

**Prädiktion des Therapieansprechens mit [<sup>18</sup>F]FLT- und [<sup>18</sup>F]FDG-  
PET am Beispiel experimenteller Lymphome und in der humanen  
Erkrankung**

Daniela Maria Constanze Zwisler  
München 2013

Technische Universität München  
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
des  
Klinikums rechts der Isar

**Prädiktion des Therapieansprechens mit [<sup>18</sup>F]FLT- und [<sup>18</sup>F]FDG-  
PET am Beispiel experimenteller Lymphome und in der humanen  
Erkrankung**

Daniela Maria Constanze Zwisler

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A.K. Buck

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2. Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger

Die Dissertation wurde am 12.06.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.09.2014 angenommen.



*„Science needs cooperation, in which the knowledge of the one gains from the discovery of the other.“*

Jose Ortega y Gasset

# Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Grundlagen der Lymphombiologie .....	2
1.2	Non-Hodgkin-Lymphome.....	5
1.3	Weiterentwicklung der konventionellen, bildgebenden Diagnostik: Positronen-Emissions-Tomographie - Computertomographie (PET-CT).....	12
1.4	Neue Entwicklungen in der Tumordiagnostik.....	14
1.5	Zielsetzung .....	16
2	Material und Methoden .....	17
2.1	Material .....	17
2.1.1	Zellen.....	17
2.1.2	Kulturmedium .....	17
2.1.3	Radioaktive Substanzen .....	17
2.1.4	Medikament.....	17
2.1.5	Gebrauchsmaterialien und Chemikalien.....	17
2.1.6	Geräte .....	19
2.1.7	Software.....	20
2.2	Methoden .....	21
2.2.1	In-vitro Modell .....	21
2.2.1.1	<i>Zellkultivierung</i> .....	21
2.2.1.2	<i>Einfrieren der Lymphomzellen</i> .....	23
2.2.1.3	<i>Zellzahlbestimmung</i> .....	24
2.2.1.4	<i>MTT-Test</i> .....	24
2.2.1.5	<i>Viabilitätsbestimmung</i> .....	26
2.2.1.6	<i>Radiosynthese der Radiopharmaka [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT</i> .....	27
2.2.1.7	<i>Durchführung der Aufnahme–Versuche mit [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT</i> .....	28
2.2.1.8	<i>Zellzyklusanalyse mit FACS</i> .....	29
2.2.2	Tiermodell .....	31
2.2.2.1	<i>Versuchstiere und Haltung</i> .....	31
2.2.2.2	<i>Inokulation der Tumorzellen und Messung des Tumolvolumens</i> .....	31
2.2.2.3	<i>Therapie</i> .....	32
2.2.2.4	<i>Kleintier-PET mit den Radiopharmaka [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT</i> .....	32
2.2.2.5	<i>Bestimmung des [<sup>18</sup>F]FDG-/ [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakes mittels Bildanalyse und Bildbearbeitung</i> .....	33

2.2.2.6	<i>Biodistribution der Tracer in Normalgeweben und Tumor</i> .....	34
2.2.2.7	<i>Histologie und Immunhistochemie</i> .....	35
2.2.3	Statistische Auswertung.....	36
2.2.4	Klinische Studie .....	37
2.2.4.1	<i>Patientenkollektiv und klinische Daten</i> .....	37
2.2.4.2	<i>Histologie</i> .....	38
2.2.4.3	<i>Auswertung der PET</i> .....	38
2.2.4.4	<i>Statistik</i> .....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	In-vitro Experimente .....	40
3.1.1	Ergebnisse des MTT-Assays.....	40
3.1.2	Ergebnisse der Viabilitätstestung.....	43
3.1.3	Resultate der radioaktiven Aufnahme-Versuche mit [ <sup>18</sup> F]FDG und [ <sup>18</sup> F]FLT: .....	45
3.1.3.1	[ <sup>18</sup> F]FDG.....	45
3.1.3.2	[ <sup>18</sup> F]FLT .....	46
3.1.4	Zellzyklusanalyse mit FACS.....	48
3.2	In-vivo Versuche .....	49
3.2.1	Hemmung des Tumorwachstums mit Doxorubicin .....	49
3.2.2	Therapie .....	52
3.2.3	Unterschiede in der frühen Beurteilung des Therapieansprechens mit [ <sup>18</sup> F] FLT und [ <sup>18</sup> F] FDG .....	53
3.2.4	Ergebnisse der Bioverteilung der Tracer und ex-vivo Bestimmung der [ <sup>18</sup> F]FDG- und [ <sup>18</sup> F]FLT-Aufnahme im Lymphom-Xenotransplantat.....	55
3.2.5	Histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der Tumorpräparate .....	57
3.3	Klinische Studie .....	59
3.3.1	Patienten.....	59
3.3.2	[ <sup>18</sup> F]FLT- Aufnahme in Mantelzelllymphomen und Korrelation zur [ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme.....	60
3.3.3	Korrelation des [ <sup>18</sup> F]FLT-Uptakes zur Ki-67 Expression und MIPI Score .....	61
3.3.4	Frühes Therapieansprechen mit [ <sup>18</sup> F]FLT-PET.....	61
3.3.5	Beurteilung des klinischen Therapieansprechens.....	62
4	Diskussion .....	63
4.1	Etablierte, diagnostische Strategien mit Bewertung des Therapieansprechens und des Therapieverlaufs bei aggressiven Lymphomen .....	64
4.2	Beurteilung des aktuellen Stellenwerts der zwei Radiopharmaka [ <sup>18</sup> F]FDG und [ <sup>18</sup> F]FLT .....	64

4.3	Diskussion der in-vitro Studie .....	68
4.4	Diskussion der in-vivo Studie .....	71
4.5	Diskussion der klinischen Studie .....	75
4.6	Kritische Bewertung des Studiendesigns .....	77
4.7	Zusammenfassende Interpretation der Resultate aus allen drei Studien .....	79
4.8	Ausblick in die Zukunft der molekularen Bildgebung mit Fokus auf den Proliferationsmarker [ <sup>18</sup> F]FLT.....	82
5	Zusammenfassung .....	84
6	Literaturverzeichnis .....	87
7	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis .....	96
8	Danksagung.....	98

# Abkürzungsverzeichnis

A	Abb.	Abbildung
	AIDS	„erworbenes Immundefektsyndrom“, <i>engl. Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
	Az	Aktenzeichen
C	CHOP	Chemotherapieschema <i>engl. cyclophosphamide,</i> <i>hydroxydaunorubicine (doxorubicine),</i> <i>oncovin, prednisone</i>
	cpm	counts per minute (=Zählrate pro Minute)
	CT	Computertomographie
D	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
	DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, <i>engl. diffuse large B-cell lymphoma</i>
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNS	Desoxyribonukleinsäure
F	FACS	Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie, <i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>
	FCS	fetales Kälberserum, <i>engl. fetal calf serum</i>
	$^{18}\text{F}$	$^{18}\text{F}$ Fluor
	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$	2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-2-desoxy-D-glucose}$
	$[^{18}\text{F}]\text{FLT}$	3'-Desoxy-2'- $[^{18}\text{F}]\text{fluorothymidin}$
G	g	Gramm
	GLUT	Glukosetransporter
H	h	Stunde
	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
	HWZ	Halbwertszeit

K	kBq	Kilobecquerel
	kg	Kilogramm
L	LDH	Laktatdehydrogenase
M	MBq	Megabecquerel
	MeV	Megaelektronenvolt
	Min.	Minute
	mRNS	Boten-Ribonukleinsäure, <i>engl. messenger ribonucleotide acid</i>
	MRT	Magnetresonanz-Tomographie
	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
	MW	Mittelwert
	μCi	Mikrocurie
N	n	Anzahl
P	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>engl. phosphate buffered saline</i>
	PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie - Computer-Tomographie
	PI	Propidiumiodid 95% (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> )
R	RNAse	Ribonuclease A
	ROI	<i>engl. region-of-interest</i>
	RPMI 1640	hergeleitet von Rosewell Park Memorial Institute; verwandtes Kulturmedium
S	SCID	<i>engl. severe combined immunodeficiency defect</i>
	SD	Standardabweichung
	SU-DHL-4	immortalisierte humane B-Lymphom- Zelllinie
	SUV	<i>engl. standardized uptake value</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

T	Tab.	Tabelle
	TBR	Tumor-Hintergrund-Quotient, <i>engl. tumor-to-background ratio</i>
	Tx	Therapie
W	WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>engl. World Health Organisation</i>

# 1 Einleitung

Die Gesundheitsforschung wird durch zwei verschiedene Impulse angetrieben: Einerseits das Verlangen, Zusammenhänge zu verstehen, andererseits das Bemühen um einen positiven Einfluss auf diese Zusammenhänge nehmen zu können. Kurz gesagt: Der Wunsch zu wissen und auch zu helfen. Nicht allein deshalb ist die Gesundheitsforschung stärker als andere Forschungsbereiche nicht ausschließlich auf den Wissenszuwachs im Grundlagenbereich fokussiert. Es wird der gesamte Weg vom Labor zum Krankenbett beschritten. Damit wird auch dem nichtwissenschaftlichen, eher kunsthandwerklichen Aspekt der klinischen Medizin Rechnung getragen. So führt und findet die Gesundheitsforschung auf vielen verschiedenen Wegen in unseren Alltag hinein (Schölmerich 2011, S.4).

Die grundlagen- und die krankheitsorientierte Forschung dienen dem besseren Verständnis biologischer Systeme und deren Störungen. Patientenorientierte Forschung hingegen entwickelt neue Diagnoseverfahren und auch Therapien. Alle diese unterschiedlichen Ebenen sind wichtig. Allein ihr Zusammenspiel in der Übertragung der Resultate aus der grundlagen- und krankheitsorientierten Forschung in die patientenorientierte Forschung und schließlich in die Versorgung führt letztendlich zu Fortschritten in der Behandlung erkrankter Menschen (Schölmerich 2011, S.4).

Eine besondere Geißel in unserer Zeit sind die Tumorerkrankungen, die nach wie vor Bestandteil intensiver weltweiter Forschungsbemühungen sind, um stetig bessere Behandlungsmöglichkeiten zu erzielen und eventuell bei einigen weiteren Krebserkrankungen eine Heilung oder zumindest ein besseres Outcome zu ermöglichen.

Aus dem vor ein paar Jahren veröffentlichten nationalen Bericht über Krebserkrankungen in den USA, die in etwa vergleichbar mit der Entwicklung in Europa ist, geht hervor, dass über die vergangenen 20 Jahre die Sterberaten für viele häufig auftretende Krebsarten im gleichen Maße gesunken sind, wie die Verbreitung von guideline-basierter Therapie zugenommen hat (Edwards et al. 2005, S.1407-1427).

Dieser Abwärtstrend bei den Krebstodesraten weltweit, der in den frühen 1990er Jahren seinen Anfang nahm, folgte auf mehr als 6 Jahrzehnte mit Mortalitätsanstieg. Der Abwärtstrend ist sowohl bei Männern, als auch bei Frauen zu beobachten und auch bei vielen der 15 häufigsten Krebsarten, wie z.B. Lungen-, Darm-, Prostata- und Rektumkarzinom bei Männern und Darm-, Rektum- und Brustkrebs bei Frauen. Das ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen: Effektive Präventionsmaßnahmen, Interventionen zur Risikoreduzierung,

Screening und bessere Früherkennung, sowie Fortschritte in Behandlungsmethoden und medizinischem Management. Hinzu kommt, dass bessere Kenntnisse über den Zusammenhang des Therapieansprechens mit der Tumorgenetik geholfen haben, die zum Teil unterschiedlichen Reaktionen auf Medikamente in einer Patientenkohorte nachvollziehen zu können.

Eine der zukünftig spannendsten Herausforderungen wird der Fortschritt in der individualisierten Medizin, basierend auf der dann personalisierten Vorhersage des Therapieansprechens und Outcomes jedes einzelnen Patienten sein. Die Therapieprädiktion von immer spezifischerer Chemotherapie, Hormontherapie oder zielgerichteter („targeted“) Therapie scheint nun mit einer Vielfalt an in-vitro und in-vivo Techniken im Bereich des Möglichen zu sein (Schwaiger und Peschel 2006, S.S1).

## 1.1 Grundlagen der Lymphobiologie

In der Entstehung maligner Tumore sind generell zwei verschiedene Klassen von Tumorgenen, verändert durch Mutationen im Genom, in Studien mit menschlichen und tierischen Krebszellen erforscht worden: Einerseits die Onkogene, die ein Zugewinn an Funktionen auszeichnet und andererseits die Tumorsuppressorgene, welche einige ihrer, für das Genom protektiven Eigenschaften eingebüßt haben. (Hanahan und Weinberg 2011, S.646-674).

Das Tumorsuppressorgen p53 wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, weil es auf potentielle Gefahren zur Veränderung des Erbgutes, wie z.B. Hypoxie (Sauerstoffmangel), ionisierende Strahlen, UV-Strahlung, Mangel an Nukleotiden (DNS-Bausteine), mit verschiedenen Mechanismen zum Schutz der Erbsubstanz reagiert (Weinberg 2007, S.317). Es können DNS-Reparaturen gestartet, ein Blockieren des Wachstums von neuen Gefäßen, die wichtig sind für die Versorgung von neuem Gewebe, ein Stoppen des Zellzyklus der betroffenen Zellen bis hin zum programmierten Zelltodveranlasst werden. Dies alles dient zum Verhindern von unkontrollierter Vermehrung fehlerhafter Zellen. Das erklärt, warum die meisten und vielleicht sogar alle menschlichen Tumorzellen teilweise oder gar komplett ihr p53-Alarmsystem ausgeschaltet haben. So können sie die ganzen Stressoren, die zu einer DNS-Schädigung und einer Dysregulierung der Wachstumskontrolle führen, tolerieren und der Weg für die Zelle selbst und ihre Nachkommen in einen hochmalignen Wachstumszustand ist geebnet (Weinberg 2007, S.317).

Krebs ist also eine Erkrankung mit unkontrollierter Zellproliferation. Aufgrund von diesem überschießenden Wachstum mag man annehmen, dass Krebszellen ganz neue Wege zur speziellen Programmierung ihres Wachstums und Teilungsfähigkeit gefunden haben und vor allem die Kontrollmechanismen innerhalb der Tumorzellen ganz anders als in gesunden Zellen organisiert sind. Das ist jedoch nicht der Fall. Beide Spezies nützen beinahe identische Kontrollmechanismen, wobei die Tumorzellen schon vorhandene Mechanismen nur leicht modifizieren und für ihre Zwecke einsetzen (Weinberg 2007, S.159).

Hanahan und Weinberg waren vor über 10 Jahren der Meinung, dass sich die Tumorforschung in Zukunft zu einer ganz logischen Wissenschaft weiterentwickelt, wo die Komplexität der Erkrankungen durch ein paar wenige Grundprinzipien erklärbar sein wird (Hanahan und Weinberg 2000, S.57). Einige dieser Prinzipien sind gerade kurz davor, entschlüsselt zu werden: Beispielsweise Mechanismen, die gesunde, menschliche Zellen dazu veranlasst, sich in maligne Tumorzellen zu transformieren. Hanahan und Weinberg sind der Ansicht, dass nur einige wenige molekulare, biochemische und zellulär erworbene Eigenschaften, die in den vergangenen Jahrzehnten erforscht wurden, von den meisten, wenn nicht sogar von allen humanen Tumorzellen angewandt werden. Diese Sichtweise der Vereinfachung gründet sich direkt auf die Lehren der Zellbiologie, dass bei allen Säugetierzellen auf die gleichen molekularen Kontrollmechanismen bei der Regulierung ihres Wachstum (Proliferation), Differenzierung und Zelltod zurückgegriffen wird.

Es sind 6 wesentliche Veränderungen in der Physiologie der entarteten Zellen zu Merkmalen von Tumoren herausgearbeitet worden:

- Die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren,
- fehlende Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen,
- Vermeiden des programmierten Zelltodes (Apoptose),
- unbegrenztes Replikationspotential,
- anhaltende Entstehung neuer Gefäße (Angiogenese)
- Infiltrierung des umliegenden Gewebes und Metastasierung

Ergebnis ist eine unkontrollierte Proliferation zum falschen Zeitpunkt am falschen Ort, mit falscher Differenzierung und nachfolgender Invasion weiterer Gewebe mit Metastasenbildung. Diese Vielfalt an Verteidigungsmaßnahmen, die alle ausgeschaltet werden, mag eventuell erklären, warum Krebs dennoch relativ selten während einer durchschnittlichen Lebenszeitspanne eines Menschen auftritt. Weiterhin gibt es für diese Veränderungen keine feste Reihenfolge, sondern sie können immer unterschiedlich verlaufen, allein die biologischen Endpunkte aller Tumorarten, ein metastasierendes Karzinom, sind wieder gleich (Hanahan und Weinberg 2011, S.646-674).

Als wichtige unterstützende Faktoren kommen noch eine gewisse Genominstabilität, die wahllos Mutationen im Erbgut hervorruft, und Entzündungsgeschehen hinzu, die die oben genannten Merkmale noch weiter begünstigen (Hanahan und Weinberg 2011, S.646–674).

Auch Coussens und Werb haben herausgefunden, dass Entzündungsgeschehen, hier besonders im umgebenden Gewebe, die Tumorprogression fördern. Zudem wurden sich von Tumorzellen Fähigkeiten des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Wachstumsfaktoren und spezielle Rezeptoren für Invasion, Migration und Metastasierung zu Nutze gemacht. Der Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Tumorentstehung ist nicht neu: Schon Virchow hat 1863 diese Hypothese aufgestellt. Bis zu 15% aller Malignome weltweit sind auf chronische Entzündungen zurückzuführen. Leukozyten und andere phagozytierende Zellen induzieren DNS-Schäden in proliferierenden Zellen durch die Produktion von reaktivem Sauerstoff und Stickstoffverbindungen, die diese Zellen eigentlich zur Bekämpfung von Infektionen einsetzen. So kommt es zur Bildung von Peroxynitrit, einem hochreaktiven, toxischen Radikal, das die DNS angreift und zu Punktmutationen und Deletionen von Basen führt.

Andererseits könnte die Rekrutierung von Entzündungszellen für die Tumorentwicklung auch kontraproduktiv sein und als Abwehrmechanismus des Wirtsorganismus, also z.B. des Menschen, gesehen werden (Coussens und Werb 2002, S.860–867).

Hanahan und Weinberg tendierten 2011 dazu, ihre 6 Tumormerkmale noch um zwei weitere Punkte zu ergänzen: Maligne Zellen passen ihren Energiemetabolismus im Vergleich zu gesunden Zellen an die gesteigerte Proliferationsaktivität an und weichen einer Immunreaktion des Organismus, besonders der B-, T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aus. Außerdem kommt bei Tumoren, verglichen mit einzelnen malignen Zellen, noch eine Dimension an Komplexität hinzu: Tumore rekrutieren ein Repertoire an angeblich gesunden Zellen, die durch die Schaffung eines guten Tumormikromilieus, z.B. mit Wachstumsfaktoren, die Ausprägung der Tumormerkmale fördern. Es lässt sich also erkennen, dass Tumore komplexe Gewebegefüge sind, welche aus ganz unterschiedlichen Zelltypen bestehen und untereinander gut abgestimmt interagieren (Hanahan und Weinberg 2011, S.646–674).

Die molekulare Pathogenese der Lymphome ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der zur Replikation eines malignen Klons führt, bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen „germinalen“ oder post-germinalen Ursprungs (Lossos et al. 2000, S. 1797). Manche Entwicklungsschritte sind schon erforscht worden, andere bisher nicht. Die Mehrheit der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome zeigen Translokationen oder Mutationen, welche in der Überexpression des B-Zell-Lymphom-6-Genes (BCL-6) resultieren. Dies wiederum führt zu einer Unterdrückung des p53-Tumor-Suppressor-Genes (Phan und Dalla-Favera 2004,

S. 635; Cattoretti et al. 2005, S.445). Ca. 20% der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome zeigen Mutationen oder Deletionen des p53-Tumor-Suppressor-Gens (Ichikawa et al. 1997, S. 529). Weitere Mechanismen in der Pathogenese bei einer kleinen Anzahl stellen die aberrierende somatische Hypermutation und die c-myc Überexpression dar (Pasqualucci et al. 2001, S. 341; Barrans et al. 2010, S. 3360) Mantelzell-Lymphome entstehen größtenteils aus naiven B-Zellen der Mantelzone in lymphatischem Gewebe (Walsh et al. 2003, S. 4047). Es lässt sich eine erhöhte Zellteilung und Replikationsrate nachweisen. Mehrheitlich führt die Expression vom cyclin D1-Gen zu einer Zellzyklusprogression von der G1- zur S-Phase (Bodrug et al. 1994, S. 2124). Außerdem zeigen Mantelzell-Lymphome eine herabgesetzte Abwehrreaktion gegenüber DNS-Schäden mit konsekutiv erhöhter chromosomaler Instabilität und einer höheren Zellüberlebensrate aufgrund beeinträchtigter Apoptose (Hofmann et al. 2001, S.787).

## 1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

Unter dem Sammelbegriff Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) werden alle malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems (monoklonale Neoplasien) zusammengefasst, die nicht die Merkmale des klassischen Morbus Hodgkin besitzen. Diese Zusammenfassung ist im Wesentlichen historisch begründet. Die Erkrankungen, die unter diesem Oberbegriff zusammengefasst werden, haben verschiedene Ausprägungen. Das gilt sowohl für die zugrundeliegenden genetischen Merkmale, die immunologischen Charakteristika als auch die klinischen Erscheinungsformen. Ihre Heterogenität resultiert aus der Tatsache, dass der maligne Prozess in Lymphozyten aus verschiedenen Reifungsstufen stattfindet. Daher variiert auch die Therapie der NHL. Ihre Häufigkeit beträgt ca. 10 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr. Es besteht eine Zunahme der Non-Hodgkin-Lymphome bei steigendem Lebensalter.

Die Einteilung der NHL erfolgte ab 2001 von der WHO zur besseren Übersicht in eine B- (ca. 80% aller NHL) und eine T-Klasse (20%), je nachdem, ob das NHL von B-lymphatischen oder T-lymphatischen Zellen abstammt, sowie nach Lymphomen mit frühen und späten Vorläuferzellen der Lymphopoese. Auf den zytologischen Malignitätsgrad als Einteilungsprinzip wurde verzichtet.

Wichtig jedoch für die Therapieentscheidung ist die klinische Unterteilung der Lymphome in indolente (niedrigmaligne) und aggressive (hochmaligne) Formen. In der indolenten Gruppe wird das histologische Bild von kleinen, reifen Lymphozyten bestimmt (zytisch), während bei den aggressiven und sehr aggressiven Formen große, unreife Zellen vermehrt zu finden sind (blastisch). Von der B-Zell-Reihe ausgehende Neoplasien (Vorstufen eines malignen Tumors) sind in beiden Gruppen deutlich häufiger als T-Zell-Neoplasien.

Die indolenten Lymphome sind chronische Erkrankungen, die sich durch Therapie gut kontrollieren lassen, aber durch Chemotherapie in der Regel nicht geheilt werden können.

Aggressive Lymphome hingegen besitzen einen raschen Krankheitsverlauf, bei denen bereits mit der ersten, häufig sehr intensiven Behandlung eine Heilung erzielt werden kann, da sonst mit einer Verschlechterung der Prognose zu rechnen ist (Hummel und Hellmich 2008).

Maligne Lymphome sind eine sehr heterogene Krankheitsgruppe, deren Behandlungsvorgehen und auch Prognose auf einer möglichst genauen Stadieneinteilung (Staging) (siehe Tab. 2) und präzisen Evaluation der histologischen Eigenschaften beruht (Jhanwar und Straus 2006, S.1326), (siehe Tab. 1 a und b).

**Tab. 1a:** Aktuelle WHO-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome, reife (periphere) B-Zell-Neoplasien, modifiziert nach Hummel und Hellmich 2008, Jhanwar 2006, S.1327

<b>WHO-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome</b>
<b>Reife (periphere) B-Zell-Neoplasien</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (31%)</li><li>• Follikuläres Lymphom (22%)</li><li>• Mantelzell-Lymphom (6%)</li><li>• B-Zell chronische lymphatische Leukämie, kleinzelliges lymphozytisches Lymphom (6%)</li><li>• Extranodales Marginalzonen B-Zell Lymphom (MALT) (5%)</li><li>• Plasmozytom (1%)</li><li>• Burkitt-Lymphom (&lt;1%)</li></ul>

**Tab. 1b:** Klinische Einteilung der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, adaptiert nach The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project (1982), S.2112–2135, Hummel und Hellmich (2008) und nach Jhanwar (2006), S.1327

<b>Klinische Einteilung der häufigeren B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome</b>
<b>Indolente Lymphome (low risk):</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Follikuläre Lymphome Grad I und II</li><li>- Extranodales Marginalzonen B-Zell Lymphom (MALT)</li><li>- B-Zell chronische lymphatische Leukämie, kleinzelliges lymphozytisches Lymphom</li><li>- Plasmozytom</li><li>- Mantelzell-Lymphom</li></ul>
<b>Aggressive Lymphome (intermediate risk):</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Follikuläres Lymphom Grad III</li><li>- Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom</li><li>- Mantelzell-Lymphom</li></ul>
<b>Sehr aggressive Lymphome (high risk):</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Burkitt-Lymphom</li></ul>

## Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom ist mit 31% das häufigste unter den NHL, tritt bevorzugt bei Männern, durchschnittlich im Alter von 64 Jahren auf. Die meisten Patienten stellen sich mit rapide vergrößernden Tumormassen in der Halsregion oder gastrointestinal und oft auch mit lokalen und systemischen Symptomen, den sogenannten B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust) vor. Oft lässt sich auch eine Erhöhung des LDH-Serumspiegels beobachten. Die bevorzugte extranodale Manifestation ist im Gastrointestinaltrakt, ist jedoch überall im Körper möglich. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom kann im Verlauf invasiv wachsen und benachbarte Organe, Gefäße, Nerven verdrängen und sogar Knochen zerstören (Armitage und Weisenburger 1998, S.2780–2795; Jaffe et al. 2001, S.170–174; National Cancer Institute at the National Institutes of Health 2011).

Die initiale Therapie hängt von der Ausbreitung der Erkrankung ab, die mithilfe der Ann Arbor Klassifikation, modifiziert nach Cotswold, bestimmt wird. Dazu werden die Anzahl an Tumorerkrankungen (nodal und extranodal), die Lokalisation, und das Vorhandensein der B-Symptomatik berücksichtigt.

**Tab. 2:** Ann Arbor Klassifikation der Hodgkin-Lymphome, modifiziert nach Cotswold, auch angewandt auf die Non-Hodgkin-Lymphome, adaptiert nach Carbone et al.(1971),S.1860-1861 und Lister et al.(1989),S.1630-1636

Stadium I	Befall einer Lymphknotenregion (I/N) oder einer extranodalen Lokalisation (I/E)
Stadium II	Befall von 2 benachbarten Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N) oder Befall von 2 extranodalen Lokalisationen auf einer Seite des Zwerchfells (II/E)
Stadium III	Befall von Lymphknotenregionen (III/N) oder extranodalen Lokalisationen (III/E) beidseits des Zwerchfells
Stadium IV	Disseminierter oder diffuser Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall

Ohne Therapie beträgt die mittlere Überlebensdauer bei aggressiven Lymphomen, einschließlich DLBCL, nur wenige Monate, bei MCL evtl. bis zu 5 Jahre.

Generell findet bei DLBCL zur Therapieplanung eine Einteilung in eine „limited stage“ oder „advanced stage“ Erkrankung statt:

- „Limited stage“ (normalerweise Ann Arbor Stadium I und II) kann in einem Bestrahlungsfeld erfasst werden. Ca. 30-40% aller DLBCL-Patienten sind betroffen. Primär wird mit einer Kombination aus verkürzter, systemischer Chemotherapie mit drei Zyklen CHOP (bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) in einem Abstand von je 21 Tagen, dem rekombinanten, monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab und einer „involved field“ Strahlentherapie behandelt. Dabei resultieren nach 5, bzw. 10 Jahren Überlebensraten von 95% und 75%. Alternativ kann eine komplette, systemische Chemotherapie mit 6 bis 8 Zyklen plus Rituximab ohne Bestrahlung angewandt werden.
- Die „Advanced stage“ Erkrankung (gewöhnlich Ann Arbor Stadium III oder IV) mit der Mehrheit von 60 bis 70% der DLBCL-Patienten kann nicht in einem einzelnen Bestrahlungsfeld erfasst werden. Hier kommt nur die komplette, systemische Chemotherapie plus den rekombinanten, monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab (R-CHOP) zum Einsatz. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach zwei Jahren beträgt damit 70% und nach 5 Jahren 60% (Coiffier 2005, S.6387–6393; Freedman und Friedberg 2012; Habermann et al. 2006, S.3121–3127; Miller 2004, S.2982–2984). Bei Patienten mit gutem Ansprechen kann ggf. die Therapie verkürzt werden, um Spät-Toxizitäten zu minimieren.

## **Mantelzell-Lymphome**

Eine weitere, jedoch seltenere Entität aus der Gruppe der aggressiven NHL sind die Mantelzell-Lymphome (MCL): Sie machen etwa 6% aller NHL aus. Eine charakteristische chromosomale Veränderung in ca. 75% aller Mantelzell-Lymphome ist die Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  mit einer Überexpression von Cyclin D1, eines Proteins zur Zellzyklusregulation (Fernández et al. 2005, S.6364–6369). Zusätzlich zu einer Vergrößerung der Lymphknoten und der Milz, sowie einem Befall des Knochenmarks in 60% der Fälle, sind die Symptome denen von DLBCL ähnlich. Die Erkrankung wird oft leider erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt. Der klinische Verlauf ist indolent bis aggressiv, so können Mantelzell-Lymphome durch konventionelle Behandlungskonzepte bisher nicht dauerhaft geheilt, sondern nur zeitweise zurückgedrängt werden. Die mittlere Überlebenszeit mit den meisten Therapieregimen beträgt 3 bis 4 Jahre (Jaffe et al. 2001, S.168–170). Dennoch konnte innerhalb der letzten 30 Jahre beinahe eine Verdoppelung der mittleren Überlebenszeit beim fortgeschrittenen, nicht-blastischen MCL beobachtet werden (Herrmann et al. 2009, S.511–518). Eine hohe Zellproliferationsrate, angezeigt durch einen hohen Ki-67-Proliferationsindex,

geht mit einer schlechteren Prognose einher. Kombinationschemotherapie wird am meisten eingesetzt und Bestrahlung nur palliativ verwendet. Zwei unterschiedliche Richtungen an Therapieregimes werden verfolgt:

1. Konventionelle Chemotherapie mit z.B. CHOP (s.o.) oder CVP(Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon), evtl. beide ergänzt mit Rituximab
2. Aggressivere Programme, die eine intensivierete Chemotherapie mit z.B. R-Hyper-CVAD (hyperfraktioniertes Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, und Dexamethason, alternierend mit hochdosiertem Methotrexat und Cytarabin) mit Rituximab oder eine konventionelle Chemotherapie (z.B. R-CHOP, R-CVP) gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation, vorsehen (Geisler 2010, S.1241–1243; Williams et al. 2011, S.24–33).

In Studien konnte kein entscheidender Überlebensvorteil der aggressiveren Behandlungsprogramme im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie gezeigt werden (Martin et al. 2008, S.1327–1330). Insgesamt ist die Erkrankung aktuell noch immer als praktisch unheilbar anzusehen.

## **Lymphom-Diagnostik**

Am genauesten erfolgt die Diagnose der einzelnen Lymphomentitäten mit einer histologischen Untersuchung aus einer Lymphknotenbiopsie. Diese basiert auf einer Beurteilung der Morphologie, sowie immunhistochemischen Untersuchungen, z.B. Nachweis der Überexpression von Cyclin D1 bei MCL. Eine Computertomographie (CT) mit Kontrastmittel von Thorax, Abdomen und kleinem Becken wird zur Stadieneinteilung und Beurteilung der Tumorausdehnung vor Behandlungsbeginn durchgeführt (Jhanwar und Straus 2006, S.1328). Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist der CT beim Nachweis einer Beteiligung des Gehirns, Spinalkanals oder Knochenmarks überlegen (Kuwert 2008, S.164). Zudem wird ein PET-CT-Scan empfohlen, um die Tumoraktivität vor Therapiebeginn darzustellen. Bei MCL ist der Einsatz von PET-CT bisher nur auf klinische Studien begrenzt und muss noch weiter auf den prädiktiven Aussagewert hin geprüft werden (Freedman und Friedberg 2012; Seam et al. 2007, S.3507–3516).

