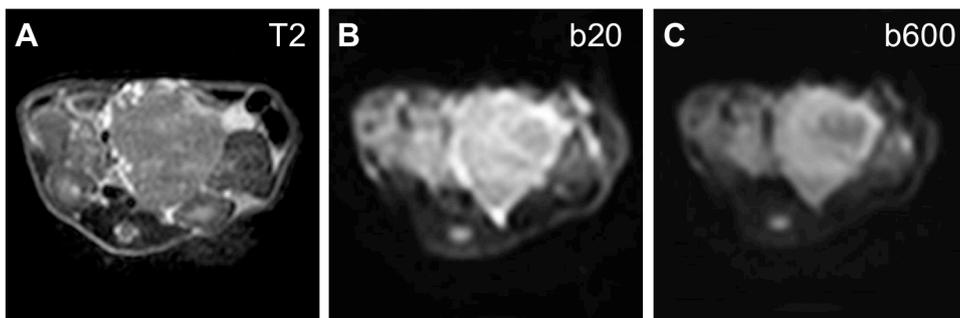


ABB. 5-23 T2-, B20-, B600-BILDER EINER ENDOGENEN MAUS

(A) T2-Aufnahme einer endogenen Maus: man sieht einen großen soliden Tumor mit randständigen kleineren Zysten

(B-C) b20/b600 Aufnahmen der gleichen Maus: man sieht das Tumorareal in den unterschiedlichen b-Wert-Aufnahmen. Diese werden zur Berechnung des ADC-Wertes herangezogen. Die zystischen Anteile werden hypointenser.

In dieser Untersuchung wurden bei einzelnen Tieren mehrere Tumorareale identifiziert und diese einzeln in der Berechnung der ADC-Werte berücksichtigt. Ebenfalls wurden die nicht-therapierten Mäuse mehrmals gemessen. Dadurch kann ein einzelnes Tier mit mehreren Tumoren in der Statistik vorkommen.

Es wurden die ADC-Werte für die unterschiedlichen Gruppen CKT (40 Tumorareal bei 9 Tieren, $n = 40$), CKTP (19 Tumorareale bei 3 Tieren, $n = 19$) und IPMN (14 Tumorareal bei 4 Tieren, $n = 14$) berechnet. Die ADC-Werte lagen in der Gruppe CKT zwischen 0,74 und 1,22 (Mean: 0,94; SD: 0,12), in der Gruppe CKTP zwischen 0,86 und 1,21 (Mean: 1,01; SD: 0,11) und bei den IPMN Tumoren zwischen 0,84 und 1,08 (Mean: 0,94; SD: 0,07). Die Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,095$). Eine Unterscheidung zwischen solidem PDAC und IPMN Vorläuferläsionen war mittels DWI-MRT nicht möglich (Abb. 5-24).

ERGEBNISSE

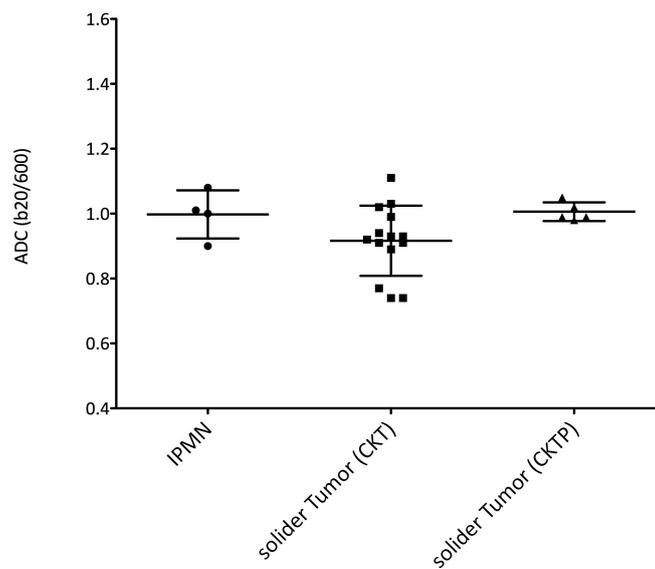


ABB. 5-24 VERGLEICH DER ADC-WERTE VON IPMN-LÄSIONEN UND SOLIDEN TUMOREN VON CKT- UND CKTP-MÄUSEN

Die ADC-Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Eine Unterscheidung zwischen IPMN-Vorläuferläsionen und invasivem PDAC ist mittels ADC-Wert nicht möglich.

Bei einigen Mäusen wurden mehrere DWI-Aufnahmen im Verlauf angefertigt. In der DWI-Messung zeigten sich inter- und intraindividuelle Schwankungen der ADC-Werte im Verlauf (Abb. 5-25 A-C).

Der ADC-Wert in vitalen Tumorabschnitten war niedriger als in nekrotischen Arealen (vgl. Abb. 5-25 D).

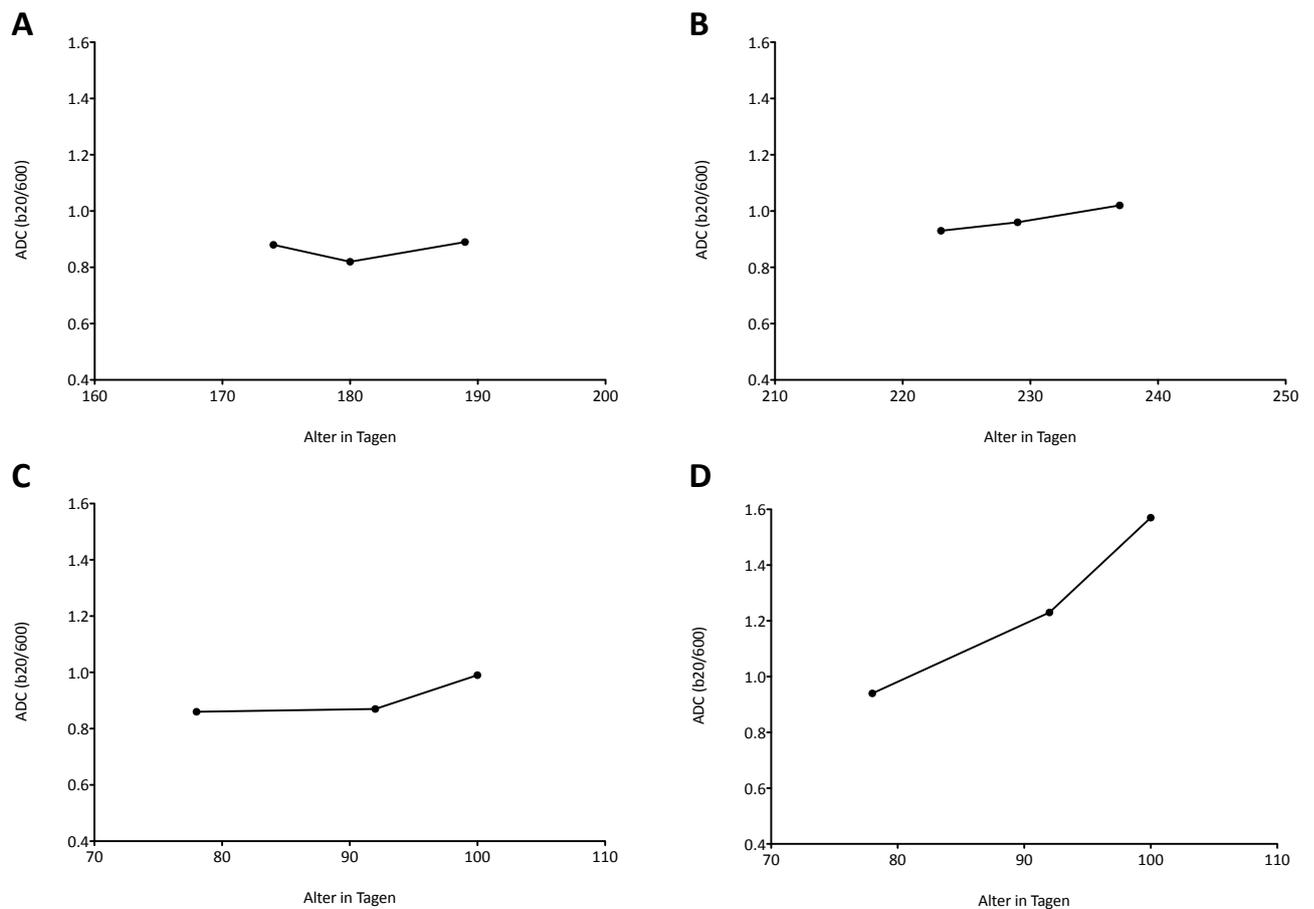


ABB. 5-25 VERLÄUFE DER ADC-WERTE

Ausgewählte Verläufe der ADC-Werte über die Zeit.

A = CKT Maus (#520007) ADC-Wert schwankt zwischen 0,82 und 0,89

B = CKT Maus (#510472) ADC-Wert steigt von 0,93 auf 1,02

C + **D** = zwei unterschiedliche Tumoranteile derselben CKTP Maus (#510817). Dabei spiegelt **C** den vitalen Tumoranteil wieder und **D** den nekrotischen Tumoranteil. Der ADC-Wert im nekrotischen Tumor steigt von 0,94 auf 1,57; im vitalen Anteil von 0,86 auf 0,99.

Die gewonnenen DWI-Aufnahmen wurden sowohl mit den T2-Aufnahmen als auch histologisch korreliert. In der HE-Färbung des entsprechenden Tumorareals wurde visuell die Zelldichte bestimmt. Die Korrelation des ADC-Wertes mit der histologisch ermittelten Zelldichte zeigte einen moderaten Zusammenhang ($r^2 = 0,5720$) von statistischer Signifikanz ($p < 0,0001$). Ein hoher ADC-Wert korrelierte mit einem zellarmen Tumor; ein niedriger ADC-Wert ging mit einem zellreichen Tumor einher. (Abb. 5-26)

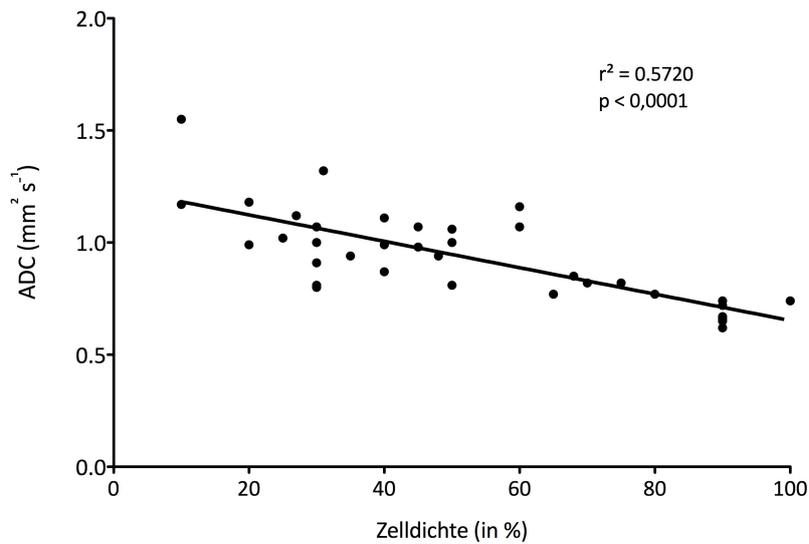


ABB. 5-26 ADC-ZELLDICHTE-KORRELATION

Inverse Korrelation zwischen dem ADC-Wert und der histologisch ermittelten Zelldichte des entsprechenden Tumorareals. Je dichter der Tumor mit Zellen gepackt ist, desto kleiner ist der ADC-Wert. Moderater Zusammenhang: $r^2 = 0,5720$ und $p < 0,0001$.

5.3 ¹⁸F-FDG-PET

5.3.1 SUBKUTANES TUMORMODELL

Es wurden insgesamt 10 Tiere mit je 2 Tumoren ($n = 20$) untersucht. Alle in der T2-MRT identifizierten Tumoren ($n = 20$) zeigten einen Traceruptake im ¹⁸F-FDG-PET (Sensitivität: 100 %). Die Anreicherung des Tracers im soliden Tumor konnte aufgrund ihrer homogenen Form und charakteristischen Lage leicht identifiziert und von unspezifischen Anreicherungen problemlos abgegrenzt werden.

Die in den MRT-Aufnahmen identifizierten nekrotischen Areale innerhalb der soliden Tumormasse zeigten in der ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahme alle einen verminderten Traceruptake und konnten somit auch alle anhand der ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahme abgegrenzt werden (Sensitivität: 100 %).

6 Tiere mit je 2 Tumoren ($n = 12$) wurden im Verlauf beobachtet. Dabei wurde ein Anstieg der T/M-Ratio in den soliden Tumorarealen identifiziert. Es konnten 8 Tiere mit 16 Tumoren ($n = 16$) in der Auswertung der finalen ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahmen berücksichtigt werden. Die T/M-Ratio variierte zwischen 6,08 und 23,78 (Mean: 10,25; SD: 5,00). Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der subkutan implantierten Tumorzellen und der Höhe des Tracer-Uptakes erkannt werden. Eine höhere implantierte Zellzahl führte zu einer höheren T/M-Ratio in den finalen Messungen. (Abb. 5-27)

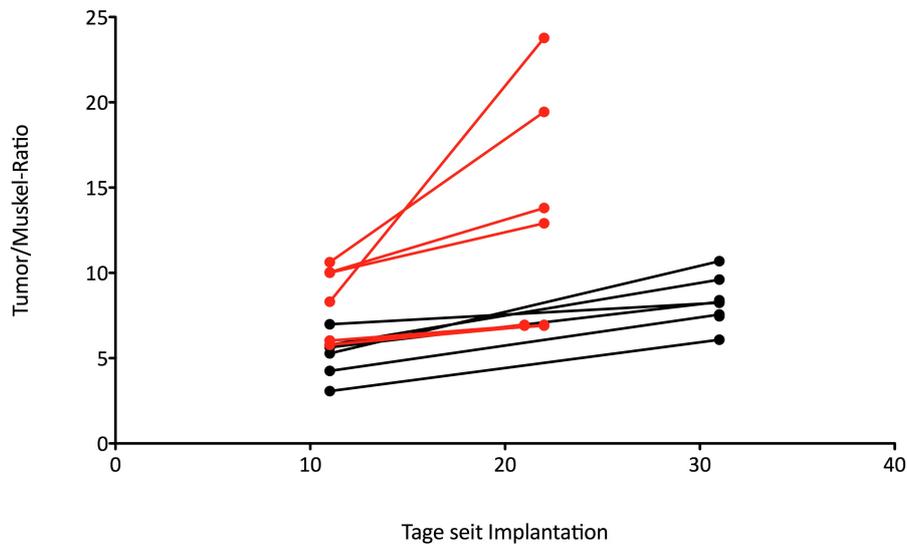


ABB. 5-27 SC-MAUSMODELL: TUMOR-ZU-MUSKEL-RATIO IM VERLAUF

Die Abbildung zeigt den Verlauf der T/M-Ratio in den ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahmen über die Zeit, abhängig von dem Tag der Tumorzellimplantation. Rote Linien, 5x10⁵ Tumorzellen; schwarze Linien, 2x10⁵ Tumorzellen implantiert. Eine höhere Tumorzellimplantation führt zu einer höheren T/M-Ratio.

5.3.2 ENDOGENES TUMORMODELL

Es wurden Tiere der CKT- sowie CKTP R172H-Modelle mittels ¹⁸F-FDG-PET untersucht. In der ¹⁸F-FDG-PET Untersuchung wurden teilweise mehrere Signalanhebungen identifiziert, welche Tumoren entsprachen. Bei diesen Tieren wurden die jeweiligen Areale separat gemessen. Dies führt dazu, dass eine Maus mit mehreren untersuchten Tumoren in einer ¹⁸F-FDG-PET-Untersuchung berücksichtigt wurde. In der Gruppe CKT wurden 12 Tiere mit insgesamt 22 Tumoren (n = 22) untersucht, 3 Tiere erhielten keine ¹⁸F-FDG-PET-Untersuchung. In der Gruppe CKTP R172H waren es 5 Tiere mit 7 untersuchten Tumoren (n = 7), bei 5 Tieren wurde keine ¹⁸F-FDG-PET-Untersuchung durchgeführt.

Es wurde ein ¹⁸F-FDG-PET-Uptake in Herzmuskel, braunem Fettgewebe, Milz und Darm beobachtet. Zudem zeigten Niere und Harnblase erhöhte ¹⁸F-FDG-PET Signale durch die Ausscheidung des Tracers über den Urin. Durch Fusion des ¹⁸F-FDG-PET-Bildes mit dem anatomischen T2-MRT-Bild wurde eine Unterscheidung zwischen unspezifischem und spezifischem Signal möglich.

Alle (n = 29) in der T2-Aufnahme identifizierten Tumoren wurden auch in der ¹⁸F-FDG-PET-Bildgebung erkannt (100 %). Durch histologische Korrelation konnten diese als PDAC bestätigt werden. Abb. 5-28 zeigt exemplarisch ein T2-MRT, ein ¹⁸F-FDG-PET, die Fusion beider Bilder, sowie das entsprechende histologische Präparat einer CKTP R172H Maus.

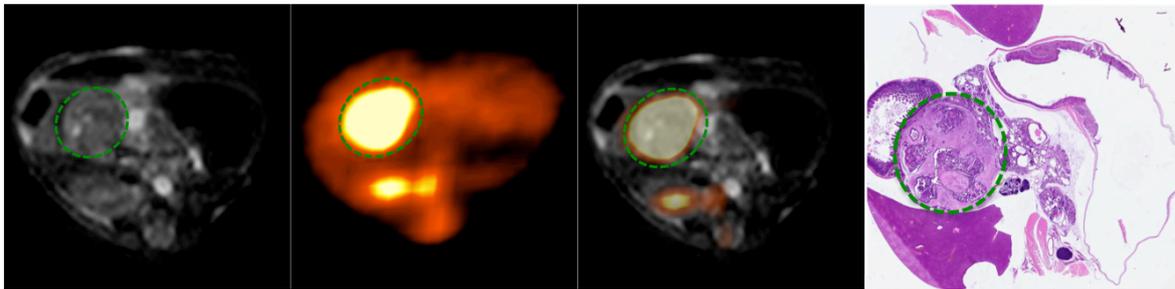


ABB. 5-28 T2-MRT, ¹⁸F-FDG-PET UND HE-PRÄPARAT EINER CKTP R172H MAUS

Von links nach rechts: T2-gewichtete MRT-Aufnahme; ¹⁸F-FDG-PET; Fusion T2-gewichtete MRT-Aufnahme und ¹⁸F-FDG-PET; HE-gefärbtes Präparat. Histologisch gesichertes PDAC (grün). Deutliches Signal in der ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahme. Korreliert mit Herdbefund in der T2-MRT-Aufnahme.