## **Response-Evaluation bei NHL**

Gewöhnlich einen Monat nach Beendigung der Therapie sollte das Therapieansprechen anhand einer körperlichen Untersuchung, Testung der Blutwerte, sowie einem PET-CT-Scan dokumentiert werden (Cheson et al. 2007, S.579–586). Mit der PET-CT lassen sich Informationen zur residuellen Tumorgroße und-aktivität nachweisen und sie macht eine Unterscheidung zwischen aktiver Erkrankung und fibrotischem Gewebe möglich, was in der CT

allein nicht eindeutig zu differenzieren ist. Hier weist die FDG-PET im Vergleich zur CT eine höhere Spezifität (92% vs. 17%), Genauigkeit (96% vs. 63%), sowie einen besseren positiven prädiktiven Wert (94% vs. 60%) (Jhanwar und Straus 2006, S.1330) auf. Der beste Zeitpunkt für den PET-CT-Scan scheint 6 bis 8 Wochen nach Ende der Chemotherapie und 12 Wochen nach Strahlentherapie zu sein. Bei früheren Messzeitpunkten können falsch positive Ergebnisse aufgrund entzündlicher Prozesse auftreten (Juweid et al. 2007, S.571–578). Aus diesen Informationen kann mithilfe der revidierten Internationalen Workshop Kriterien eine Response-Beurteilung erfolgen (Cheson et al. 2007, S.579–586). Eine komplette Remission (CR) ist erreicht, wenn erstens kein Hinweis mehr auf die Erkrankung oder ihrer Symptome im Arztgespräch und in der körperlichen Untersuchung besteht. Zweitens Milz und Leber nicht tastbar sind und keine Knötchen haben. Drittens alle residuellen, post-treatment Tumorpakete/massen (Resttumoren) im PET-Scan negativ sind und eine vor Therapie durchgeführte positive Knochenmarkbiopsie muss nun in der Kontrollbiopsie negativ sein. Falls die Morphologie nicht eindeutig ist, muss zumindest der immunhistochemische Nachweis negativ sein (Freedman und Friedberg 2012).

Ungefähr 30-40% der Patienten mit aggressivem NHL erreichen keine komplette Remission (CR) nach initialer Standard-Chemotherapie. Eine generelle Langzeitremission wird nur in 50-60% erreicht. Ein signifikanter Teil der Patienten spricht somit nicht ausreichend auf die Initialtherapie an. Eine frühe Therapiebeurteilung wird gewöhnlich mit einem CT-Scan nach 3 oder 4 Zyklen Chemotherapie durchgeführt. Einige Studien mit Einsatz von FDG-PET wurden diesbezüglich veröffentlicht (Haioun et al. 2005, S.1376–1381; Mikhaeel et al. 2000, S.543–553). Trotz den Limitationen dieser Studien zieht Mikhaeel daraus einige generelle Schlüsse: CR scheint mit wiederholten PET-Scans nach einem bis drei Zyklen Chemotherapie nachweisbar zu sein (früher als mit der CT). Diese frühe, mit PET nachweisbare CR korreliert mit einer besseren Prognose (zeigt vermutlich eine hohe Chemosensibilität an). Frühe PET-Scans wären angeblich genauere Indikatoren für das Outcome als post-treatment PET-Scans (Mikhaeel 2006, S. S23).

Derzeit wird allgemein noch kein Einsatz der PET als Verlaufskontrolle vor Therapieende empfohlen, außer eine klinische Verschlechterung des Patienten macht eine Evaluation notwendig. Zu wenig Daten sind bisher verfügbar und auch die Variabilität verschiedener Untersucher ist groß (Horning et al. 2010, S.775–777). Die Aussagekraft der Verlaufs-PET muss noch in weiteren Studien näher untersucht werden.

Bei den heute möglichen aggressiveren Therapieschemata wird aber auch eine höhere Auftretenswahrscheinlichkeit (Inzidenz) einer behandlungsbedingten

Toxizität in Kauf genommen. Dies, wie auch onkologische Notfälle sind im Krankheitsverlauf von aggressiven NHL häufig (Freedman und Friedberg 2012). Daher ist der Nachweis eines frühen Therapieansprechens so wichtig, wobei radioaktive Tracer der PET-CT -sinnvoll eingesetzt- hilfreich sein können.

### 1.3 Weiterentwicklung der konventionellen, bildgebenden Diagnostik: Positronen-Emissions-Tomographie - Computertomographie (PET-CT)

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie – Computertomographie (PET-CT) wird dem Patienten zuerst eine Markersubstanz gespritzt, eine Glukoseverbindung bei [ $^{18}\text{F}$ ]FDG oder eine Mischung aus indirekten DNS-Bausteinen (modifiziertes Thymidin) bei [ $^{18}\text{F}$ ]FLT, angereichert mit Fluor. Der Blutfluss verteilt nun die jeweilige Substanz im Körper, die vermehrt von stoffwechselaktiven Zellen ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG) oder eher von Gewebe mit hoher Zellteilungsrate ([ $^{18}\text{F}$ ]FLT) aufgenommen wird. Beim Zerfall der radioaktiven Fluoratome wird jeweils ein Positron ausgesendet (Beer et al. 2011, S.32).

In der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird die Vernichtungsstrahlung eines Positrons detektiert. Beim Zerfall des Positronenstrahlers  $^{18}\text{F}$  wird ein Positron emittiert, welches sich mit einem Elektron unter Energieabgabe von zwei Gammastrahlen mit je 0,511 MeV eliminiert. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass beide Teilchen durch die Abbremsung in der umgebenden Materie eigentlich keine kinetische Energie mehr besitzen. Diese beiden Gammastrahlen ( $\gamma$ -Quanten) entfernen sich genau in einem  $180^\circ$  Winkel von ihrem Entstehungsort. Beim PET-Scanner sind die Detektoren ringförmig angeordnet. Mithilfe der zwei koinzidenten, entgegengesetzten  $\gamma$ -Quanten lässt sich zwischen dem Eliminationsort des Positrons und der Detektorenmessung ein direkter Zusammenhang herstellen. Die gemessenen Koinzidenzen werden in einem Sinogramm dargestellt. Bei einem PET-CT liegt nun eine Kombination eines Positronenemissions-Tomographen mit einem CT vor. Eine unabhängige Benutzung, aber auch eine kombinierte Messung mit den einzelnen Geräten ist möglich. Somit lassen sich auf diese Weise die morphologischen Daten aus der CT mit den funktionellen, spezifischen Informationen über Stoffwechselfvorgänge des PET-Scanners zusammenführen. Mit der PET-CT konnte ein großer Fortschritt in der Onkologie, bezogen auf Diagnostik, Staging, Verlaufskontrolle, sowie der Therapieevaluation erreicht werden (Schicha 2007, S.75–80).

[<sup>18</sup>F]FDG ist ein seit 30 Jahren verfügbarer Marker in der Tumordiagnostik (Engles et al. 2006, S.603–604; Jerusalem et al. 1999, S.429–433; Juweid et al. 2007, S.571; Safar et al. 2012, S.184–190). Zur Darstellung der Tumorherde wird sich die erhöhte Glukoseaufnahme in Tumorzellen, bedingt durch die gesteigerte Glykolyse, zu Nutze gemacht. Auch andere Mechanismen haben Anteil an der verstärkten Glukoseaufnahme: Das hypoxische Tumorumgebungsgewebe, eine Beziehung zur Proliferation mit Aktivierung der Onkogene und dem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde schon von Warburg ein hoher Glukoseumsatz in Tumorzellen beschrieben (Buerkle und Weber 2008, S.549–552; Hsu und Sabatini 2008, S.703–707). Wegen etlicher falsch-positiver Befunde, besonders im Zusammenhang mit Entzündungsgeschehen und einer nur teilweisen Darstellung des proliferativen Tumorkompartiments, ist der [<sup>18</sup>F]FDG-Uptake jedoch nicht als tumorspezifisch zu bezeichnen. Aus diesem Grund und weil die meisten eingesetzten Therapieregime eher Zellproliferation und –wachstum hemmen, wird nach tumorspezifischen radioaktiven Tracern gesucht (Buck et al. 2009, S.205–215).

Als Kriterien für einen klinisch nutzbaren Proliferationsmarker zur in-vivo-Darstellung ist eine hohe Aufnahme in proliferierenden Zellen, möglichst wenig Metaboliten, sowie eine einfache Markierung wünschenswert. Neuere Ansätze in der Tumortherapie greifen gezielt im Zellzyklus der Tumorzellen an und rufen einen Zellzyklusarrest, anstelle eines sofortigen Zelltods hervor. Daher scheint es sinnvoll, einen Tracer einzusetzen, der Veränderungen des DNS-Metabolismus, ganz unabhängig vom Glukoseverbrauch, anzeigt und damit auch das Therapieansprechen frühzeitig darstellen kann. [<sup>18</sup>F]FLT repräsentiert als indirekter DNS-Baustein die Proliferationsaktivität des Tumors. So wurde [<sup>18</sup>F]FLT als Surrogatparameter zur frühen Therapie-Evaluation besonders beim Einsatz neuer, zielgerichteter Tumorpräparate vorgeschlagen (Buck et al. 2009, S.205–215).

Wie schon mit einer Reihe von experimentellen Versuchen und auch klinischen Studien gezeigt, ist [<sup>18</sup>F]FLT ein sensitiver Tracer zur Detektion von Proliferation in gesundem hoch proliferativem Gewebe und in malignen Tumoren (Buchmann et al. 2004, S.436–442; Buck et al. 2003, S.1426–1431; Herrmann et al. 2011, S.690–696; John R. Grierson et al. 2004, S.829–837). Die Anwendung von [<sup>18</sup>F]FLT ermöglicht eine relativ einfache, nicht-invasive und wiederholte Messung von Tumorproliferation in klinischer Forschung und Routinediagnostik. Die Fähigkeit, Tumorwachstum früh nach Therapiebeginn zu bestimmen, kann als früher Indikator des Therapieerfolgs eingesetzt werden. Bei der herkömmlichen Vorgehensweise werden Patienten mehrere Monate chemotherapiert und erst anschließend wird mit anatomischen Nachweismethoden ein Tumorzuwachs wahrgenommen, der ein Therapieversagen anzeigt. Besonders nützlich könnte der Proliferationsnachweis in der Entwicklung neuer biologischer Wirkstoffe sein, die in Tumor Signaling Pathways und in die Angiogenese eingreifen. Denn eine Volumenreduktion des Tumors ist bei diesen Wirkstoffen nicht ganz im

Vordergrund, eher eine Wachstumsverlangsamung. Diese Beweggründe haben der Weiterentwicklung zu einer innovativeren Tumorbildgebung und der Suche nach radioaktiven Markern wie [ $^{18}\text{F}$ ]FLT mehr Nachdruck verliehen (Shields et al. 1998, S.1334–1336).

## 1.4 Neue Entwicklungen in der Tumordiagnostik

Nach der erfolgreichen Einführung der PET-CT war es nur eine Frage der Zeit, wann diese Idee auch auf die Kombination von Magnetresonanz-Tomographie und PET angewandt wird:

Der weltweit erste integrierte humane MRT-PET-Ganzkörperscanner ist im Herbst 2010 in Deutschland in Betrieb genommen worden und befindet sich in der klinischen Erprobung. Mit diesem Gerät, analog zur der PET-CT, wird die Magnetresonanz-Tomographie (MRT) mit einem PET-Scanner kombiniert, wodurch eine gemeinsame, zeitgleiche Analyse von noch präziserer anatomischer Darstellung und Informationen über den Stoffwechsel auf molekularer Ebene ermöglicht wird. Studien an Tier-MRT-PET-Scannern gingen dieser Entwicklung voraus (Judenhofer et al. 2008, S.459–465).

Die Technologie der MRT-PET ist so neu, dass sich sämtliche Vor- und Nachteile noch in klinischer Erprobung mit Studien erweisen müssen. Trotzdem wird vermutlich die MRT-PET die schon länger etablierte PET-CT nicht verdrängen. Nicht überall ist die MRT-PET diagnostisch überlegen, ihre Aufnahmezeit ist länger, sowie die Verursachung von hohen Kosten, die für einen MRT-PET-Ganzkörperscanner aktuell noch mehrere Millionen Euro betragen. Mit diesen integrierten Systemen steht ein weiterer Baustein auf dem Weg zu einer personalisierten, d.h. auf den einzelnen Patienten zugeschnittenen Medizin, zur Verfügung (Beer et al. 2011, S.30–35).

Es gibt noch mehrere andere innovative Ansätze in der diagnostischen Darstellung von Tumorerkrankungen, einige werden im Folgenden kurz geschildert:

Mit dem **In-beam-PET-Verfahren** wird die Wechselwirkung von Ionenstrahlen, die Bestandteil der Ionentherapie bei Krebspatienten sind, mit dem bestrahlten Gewebe während der Behandlung sichtbar gemacht. Die Physiker aus dem Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf benutzen dazu kernphysikalische Vorgänge, die während der Ionentherapie im Körper der Patienten stattfinden. Kleinere und schnellere Detektoren machen verbesserte Tomographen möglich. Mit diesem Verfahren kann gewährleistet werden, dass die therapeutischen Ionenstrahlen nur Krebszellen töten und das gesunde Gewebe weitestgehend geschont wird (Fiedler et al. 2008, S.1077–1086; Shakirin et al. 2011, S.1281–1298).

Sogenannte **Nanofähren**, nur wenige Tausendstel Millimeter groß, können als winzige Transportbehälter dienen. Aufgrund ihrer geringen Größe ist es ihnen möglich, in Zellen und sogar in Zellkerne einzudringen, ohne sie zu beschädigen. Am Max-Planck-Institut für Polymerforschung werden Verfahren entwickelt, wie man Nanokapseln und –kugeln zu Diagnose und Behandlung von Erkrankungen einsetzen kann. Bisher sind Nanokapseln mit Öffnungsmechanismen entwickelt worden, in denen eine Einlagerung von unterschiedlichen Stoffen möglich ist. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Minifähren wären ein exakter Transport von Medikamenten an ihren Wirkort oder auch eine Visualisierung von Tumoren als magnetische Sonden (Sharma et al. 2010, S.59–69; Siebert et al. 2012, S.165–175).

Eine invasive Methode zur Tumorüberwachung wird von Medizintechnikern der TUM entwickelt: Nur schwer operable oder langsam wachsende Tumoren könnten in Zukunft von einem miniaturisierten, **implantierten, elektronischen Sensor-Chip** überwacht werden. Dabei wird die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Gewebe bestimmt. Bei sinkendem Sauerstoffgehalt in Tumornähe kann eine Wachstumsbeschleunigung des Tumors ein Grund sein.

Hypoxische Zustände können bei allen soliden Tumoren beobachtet werden. Ihre Anzahl ist jedoch bei den einzelnen Tumortypen und mit der Zeit variabel und nicht abhängig vom klinischen oder radiologischen Erscheinungsbild. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und dem Therapieansprechen war mit der nicht invasiven Eppendorf-Sonde in klinischen Studien nachweisbar. Eine Unterscheidung zwischen nekrotischem Gewebe und anoxischen, aber noch lebenden Zellen ist mit dieser Sonde nicht möglich (Becker 2012, S.3-66).

Der in Tumornähe implantierte Sensor-Chip gibt seine Messungen per Funk an ein Empfangsgerät weiter, das der Patient bei sich trägt, welches die Daten an den behandelnden Arzt weiterleitet. Dieser kann damit die Tumorentwicklung genau verfolgen und gegebenenfalls eine Entscheidung für Chemotherapie oder Operation treffen. Um das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu minimieren, wurde das gesamte Gerät in ein Gehäuse aus biokompatiblen Kunststoff verpackt. Als zusätzliche Ausstattungen sollen noch Sonden zur Messung des Säuregehalts und der Temperatur, sowie eine Miniatur-Medikamentenpumpe entwickelt werden. Die nächste Bewährungsprobe wird die Anwendung im Tiermodell sein, die zeigen wird, ob mit dem Sensor-Chip eine maßgeschneiderte und schonendere Krebstherapie auch beim Menschen möglich ist (Wolf et al. 2007, S.164–168).

## 1.5 Zielsetzung

Ein diagnostischer Biomarker, der das Ansprechen einer Krebstherapie dosisabhängig zur verabreichten Medikation widerspiegelt, ist von Vorteil, um die Chemotherapie individuell anzupassen.

Die vorliegende Arbeit besteht aus 3 unterschiedlichen Teilen. Ziel der präklinischen Studien war es, herauszufinden, ob bei SU-DHL-4-Zellen aus einem diffus großzelligen Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) nach Chemotherapie mit Doxorubicin mithilfe der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachvollzogen werden kann. Weiterhin sollte geklärt werden, welcher der beiden Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG oder [ $^{18}\text{F}$ ]FLT sich besser zur frühen Prädiktion der Therapie-Response bei aggressiven Lymphomen eignet.

Zu Beginn fand in mehreren in-vitro Studien eine Charakterisierung der SU-DHL-4-Zellen statt. Dabei sollte mithilfe des MTT die Stoffwechselaktivität näher untersucht und mit Trypanblau die Viabilität nach der chemotherapeutischen Behandlung der Lymphomzellen beurteilt werden. Die Durchflusszytometrie (FACS) sollte eine genaue Analyse der Zellzyklusphasen liefern, um mögliche Wirkungsunterschiede bei ansteigenden Doxorubicin-Konzentrationen festzustellen.

Als weiterführenden Schritt sollte versucht werden, die Erkenntnisse der in-vitro Versuche im Mausmodell zu bestätigen. Dazu wurden mit SU-DHL-4-Zellen xenotransplantierte SCID-Mäuse mit Doxorubicin behandelt und jeweils vor und 24 oder 48 h nach Therapie je ein [ $^{18}\text{F}$ ]FDG- und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET-Scan durchgeführt. Die Radioaktivitätsverteilung in den Mäusen wurde wiederum durch die Biodistribution einiger entnommener Organe validiert.

Abschließend sollten aus den in-vitro und in-vivo Ergebnissen Bezüge zur Anwendbarkeit des frühen Therapieansprechens mithilfe der PET-Diagnostik in der humanen Erkrankung hergestellt werden. Dies sollte anhand einer prospektiven, klinischen Studie gezeigt werden, in der erstmals der Einsatz von ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG) und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT zur frühen Therapie-Prädiktion bei Mantelzell-Lymphomen verglichen wurde.

Insgesamt sollte diese Arbeit, die in-vitro, in-vivo Versuche und eine klinische Studie umfasst, einen Beitrag zur Untersuchung der möglichst frühzeitigen Therapieevaluation bei aggressiven Lymphomen mit den radioaktiven PET-Tracern [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT nach Einleiten einer Chemotherapie leisten. Aus diesen experimentellen Erkenntnissen sollte dann ein besseres Verständnis für die klinische Anwendung der PET-Diagnostik insbesondere mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT bei aggressiven Lymphomen resultieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Die in-vitro-Versuche und die Xenotransplantationen wurden mit der Suspensionszelllinie SU-DHL-4 durchgeführt. Diese stammen von einem humanen, diffus großzelligen B-Zell-Lymphom. Die Zelllinie wurde von der DSMZ (Bestellnummer: ACC 495) in Braunschweig bezogen.

#### 2.1.2 Kulturmedium

RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin):

(NaHCO<sub>3</sub>(2,0 g/l); stabiles Glutamin; geringes Endotoxin) mit den Zusätzen:

10% fetales Kälberserum (FCS); 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin

#### 2.1.3 Radioaktive Substanzen

[<sup>18</sup>F] FDG und [<sup>18</sup>F] FLT

Nuklearmedizinische Klinik,

TUM

<sup>18</sup>F-HWZ = 109,71 min

#### 2.1.4 Medikament

Doxorubicin

Apotheke Klinikum rechts

(Stammlösung 1mg/ml)

der Isar, München

#### 2.1.5 Gebrauchsmaterialien und Chemikalien

Altromin Spezialfutter

Altromin GmbH&CoKg,Lage

Augensalbe, Vidisic®

Dr. Mann Pharma, Berlin

CASY1-Probenröhrchen (CASY®cups)	Schärfe System, Reutlingen
Cleaved Caspase 3 Antikörper	NewEnglandBiolabs, Frankfurt
Cryo Tubes (1,8ml)	Nunc Inter Med, Dänemark
Dimethylsulfoxid (DMSO Freeze Medium)	Bio Veris Corporation, Gaithersburg, MD, USA
Eppendorfcups (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Ethanol 70%	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
FACS-Tubes (5 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Formalin 4% (Stammlösung 37%)	Merck, Darmstadt
IgG-Zweitantikörper	EnVision, DAKO, Hamburg
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Isofluran, Forene®	Abbott, Wiesbaden
MIB-1, Ki-67 Antikörper	Immunotech, Westbrook, ME, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Propidiumiodid 95% (PI)	Sigma, Steinheim
Ribonuclease A (RNase)	Sigma, Steinheim
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Trypanblau-Lösung 0,5%	Sigma, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.6 Geräte

Absaugpumpe Eppendorf 4151	Eppendorf, Hamburg
Analysewaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Typ 6000	Heraeus, Berlin
Digitalkamera	Supra, Kaiserslautern
CASY-Zellzählgerät CASY 1	Schärfe System, Reutlingen
Coulter® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Turku, Finnland
Ganzkörper-PET-Scanner ECAT HR+ TN, USA	Siemens/CTI Inc., Knoxville, TN, USA
Gefrierschrank (- 20°C)	Perbio Hy Clone, Bonn
Gefrierschrank (- 70°C) HU9-50y-T-A	Heraeus Sepatech, Osterode
Immunostainer	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA
Inveon™ Animal-PET-Scanner	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA
Isofluran-Verdampfer Völker DE-0131	Völker, Kaltenkirchen
Vakuum Sicherheitsabsaugsystem AZ 02	HLC BioTech, Bovenden
Veterinary anesthesia system,	Landmark Vetland Medical Sales&Services L.L.C., Louisville, KY, USA
IVC-Käfigsystem Typ BOXUNCP04TCS	Tecniplast S.P.A., Varese, Italien
Kühlschrank Wine-Cooler 6°C	Robert Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe

Laminair-Flow-Arbeitsbank	Heraeus, Berlin
Mikroskop, Axiovert 10	Zeiss, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen
Pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt
Stickstoffbehälter ARPEGE 70	Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden
Vortex-Genie	Bender & Hobei AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Well-Platten	Greiner bio-one, Solingen
Wellplattenleser Bio-Tek Elx800TM	Progen Scientific, London, UK
Zentrifuge, Megafuge 1,0 R	Heraeus, Berlin
<b>2.1.7 Software</b>	
FlowJo 7.2.1	TreeStar Inc., Ashland, OR, USA
Inveon Research Workplace 2.2	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA
KCJunior™ 1998-2003	Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Microsoft® Office 2003, Microsoft® Office Word 2007	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
R Software Version 2.11.1	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
SPSS Version 18.0	IBM® Corp., Armonk, NY, USA
X2On, EPICS® XL/XL-MCL™ Flow Cytometer, Version 3.0	Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 In-vitro Modell

#### 2.2.1.1 Zellkultivierung

SU-DHL-4 Suspensionszellen wurden mit dem Kulturmedium RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) und den Zusätzen 10% fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin), 1% L-Glutamin (Biochrom, Berlin) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heraeus, Berlin) inkubiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminair-Flow-Arbeitsbank (Heraeus, Berlin) durchgeführt.

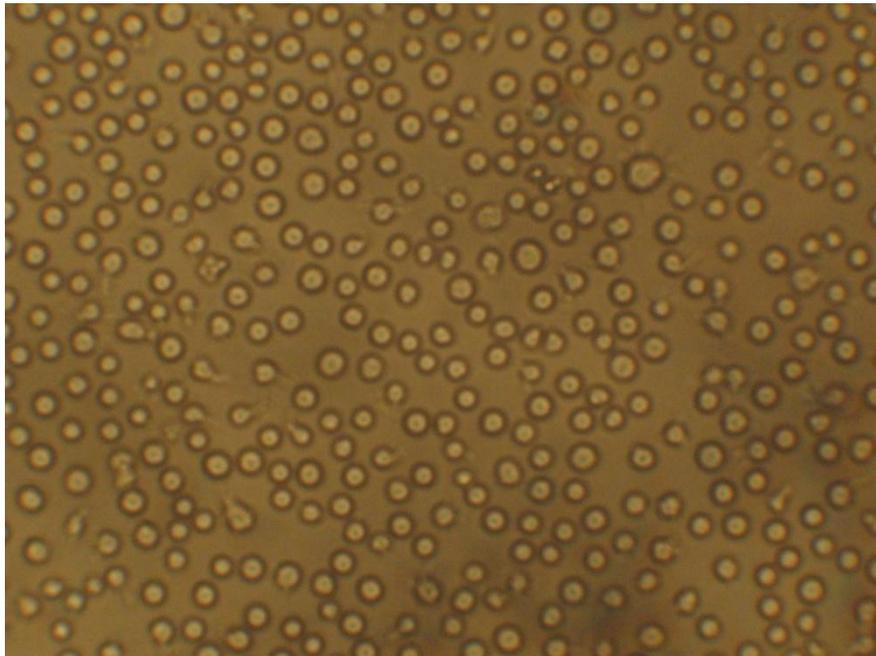
Die dazu verwandten Instrumente wurden vor und nach der Benutzung mit Ethanol 70% desinfiziert. Das Medium wurde stets im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

#### **Auftauen der Lymphomzellen**

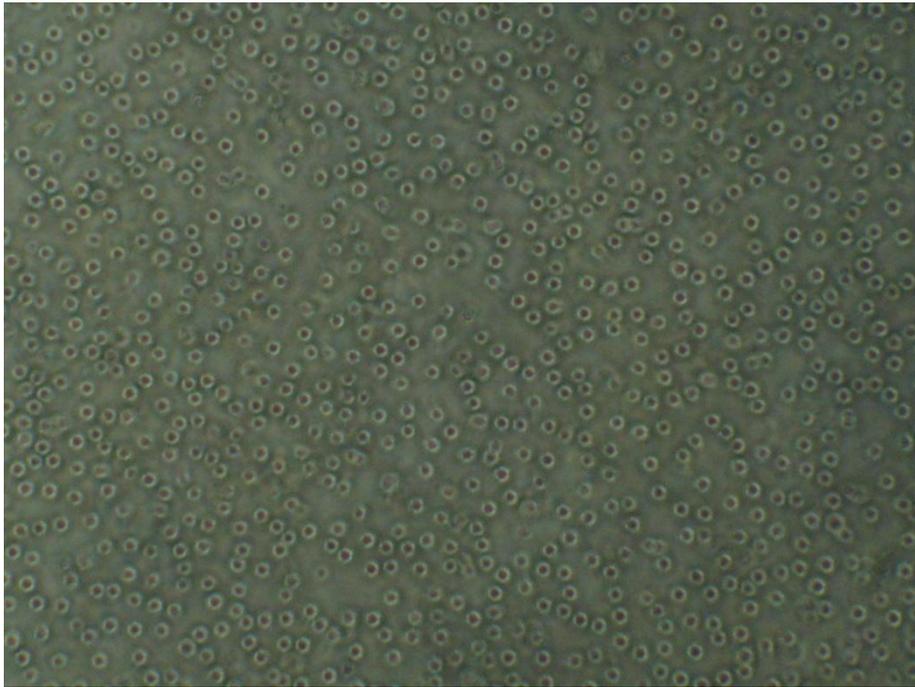
Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in DMSO-Einfriermedium (Bio Veris Corporation, Gaithersburg, MD, USA) in 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc Inter Med, Dänemark) à  $10 \times 10^6$  Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde bei Zimmertemperatur abgewartet, bis sich nur noch ein kleines Eisstückchen im Kryoröhrchen befand. Anschließend wurde ca. 1ml der Zellsuspension zu 19 ml des vorgewärmten Nährmediums in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, wobei dann der Inhalt komplett auftaute. Es wurde ein besseres Wachstum der Zellen bei Verwendung eines Nährmediums mit 20% FCS (Biochrom, Berlin) während der ersten Woche erzielt. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen zweimal 5 Min. bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, daraufhin das Pellet mit 8 ml Nährmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (Greiner bio-one, Solingen) im Brutschrank (Heraeus, Berlin) aufbewahrt. Ca. 1-2 Tage später wurden die Zellen in der Zellkulturflasche (Greiner bio-one, Solingen) unter dem Mikroskop (Zeiss, Göttingen) betrachtet und das Anwachsen kontrolliert. In aller Regel war eine 1:2 oder 1:3 Verdünnung der Zellsuspension mit dem Nährmedium nötig.

### **Passagieren der Lymphomzellen**

Das Passagieren der Zellen wurde dreimal pro Woche durchgeführt. Das Umschlagen der Mediumfarbe von rot nach gelb kennzeichnete die vermehrte Anreicherung von sauren Stoffwechselmetaboliten und das Erreichen der exponentiellen Wachstumskurve. Nun wurde nach dem Zentrifugieren für 5 Min. bei 1500 U/min das verbrauchte Nährmedium mit den abgestorbenen Zellen und dem Zelldetritus sorgfältig abgesaugt. Im Anschluss wurde das Zellpellet in einer 1:2 oder 1:3 Verdünnung mit frischem Kulturmedium resuspendiert und weiter in Zellkulturflaschen (Greiner bio-one, Solingen) im Brutschrank (Heraeus, Berlin) aufbewahrt. Die ideale Zellkonzentration zum Aufbewahren betrug dabei  $0.5 \times 10^6$  Zellen/ml.



**Abb. 1:** Native SU-DHL-4-Zellen unter dem Mikroskop in einer 200fachen Vergrößerung (Objektiv x Okular) in einer Konzentration von  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro ml



**Abb. 2:** Native SU-DHL-4-Zellen unter dem Mikroskop in einer 100fachen Vergrößerung (Objektiv x Okular) in einer Konzentration von  $1,4 \times 10^6$  Zellen pro ml

#### 2.2.1.2 Einfrieren der Lymphomzellen

Eine sichere Langzeitlagerung der Zellen wurde mithilfe einer DMSO-Einfrierlösung (Bio Veris Corporation, Gaithersburg, MD, USA) in flüssigem Stickstoff gewährleistet. Dazu wurde FCS (Biochrom, Berlin) und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Verhältnis 9:1 gemischt, kurz auf Eis gelagert und die zuvor 5 Min. bei 1500U/min abzentrifugierten Zellen zügig resuspendiert ( $10 \times 10^6$  Zellen/ml). Danach wurde jedes Kryoröhrchen (Nunc Inter Med, Dänemark) rasch mit je 1ml DMSO-Zellengemisch gefüllt. Zunächst wurden die Zellen für 2 Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt und dann für 24 Stunden bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Charakterisierung der Lymphomzellen:

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Eine möglichst genaue Bestimmung der Anzahl der Zellen wurde durch den Einsatz des CASY-1-Zellzählgerätes (Schärfe System, Reutlingen) erzielt. Dabei wurden 50µl der zu messenden Zellsuspension zu 10 ml CASYton-Lösung (Schärfe System, Reutlingen) in ein CASY1-Probenröhrchen (Schärfe System, Reutlingen) pipettiert (ca. Verdünnung von 1:200). Anhand von Vorversuchen, in welchen der mittlere Zellkerndurchmesser bestimmt worden war, wurden die Zellen in einem Messbereich von 7 bis 30 µm mit peak bei 12,4 µm lokalisiert. Dadurch fielen Zelldetritus und Zellkerne nekrotischer Zellen unter den vorher festgelegten Messbereich lebender Zellen und wurden nicht mitgezählt. Je Zellsuspension wurde die Zellzahlbestimmung zweimal durchgeführt und anschließend ein Mittelwert errechnet. Für die darauffolgenden Versuche wurde die gezählte Zellsuspension durch Verdünnung mit Kulturmedium auf die gewünschten Zellkonzentrationen gebracht.

### 2.2.1.4 MTT-Test

Der MTT-Test dient dem Nachweis und der Messung von Zellproliferation, Zellvitalität und Cytotoxizität bestimmter Substanzen. Das Testprinzip des MTT beruht auf der Messung metabolischer Aktivität lebender Zellen. Mithilfe von Enzymen wird das gelbfarbene Tetrazoliumsalz MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Promega, Mannheim) zu dem wasserunlöslichen, dunkelblauen Formazan reduziert. Diese Farbänderung kann photometrisch gemessen werden und verhält sich direkt proportional zur Zahl aller metabolisch aktiven und damit vitalen Zellen. Für den Versuch wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 wells (Greiner bio-one, Solingen) verwendet. Zur Vorbereitung wurde eine Verdünnungsreihe aus dem zytotoxischen Chemotherapeutikum Doxorubicin aus der Gruppe der Anthracycline und dem Kulturmedium mit den Konzentrationen 6 ng/ml, 12,5ng/ml, 25 ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml in 100µl je well hergestellt. Parallel wurden die benötigten  $5 \times 10^4$  Zellen pro well mit der Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH&Co., Lauda-Königshofen) abgezählt, abzentrifugiert und mit 100µl Kulturmedium je well resuspendiert. Somit wurde ein Gesamtvolumen von 200µl pro well (100µl Doxorubicinlösung + 100µl Zellsuspension) erzielt. Für jede Doxorubicinkonzentration wurden drei wells zur Messung vorgesehen, um eine

ausreichende Anzahl an wells für eine Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes zu erhalten. Die Anordnung auf der Wellplatte wurde wie folgt durchgeführt: In Dreierreihen angeordnet wurde mit dem Leerwert (200µl Kulturmedium) begonnen, dann folgten als Kontrolle eine 200µl Zellsuspension je well, sowie in aufsteigender Reihenfolge die Doxorubicinkonzentrationen, siehe

Abb. 3.

A	B	C	D	E	F	G	H	
								Medium (Leerwert)
								Zellen
								6 ng/ml
								12,5 ng/ml
								25 ng/ml
								50 ng/ml
								100 ng/ml
								200 ng/ml
								
								
								
								

	Medium (Leerwert)		Zellen
	Medium zur Verdunstung		Doxorubicinkonzentrationen und Zellen

Abb. 3: Schematische Darstellung der MTT-Versuchsanordnung auf einer 96er Wellplatte

Anschließend wurde 40µl MTT je well hinzupipettiert und die Platte für 30 Min. im Brutschrank inkubiert. Die direkt angrenzenden, aber nicht zum Versuch gehörigen wells wurden mit 150µl Medium befüllt, um eine Verdunstung der Ansätze zu verhindern. Die photometrische Messung der Absorption bei 570 nm wurde frühestens nach 2 Stunden und sehr vorsichtigem Schütteln der Wellplatte durchgeführt. Dieser Ansatz wurde insgesamt zweimal für 24 und 48 Stunden ausgeführt und zu den angegebenen Zeiten abgelesen. Aus den Resultaten wurde zu jeder Konzentration der Mittelwert gebildet und der Leerwert subtrahiert.

### 2.2.1.5 Viabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung aller lebenden Zellen in der Zellkultur wurde der Trypanblau-Test eingesetzt. Er nutzt die Eigenschaft, dass intakte, vitale Zellen den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen, geschädigte und abgestorbene Zellen hingegen schon. Dabei gelangt der Farbstoff durch die nun durchlässigere Zellmembran in das Zellinnere und färbt die Zelle blau. Der Grad der Anfärbung einer Zelle kann als Maß für deren Schädigung dienen.

Für den Versuchsansatz wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro well im Kulturmedium mit je 3 Proben pro Konzentration und 3 Leerwerten in einer 96er Wellplatte vorgelegt und bis zur Doxorubicinzugabe im Brutschrank gelagert. Es wurden zwei gleiche Ansätze, für die Auswertung nach 24 und 48 Stunden, hergestellt. Die Doxorubicinverdünnungsreihe wurde für die Konzentrationen 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 200 ng/ml, 800 ng/ml analog zum MTT-Assay hergestellt. Nach dem sorgfältigen Mischen der Zellsuspension in den wells wurde die Doxorubicinverdünnung zugegeben und gut resuspendiert. Im Anschluss wurde die Wellplatte 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (MD-Kova, Madaus Diagnostika, Köln). Dazu wurden je 10µl Zellsuspension pro einzelner Well mit 40µl Trypanblau-Lösung (Sigma, Steinheim) resuspendiert. Nach dem Anhauchen des Deckgläschens (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) wurde dieses auf der Zählkammer angebracht. Bei korrektem Vorgehen erscheinen auf dem Deckgläschen Newtonringe.

Die Suspension wurde dann mit einer 20µl Pipette in die Zählkammer bis zu ihrer vollständigen Füllung eingebracht. Die Auswertung wurde unter dem Mikroskop (Zeiss, Göttingen) mit 10- bis 40-fachem Objektiv durchgeführt, indem zunächst die Einteilungslinien der Zählkammer ins Blickfeld geschoben wurden. Es wurden nur die 4 großen Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet. Um eine doppelte Zählung der direkt auf den Linien liegenden Zellen zu vermeiden, wurden nur diese gezählt, welche oben und links auf der Linie lagen. Jetzt erfolgte auch die Unterscheidung zwischen den blau gefärbten, nekrotischen Zellen und den blassen, nicht angefärbten, vitalen Zellen. Zur Berechnung der Zellzahl in einem µl wurde folgende Formel verwendet:

---

Zellzahl in 4 Quadranten x 5 x 10.000

---

4 (Anzahl der Quadranten)

Gesamtzahl aller Zellen – nekrotische Zellen = **vitale Zellen**

Das Vorhandensein von mindestens 80% vitale Zellen war Voraussetzung für die Durchführung der Versuche.

#### 2.2.1.6 *Radiosynthese der Radiopharmaka [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT*

Beide radioaktiven Tracer wurden in der radiopharmazeutischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München produziert.

Für die Synthese von [<sup>18</sup>F]FDG wurde die etablierte Standardmethode nach Hamacher angewandt (Hamacher et al. 1986, S.235–238). Die Herstellung von [<sup>18</sup>F]FDG erfolgte durch die Verwendung von acetylgeschütztem Mannosetriflat. Als Phasentransferkatalysator zur Verdrängung der Triflatgruppe wurde Kryptofix 2.2.2 (E. Merck AG, Darmstadt) verwandt.

[<sup>18</sup>F]FLT wurde nach der Methode von Machulla hergestellt (Machulla et al. 2000, S. 843-846). Den Precursor bildete Anhydrothymidin, welches zuvor mittels einer Benzoylgruppe vor Zerfall geschützt wurde. Die Generierung des [<sup>18</sup>F]Fluorids wurde im klinikinternen Zyklotron (Siemens AG, München) mit Protonenbestrahlung (18MeV) aus [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O zur radioaktiven Markierung durchgeführt. Mit Hilfe einer nukleophilen Substitution wurde dann aus dem Precursor und [<sup>18</sup>F]Fluorid [<sup>18</sup>F]FLT hergestellt. Zuletzt fanden eine Qualitätsüberprüfung und eine Kontrolle der Markierungsausbeute statt.

Zur Injektionsvorbereitung der beiden Tracer wurden die Radiopharmaka unter sterilen Bedingungen filtriert und in eine Injektionslösung überführt.

### 2.2.1.7 Durchführung der Aufnahme-Versuche mit [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT

Die vorangegangenen Versuche dienen als Vorarbeiten der Uptake-Versuche. Die zum besseren Wachstum in mittleren bis großen Kulturflaschen im Brutschrank bei 37° Grad gelagerten Lymphomzellen wurden mit dem CASY1-Zellzählgerät (Schärfe System, Reutlingen) gezählt und anschließend auf die gewünschte Konzentration von  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro ml verdünnt, sodass sich  $0,5 \times 10^6$  Zellen in jedem well befanden. Dieser Wert wurde mithilfe eines Konzentrationsassays in einem Vorversuch ermittelt. Die Zellen wurden mit dem Kulturmedium resuspendiert und in einem well einer 6er-Wellplatte (Greiner bio-one, Solingen) vorgelegt. Parallel wurde die Doxorubicin-Verdünnungsreihe nach dem gleichen Schema wie beim oben beschriebenen MTT-Assay angefertigt und in die verbliebenen wells der 6er-Wellplatte eingefüllt. Um bei den Aufnahmeversuchen physiologische Temperaturen zu gewährleisten, wurden die Zellsuspension und die Doxorubicin-Verdünnungsreihe bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei 37° Grad im Brutschrank inkubiert. Daraufhin fand die Überführung in zwei 96er-Wellplatten für die verschiedenen Auswertungen nach 24 und 48 Stunden statt. Die Anordnung auf der Platte entsprach dem MTT- Assay. Als Kontrolle wurde die Aktivität mit Zellen allein und als Leerwert die Aktivität mit Kulturmedium verwendet. Die zwei Ansätze wurden im Brutschrank bei 37° Grad während den oben genannten Zeitspannen gelagert. Vor der Zugabe der Aktivität wurden die Proben in Eppendorfcups (Eppendorf, Hamburg) umpipettiert. Nun wurde der Versuch mit dem Hinzufügen der Aktivität, je Probe 370 kBq in 100µl, gestartet. Das

Gesamtvolumen in einem Eppendorf-cup betrug insgesamt 1,1 ml mit je 0,5 ml Zellsuspension und Doxorubicinlösung, sowie 0,1 ml Aktivität. Um optimale Bedingungen für die Aufnahme herzustellen, wurden die Eppendorf-cups daraufhin eine Stunde lang im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 2000 U/min für 5 Min. zentrifugiert und danach dreimal gewaschen: Hierbei wurde der Überstand abgesaugt, mit 1ml eiskaltem PBS (Biochrom, Berlin) gespült und erneut bei 2000 U/min für 5 Min. zentrifugiert. Die Radioaktivität wurde nach Beenden des letzten Waschvorganges direkt in den Eppendorf-cups im Gamma-Counter (Wallac, Turku, Finnland) in counts per minute (cpm) zerfallskorrigiert gemessen. Der Versuch wurde sowohl mit [<sup>18</sup>F]FDG, als auch mit [<sup>18</sup>F]FLT durchgeführt, der Ablauf erfolgte analog.

### 2.2.1.8 Zellzyklusanalyse mit FACS

Die fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht sowohl eine Charakterisierung und Quantifizierung, als auch eine Sortierung von Zellpopulationen. Als Grundprinzip werden bei dieser Methode spezielle Antigene auf den zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierendem Farbstoff besetzten Antikörpern markiert. Dieser Komplex wird einzeln, Zelle für Zelle, mit Laserlicht geeigneter Wellenlänge bestrahlt und das dadurch entstandene Fluoreszenz- und Streulicht wird erfasst. Hiermit werden zudem Informationen über z.B. die Größe des Zellkerns und damit auch die aktuellen Stadien des Zellzyklus geliefert. Zu Beginn des Versuches müssen die Zellen vorbereitet werden. Dazu wurde zum Zellpellet mit mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen je Probe unter laufendem Vortexer (Bender&Hobei, Zürich, Schweiz) je 3 ml eiskaltes Ethanol 70% pipettiert. Die Zellen wurden dann bei - 20° Grad über Nacht im Gefrierschrank (Heraeus, Osterode) fixiert. Anschließend wurden sie in spezielle FACS-tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) überführt und zweimal bei 1300 U/min für 4 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, damit nur noch so wenig Ethanol wie möglich im Tube zurückblieb. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die tubes zur besseren Lagerung auf Eis gestellt. Die Zellpellets wurden mit je 300µl PBS (Biochrom, Berlin) pro tube, einer kleinen Prise RNase (Sigma, Steinheim) und mit dem Farbstoff Propidiumiodid 95% (PI) (Sigma, Steinheim), im Verhältnis 1:500 in

Bezug auf das PBS, resuspendiert. Daraufhin wurden die tubes 30 Minuten im Brutschrank bei 37° Grad, wegen dem empfindlichen Farbstoff lichtgeschützt, inkubiert. Zuletzt wurde die Messung mit dem FACS-Gerät (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) durchgeführt, wobei vorher die einzelnen tubes erst gevortext und die Zellsuspension gesiebt wurde, um eine Aggregation zu verhindern. Die Zellzyklusverteilung wurde mit dem Programm X2On, EPICS® XL/XL-MCL™ Flow Cytometer, Version 3.0 (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) analysiert. Die Messungen wurden nur als aussagekräftig gewertet, wenn mehr als 85% lebende Zellen detektiert wurden.

Eine anschließende Bearbeitung der Daten und eine grafische Darstellung wurden mit dem Programm FlowJo 7.2.1 (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA) vorgenommen.

## 2.2.2 Tiermodell

### 2.2.2.1 *Versuchstiere und Haltung*

Es wurden weibliche, 6 Wochen alte SCID-Mäuse mit schwerem, kombinierten Immundefekt von Charles River (WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland), aus spezifiziert pathogenfreier Zucht bezogen. Charakteristisch ist bei den SCID-Mäusen ein schwerer Immundefekt durch die reduzierte Anzahl an Lymphozyten mit Insuffizienz der humoralen und zellulären Immunität, aufgrund eines Defektes der B- und T-Lymphozyten (Bosma und Carroll 1991, S.323). Dies verhindert eine Abstoßung humaner Tumore und stellt eine besondere Eignung für die Xenotransplantation der verwandten Lymphomzellen dar. Die Haltung erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes in einem Tierstall mit speziellen Käfigen (Tecniplast S.P.A., Varese, Italien) bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit mit je maximal sechs Tieren pro Käfig. Es wurden Leitungswasser und Altromin Spezialfutter (Altromin GmbH&CoKg, Lage) für immundefiziente Versuchstiere zur freien Verfügung bereitgestellt. Die Reinigung und Desinfektion der Käfige wurde zweimal pro Woche durchgeführt. Ca. zwei Wochen vor dem geplanten Versuchsbeginn erfolgte die Einnistung der Mäuse. Die Versuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Az.: 55.2-1-54-2531-52-07) durchgeführt.

### 2.2.2.2 *Inokulation der Tumorzellen und Messung des Tumorummens*

Zunächst wurden die SU-DHL-4 Lymphomzellen vorbereitet. Dazu wurden pro Maus  $10 \times 10^6$  Zellen in je 100µl sterilem PBS (Biochrom, Berlin) aufgenommen. Bis zur Injektion wurden die Zellen vorübergehend auf Eis gelagert. Anschließend fand bei den ca. 8 Wochen alten SCID-Mäusen die Xenotransplantation der Tumorzellen subkutan im rechten Schulterbereich statt.

Das Tumolvolumen wurde mittels einer Schublehre bestimmt. Ab einem mittleren Tumolvolumen von  $1\text{cm}^3$  wurde mit dem täglichen Protokollieren des Tumolvolumens begonnen. Dieser Wert wurde ca. 4 Wochen nach s.c. Injektion der Tumorzellen erreicht. Ab einem mittleren Tumolvolumen von ca.  $1,5\text{cm}^3$  wurde die Therapie begonnen. Um eine möglichst genaue Abschätzung der Therapiewirkung auf das Tumorwachstum zu erhalten, wurde die Messung ab Therapiebeginn täglich durchgeführt. Dazu wurden der Längendurchmesser, gemessen parallel zur Longitudinalachse, und der Breitendurchmesser, gemessen parallel zur Sagittalachse, bestimmt. Diese Achsen wurden auf den Mäusen gekennzeichnet, um die Messungenauigkeit möglichst gering zu halten.

Zur Messung des Tumolvolumens  $V$  [ $\text{cm}^3$ ] diene folgende Formel:

$$\text{Tumolvolumen} = \text{Länge [cm]} \times (\text{Breite [cm]})^2 \times \frac{1}{2}$$

### 2.2.2.3 Therapie

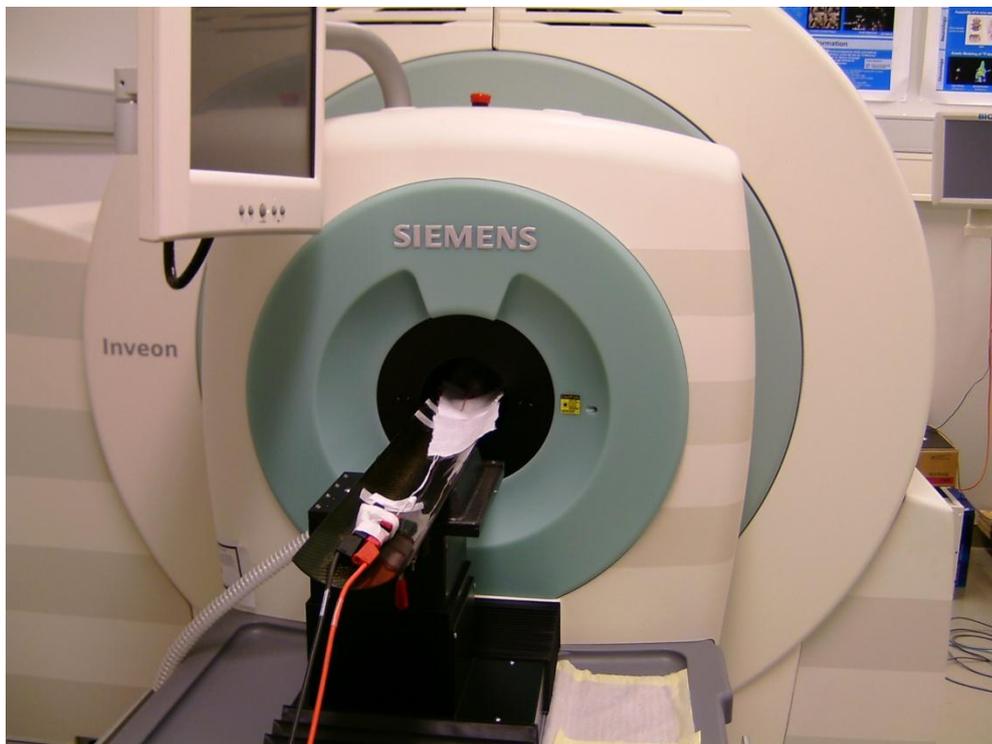
Zur Therapie wurden  $100\mu\text{l}$  Doxorubicin in einer gewichtsadaptierten Konzentration von  $10\ \mu\text{g/gKG}$ , intraperitoneal als Einzelinjektion verabreicht (Schmitt et al. 2000, S.1034). Das gleiche Volumen, jedoch mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) (Merck, Darmstadt), wurde den Tieren der Kontrollgruppe ebenfalls intraperitoneal injiziert.

### 2.2.2.4 Kleintier-PET mit den Radiopharmaka [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT

Zur Aktivitätsmessung in-vivo wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert. Zu Beginn wurde jede Maus zur Bestimmung des standardized uptake value (FDG- oder FLT-SUV) gewogen. Die Einleitung erfolgte per inhalationem über ca. 2 Minuten mit 4 Vol. % Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden) unter Verwendung des Landmark Veterinary Anesthesia Systems (Landmark VetlandMedical Sales&Services L.L.C., Louisville, KY, USA). Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde die Dosierung von Isofluran auf 2 Vol.% verringert. Um einer zu großen Auskühlung der Maus während der Messung entgegenzuwirken, wurde im Kleintier-PET (Siemens, Knoxville, TN, USA) eine spezielle Wärmeliege mit Heizung eingebaut. Um eine Austrocknung der Augen zu verhindern, wurden diese mit Vidisic® Augensalbe (Dr. Mann Pharma, Berlin) abgedeckt. Es war eine ständige Überwachung der Maus erforderlich, um ggf. bei einer eintretenden Schnappatmung schnell reagieren zu können. Die Radiotracer, entweder [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

oder [ $^{18}\text{F}$ ]FLT, wurden über einen Katheter in die Schwanzvene intravenös injiziert. Pro Maus wurde zwischen 9,25 MBq und 11,1 MBq (250-300 $\mu\text{Ci}$ ) Aktivität appliziert.

Danach wurde der Katheter mit einer Kochsalzlösung 0,9 % gespült und eine Rückmessung durchgeführt, um die in der Injektionsspritze verbliebene Aktivität zu bestimmen. Die Tracerinjektion wurde 45Min. vor dem Beginn der fünfzehnminütigen, statischen Messung (Abb. 4) durchgeführt. Mit dem Inveon PET System (Siemens, Knoxville, TN, USA) wurden die Daten in Listmode akquiriert. Es fand daraufhin eine Umwandlung der Rohdaten in Sinogramme statt. Dabei entsprach das rekonstruierte 128x128x95 Voxelbild einer Voxelgröße von 0,43x0,43x0,78mm<sup>3</sup> bei einer Schichtdicke von 0,76mm. Zudem wurden automatisch eine Zerfallskorrektur und eine globale Totzeitkorrektur angewendet. Bei der Verwendung der radioaktiven Tracer wurden sämtliche Sicherheitsvorschriften des Strahlenschutzes eingehalten.



**Abb. 4:** Untersuchung eines Versuchstiers mit dem Inveon™ PET-Scanner im Kleintierlabor der Nuklearmedizinischen Klinik

### 2.2.2.5 Bestimmung des [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-/[ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptakes mittels Bildanalyse und Bildbearbeitung

Eine semiquantitative Beurteilung der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG- und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Aufnahme in das Xenotransplantat ließ sich durch die Bestimmung des Tumor-Hintergrund-Quotienten (TBR) realisieren. Hierfür wurde manuell im angefertigten Frame, in

der koronaren Schnittebene im Bereich der höchsten Aktivität eine Kreisfläche mit ca. 6 mm Durchmesser als sog. Region-of-Interest (2D-ROI) festgelegt. Als Referenz wurden zusätzliche ROIs im Bereich Muskulatur des rechten Hinterlaufs angefertigt, um die Hintergrundaktivität zu bestimmen (Graf et al. 2008, S.350). Die Bildbearbeitung wurde mithilfe der Software Inveon Research Workplace 2.2 von Siemens Medical Solutions durchgeführt. Die Berechnung des TBR ergab sich aus den mittleren gemessenen Aktivitäten der Tumor- und Muskel-ROIs:

$$\text{TBR} = \frac{\text{mittlere gemessene Aktivität ROI (Tumor) [counts/s]}}{\text{mittlere gemessene Aktivität ROI (Muskel) [counts/s]}}$$

#### 2.2.2.6 Biodistribution der Tracer in Normalgeweben und Tumor

Die genauere Verteilung der Tracer in den unterschiedlichen Geweben, insbesondere im Tumorgewebe der Mäuse, wurde mit einer Biodistributionsanalyse ca. 120 Min. nach Gabe der Radioaktivität festgestellt. Außerdem wurde bei der Sektion Tumorgewebe für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen vorbereitet.

Mittels einer vorangegangenen Betäubung mit CO<sub>2</sub> erfolgte nach eingetretenem Atemstillstand die Tötung der Mäuse durch Eröffnung des Brustkorbes und eines Schnittes in den Herzbeutel. Die Sektion wurde aufgrund der schnell einsetzenden Degenerationsprozesse unmittelbar nach Todeseintritt durchgeführt. In stets identischer Reihenfolge fand die Organentnahme statt: Blut, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Muskel, Knochen, Tumor und Gehirn. Diese wurden daraufhin in zuvor abgewogene  $\gamma$ -Probenröhrchen gegeben. Sofort nach der Entnahme wurden die gefüllten Probenröhrchen mit einer speziellen Analysewaage (Sartorius, Göttingen) wegen Masseveränderungen bei späterem Feuchtigkeitsverlust erneut gewogen. Von Blut, Herz, Lunge, Leber, Darm, Muskel wurden nur Anteile gemessen, jedoch konnte von einer homogenen Verteilung der Tracer in diesen Organen ausgegangen werden. Mithilfe eines automatisierten Gamma-Counters (Wallac, Turku, Finnland) wurde

darauflin die Aktivität mit einer Zählrate in counts per minute (cpm) bestimmt. Der lineare Messbereich des Gamma-Counters liegt zwischen  $10^3$  und  $10^6$  cpm. Es wurden nur Messwerte innerhalb dieses Bereiches berücksichtigt. Zum besseren Vergleich der Messwerte wurden die Zählraten der Gewebeproben mit dem Tumor-Hintergrund-Quotienten (TMR) angegeben.

### 2.2.2.7 Histologie und Immunhistochemie

Für die histologische und immunhistochemische Auswertung wurde ein Teil des Tumorgewebes in 4%-iger Formalinlösung (Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Dazu wurde das Gewebe nach der Fixation in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol entwacht, sowie mittels einer Acetonreihe je 5 Min. in 100%, 96%, 75% und 40% rehydriert und in flüssigem Paraffin in eine Gießform aus Kunststoff eingegossen. Es wurden aus dem Paraffinblock Dünnschnitte angefertigt. In 0,01 mmol/l Citratpuffer (pH= 6,0) und mit 0,1% Tween 20 vor Austrocknung geschützt, wurden die Schnitte in der Mikrowelle bei 800W 30 Minuten erhitzt. Der Waschvorgang erfolgte mit Kochsalzlösung mit 5% fetalem Kälberserum (FCS, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) über 20 Min. gepuffert mit Tris-Puffer (pH= 7,6) (alle hier verwandten Chemikalien wurden von Merck KG, Darmstadt bezogen). Die Schnitte wurden nach der Färbung im warmen Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Es resultierte pro Tumor je ein Schnittpräparat in der histologischen Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und ein immunhistochemisches Präparat mit Färbung der Ki-67 positiven Kerne, außerdem wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die aktivierte Caspase 3 verwendet. Die immunhistochemische Technik wurde in zwei Schritten mithilfe des automatisierten Immunostainers (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA), nach mitgeliefertem Protokoll durchgeführt: Zuerst wurde MIB-1, ein primärer monoklonaler Antikörper (Immunotech, Westbrook, ME, USA) eingesetzt, welcher sich ganz spezifisch an das Epitop des Ki-67-Proliferationsantigens bindet. Sowie der Cleaved Caspase 3-spezifische monoklonale Antikörper (Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt), der gegen die aktivierte Caspase 3 in

apoptotischen Zellen gerichtet ist und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden im zweiten Schritt diese Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem IgG-Zweitantikörper gegen Kaninchen-IgG (EnVision, DAKO, Hamburg) und damit die Färbung sichtbar gemacht. Zuletzt wurde eine repräsentative Auswahl der Präparate getroffen und Fotografien angefertigt.

### 2.2.3 Statistische Auswertung

Die Software R Version 2.11.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) wurde für die statistischen Auswertungen sowohl der in-vitro, als auch der in-vivo Versuche eingesetzt. Dies beinhaltete den Wertebereich (WB), die Mittelwerte (MW), den Median, sowie die einfache Standardabweichung (SD) und den Standardfehler (SE) in Bezug auf das Tumolvolumen und den TBR, welche wie folgt berechnet wurden:

Wertebereich (WB):

$$[x_1 - x_n]$$

Mittelwert (Arithmetisches Mittel):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Median:

$$\tilde{x} = \begin{cases} x_{\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} \left( x_{\left[ \frac{n}{2} \right]} + x_{\left[ \frac{n}{2} + 1 \right]} \right) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

einfache Standardabweichung (SD):

$$\sigma = \sqrt{\left( \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [x_i - \bar{x}]^2 \right)}$$

Standardfehler (SE):

$$\sigma/\sqrt{n}$$

Um die Mittelwerte aus mehreren Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde als statistische Methode eine Varianzanalyse (engl. analysis of variance [ANOVA]) eingesetzt. Die Signifikanz der ermittelten Werte wurde mit dem Dunnett-T- und Bonferroni-Test bestimmt.

Beim multiplen Testen wurde die Bonferroni-Korrektur eingesetzt. Werden k Tests durchgeführt, wird jeder einzelne Test zur Fehlerwahrscheinlichkeit  $\alpha/k$  getestet. ( $\alpha$  = Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art, eine wahre Nullhypothese abzulehnen) Diese Herangehensweise ist eher konservativ, weil sie die Ablehnung der Nullhypothese schwieriger macht (Bortz 2008, S.39; Hüsler 2010, S.165–166). Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert 0,05 festgelegt.

## 2.2.4 Klinische Studie

Bei Mantelzell-Lymphomen (MCL) aus der Gruppe der B-Zell-NHL ist die Proliferationsaktivität ein wichtiger prognostischer Marker. Immunhistochemische Analysen repräsentieren die Proliferationsrate nicht genau. Um eine nicht-invasive Charakteristik von MCL zu erhalten, wurde der frühe Einsatz des Proliferationsmarkers [ $^{18}\text{F}$ ]FLT in Bezug auf das Therapieansprechen untersucht.

### 2.2.4.1 *Patientenkollektiv und klinische Daten*

Die Einschluss-Kriterien, darunter eine histologisch bestätigte Diagnose eines MCL, eine klinische Indikation zur systemischen Behandlung, Alter  $\geq 18$  Jahre und volle Geschäftsfähigkeit, wurden von 8 Patienten, 3 Frauen und 5 Männern im Alter von 47 bis 87 Jahren, erfüllt. Das mittlere Alter betrug 70,8 Jahre. Nach vollständiger, ausführlicher Aufklärung über das Vorgehen und anschließender Unterschrift der Einverständniserklärung wurden die Patienten in die Studie aufgenommen.

Wie im initialen Staging mit klinischer Untersuchung, Knochenmarkbiopsie und CT-Scan festgestellt, befand sich ein Patient im Stadium II und 7 Patienten befanden sich im Stadium IV der Erkrankung nach der Ann Arbor Klassifikation. Der internationale MCL-Prognose-Index (MIPI) Score wurde berechnet, wie an anderer Stelle vorher von Hoster et al. beschrieben (Hoster et al. 2008, S.558–565). Er dient zur Abschätzung der Überlebenszeit speziell für MCL-Patienten und berücksichtigt Alter, aktuelles Erscheinungsbild, Laktatdehydrogenase und Leukozytenzahl. Zusätzlich liefert auch der Proliferations-Index wichtige Informationen zur Einschätzung der individuellen Prognose (Hoster et al. 2008, S.558–565).

Von Mai 2010 bis Mai 2011 wurden die PET-Scans durchgeführt, der Studieneinschluss erfolgte von Mai 2010 bis April 2011.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München legitimiert.

### 2.2.4.2 Histologie

Die Klassifikation der Lymphome orientiert sich an dem aktuellen Klassifikationssystem der WHO von 2008 (Swerdlow et al. 2008, S.157–166). Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, sowie die Immunhistochemie mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und der zusätzliche Nachweis von cyclin D1(clone sp4; DCS Innovative Diagnostik-Systeme) wurde, wie im in-vivo Abschnitt der Arbeit in Kapitel 3.2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Alle 8 Patienten waren cyclin D1-positiv. Die Translokation t(11;14)(q13;q32) liegt der Überexpression dieses Zellzyklusregulationsproteins cyclin D1 zugrunde und ist ein Charakteristikum des MCL. Bei zwei der Patienten wurde histologisch die blastoide Form nachgewiesen, die restlichen 6 Patienten waren an der klassischen Form des MCL erkrankt.

### 2.2.4.3 Auswertung der PET

In Zusammenhang mit dem Routine-Staging, die eine klinische Untersuchung, CT-Scan und Knochenmarkbiopsie beinhalten, wurden die Baseline [<sup>18</sup>F]FLT-PET-

und [<sup>18</sup>F]FDG-PET-Scans innerhalb einer Woche vor Therapie durchgeführt. [<sup>18</sup>F]FLT-PET wurde bei 5 Patienten nach durchschnittlich 6,2 Tagen (Median = 6,0; Wertebereich = 5,0 - 7,0 Tage) nach dem Start des ersten Immunochemotherapie-Zyklus wiederholt. [<sup>18</sup>F]FLT wurde, wie vorher beschrieben, synthetisiert (Machulla et al. 2000, S.843–846). Der PET-Scan wurde 45 min. nach Injektion von ca. 300 MBq [<sup>18</sup>F]FLT (Wertebereich = 270 – 340 MBq), wie von Herrmann et al. beschrieben, gestartet (Herrmann et al. 2011, S.691).

Alle Scans wurden von zwei Nuklearmedizinern unabhängig voneinander befundet, ohne Kenntnis klinischer Hinweise oder Ergebnisse anderer bildgebender Verfahren. Regions of interest (ROIs) mit 1,5 cm Durchmesser wurden in die Region mit der höchsten Tumoraktivität platziert, wie an den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschrieben (Herrmann et al. 2007, S.3554; Weber et al. 2001, S.3059–3062; Wieder et al. 2004, S.901). Die Mittelwerte der SUVs wurden von jedem ROI mit der folgenden Formel nach Weber et al. berechnet (Weber et al. 1999, S.1771–1777):

$$\text{gemessene Aktivitätskonzentration [Bq/g]} \times \text{Körpergewicht [g]} / \text{injizierte Aktivität [Bq]}$$

#### 2.2.4.4 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Auswertungsprogramm PASW SPSS Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Aufgrund der kleinen Patientenzahl und dem eher explorativen Charakter der klinischen Studie fanden keine formalen Tests Anwendung. Zur Beschreibung der quantitativen Daten wurde das arithmetische Mittel, der Median und der Wertebereich angegeben. Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) oder Spearman (ρ) wurden mit einem 95% Konfidenzintervall berechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 In-vitro Experimente

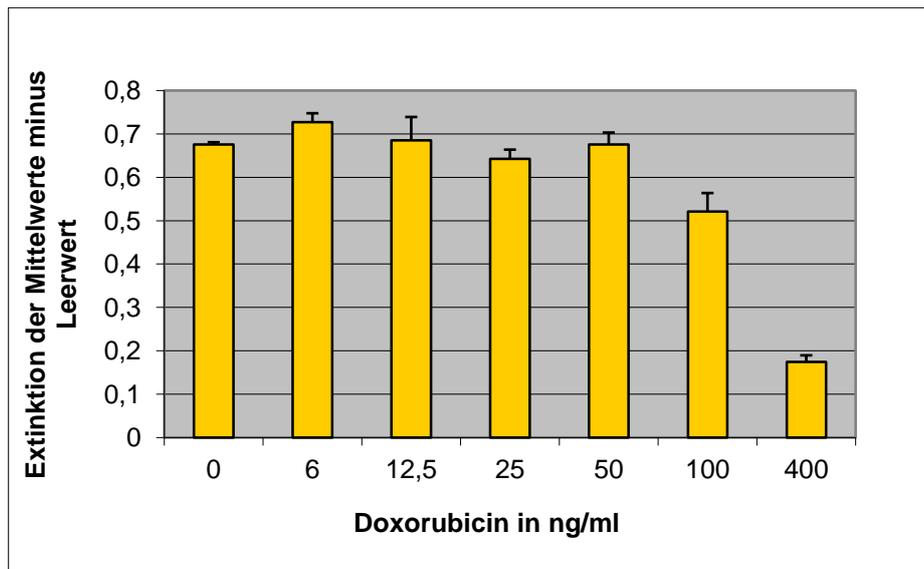
#### 3.1.1 Ergebnisse des MTT-Assays

Zu Beginn wurde mithilfe des MTT Assays die Sensibilität der SU-DHL-4 - Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin nachgewiesen. Es konnte eine dosisabhängige Reduktion der Stoffwechselaktivität der Lymphomzellen bei steigender Doxorubicinkonzentration gezeigt werden.