Im CKT Modell variierte die T/M-Ratio zwischen 1,47 und 12,72 (Mean: 4,87; SD: 2,57). Bei den CKTP R172H Mäusen lag die T/M-Ratio zwischen 2,14 und 6,96 (Mean: 3,89; SD: 1,68). Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in ihren T/M-Ratios ($p = 0,5196$) (Abb. 5-29).

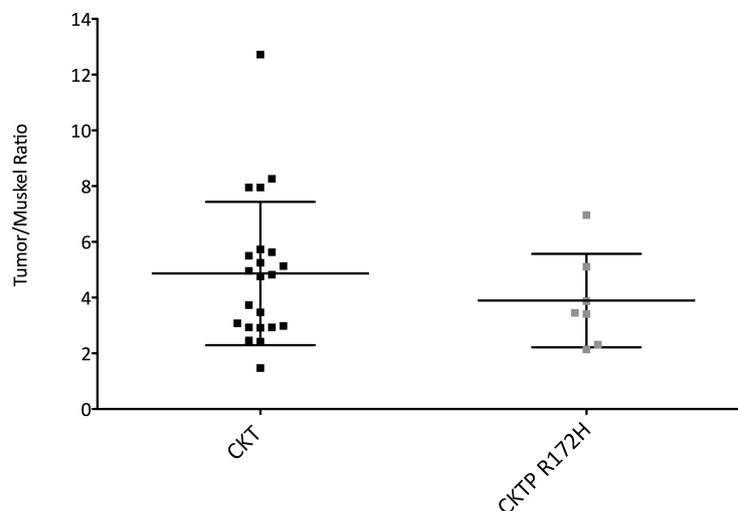


ABB. 5-29 ¹⁸F-FDG-PET: VERGLEICH TUMOR-ZU-MUSKEL-RATIO

Vergleich der Endwert-T/M-Ratio der CKT Mäuse und der CKTP R172H Mäuse. Die T/M-Ratio der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von einander. Die Werte zeigen auch innerhalb einer Gruppe interindividuelle Schwankungen.

Es konnten auch solide PDAC-Anteile von präneoplastischen IPMN-Läsionen unterschieden werden, da die IPMN-Läsionen in der ^{18}F -FDG-PET-Bildgebung einen geringeren Traceruptake zeigten (1,45 bis 2,73; Mean: 1,861; SD: 0,4882) (Abb. 5-30).

Der ^{18}F -FDG-Uptake zwischen PDAC und IPMN unterschied sich signifikant ($p = 0,0004$).

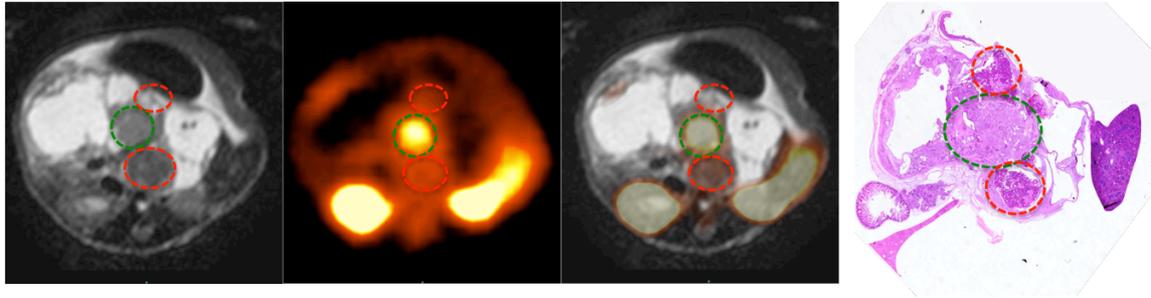


ABB. 5-30 T2-MRT, ^{18}F -FDG-PET UND HE-PRÄPARAT EINER CKT MAUS

Von links nach rechts: T2-gewichtete MRT-Aufnahme; ^{18}F -FDG-PET; Fusion T2-gewichtete MRT-Aufnahme und ^{18}F -FDG-PET; HE-gefärbtes Präparat.

CKT Mäuse entwickeln große Zysten. Das histologisch gesicherte PDAC (grün) zeigt einen Traceruptake im ^{18}F -FDG-PET. Präneoplastische IPMNs (rot) zeigen keinen Traceruptake und imponieren im T2-MRT-Bild hypointenser.

Auch zeigten die Metastasen z.B. der Leber oder der Lunge ein erhöhter Tracer-Uptake. Die T/M-Ratio war ähnlich hoch wie die der Primären (3,42 bis 6,88; Mean: 4,973; SD 1,757).

5.4 ^{18}F -FLT-PET

Es wurden ebenfalls ^{18}F -FLT-PET-Messungen in endogenen CKT und CKTP R172H Mäusen durchgeführt. Es wurden insgesamt 10 Tiere mit 16 Tumoren untersucht ($n = 16$). In der Gruppe CKT 7 Tiere mit insgesamt elf Tumoren ($n = 11$) und 3 CKTP R172H Mäuse mit 5 Tumoren ($n = 5$). Im Allgemeinen war kein signifikanter Tracer-Uptake im endogenen PDAC zu beobachten (Abb. 5-31, Abb. 5-32).

Nur durch Fusion mit den T2-Aufnahmen konnte die Tumorregion identifiziert werden und eine ROI gezeichnet werden, aus welcher dann die T/M-Ratio berechnet wurde.

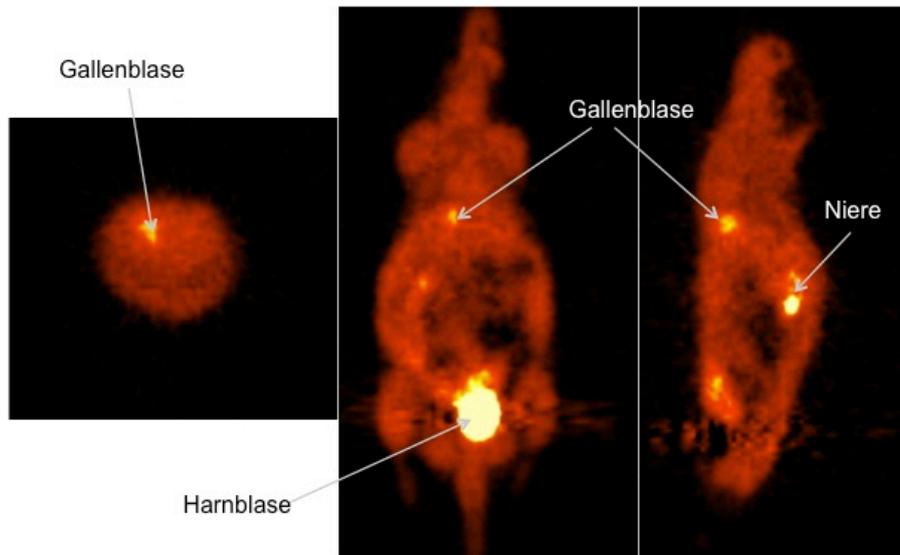


ABB. 5-31 ^{18}F -FLT-PET EINER CKT-MAUS (#510107)

Von links nach rechts: axialer, koronarer, sagittaler Schnitt. Bis auf eine unspezifische Traceranreicherung in Niere, Gallenblase und Harnblase keine weitere Anreicherung. Insbesondere keine Anreicherung im Tumorgewebe.

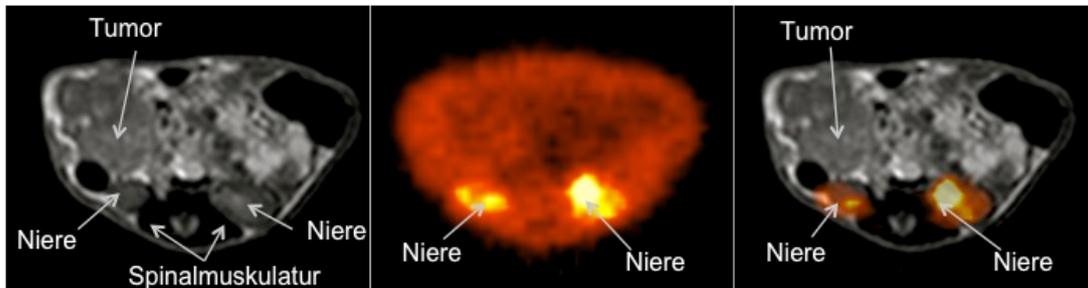


ABB. 5-32 ^{18}F -FLT-PET UND T2-MRT EINER CKT MAUS (#510160)

Von links nach rechts: T2-MRT, ^{18}F -FLT-PET, Fusion T2-MRT und ^{18}F -FLT-PET. Der große Tumor ist in der T2-Aufnahme deutlich zu erkennen. Im ^{18}F -FLT-PET sieht man keine vermehrte Traceranreicherung in der Tumorregion, lediglich eine unspezifische Anreicherung in den Nieren.

Die T/M-Ratio variierte bei den CKT Mäusen zwischen 0,58 und 1,66 (Mean: 0,89; SD: 0,30). Bei den CKTP R172H Mäusen variierte die T/M-Ratio zwischen 0,85 und 0,97 (Mean: 0,90; SD: 0,05). (Abb. 5-33)

Aufgrund der fehlenden Traceranreicherung im Tumorgewebe wurden die Mäuse nicht im Verlauf beobachtet.

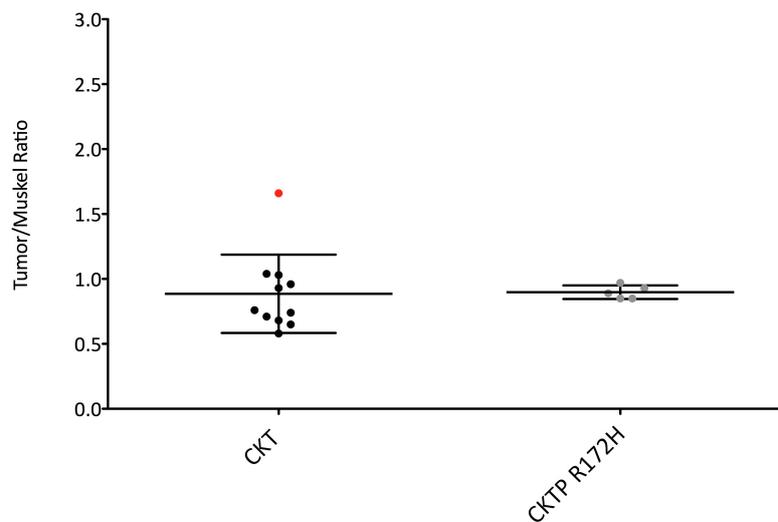


ABB. 5-33 ^{18}F -FLT-PET: VERGLEICH TUMOR-ZU-MUSKEL-RATIO

Vergleich der T/M-Ratio im ^{18}F -FLT-PET der CKT- und CKTP R172H-Mäuse. Bis auf eine Ausnahme bei den CKT Mäusen (**roter Punkt**) zeigen die Tumore keine Signalanhebung in der ^{18}F -FLT-PET.

Innerhalb eines ^{18}F -FDG-PET positiven CKT transgenen PDACs wurde eine ^{18}F -FLT-PET positive Subregion mit einer T/M-Ratio von 1,66 identifiziert (Abb. 5-34). Histologisch wurde der Tumor dieser Region als sarkomatoid-anaplastischer Tumor klassifiziert. Um Aussagen bezüglich der Proliferationsrate machen zu können, wurde eine Färbung mit BrdU durchgeführt. Dabei zeigte sich in dem sarkomatoid-anaplastischen Tumorabschnitt ein signifikant höherer Anteil BrdU-positiver Zellen als in der ^{18}F -FLT-PET negativen Region. Der sarkomatoid-anaplastische Tumorabschnitt konnte folglich als hochproliferativ angesehen werden. In der CK19-Färbung zeigte sich bei dem typischen PDAC eine kräftige Anfärbung mit anti-CK19-Antikörpern, was für eine hohe Anzahl an Ductus sprach, wohingegen der sarkomatoid-anaplastische Tumorabschnitt nur eine geringe Anfärbung mit anti-CK19-Antikörpern zeigte, demzufolge nur wenige Ductus zeigte. (Abb. 5-35)

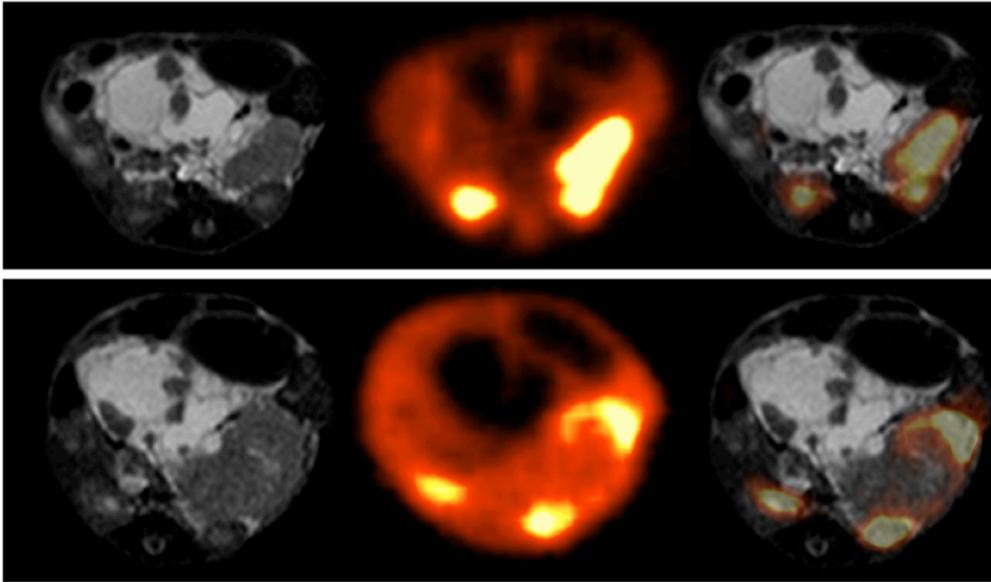


ABB. 5-34 ^{18}F -FDG-PET UND ^{18}F -FLT-PET EINER CKT MAUS (MAUS #510470)

Oben: ^{18}F -FDG-PET; unten: ^{18}F -FLT-PET

Jeweils von links nach rechts: T2-MRT, PET-Aufnahme, PET-MRT-Fusion

Aufnahmen des Pankreaskarzinoms in einer CKT transgenen Maus. Durch Fusion der MRT-Aufnahme mit der PET-Aufnahme erkennt man einen ^{18}F -FDG-Uptake im gesamten Tumor. In der ^{18}F -FLT-PET-Aufnahme zeigt nur die ventrale Tumorregion einen ^{18}F -FLT-Uptake, die dorsale hingegen nicht.

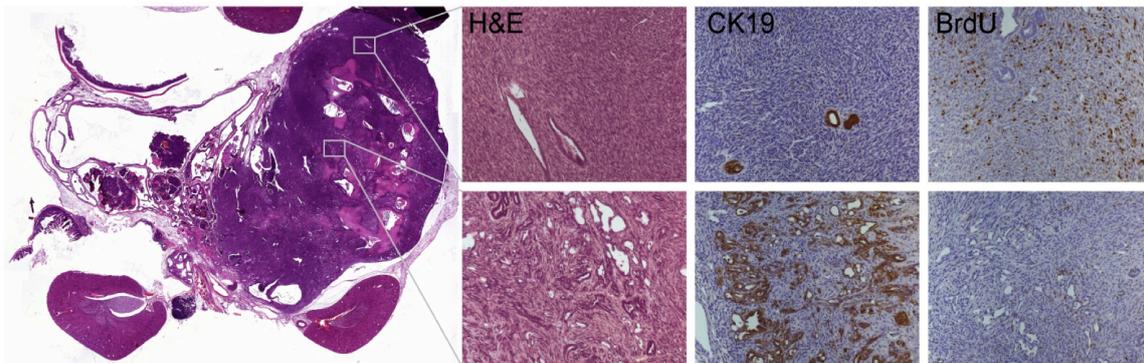


ABB. 5-35 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN (MAUS #510470)

Von links nach rechts: HE-Übersicht, HE-Ausschnitt, CK19-Färbung, BrdU-Färbung. Die obere Reihe zeigt den ^{18}F -FLT-PET-positiven Tumoranteil. Histologisch handelt es sich bei diesem Tumoranteil um einen sarkomatoid-anaplastischen Phänotyp. Deutliche CK19-Anfärbung des PDACs, weniger im sarkomatoid-anaplastischen Tumoranteil. Erwartungsgemäß ist der Anteil an BrdU-positiven Zellen in dem ^{18}F -FLT-PET positiven Tumorbereich signifikant höher als in dem ^{18}F -FLT-PET negativen Anteil.

5.5 MULTIMODALE LONGITUDINALE BILDGEBUNG

Exemplarisch wird an dieser Stelle eine CKTP R172H Maus vorgestellt, welche über einen Zeitraum von 22 Tagen eine multimodale Bildgebung erhalten hat. Hierbei wird deutlich, dass erst durch die Betrachtung der verschiedenen Bildgebungsmodalitäten eine genaue und frühzeitige Prognose gestellt werden kann.

In dieser CKTP R172H Maus erkannte man im frühen Stadium im ^{18}F -FDG-PET ein kleines Areal mit verminderter Traceranreicherung, welches im weiteren Verlauf an Größe zunahm. Im T2-MRTs zeigte sich eine diskrete Hyperintensität dieser Region. In der DWI-MRT war dieses Areal im frühen Stadium nicht abgrenzbar. Erst im weiteren Verlauf ließ sich dieses Areal auch in der DWI-MRT nachweisen. Erst in Zusammenschau der erhobenen Informationen aus den verschiedenen Bildgebungsmodalitäten konnte dieses Areal bildmorphologisch als spontane Nekrose gewertet werden. (Abb. 5-36)

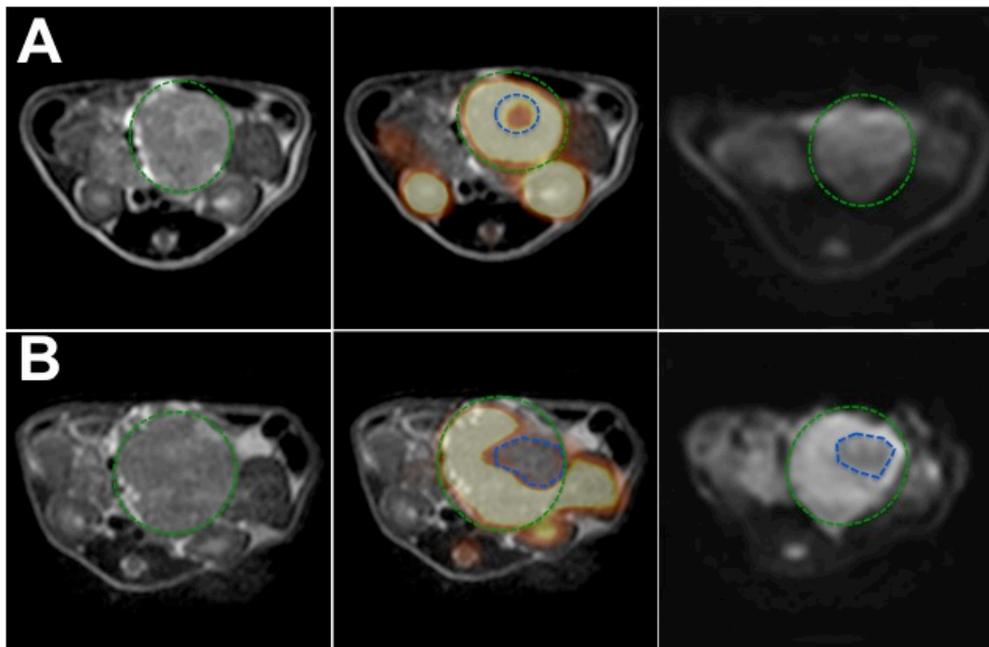


ABB. 5-36 T2-MRT, ^{18}F -FDG-PET FUSION, B600-BILD ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN

T2-MRT, Fusion T2-MRT und ^{18}F -FDG-PET und entsprechendes b600-Bild eines großen soliden Tumors (grüner Kreis) einer CKTP R172H Maus im Alter von 78 Tagen (A) und im Alter von 92 Tagen (B). Im Fusionsbild erkennt man ein kleines Areal (blauer Kreis) mit vermindertem Uptake (A, mittleres Bild), welches im Verlauf größer wird (B, mittleres Bild, blauer Kreis). Das entsprechende b600-Bild zeigt erst im Alter von 92 Tagen die nekrotische Region (B, rechtes Bild, blauer Kreis).

Zur weiteren Beurteilung wurden die Daten longitudinal im Diagramm dargestellt (Abb. 5-37). Dabei zeigte sich der deutlich verminderte ^{18}F -FDG-Uptake im nekrotischen Tumorabschnitt. Die T/M-Ratio im vitalen Tumor war deutlich höher und stieg auch im Verlauf weiter an. Das Volumen des vitalen Tumors war ebenfalls höher und nahm Verlauf auch kontinuierlich an Größe zu. Das Volumen des nicht-soliden Anteils nahm nur zwischen der

2. und 3. Messung (86. und 92. Lebensstag) zu. Der nekrotische Tumoranteil zeigte auch einen Anstieg des ADC-Wertes im Verlauf. Der ADC-Wert des vitalen Tumors war im Verlauf relativ konstant.

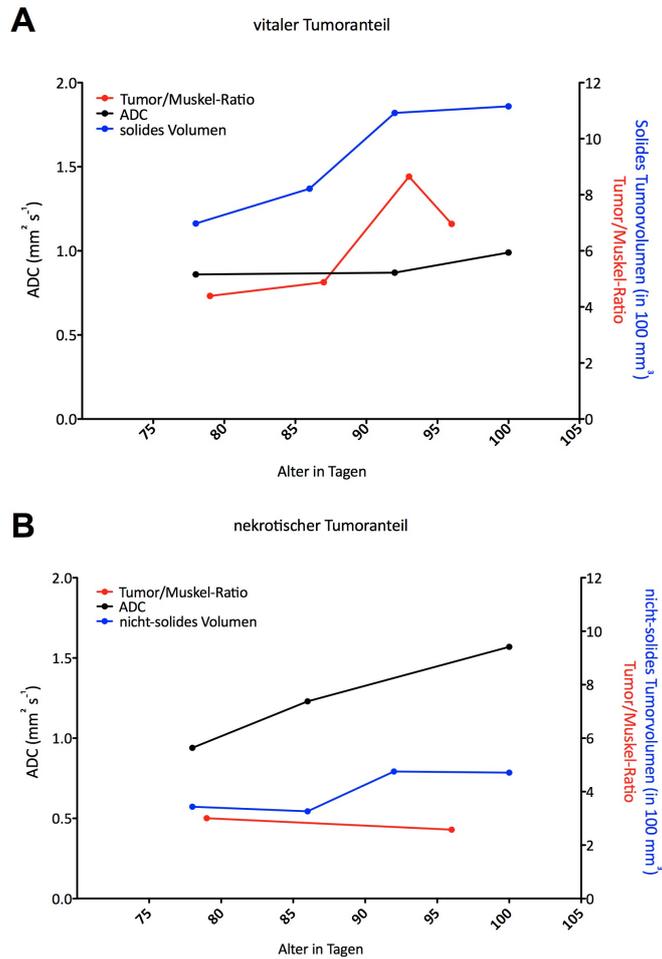


ABB. 5-37 VERLAUF TUMOR/MUSKEL-RATIO, ADC-WERT, VOLUMEN: VITALER UND NEKROTISCHER TUMORABSCHNITT

Es wird jeweils der Verlauf für die T/M-Ratio im ¹⁸F-FDG-PET, den ADC-Wert und das Volumen dargestellt. **A** stellt den vitalen Tumorabschnitt, **B** den nekrotischen Tumorabschnitt dar. Man erkennt eine geringere T/M-Ratio im nekrotischen Areal sowie einen Anstieg des ADC-Wertes im nekrotischen Tumoranteil. Das Volumen des vitalen Tumors nimmt kontinuierlich zu, auch das Volumen des nekrotischen Tumors nimmt leicht an Größe zu.

Mithilfe der ex vivo histologischen Auswertung lies sich durch Korrelation der bildmorphologisch gewonnen Daten mit den HE-Präparaten eine nekrotische Region bestätigen (Abb. 5-38).

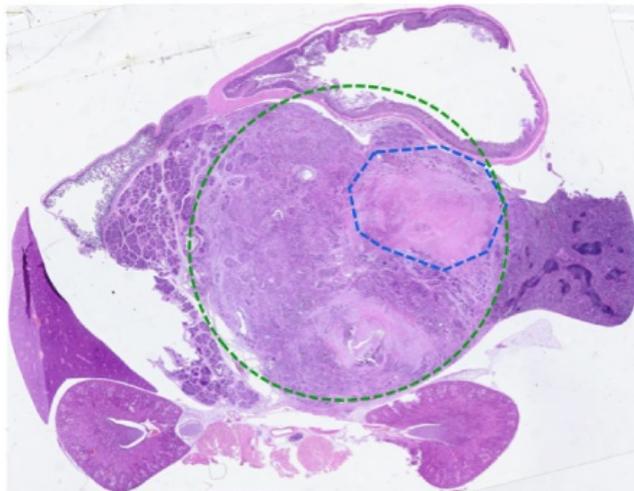


ABB. 5-38 HE-PRÄPARAT: VITALER UND NEKROTISCHER TUMOR

Histologisch lässt sich das in der multimodalen Bildgebung identifizierte nekrotische Areal verifizieren (grüner Kreis = solider vitaler Tumor; blauer Kreis = nekrotischer Tumoranteil).

5.6 ERGEBNISSE DER THERAPIEVERLAUFSKONTROLLE

5.6.1 SUBKUTANES TUMORMODELL

Es wurden nur Mäuse eingeschlossen, denen 3×10^5 Tumorzellen implantiert wurden, um eine Vergleichbarkeit der Volumina und der T/M-Ratio im ^{18}F -FDG-PET zu ermöglichen. Die mit Gemcitabin behandelte Therapiegruppe enthielt 6 Tiere mit je 2 Tumoren, also insgesamt 12 Tumoren ($n = 12$), die Kontrollgruppe ebenfalls 6 Tiere mit je 2 Tumoren, insgesamt also 12 Tumoren ($n = 12$).

In der Berechnung der Volumina zum Endpunkt wurden 6 Tiere (folglich 12 Tumoren, $n = 12$) aus der Therapiegruppe und 5 Tiere mit 10 Tumoren ($n = 10$) aus der Kontrollgruppe berücksichtigt, in dieser Gruppe wurde bei einer Maus die letzte MRT-Aufnahme nicht durchgeführt. Die mit Gemcitabin therapierten s.c. implantierten Tumoren zeigten eine signifikant geringere Größenzunahme im Vergleich zu den Kontrolltumoren. Das solide Endvolumen betrug in der Therapiegruppe 113,2 bis 403,0 mm^3 (Mean: 232,9; SD: 86,6). In der Kontrollgruppe betragen die Endvolumina 172,5 bis 579,3 mm^3 (Mean: 368,3; SD: 150,5). Der Mann-Whitney-Test ergab einen p-Wert $<0,05$, das Endvolumen der therapierten im Vergleich zu den nicht therapierten PDACs unterschied sich somit signifikant ($p = 0,0443$). (Abb. 5-39)

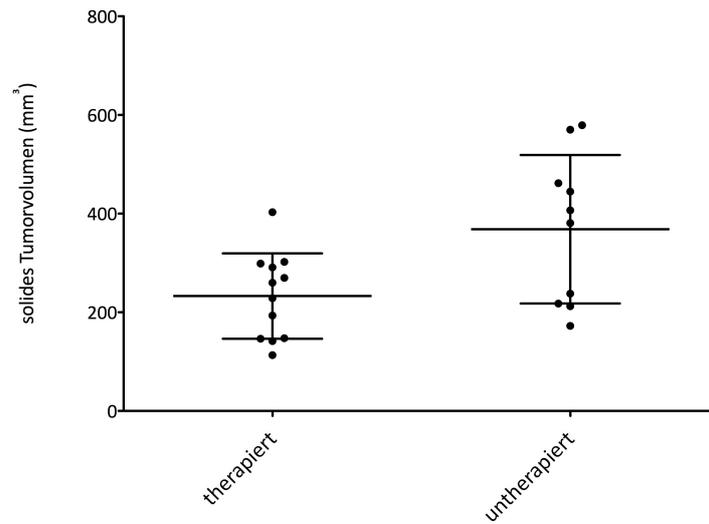


ABB. 5-39 VERGLEICH SOLIDES TUMORVOLUMEN: THERAPIERT VS. UNTHERAPIERT

Das solide Tumorvolumen der finalen T2-Aufnahme der therapierten sc-Mäuse und der untherapierten sc-Mäuse. Das Tumorvolumen ist bei den untherapierten Mäusen signifikant höher als bei den therapierten Mäusen ($p = 0,0443$).

Der relative nicht-solide Anteil zum Endpunkt betrug in der Gruppe der therapierten Tiere zwischen 4,8 und 14,1 % (Mean: 9,4 %, SD 2,77). Bei den untherapierten Mäusen betrug der Anteil zwischen 2,3 und 33,2 % (Mean: 12,5 %, SD: 9,00). Die beiden Gruppen unterschieden sich in diesem Merkmal nicht signifikant voneinander ($p = 0,4679$). (Abb. 5-40)

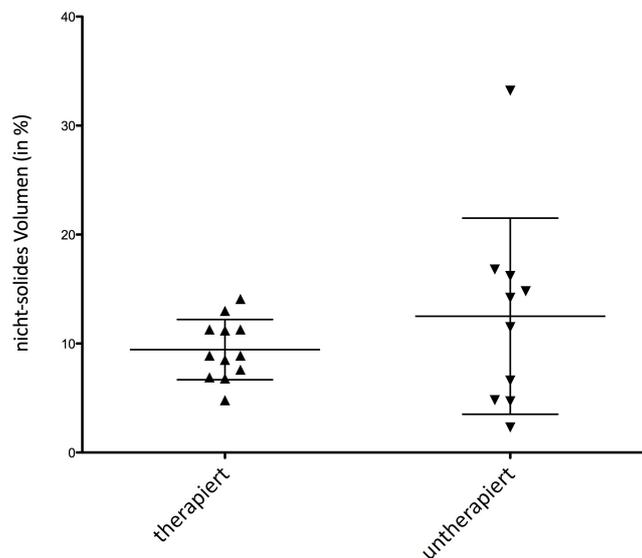


ABB. 5-40 VERGLEICH NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN (IN %): THERAPIERT VS. UNTHERAPIERT

Das relative nicht-solide Tumorvolumen unterscheidet sich im Endpunkt-MRT nicht signifikant voneinander.

9 Tiere mit 18 Tumoren (n = 18) der Therapiegruppe und 7 Tiere mit 14 Tumoren (n = 14) der Kontrollgruppe erhielten jeweils 2 ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahmen. Es wurde die relative Änderung über die Zeit betrachtet. In der Therapiegruppe wurde jeweils eine ¹⁸F-FDG-PET-Aufnahme vor und eine weitere 7 Tage nach Therapiebeginn angefertigt. Dabei zeigte sich in der Therapiegruppe eine Änderung der T/M-Ratio von 52 bis 190 % (Mean: 102,9 %, SD: 37,8). In der Kontrollgruppe variierte die T/M-Ratio in dem Zeitraum um 115 bis 286 % (Mean: 158,3; SD: 48,5). Die ¹⁸F-FDG-PET-Ratio zeigte in den therapierten Tumormäusen eine geringere Zunahme über die Zeit und blieb nahezu konstant in der Signalintensität. In der Kontrollgruppe war hingegen ein Anstieg des Signals und somit auch der T/M-Ratio zu beobachten. (Abb. 5-41)

Der Unterschied der T/M-Ratio zwischen therapierten und nicht-therapierten Tumoren war signifikant (p = 0,0016).

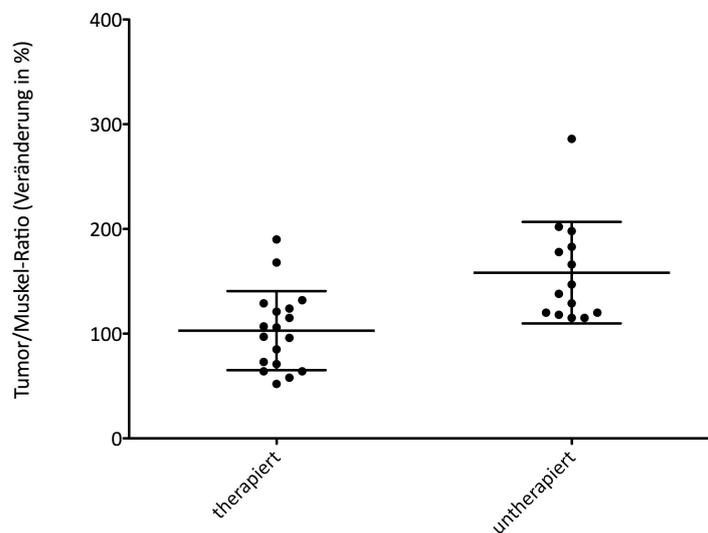


ABB. 5-41 RELATIVE ÄNDERUNG DER TUMOR-ZU-MUSKEL-RATIO

Es wird jeweils die Veränderung der T/M-Ratio vor und nach Therapie bzw. Placebo beobachtet. Die Gruppe der therapierten Mäuse zeigt einen signifikant geringeren Anstieg bzw. sogar einen Abfall der T/M-Ratio. Alle untherapierten Mäuse zeigen einen Anstieg der T/M-Ratio.

5.6.2 ENDOGENES TUMORMODELL

Einzelne Tiere des endogenen Modells erhielten eine Therapie mit Gemcitabin. In der Gruppe CKT wurden 4 Tiere mit 4 Tumoren (n = 4), in der Gruppe CKTP R172H 2 Tiere mit 2 Tumoren (n = 2) beobachtet. Dabei wurden die Tiere sowohl mittels Volumenmessung in der T2W-MRT sowie ADC-Messungen und ¹⁸F-FDG-PET-Untersuchungen im Verlauf beobachtet.

Es wurden bei 4 CKT Mäusen und bei einer CKTP R172H Maus das Volumen vor und nach Therapie ermittelt.

#210048 (CKT): Das solide Tumolvolumen stieg vor Therapie von 1500,3 mm³ auf 2346,9 mm³ an. Nach der ersten Gabe Gemcitabin sank das solide Volumen zunächst auf 1982,4 mm³ (-15,5 %), bevor es auf 2292,0 mm³ anstieg. Berücksichtigt man auch den nicht-soliden Anteil, so stieg das Gesamtvolumen von 2559,1 mm³ auf 3447,4 mm³ an und sank nach Therapiebeginn leicht ab auf 3292,7 mm³ (-4,5 %), anschließend stieg es auf 3631,2 mm³ an. Nach Therapie stieg bei dieser Maus der nicht-soliden Anteil des Tumolvolumens an (von 1100,5 mm³ direkt vor Therapiebeginn auf 1310,3 mm³ (+19,1 %)), wohingegen der solide Anteil abfiel.

#620019 (CKT): Das solide Tumolvolumen blieb zwischen den ersten beiden Messungen annähernd konstant bei zuerst 1332,1 mm³, dann 1347,9 mm³ und sank dann leicht auf 1247,5 mm³. Nach Therapiebeginn sank das solide Volumen weiter. Zunächst auf 1139,3 mm³ (-8,7 %), dann auf 1035,4 mm³ (-17,0 %). Der nicht-soliden Volumenanteil nahm in diesem Tier nach Therapiebeginn zunächst ab. Direkt vor Therapie betrug der nicht-soliden Anteil 538,6 mm³ (=100 %), nach Gabe von Gemcitabin nur noch 261,4 mm³ (-51,5 %); anschließend stieg er wieder an auf 361,1 mm³. Das Volumen nahm nach Therapiebeginn ab, jedoch war bereits vor Therapiestart ein Trend zur Volumenabnahme erkennbar.

#510599 (CKT): Vor Therapie stieg das solide Volumen von 1727,7 4 mm³ auf 1989,9 4 mm³ und weiter auf 2046,8 mm³ an, unter der Gemcitabintherapie stieg es zunächst weiter auf 2949,5 mm³ an und sank dann auf 2665,9 mm³. Das nicht-soliden Volumen stieg vor Therapie zunächst von 520,6 mm³ auf 873,3 mm³ an und fiel dann auf 664,2 mm³ ab. Nach Gemcitabin-Gabe stieg der nicht-soliden Anteil auf 1153,7 mm³ und sank dann leicht auf 944,2 mm³ ab.

#510633 (CKT): Das solide Tumolvolumen stieg über 62 Tage kontinuierlich von 282,3 mm³ auf 951,2 mm³ an. Nach Beginn der Chemotherapie stieg das Volumen weiter an auf zunächst 1066,4 mm³, dann auf 1198,0 mm³. Der nicht-soliden Anteil ist dabei zunächst ebenfalls kontinuierlich von 169,5 mm³ auf 456,5 mm³ angestiegen. Nach Therapiebeginn stieg der nicht-soliden Anteil überproportional stark auf 603,9 mm³ an und sank anschließend wieder auf 438,7 mm³ ab.