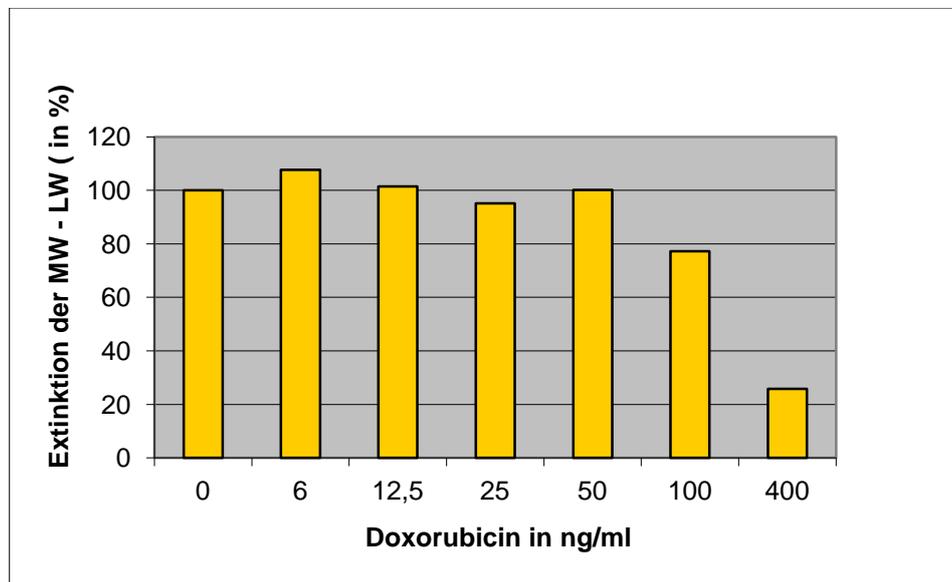
24h nach Doxorubicingabe sank die Stoffwechselaktivität der Zellen deutlich ab der Konzentration von 100 ng/ml Doxorubicin im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollzellen von 0,675 (SE = 0,005) auf 0,521 (SE = 0,042), 77,2% bezogen auf Kontrollzellen (festgelegt auf 100%). Die weiteren Werte: 6 ng/ml: 0,727 (SE = 0,021), 107,7% ; 12,5 ng/ml: 0,685 (SE = 0,054), 101,5% ; 25 ng/ml: 0,642 (SE = 0,021), 95,1%; 50ng/ml: 0,676 (SE = 0,027), 100,1%; 100ng/ml: 0,521 (SE = 0,042), 77,2%; 400ng/ml: 0,174 (SE = 0,015), 25,8% (Abb. 5 A und B). Alle Mittelwerte sind abzüglich Leerwert angegeben.

Nach 48h Inkubationszeit des Chemotherapeutikums ließ sich eine schrittweise Abnahme der stoffwechselaktiven Zellen unter den von 6 ng/ml bis 400 ng/ml mit Doxorubicin behandelten Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, zeigen (0 ng/ml {Kontrolle}: 0,400 [SE = 0,039], 100%; 6 ng/ml: 0,348 [SE = 0,055], 87,1%; 12,5 ng/ml: 0,296 [SE = 0,033], 74,1%; 25 ng/ml: 0,290 [SE = 0,035], 72,6%; 50 ng/ml: 0,269 [SE = 0,020], 67,3%; 100 ng/ml: 0,162 [SE = 0,017], 40,5%; 400 ng/ml: 0,019 [SE = 0,005], 4,8%). (Abb. 6 A und B)

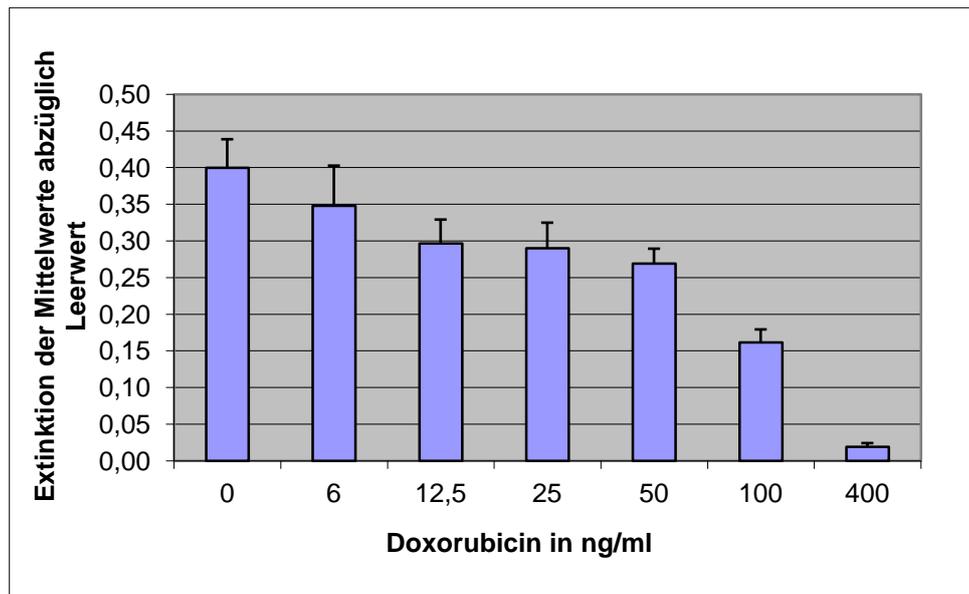
Die größte Reduktion trat jeweils bei 400 ng/ml Doxorubicin auf (nach 24h: 0,174 [SE = 0,015]; nach 48h: 0,019 [SE = 0,005]). Es konnte zudem eine Sensibilität der Zellen bis zu einer Konzentration von 6 ng/ml Doxorubicin bewiesen werden.



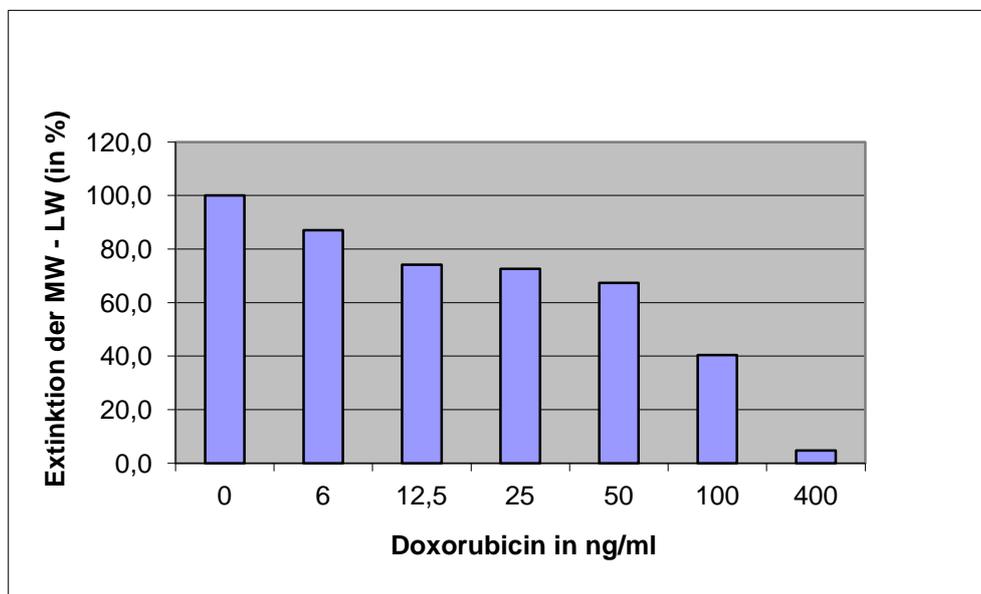
**Abb. 5 (A):** Extinktionsmessung des MTT Assay 24h nach Chemotherapie mit Nachweis stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration, Fehlerbalken geben den Standardfehler an



**Abb. 5 (B):** Prozentualer Anteil stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration im MTT Assay 24h nach Chemotherapie, MW= Mittelwert; LW= Leerwert



**Abb. 6 (A):** Extinktionsmessung des MTT Assay 48h nach Chemotherapie mit Nachweis stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration, Fehlerbalken geben den Standardfehler an



**Abb. 6 (B):** Prozentualer Anteil stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration im MTT Assay 48h nach Chemotherapie, MW= Mittelwert, LW= Leerwert

### 3.1.2 Ergebnisse der Viabilitätstestung

Im nächsten Schritt wurde mit der Trypanblaufärbung untersucht, wie sich die verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen auf das Überleben der Zellen auswirken.

Die Viabilität der Lymphomzellen wurde in den Doxorubicinkonzentrationen 12,5 ng/ml , 25 ng/ml , 200 ng/ml , 800 ng/ml mit den unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Zusammengefasst wurde bei ansteigenden Doxorubicinkonzentrationen eine Verminderung viabler Zellen festgestellt.

Schon bei den niedrigeren Konzentrationen bis 25 ng/ml ließ sich 24h nach Chemotherapie eine Abnahme der vitalen Zellen um ca. ein Drittel (SE = 18559,2) erkennen. Bei 200 und 800 ng/ml Doxorubicin überlebten ca. 50% der Zellen (SE = 27284,5 und SE = 8819,2).

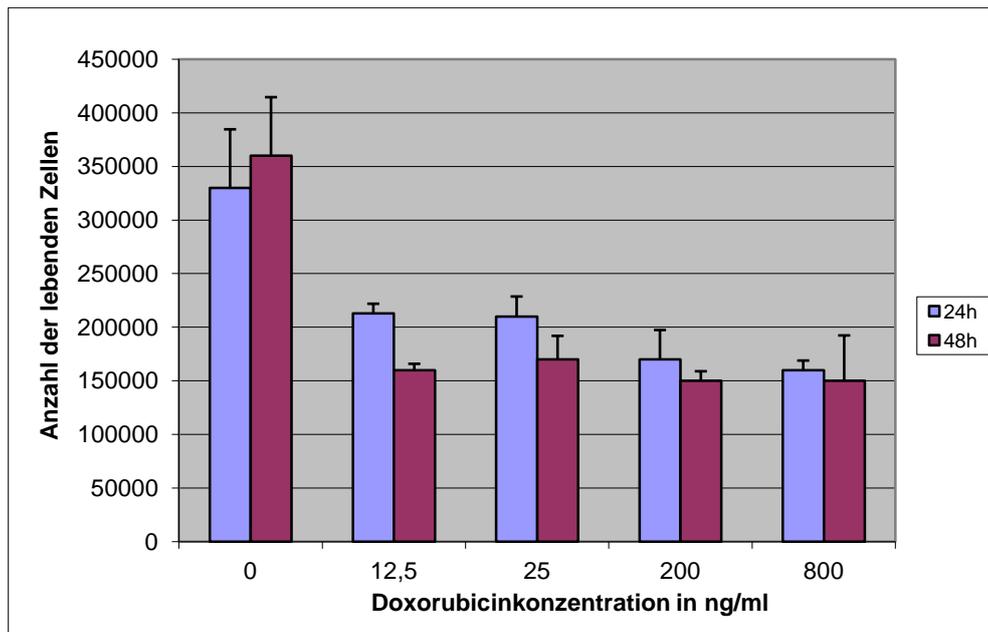
Es ergaben sich folgende Werte: 0 ng/ml (Kontrolle): 330000 (SE = 54569,0), 100%; 12,5 ng/ml: 213000 (SE = 8819,2), 65%; 25 ng/ml: 210000 (SE = 18559,2), 64%; 200 ng/ml: 170000 (SE = 27284,5), 52%; 800 ng/ml: 160000 (SE = 8819,2), 48%. Angegeben ist immer der Mittelwert. Prozentzahlen sind in Bezug zur Kontrolle zu sehen.

Abbildung 7 A und B, blaue Säulen.

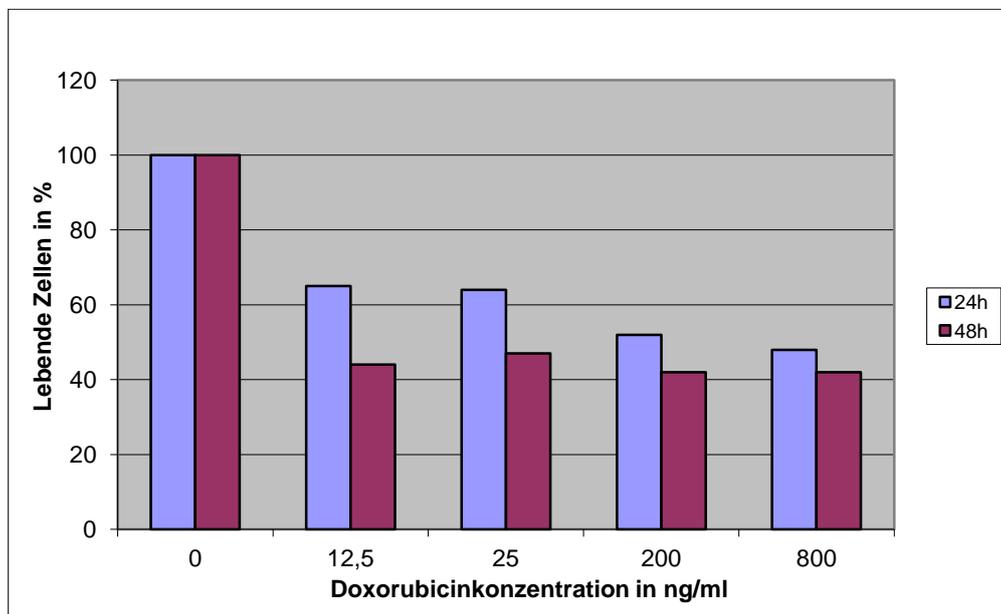
48h nach Doxorubicingabe zeigte sich in allen Konzentrationen eine Reduktion vitaler Zellen um ca. 60%.

Gemessen wurde: 0 ng/ml (Kontrolle): 360000 (SE = 54569,0), 100%; 12,5 ng/ml: 160000 (SE = 5773,5), 44%; 25 ng/ml: 170000 (SE = 21858,1), 47%; 200 ng/ml: 150000 (SE = 8819,2), 42%; 800 ng/ml: 150000 (SE = 42262,4), 42%.

Abbildung 7 A und B, lila Säulen.



**Abb. 7 (A):** Viabilität der Lymphomzellen in Abhängigkeit der Doxorubicinkonzentrationen unter Angabe der Zellzahl 24 (blaue Säulen) und 48h (lila Säulen) nach Chemotherapie, Fehlerbalken geben Standardfehler an.



**Abb. 7 (B):** Viabilität der Lymphomzellen in Abhängigkeit der Doxorubicinkonzentrationen mit Prozentangabe im Vergleich zur Kontrolle 24 (blaue Säulen) und 48h (lila Säulen) nach Chemotherapie

### 3.1.3 Resultate der radioaktiven Aufnahme-Versuche mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT:

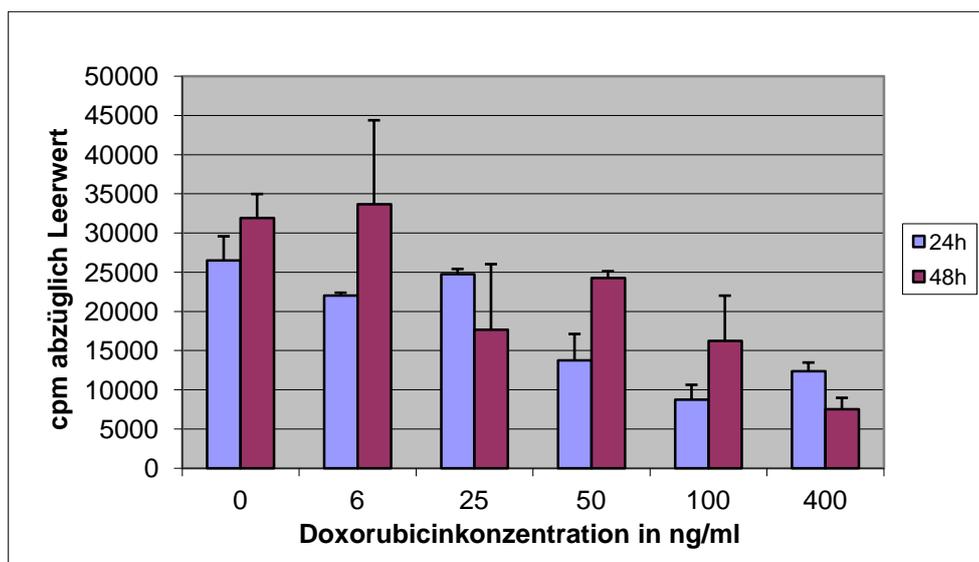
#### 3.1.3.1 [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

In den im Folgenden, zunächst mit dem Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, durchgeführten Uptake-Versuchen ließ sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung in den Konzentrationen von 6 bis 400 ng/ml feststellen, wie in den Abbildungen 8 A und B ersichtlich. Jedoch konnte ein Abwärtstrend der Traceraufnahme bei steigenden Doxorubicinkonzentrationen beobachtet werden.

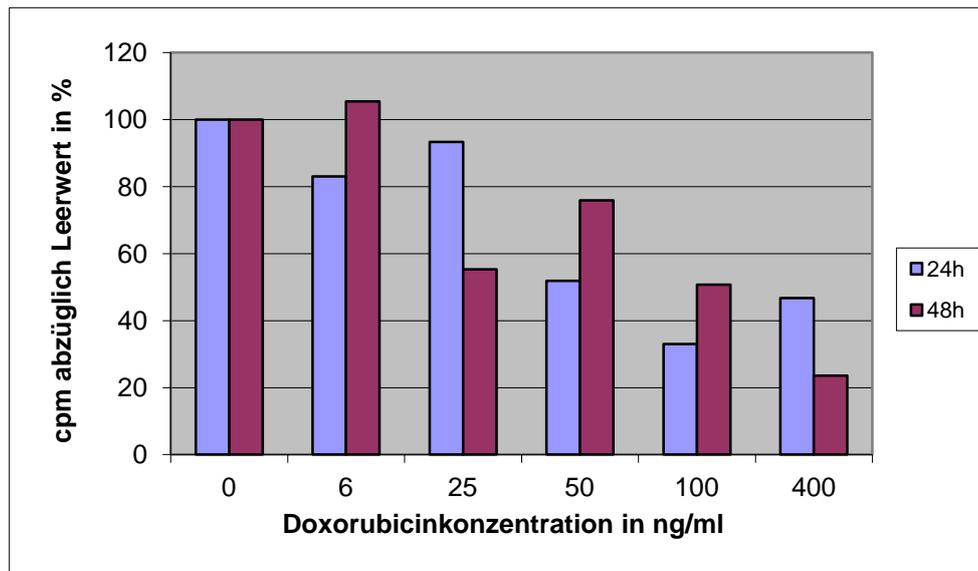
24h nach cytotoxischer Therapie ergaben sich für 6 ng/ml: Mittelwert abzüglich Leerwert (MW -LW) = 22023,5 cpm; SE = 353,8; 83%; 25 ng/ml: MW-LW = 24757,8 cpm; SE = 656,2; 93%; 50 ng/ml: MW-LW = 13768,5; SE = 3346,7; 52%; 100 ng/ml: MW-LW = 8759,6 cpm; SE = 1872,8; 33%; 400ng/ml: MW-LW = 12380,5 cpm; SE= 1094,9; 47% (Leerwert = Medium + FDG). Der maximale [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake unbehandelter Kontrollzellen betrug minus Leerwert 26512,7 cpm; SE = 3068,9, 100%. (Abb. 8 A und B, blaue Säulen)

48h nach Chemotherapie zeigten sich ähnliche Verhältnisse, wobei es bei 400 ng/ml zu einem deutlichen Abfall des Uptakes um 76,4%; SE = 1443,5 gegenüber den Kontrollzellen kam, ablesbar in Abb. 8 A und B, lila Säulen.

0 ng/ml (Kontrolle): 31933,0 cpm; SE = 3044,0; 100%; 6 ng/ml: 33669,0 cpm; SE = 10712,4; 105%; 25 ng/ml: 17651,3 cpm; SE = 8376,3; 55%; 50 ng/ml: 24245,8 cpm; SE = 882,3; 76%; 100 ng/ml: 16219,0 cpm; SE = 5788,3; 51%; 400 ng/ml: 7524,6 cpm; SE = 1443,5; 24%.



**Abb. 8 (A):** [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake 24 und 48h nach Doxorubicintherapie mit cpm-Werten abzüglich des Leerwertes abhängig von den Konzentrationen 0 bis 400 ng/ml. Standardfehler dargestellt als Fehlerbalken. cpm= counts per minute



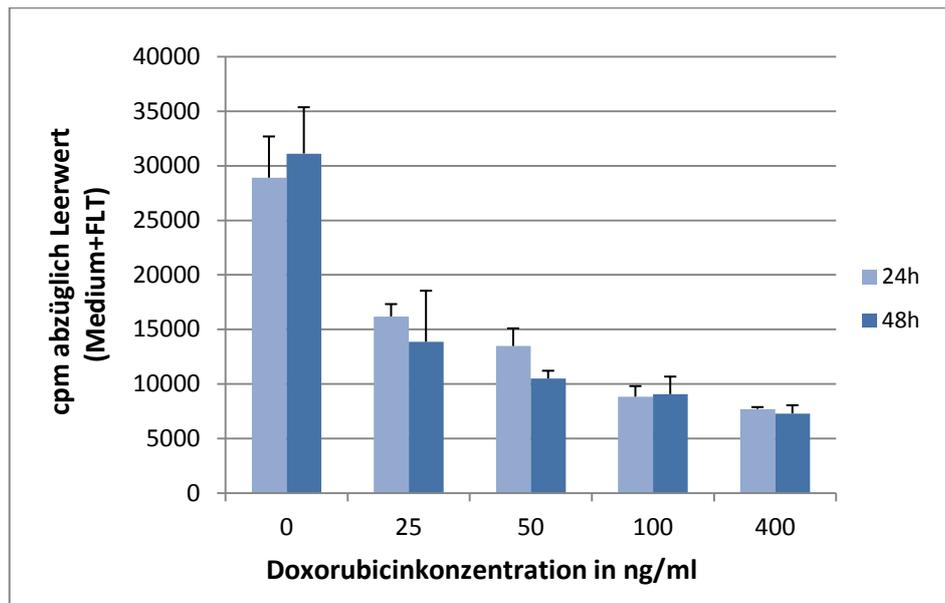
**Abb. 8 (B):**  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptake 24 und 48h nach Doxorubicintherapie mit cpm-Werten abzüglich des Leerwertes in Prozentangabe in Beziehung zu unbehandelten Kontrollzellen als 100%, in Abhängigkeit von den Konzentrationen 0 bis 400 ng/ml. cpm = counts per minute

### 3.1.3.2 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$

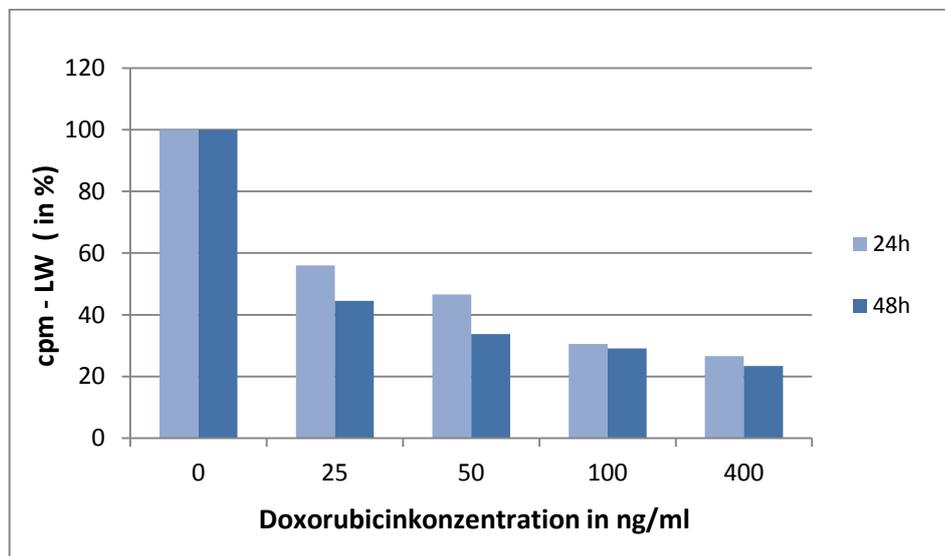
Anders verhielt sich in den Versuchen die  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Traceraufnahme der Lymphomzellen. Im Gegensatz zu  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  wurde mit  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  in den verwandten Doxorubicinkonzentrationen von 25 bis 400 ng/ml eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen: 24h nach Chemotherapie zeigte sich eine deutliche, schrittweise Reduktion des Uptakes: 0 ng/ml: Mittelwert minus Leerwert (MW-LW) = 28904,8 cpm; SE = 3780,0; 100%; 25 ng/ml: MW-LW = 16181,9 cpm; SE = 1132,7; 56%; 50 ng/ml: MW-LW = 13471,4 cpm; SE = 16150,0; 47%; 100ng/ml: MW-LW = 8823,1 cpm; SE = 972,4; 31%; 400 ng/ml: MW-LW = 7701,4 cpm; SE = 170,2; 27% (Leerwert = Medium + FLT). Prozentwerte sind immer auf die Kontrolle bezogen. Diese Werte lassen sich in den Abb. 9 A und B (hellblaue Säulen) nachvollziehen.

Nach 48h zeigte sich schon bei 25 ng/ml ein Rückgang der Traceraufnahme auf 44,5% (SE = 4679,0), bei 400 ng/ml betrug sie im Vergleich zur Kontrolle nur noch ein Viertel (23,4 %, SE = 760,3), wie man aus den Abb. 9 A und B ablesen kann.

0 ng/ml(Kontrolle): 31121,9 cpm; SE = 4343,9; 100%; 25 ng/ml: 13861,3 cpm; SE = 4679,0; 45%; 50 ng/ml: 10494,1 cpm; SE = 706,6; 34%; 100 ng/ml: 9061,9 cpm; SE = 1605,3; 29%; 400 ng/ml: 7280,2 cpm; SE = 760,3; 23%.

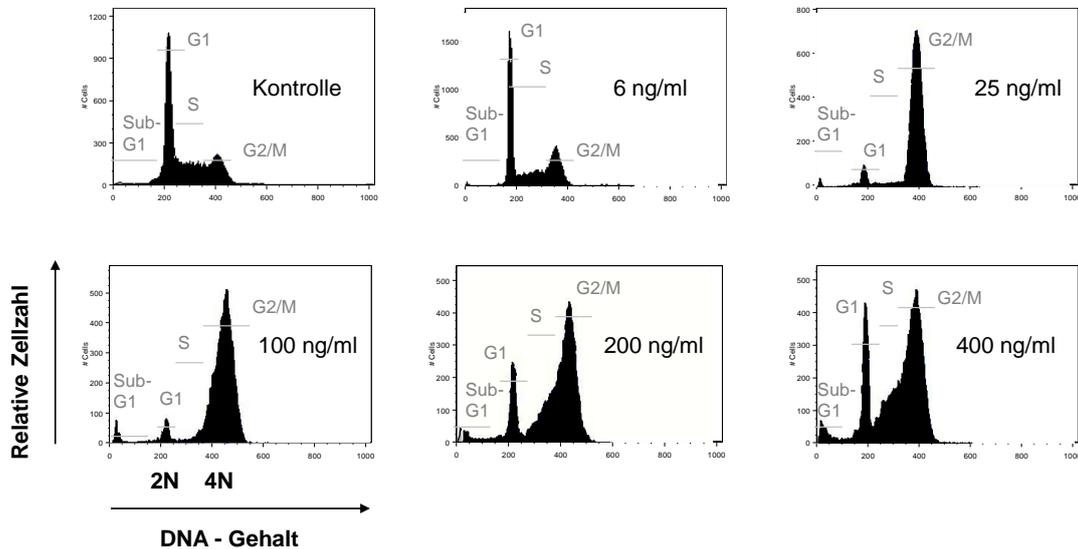


**Abb. 9 (A):**  $[^{18}\text{F}]$ FLT-Traceraufnahme gemessen in cpm abzüglich Leerwert (Medium+FLT), abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen 0 bis 400 ng/ml, 24h (hellblau) und 48h (dunkelblau) nach Chemotherapie, cpm= counts per minute



**Abb. 9 (B):**  $[^{18}\text{F}]$ FLT-Traceraufnahme gemessen in cpm abzüglich Leerwert (LW) in Prozentangabe in Bezug zur Kontrolle, abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen 0 bis 400 ng/ml, 24h (hellblau) und 48h (dunkelblau) nach Chemotherapie

## 3.1.4 Zellzyklusanalyse mit FACS



**Abb. 10:** Effekte auf den Zellzyklus unter steigenden Doxorubicinkonzentrationen, 48h nach Chemotherapie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen

Um genauere Angaben über den Zellzyklus 48h nach Chemotherapie mit Doxorubicin zu erhalten, wurde ein FACS durchgeführt (Abb.10). Dabei ergaben sich in den Konzentrationen von 6 bis 100 ng/ml eine dosisabhängige Reduktion der S-Phase mit ansteigendem G2-Arrest. Bei 200 und 400 ng/ml wurde ein zusätzlicher G1-Arrest beobachtet. Eher gering vertreten zeigte sich die Fraktion der apoptotischen Zellen, repräsentiert durch die subG1-Phase, mit einem Maximum von 7,4% (SE = 0,2) bei 400 ng/ml (Abb.11).

Die Prozentanteile der berechneten Mediane betragen im Einzelnen:

**Kontrollzellen:** subG1: 2,8%(SE=0,3); G1: 38,7%(SE=3,0); S: 43,0% (SE=1,7); G2: 13,9%(SE=0,5).

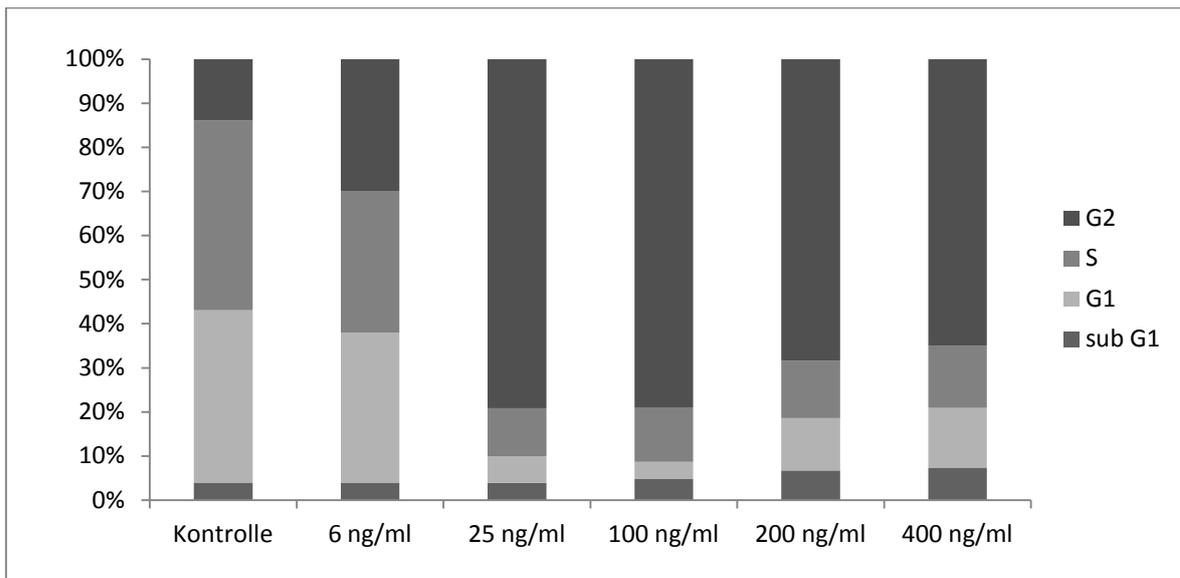
**6 ng/ml:** subG1: 2,9%(SE=0,2); G1: 34,3%(SE=2,3); S: 31,9%(SE=1,6) ; G2: 23,6%(SE=0,7).