#510818 (CKTP R172H): Bei dieser Maus wurde nur eine Volumenmessung nach Therapiestart gemacht. Dabei zeigte sich zunächst ein Anstieg des soliden Volumens von 269,3 mm³ auf 510,3 mm³ vor Therapiestart und nach Gemcitabin-Gabe eine Abnahme auf 456,7 mm³. Der nicht-soliden Anteil stieg ebenfalls vor Therapie von 314,1 mm³ auf 396,0 mm³ an und sank nach Therapiestart auf 376,0 mm³ ab.

Es konnte unter Therapie keine bedeutsame Veränderung des Tumolvolumens ausgemacht werden.

ERGEBNISSE

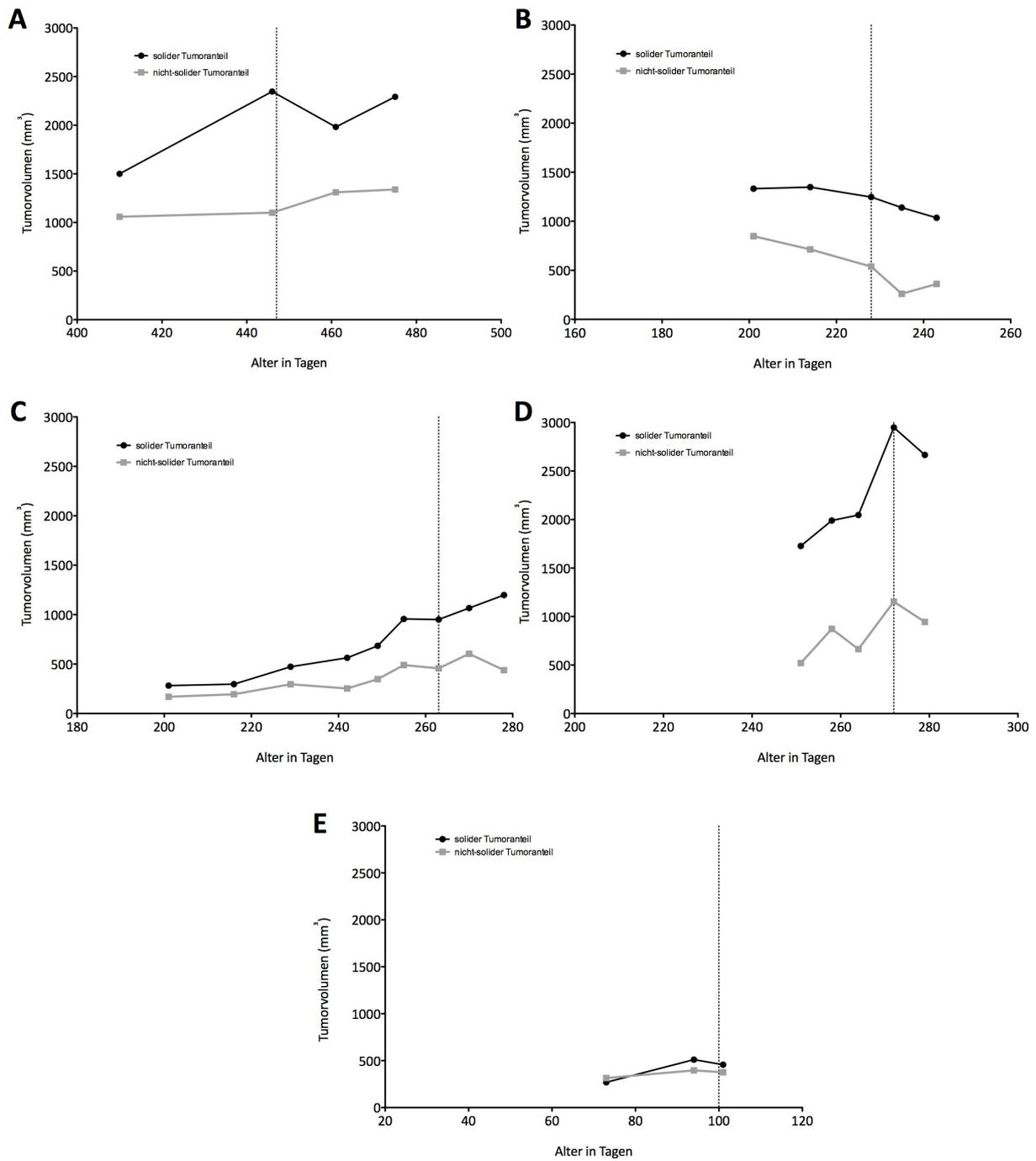


ABB. 5-42 VERLAUF SOLIDES UND NICHT-SOLIDES TUMORVOLUMEN THERAPIERTER MÄUSE

Die vertikalen gepunkteten Linien (.....) zeigen den jeweiligen Zeitpunkt des Therapiebeginns an.
A = CKT Maus (#210048), **B** = CKT Maus (#620019), **C** = CKT Maus (#510633), **D** = CKT Maus (#510599),
E = CKTP R172H Maus (#510818)

Ebenfalls wurde der ADC-Wert der therapierten Tiere ermittelt. Vier CKT Mäuse und eine CKTP R172H Maus wurde hier eingeschlossen. Dabei zeigte sich unmittelbar nach Gabe von Gemcitabin am Folgetag bei zwei von vier Tieren ein kurzfristiger Anstieg des ADC-Wertes. Bei den anderen beiden Tieren kam es zu einem Abfall des ADC-Wertes. Im weiteren Verlauf normalisierte sich der Wert wieder. Ebenfalls zu beobachten war eine deutliche intraindividuelle Schwankung der ADC-Werte im Verlauf.

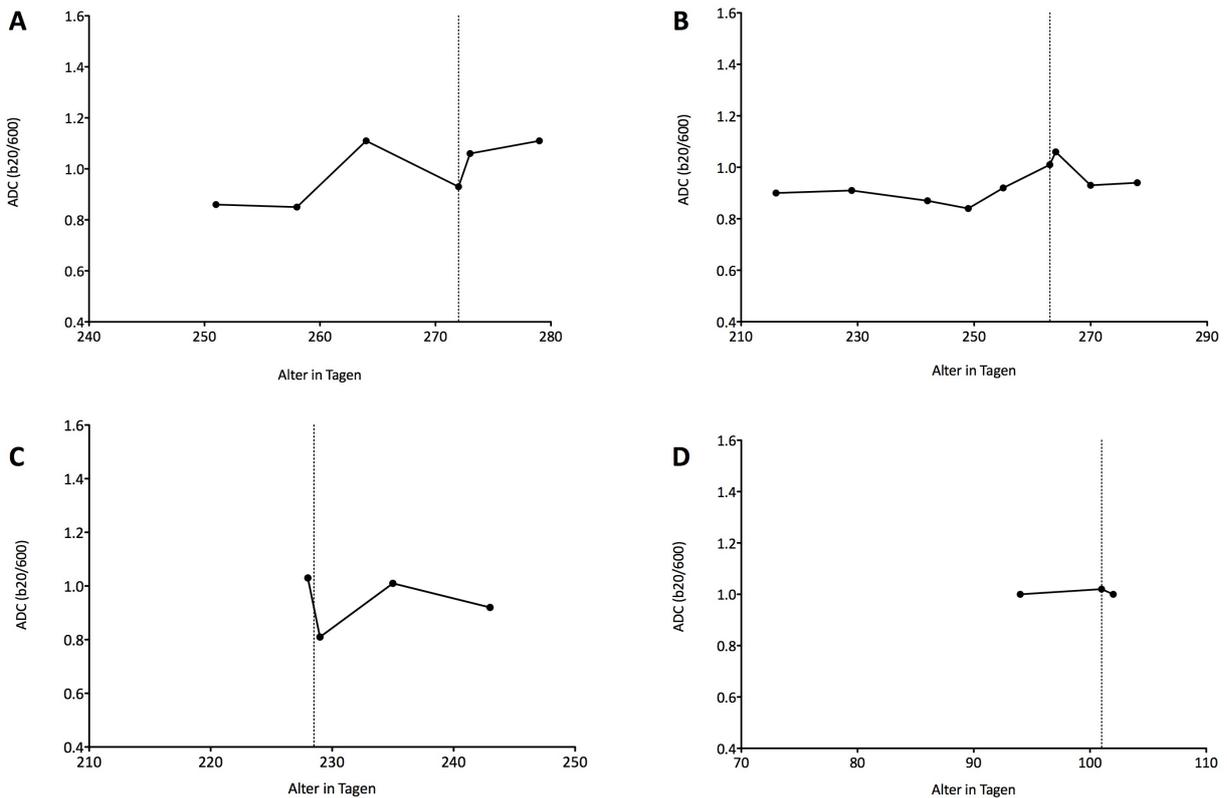


ABB. 5-43 VERLÄUFE ADC-WERTE

Ausgewählte Verläufe der ADC-Werte über die Zeit. Die vertikalen gepunkteten Linien (.....) zeigen den jeweiligen Zeitpunkt des Therapiebeginns an.

A = CKT Maus (#510599), **B** = CKT Maus (#510633), **C** = CKT Maus (#620019), **D** = CKTP R172H Maus (#510818). Man sieht eine deutliche intraindividuelle Schwankung der ADC-Werte, insbesondere in **A**. Nach Therapiebeginn steigt der ADC-Wert zunächst an (siehe **A, B**).

Die 4 therapierten CKT Tiere und ein therapiertes CKTP R172H Tier erhielten zusätzlich ¹⁸F-FDG-PET-Untersuchungen im Verlauf. Dabei zeigte sich ebenfalls keine signifikante Änderung der T/M-Ratio.

#210048 (CKT): Die T/M-Ratio betrug vor Therapiebeginn 1,7. Nach Gabe von Gemcitabin stieg die T/M-Ratio gering auf 1,97 an, sank dann gering auf zunächst 1,87 und anschließend auf 1,7. Insgesamt zeigten sich relativ konstante Werte der T/M-Ratio auch nach Therapiebeginn.

#620019 (CKT): Die T/M-Ratio zeigte sich vor Therapiebeginn sehr variabel, stieg zunächst von 3,02 auf 5,24 und sank dann wieder auf 3,08 ab. Nach Gabe von Gemcitabin sank die T/M-Ratio nur geringfügig auf 2,99 und stieg anschließend auf 3,53 und später auf 3,64 an.

#510633 (CKT): Zunächst stieg die T/M-Ratio von 2,76 auf 3,78 und weiter auf 4,99 an, anschließend sank die T/M-Ratio auf zunächst 4,03 und weiter auf 4,01, bevor sie wieder auf 4,76 anstieg. Nach Therapiebeginn war die T/M-Ratio annähernd stabil bei 4,81 bzw. 4,80.

#510599 (CKT): Vor Therapie stieg die T/M-Ratio von 1,9 auf 2,76 bevor die T/M-Ratio auf 2,39 absank und anschließend mit 2,42 nur geringfügig geringer war. Nach Gemcitabin-Therapie stieg die T/M-Ratio auf 3,33 an.

#510818 (CKTP R172H): Die T/M-Ratio stieg vor Therapie von 3,20 auf 3,41 an. Nach Therapiebeginn sank die T/M-Ratio auf 2,83.

ERGEBNISSE

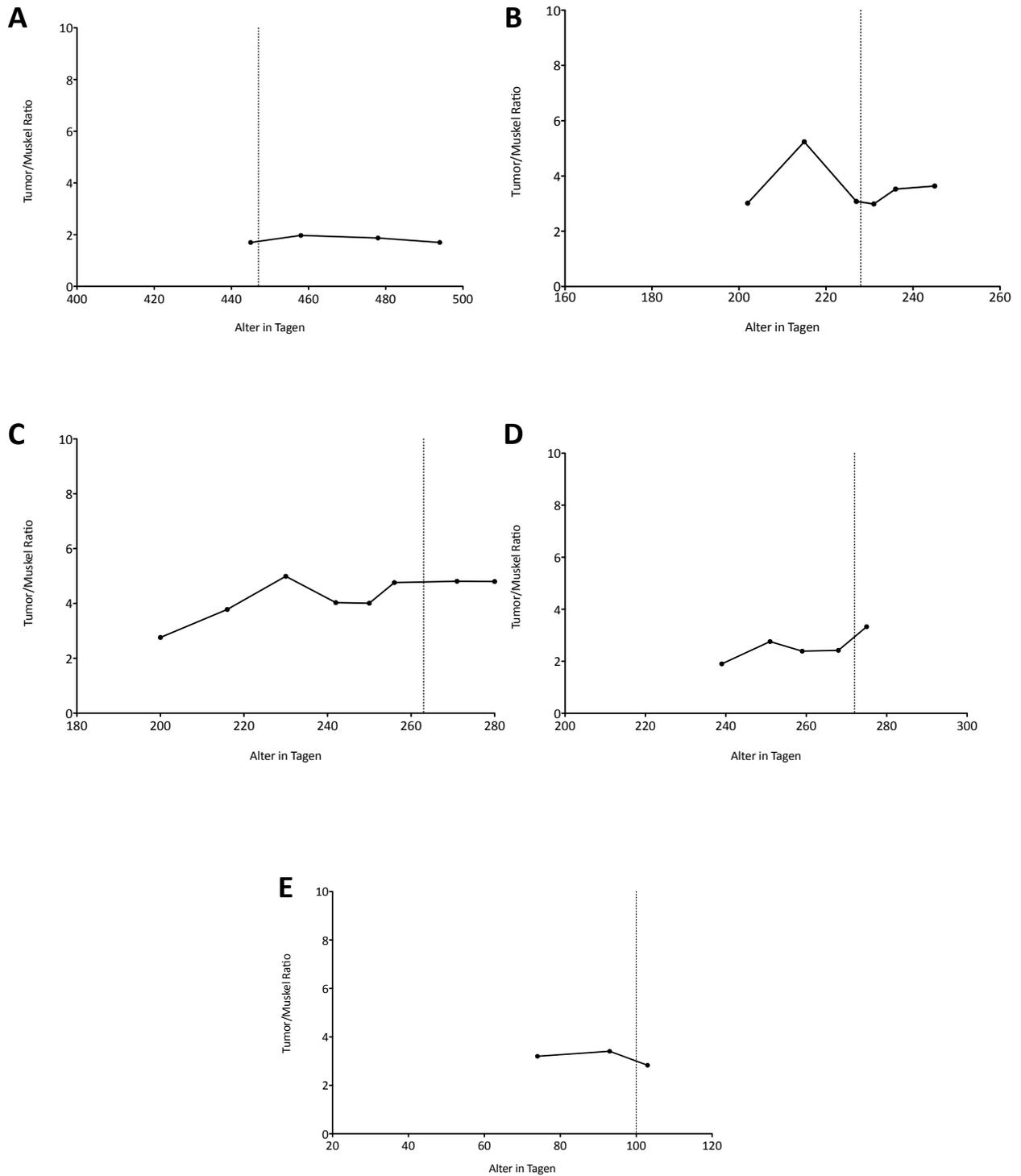


ABB. 5-44 VERLAUF TUMOR-ZU-MUSKEL-RATIO THERAPIERTER MÄUSE

Die vertikalen gepunkteten Linien (.....) zeigen den jeweiligen Zeitpunkt des Therapiebeginns an.
A = CKT Maus (#210048), **B** = CKT Maus (#620019), **C** = CKT Maus (#510633), **D** = CKT Maus (#510599),
E = CKTP R172H Maus (#510818)

6 DISKUSSION

Aufgrund frustraner Ergebnisse präklinisch erfolgreich getesteter Chemotherapeutika in klinischen Versuchen am PDAC ist der Einsatz eines suffizienten präklinischen Tiermodells unabdingbar. Trotz immer neuer Forschungsanstrengungen existierten bislang kaum Studien, welche die Heterogenität der endogenen Mausmodelle charakterisieren. Demzufolge wurden in dieser Arbeit mittels nicht-invasiver, multimodaler MRT und PET basierter Bildgebung die Tumorgroße, Diffusionsrestriktion und ^{18}F -FDG-Uptake verschiedener PDACs im endogenen und subkutanen Tumormodell evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine sichere Identifizierung der endogenen Tumore möglich ist. Vorläuferläsionen und Nekrosen konnten durch verminderten Tracer-Uptake im ^{18}F -FDG-PET im Vergleich zum PDAC und auch im T2-gewichteten MRT aufgrund der zum Tumor differenten Signalintensität (solide IPMN = hypointens) abgegrenzt werden. Mittels ^{18}F -FLT-PET konnten die Tumoren in der Regel nicht identifiziert werden; es ist somit nicht als Werkzeug der multimodalen, multiparametrischen Bildgebung in der Maus unter Verwendung endogener Tumoren geeignet. Lediglich bei der Frage, ob ein hochproliferativer Tumor vorliegt, kann es unter Umständen von Nutzen sein; diese Fragestellung bedarf weiterer Klärung. Des Weiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass der ADC-Wert mit der Zelldichte eines Tumors korreliert. Eine Unterscheidung zwischen Vorläuferläsionen und invasiven Karzinomen ist anhand des ADC-Wertes jedoch nicht möglich. In dieser Arbeit konnte nicht zuletzt auch der Unterschied zwischen subkutanen Tumormodellen und GEMM in präklinischen Versuchen aufgezeigt werden. Das GEMM spiegelt in hohem Maße die Pathogenitäten des humanen PDACs wider.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bieten schlussendlich eine wichtige Grundlage für weitere präklinische Forschungen.

6.1 DIE TUMORMODELLE

Die beiden Tumormodelle unterschieden sich signifikant voneinander. So zeigten sich die Tumoren des sc-Tumormodells sehr homogen in der T2-MRT, ebenso zeigte sich einen homogenen Tracer-Uptake im ^{18}F -FDG-PET. Auch in der histopathologischen Untersuchung zeigten sie ein homogenes Bild mit einer hoher Zellularität und einer gering ausgeprägten Stromakomponente. Die Tumoren wiesen im vitalen Gewebe keine Zysten auf, jedoch zeigte sich bei praktisch allen Tumoren eine zentrale Nekrose mit z.T. zystischer Umwandlung. Im Gegensatz hierzu zeigten sich die Tumoren des GEMMs in jeglicher Hinsicht heterogen. Erwartungsgemäß zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen, aber auch innerhalb eines Genotyps zeigten sich deutliche Heterogenitäten. Die Tumoren zeigten sich in der T2W-MRT von variabler Größe mit einem variablen Anteil zystischer Strukturen, auch der Tracer-Uptake im ^{18}F -FDG-PET zeigte eine große Streubreite. Histologisch konnten verschiedene Präkursorläsionen (IPMNs, PanINs)

nachgewiesen werden, auch hier waren die Tumore sehr heterogen mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Stromaanteil oder Anteil zystischer Strukturen. Zysten wurden häufiger und in größerer Ausdehnung im CKT-Tumormodell gefunden, bei CKP-Mäusen war der zystische Anteil am geringsten.

Auch der Verlauf der Tumorgenese zeigte sich heterogen. CKT-/CKTP-Mäuse entwickelten im Vergleich zu CKP-Mäusen signifikant früher invasive PDACs. Im Vergleich zu den CKT-Tumoren entwickelten sich CKP-/CKTP-Tumoren rascher und waren im Endvolumen durchschnittlich kleiner. Das langsame Tumorwachstum könnte eine mögliche Ursache des längeren Überlebens der CKT-Mäuse sein.

Im endogenen Tumormodell traten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diverse assoziierte Komorbiditäten auf, wie Metastasen, Aszites oder Pleuraergüsse. Im sc-Tumormodell wurden keinerlei solcher assoziierten Komorbiditäten beobachtet.

Die Tumoren der sc-Tiere und die der GEMMs unterschieden sich sowohl in der multimodalen Bildgebung wie auch histopathologisch signifikant voneinander. Es konnte gezeigt werden, dass die vorgestellten GEMMs sowohl bildmorphologisch wie auch histologisch die Eigenschaften des humanen PDACs in hohem Maße widerspiegeln und somit eine geeignete Grundlage für die präklinische PDAC-Forschung darstellen, gerade auch im Hinblick auf folgende Therapiestudien.

Olive et al. waren die ersten, die eine präklinische Therapiestudie an genetisch manipulierten Mausmodellen des PDACs durchführten. In dieser Studie wurden p53^{LSL-R172H} oder p53^{LSL-R270H} Mäuse verwendet, die daraus resultierenden PDACs zeigten eine schlechte Vaskularisation und einen hohen Stromaanteil, die sc-Tumoren hingegen zeigten eine gute Vaskularisation. Aus beiden Gruppen wurden Tiere mit Gemcitabin therapiert und eine Kontrollgruppe mit Kochsalz. Hierbei zeigten die therapierten endogenen Tumore keine Änderung der Wachstumskinetik gegenüber der Placebo-Gruppe. Die transplantierten Tumore hingegen zeigten unter Gemcitabin-Therapie ein vermindertes Wachstum. (Olive et al. 2009)

6.2 MRT UND HISTOLOGISCHE KORRELATION

In dieser Arbeit wurde ein 1,5T MRT-Scanner in Kombination mit einer kleinen Oberflächenspule verwendet. Häufig werden hochauflösende MR-Tomographen mit einer hohen Feldstärke von 7 oder 9,4T verwendet. Jedoch sind solche Geräte teuer in der Anschaffung und nicht zuletzt deshalb nicht sehr verbreitet, wohingegen 1,5 oder 3T MR-Tomographen häufig vorhanden sind. Ein Vorteil ist die relativ leichte Übertragung des Scanprotokolls in die klinische Routine. In mehreren Studien wurden 1,5 bzw. 3T Geräte erfolgreich angewendet (Braren et al. 2011; Samkoe et al. 2010). Doch bringt dies auch Nachteile: innerhalb einer vertretbaren Messzeit lässt sich nur eine geringe Ortsauflösung erzielen und daraus resultiert wiederum ein hoher Partialvolumeneffekt. Histologische Korrelationen mit den T2-Aufnahmen zeigen jedoch eine gute Übereinstimmung und eine gute Abgrenzung von soliden Tumoren, IPMN-Läsionen, Nekrosen und Zysten. Aussagen über das Grading konnten anhand der T2-Aufnahmen nicht getroffen werden.

Aufgrund der enormen Unterschiede in der Tumormorphologie und -genese ist die Datenauswertung der endogenen Tumoren erschwert. Bildmorphologische Auswertungen sind in transplantierten, homogenen Tumoren simpler, da diese einen ähnlichen Gehalt an Zysten und Fibrose aufweisen. Die möglichst exakte Bestimmung des Tumolvolumens spielt eine große Rolle. Insbesondere im Hinblick auf das Ansprechen auf Chemotherapeutika ist es nach wie vor ein wichtiger Parameter (vgl. *Response Evaluation Criteria In Solid Tumor Volumina* (RECIST) (Eisenhauer et al. 2009)) und wird daher in vielen präklinischen Tierstudien angewandt (Aliu et al. 2009; Braren et al. 2011; Kim, H. et al. 2008). Da auch der nekrotische Anteil als möglicher prädiktiver Wert für eine antitumorale Therapie angesehen werden kann (Braren et al. 2011), ist es von großer Bedeutung, solide Tumoranteile von nicht-soliden Anteilen, also zystischen und/oder nekrotischen Anteilen, zu unterscheiden. Daher wurde in dieser Dissertationsarbeit eine Volumenauswertung mittels Segmentierung durchgeführt, was auch im Hinblick auf folgende Therapiestudien bedeutsam ist.

Aufgrund der Inhomogenität der endogenen Tumormodelle ist eine automatisierte Tumorerkennung nicht möglich, manuell gezeichnete ROIs unterliegen aber Schwankungen und dürfen folglich als Fehlerquelle nicht außer Acht gelassen werden. Die durchgeführte Threshold-Segmentierung der T2-MRT-Aufnahmen mit einem festgesetzten Threshold bei einem Grauwert von 9000 ist kritisch zu bewerten. Die gängigsten Methoden in der Literatur bedienen sich häufig Histogramm-basierter Analysen, die den für den jeweiligen Datensatz entsprechenden Threshold liefern (siehe unter anderem bei *Sezgin* (Sezgin 2004)). Im Vorfeld wurden zunächst Auswertungen mittels dieser Methode (Auswahl des Thresholds anhand des Minimums zwischen zweier Maxima im Histogramm) getätigt (Daten werden nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass es in den unterschiedlichen Aufnahmen zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Segmentierung kam – in der einen Aufnahme wurden bestimmte Grauwerte und die damit verbundenen Strukturen der soliden Masse, in einer anderen den nicht-soliden Anteilen zugerechnet, was zum einem an unterschiedlichen Helligkeiten der einzelnen Aufnahmen, zum anderen an dem meist nicht bimodalen Histogramm liegt. Da diese Auswertungen nicht zu einem gewünschten Mehrgehalt an Informationen führten, wurde eine Equalisierung durchgeführt und ein fixer Threshold für alle Aufnahmen festgelegt. Darunter zeigten sich die Ergebnisse der Segmentierung als deutlich zuverlässiger. Nicht-solide hyperintense Strukturen, vor allem Zysten, konnten von soliden hypointensen Strukturen abgegrenzt werden. Da die nicht-soliden Tumoranteile abhängig von der Größe eines Tumors sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die relativen nicht-soliden Anteile berechnet um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen.

Da mehrere T2-Messungen im Verlauf durchgeführt wurden, war eine longitudinale Betrachtung möglich. Dabei zeigte sich, dass die kalkulierten soliden und nicht-soliden Tumolvolumina der endogenen Tumormodelle nicht nur inter-, sondern auch intraindividuell schwankten.

In den endogenen Tumormodellen traten häufig auch Aszites und Metastasen auf, welche allesamt in der T2-MRT identifiziert werden konnten. Diese Charakteristika werden typischerweise auch beim menschlichen PDAC gefunden. Im Gegensatz hierzu zeigten die transplantierten Tiere keine derartigen zusätzlichen Charakteristika. In den T2-MRT-Aufnahmen zeigte sich bei fast allen sc-Tumoren im Verlauf eine meist zentrale hyperintense Struktur. Dies konnte histologisch als Nekrose oder zystische Umwandlung einer Nekrose gesichert werden. Dies wurde bereits in diversen Studien beschrieben, unter anderem in Xenograft-

Modellen des kolorektalen Adenokarzinomes (Kirkland und Bailey 1986) und des Melanoms (Lyng et al. 2000) sowie in Xenograft-Modellen des PDACs (Glazer et al. 2010; Nakamura et al. 2010). Möglicherweise liegt dies an einem akzelerierten Tumorwachstum, Unterschieden in der Tumorkomposition oder Unterschieden in der Blutversorgung. Um diesbezüglich genauere Aussagen tätigen zu können, sollte ein erweitertes Bildgebungsprotokoll, welches eine DCE- und DWI-MRT umfasst, angewendet werden.

Es konnten alle in den T2-Aufnahmen identifizierten Tumoren auch histologisch in den HE-Präparaten gesichert werden. Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen bildmorphologisch identifizierten nekrotischen Tumorgewebe und den HE-Präparaten.

Die karzinogenen Läsionen weisen begleitend entweder PanIN oder IPMN Läsionen auf, was vermuten lässt, dass das PDAC der $Kras^{G12D};Ela-TGF\alpha$ Mäuse aus zwei unterschiedlichen Präkursor Läsionen hervorgeht. Jedoch erlaubt die HE-Färbung nur eine eingeschränkte Beurteilung der Tumorkomposition. Färbungen mit BrdU und CK19 wurden nur versuchsweise durchgeführt. In weiteren Studien sollte ein größeres Augenmerk auf die histologische Aufarbeitung gelegt werden, um noch genauere Informationen über die einzelnen Tumoren zu erhalten.

6.3 DWI-MRT

Ebenfalls wurde eine Diffusionsbildgebung der endogenen wie auch der transplantierten Tumoren durchgeführt. Bei den endogenen Tieren konnten anhand der gewonnenen Bilddaten ADC-Werte berechnet werden. Die subkutanen Tumoren konnten hingegen nicht ausgewertet werden, da durch massive Suszeptibilitätsartefakte die Bilddaten nicht verwertbar waren. In der Literatur gibt es verschiedene Ansätze, um den Suszeptibilitätsartefakt an Gewebe-Luft-Übergängen zu reduzieren. Zum einen wurde von *Landuyt et al.* eine spezielle elastische Masse aus Alginat hergestellt, welche über den sc-Tumoren aufgetragen wurde (*Landuyt et al. 2002*), zum anderen wurde in einer Studie von *Maeda et al.* bei Anwendung einer sogenannten line-scan-DWI (TR/TE 2376 - 3124ms/57,1 - 70,7ms, Matrix 128 x 128 Spalten, Bandbreite 3,91 kHz, zwei b-Werte: b5 und b1000) keine Suszeptibilitätsartefakte mehr beobachtet (*Maeda et al. 2005*). Für weitere Versuche mit subkutanen Tumoren sollte eine dieser Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.

Die errechneten ADC-Werte aller endogenen Tumormodelle zeigten eine inverse Korrelation zu einer semiquantitativ bestimmten Zelldichte. Auch *Humphries et al.* gelangen zu dieser Erkenntnis in ihrer pädiatrischen Studie an 19 extrakraniellen soliden Tumoren (*Humphries et al. 2007*). Ein Vergleich der ADC-Werte zwischen normalem Pankreasgewebe und PDAC der Mäuse war aufgrund der kleinen Organgröße nicht möglich. Vergleiche zwischen gesundem Pankreas und eines PDAC im Menschen zeigen in den Tumoren deutlich geringere ADC-Werte als in nicht-tumorösen Geweben (*Fattahi et al. 2009*; *Muraoka et al. 2008*; *Wang et al. 2011a*). Die ADC-Werte des CKT- und des CKTP R172H-Modells unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Eine Unterscheidung zwischen IPMN-Präkursorläsionen und solidem PDAC war mittels ADC-Wert nicht möglich. Meines Wissens gibt es bislang nur eine Studie, die ADC-Werte von IPMN-

Läsionen und soliden Tumoren vergleicht. In dieser Studie zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen IPMN und MCN, jedoch zeigten niedrig-dysplastische oder benigne Läsionen höhere ADC-Werte (Sandrasegaran et al. 2011). In dieser Arbeit wurde der Dysplasiegrad nicht in den Auswertungen berücksichtigt.

Durch Berechnung des ADC-Wertes konnte gezeigt werden, dass der ADC-Wert im nekrotischen Gewebe deutlich höher als im vitalen Tumorgewebe ist. Auch *Lewandowski et al.* konnten in einem orthotopen PDAC-Modell des Kaninchens nekrotisches Tumorgewebe von vitalem Tumorgewebe anhand eines signifikant höheren ADC-Wertes unterscheiden (Lewandowski et al. 2010).

6.4 PET

Zur Analyse des Tracer-Uptakes im PET wurde eine 3D-ROI in das anreichernde Tumorareal gelegt. In einer Studie von *Herrmann et al.* konnte gezeigt werden, dass 3D-ROIs genauere Ergebnisse liefern als 2D-ROIs (Herrmann et al. 2011). Zur Berechnung der SUV *Mean values* wurden lediglich die höchsten 50 % der Pixelwerte berücksichtigt. Der Vorteil dieser Methode ist zum einen die Vermeidung falsch niedriger Werte durch die Miteinbeziehung der wenig anreichernden Tumorumgebung, zum anderen die bessere Reproduzierbarkeit und die Unabhängigkeit von der Tumormorphologie und Tumorgöße (Krak et al. 2005; Lee et al. 2000). Der 50 % Threshold zeigte in einer Studie von *Krak et al.* eine höhere Reproduzierbarkeit als der 75 % Threshold (Krak et al. 2005). Bildfusionierungen wurden routinemäßig für endogene PDAC-Tumoren erstellt. Eine direkt aufeinanderfolgende Bildgebung im MRT und im PET wäre nur mittels kombiniertem PET-MRT-Geräte adäquat realisierbar. Daher kommt es zu kleineren Veränderungen, zum einen durch eine leicht abweichende Lagerung, zum anderen durch geringe Verschiebungen der Bauchorgane aufgrund eines veränderten Darmgasgehaltes. Diese Veränderungen lassen sich durch manuelle Fusion der Bilddaten annähernd ausgleichen. Es wurden auch PET-CT Aufnahmen durchgeführt (die Daten werden in dieser Arbeit nicht gezeigt); diese ermöglichten zwar die Aufnahme der beiden Modalitäten in einer Untersuchung und damit eine identische Anatomie, jedoch war der Weichteilkontrast in den CT-Aufnahmen zu gering, um daraus spezifische Informationen über das PDAC zu gewinnen.

Die in der T2-MRT identifizierten soliden Tumoren konnten alle auch im ^{18}F -FDG-PET identifiziert werden. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Traceranreicherung in den IPMN-Vorläuferläsionen. Dies wurde auch bereits durch *Delbeke et al.* beobachtet (Delbeke et al. 1999). *Fendrich et al.* konnten ebenfalls einen geringeren, jedoch deutlich sichtbaren FDG-Uptake in PanINs von *LsL-Kras^{G12D};Pdx1-Cre*-Mäusen sehen (Fendrich et al. 2011). Bei den transplantierten Tieren wurde ein leichter Anstieg der T/M-Ratio im Verlauf beobachtet, eine höhere Zahl implantierter Tumorzellen zeigte dabei eine tendenziell höhere T/M-Ratio. Die Werte der T/M-Ratio schwankten bei den endogenen Tieren in der longitudinalen Beobachtung. Die T/M-Ratio des CKT-Modells war ähnlich hoch wie die des CKT R172H-Tiermodells. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei subkutanen und endogenen Tumoren deuten erneut auf die Heterogenität des endogenen

Tumormodells hin, wo sich die Tumoranatomie und -komposition im Verlauf verändert. Einige Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Änderung von beispielsweise Zelldichte oder Proliferationsrate mit dem ^{18}F -FDG-Tracer-Uptake (Henriksson et al. 2007; Kitagawa et al. 2003). Des Weiteren können alimentäre Veränderungen, wie sie z.B. in einem fortgeschrittenen Tumorstadium auftreten, ebenfalls Auswirkungen auf den ^{18}F -FDG-Uptake haben. Eine veränderte Blutglukosekonzentration kann die ^{18}F -FDG-Anreicherung verändern: so führen höhere Blutglukosekonzentrationen zu einem verminderten Uptake (Diederichs et al. 1998). Eine erhöhte Blutglukosekonzentration ist auch in einem fortgeschrittenen Stadium des Pankreaskarzinoms zu finden, da zunehmend die insulinproduzierenden β -Zellen zerstört werden.

Mittels ^{18}F -FDG-PET konnten Metastasen sicher identifiziert werden. Die T/M-Ratio zeigte ähnliche Werte wie die der soliden Primarien.

^{18}F -FLT-PET-Aufnahmen wurden durchgeführt, da in klinischen Studien gute Ergebnisse mittels ^{18}F -FLT-PET erzielt wurden und sogar eine Überlegenheit des ^{18}F -FLT-PETs gegenüber ^{18}F -FDG-PET suggeriert wurde (Buck et al. 2003; Herrmann et al. 2007). Auch in einer klinischen PDAC-Studie wurde dieser Erfolg erzielt: *Herrmann et al.* konnten zeigen, dass beim humanen PDAC mit einer Sensitivität von 71,4 % im ^{18}F -FLT-PET ein erhöhter Tracer-Uptake zu finden war, des Weiteren waren keine der benignen Pankreasläsionen mit einem erhöhten Tracer-Uptake assoziiert (Herrmann et al. 2008). Auch in Tiermodellen wurde ^{18}F -FLT als Tracer mit guten Ergebnissen getestet. *Von Forstner et al.* konnten in einem orthotopen Modell mit humanen Pankreaskarzinomzelllinien in SCID-Mäusen einen signifikanten ^{18}F -FLT-Uptake in den soliden Tumoren nachweisen, wohingegen der ^{18}F -FDG-Uptake nur bei 50 % der Tiere signifikant erhöht war (von Forstner et al. 2008). Ein weiterer Grund für die Mitaufnahme der ^{18}F -FLT-PET in das multimodale Bildgebungsprotokoll war die potentiell bessere Beurteilung der Tumorrespons, da Chemotherapeutika den Zellzyklus hemmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen jedoch den Ergebnissen der Literatur. Lediglich in einem hochproliferativen Tumoranteil wurde ein erhöhter ^{18}F -FLT-Tracer-Uptake festgestellt. Eine mögliche Erklärung für die ungleichen Ergebnisse könnte eine unterschiedliche Aktivität der TK1 in den Tumoren sein (Rasey et al. 2002). Eine jüngere Studie von *Herrmann et al.* aus dem Jahr 2012, welche 46 Patienten mit Pankreastumoren umfasst, zeigt eine Überlegenheit des ^{18}F -FDG-PETs (Sensitivität 92 %) gegenüber dem ^{18}F -FLT-PET (Sensitivität 72 %) bei der Diagnostik von malignen Pankreastumoren (Herrmann et al. 2012).