**25 ng/ml:** subG1: 3,9%(SE=0,1); G1: 5,4%(SE=0,3); S: 10,5%(SE=0,1); G2: 79,2%(SE=0,7).

**100 ng/ml:** subG1: 4,8%(SE=0,2); G1: 3,9%(SE=0,1); S: 12,2%(SE=0,8); G2: 79,8%(SE=1,3).

**200ng/ml:** subG1: 6,7%(SE=0,2); G1: 11,8%(SE=0,1); S: 13,3%(SE=1,9); G2: 67,9%(SE=2,3).

**400 ng/ml:** subG1: 7,4%(SE=0,2); G1: 13,5%(SE=0,9); S: 14,1%(SE=1,5); G2: 64,8%(SE=1,2).



**Abb. 11:** Zellzyklusanalyse mittels FACS 48h nach Chemotherapie: Prozentualer Anteil jeder einzelnen Zellzyklusphase am Gesamtzyklus, Vergleich der Kontrollzellen zu den aufsteigenden Doxorubicinkonzentrationen von 6 bis 400 ng/ml.

## 3.2 In-vivo Versuche

### 3.2.1 Hemmung des Tumorwachstums mit Doxorubicin

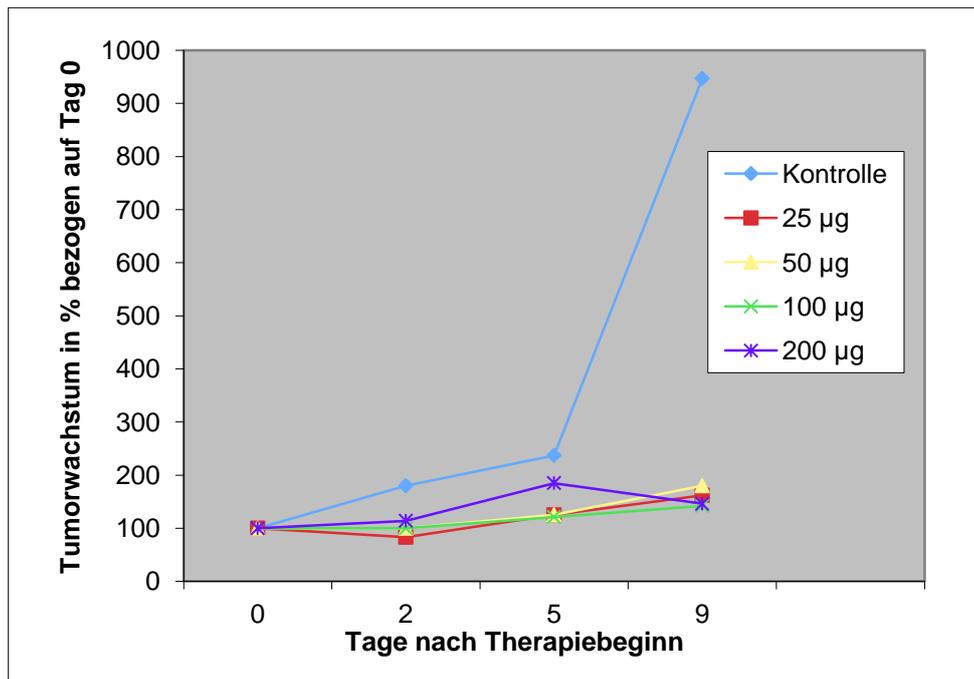
Im Tiermodell mit den SCID-Mäusen wurden ab einem mittleren Tumolvolumen von 1 cm<sup>3</sup> tägliche Schublehren-Messungen nach der Formel in 2.2.2.2 zur Abschätzung des Tumorwachstums durchgeführt. Zur Therapie wurden ab ca. 1,5 cm<sup>3</sup> Tumolvolumen 100µl Doxorubicin in einer gewichtsangepassten Konzentration von 10 µg/gKg, intraperitoneal als Einzelinjektion verabreicht. Das gleiche Volumen, jedoch mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl), wurde der Kontrollgruppe ebenfalls intraperitoneal injiziert. In der Abbildung 12 dargestellt sind die Messungen an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 9. Wobei das Tumolvolumen am Tag 0 100% entspricht und das Tumorwachstum der Gruppe der Kontrollmäuse und der behandelten Doxorubicingruppen in Prozent umgerechnet wurde.

*Volumenzunahme/abnahme in Prozent bezogen auf Messung am Tag 0 (100%):*

**Tag 2:** Kontrolle: +80%; SE=30; 25µg: -17%; SE=12; 50µg:+0%;SE=5; 100µg:+0%; SE=18; 200µg: +14%; SE=10

**Tag 5:** Kontrolle: +137%; SE=155; 25µg: +25%; SE=14; 50µg: +25%; SE=15; 100µg: +21%; SE=9; 200µg: +85%; SE=28

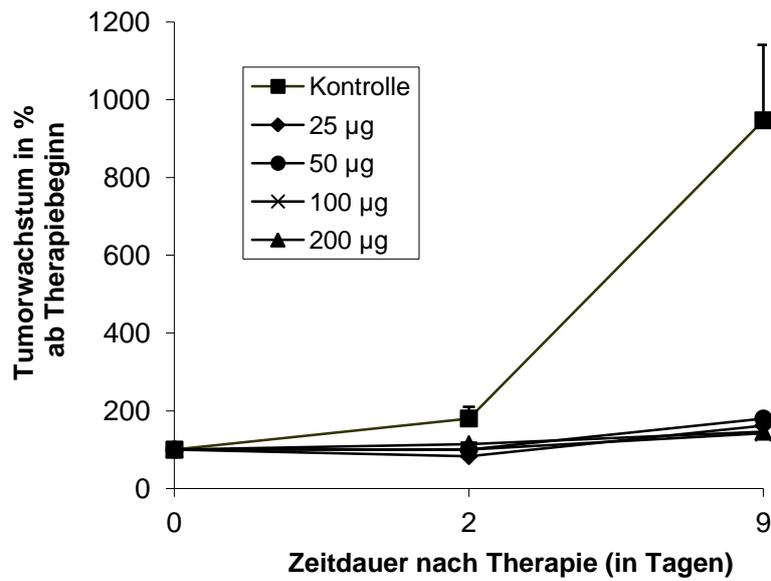
**Tag 9** siehe nächste Seite



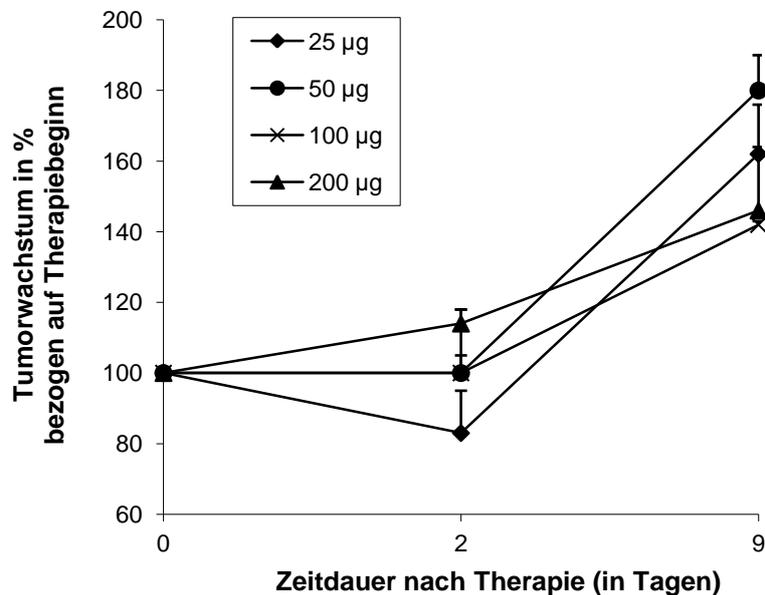
**Abb. 12:** Tumorwachstum in Prozent, bezogen auf Therapiebeginn (Tag 0), dargestellt sind die einzelnen Doxorubicinkonzentrationen im Verlauf von Tag 0 bis Tag 9

In Abbildung 13 A und B wurden die Tumorprogredienz in Prozent auf das Ausgangsvolumen von Tag 0 umgerechnet und die Messwerte von Tag 0, Tag 2 und Tag 9 berücksichtigt. In der Kontrollgruppe befanden sich 6 Mäuse ( $n=6$ ), in den restlichen Doxorubicin-Gruppen befanden sich an Tag 2 13 Mäuse ( $n=13$ ) und an Tag 9 drei Mäuse ( $n=3$ ) je Konzentration. Das Tumolvolumen verhielt sich am Tag 2 in den jeweiligen Therapiegruppen konstant, verglichen mit einem Anstieg um 80% ( $SE = 30$ ) in der Kontrollgruppe. Am Tag 9 nach Chemotherapie wurde auch bei den behandelten Mäusen eine Progredienz des Tumolvolumens verzeichnet (25µg: + 62%,  $SE = 17$ ; 50µg: + 80%,  $SE = 12$ ; 100µg: +42%,  $SE = 0,7$ ; 200µg: + 46%,  $SE = 21$ ). Ein viel größerer Zuwachs, nämlich um 947%,  $SE = 225$  ließ sich bei den unbehandelten Kontrollmäusen beobachten, ersichtlich aus Abb.13 A.

Aufgrund der niedrigen Anzahl an Mäusen gab es keinen statistischen Unterschied im Tumorwachstum zwischen den einzelnen Doxorubicinkonzentrationsgruppen. Dennoch konnte in der Langzeitbeobachtung eine Tendenz zur größeren Wachstumsinhibierung bei höheren Doxorubicinkonzentrationen erkannt werden.



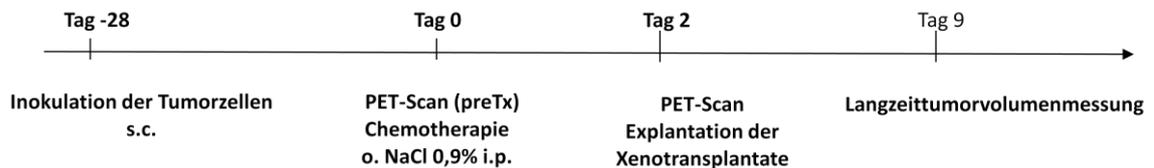
**Abb. 13 (A):** Tumorwachstum in den verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen in Prozent bezogen auf Tag 0 (Therapiebeginn) mit Kontrollgruppe, gemessen an Tag 2 und 9 nach Therapie, Fehlerbalken geben Standardfehler (SE) an.



**Abb. 13 (B):** Tumorwachstum in den verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen in Prozent bezogen auf Tag 0 (Therapiebeginn) ohne Kontrollgruppe, gemessen an Tag 2 und 9 nach Therapie, Fehlerbalken geben Standardfehler (SE) an.

### 3.2.2 Therapie

Im Rahmen der tierexperimentellen Studie wurden 15 weibliche SCID-Mäuse (n=15) im Mittel vier Wochen (28 Tage) vor dem statischen PET-Scan mit den SU-DHL-4-Zellen xenotransplantiert. Ab einem mittleren Tumolvolumen von ca. 1,5 cm<sup>3</sup> wurden diese Mäuse in die Studie eingeschlossen. Hierbei wurde zuerst ein statischer pre- Treatment-PET-Scan als Baseline-Messung für alle weiteren PET-Scans durchgeführt. Im Anschluss erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Chemotherapie mit 10 µg/gKg Doxorubicin. Den drei Kontrollmäusen (n=3) dagegen wurde nur eine physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) i.p. injiziert. Dieser Tag wurde als Tag 0 im Protokoll festgelegt. Daraufhin wurden am Tag 1 (24h) und Tag 2 (48h) nach Therapie erneut PET-Scans durchgeführt, um den weiteren Verlauf der Tumorprogression zu dokumentieren. An Tag 2 wurden dann der Tumor und zusätzliche Organe zur ex vivo Validierung der PET-Daten im Gamma-Counter explantiert. Dieses Vorgehen wurde sowohl bei [<sup>18</sup>F]FDG, als auch bei [<sup>18</sup>F]FLT angewandt. Das Therapieschema ist in Abb. 14 dargestellt.

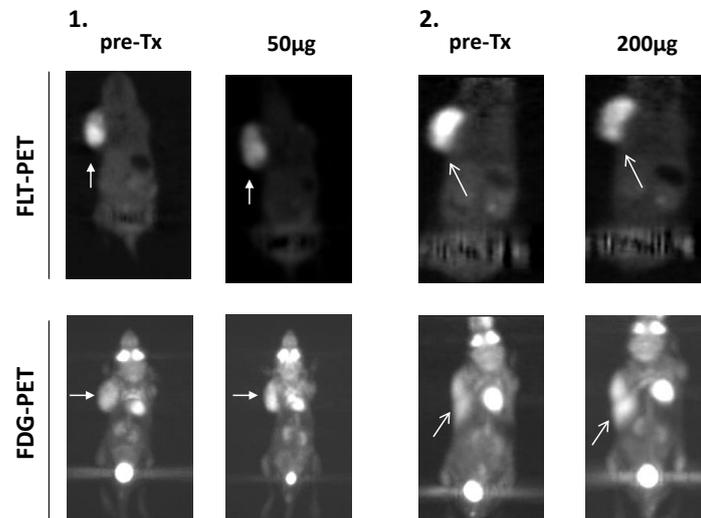


**Abb. 14:** Therapieschema des Tiermodells: **Tag -28:** s.c. Xenotransplantation der SU-DHL-4-Zellen in SCID-Mäuse. **Tag 0:** statisches Baseline-PET-Scan, danach entweder Chemotherapie mit Doxorubicin oder NaCl 0,9% Injektion i.p. **Tag 1 und 2:** statischer Verlaufs-PET-Scan mit abschließender Explantation des Tumors und weiterer Organe zur ex vivo Validierung.

### 3.2.3 Unterschiede in der frühen Beurteilung des Therapieansprechens mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT und [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

Statische [ $^{18}\text{F}$ ]FLT- und [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Scans wurden am Tag 0 (pre-treatment [pre-Tx]) zur Baseline-Bestimmung und an Tag 2 (post-treatment [post-Tx]) als Verlaufsmessung bei je drei Mäusen pro Doxorubicinkonzentrationsgruppe durchgeführt. Repräsentative, axiale und transversale PET-Bilder für jede Konzentrationsgruppe pre- und post-treatment mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT und [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wurden für Abbildung 15 ausgewählt. Hier lässt sich eine reduzierte [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Traceraufnahme nach Chemotherapie erkennen (Abb. 15). Hingegen fällt bei der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Aufnahme ein Anstieg ganz unabhängig von der Doxorubicinkonzentration auf (Abb. 15).

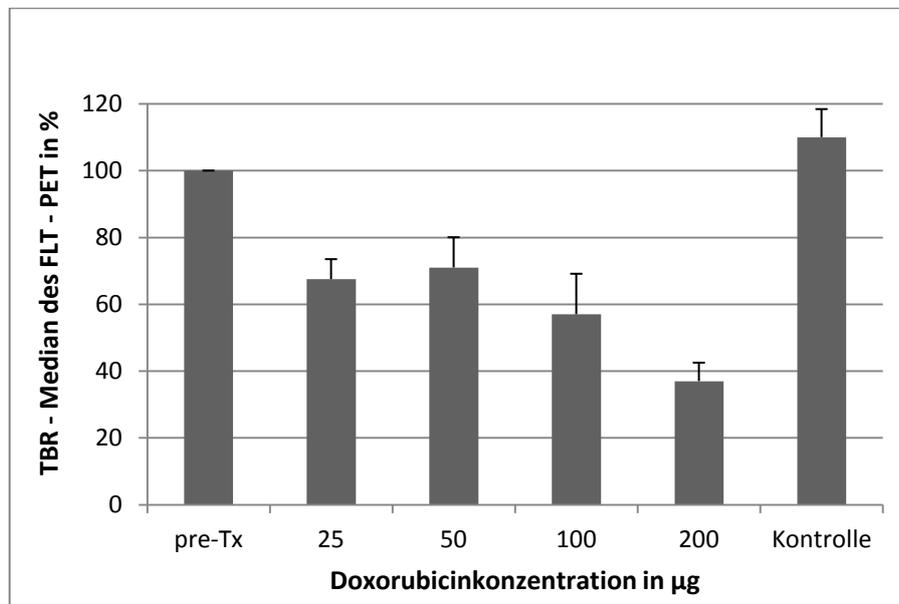
Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden regions of interest (ROIs) in den axialen PET-Aufnahmen zum Nachvollziehen einer Dosis-Wirkungsbeziehung definiert. Die TBR-Mittelwerte vor Therapie, wurden als 100% festgelegt und die Reduktion oder Zunahme der TBR-Mittelwerte nach der Therapie in Bezug dazu berechnet.



**Abb. 15:** [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET-Scans (obere Reihe): **1.** vor (pre-Tx) und nach Therapie mit 50µg Doxorubicin, sowie **2.** vor (pre-Tx) und nach Therapie mit 200µg Doxorubicin im Vergleich zu [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Scans (untere Reihe) mit gleicher Vorgehensweise wie bei [ $^{18}\text{F}$ ]FLT. Die Tumormasse ist jeweils mit einem Pfeil markiert.

## FLT:

Für den Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FLT zeigte sich in der Varianzanalyse eine signifikante Heterogenität der TBR-Prozentwertverteilung zwischen den einzelnen Konzentrationsgruppen mit  $p = 0,008$ . Der Dunnett-T-Test ergab im multiplen, paarweisen Testen signifikant niedrigere TBR - Prozentwerte in allen Konzentrationen im direkten Vergleich mit den Kontrollmäusen. Diese TBR-Medianwerte, angegeben in Prozent, 48h (Tag 2) nach der Chemotherapie sanken für jede Konzentration: Bei 25  $\mu\text{g}$  auf 67,5% (SE = 6,0,  $p = 0,02$ ); bei 50  $\mu\text{g}$  auf 71,0% (SE = 9,0,  $p = 0,037$ ); bei 100  $\mu\text{g}$  auf 57,0% (SE = 12,1,  $p = 0,008$ ); sowie bei 200  $\mu\text{g}$  auf 37,0% (SE = 5,5,  $p = 0,001$ ). In der Kontrolle zeigte sich ein Anstieg um 10,0% (SE = 8,4). Dargestellt ist dies in Abbildung 16:

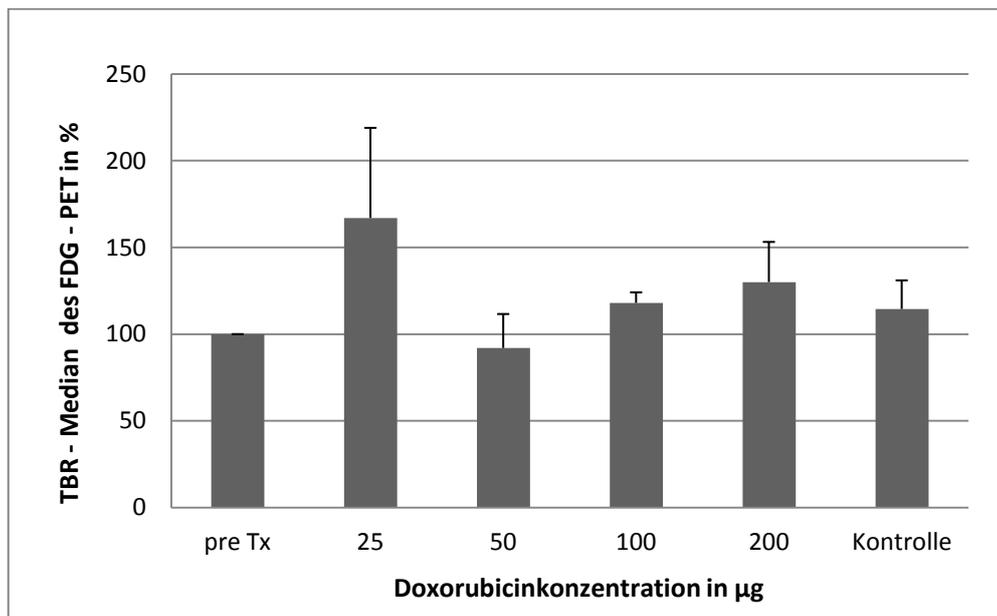


**Abb. 16:** Prozentuale Angabe der TBR-Medianwerte des [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET, nach Chemotherapie, abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen inklusive Kontrolle immer in Bezug zu den Werten vor Therapie (pre-Tx), Fehlerbalken geben SE an.

Obwohl die TBR-Medianwerte der Doxorubicinkonzentrationen in Prozent signifikant zu den TBR-Werten der Kontrollen differieren, konnte kein signifikanter Unterschied unter den einzelnen Konzentrationen festgestellt werden ( $p$ -Wert ANOVA = 0,131).

## FDG:

Andererseits ergaben sich für den Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG folgende prozentuale TBR-Medianwerte: Bei 25 $\mu\text{g}$  kam es zu einem Anstieg auf 167,0% (SE = 52,0); bei 50 $\mu\text{g}$  wurde ein Wert von 92,0% (SE = 19,6) erreicht; bei 100 $\mu\text{g}$  kam es zu 118,0% (SE = 6,1); bei 200 $\mu\text{g}$  zeigten sich 130,0% (SE = 23,2) und die Kontrolle stieg leicht an auf 114,5% (SE = 16,5) bezogen auf die Baseline (Abb.17).



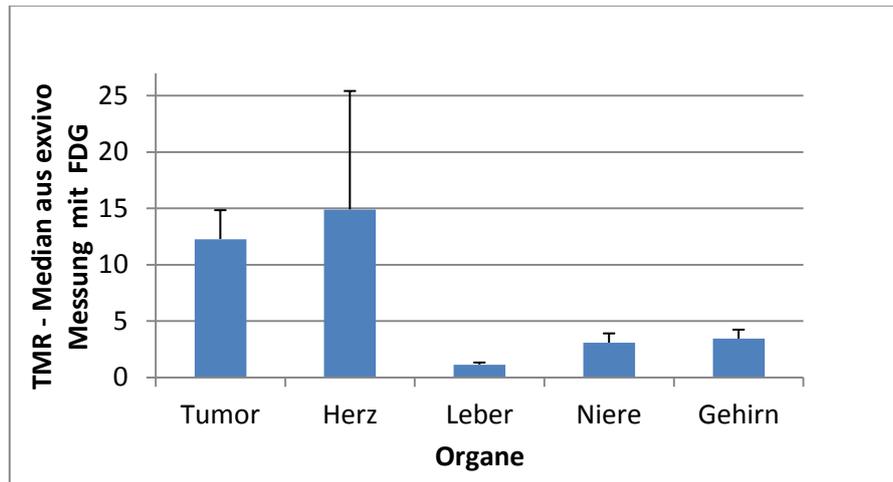
**Abb. 17:** Prozentuale Angabe der TBR-Medianwerte des [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET, nach Chemotherapie, abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen inklusive Kontrolle immer in Bezug zu den Werten vor Therapie (pre-Tx), Fehlerbalken geben SE an.

## 3.2.4 Ergebnisse der Bioverteilung der Tracer und ex-vivo

Bestimmung der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG- und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Aufnahme im Lymphom-Xenotransplantat

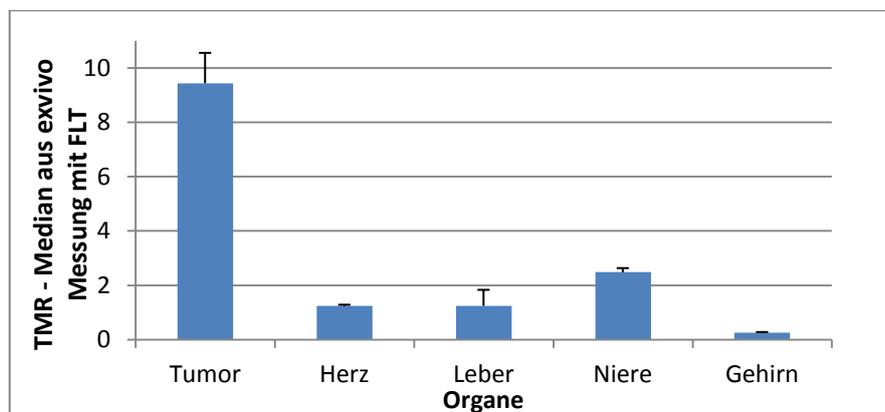
Um genauere Hinweise über die Verteilung der radioaktiven Tracer im murinen Organismus zu erhalten, wurde bei einzelnen Mäusen (je Tracer 7 Mäuse  $n=7$ ) eine Biodistribution sowohl mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, als auch mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT ausgeführt. Anschließend wurden die Organe ex vivo im Gamma-Counter ca. 120 Min. nach Injektion der Tracer gemessen. Pro Maus wurde zwischen 9,25 MBq und 11,1 MBq (250-300 $\mu\text{Ci}$ ) Aktivität appliziert. Zur Auswertung der Daten wurde die Tumor-Muskel-Ratio (TMR) bestimmt. Dabei wurde analog zur Bildauswertung der Muskulus quadriceps femoris des rechten Mäusehinterbeins als Referenz benutzt. Anschließend wurden die Traceranreicherungen in den Organen, sowie im Muskel, pro Gramm Gewebe umgerechnet. Zuletzt wurde aus diesen Werten der

Quotient aus jeweiligem Organ und Muskel gebildet. Für Tumor, Herzmuskel, Leber, Niere und Gehirn wurde der Median der Quotienten in Abb. 18 und 19 dargestellt: Dieser belief sich bei  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  für den Tumor auf 12,3 (SE = 2,6), Herzmuskel und Gehirn hatten aufgrund des großen Glukosebedarfs mit 14,9 (SE = 10,5) und 3,4 (SE = 0,8) ebenfalls höhere Werte, über die Niere mit dem Wert 3,1 (SE = 0,8) findet die Ausscheidung des Tracers statt. Allein die Leber reicherte nur gering an 1,1 (SE = 0,2).



**Abb. 18:** Biodistribution von Tumor, Herz, Leber, Niere und Gehirn: TMR-Medianwerte, gemessen ca. 120 Min. nach Tracerinjektion von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , Fehlerbalken geben Standardfehler (SE) an.

Bei  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  zeigte der Tumor wegen seiner Eigenschaft zur Proliferation im Vergleich zu den übrigen Organen den größten Wert 9,4 (SE = 1,12). Die Niere fungiert wieder als Ausscheidungsorgan 2,5 (SE = 0,15). Deutlich lässt sich erkennen, dass Leber und Herz mit je 1,2 (SE = 0,59 und SE = 0,04) nur einen geringen Unterschied zur Hintergrundaktivität aufwiesen. Die Blut-Hirn-Schranke kann von  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  nicht überwunden werden, TMR = 0,3 (SE = 0,02), ersichtlich in Abb. 19. Diese gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit den PET-Scans.



**Abb. 19:** Biodistribution von ausgewählten Organen: TMR-Medianwerte, gemessen ca. 120 Min. nach Tracerinjektion von  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ , Fehlerbalken geben Standardfehler (SE) an.

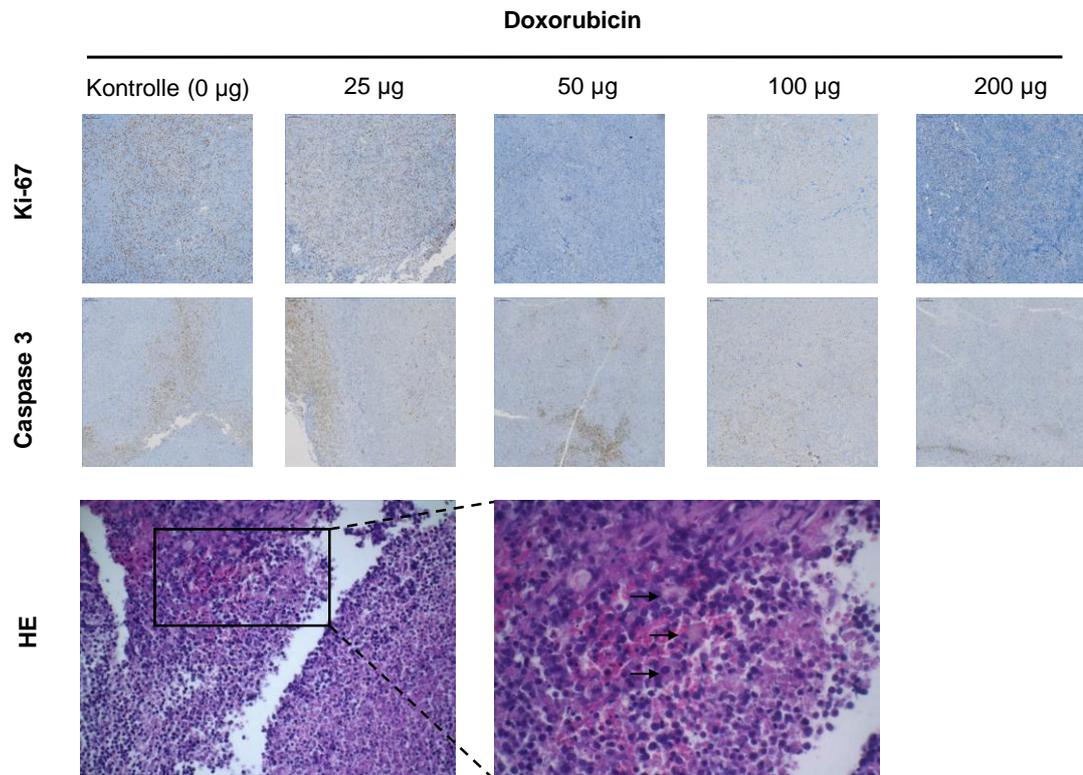
### 3.2.5 Histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der Tumorpräparate

Nach dem Verlaufs-PET-Scan am Tag 2 wurden die Lymphome für die Histologie und die immunhistochemischen Nachweise von Ki-67 und Caspase 3 als Proliferations- und Apoptosemarker, explantiert. Als Proliferationsindex (Ki-67-Index) wurde der Quotient aus den mit Anti-Ki-67-Antikörpern markierten Zellen und der Gesamtheit der Zellen bezeichnet. Dieser befand sich bei den unbehandelten Lymphomen zwischen 0,23 und 0,32.

In Abb. 20, obere Zeile, erkennt man eine Abnahme der Proliferationsrate mit steigender Doxorubicindosis. Auch im multiplen, paarweisen Testen mit den Dunnet-T-Test ergaben sich zu allen Doxorubicinkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigere Ki-67-Indexwerte: 25µg  $p = 0,007$ ; 50µg, 100µg und 200µg  $p < 0,001$ . Außerdem gab es auch unter den einzelnen Konzentrationsgruppen signifikante Unterschiede im Ki-67-Index (ANOVA  $p$ -Wert = 0,013). Im multiplen Vergleichen zeigte sich, dass die Gesamt-Heterogenität der Ki-67-Index-Verteilung hauptsächlich auf Unterschiede zwischen 25µg und 50µg (Bonferroni  $p = 0,018$ ) und 25µg und 200µg (Bonferroni  $p = 0,037$ ) beruht.

In der mittleren Reihe sind Zellen mit dem Apoptosemarker Caspase 3 markiert worden. Hier konnten keine relevanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und allen übrigen Doxorubicinkonzentrationen in Bezug auf den Nachweis von Caspase 3 gezeigt werden. Apoptotische Zellen wurden zu etwa 1% an der Gesamtheit in diesen Schnitten nachgewiesen.

Unten links zeigt eine Übersichtsaufnahme (mittlere Vergrößerung) in HE-Färbung einen Tumor im Randbereich. Rechts lässt sich in der Detailansicht eine organisierte, chronische/aseptische Entzündung ohne Anwesenheit von Granulozyten erkennen. Die Pfeile weisen auf Makrophagen hin, die Resorption betreiben. Über den Pfeilen befinden sich längliche Fibroblasten.



**Abb. 20:**

**obere Reihe:**

*Doxorubicinabhängige Reduktion der Lymphomproliferation bei steigender Dosis, nachgewiesen mit Ki-67,*

**mittlere Reihe:**

*Mit Apoptosemarker Caspase 3 markierte Zellen in Abhängigkeit von Doxorubicin,*

**untere Reihe:**

*(rechts) Übersichtsaufnahme von Tumorgewebe im Randbereich bei mittlerer Vergrößerung,*

*(links) Detailaufnahme mit Nachweis von chronischer, organisierter Entzündung, (→) Makrophagen für Resorption, längliche Zellen darüber: Fibroblasten, HE=Hämatoxylin-Eosin.*

### 3.3 Klinische Studie

#### 3.3.1 Patienten

Bei allen Studienteilnehmern wurde nach den aktuellen Leitlinien nach Biopsie eine histopathologische Diagnose gestellt und der Tumor eingeteilt. Weiterhin wurde leitliniengerecht die Ausdehnung des Tumors ermittelt (Staging) und die Erkrankung nach Ann Arbor klassifiziert. Die Therapieschemata, der Ki-67-Index und [<sup>18</sup>F]FLT-SUV können aus Tabelle 3 entnommen werden. Die Angaben zu den einzelnen Patienten sind ebenfalls aus Tabelle 3 ersichtlich.