6.5 MULTIMODALE LONGITUDINALE BILDGEBUNG

Eine Herausforderung des endogenen Tumormodells ist die komplexe Heterogenität, beginnend bei dem ungewissen Zeitpunkt der Tumormanifestation sowie die heterogene Tumorkomposition hinsichtlich Größe, Fibrosegehalt und spontaner Nekrosen sowie Größe und Anzahl der Zysten. Demgemäß ist es schwierig, den richtigen Zeitpunkt der Tumorentstehung mittels Bildgebung festzuhalten und auch die Auswertungen bedürfen einer genauen, manuellen Analyse. Mithilfe dieser Arbeit konnten die etwaigen Zeiträume für den Beginn der longitudinalen Bildgebungsstudie ermittelt werden. So sollte bei Tieren der CKT-Zellreihe ab

einem Alter von 1 Monat, bei CKP-Tieren ab 2 Monaten und bei CKTP R172H- und CKTP fl+/- Mäusen ab einem Alter von 2 Wochen zweiwöchentliche MRT-Untersuchungen durchgeführt werden; bei positivem soliden Tumorbefund sollte zusätzlich eine DWI-MRT durchgeführt und eine ^{18}F -FDG-PET-Untersuchung geplant werden. Bei weiteren Studien sollte ein an den entsprechenden Genotyp adaptiertes Bildgebungsprotokoll berücksichtigt und etabliert werden.

Es ist schwierig für eine solche heterogene Gruppe wie die des endogenen Tiermodells, standardmäßig den Mean- und SD-Wert der ^{18}F -FDG-PET-Untersuchung anzugeben. Die komplexe Heterogenität der Tumorgroße, Tumorkomposition und Pathophysiologie bleiben dabei unberücksichtigt.

Durch multimodale Betrachtung ist es möglich, frühzeitige Veränderungen festzustellen. So können beispielsweise spontane Nekrosen durch Begutachtung von T2-, DWI-MRT und ^{18}F -FDG-PET sicher identifiziert werden.

6.6 THERAPIEVERSUCHE

Zur Feststellung welche Kombination der bildgebenden Verfahren am besten zu einer Therapieverlaufskontrolle geeignet ist, wurden multimodale Bildgebungsdaten erhoben. Zunächst wurden die Bildgebungsmodalitäten im sc-Mausmodell getestet und anschließend versuchsweise im endogenen Modell angewendet. Für die Therapieversuche wurde das Standardchemotherapeutikum Gemcitabin verwendet.

Therapieversuche mit Gemcitabin zeigten in dieser Studie deutliche Erfolge im subkutanen Tumormodell. Das solide Volumen war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger. Andere Studien untermauern dieses Ergebnis. In einem orthotopen PDAC-Modell an immundefizienten Mäusen zeigten *He et al.* ein signifikant geringeres Tumorstadium unter Gemcitabin-Therapie (*He et al.* 2000). Auch *Mohammed et al.* zeigten ein signifikant geringeres Tumorstadium unter Gemcitabin-Therapie in einem orthotopen Tumormodell bei SCID-Mäusen (*Mohammad et al.* 1998). Im Gegensatz hierzu weicht das nicht-solide Tumorstadium nicht signifikant voneinander ab. Dieses Ergebnis überrascht, da bei einer Therapieresponse von einer Zunahme der Nekrose auszugehen ist (wie zum Beispiel bei *Glazer et al.* (*Glazer et al.* 2010)), welche sich hyperintens darstellt und somit dem nicht-soliden Tumorstadium zuzuordnen wäre. Mögliche Erklärungen könnten zum einen der große Anteil spontaner Nekrosen in den nicht-therapierten Tieren sein, zum anderen können natürlich auch Ungenauigkeiten in der Auswertung, beispielsweise aufgrund des Thresholdes oder des Auswerters, ursächlich sein.

Diverse klinische Studien belegen, dass das ^{18}F -FDG-PET ein geeignetes Bildgebungstool für die Evaluierung der Therapieresponse darstellt (*Denecke et al.* 2005; *Weber* 2005). Bislang existieren jedoch kaum tierexperimentelle Studien zu diesem Thema. In dieser Dissertationsarbeit zeigten die therapierten sc-Mäuse eine signifikant geringere T/M-Ratio im ^{18}F -FDG-PET. *Shah et al.* konnten in ihrem orthotopen PDAC-Modell

eine Abnahme des SUV_{mean} unter Therapie mit Gemcitabin und Anti-EMMPRIN Antikörper⁵ zeigen (Shah et al. 2012).

Die Tumore des endogenen Modells zeigten im Vergleich zu den sc-Tumoren ein sehr heterogenes Verhalten. Es existieren nur wenige präklinische Arbeiten, welche endogene und transplantierte PDAC-Tiermodelle in einer Therapiestudie beobachten. In einer der wenigen präklinischen Studien zeigte sich an einem murinen *LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H;Pdx-1-Cre*-Tumormodell nach Gabe von Gemcitabin (alleine oder in Kombination mit Dimethylaminoparthenolid) eine nicht-signifikante Abnahme des Tumolvolumens, eine Überlebensverlängerung konnte ebenfalls beobachtet werden (Yip-Schneider et al. 2013). *Olive et al.* konnten einen deutlichen Unterschied zwischen transplantierten und endogenen murinen PDAC-Modellen feststellen; so konnte im endogenen Modell nach Gabe von Gemcitabin keine Änderung der Wachstumskinetik identifiziert werden (Olive et al. 2009).

Ähnlich heterogen zeigte sich die T/M-Ratio im ¹⁸F-FDG-PET. Die prätherapeutische Heterogenität der T/M-Ratio setzte sich auch posttherapeutisch fort.

Die DWI-MRT wurde bereits mehrfach in präklinischen und klinischen Therapiestudien erfolgreich getestet (Braren et al. 2011; Galons et al. 1999; Kim, H. et al. 2008; Kim, S. et al. 2009; Li, S. P. und Padhani 2012; Yankeelov et al. 2007). *Braren et al.* zeigten in einem HCC-Rattenmodell den prädiktiven Nutzen des ADC-Wertes für ein Therapieansprechen nach transarterieller Embolisation (Braren et al. 2011).

In dieser Arbeit konnte nach Gabe von Gemcitabin bei einer Maus ein kurzzeitiger, bei einer anderen ein langzeitiger Anstieg der ADC-Werte beobachtet werden. *Kim et al.* beobachteten einen signifikanten Anstieg des ADC-Wertes einen Tag nach Gabe des Chemotherapeutikums. Seiner Forschungsgruppe gelang es, einen deutlichen Therapieeffekt unter Gemcitabin und TRA-8⁶ in den MRT-Volumina und im DWI-MRT darzustellen. Es kam zu einer deutlichen Tumolvolumenabnahme und einem Anstieg des ADC-Wertes. Ein früher Anstieg des ADC-Wertes war dabei mit einer frühen Apoptose und einem verlängerten Überleben assoziiert. Allerdings handelte es sich bei dem Tumormodell um ein orthotopes Tumormodell mit MIA-PaCa-2-Zellen in immundefizienten Mäusen. (Kim, H. et al. 2008)

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in den zentralen Regionen der ADC-Wert nach Chemotherapie am stärksten ansteigt (Morse et al. 2007). Dies sollte in weiteren Studien bei der ROI-Zeichnung berücksichtigt werden. Weiter ist die Höhe des prätherapeutischen ADC-Wertes für die Tumorrespons und die damit assoziierte Veränderung des ADC-Wertes entscheidend. So konnte gezeigt werden, dass ein initial hoher ADC-Wert mit einem schlechteren Outcome und einem geringeren ADC-Anstieg verbunden ist (DeVries et al. 2003).

⁵ Anti-EMMPRIN Antikörper: EMMPRIN steht für *extracellular matrix metalloproteinase inducer* und ist auch bekannt unter CD147; dabei handelt es sich um ein membrangebundenes Glykoprotein, welches eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression spielt (Shah et al. 2012).

⁶ TRA-8 ist ein monoklonaler Antikörper, der an den *death-receptor 5* bindet und damit die Apoptose induziert

Insgesamt ist die beobachtete Kohorte zu klein und der Beobachtungszeitraum nach Chemotherapie zu kurz, um genauere Informationen aus den erhobenen Daten gewinnen zu können. Es kann aber geschlussfolgert werden, dass die Therapieerfolge des sc-Modells im endogenen Tumormodell nicht erzielt werden können. Dieses Ergebnis wurde erwartet und bestätigt die Annahme, dass ein endogenes Tumormodell, welches die humanen Konditionen widerspiegelt, ein schlechtes Outcome in chemotherapeutischen Studien zeigt. Jedoch muss die geringe Fallzahl der untersuchten Tiere berücksichtigt werden. Da aber bereits anhand der kleinen Fallzahl ein Nichtansprechen der Gemcitabin-Therapie im endogenen Mausmodell abzusehen ist und ein Ansprechen auf Gemcitabin im sc-Tumormodell gezeigt werden konnte, ist gleichwohl davon auszugehen, dass die hier untersuchten endogenen Tumormodelle geeignete Modelle für weitere präklinische Therapiestudien des PDACs darstellen. Insbesondere im endogenen Tumormodell erscheint eine longitudinale und multimodale Bildgebung notwendig, um frühzeitige Änderungen in der Tumorkomposition zu detektieren und Responder von Non-Respondern zu unterscheiden.

Auch andere Studien zeigen, dass durch Kombination von anatomischen Daten aus CT oder MRT mit funktionellen Daten aus dem PET meist eine genauere Aussage bezüglich Tumorrespons getätigt werden kann - so beispielsweise *Shah et al.* (Shah et al. 2012).

6.7 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Tumoren der endogenen Mausmodelle sind sehr heterogen in ihrem Erscheinungsbild. Sie können mittels multimodaler Bildgebung, wie die histologische Korrelation belegt, zuverlässig identifiziert werden. Alle in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Methoden, bis auf das ^{18}F -FLT-PET, eignen sich hierfür. Anhand der multimodalen MRT-Untersuchung und der ^{18}F -FDG-PET konnten solide und zystische Anteil, sowie Nekrosen abgegrenzt werden. Durch Fusion der T2-MRT und ^{18}F -FDG-PET können noch präzisere Analysen gemacht und bereits kleinere Tumore ausgewertet werden. Das DWI-MRT erlaubte Aussagen über die Zellularität.

Zur Identifizierung und Charakterisierung des PDACs stellt ein multimodales Bildgebungskonzept, bestehend aus T2-MRT, DWI-MRT und ^{18}F -FDG-PET, folglich ein geeignetes Werkzeug dar. Der ^{18}F -FLT Tracer erscheint nur bei ausgewählten hoch-proliferativen endogenen Tumoren zur Bildgebung einsetzbar; diesbezüglich sind weitere Untersuchungen notwendig. Zur Verlaufsbeobachtung scheint ebenfalls eine multimodale Bildgebung notwendig um so frühzeitige Änderungen der Tumormorphologie zuverlässig zu erkennen. Bezüglich der Auswahl der Bildgebungsmethode für Therapiestudien kann anhand der vorliegenden Daten noch keine abschließende Aussage getätigt werden. Das ^{18}F -FDG-PET zeigt in den s.c. implantierten Tumoren sehr gute Resultate, bei den endogenen Tumoren ist anhand der vorliegenden Daten noch kein eindeutiger Trend erkennbar. Eine Therapiestudie mit einer größeren Kohorte sollte daher unbedingt folgen. Gleiches gilt für die Volumenbestimmung im T2-MRT. Des Weiteren sollte eine line-scan-DWI in das MRT-Scanprotokoll aufgenommen werden. Hierbei wird nur eine Linie pro Repetitionszeit angeregt, eine zweite Fourier-Transformation in der Phasenkodierrichtung ist hierbei nicht notwendig. Suszeptibilitätsartefakte, die

aufgrund der Phasenverschiebung zu Fehllokalisierung des Signals führen, werden somit unterbunden. Dies ermöglicht eine ADC-Wert-Messung auch an s.c.-Tumoren. Darüber hinaus sollte eine KM-Untersuchung in das MRT-Scanprotokoll aufgenommen werden. Anhand der DCE-MRT könnten weitere Kenntnisse hinsichtlich der Tumorkomposition erlangt werden. Bereits mehrere Studien haben eine DCE-MRT in Tiermodellen erfolgreich getestet (Braren et al. 2011; Li, S. P. und Padhani 2012). Darüber hinaus wurden in Therapiestudien Nekrosen mittels DCE-MRI sicher identifiziert (Braren et al. 2011).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) gehört immer noch zu den Erkrankungen mit sehr schlechter Prognose. Trotz enormer Forschungsanstrengungen ist es bislang nicht gelungen, die Erfolge präklinisch getesteter Substanzen auch in klinischen Studien zu erzielen. Ursächlich hierfür ist unter anderem die Nutzung ungeeigneter Tumormodelle, die nicht die komplexe Heterogenität des humanen PDACs widerspiegeln. Ein detailliertes Wissen des spontanen Verlaufes der Tumorprogression ist wichtig zur korrekten Interpretation von spontanen und therapieinduzierten oder physiologischen Veränderungen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene endogene und transplantierte Tumore des PDACs im Mausmodell mittels multimodaler nicht-invasiver Bildgebung untersucht. Dabei wurden anatomische und funktionelle Informationen aus T2-MRT, DWI-MRT sowie ^{18}F -FDG- und ^{18}F -FLT-PET gewonnen und ausgewertet. 1.) Alle Modalitäten, bis auf das ^{18}F -FLT-PET, konnten die soliden Tumoren identifizieren. Das ^{18}F -FLT-PET zeigte nur bei einem sarkomatoid-anaplastischen Tumor einen erkennbaren ^{18}F -FLT-Uptake. 2.) Das s.c. Tumormodell zeigte einen homogenen Verlauf in der Volumenzunahme und der T/M-Ratio im ^{18}F -FDG-PET; die DWI-MRT war aufgrund der starken Suzeptibilitätsartefakte (bei subkutaner Lage mit angrenzender Luft) nicht verwertbar. Die endogenen Modelle zeigten sich sehr heterogen mit interindividuellen Schwankungen innerhalb einer genetischen Gruppe. In einem fortgeschrittenen Tumorstadium traten im endogenen, nicht aber im transplantierten Tumormodell, Aszites, Pleuraergüsse und Metastasen auf. 3.) Nekrosen konnten mittels T2-MRT, DWI-MRT sowie ^{18}F -FDG-PET abgegrenzt werden. 4.) Ein multimodales Bildgebungsprotokoll ist notwendig, um möglichst genaue Aussagen bzgl. Tumorkomposition und frühes Ansprechen auf Chemotherapeutika zu ermöglichen.

In einem Therapieversuch mit dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabin konnte im s.c. Tumormodell gezeigt werden, dass sowohl die T2-MRT wie auch das ^{18}F -FDG-PET geeignete Modalitäten zur Beurteilung eines Therapieansprechens sind. Therapieversuche im endogenen Modell zeigten kein eindeutiges Ansprechen auf Gemcitabin. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich nochmals die Wertigkeit des endogenen Modells, welches bei geringer Ansprechrate (vergleichbar der humanen Situation bei ca. 10%) und heterogenem Spontanverlauf, eine individuelle Korrelation von Bildgebung, klinischem Verlauf und Histologie erfordert.

Eine Weiterführung der Versuche unter Einbeziehung der modifizierten DWI-MRT im s.c. Tumormodell sollte zunächst die Aussagekraft der DWI-MRT für die Frage der Therapierespons eruieren. Anschließend sollte eine große kontrollierte Doppelblind-Therapiestudie am endogenen Mausmodell folgen, welche mittels longitudinaler und multimodaler Bildgebung (T2-MRT, DWI-MRT, DCE-MRT und ^{18}F -FDG-PET) evaluiert werden sollte. Daran anknüpfend können dann weitere potentielle Chemotherapeutika an dem etablierten Mausmodell und dem etablierten Bildgebungsprotokoll getestet und auch beim Menschen angewandt werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamek, H.E., Albert, J., Breer, H., Weitz, M., Schilling, D., Riemann, J.F. Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *Lancet*. (2000) **356**: 190-193.
- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., DePinho, R.A. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. (2003) **17**: 3112-3126.
- Ahrendt, S.A., Pitt, H.A. Surgical management of pancreatic cancer. *Oncology (Williston Park)*. (2002) **16**: 725-734; discussion 734, 736-728, 740, 743.
- Aliu, S.O., Wilmes, L.J., Moasser, M.M., Hann, B.C., Li, K.L., Wang, D., Hylton, N.M. MRI methods for evaluating the effects of tyrosine kinase inhibitor administration used to enhance chemotherapy efficiency in a breast tumor xenograft model. *J Magn Reson Imaging*. (2009) **29**: 1071-1079.
- Balci, N.C., Semelka, R.C. Radiologic diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Radiol*. (2001) **38**: 105-112.
- Bardeesy, N., Aguirre, A.J., Chu, G.C., Cheng, K.H., Lopez, L.V., Hezel, A.F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., Hanahan, D., Redston, M.S., Chin, L., Depinho, R.A. Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2006a) **103**: 5947-5952.
- Bardeesy, N., Cheng, K.H., Berger, J.H., Chu, G.C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A.F., Horner, J., Lauwers, G.Y., Hanahan, D., Depinho, R.A. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev*. (2006b) **20**: 3130-3146.
- Bardeesy, N., Depinho, R.A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*. (2002) **2**: 897-909.
- Bardeesy, N., Sharpless, N.E., Depinho, R.A., Merlino, G. The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model. *Semin Cancer Biol*. (2001) **11**: 201-218.
- Bohmig, M., Rosewicz, S. [Pancreatic carcinoma]. *Z Gastroenterol*. (2004) **42**: 261-268.
- Brambs, H., Claussen, C. Pancreatic and ampullary carcinoma. Ultrasound, computed tomography, magnetic resonance imaging and angiography. *Endoscopy*. (1993) **25**: 58-68.
- Braren, R., Altomonte, J., Settles, M., Neff, F., Esposito, I., Ebert, O., Schwaiger, M., Rummeny, E., Steingotter, A. Validation of preclinical multiparametric imaging for prediction of necrosis in hepatocellular carcinoma after embolization. *J Hepatol*. (2011) **55**: 1034-1040.
- Buck, A.K., Halter, G., Schirrmeister, H., Kotzerke, J., Wurzigler, I., Glatting, G., Mattfeldt, T., Neumaier, B., Reske, S.N., Hetzel, M. Imaging proliferation in lung tumors with PET: 18F-FLT versus 18F-FDG. *J Nucl Med*. (2003) **44**: 1426-1431.
- Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., Von Hoff, D.D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. (1997) **15**: 2403-2413.