**Tab. 3:** Patientencharakteristika (n=8): Geschlecht, Alter, Ann-Arbor-Stadium, Histologie, Therapie, Ki-67-Index in %, MIPI-Ki-67-Score, [<sup>18</sup>F]FLT-SUVmax mit Angabe des Mittelwerts (MW), Standardabweichung (SD) und Wertebereich (WB)

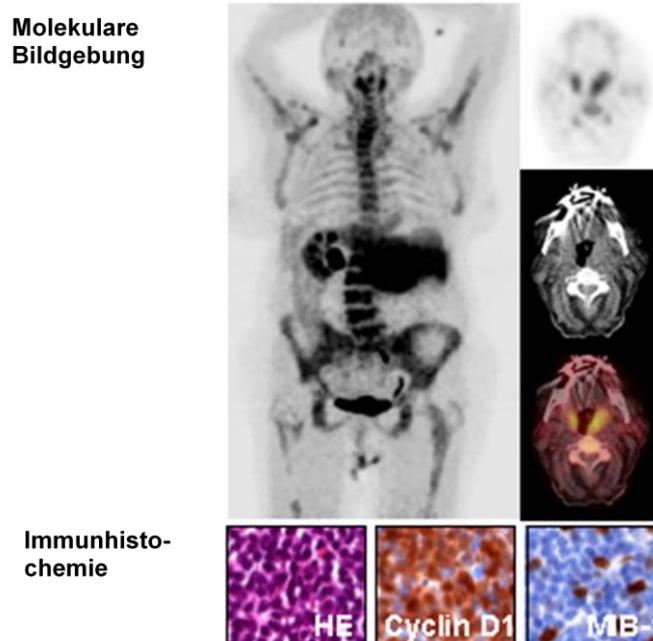
Patient u. Ge- schlecht	Alter in Jahre n	Stadium (Ann Arbor)	Histologie	Therapie	Ki-67 in %	MIPI – Ki-67 Score	SUVmax [ <sup>18</sup> F]FLT			
							MW ±SD	WB		
1	m	87	IV AE	klassisch	R	35	7,3 (h)	k.A.	k.A.	
2	m	71	IV AE	klassisch	R-Benda	10	6,3(m)	3,9	2,1	2,0-6,2
3	w	80	II A	klassisch	R-Benda	5	7,2 (h)	8,2	0,7	7,7-8,6
4	m	65	IV BE	klassisch	MCL-2	10	6,2(m)	5,8	1,2	4,5-7,7
5	w	75	IV B	blastoid	R-Benda	85	8,0 (h)	17,6	2,6	14,5-19,6
6	w	74	IV BE	klassisch	R-CHOP	40	7,9 (h)	11,4	2,2	9,3-15,1
7	m	47	IV A	blastoid	MCL-2	80	7,1 (h)	12,2	2,9	8,2-14,5
8	m	67	IV A	klassisch	R-CHOP	1	6,4(m)	7,6	1,3	6,3-9,5

m=männlich; w=weiblich; h=hoch; m=mittel; k.A.=keine Angaben, da kein Uptake;  
MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; WB=Wertebereich; SUVmax=SUV-Maximum

R-Benda=Rituximab-Bendamustin; R-CHOP=Rituximab-Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon; MCL-2(analog)=Rituximab-maxiCHOP, alternativ mit Rituximab und hochdosiertem Cytarabin

### 3.3.2 [ $^{18}\text{F}$ ]FLT- Aufnahme in Mantelzelllymphomen und Korrelation zur [ $^{18}\text{F}$ ]FDG- Aufnahme

Eine erhöhte Aufnahme in den PET-Scans zeigte sowohl [ $^{18}\text{F}$ ]FLT, als auch [ $^{18}\text{F}$ ]FDG bei 7 von 8 untersuchten Patienten an (als repräsentatives Beispiel sind die Aufnahmen von Patient 4 in Abb. 21 dargestellt). Ein Patient zeigte jedoch im PET-Scan nach Entfernung eines einzelnen Lymphknotens kein residuelles Lymphomgewebe mehr. Der zu Beginn gemessene Mittelwert der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptakes (SUV) in Lymphomgewebe betrug 9,9 (Median = 8,2; Wertebereich = 5,5 – 15,9;  $p = 0,043$ ). Der Baseline [ $^{18}\text{F}$ ]FDG- Mittelwert-SUV war 7,4 (Median = 7,6; Wertebereich = 3,0 – 10,3;  $p = 0,051$ ). [ $^{18}\text{F}$ ]FLT erzielte also einen höheren Mittelwert als [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. Eine starke positive Korrelation in der Testung nach Spearman  $\rho$  mit +0,76 im 95% Konfidenzintervall, von +0,01 bis +0,96 ergaben die Uptake-Werte von den beiden verwendeten Tracern. Bis zu 5 Läsionen, die ein heterogenes Aufnahmeverhalten zeigten, wurden bei jedem Patienten gemessen. Dennoch blieb die Variabilität der Uptake-Werte, die auf einen Patienten bezogen waren kleiner, als die Variabilität zwischen den einzelnen Patienten.



**Abb. 21: Molekulare Bildgebung** *links:* coronarer FLT-PET-Scan von Patient 4 mit klassischem MCL; *rechts oben:* transversaler FLT-PET-Scan in der Halsregion, zwei Anreicherungen in grauschwarz, *rechts Mitte:* CT-Scan ebenda, *rechts unten:* Fusionsbild FLT-PET-Scan mit den zwei Anreicherungen, dargestellt in gelb

**Immunhistochemie** des Tumors *links:* HE-Färbung, *Mitte:* CyclinD1-Nachweis, *rechts:* Ki-67(MIB-1)- Nachweis 10% positiv, braun angefärbte Zellen

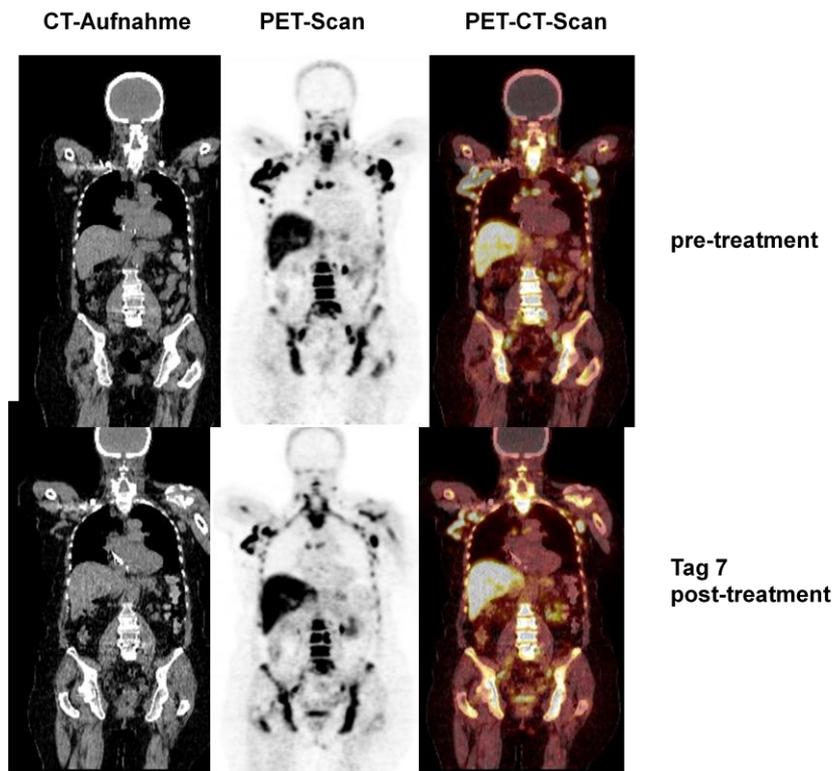
### 3.3.3 Korrelation des [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakes zur Ki-67 Expression und MIPI Score

Bei allen PET-positiven Patienten (n = 7) wurde eine Ki-67 Immunhistochemie durchgeführt. Der Anteil an Ki-67-positiven Zellen belief sich von 1% bis 85% (Mittelwert = 33%; Median = 10%). In der Analyse nach Pearson r wurde eine starke Korrelation mit +0,91 im 95% Konfidenzintervall mit Werten von 0,50 bis 0,99 zwischen initialem [<sup>18</sup>F]FLT-uptake und Ki-67-Proliferationsindex festgestellt. Das bedeutet eine höhere Ki-67 Proliferation bei Patienten mit höheren anfänglichen [<sup>18</sup>F]FLT-Aufnahmewerten.

Der MIPI bewegte sich von 5,4 bis 7,1 (Mittelwert = 6,4; Median = 6,3) und der MIPI mit Ki-67 hatte einen Wertebereich von 6,2 bis 8,0 (Mittelwert = 7,1; Median = 7,2). Die Mittelwerte des Baseline [<sup>18</sup>F]FLT-uptakes und der MIPI-Ki-67 zeigten eine ebenfalls eine starke, positive Korrelation (Pearson r +0,84; 95% Konfidenzintervall; Werte von 0,25 bis 0,98). Es konnte keine große Korrelation zwischen der [<sup>18</sup>F]FLT-Aufnahme und dem MIPI nachgewiesen werden (Spearman ρ, +0,14; 95% Konfidenzintervall, Werte von -0,69 bis +0,81).

### 3.3.4 Frühes Therapieansprechen mit [<sup>18</sup>F]FLT-PET

Im Studienteil der frühen Therapie-Response waren 5 Patienten mit eingeschlossen. Eine Woche nach Therapiebeginn zeigten die SUV-Mittelwerte des [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakes eine mittlere Reduktion von 45% (Wertebereich = -15% bis 96%). Es wurde eine heterogene Veränderung des Uptakes mit einem Abfall > 80% bei zwei Patienten beobachtet (SUV-Mittelwert = 84% und 96%). Andererseits fiel die [<sup>18</sup>F]FLT- Aufnahme bei zwei weiteren Patienten nur um 20% und 38%, ersichtlich in Abb. 22. Bei einem einzigen Patienten stieg der SUV-Mittelwert sogar um 15% an.



**Abb. 22:** Frühe Therapie-Prädiktion mit FLT-PET. Aufnahmen von Patient 5 vor Therapie und am Tag 7 nach Beginn der Chemotherapie. **Linke Seite:** CT-Aufnahmen, **Mitte:** PET-Scans, **Rechte Seite:** PET-CT-Scans **Obere Reihe:** pre-treatment: Starke Anreicherung in der Halsregion, in beiden Axillae, linke Nierengegend und in der Leber. **Untere Reihe:** Tag 7 post-treatment: Abnahme der Anreicherung in der Halsregion, den Axillae und in der linken Nierengegend. Der SUV sank um 38%. Leber reicherte eher unverändert an.

### 3.3.5 Beurteilung des klinischen Therapieansprechens

Regulär wurden die Patienten mit einer kombinierten Immunochemotherapie (R-Benda: Rituximab und Bendamustin; R-CHOP: Rituximab und Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon; oder MCL-2: Rituximab-maxiCHOP, abwechselnd mit Rituximab und high-dose Cytarabin) behandelt. Ein Patient erhielt eine Rituximab-Monotherapie. Alle Patienten sprachen auf die Antikörper- oder Immuntherapie an: 6 Patienten erreichten eine komplette Remission (CR), bewiesen durch konventionelles CT- Staging, zwei Patienten mit einer partiellen Remission (PR), einer nach 6 und der andere nach 3 Zyklen, bei noch laufender Therapie. Wegen der kleinen Patientenanzahl wurde keine Korrelation zwischen [ $^{18}\text{F}$ ]FLT oder MIPI und dem klinischen Therapieansprechen berechnet.

## 4 Diskussion

Bei aggressiven Lymphomen ist die Evaluation der Therapie-Response zu einem möglichst frühen Zeitpunkt für die weitere Planung der Vorgehensweise sehr sinnvoll. Therapierefraktäre Patienten können beispielsweise ohne zu großen Zeitverlust mit noch bestehender Aussicht auf Heilung auf high-dose Chemotherapie mit darauffolgender autologer Stammzelltherapie umgestellt werden.

Als zentrale Fragen dieser Arbeit galt es daher in den in-vitro Versuchen und im Mausmodell zu klären, welcher der beiden radioaktiven Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT sich besser zur frühzeitigen Therapiebeurteilung eignet und ob eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bei beiden Tracern nachvollzogen werden kann. Mit einer klinischen Studie sollte abschließend erstmals die Sensitivität von [ $^{18}\text{F}$ ]FLT und der Einsatz dieses Tracers als Biomarker für die Proliferationsaktivität zur besseren Prognoseabschätzung für Mantelzelllymphome (MCL), als Vertreter aus der Gruppe der aggressiven Lymphome, untersucht werden.

Von den in-vitro Versuchen im Reagenzglas, über das tierexperimentelle, xenotransplantierte Mausmodell, bis hin zur humanen Manifestation der aggressiven Lymphome konnte gezeigt werden, dass das Thymidinanalogon [ $^{18}\text{F}$ ]FLT sehr brauchbar für den Nachweis von Zellproliferation ist. Dies liegt an der engen Korrelation zwischen Proliferationsaktivität und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptake bei Lymphomen (Wagner et al. 2003, S.2681–2687).

Anhand der präklinischen Studie wurde dargestellt, dass mithilfe des Kleintier-FLT-PET frühe Veränderungen in der Tumorphiliferation nach Chemotherapie im Lymphom-Xenograft-Modell nachgewiesen werden können. Darüber hinaus konnte die frühzeitige Abnahme der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Traceraufnahme schon 48h nach erfolgter Chemotherapie festgestellt werden. Diese korreliert mit einem Zellzyklusarrest und verhält sich gegenläufig zur Induktion von Apoptose, wie aus der Immunhistochemie ersichtlich ist. Mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG ließ sich zwar nach Chemotherapie eine Abnahme des Uptakes darstellen, jedoch nicht genau auf die vorher verabreichte Dosis bezogen.

Die klinische Studie bewies nunmehr, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FLT auch speziell für die Diagnostik von MCL sensitiv ist und der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptake auch in der humanen Erkrankung mit der Proliferation korreliert.

## 4.1 Etablierte, diagnostische Strategien mit Bewertung des Therapieansprechens und des Therapieverlaufs bei aggressiven Lymphomen

Die ersten Bewertungen des Therapieansprechens werden meist erst 6 bis 8 Wochen nach Therapiebeginn durchgeführt. Hierbei werden bildgebende Verfahren eingesetzt, wie z.B. der Ultraschall, die Computertomographie (CT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT), welche sich primär nur auf die Morphologie stützen. Bei Patienten mit therapierefraktären Erkrankungen würden jedoch frühzeitige Aussagen zum Therapieansprechen eine Modifikation der Behandlung ermöglichen, noch bevor Veränderungen der Tumorgröße überhaupt sichtbar werden. Damit könnten unnötige Toxizität der Therapie, sowie unangemessene Kosten verhindert werden (Cheson et al. 2007, S.579–586; Juweid et al. 2007, S.571–578; Lister et al. 1989, S.1630–1636).

Die Response-Beurteilung hat eine schon über 25jährige Entwicklung mit der etablierten radiologischen Bildgebung hinter sich. Auch in der Herstellung neuer Medikamente gegen Malignome spielt sie eine wichtige Rolle. Noch immer verlangt diese Bildgebung eine genau definierte, anatomisch einwandfrei erkennbare Läsion und verlässt sich auf die messbare Volumenreduktion des Tumors während und nach der Therapie, um den klinischen Nutzen einschätzen zu können. Gwyther sieht hier jedoch Probleme mit zytostatischen Wirkstoffen, die Tumorzellen nicht abtöten, sondern nur in ihrem Wachstum hemmen. Morphologische Bildgebung ist nicht in der Lage, dies darzustellen. Daher wird hier funktionelle Bildgebung wie das PET benötigt, dass aufgrund der schlechteren räumlichen Auflösung mit einem CT kombiniert werden sollte (Gwyther 2006, S.S11).

## 4.2 Beurteilung des aktuellen Stellenwerts der zwei Radiopharmaka [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT

### **[ $^{18}\text{F}$ ]FDG:**

Schon seit längerem befindet sich nun das sich an Stoffwechselfvorgängen orientierende Glukoseanalogon [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET in der klinischen Routine mit Fokus auf die Onkologie im Einsatz (Buck und Reske 2004, S.461; Direcks et al. 2008, S.481), zum Staging verschiedener Tumorarten und auch einige Ansätze zur Therapiekontrolle wurden gemacht (Mikhaeel 2006, S.22–26; Shields 2006, S.147–148). Eine breite klinische Akzeptanz dieses Tracers wurde dank der hohen Sensitivität besonders im Zusammenhang mit der Hybridtechnik des PET-

CT in der Onkologie erreicht und die Rolle der Nuklearmedizin dadurch weltweit gestärkt (Schwaiger und Wester 2011, S.38S).

Der molekulare Hintergrund der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Akkumulation in Zellen wurde in-vitro und in-vivo untersucht: [ $^{18}\text{F}$ ]FDG gelangt wie Glukose über die Glukosetransporter in die Zellen und wird daraufhin ebenfalls durch das Enzym Hexokinase phosphoryliert. Hier hört jedoch die Verstoffwechslung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG auf, denn [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-6-Phosphat ist kein Substrat der Glukose-6-Phosphat-Isomerase, akkumuliert in der Zelle und wird nur sehr langsam hydrolysiert. Der komplette Mechanismus der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Aufnahme in verschiedene Gewebearten ist noch nicht vollständig geklärt (Buck und Reske 2004, S.461). [ $^{18}\text{F}$ ]FDG -6-Phosphat hemmt nicht seine eigene Bildung. Eine schnelle Ausscheidung wird durch glomeruläre Filtration im Primärharn ohne Rückresorption gewährleistet (Kuwert 2008, S.159).

Es treten jedoch auch hier einige bedeutende Limitationen bei der Einsatzfähigkeit auf: Der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake ist nicht spezifisch für Tumore: So kann eine erhöhte Aufnahme durchaus physiologisch bei hohem Glukosebedarf sein, wie dann z.B. im Gehirn und Muskelgewebe beobachtet werden kann. Außerdem wurden hohe [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Werte bei Entzündungsgeschehen nachgewiesen (Brown et al. 1995, S.1854–1861; Direcks et al. 2008, S.481) . Andererseits begünstigt gerade ein Milieu reich an Entzündungszellen und Wachstumsfaktoren das neoplastische Risiko und treibt die Zellproliferation voran (Coussens und Werb 2002, S.860). Eine genaue Trennung dieser beiden Mechanismen in einem Gewebe gestaltet sich also schwierig. Maschauer et al. entdeckten, dass mit dem Wachstumsfaktor VEGF stimulierte Endothelzellen, welche in vaskularisierten, neoplastischen Läsionen vorkommen, zum gesamten [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake beitragen können (Maschauer et al. 2004, S.455–460). Nekrotische oder fibrotische Gewebeareale reduzieren eher die Tracer-Aufnahme (Brown et al. 1995, S.1854–1861). Mithilfe eines Tumormausmodells fanden Kubota et al. heraus, dass 29% des [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptakes nicht von Tumorgewebe erfolgte (Kubota et al. 1992, S.1972–1980). Eine klinische Studie zeigte Unterschiede in der Regulation der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Aufnahme bei Brust- im Vergleich zu Lungentumoren (Torizuka et al. 1998, S.767–774). Dies lässt vermuten, dass unterschiedliche Malignome auch ganz unterschiedlich den biologischen Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG aufnehmen.

In einer klinischen Studie aus den Jahren 2000 bis 2004, durchgeführt von Haioun et al. mit 90 Patienten mit aggressivem Lymphom erreichten 83% der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-negativen Patienten nach Beendigung der Induktionstherapie eine komplette Remission (CR), im Vergleich mit nur 58% der positiven Patienten. Das Outcome unterschied sich signifikant: Im Beobachtungszeitraum von 2 Jahren erreichte die Gruppe der PET-negativen ein Gesamtüberleben von 90%, während sich für die PET-positiven Patienten nur 61% ergaben. Prädiktive Aussagen der frühen PET-Scans, durchgeführt vor dem Beginn der Chemotherapie, wurden sowohl in der

low-risk, sowie in der high-risk Gruppe beobachtet. Dies lässt eine prognostische Unabhängigkeit vom schon etablierten International Prognostic Index (IPI) vermuten, der normalerweise zur Abschätzung des Verlaufs und des Überlebens bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen benutzt wird. Dieser Vorhersagewert gründet sich auf 5 prätherapeutische, klinische Charakteristika: Patientenalter, Ann Arbor Stadium, Serumlaktatdehydrogenasewert, Erscheinungsbild nach der Eastern Cooperative Oncology Group Klassifikation (ECOG) und Anzahl der extranodalen Manifestationen (Haioun et al. 2005, S.1376–1381; The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project 1993, S.987–994).

Einige weitere klinische Studien mit FDG-PET haben gezeigt, dass die Persistenz einer erhöhten glykolytischen Aktivität in Lymphomläsionen, die durch einen anhaltend positiven PET-Scan am Ende der First-Line-Therapie dargestellt wird, mit einer Rückfallrate von 100% assoziiert ist. Bei einem negativen Scan hingegen rangierte die Rückfallrate nur zwischen 16% und 20% (Jerusalem et al. 1999, S.429–433; Mikhaeel et al. 2000, S.543–553; Spaepen et al. 2001, S.414–419).

Aus diesen Gründen wurde das [<sup>18</sup>F]FDG-PET in den vergangenen Jahren in den First-Line-Strategien zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung aggressiver Lymphome eingesetzt: Jhanwar et al. empfehlen für das Management von aggressiven NHL und Hodgkin-Lymphomen mit [<sup>18</sup>F]FDG folgendes diagnostisches Vorgehen:

1. Die Durchführung des initialen Stagings erfolgt mit konventionellen Methoden und [<sup>18</sup>F]FDG-PET, was eventuell zu Änderungen im Staging und Anpassung des Vorgehens führt.
2. Der frühe oder Verlaufs-PET-Scan erfolgt nach zwei Therapiezyklen bei Patienten mit höherem Risiko, basierend auf den prognostischen Faktoren: Eine Anpassung der Chemotherapie sollte bei persistierenden positiven PET-Werten oder progressiver Erkrankung erwogen werden.
3. [<sup>18</sup>F]FDG-PET sollte einen Monat nach Beendigung der Chemotherapie durchgeführt werden, um eine Normalisierung des Knochenmark-Uptakes zu gewährleisten:  
Ist der metabolische Nachweis unvollständig oder progredient, ist eine Biopsie und weitere Chemotherapie oder ein Follow-Up in kurzen Abständen in Betracht zu ziehen. Negative PET-Messungen sind höchst aussagekräftig für ein erkrankungsfreies Langzeitüberleben.
4. Ein Langzeit-Follow-Up mit [<sup>18</sup>F]FDG-PET erfolgt, wenn neue klinische Symptome entstehen oder eine Veränderung bei den konventionellen Staging-Methoden nachgewiesen wird (Jhanwar und Straus 2006, S.1326–1334).

Ganz anders stellte sich erst kürzlich eine Studie von Moskowitz et al. dar: Hierbei erwies sich der Einsatz von [<sup>18</sup>F]FDG, angewandt zur Verlaufs- und post-treatment Kontrolle nach einer intensivierten Immuntherapie mit R-CHOP zur Prädiktion des Outcomes bei diffus großzelligen Lymphomen als unbrauchbar. Zur genaueren Evaluation von positiven [<sup>18</sup>F]FDG -Verlaufs-PET-Scans empfehlen Moskowitz et al. eine Biopsie vor einer Therapieanpassung. Bei wiederum positivem Ergebnis wurde der Einsatz der Kombinationschemotherapie ICE (Ifosfamide, Carboplatin und Etoposid) mit anschließender autologer Stammzelltransplantation empfohlen (Moskowitz et al. 2010, S.1896–1903).

Eine Überschätzung des [<sup>18</sup>F]FDG-Uptakes kommt öfters auch nach Chemotherapie vor oder ist bedingt durch bestrahlungsinduzierte Entzündungsprozesse. Der Nachweis dieses unspezifischen Uptakes kann Wochen bis Monate andauern und damit potentiell die Veränderungen des Glukosestoffwechsels während der Beobachtungsphase der Therapiereponse beeinflussen (Herrmann et al. 2009, S.210–232).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Studienergebnisse, die es erschweren, ein einheitliches Bild über die Aussagekraft des Biomarkers [<sup>18</sup>F]FDG zu erhalten, erscheint es sinnvoll, einen zuverlässigeren in-vivo-Marker zum Überwachen der Therapiekontrolle bei Karzinomen zu entwickeln und zu etablieren.

### **[<sup>18</sup>F]FLT:**

Daher liegt nun besonderes Augenmerk auf dem Surrogatparameter für Zellproliferation: 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidin ([<sup>18</sup>F]-FLT) ist seit Jahren bekannt und wird durch das im Zytosol lokalisierte Enzym Thymidinkinase1 (TK-1) zu FLT-Monophosphat phosphoryliert. Dieses Molekül wiederum kann die Zelle nicht verlassen (Direcks et al. 2006, S.441–462). Viel TK-1 wird in proliferierenden und malignen Zellen nachgewiesen, wobei die TK-1 Aktivität von der DNS-Synthese und daher von der S-Phase im Zellzyklus abhängt (Eriksson et al. 2002, S.1327–1346), dies jedoch nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch durch posttranskriptionelle und posttranslationale Mechanismen beeinflusst. Im Nukleosidstoffwechsel der DNS-Bausteine gibt es für den Nachschub an Thymidin zwei verschiedene Wege: Einerseits kann die endogene Synthese über die Methylierung des weiteren DNS-Bausteins Uridylat durch die Thymidylatsynthase ausgehen. Andererseits kann der exogene Salvage-Pathway benützt werden, wo unabhängig produziertes, von außen kommendes Thymidin durch die TK-1 phosphoryliert wird (Kuwert 2008, S.183). [<sup>18</sup>F]-FLT ist ein selektives Substrat für TK-1 (Munch-Petersen et al. 1991, S.9032–9038). In Zellen, die sich nicht teilen, ist die TK-1 Aktivität niedrig oder nicht nachweisbar, wohingegen die Aktivität in

der S-Phase um das 10fache des Ausgangswertes hochreguliert wird (Sherley und Kelly 1988, S.8350–8358). TK-1 ist ein Schlüsselenzym für den Salvage-Pathway der DNS-Synthese und im Gegensatz zu Thymidin, wird [ $^{18}\text{F}$ ]FLT nicht direkt als DNS-Baustein verwendet. Aufgrund der 3'- Substitution durch  $^{18}\text{F}$ , kann FLT nicht mehr in die DNS eingebaut werden und führt zum Kettenabbruch (Kong et al. 1992, S.808–818; Sundseth et al. 1996, S.331–335). Diese Eigenschaft versuchte man sich vor Jahren auch als antiretrovirales Medikament bei HIV-Patienten zu Nutze zu machen: die Übersetzung von viraler RNS in DNS sollte so gehemmt werden ohne den normalen zellulären Replikationsvorgang viel zu beeinflussen (Barthel et al. 2005, S.257–263; Kong et al. 1992, S.808–818; Rasey et al. 2002, S.1210–1217). [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Monophosphat wird mit der Thymidilatkinase weiter phosphoryliert. Dieser Schritt wird als irreversibel betrachtet, unspezifische Phosphorylierung durch andere Kinasen jedoch nicht (Reske und Deisenhofer 2006, S.S39).

In Studien mit Ratten wurde gezeigt, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FLT nicht in die DNS inkorporiert wird, daher lässt sich [ $^{18}\text{F}$ ]FLT als indirekter Marker für die DNS-Synthese verwenden (Lu et al. 2002, S.1691–1698). Insgesamt betrachtet kann man feststellen, dass dieser Tracer bei Aufnahme in die Zelle und der Phosphorylierung durch die TK-1 gleichbehandelt wird wie das Ursprungsmolekül Thymidin. Anschließend aber wird das phosphorylierte [ $^{18}\text{F}$ ]FLT im Gegensatz zu Thymidin weder nennenswert weiter metabolisiert, noch kann es die Zelle verlassen.

Wie von Rasey et al. im in-vitro Modell gezeigt wurde, korreliert der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptake mit der S-Phase und einem erhöhtem TK-1 Nachweis (Barthel et al. 2005, S.257–263; Rasey et al. 2002, S.1214–1217). Die Tumorpheriferation und damit die [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Aufnahme korreliert außerdem mit einem angestiegenen Ki-67-Index (Buck et al. 2006, S.11055–11061; Eckel et al. 2009, S.1445; Kenny et al. 2005, S.10108; Vesselle et al. 2002, S.3315–3323). Dies sind wichtige Erkenntnisse zur Verifizierung der Aussagekraft dieses Biomarkers, die in vielen präklinischen und auch klinischen Studien Anwendung finden.

### 4.3 Diskussion der in-vitro Studie

#### **Vorgehensweise:**

In den in-vitro-Versuchen wurde zunächst eine Charakterisierung der SU-DHL-4-Zellen mittels MTT und Viabilitätstestung vorgenommen. Anschließend wurden die Aufnahmeversuche mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT 24h und 48h nach Therapie und zuletzt eine Zellzyklusanalyse durchgeführt, alle Versuche bei ansteigenden Doxorubicinkonzentrationen.

Das Chemotherapeutikum Doxorubicin gehört der Stoffgruppe der Anthrazykline an und wirkt mit verschiedenen Mechanismen:

1. DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche mittels Bindung an Topoisomerase II. Das Enzym Topoisomerase II ist wichtig für das Ausführen von Korrekturen an der DNS-Struktur während der Transkription (G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub>-Phase) und Replikation (S-Phase). Die Folge ist eine Hemmung der Nukleinsäuresynthese (Potter und Rabinovitch 2005, S.39–43).
2. Anstieg der zytosolischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration, dies ist eine sehr reaktive Sauerstoffverbindung.
3. Auslösen des Zusammenbruchs der äußeren Mitochondrienmembran, was zur Freisetzung von Cytochrom C, zur Initiierung der Caspasenkaskade und damit ultimativ zur Apoptose führt.

(Engles et al. 2006, S.603)

Der Thymidinmetabolismus und der Salvage-Pathway, welche Bedeutung bei der Verstoffwechslung von [<sup>18</sup>F]FLT haben, sind nicht unmittelbar durch die Doxorubicinwirkung betroffen (Kano et al. 2001, S.1999–2007). Dennoch inhibiert die Chemotherapie die Proliferation der Tumorzellen, jedoch mit anderen Mechanismen. Als Folge davon kann es zu einer veränderten [<sup>18</sup>F]FLT-Aufnahme kommen, was wiederum für [<sup>18</sup>F]FLT den Einsatz als indirekten Marker zum Nachweis von frühem Therapieansprechen nach Verwenden von Chemotherapie nahelegt (Direcks et al. 2008, S.481).

### **in-vitro Versuche:**

Eine erste Einschätzung der verwendeten SU-DHL-4-Lymphomzellen erfolgte mithilfe der in-vitro Versuche: Hierbei konnte eine dosisabhängige Reduktion der Stoffwechselaktivität der Lymphomzellen bei steigender Doxorubicinkonzentration mittels MTT besonders 48h nach Therapie gezeigt werden.

Ergänzend dazu wurde erwartungsgemäß in der Trypanblaufärbung bei ansteigenden Doxorubicinkonzentrationen eine Verminderung viabler Zellen festgestellt. Schon bei den niedrigeren Konzentrationen bis 25 ng/ml ließ sich 24h nach Chemotherapie eine Abnahme der vitalen Zellen um ca. ein Drittel erkennen. Bei 200 und 800 ng/ml Doxorubicin überlebten ca. 50% der Zellen. 48h nach Doxorubicingabe zeigte sich in allen Konzentrationen eine Reduktion vitaler Zellen um ca. 60%.

Der nächste Schritt waren die mit dem radioaktiven Tracer [<sup>18</sup>F]FDG durchgeführten Uptake-Versuche, wo sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung in den Konzentrationen von 6 bis 400 ng/ml feststellen ließ. Jedoch konnte ein Abwärtstrend der Traceraufnahme bei steigenden Doxorubicinkonzentrationen

beobachtet werden. Da Doxorubicin zu einem G<sub>2</sub>-Arrest der Lymphomzellen führt und dadurch ein größeres Zellvolumen verursacht, erhöht sich die [<sup>18</sup>F]FDG-Aufnahme (Higashi et al. 1993, S.773–779). Dies könnte ein Erklärungsversuch für den uneinheitlichen Uptake von [<sup>18</sup>F]FDG in die Zellen bei den in-vitro Versuchen sein.

Anders verhielt sich in den Versuchen die [<sup>18</sup>F]FLT-Traceraufnahme der Lymphomzellen. Im Gegensatz zu [<sup>18</sup>F]FDG wurde mit [<sup>18</sup>F]FLT in den verwandten Doxorubicinkonzentrationen von 25 bis 400 ng/ml eine Dosis-Wirkungsbeziehung 24h und 48h nach Chemotherapie nachgewiesen. In Abwesenheit von Entzündungszellen, die evtl. zu einer vermehrten Aufnahme von [<sup>18</sup>F]FDG geführt hätten, sank bei beiden radioaktiven Tracern der Uptake nach Doxorubicininkubation.

Um genauere Angaben über den Zellzyklus 48h nach Chemotherapie mit Doxorubicin zu erhalten, wurde ein FACS durchgeführt. Dabei ergaben sich in den Konzentrationen von 6 bis 100 ng/ml eine dosisabhängige Reduktion der S-Phase mit ansteigendem G<sub>2</sub>-Arrest. Bei 200 und 400 ng/ml wurde ein zusätzlicher G<sub>1</sub>-Arrest beobachtet.

Die TK-1-Expression von Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, steigt in der späten G<sub>1</sub>-Phase an, ist in der S- und G<sub>2</sub>-Phase signifikant erhöht und erreicht Maximalwerte in der Mitose (Vesselle et al. 2002, S.3320–3321). In diesen Phasen werden demnach höhere [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakewerte erwartet.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen kam es bei Direcks et al. zu einem massiven Anstieg der FLT-Aufnahme in MDA MB231 Brustkrebszellen nach einmaliger Doxorubicintherapie mit der IC<sub>50</sub>-Konzentration von 200 nM auch unabhängig von der Inkubationszeit, nach 24h schon um 37%, nach 48h um 394% (Direcks et al. 2008, S.486). Dies wurde auf den durch Doxorubicin ausgelösten G<sub>2</sub>/M-Arrest der Zellen zurückgeführt. In dieser Phase ist auch die TK-1-Aktivität hoch, welche für die Verstoffwechslung des Thymidins verantwortlich ist (Direcks et al. 2008, S.486–487; Munch-Petersen et al. 1991, S.9032–9038; Sherley und Kelly 1988, S.8350–8358). 48h nach Doxorubicinbehandlung zeigte sich auch bei Direcks et al. eine starke Akkumulation der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, was sich schon nach 24h andeutete (Direcks et al. 2008, S.483). Das deckt sich gut mit unseren Ergebnissen der Zellzyklusanalyse.

Leyton beschreibt ebenfalls einen signifikanten Anstieg der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Phase mit einem signifikanten Abfall der S-Phasen-Zellfraktion unter dem Einsatz von Cisplatin, eines anderen Chemotherapeutikums, bei Fibrosarkomen (Leyton et al. 2005, S.4202-4210).

## 4.4 Diskussion der in-vivo Studie

### Vorgehensweise:

In der präklinischen Studie wurden die mit Lymphomzellen xenotransplantierten Mäuse, ab einem mittleren Tumolvolumen von 1,5 cm<sup>3</sup>, intraperitoneal mit einer Einzelinjektion Doxorubicin (10µg/gKG) behandelt. Dies ist eine gängige Medikation in der Lymphomtherapie im Mausmodell (Schmitt et al. 2000, S.1034).

Die Kleintier-PET-Messungen mit [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT wurden jeweils vor und 48h nach Chemotherapie durchgeführt und kurz darauf die Verteilung der radioaktiven Tracer im murinen Organismus in der Biodistribution nachvollzogen. Die Histologie der xenotransplantierten Lymphome wurde mithilfe einer HE-Färbung und immunhistochemischen Verfahren aufgearbeitet.

In der nächsten Stufe zur Testung einer Dosis-Wirkungsbeziehung bei [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT ergaben die in-vivo-Versuche Folgendes:

Das mithilfe einer Schublehre bestimmte Tumolvolumen der xenotransplantierten SCID-Mäuse verhielt sich am Tag 2 in den jeweiligen Therapiegruppen konstant, verglichen mit einem Anstieg um 80,0% (SE = 23,2) in der Kontrollgruppe. Am Tag 9 nach Chemotherapie wurde auch bei den behandelten Mäusen eine Progredienz des Tumolvolumens verzeichnet, am stärksten bei 50µg: + 80,0%, SE = 11,8. Ein viel größerer Zuwachs, nämlich um 947,0%, SE = 224,7 ließ sich bei den unbehandelten Kontrollmäusen beobachten.

**FLT:** Die Abnahme der TBR-Werte der [<sup>18</sup>F]FLT-PET-Scans 48h nach Therapie korrelierte umgekehrt zu den ansteigenden Doxorubicindosen.

Für die ROIs der [<sup>18</sup>F]FLT-PET-Scans zeigte sich in der Varianzanalyse eine signifikante Heterogenität der TBR-Prozentwertverteilung zwischen den einzelnen Konzentrationsgruppen mit  $p = 0,008$ . Der Dunnet-T-Test ergab im multiplen, paarweisen Testen signifikant niedrigere TBR-Prozentwerte in allen Konzentrationen im direkten Vergleich mit den Kontrollmäusen. Diese TBR-Medianwerte, angegeben in Prozent, 48h (Tag 2) nach der Chemotherapie sanken für jede Konzentration, am deutlichsten ab 100 µg auf 57,0% (SE = 12,1,  $p = 0,008$ ). In der Kontrolle zeigte sich ein Anstieg um 10,0% (SE = 8,4). Diese Nachweise gingen alle den messbaren Änderungen im Tumolvolumen voraus.

**FDG:** Konträr zu [<sup>18</sup>F]FLT ergab sich für den Tracer [<sup>18</sup>F]FDG in unseren Versuchen keine einheitliche Tendenz der prozentualen TBR-Medianwerte in Bezug zu den Doxorubicindosen. Bei 25µ und 200µg Doxorubicin stiegen die TBR-Medianwerte im Vergleich zur Baseline (pre-Tx) und zur Kontrolle an. Dies

könnte an den anwesenden Entzündungszellen, besonders den Makrophagen liegen, die in der histologischen HE-Färbung der explantierten Tumorpräparate nachgewiesen werden konnten. SCID-Mäusen fehlen B- und T-Lymphozyten aber sie besitzen eine normale Anzahl an Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen (Greiner et al. 1998, S.166–177). Im Gegensatz dazu wurde mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT in entzündlichem Gewebe nur ein geringer Uptake beobachtet (Buck et al. 2006, S.11055–11061).

Kuwert et al. zitieren einige klinische und experimentelle Studien, die sehr früh, bereits 24h nach Therapie, einen Anstieg der FDG-Aufnahme in malignen Tumoren zeigten. In Zellkulturexperimenten mit Rattenadenokarzinomzellen der Prostata unter Chemotherapie konnte dies auf einen erhöhten Glukosetransport zurückgeführt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist wahrscheinlich die Umverteilung des Glukosetransportproteins von intrazellulär an die Plasmamembranoberfläche. Dies wird als eine der ersten, generellen Reaktionen auf zellulären Stress gewertet und ist ein kurzfristiger Regulationsmechanismus, der von der Proteinbiosynthese unabhängig ist. Daher kann einige Zeit später, ca. 48h nach Chemotherapie, wieder ein Abfall der FDG-Aufnahme beobachtet werden (Kuwert 2008, S.7). Diese Erkenntnisse lassen eine Erklärung für die eher schwankenden TBR-Medianwerte in den unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationsgruppen für [ $^{18}\text{F}$ ]FDG in den Versuchen 48h nach Therapie zu.

Ohne Therapie, nur allein im Rahmen der malignen Transformation findet sich nach 4-6h schon sehr früh eine Aktivierung des kodierenden Gens und der mRNA für GLUT1, hingegen morphologische Veränderungen erst nach 72-76h. Im Tiermodell wurde herausgefunden, dass der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake mit der Expression von GLUT1 und Hexokinase korreliert. Die histologisch bestimmte, unterschiedliche Expression von GLUT1 als Bestandteil verschiedener genetischer Programme in malignen Tumoren wird als Grund für unterschiedlichen Tracer-Uptake angesehen (Kuwert 2008, S.158–159).

Nicht außer Acht gelassen werden sollte in diesem Zusammenhang eine eventuelle Interaktion von Doxorubicin selbst mit der Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, die die Ergebnisse der PET-Messung verfälschen könnte.

Bei Direcks et al. stieg die [ $^3\text{H}$ ]FDG-Aufnahme in-vitro 48h nach IC<sub>50</sub>-Doxorubicinbehandlung um 33% an, ein Anstieg war auch schon nach 24h nachweisbar (Direcks et al. 2008, S.486). Erhöhter Tracer-Uptake von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG z.B. im klinischen Setting kann auch mit Non-Response assoziiert sein. Ein anderer möglicher Erklärungsversuch dieses Anstiegs wird von Engles et al. geliefert:

Aufgrund der starken chemischen und molekularen Veränderungen an den Zellen, ausgelöst durch Chemotherapie, wurde die Vermutung aufgeworfen, dass die

typische Beziehung zwischen FDG-Aufnahme und Zellzahl in unbehandelten Zellen unter diesen Bedingungen verändert wird. Direkte Effekte von Chemotherapeutika auf HKII und GLUT-1, die ja beim Glukosemetabolismus eine Rolle spielen, sind schon gezeigt worden. Engles et al. wiesen in unbehandelten MCF-7-Zellen, einer Adenokarzinombrustkrebszelllinie nach, dass mehr mRNA von HKII, als von GLUT-1 vorhanden ist und dass der [<sup>3</sup>H]FDG-Uptake stark mit der GLUT-1-mRNA Expression in Zusammenhang steht. Während der Therapiedauer mit Doxorubicin drehten sich die Verhältnisse um und die GLUT-1-mRNA stieg um das 2,5fache im Vergleich zu den untherapierten Zellen an. 24h nach Beendigung der Therapie kehrten die Werte wieder auf das Niveau der unbehandelten Zellen zurück. Zudem konnte keine Korrelation zwischen [<sup>3</sup>H]FDG-Aufnahme und der HKII-mRNA beobachtet werden. Nach einer 24stündigen Behandlungsdauer mit Doxorubicin konnte man ein Abfall der [<sup>3</sup>H]FDG-Aufnahme im Verhältnis zur Anzahl an lebenden Zellen beobachten. Trotz hohen GLUT-1-mRNA Werten waren zu diesem Zeitpunkt die GLUT-1- und HKII-Protein Werte niedrig. Dieses Stunning-Phänomen nach 24h erklären Engles et al. mit einer negativen Einflussnahme des Doxorubicin auf die erfolgreiche Translation von GLUT-1-mRNA in GLUT-1-Proteine, was in einer relevanten Abnahme des [<sup>3</sup>H]FDG-Uptakes resultiert. Trotz diesen Therapieeffekten besteht, wie schon in einigen Studien gezeigt, eine Beziehung zwischen dem [<sup>3</sup>H]FDG-Uptake in Tumorzellen und der Anzahl an lebenden Zellen nach Therapie, die eine Verwendung von FDG im Tumortherapiemonitoring nahelegt. Jedoch sollten diese Effekte beim Einsatz von FDG und der Bewertung der Ergebnisse genau in Betracht gezogen werden (Engles et al. 2006, S.603–608).

Um genauere Hinweise über die Verteilung der radioaktiven Tracer im murinen Organismus zu erhalten, wurde bei einzelnen Mäusen (je Tracer 7 Mäuse, je n=7) eine Biodistribution sowohl mit [<sup>18</sup>F]FDG, als auch mit [<sup>18</sup>F]FLT ausgeführt. Direcks et al. fanden bei der Messung des zellulären Tracer-Uptakes keinen Unterschied zwischen dem PET-Scanner und dem Gamma-Counter. Der Vorteil der PET-Messungen ist jedoch, dass die Zellen nicht mehr in ein anderes Gefäß transferiert werden müssen, wobei man eventuell Zellen verliert und damit das Signal reduziert und Messfehler verursacht (Direcks et al. 2008, S.486).

Anschließend wurden die Organe ex vivo im Gamma-Counter gemessen und die Tumor-Muscle-Ratio (TMR) bestimmt. Für Tumor, Herzmuskel, Leber, Niere und Gehirn wurde der Median der Quotienten berechnet: Dieser belief sich bei [<sup>18</sup>F]FDG für den Tumor auf 12,3 (SE = 2,6), Herzmuskel und Gehirn hatten aufgrund des großen Glukosebedarfs mit 14,9 (SE = 10,5) und 3,4 (SE = 0,8) ebenfalls höhere Werte, über die Niere mit dem Wert 3,1 (SE = 0,8) findet die Ausscheidung des biologischen Tracers statt. Allein die Leber reicherte nur gering an 1,1 (SE = 0,2).

Bei [<sup>18</sup>F]FLT zeigte der Tumor wegen seiner Eigenschaft zur Proliferation im Vergleich zu den übrigen Organen den größten Wert 9,4 (SE = 1,12). Die Niere fungierte wieder als Ausscheidungsorgan 2,5 (SE = 0,15). Deutlich lässt sich erkennen, dass Leber und Herz mit je 1,2 (SE = 0,59 und SE = 0,04) nur einen geringen Unterschied zur Hintergrundaktivität aufwiesen. Die Blut-Hirn-Schranke kann von [<sup>18</sup>F]FLT nicht überwunden werden, daher TMR = 0,3 (SE = 0,02). Diese gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit den zuvor angefertigten PET-Scans und zu früheren Arbeiten über die Traceraufnahme in gesundem Gewebe (Wagner et al. 2003, S.2681–2687).

In Experimenten mit fibrosarkom-transplantierten, untherapierten Ratten wurde der höchste [<sup>18</sup>F]FLT-Uptake in der Milz beobachtet, gefolgt vom Uptake in der Leber und im Darm, also in Organen mit aktiver DNS-Synthesefunktion. In der Milz wurde dieser höchste Wert nach 120 Min., in der Leber und im Darm schon nach 80 Min. nachgewiesen und sank dann im Laufe des Beobachtungszeitraumes wieder. (Der Prozentsatz der in die DNS eingebauten Radioaktivität belief sich auf unter 2% in Milz und Darm) (Lu et al. 2002, S.1691).

Bei der Interpretation der gewonnenen Werte ist zu beachten, dass die Bioverteilung von [<sup>18</sup>F]FLT speziesabhängig ist, z.B. bei Ratten ist der [<sup>18</sup>F]FLT-Uptake niedriger als beim Menschen, weil sie eine 10fach höhere Thymidin-Serumkonzentration besitzen (Kuwert 2008, S.185). Aus diesem Grund ist es ratsam, die im Tiermodell gewonnenen Werte in klinischen Studien zu verifizieren.

Die Lymphome aus SU-DHL-4-Zellen wurden für die Histologie und die immunhistochemischen Nachweise von Ki-67 und Caspase 3 als Proliferations- und Apoptosemarker, explantiert. Der FLT-Uptake spiegelt die TK-1-Aktivität wider und stellt daher nur einen indirekten Marker für die Proliferation dar. Hingegen reflektiert die Ki-67-Immunhistochemie direkt die S-Phasen-Fraktion des Zellzyklus und ist weniger von Perfusion und Tumorgewebeheterogenität betroffen (Buck et al. 2007, S.1779).

Der Proliferations-Index befand sich bei den unbehandelten Lymphomen zwischen 0,23 und 0,32. Im multiplen, paarweisen Testen mit den Dunnet-T-Test ergaben sich zu allen Doxorubicinkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigere Ki-67-Indexwerte: 25µg  $p = 0,007$ ; 50µg, 100µg und 200µg  $p < 0,001$ . Außerdem gab es auch unter den einzelnen Konzentrationsgruppen signifikante Unterschiede im Ki-67-Index (ANOVA  $p$ -Wert = 0,013). Im multiplen Vergleichen zeigte sich, dass die Gesamt-Heterogenität der Ki-67-Index-Verteilung hauptsächlich auf Unterschiede zwischen 25µg und 50µg (Bonferroni  $p = 0,018$ ) und 25µg und 200µg (Bonferroni  $p = 0,037$ ) beruht. Keine relevanten Unterschiede konnten zwischen der Kontrolle und allen übrigen Doxorubicinkonzentrationen in Bezug auf den Nachweis von Caspase 3 gezeigt werden. Apoptotische Zellen wurden zu etwa 1% an der Gesamtheit in diesen Schnitten nachgewiesen.

Die Reduktion von Ki-67 spricht für einen Zellzyklusarrest ausgelöst durch Doxorubicin. Somit lässt sich der verminderte [<sup>18</sup>F]FLT-Uptake in den PET-Scans erklären. Gleichzeitig wäre in diesem Zusammenhang ein Anstieg der Caspase 3, als Hinweis für eine Apoptoseinduktion zu erwarten (Di Bartolomeo et al. 2000, S.532–539; Graf et al. 2008, S.352; Zhou et al. 2002, S.124–131), was jedoch in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden konnte.

Die HE-Färbung des Tumorgewebes ergab zudem eine organisierte, chronische/aseptische Entzündung mit Nachweis von Makrophagen, aber ohne Anwesenheit von Granulozyten. Coussens und Werb berichteten über die Tatsache, dass Inflammation als eine Komponente der Tumorprogression gesehen werden sollte und daher auch im Tumormikromilieu Entzündungszellen vorhanden seien (Coussens und Werb 2002, S.860). Dies passt gut zu den Ergebnissen der HE-Färbung.

## 4.5 Diskussion der klinischen Studie

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Erkenntnisse aus den in-vitro und in-vivo Studien in gewissem Maße auch in der humanen Erkrankung reproduzierbar sind: Mithilfe einer prospektiven, klinischen Pilotstudie wurde dargestellt, dass das [<sup>18</sup>F]FLT-PET als Proliferationsbiomarker eine hohe Sensitivität für Mantelzelllymphome (MCL), einem aggressiven Lymphom, in der humanen Etablierung besitzt und somit weitere klinische Untersuchungen rechtfertigt.

Das Erreichen einer kompletten Remission (CR) nach einer First-Line Chemotherapie ist von immenser Bedeutung bei Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom, weil dies gewöhnlich zu einem längerem progressionsfreien Überleben führt. Eine inkomplette Remission ist erfahrungsgemäß mit einem schlechteren Outcome verbunden (Coiffier 1999, S.1141–1143).

Standardisierte Kriterien für die Response-Beurteilung von malignen Lymphomen sind notwendig, um eine Vergleichbarkeit unter den verschiedenen klinischen Studien zu ermöglichen und nützlich zur Testung neuer therapeutischer Wirkstoffe. Eine Überarbeitung der standardisierten Kriterien wurde von Cheson et al. vorgeschlagen und durch diagnostische Hinweise aus PET, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie ergänzt (Cheson et al. 2007, S.579–586). Dies wurde nötig, da vorher der CT-Diagnostik eine große Bedeutung zukam. Jedoch konnte damit bei einem Tumorresiduum nicht zwischen aktiver Erkrankung und Fibrose unterschieden werden. Daher wurde der positive prädiktive Wert der CT mit nur 40% eingestuft (Jerusalem et al. 1999, S.429–433; Spaepen et al. 2001, S.414–419).

Dies führte zum Konzept der “ungewissen kompletten Remission“ (CRu), welches die unbekannt Signifikanz persistierender radiologischer Abnormalitäten bei Patienten widerspiegelte, die andernfalls in CR eingestuft worden wären. Im Gegensatz dazu macht die funktionelle, nuklearmedizinische Bildgebung mit den Tracern [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT eine metabolische Charakterisierung des zu untersuchenden Gewebes möglich.

Die Kombination von mehreren Chemotherapeutika haben aggressive Lymphome von einer immer tödlich verlaufenden Erkrankung zu einer potentiell heilbaren Erkrankung umgewandelt. Aggressivere, aber auch potentiell toxischere Behandlungsmethoden sind nun verfügbar. Daher gibt es ein erhöhtes Interesse für eine frühe Patientenselektion, unter der Annahme, dass schnelle Responder unter einer Standardtherapie wahrscheinlich ein besseres und längerfristiges Therapieansprechen zeigen. Wohingegen Non-Responder von einer frühen Therapieanpassung profitieren könnten (Haioun et al. 2005, S.1376). Ein erhöhter

Tracer-Uptake von FDG im klinischen Setting wäre eventuell ein Anzeichen für Non-Response.

In dieser vorliegenden klinischen Studie zeigten alle nach den “revised response” Kriterien nach Cheson et al. evaluierten Patienten einen intensiven [<sup>18</sup>F]FLT-Uptake und alle durch konventionelle bildgebende Verfahren wie Spiral-CT oder auch [<sup>18</sup>F]FDG-PET-CT identifizierte MCL-Läsionen wurden mit [<sup>18</sup>F]FLT-PET nachgewiesen. Letzteres steht im Einklang mit der guten Nachweisbarkeit von aggressiven Lymphomen mit [<sup>18</sup>F]FLT-PET in einigen schon veröffentlichten Studien. Außerdem beobachteten Buchmann et al. bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) mit normaler Zellularität eine bessere Akkumulation von FLT in aggressiven NHL, als in indolenten Manifestationen (Buchmann et al. 2004, S.436–442; Buck et al. 2006, S.11055–11061; Herrmann et al. 2007, S.3552–3558)

Im Vorfeld sind schon einige Untersuchungen mit [<sup>18</sup>F]FDG zum Nachweis von MCL durchgeführt worden. In einer klinischen Studie von Gill et al. konnte zwar für [<sup>18</sup>F]FDG-PET eine Sensitivität von 100% für MCL-Läsionen in den Baseline-Scans von 9 Patienten nachgewiesen werden, aber es zeigte sich auch eine große Rate von falsch-negativen Befunden bei der Evaluation von gastrointestinaler Beteiligung (Gill et al. 2008, S.159–165). In weiteren Studien ergab sich zudem eine niedrige Sensitivität für das Anzeigen von Knochenmarksbefall (Bodet-Milin et al. 2010, S.1633–1642; Brepoels et al. 2008, S.1693–1701). Die vorliegenden Ergebnisse bekräftigen diese Aussage auch für den Proliferationsmarker [<sup>18</sup>F]FLT.

Ein kürzlich eingeführter, klinisch-biologischer Kombinations-Score speziell für MCL, engl. MCL International Prognostic Index (MIPI), erlaubt eine verlässliche Abschätzung des individuellen, klinischen Verlaufs und des Überlebens. Desweiteren ist der Proliferations-Index mit Ki-67 ein zusätzlicher starker prognostischer Marker, sodass beide auch kombiniert angewendet werden (Hoster et al. 2008, S.558–565). Diese Ergebnisse bestätigen eine vorhergehende Transkriptom-Analyse, welche eine prädiktive, 20 Gene umfassende Proliferations-Signatur identifiziert hat, um damit das mittlere Überleben bei MCL abzuschätzen (Rosenwald et al. 2003, S.185–197) Diese Prädiktion ist ohne Bestimmung des IPI möglich und könnte die biologische Heterogenität diffuser, großzelliger B-Zelllymphome genauer reflektieren (Haioun et al. 2005, S.1376).

Sogar mithilfe dieser kleinen Pilotstudie (n=8) war es möglich, eine starke positive Korrelation zwischen Proliferation, nachgewiesen mit Ki-67 oder MIPI-Ki-67, und der [<sup>18</sup>F]FLT-Aufnahme darzustellen. Diese Korrelation zeigt, dass [<sup>18</sup>F]FLT-PET ein passendes, sensitives Werkzeug zur Abschätzung der Proliferationsaktivität von MCL ist. Schon früher wurde dieser Zusammenhang für [<sup>18</sup>F]FDG-PET und blastoidem versus klassischem MCL gezeigt (Brepoels et al. 2008, S.1693–1701).

Vier aus fünf Patienten, die in den frühen Therapie-Response –Teil der Studie integriert waren, zeigten einen deutlichen Abfall des [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakes. Aufgrund der kleinen Patientenzahl (n=8) und der kurzen Zeit des Follow-Up wurden im Hinblick auch auf individuelle Änderungen des [<sup>18</sup>F]FLT-SUV deskriptive Ergebnisse früh nach Therapiebeginn dargestellt.

Als äußerst vielversprechender, prognostischer Marker für progressionsfreies Überleben wurde vor Kurzem der Negativbefund bei minimaler, residualer Erkrankung (engl.: MRD) gehandelt, bewiesen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion nach 3-4 Immunochemotherapiezyklen (Pott et al. 2010, S.3215–3223).

Eine positive Korrelation zwischen dem frühem Ansprechen mit [<sup>18</sup>F]FLT-PET und einem negativen MRD-Befund zur Mitte der Therapie hin, könnte die Einführung dieses Bildgebungsverfahrens bei MCL als klinischen Parameter begünstigen. Zudem könnte dies auch langfristig zu Anpassungen der Therapie, basierend auf den Ergebnissen der Bildgebung, führen.

Zentren, die PET zur frühen Therapie-Response maligner Lymphome benutzen, favorisieren momentan ein PET-Scan nach dem zweiten Zyklus der Chemotherapie. Damit ist offenbar eine Balance zwischen dem Verabreichen von ausreichend Chemotherapie für das Erreichen einer CR und einer möglichst frühen Darstellung von Chemosensitivität und guter Prognose möglich. Es scheint auch eine Unterscheidung zwischen früher und später CR möglich, was prognostisch wichtig ist (Mikhaeel 2006, S.24).

## 4.6 Kritische Bewertung des Studiendesigns

Es sind jedoch Einschränkungen bei den Ergebnissen dieser Arbeit zu beachten: Aufgrund der kleinen Anzahl an Mäusen in den Tierversuchen gab es statistische Limitationen.

Es konnte kein statistischer Unterschied im Tumorwachstum zwischen den einzelnen Doxorubicinkonzentrationsgruppen festgestellt werden. Trotzdem konnte man in der Langzeitbeobachtung eine Tendenz zur größeren Wachstumsinhibierung bei höheren Doxorubicinkonzentrationen erkennen. Ein Erklärungsversuch wäre die etwas begrenzte Genauigkeit der Tumolvolumenmessung mit einer Schublehre innerhalb des kurzen Beobachtungszeitraumes von 9 Tagen.

Obwohl die TBR–Medianwerte der FLT-PET-Scans der verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen in Prozent signifikant zu den TBR–Werten der Kontrollen differieren, konnte kein signifikanter Unterschied unter den einzelnen Konzentrationen bewiesen werden (p-Wert ANOVA = 0,131).

Weiterhin konnten keine relevanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und allen übrigen Doxorubicinkonzentrationen in Bezug auf den Nachweis von Caspase 3 gezeigt werden.

Der Ki-67-Index der 50µg-Gruppe war stärker reduziert, als der [<sup>18</sup>F]FLT-TBR-Wert hätte vermuten lassen. Am Tag 2 nach Chemotherapie wurden Mäuse aus den jeweiligen Konzentrationsgruppen unabhängig von ihrem TBR-Wert zur Tumorexplantation und histologischen Auswertung ausgewählt, zufälligerweise waren es hier die drei Mäuse mit der größten Reduktion der TBR-Werte.

Auch in der klinischen Studie wird die Aussage etwas durch die geringe Patientenzahl (n = 8) limitiert und sollte in einer größeren Kohorte über einen längeren Zeitraum erneut geprüft werden.

Generelle Einschränkungen beim Einsatz der PET-Technologie sind noch immer die hohen Kosten und eine begrenzte Verfügbarkeit der radioaktiven Tracer. Zudem existiert eine nicht zu unterschätzende Variabilität der Geräte mit ihrer Ausstattung, Technik und einer unterschiedlichen FDG-Aufnahme in die verschiedenen histologischen Subtypen, was zu falsch-negativen Resultaten führt. Falsch-positive Ergebnisse bei der Verwendung von FDG tauchen zudem bei Thymushyperplasie, Sarkoidose oder dem Nachweis von braunem Fettgewebe auf (Cheson et al. 2007, S.580; Alavi et al. 2007, S.819-821).

Auch beim Proliferationsbiomarker FLT sollten Limitationen besonders im Hinblick auf die Einsatzfähigkeit beim Menschen beachtet werden:

Bei Grierson betrogen interessanterweise die Nukleotidasen-vermittelte Dephosphorylierung von [<sup>18</sup>F]FLT-Monophosphat und der darauffolgende [<sup>18</sup>F]FLT-Efflux ca. 50% des anfänglichen [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakes in proliferierenden humanen, pulmonalen Adenokarzinomzellen (John R. Grierson et al. 2004, S.832–834). Das sollte bei einer vernünftigen Bewertung der PET-Resultate in Betracht gezogen werden.

Außerdem wäre vorstellbar, dass einige angewandte chemotherapeutische Substanzen direkt in den FLT-Metabolismus eingreifen und damit eine Verfälschung des Uptakes in die Zellen hervorrufen: Beispielsweise eine direkte Beeinflussung der TK-1-Aktivität oder eine Änderung des Expressionslevels derselben (Barthel et al. 2005, S.257–263).

In einigen Chemotherapieregimes werden die Tumorzellen an einer weiteren Teilung und damit an der Proliferation gehindert, was auch als Zellzyklusarrest bezeichnet wird. Die Reaktion der Tumorzellen ist meist die Einleitung des programmierten Zelltodes, der sogenannten Apoptose (Smith et al. 1994, S.S7-S11). Ein Problem entsteht, wenn bestimmte Zellen in ihrem Zellzyklus sozusagen gestoppt werden, sich also damit in einem Zellzyklusarrest befinden, jedoch aus verschiedenen Gründen, z.B. Mutationen, keine Apoptose einleiten. Eine Detektion dieser zwar noch vitalen, aber vorübergehend nicht proliferierenden Zellen gestaltet sich für den Proliferationsmarker [<sup>18</sup>F]FLT schwierig. Nach einiger

Zeit kann eine erneute Proliferation dieser Tumorzellen nicht ausgeschlossen werden, was als weitere Konsequenz durchaus zu einem Fehlschlagen der Chemotherapie im Behandlungsverlauf führen kann. Hier wäre noch zu klären, ob und wann eventuell noch zusätzliche diagnostische PET-Messungen – nicht nur kurz nach Applikation der Medikation, sondern auch im weiteren Therapieverlauf - sinnvoll wären.

#### 4.7 Zusammenfassende Interpretation der Resultate aus allen drei Studien

Die Ergebnisse dieser dreiteiligen Arbeit befürworten eher den Einsatz von [ $^{18}\text{F}$ ]FLT und nicht primär von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, bei aggressiven Lymphomen, um frühe Veränderungen der Tumorphiliferation nach cytotoxischer Behandlung zu detektieren, die Veränderungen des Tumolvolumens vorausgehen. Vergleichbare Resultate beim Nachweis des Therapieansprechens in Mausmodellen wurden für folgende Tumorentitäten erzielt: mit Radiochemotherapie behandeltes Ösophaguskarzinom (Apisarnthanarax et al. 2006, S.4590–4597), mit Cisplatin behandelte Fibrosarkome (Leyton et al. 2005, S.4202–4210) und bestrahlte Plattenepithelkarzinome (Yang et al. 2006, S.412–419).

Follikuläre, high-grade, xenotransplantierte Lymphome im Mausmodell zeigten 48h nach Chemotherapie mit Cyclophosphamid eine deutlich reduzierte [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Aufnahme. Veränderungen der Tumorgöße waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht festzustellen. Diese Ergebnisse unterstreichen ebenfalls den Einsatz von [ $^{18}\text{F}$ ]FLT beim Nachweis von frühem Therapie-Response in Konkurrenz zu den herkömmlichen, morphologischen Nachweismethoden (Buck et al. 2007, S.1775–1782).

Auch in etlichen früheren klinischen Studien konnte eine Überlegenheit von [ $^{18}\text{F}$ ]FLT bestätigt werden: In einer Gruppe von 26 unbehandelten Patienten mit suspekten Raumforderungen im Thorax-CT mit Verdacht auf Lungentumor stieg nur [ $^{18}\text{F}$ ]FLT verlässlich bei allen malignen Läsionen an. Mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG hingegen ergaben sich 4 falsch-positive Ergebnisse bei 8 benignen Läsionen. Zudem korrelierte der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-SUV besser mit dem Proliferations-Index aus Ki-67, als der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-SUV und spiegelte damit die Proliferationsaktivität der Tumore aussagekräftiger wider (Buck et al. 2003, S.1426–1431). In einer ähnlichen Studie war der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-uptake spezifisch für Malignität, sodass vorgeschlagen wurde, den Tracer zur Differentialdiagnose von solitären Lungenrundherden, Proliferationsbeurteilung und Prognoseabschätzung dieser Tumore einzusetzen (Buck et al. 2002, S.3331–3334). Zwei Wochen nach Beginn einer neoadjuvanten Chemotherapie durchgeführte [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET-Scans waren die einzigen

prognostisch signifikanten bildgebenden Parameter mit Aussagekraft hinsichtlich des Überlebens, neben dem Tracer [<sup>18</sup>F]FDG und Immunhistochemie, bei Patienten mit Magenkarzinom in einer Single-Center-Studie (Ott et al. 2011, S.3316–3323).

Eine frühe Response-Prädiktion gelang mit Einsatz des Biomarkers [<sup>18</sup>F]FLT eine Woche nach einer Chemotherapie in Dreifachkombination bestehend aus 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC) als Pilotstudie bei Brustkrebspatientinnen (Kenny et al. 2007, S.1339–1349).