- Carmichael, J., Fink, U., Russell, R.C., Spittle, M.F., Harris, A.L., Spiessi, G., Blatter, J. Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer.* (1996) **73**: 101-105.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J.B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* (2011) **364**: 1817-1825.
- Cubilla, A.L., Fortner, J., Fitzgerald, P.J. Lymph node involvement in carcinoma of the head of the pancreas area. *Cancer.* (1978) **41**: 880-887.
- Delbeke, D., Rose, D.M., Chapman, W.C., Pinson, C.W., Wright, J.K., Beauchamp, R.D., Shyr, Y., Leach, S.D. Optimal interpretation of FDG PET in the diagnosis, staging and management of pancreatic carcinoma. *J Nucl Med.* (1999) **40**: 1784-1791.
- Denecke, T., Rau, B., Hoffmann, K.T., Hildebrandt, B., Ruf, J., Gutberlet, M., Hunerbein, M., Felix, R., Wust, P., Amthauer, H. Comparison of CT, MRI and FDG-PET in response prediction of patients with locally advanced rectal cancer after multimodal preoperative therapy: is there a benefit in using functional imaging? *Eur Radiol.* (2005) **15**: 1658-1666.
- DeVries, A.F., Kremser, C., Hein, P.A., Griebel, J., Krezcy, A., Ofner, D., Pfeiffer, K.P., Lukas, P., Judmaier, W. Tumor microcirculation and diffusion predict therapy outcome for primary rectal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2003) **56**: 958-965.
- Diederichs, C.G., Staib, L., Glatting, G., Beger, H.G., Reske, S.N. FDG PET: elevated plasma glucose reduces both uptake and detection rate of pancreatic malignancies. *J Nucl Med.* (1998) **39**: 1030-1033.
- DiGiuseppe, J.A., Hruban, R.H., Goodman, S.N., Polak, M., van den Berg, F.M., Allison, D.C., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol.* (1994) **101**: 684-688.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., Verweij, J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* (2009) **45**: 228-247.
- Ellenrieder, V., Adler, G., Gress, T.M. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Ann Oncol.* (1999) **10 Suppl 4**: 46-50.
- Fattahi, R., Balci, N.C., Perman, W.H., Hsueh, E.C., Alkaade, S., Havlioglu, N., Burton, F.R. Pancreatic diffusion-weighted imaging (DWI): comparison between mass-forming focal pancreatitis (FP), pancreatic cancer (PC), and normal pancreas. *J Magn Reson Imaging.* (2009) **29**: 350-356.
- Fendrich, V., Schneider, R., Maitra, A., Jacobsen, I.D., Opfermann, T., Bartsch, D.K. Detection of precursor lesions of pancreatic adenocarcinoma in PET-CT in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Neoplasia.* (2011) **13**: 180-186.
- Freelove, R., Walling, A.D. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician.* (2006) **73**: 485-492.
- Friess, H., Kleeff, J., Korc, M., Buchler, M.W. Molecular aspects of pancreatic cancer and future perspectives. *Dig Surg.* (1999) **16**: 281-290.
- Galons, J.P., Altbach, M.I., Paine-Murrieta, G.D., Taylor, C.W., Gillies, R.J. Early increases in breast tumor xenograft water mobility in response to paclitaxel therapy detected by non-invasive diffusion magnetic resonance imaging. *Neoplasia.* (1999) **1**: 113-117.

Gisselsson, D., Jonson, T., Petersen, A., Strombeck, B., Dal Cin, P., Hoglund, M., Mitelman, F., Mertens, F., Mandahl, N. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2001) **98**: 12683-12688.

Glazer, E.S., Zhu, C., Massey, K.L., Thompson, C.S., Kaluarachchi, W.D., Hamir, A.N., Curley, S.A. Noninvasive radiofrequency field destruction of pancreatic adenocarcinoma xenografts treated with targeted gold nanoparticles. *Clin Cancer Res.* (2010) **16**: 5712-5721.

Goggins, M., Hruban, R.H., Kern, S.E. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol.* (2000) **156**: 1767-1771.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., Barbacid, M. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell.* (2003) **4**: 111-120.

Haglund, C., Roberts, P.J., Kuusela, P., Scheinin, T.M., Makela, O., Jalanko, H. Evaluation of CA 19-9 as a serum tumour marker in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* (1986) **53**: 197-202.

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

Heinemann, V., Quietzsch, D., Gieseler, F., Gonnermann, M., Schonekas, H., Rost, A., Neuhaus, H., Haag, C., Clemens, M., Heinrich, B., Vehling-Kaiser, U., Fuchs, M., Fleckenstein, D., Gesierich, W., Uthgenannt, D., Einsele, H., Holstege, A., Hinke, A., Schalhorn, A., Wilkowski, R. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* (2006) **24**: 3946-3952.

Henriksson, E., Kjellen, E., Wahlberg, P., Ohlsson, T., Wennerberg, J., Brun, E. 2-Deoxy-2-[18F] fluoro-D-glucose uptake and correlation to intratumoral heterogeneity. *Anticancer Res.* (2007) **27**: 2155-2159.

Herrmann, K., Bundschuh, R.A., Rosenberg, R., Schmidt, S., Praus, C., Souvatzoglou, M., Becker, K., Schuster, T., Essler, M., Wieder, H.A., Friess, H., Ziegler, S.I., Schwaiger, M., Krause, B.J. Comparison of different SUV-based methods for response prediction to neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer by FDG-PET and MRI. *Mol Imaging Biol.* (2011) **13**: 1011-1019.

Herrmann, K., Eckel, F., Schmidt, S., Scheidhauer, K., Krause, B.J., Kleeff, J., Schuster, T., Wester, H.J., Friess, H., Schmid, R.M., Schwaiger, M., Buck, A.K. In vivo characterization of proliferation for discriminating cancer from pancreatic pseudotumors. *J Nucl Med.* (2008) **49**: 1437-1444.

Herrmann, K., Erkan, M., Dobritz, M., Schuster, T., Siveke, J.T., Beer, A.J., Wester, H.J., Schmid, R.M., Friess, H., Schwaiger, M., Kleeff, J., Buck, A.K. Comparison of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography (FLT PET) and FDG PET/CT for the detection and characterization of pancreatic tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2012) **39**: 846-851.

Herrmann, K., Ott, K., Buck, A.K., Lordick, F., Wilhelm, D., Souvatzoglou, M., Becker, K., Schuster, T., Wester, H.J., Siewert, J.R., Schwaiger, M., Krause, B.J. Imaging gastric cancer with PET and the radiotracers 18F-FLT and 18F-FDG: a comparative analysis. *J Nucl Med.* (2007) **48**: 1945-1950.

Herzog, H., Hichwa, R.D. (1999). Image reconstruction, quantification and standard uptake value. PET in clinical oncology. H.J. Wieler und R.E. Coleman. Darmstadt, Steinkopff Verlag: 19-33.

Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., Depinho, R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* (2006) **20**: 1218-1249.

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright,

- C.V., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D.A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. (2003) **4**: 437-450.
- Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., Tuveson, D.A. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. (2005) **7**: 469-483.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Anver, M.R., Biankin, A.V., Boivin, G.P., Furth, E.E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Lauwers, G.Y., Longnecker, D.S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G.J., Perez-Gallego, L., Redston, M., Tuveson, D.A. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res*. (2006) **66**: 95-106.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Longnecker, D.S., Luttges, J., Offerhaus, G.J. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. (2001) **25**: 579-586.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S.E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. (2000) **6**: 2969-2972.
- Humphries, P.D., Sebire, N.J., Siegel, M.J., Olsen, O.E. Tumors in pediatric patients at diffusion-weighted MR imaging: apparent diffusion coefficient and tumor cellularity. *Radiology*. (2007) **245**: 848-854.
- Irie, H., Honda, H., Kaneko, K., Kuroiwa, T., Yoshimitsu, K., Masuda, K. Comparison of helical CT and MR imaging in detecting and staging small pancreatic adenocarcinoma. *Abdom Imaging*. (1997) **22**: 429-433.
- Jackson, E.L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R.T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., Tuveson, D.A. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*. (2001) **15**: 3243-3248.
- Johnson, J.I., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L.V., Venditti, J.M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., Sausville, E.A. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. (2001) **84**: 1424-1431.
- Kamisawa, T., Isawa, T., Koike, M., Tsuruta, K., Okamoto, A. Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas*. (1995) **11**: 345-349.
- Kamisawa, T., Takuma, K., Anjiki, H., Egawa, N., Hata, T., Kurata, M., Honda, G., Tsuruta, K., Suzuki, M., Kamata, N., Sasaki, T. Differentiation of Autoimmune Pancreatitis From Pancreatic Cancer by Diffusion-Weighted MRI. *Am J Gastroenterol*. (2010) **105**: 1870-1875.
- Kauffmann, Moser, Sauer (2006). *Radiologie*. München, Urban & Fischer.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., Wright, C.V. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*. (2002) **32**: 128-134.
- Keogan, M.T., Tyler, D., Clark, L., Branch, M.S., McDermott, V.G., DeLong, D.M., Coleman, R.E. Diagnosis of pancreatic carcinoma: role of FDG PET. *AJR Am J Roentgenol*. (1998) **171**: 1565-1570.
- Kerbel, R.S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther*. (2003) **2**: S134-139.
- Kim, H., Morgan, D.E., Buchsbaum, D.J., Zeng, H., Grizzle, W.E., Warram, J.M., Stockard, C.R., McNally, L.R., Long, J.W., Sellers, J.C., Forero, A., Zinn, K.R. Early therapy evaluation of combined anti-death receptor 5 antibody and gemcitabine in orthotopic pancreatic tumor xenografts by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Cancer Res*. (2008) **68**: 8369-8376.

- Kim, S., Loevner, L., Quon, H., Sherman, E., Weinstein, G., Kilger, A., Poptani, H. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for predicting and detecting early response to chemoradiation therapy of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* (2009) **15**: 986-994.
- Kindler, H.L., Friberg, G., Singh, D.A., Locker, G., Nattam, S., Kozloff, M., Taber, D.A., Karrison, T., Dachman, A., Stadler, W.M., Vokes, E.E. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* (2005) **23**: 8033-8040.
- Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M.F., O'Reilly, E., Wozniak, T.F., Picus, J., Bhargava, P., Mayer, R.J., Schilsky, R.L., Goldberg, R.M. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol.* (2010) **28**: 3617-3622.
- Kindler, H.L., Wroblewski, K., Wallace, J.A., Hall, M.J., Locker, G., Nattam, S., Agamah, E., Stadler, W.M., Vokes, E.E. Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs.* (2012) **30**: 382-386.
- Kirkland, S.C., Bailey, I.G. Establishment and characterisation of six human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer.* (1986) **53**: 779-785.
- Kitagawa, Y., Sano, K., Nishizawa, S., Nakamura, M., Ogasawara, T., Sadato, N., Yonekura, Y. FDG-PET for prediction of tumour aggressiveness and response to intra-arterial chemotherapy and radiotherapy in head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2003) **30**: 63-71.
- Koh, D.M., Collins, D.J. Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology. *AJR Am J Roentgenol.* (2007) **188**: 1622-1635.
- Kojima, K., Vickers, S.M., Adsay, N.V., Jhala, N.C., Kim, H.G., Schoeb, T.R., Grizzle, W.E., Klug, C.A. Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res.* (2007) **67**: 8121-8130.
- Koster, A., van Krieken, J.H., Mackenzie, M.A., Schraders, M., Borm, G.F., van der Laak, J.A., Leenders, W., Hebeda, K., Raemaekers, J.M. Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res.* (2005) **11**: 154-161.
- Krak, N.C., Boellaard, R., Hoekstra, O.S., Twisk, J.W., Hoekstra, C.J., Lammertsma, A.A. Effects of ROI definition and reconstruction method on quantitative outcome and applicability in a response monitoring trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2005) **32**: 294-301.
- Landuyt, W., Sunaert, S., Farina, D., Meijerink, M., Beatse, E., Van Hecke, P., Hermans, R., Marchal, G., Lambin, P., Bosmans, H. In vivo animal functional MRI: improved image quality with a body-adapted mold. *J Magn Reson Imaging.* (2002) **16**: 224-227.
- Laubenberger, T., Laubenberger, J. (1999). Technik der medizinischen Radiologie: Diagnostik, Strahlentherapie, Strahlenschutz; für Ärzte, Medizinstudenten und MTRA; [mit 71 Tabellen], Deutscher Ärzteverlag.
- Laun, F., Fritzsche, K., Kuder, T., Stieltjes, B. Einführung in die Grundlagen und Techniken der Diffusionsbildgebung. *Der Radiologe.* (2011) **51**: 170-179.
- Lee, J.R., Madsen, M.T., Bushnell, D., Menda, Y. A threshold method to improve standardized uptake value reproducibility. *Nucl Med Commun.* (2000) **21**: 685-690.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF) (2013). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-010OL. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.

Lewandowski, R.J., Eifler, A.C., Bentrem, D.J., Chung, J.C., Wang, D., Woloschak, G.E., Yang, G.Y., Ryu, R., Salem, R., Larson, A.C., Omary, R.A. Functional magnetic resonance imaging in an animal model of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* (2010) **16**: 3292-3298.

Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J.L. Pancreatic cancer. *Lancet.* (2004) **363**: 1049-1057.

Li, S.P., Padhani, A.R. Tumor response assessments with diffusion and perfusion MRI. *J Magn Reson Imaging.* (2012) **35**: 745-763.

Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., Carter, C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* (2006) **66**: 11851-11858.

Lohr, M., Schmidt, C., Ringel, J., Kluth, M., Muller, P., Nizze, H., Jesnowski, R. Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* (2001) **61**: 550-555.

Louvet, C., Labianca, R., Hammel, P., Lledo, G., Zampino, M.G., Andre, T., Zaniboni, A., Ducreux, M., Aitini, E., Taieb, J., Faroux, R., Lepere, C., de Gramont, A. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol.* (2005) **23**: 3509-3516.

Lyng, H., Haraldseth, O., Rofstad, E.K. Measurement of cell density and necrotic fraction in human melanoma xenografts by diffusion weighted magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine.* (2000) **43**: 828-836.

Maeda, M., Kato, H., Sakuma, H., Maier, S.E., Takeda, K. Usefulness of the apparent diffusion coefficient in line scan diffusion-weighted imaging for distinguishing between squamous cell carcinomas and malignant lymphomas of the head and neck. *AJNR Am J Neuroradiol.* (2005) **26**: 1186-1192.

Mazur, P.K., Siveke, J.T. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut.* (2012) **61**: 1488-1500.

Mertz, H.R., Sechopoulos, P., Delbeke, D., Leach, S.D. EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc.* (2000) **52**: 367-371.

Mohammad, R.M., Al-Katib, A., Pettit, G.R., Vaitkevicius, V.K., Joshi, U., Adsay, V., Majumdar, A.P., Sarkar, F.H. An orthotopic model of human pancreatic cancer in severe combined immunodeficient mice: potential application for preclinical studies. *Clin Cancer Res.* (1998) **4**: 887-894.

Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* (2007) **25**: 1960-1966.

Morse, D.L., Galons, J.P., Payne, C.M., Jennings, D.L., Day, S., Xia, G., Gillies, R.J. MRI-measured water mobility increases in response to chemotherapy via multiple cell-death mechanisms. *NMR Biomed.* (2007) **20**: 602-614.

Moser, E. (2006). Kapitel 6 - Nuklearmedizin. Radiologie (Third Edition). Kauffmann et al. Munich, Urban & Fischer: 287-330.

Moskaluk, C.A., Hruban, R.H., Kern, S.E. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* (1997) **57**: 2140-2143.

- Munch-Petersen, B., Cloos, L., Jensen, H.K., Tyrsted, G. Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Adv Enzyme Regul.* (1995) **35**: 69-89.
- Muraoka, N., Uematsu, H., Kimura, H., Imamura, Y., Fujiwara, Y., Murakami, M., Yamaguchi, A., Itoh, H. Apparent diffusion coefficient in pancreatic cancer: characterization and histopathological correlations. *J Magn Reson Imaging.* (2008) **27**: 1302-1308.
- Nagai, H., Kuroda, A., Morioka, Y. Lymphatic and local spread of T1 and T2 pancreatic cancer. A study of autopsy material. *Annals of surgery.* (1986) **204**: 65.
- Nagakawa, T., Kayahara, M., Ohta, T., Ueno, K., Konishi, I., Miyazaki, I. Patterns of neural and plexus invasion of human pancreatic cancer and experimental cancer. *International Journal of Pancreatology.* (1991) **10**: 113-119.
- Nakamura, K., Sasajima, J., Mizukami, Y., Sugiyama, Y., Yamazaki, M., Fujii, R., Kawamoto, T., Koizumi, K., Sato, K., Fujiya, M., Sasaki, K., Tanno, S., Okumura, T., Shimizu, N., Kawabe, J., Karasaki, H., Kono, T., Ii, M., Bardeesy, N., Chung, D.C., Kohgo, Y. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS One.* (2010) **5**: e8824.
- Nakao, A., Harada, A., Nonami, T., Kaneko, T., Takagi, H. Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas.* (1996) **12**: 357-361.
- Newman, E.A., Simeone, D.M., Mulholland, M.W. Adjuvant treatment strategies for pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* (2006) **10**: 916-926.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., Gutterer, K., Kettner, E., Schmalenberg, H., Weigang-Koehler, K., Bechstein, W.O., Niedergethmann, M., Schmidt-Wolf, I., Roll, L., Doerken, B., Riess, H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* (2007) **297**: 267-277.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., Frese, K.K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S.P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W.J., Chang, A., Dhara, M., Wang, L., Ruckert, F., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Izeradjene, K., Hingorani, S.R., Huang, P., Davies, S.E., Plunkett, W., Egorin, M., Hruban, R.H., Whitebread, N., McGovern, K., Adams, J., Iacobuzio-Donahue, C., Griffiths, J., Tuveson, D.A. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* (2009) **324**: 1457-1461.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A. The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* (2006) **12**: 5277-5287.
- Perez-Mancera, P.A., Rust, A.G., van der Weyden, L., Kristiansen, G., Li, A., Sarver, A.L., Silverstein, K.A., Grutzmann, R., Aust, D., Rummele, P., Knosel, T., Herd, C., Stemple, D.L., Kettleborough, R., Brosnan, J.A., Li, A., Morgan, R., Knight, S., Yu, J., Stegeman, S., Collier, L.S., ten Hoeve, J.J., de Ridder, J., Klein, A.P., Goggins, M., Hruban, R.H., Chang, D.K., Biankin, A.V., Grimmond, S.M., Wessels, L.F., Wood, S.A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Pilarsky, C., Largaespada, D.A., Adams, D.J., Tuveson, D.A. The deubiquitinase USP9X suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature.* (2012) **486**: 266-270.
- Pham, D.L., Xu, C., Prince, J.L. Current methods in medical image segmentation. *Annu Rev Biomed Eng.* (2000) **2**: 315-337.
- Rasey, J.S., Grierson, J.R., Wiens, L.W., Kolb, P.D., Schwartz, J.L. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med.* (2002) **43**: 1210-1217.

- Richter, A., Niedgerthmann, M., Sturm, J.W., Lorenz, D., Post, S., Trede, M. Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World J Surg.* (2003) **27**: 324-329.
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., Kern, S.E. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* (1997) **57**: 1731-1734.
- Sahani, D.V., Shah, Z.K., Catalano, O.A., Boland, G.W., Brugge, W.R. Radiology of pancreatic adenocarcinoma: current status of imaging. *J Gastroenterol Hepatol.* (2008) **23**: 23-33.
- Samkoe, K.S., Chen, A., Rizvi, I., O'Hara, J.A., Hoopes, P.J., Pereira, S.P., Hasan, T., Pogue, B.W. Imaging tumor variation in response to photodynamic therapy in pancreatic cancer xenograft models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2010) **76**: 251-259.
- Sandgren, E.P., Luetkeke, N.C., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Lee, D.C. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell.* (1990) **61**: 1121-1135.
- Sandrasegaran, K., Akisik, F.M., Patel, A.A., Rydberg, M., Cramer, H.M., Agaram, N.P., Schmidt, C.M. Diffusion-weighted imaging in characterization of cystic pancreatic lesions. *Clin Radiol.* (2011) **66**: 808-814.
- Schneider, G., Siveke, J.T., Eckel, F., Schmid, R.M. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology.* (2005) **128**: 1606-1625.
- Sezgin, M. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic imaging.* (2004) **13**: 146-168.
- Shah, N., Zhai, G., Knowles, J.A., Stockard, C.R., Grizzle, W.E., Fineberg, N., Zhou, T., Zinn, K.R., Rosenthal, E.L., Kim, H. (18)F-FDG PET/CT imaging detects therapy efficacy of anti-EMMPRIN antibody and gemcitabine in orthotopic pancreatic tumor xenografts. *Mol Imaging Biol.* (2012) **14**: 237-244.
- Siveke, J.T., Einwachter, H., Sipos, B., Lubeseder-Martellato, C., Kloppel, G., Schmid, R.M. Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell.* (2007) **12**: 266-279.
- Siveke, J.T., Lubeseder-Martellato, C., Lee, M., Mazur, P.K., Nakhai, H., Radtke, F., Schmid, R.M. Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology.* (2008) **134**: 544-555.
- Siveke, J.T., Schmid, R.M. Chromosomal instability in mouse metastatic pancreatic cancer--it's Kras and Tp53 after all. *Cancer Cell.* (2005) **7**: 405-407.
- Soriano, A., Castells, A., Ayuso, C., Ayuso, J.R., de Caralt, M.T., Gines, M.A., Real, M.I., Gilabert, R., Quinto, L., Trilla, A., Feu, F., Montanya, X., Fernandez-Cruz, L., Navarro, S. Preoperative staging and tumor resectability assessment of pancreatic cancer: prospective study comparing endoscopic ultrasonography, helical computed tomography, magnetic resonance imaging, and angiography. *Am J Gastroenterol.* (2004) **99**: 492-501.
- Strauss, L.G. Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients. *Eur J Nucl Med.* (1996) **23**: 1409-1415.
- Sugahara, T., Korogi, Y., Kochi, M., Ikushima, I., Shigematu, Y., Hirai, T., Okuda, T., Liang, L., Ge, Y., Komohara, Y., Ushio, Y., Takahashi, M. Usefulness of diffusion-weighted MRI with echo-planar technique in the evaluation of cellularity in gliomas. *J Magn Reson Imaging.* (1999) **9**: 53-60.
- Vogl, T.J., Reith, W., Rummeny, E.J. (2011). *Diagnostische Und Interventionelle Radiologie*, Springer.

- von Forstner, C., Egberts, J.H., Ammerpohl, O., Niedzielska, D., Buchert, R., Mikecz, P., Schumacher, U., Peldschus, K., Adam, G., Pilarsky, C., Grutzmann, R., Kalthoff, H., Henze, E., Brenner, W. Gene expression patterns and tumor uptake of 18F-FDG, 18F-FLT, and 18F-FEC in PET/MRI of an orthotopic mouse xenotransplantation model of pancreatic cancer. *J Nucl Med.* (2008) **49**: 1362-1370.
- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine.* (2013) **369**: 1691-1703.
- Wagner, M., Greten, F.R., Weber, C.K., Koschnick, S., Mattfeldt, T., Deppert, W., Kern, H., Adler, G., Schmid, R.M. A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes Dev.* (2001) **15**: 286-293.
- Wagner, M., Luhrs, H., Kloppel, G., Adler, G., Schmid, R.M. Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice. *Gastroenterology.* (1998) **115**: 1254-1262.
- Wagner, M., Seitz, U., Buck, A., Neumaier, B., Schultheiss, S., Bangerter, M., Bommer, M., Leithauser, F., Wawra, E., Munzert, G., Reske, S.N. 3'-[18F]fluoro-3'-deoxythymidine ([18F]-FLT) as positron emission tomography tracer for imaging proliferation in a murine B-Cell lymphoma model and in the human disease. *Cancer Res.* (2003) **63**: 2681-2687.
- Wang, Y., Chen, Z.E., Nikolaidis, P., McCarthy, R.J., Merrick, L., Sternick, L.A., Horowitz, J.M., Yaghamai, V., Miller, F.H. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of pancreatic adenocarcinomas: association with histopathology and tumor grade. *J Magn Reson Imaging.* (2011a) **33**: 136-142.
- Wang, Y., Chen, Z.E., Yaghamai, V., Nikolaidis, P., McCarthy, R.J., Merrick, L., Miller, F.H. Diffusion-weighted MR imaging in pancreatic endocrine tumors correlated with histopathologic characteristics. *J Magn Reson Imaging.* (2011b) **33**: 1071-1079.
- Warshaw, A.L., Fernandez-del Castillo, C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* (1992) **326**: 455-465.
- Weber, W.A. Use of PET for monitoring cancer therapy and for predicting outcome. *J Nucl Med.* (2005) **46**: 983-995.
- Weishaupt, D., Koehli, V., Marincek, B. (2006). Wie funktioniert MRI?: Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanztomographie. Berlin Heidelberg, Springer
- Wilentz, R.E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G.J., Kang, M., Goggins, M., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* (1998) **58**: 4740-4744.
- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* (2000) **60**: 2002-2006.
- Xiong, H.Q., Rosenberg, A., LoBuglio, A., Schmidt, W., Wolff, R.A., Deutsch, J., Needle, M., Abbruzzese, J.L. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *J Clin Oncol.* (2004) **22**: 2610-2616.
- Yamano, M., Fujii, H., Takagaki, T., Kadowaki, N., Watanabe, H., Shirai, T. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* (2000) **156**: 2123-2133.
- Yankeelov, T.E., Lepage, M., Chakravarthy, A., Broome, E.E., Niermann, K.J., Kelley, M.C., Meszoely, I., Mayer, I.A., Herman, C.R., McManus, K., Price, R.R., Gore, J.C. Integration of quantitative DCE-MRI and ADC mapping to monitor treatment response in human breast cancer: initial results. *Magn Reson Imaging.* (2007) **25**: 1-13.

Yip-Schneider, M.T., Wu, H., Stantz, K., Agaram, N., Crooks, P.A., Schmidt, C.M. Dimethylaminoparthenolide and gemcitabine: a survival study using a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer*. (2013) **13**: 194.

Ziegler, S.I. (1999). Physics, quality control. PET in clinical Oncology. H.J. Wieler und R.E. Coleman. Darmstadt, Steinkopff Verlag.

Zimny, M., Fass, J., Bares, R., Cremerius, U., Sabri, O., Buechin, P., Schumpelick, V., Buell, U. Fluorodeoxyglucose positron emission tomography and the prognosis of pancreatic carcinoma. *Scand J Gastroenterol*. (2000) **35**: 883-888.

9 ANHANG

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 3-1 Vorläuferläsionen in $Kras^{G12D}/Kras^{G12D};TGF\alpha$	4
Abb. 3-2 Genetische Grundlagen der Pankreaskarzinomentstehung	5
Abb. 3-3 Cre/lox Modell	12
Abb. 3-4 Diffusion der Wassermoleküle	16
Abb. 3-5 Vernichtungsstrahl.....	17
Abb. 4-1 Segmentierung in ImageJ.....	25
Abb. 5-1 T2-MRT einer sc-Maus (#43).....	32
Abb. 5-2 sc-Mausmodell: Verlauf solides Tumolvolumen	33
Abb. 5-3 sc-Mausmodell: Endpunkt-MRT - solides und nicht-solides Tumolvolumen	34
Abb. 5-4 Histologie und T2-MRT einer sc-Maus (#40)	35
Abb. 5-5 Histologie und T2-MRT einer sc-Maus (#1)	35
Abb. 5-6 CKT Modell: Verlauf solides Tumolvolumen	37
Abb. 5-7 CKT Modell: Verlauf nicht-solides Tumolvolumen	37
Abb. 5-8 HE-Präparat einer CKT-Maus	38
Abb. 5-9 HE-Präparat einer CKT-Maus mit Ausschittsvergrößerung.....	39
Abb. 5-10 CKP Modell: Verlauf solides Tumolvolumen	40
Abb. 5-11 CKP Modell: Verlauf nicht-solides Tumolvolumen	40
Abb. 5-12 HE-Präparat einer CKP-Maus	41
Abb. 5-13 CKTP R172H Modell: Verlauf solides Tumolvolumen.....	42
Abb. 5-14 CKTP R172H Modell: Verlauf nicht-solides Tumolvolumen	42
Abb. 5-15 HE-Präparat einer CKTP R172H-Maus	43
Abb. 5-16 HE-Präparat einer CKTP R172H-Maus mit Ausschnittsvergrößerung	43
Abb. 5-17 CKTP fl+/- Modell: Verlauf solides Tumolvolumen.....	44
Abb. 5-18 CKTP fl+/- Modell: Verlauf nicht-solides Tumolvolumen	44
Abb. 5-19 HE-Präparat einer CKTP fl+/- Maus.....	45
Abb. 5-20 Vergleich solides Endvolumen der endogenen Tumormodelle.....	46
Abb. 5-21 Vergleich nicht-solider Anteil am Endvolumen der endogenen Tumormodelle	46
Abb. 5-22 Überlebenskurven der endogenen Tumormodelle	47
Abb. 5-23 T2-, b20-, b600-Bilder einer endogenen Maus.....	48
Abb. 5-24 Vergleich der ADC-Werte von IPMN-Läsionen und soliden Tumoren von CKT- und CKTP-Mäusen..	49
Abb. 5-25 Verläufe der ADC-Werte.....	50
Abb. 5-26 ADC-Zelldichte-Korrelation.....	51

Abb. 5-27 sc-Mausmodell: Tumor-zu-Muskel-Ratio im Verlauf.....	52
Abb. 5-28 T2-MRT, ¹⁸ F-FDG-PET und HE-Präparat einer CKTP R172H Maus.....	53
Abb. 5-29 ¹⁸ F-FDG-PET: Vergleich Tumor-zu-Muskel-Ratio.....	53
Abb. 5-30 T2-MRT, ¹⁸ F-FDG-PET und HE-Präparat einer CKT Maus	54
Abb. 5-31 ¹⁸ F-FLT-PET einer CKT-Maus (#510107)	55
Abb. 5-32 ¹⁸ F-FLT-PET und T2-MRT einer CKT Maus (#510160).....	55
Abb. 5-33 ¹⁸ F-FLT-PET: Vergleich Tumor-zu-Muskel-Ratio.....	56
Abb. 5-34 ¹⁸ F-FDG-PET und ¹⁸ F-FLT-PET einer CKT Maus (Maus #510470)	57
Abb. 5-35 Histologische Färbungen (Maus #510470)	57
Abb. 5-36 T2-MRT, ¹⁸ F-FDG-PET Fusion, b600-Bild zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	58
Abb. 5-37 Verlauf Tumor/Muskel-Ratio, ADC-Wert, Volumen: vitaler und nekrotischer Tumorabschnitt	59
Abb. 5-38 HE-Präparat: vitaler und nekrotischer Tumor	60
Abb. 5-39 Vergleich solides Tumolvolumen: therapiert vs. untherapiert	61
Abb. 5-40 Vergleich nicht-solides Tumolvolumen (in %): therapiert vs. untherapiert	61
Abb. 5-41 Relative Änderung der Tumor-zu-Muskel-Ratio	62
Abb. 5-42 Verlauf solides und nicht-solides Tumolvolumen therapierter Mäuse	64
Abb. 5-43 Verläufe ADC-Werte	65
Abb. 5-44 Verlauf Tumor-zu-Muskel-Ratio therapierter Mäuse	67

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Stadieneinteilung nach UICC	8
Tabelle 2 Verschiedene Radiopharmaka und ihr Nuklid	18

III. DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit der Promotion danke ich Herrn Prof. Dr. E.J. Rummeny vom Institut für Radiologische Diagnostik der Technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. R. Braren für die stets sehr gute Betreuung und Beantwortung meiner unzähligen Fragen.

Frau Dr. Y. Kosanke danke ich für ihre Hilfe bei tiermedizinischen Fragestellungen. Insbesondere bei der Implantation der Tumorzellen, der Euthanasie und bei der Mitbetreuung der Tiere während den Untersuchungen.

Frau I. Heid danke ich für die Hilfe, insbesondere bei der Anfertigung und Auswertungen der histologischen Präparate.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. J. Siveke für die Mitbegutachtung und -beurteilung der histologischen Schnitte.

Herrn Dr. M. Setteles danke ich für die Unterstützung bei physikalischen und MRT-spezifischen Fragen.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. P. Noël für die Umsetzung des Segmentierungstools in ImageJ.

Für die ständige Unterstützung die ich in jeglicher erdenklichen Art und Weise von meinen Eltern und meiner Großmutter erfahren habe, möchte ich mich auch an dieser Stelle nochmals herzlich bedanken.

Meinem geliebten Ehemann möchte ich für seine stetige liebevolle Unterstützung und seine unerschöpfliche Hilfe besonders danken.

IV. KURZZUSAMMENFASSUNG

MULTIMODALE BILDGEBUNG ZUR TUMORCHARAKTERISIERUNG UND THERAPIEKONTROLLE IN ENDOGENEN UND TRANSPLANTIERTEN MAUSMODELLEN DES PANKREATISCH DUKTALEN ADENOKARZINOMS

Ein subkutan implantiertes und vier endogene Mausmodelle des pankreatisch duktales Adenokarzinoms wurden mittels T2-MRT, DWI-MRT und PET longitudinal beobachtet. Die Tumore des subkutanen Tumormodells zeigten sich homogen mit einem guten Ansprechen auf Gemcitabin. Die endogenen Modelle zeigten sich äußerst heterogen und dem humanen pankreatisch duktales Adenokarzinom sehr ähnlich. Mittels des angewandten multimodalen Bildgebungsprotokolls konnte die Tumorentwicklung, die Tumorkomposition und die metabolische Aktivität beurteilt werden.

MULTIMODAL IMAGING FOR TUMOR CHARACTERIZATION AND THERAPY RESPONSE MONITORING OF ENDOGENOUS AND TRANSPLANTED PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA MOUSE MODELS

One subcutaneous and four endogenous mouse models of pancreatic ductal adenocarcinoma were monitored longitudinally by T2-MRI, DWI-MRI and PET. The tumors of the subcutaneous mouse models were homogeneous with a good response to Gemcitabine. The tumors of the endogenous mouse models were quite heterogeneous and highly similar to the human pancreatic ductal adenocarcinoma. By using the multimodal imaging tool it was possible to assess the tumor development, the tumor composition and the metabolic activity.

V. VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

- 09/2009 **M. Gretzinger**, J. Siveke, A. Steingötter, I. Heid, Y. Kosanke, K. Herrmann, A. Buck, R.M. Schmid, M. Schwaiger, E.J. Rummeny und R. Braren: *Multiparametric Imaging for Tumor Characterization in an Endogenous Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)*. World Molecular Imaging Congress, Montreal, Kanada. (Poster)
- 10/2009 I. Heid, R. Braren, **M. Gretzinger**, Y. Kosanke, R. Meier, A. Steingoetter, R.M. Schmid, A. Buck, J.T. Siveke: *Nicht-invasive Detektion und Charakterisierung des duktales Pankreaskarzinoms im endogenen genetischen Mausmodell mittels MRT und PET*. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Hamburg. (Poster)
- 11/2010 I. Heid, M. Trajkovic-Arsic, **M. Gretzinger**, Y. Kosanke, A. Steingoetter, E. J. Rummeny, R. M. Schmid, J.T. Siveke, R. Braren: *Monitoring of pancreatic ductal adenocarcinoma in mouse models via multiparametric magnetic resonance imaging*. 22nd EORTC-NCI-AACR Symposium on "Molecular targets and Cancer Therapeutics", Berlin. (Poster)
- 09/2011 I. Heid, M. Trajkovic-Arsic, **M. Gretzinger**, Y. Kosanke, A. Steingoetter, S. Sayyed, P. Noel, B. Haller, E.J. Rummeny, J.T. Siveke, R. Braren: *Endogenous mouse models of pancreatic adenocarcinoma as a preclinical trial platform characterized by multiparametric magnetic resonance imaging*. Second AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research, San Francisco, USA. (Poster)
- 06/2012 I. Heid, M. Trajkovic-Arsic, I. Esposito, K. Steiger, **M.R. Gretzinger**, A. Steingoetter, B. Haller, M. Schwaiger, E.J. Rummeny, J.T. Siveke, R. Braren: *Imaging heterogeneity of endogenous mouse models of pancreatic cancer*. *Pancreatic Cancer: Progress and Challenges*, AACR, Lake Tahoe, USA. (Poster)
- 05/2013 I. Heid, M. Trajkovic-Arsic, I. Esposito, **M. Gretzinger**, M. Schwaiger, E.J. Rummeny, J. Siveke, R. Braren: *Multimodale Diagnostik der Pankreastumorheterogenität im endogenen Mausmodell*. 94. Deutscher Röntgenkongress, Hamburg (Vortrag)
- 09/2016 I. Heid, K. Steiger, M. Trajkovic-Arsic, M. Settles, **M.R. Eßwein**, M. Erkan, J. Kleef, C. Jäger, H. Friess, B. Haller, A. Steingötter, R.M. Schmid, M. Schwaiger, E.J. Rummeny, I. Esposito, J.T. Siveke, R. Braren: *Co-clinical assessment of tumor cellularity in pancreatic cancer*