Bei Cobben et al. wurde [<sup>18</sup>F]FLT zum Nachweis von Weichteilsarkomen eingesetzt, wobei eine Einteilung in low-grade und high-grade Sarkomen gemacht werden konnte. Außerdem korreliert auch hier der Uptake mit der Proliferation (Cobben et al. 2004, S.1685–1690).

[<sup>18</sup>F]FLT zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität für frühe Therapie-Response aus (Graf et al. 2008, S.349–355; Herrmann et al. 2011, S.690–696).

Dennoch sollte für einen vernünftigen Einsatz von [<sup>18</sup>F]FLT die Tumorentität und das geplante Behandlungsvorgehen miteinbezogen werden, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen: In einer Studie von Troost et al. war es mithilfe von [<sup>18</sup>F]FLT nicht möglich, zwischen reaktiven und metastasierten Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumoren zu unterscheiden. Der Grund ist in der reaktiven Proliferation von B-Lymphozyten zu suchen (Troost et al. 2007, S.726–735).

In einer weiteren Studie konnten Wieder et al. bei rektalen Karzinomen keine Korrelation der histopathologischen Tumorregression mit den Veränderungen des [<sup>18</sup>F]FLT-Uptakes zwei Wochen nach Beginn und nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie zeigen. Aus diesem Grund sind sie nicht der Meinung, dass [<sup>18</sup>F]FLT ein vielversprechender Marker für Tumor-Response im verwendeten Chemoradiotherapieregime bei Patienten mit rektalem Karzinom ist (Wieder et al. 2007, S.878–883).

Physiologisch hohe [<sup>18</sup>F]FLT-Aufnahmen werden in den proliferierenden Zellen des hämatopoetischen Knochenmarks und auch im Lebergewebe beobachtet, was die Einsatzfähigkeit zum Nachweis von Knochenmarksmalignomen und z.B. Lebermetastasen und hepatozellulären Karzinomen einschränkt (Eckel et al. 2009, S.1441–1447; Reske und Deisenhofer 2006, S.S40). Dies wird durch die Resultate der klinischen MCL-Studie bestätigt. In Bezug auf den positiven prädiktiven Wert zeigte eine Studie zur Therapieresponse mit [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]FLT kürzlich, dass FDG-positive und FLT-negative Patienten ein besseres Outcome hatten, als Patienten, bei denen beide Marker positiv waren (Kasper et al. 2007, S.746–753).

Hämatologische Erkrankungen sind jedoch auch in der Bildgebung mit PET-CT anders zu bewerten als solide Tumore. Tumorresiduen können fibrosiertes

Narbengewebe, aber auch aktive Tumorzellen enthalten. Wird im PET Aktivität angezeigt, liegt wahrscheinlich noch aktives Tumorgewebe vor und eine Therapie sollte erwogen werden. Ist hingegen die PET-Auswertung negativ, könnten einerseits Narbengewebe oder aber Mikrometastasen, die technisch bisher nicht nachzuweisen sind, vorliegen. Dazu stellen sich nun einige Fragen: Bis zu welchem Grad der Volumenreduktion oder Funktionseinschränkung des Gewebes ist der Nachweis sinnvoll? Zu welchem Zeitpunkt und mit welchen Methoden soll dies gemessen werden? Sind PET-Scans ausreichend oder sind formellere Messwerte wie z.B. SUV zu genauer Beurteilung von Nöten (Gwyther 2006, S.14)? Protokolle mit Empfehlungen zum diagnostischen Vorgehen von aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen unter Verwendung der PET-Diagnostik liefern eine genauere Einschätzung der Therapie-Response, als mit der herkömmlichen Beurteilung (Juweid et al. 2005, S.4652–4661).

Der prognostische Aussagewert von Verlaufs-PET-Scans, beurteilt nach visuellen Kriterien, wird für diffus-großzellige B-Zelllymphome heftig diskutiert. Im Gegensatz dazu könnte die Reduktion des SUV-Maximums (SUV-Max) das Outcome eventuell besser vorhersagen. In einer Multicenterstudie wurden die SUV-Max-Werte als Baseline vor Chemotherapie und nach 4 Zyklen bestimmt. Im Vergleich von SUV-Max zur visuellen Auswertung des progressionsfreien Überlebens über 2 Jahre wurden 83% zu 40% richtig eingeschätzt ( $p < 0.0001$ ). Noch besser war die Einschätzung für das Gesamtüberleben im gleichen Zeitraum von 94% zu 50% ( $p < 0.0001$ ). Somit erweist sich die SUV-Max-Analyse in sequentiellen Verlauf-PET-Scans als brauchbar für die Anwendung bei aggressiven NHL-Lymphomen und sagt das Outcome besser als die herkömmliche visuelle Methode voraus (Casasnovas et al. 2011, S.37–43).

Da in den meisten Studien unterschiedliche SUV-Werte für indolente und aggressive Lymphome erreicht werden, sollte der Nutzen eines Follow-Up-Scans im Vergleich mit einem zuvor angefertigten pre-Tx-Scan, der die erhöhte Tracer-Aufnahme in den Tumor dokumentiert, bestätigt werden (Jhanwar und Straus 2006, S.1333).

#### **Hauptanliegen der Arbeit:**

Frühe Therapieresponse ist sehr wertvoll, um Non-Responder so bald wie möglich aus dem Patientenkollektiv herauszufiltern und sie damit vor unnötiger Toxizität der Chemotherapie zu schützen. Aktuell ist die Positronen-Emissions- mit Computertomographie (PET-CT) hierfür das geeignetste Instrument. Dazu sollten für Malignome möglichst selektive Tracer verwandt werden, [ $^{18}\text{F}$ ]FLT ist einer von ihnen. Die Anwendung dieser Tracer in der klinischen Routine setzt Testungen in-vitro und im Tiermodell voraus, denn jedes einzelne Chemotherapeutikum kann ganz unterschiedliche Einflüsse auf den Tracer-Uptake haben und auch die Pharmakodynamik im Organismus verändern (Direcks et al. 2008, S.487).

Die Überführung der gewonnenen Erkenntnisse in den klinischen Alltag muss jedoch auch noch einige Hürden nehmen: Den Bedenken über die mögliche Toxizität dieser neuen bildgebenden Verfahren sollte begegnet werden. Vielversprechende Resultate wurden bisher in kleineren Singlecenterstudien erzielt. Die genaue Evaluation neuer diagnostischer Vorgehensweisen verlangt aber strenge Qualitätskontrollen der Untersuchungen, wie z.B. genaue Patientenselektion, Randomisierung, Multicenterstudien und unabhängige Datenanalyse ohne Bias als Voraussetzung evidenzbasierter Medizin. Die Kombination von in-vitro und in-vivo Biomarkern wird zahlreiche neue Wege zur Vorhersage, aber auch zur Überwachung des Therapie-Outcomes aufzeigen (Schwaiger und Peschel 2006, S.S3-S4).

In dieser Studie wurden die radioaktiven PET-Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT auf ihr Potential hinsichtlich der Beurteilung des frühen Therapieansprechens nach einer Therapie mit Doxorubicin beurteilt:

[ $^{18}\text{F}$ ]FDG ließ sowohl in-vitro, als auch in-vivo keine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen und lieferte auch keine klare Tendenz der Tracer-Anreicherung im PET-CT.

Mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT war in-vitro und im Mausmodell eine Abnahme des Tracer-Uptakes bei steigender Doxorubicinkonzentration nachweisbar.

In der klinischen Studie konnte exemplarisch für MCL eine hohe Sensitivität und eine starke Korrelation zur Tumorpheriferation gezeigt werden. Daher lässt sich [ $^{18}\text{F}$ ]FLT anhand dieser gewonnenen Erkenntnisse als der nützlichere PET-Tracer charakterisieren. Die vollständige Einsatzfähigkeit für den klinischen Alltag muss jedoch noch in weiteren klinischen Langzeitstudien mit größeren Fallzahlen getestet werden.

#### 4.8 Ausblick in die Zukunft der molekularen Bildgebung mit Fokus auf den Proliferationsmarker [ $^{18}\text{F}$ ]FLT

Abschließend betrachtet sind Tumorwachstum und –metabolismus viel komplexer als man zu Beginn gedacht hatte. Wird der hauptsächliche, metabolische Versorgungsweg blockiert, besitzen Tumore eine erstaunliche Fähigkeit, neue alternative Möglichkeiten zu entwickeln. Auch mit einer ständig zunehmenden Anzahl an Nachweismöglichkeiten, wird paradoxerweise keine alleine dominieren können. Vielmehr ist eine multidisziplinäre Vorgehensweise mit biochemischer, funktioneller und anatomischer Bildgebung, sowie klinischen Untersuchungen mit

mehreren Meinungen eines Expertenteams in großen Multicenterstudien wahrscheinlich. Diese Herangehensweise mag dem Patienten den größten Nutzen bringen. Jedoch sollten in der schnell weiter fortschreitenden Technologie die Kriterien ständig überdacht und gegebenenfalls angepasst werden (Gwyther 2006, S.S14-S15).

Schwaiger beantwortet die Frage „Warum in Zukunft PET-Radiotracer für die Anwendung im klinischen Umfeld gefragt sind und auch gebraucht werden“ so:

1. Die PET-Technologie ist der Single-Photonen-Bildgebung überlegen und wird die Single Photon Emission Computertomographie (SPECT) im fortschreitenden Gesundheitssektor weiter herausfordern. Unterstützung erfährt sie von einer spezialisierten, radiopharmazeutischen Industrie und guten Verteilungsnetzwerken.
2. Die wachsende Bedeutung der PET-Technologie wird begleitet von der steigenden Verfügbarkeit der PET-Tracer für etablierte, nuklearmedizinische Bildgebungsindikationen, wie z.B. Knochenscan und die Darstellung der Myokardperfusion und der Entwicklung neuer Substanzen für die Diagnose und Staging gängiger Erkrankungen, z.B. Amyloid-Liganden zur Früherkennung von Morbus Alzheimer.
3. Der Erfolg der Translation molekularer Ansätze mit PET zur Anwendung beim Patienten wird stark von der Integration therapeutischer Strategien und neuer Bildgebungsmethoden und ihrem Einfluss auf therapeutische Entscheidungsfindung abhängen, dies alles nicht zuletzt auf dem Weg zur Realisierung einer personalisierten Medizin (Schwaiger und Wester 2011, S.37S).

Zusammengefasst gesagt, kann man Reske zustimmen, dass wir gerade erst am Anfang stehen, um die genaue Rolle des FLT als Responsemarker in der Antikrebstherapie zu definieren. Nichtsdestotrotz zeichnet sich FLT durch seine Fähigkeit, spezifisch einen wichtigen Stoffwechselweg des Tumorzellmetabolismus zu markieren, als ein vielversprechendes und potentiell wichtiges, neues Radiopharmazeutikum aus. Der schnelle Zuwachs in unserem Wissen um grundlegende, therapiebezogene Veränderungen im Tumor- und FLT-Metabolismus und in der Definition seines klinischen Nutzens sind schon in naher

## 5 Zusammenfassung

Der frühe Nachweis eines Therapieansprechens in der Behandlung von Tumorerkrankungen ist von großer Bedeutung im Hinblick auf das weitere Therapiemanagement und letzten Endes auch entscheidend für das Outcome. In der molekularen Diagnostik sind mehrere radioaktive PET-Tracer in der Anwendung und klinischer Erprobung. Der am längsten etablierte Biomarker ist das Glukoseanalogon FDG, welches jedoch nicht spezifisch für die Detektion von tumorösen Zellen ist. Große Erwartungen werden daher an den Proliferationsmarker FLT gestellt, der indirekt die gesteigerte DNS-Synthese in Tumorzellen nachweisen soll. Im Zuge immer zielgerichteter Behandlungsansätze auf molekularer Ebene, erscheint es zudem sinnvoll, mithilfe von PET-Traceern Dosis-Wirkungs-Beziehungen beim Einsatz schon etablierter Chemotherapeutika, zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit besteht aus 3 verschiedenen Teilen. Ziel der präklinischen Studien war es, herauszufinden, ob bei SU-DHL-4-Zellen, isoliert aus einem diffus großzelligen Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) nach Chemotherapie mit dem Wirkstoff Doxorubicin mithilfe der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachvollzogen werden kann. Weiterhin sollte auch in der klinischen Studie geklärt werden, welcher der beiden Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG oder [ $^{18}\text{F}$ ]FLT sich besser zur frühen Therapie-Beurteilung bei aggressiven Lymphomen eignet.

Eine erste Einschätzung der verwendeten SU-DHL-4-Lymphomzellen erfolgte mithilfe der in-vitro Versuche: Hierbei konnte eine dosisabhängige Reduktion der Stoffwechselaktivität der Lymphomzellen bei steigender Doxorubicinkonzentration mittels MTT 48h nach Therapie gezeigt werden.

Ergänzend dazu wurde in der Trypanblaufärbung bei ansteigenden Doxorubicinkonzentrationen eine Verminderung viabler Zellen festgestellt. Schon bei den niedrigeren Konzentrationen bis 25 ng/ml ließ sich 24h nach Chemotherapie eine Abnahme der vitalen Zellen um ca. ein Drittel erkennen.

48h nach Doxorubicingabe zeigte sich in allen Konzentrationen eine Reduktion vitaler Zellen um ca. 60%.

Den nächsten Schritt bildeten die mit dem radioaktiven Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG durchgeführten Uptake-Versuche, wo sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung in den Konzentrationen von 6 bis 400 ng/ml feststellen ließ. Jedoch konnte ein Abwärtstrend der Traceraufnahme bei steigenden Doxorubicinkonzentrationen beobachtet werden.

Anders verhielt sich in den Versuchen die [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Traceraufnahme der untersuchten Lymphomzellen. Im Gegensatz zu [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wurde mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT in den verwandten Doxorubicinkonzentrationen von 25 bis 400 ng/ml eine Dosis-Wirkungsbeziehung 24h und 48h nach Chemotherapie nachgewiesen. Um genauere Angaben über den Zellzyklus 48h nach Chemotherapie mit Doxorubicin zu erhalten, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dabei ergaben sich in den Konzentrationen von 6 bis 100 ng/ml eine dosisabhängige Reduktion der S-Phase mit ansteigendem G<sub>2</sub>-Arrest. Bei 200 und 400 ng/ml wurde ein zusätzlicher G<sub>1</sub>-Arrest beobachtet.

Die in-vivo Versuche ergaben Folgendes: Das mithilfe einer Schublehre bestimmte Tumolvolumen der xenotransplantierten SCID-Mäuse verhielt sich nach 48h in

den jeweiligen Therapiegruppen konstant, verglichen mit einem Anstieg um 80,0% (SE = 23,2) in der Kontrollgruppe. Am Tag 9 nach Chemotherapie wurde auch bei den behandelten Mäusen eine Progredienz des Tumolvolumens verzeichnet, am stärksten bei 50µg: + 80,0%, SE = 11,8. Ein viel größerer Zuwachs, nämlich um 947,0%, SE = 224,7 ließ sich bei den unbehandelten Kontrollmäusen beobachten.

FLT: Die Abnahme der TBR-Werte der [<sup>18</sup>F]FLT-PET-Scans 48h nach Therapie korrelierte umgekehrt zu den ansteigenden Doxorubicindosen. Für die ROIs der [<sup>18</sup>F]FLT-PET-Scans zeigte sich in der Varianzanalyse eine signifikante Heterogenität der TBR-Prozentwertverteilung zwischen den einzelnen Konzentrationsgruppen mit  $p = 0,008$ . Der Dunnet-T-Test ergab im multiplen, paarweisen Testen signifikant niedrigere TBR-Prozentwerte in allen Konzentrationen im direkten Vergleich mit den Kontrollmäusen. Diese Nachweise gingen alle den messbaren Änderungen im Tumolvolumen voraus.

FDG: Konträr zu [<sup>18</sup>F]FLT ergab sich für den Tracer [<sup>18</sup>F]FDG in unseren Versuchen keine einheitliche Tendenz der prozentualen TBR-Medianwerte in Bezug zu den Doxorubicindosen. Bei 25µ und 200µg Doxorubicin stiegen die TBR-Medianwerte im Vergleich zur Baseline und zur Kontrolle an.

Eine Validierung der PET-Aufnahmewerte wurde bei einzelnen Mäusen (je Tracer 7 Mäuse, je  $n=7$ ) mit einer Biodistribution sowohl mit [<sup>18</sup>F]FDG, als auch mit [<sup>18</sup>F]FLT ausgeführt. Anschließend wurden die Organe ex vivo im Gamma-Counter gemessen und die Tumor-Muscle-Ratio (TMR) bestimmt. Diese belief sich bei [<sup>18</sup>F]FDG für den Tumor auf 12,3 (SE = 2,6), Herzmuskel und Gehirn hatten aufgrund des großen Glukosebedarfs mit 14,9 (SE = 10,5) und 3,4 (SE = 0,8) ebenfalls höhere Werte, über die Niere mit dem Wert 3,1 (SE = 0,8) findet die Ausscheidung des biologischen Tracers statt. Allein die Leber reicherte nur gering an 1,1 (SE = 0,2).

Bei [<sup>18</sup>F]FLT zeigte der Tumor wegen seiner Eigenschaft zur Proliferation im Vergleich zu den übrigen Organen den größten Wert 9,4 (SE = 1,12). Die Niere fungierte wieder als Ausscheidungsorgan 2,5 (SE = 0,15). Deutlich lässt sich erkennen, dass Leber und Herz mit je 1,2 (SE = 0,59 und SE = 0,04) nur einen geringen Unterschied zur Hintergrundaktivität aufwiesen. Die Blut-Hirn-Schranke kann von [<sup>18</sup>F]FLT nicht überwunden werden.

Die Lymphome aus SU-DHL-4-Zellen wurden für die Histologie und die immunhistochemischen Nachweise von Ki-67 und Caspase 3 als Proliferations- und Apoptosemarker, explantiert. Der Proliferations-Index befand sich bei den unbehandelten Lymphomen zwischen 0,23 und 0,32. Im multiplen, paarweisen Testen mit den Dunnet-T-Test ergaben sich zu allen Doxorubicinkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigere Ki-67-Indexwerte: 25µg  $p = 0,007$ ; 50µg, 100µg und 200µg  $p < 0,001$ . Außerdem gab es auch unter den einzelnen Konzentrationsgruppen signifikante Unterschiede im Ki-67-Index (ANOVA  $p$ -Wert = 0,013). Im multiplen Vergleichen zeigte sich, dass die Gesamt-Heterogenität der Ki-67-Index-Verteilung hauptsächlich auf Unterschiede zwischen 25µg und 50µg (Bonferroni  $p = 0,018$ ) und 25µg und 200µg (Bonferroni  $p = 0,037$ ) beruht. Keine relevanten Unterschiede konnten zwischen der Kontrolle und allen übrigen Doxorubicinkonzentrationen in Bezug auf den Nachweis von Caspase 3 gezeigt werden. Apoptotische Zellen wurden zu etwa 1% an der Gesamtheit in

diesen Schnitten nachgewiesen. Die Reduktion von Ki-67 spricht für einen Zellzyklusarrest ausgelöst durch Doxorubicin.

In der vorliegenden klinischen Studie zeigten alle nach den "revised response" Kriterien evaluierten Patienten einen intensiven [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptake und alle durch konventionelle Bildgebung wie Spiral-CT oder auch [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-CT identifizierten MCL-Läsionen wurden mit [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET nachgewiesen. Sogar in dieser kleinen Pilotstudie (n=8) war es möglich, eine starke positive Korrelation zwischen Proliferation, nachgewiesen mit Ki-67 oder MIPI-Ki-67, und der [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Aufnahme darzustellen. Diese Korrelation zeigt, dass [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET ein passendes, sensitives Werkzeug zur Abschätzung der Proliferationsaktivität von MCL ist. 4 aus 5 Patienten, die in den frühen Therapie-Response –Teil der Studie integriert waren, zeigten einen deutlichen Abfall des [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Uptakes. Aufgrund der kleinen Patientenzahl (n=8) und der kurzen Zeit des Follow-Up wurden im Hinblick auch auf individuelle Änderungen des [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-SUV deskriptive Ergebnisse früh nach Therapiebeginn dargestellt.

Zusammenfassend wurden die radioaktiven PET-Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und [ $^{18}\text{F}$ ]FLT auf ihr Potential hinsichtlich der Beurteilung des frühen Therapieansprechens nach einer Therapie mit Doxorubicin beurteilt: Die Ergebnisse der dreiteiligen Arbeit befürworten eher den Einsatz von [ $^{18}\text{F}$ ]FLT und nicht primär von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG bei aggressiven Lymphomen. In der klinischen Studie konnte exemplarisch für MCL eine hohe Sensitivität und eine starke Korrelation dieses Tracers zur Tumorphosphorierung gezeigt werden. Daher lässt sich [ $^{18}\text{F}$ ]FLT auch anhand dieser gewonnenen Erkenntnisse als der nützlichere PET-Tracer charakterisieren. Die vollständige Einsatzfähigkeit im klinischen Alltag muss jedoch trotz dieser vielversprechenden Resultate noch in weiteren klinischen Langzeitstudien mit größeren Fallzahlen getestet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alavi, A., Mavi, A. und Fischman, A. Is PET-CT the only option? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (2007) 819–821.
- Apisarnthanarax, S., Alauddin, M. M., Mourtada, F., Ariga, H., Raju, U., Mawlawi, O., Han, D., Bornmann, W. G., Ajani, J. A., Milas, L., Gelovani, J. G. und Chao, K. S. C. Early detection of chemoradioresponse in esophageal carcinoma by 3'-deoxy-3'-<sup>3</sup>H-fluorothymidine using preclinical tumor models. *Clin. Cancer Res* 12 (2006) 4590–4597.
- Armitage, J. O. und Weisenburger, D. D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol* 16 (1998) 2780–2795.
- Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., Turner, K., Owen, R., Patmore, R., Roman, E., Jack, A. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 28 (2010) 3360.
- Barthel, H., Perumal, M., Latigo, J., He, Q., Brady, F., Luthra, S. K., Price, P. M. und Aboagye, E. O. The uptake of 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine into L5178Y tumours in vivo is dependent on thymidine kinase 1 protein levels. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (2005) 257–263.
- Becker, S. Intelligente Implantate zur Therapieunterstützung. Dissertationsschrift Technische Universität München, Fakultät für Elektrotechnik 2012.
- Beer, A., Drzezga, A., Fürst, S., Ziegler, S., Nekolla, S. und Schwaiger, M. Neue Blicke in den Körper. *forschung - Mitteilungen der DFG* 36 (2011) 30–35.
- Belton, A. L., Saini, S., Liebermann, K., Boland, G. W. und Halpern, E. F. Tumour size measurement in an oncology trial: comparison between off-site and on-site measurements. *Clin Radiol* 58 (2003) 311–314.
- Bodet-Milin, C., Touzeau, C., Leux, C., Sahin, M., Moreau, A., Maisonneuve, H., Morineau, N., Jardel, H., Moreau, P., Gallazini-Crépin, C., Gries, P., Gressin, R., Harousseau, J.-L., Mohty, M., Kraeber-Bodere, F. und Le Gouill, S. Prognostic impact of <sup>18</sup>F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in untreated mantle cell lymphoma: a retrospective study from the GOELAMS group. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37 (2010) 1633–1642.
- Bodrug, S., Warner, B., Bath, M., Lindeman, GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J* 13 (1994) 2124
- Bortz, J. Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008.
- Bosma, M.J., Carroll, A., M. The SCID mouse mutant: definition, characterization and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9 (1991) 323-350.
- Brepoels, L., Stroobants, S., De, W., Dierickx, D., Vandenberghe, P., Thomas, J., Mortelmans, L., Verhoef, G. und De, W.-P. Positron emission tomography in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 49 (2008) 1693–1701.
- Brown, R., Leung, J., Fisher, S., Frey, K., Ethier, S. und Wahl, R. Intratumoral distribution of tritiated fluorodeoxyglucose in breast carcinoma: I. Are inflammatory cells important? *J Nucl Med* 36 (1995) 1854–1861.
- Buchmann, I., Neumaier, B., Schreckenberger, M. und Reske, S. [<sup>18</sup>F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine-PET in NHL patients: whole-body biodistribution and imaging of lymphoma manifestations--a pilot study. *Cancer Biother. Radiopharm* 19 (2004) 436–442.
- Buck, A., Bommer, M., Stilgenbauer, S., Juweid, M., Glatting, G., Schirrmeister, H., Mattfeldt, T., Tepsic, D., Bunjes, D., Mottaghy, F., Krause, B., Neumaier, B., Dohner,

- H., Moller, P. und Reske, S. Molecular imaging of proliferation in malignant lymphoma. *Cancer Res* 66 (2006) 11055–11061.
- Buck, A., Halter, G., Schirrmeister, H., Kotzerke, J., Wurziger, I., Glatting, G., Mattfeldt, T., Neumaier, B., Reske, S. und Hetzel, M. Imaging proliferation in lung tumors with PET: 18F-FLT versus 18F-FDG. *J Nucl Med* 44 (2003) 1426–1431.
- Buck, A., Herrmann, K., Shen, C., Dechow, T., Schwaiger, M. und Wester, H.-J. Molecular imaging of proliferation in vivo: positron emission tomography with fluorothymidine. *Methods* 48 (2009) 205–215.
- Buck, A., Kratochwil, C., Glatting, G., Juweid, M., Bommer, M., Tepsic, D., Vogg, A., Mattfeldt, T., Neumaier, B., Moller, P. und Reske, S. Early assessment of therapy response in malignant lymphoma with the thymidine analogue FLT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (2007) 1775–1782.
- Buck, A. und Reske, S. Cellular origin and molecular mechanisms of 18F-FDG uptake: is there a contribution of the endothelium? *J Nucl Med* 45 (2004) 461–463.
- Buck, A., Schirrmeister, H., Hetzel, M., Von, D., Halter, G., Glatting, G., Mattfeldt, T., Liewald, F., Reske, S. und Neumaier, B. 3-deoxy-3-fluorothymidine-positron emission tomography for noninvasive assessment of proliferation in pulmonary nodules. *Cancer Res* 62 (2002) 3331–3334.
- Buerkle, A. und Weber, W. Imaging of tumor glucose utilization with positron emission tomography. *Cancer Metastasis Rev* 27 (2008) 545–554.
- Carbone, P. P., Kaplan, H. S., Musshoff, K., Smithers, D. W. und Tubiana, M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* 31 (1971) 1860–1861.
- Casasnovas, R.-O., Meignan, M., Berriolo-Riedinger, A., Bardet, S., Julian, A., Thieblemont, C., Vera, P., Bologna, S., Brière, J., Jais, J.-P., Haioun, C., Coiffier, B. und Morschhauser, F. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 118 (2011) 37–43.
- Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer cell* 7 (2005) 445.
- Cheson, B., Pfistner, B., Juweid, M., Gascoyne, R., Specht, L., Horning, S., Coiffier, B., Fisher, R., Hagenbeek, A., Zucca, E., Rosen, S., Stroobants, S., Lister, T., Hoppe, R., Dreyling, M., Tobinai, K., Vose, J., Connors, J., Federico, M. und Diehl, V. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 25 (2007) 579–586.
- Cobben, D. C. P., Elsinga, P. H., Suurmeijer, A. J. H., Vaalburg, W., Maas, B., Jager, P. L. und Hoekstra, H. J. Detection and grading of soft tissue sarcomas of the extremities with (18)F-3'-fluoro-3'-deoxy-L-thymidine. *Clin. Cancer Res* 10 (2004) 1685–1690.
- Coiffier, B. How to interpret the radiological abnormalities that persist after treatment in non-Hodgkin's lymphoma patients? *Ann. Oncol* 10 (1999) 1141–1143.
- Coiffier, B. State-of-the-art therapeutics: diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23 (2005) 6387–6393.
- Coussens, L. M. und Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420 (2002) 860–867.
- Di Bartolomeo, S., Di Sano, F., Piacentini, M. und Spinedi, A. Apoptosis induced by doxorubicin in neurotumor cells is divorced from drug effects on ceramide accumulation and may involve cell cycle-dependent caspase activation. *J. Neurochem* 75 (2000) 532–539.
- Direcks, W. G. E., Berndsen, S. C., Proost, N., Peters, G. J., Balzarini, J., Spreuvenberg, M. D., Lammertsma, A. A. und Molthoff, C. F. M. [18F]FDG and [18F]FLT uptake in human breast cancer cells in relation to the effects of chemotherapy: an in vitro study. *Br J Cancer* 99 (2008) 481–487.
- Direcks, W. G., Lammertsma, A. A. und Molthoff, C. F. M. 3'-Deoxy-3'-Fluorothymidine as a Tracer of Proliferation in Positron Emission Tomography. In: Peters, G.J.: Deoxynucleoside analogs in cancer therapy: Cancer drug discovery and development. Humana Press, New Jersey, 2006 441–462.
- Eckel, F., Herrmann, K., Schmidt, S., Hillerer, C., Wieder, H., Krause, B.-J., Schuster, T., Langer, R., Wester, H.-J., Schmid, R., Schwaiger, M. und Buck, A. Imaging of

- proliferation in hepatocellular carcinoma with the in vivo marker 18F-fluorothymidine. *J Nucl Med* 50 (2009) 1441–1447.
- Edwards B., Brown M., Wingo P., Howe H., Ward E., Ries L., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 97 (2005) 1407–1427.
- Engles, J. M., Quarless, S. A., Mambo, E., Ishimori, T., Cho, S. Y. und Wahl, R. L. Stunning and its effect on 3H-FDG uptake and key gene expression in breast cancer cells undergoing chemotherapy. *J. Nucl. Med* 47 (2006) 603–608.
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K. und Eklund, H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell Mol Life Sci* 59 (2002) 1327–1346.
- Fernández, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E. und Rosenwald, A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J. Clin. Oncol* 23 (2005) 6364–6369.
- Fiedler, F., Priegnitz, M., Julich, R., Pawelke, J., Crespo, P., Parodi, K., Ponisch, F. und Enghardt, W. In-beam PET measurements of biological half-lives of 12C irradiation induced beta+-activity. *Acta Oncol* 47 (2008) 1077–1086.
- Freedman, A. und Friedberg, J. (2012): Initial treatment of advanced stage diffuse large B cell lymphoma ([http://www.uptodate.com.eaccess.ub.tum.de/contents/initial-treatment-of-advanced-stage-diffuse-large-b-cell-lymphoma?source=search\\_result&search=NHL&selectedTitle=5%7E150](http://www.uptodate.com.eaccess.ub.tum.de/contents/initial-treatment-of-advanced-stage-diffuse-large-b-cell-lymphoma?source=search_result&search=NHL&selectedTitle=5%7E150))  
Stand:07.03.2012.
- Freedman, A. und Friedberg, J. (2012) Initial evaluation and staging of non-Hodgkin lymphoma ([http://www.uptodate.com.eaccess.ub.tum.de/contents/initial-evaluation-and-staging-of-non-hodgkin-lymphoma?source=search\\_result&search=initial-treatment-of-advanced-stage-diffuse-large-b-cell-lymphoma&selectedTitle=1%7E150](http://www.uptodate.com.eaccess.ub.tum.de/contents/initial-evaluation-and-staging-of-non-hodgkin-lymphoma?source=search_result&search=initial-treatment-of-advanced-stage-diffuse-large-b-cell-lymphoma&selectedTitle=1%7E150))  
Stand:07.03.2012.
- Geisler, C. Front-line treatment of mantle cell lymphoma. *Haematologica* 95 (2010) 1241–1243.
- Geissler, K. (2008) Spezielle Lymphome ([http://www.gnigl.info/mlh/leoben2008/Geissler\\_K\\_Spezielle%20NHL08.pdf](http://www.gnigl.info/mlh/leoben2008/Geissler_K_Spezielle%20NHL08.pdf))  
Stand:07.06.2013.
- Gill, S., Wolf, M., Prince, H., Januszewicz, H., Ritchie, D., Hicks, R. und Seymour, J. fluorodeoxyglucose positron emission tomography scanning for staging, response assessment, and disease surveillance in patients with mantle cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 8 (2008) 159–165.
- Graf, N., Herrmann, K., den Hollander, J., Fend, F., Schuster, T., Wester, H.-J., Senekowitsch-Schmidtke, R., Zum Büschenfelde, C. M., Peschel, C., Schwaiger, M., Dechow, T. und Buck, A. K. Imaging proliferation to monitor early response of lymphoma to cytotoxic treatment. *Mol Imaging Biol* 10 (2008) 349–355.
- Greiner, D. L., Hesselton, R. A. und Shultz, L. D. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16 (1998) 166–177.
- Gwyther, S. J. Current standards for response evaluation by imaging techniques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33 (2006) S11–S15.
- Habermann, T., Weller, E., Morrison, V., Gascoyne, R., Cassileth, P., Cohn, J., Dakhil, S., Woda, B., Fisher, R., Peterson, B. und Horning, S. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24 (2006) 3121–3127.
- Haioun, C., Itti, E., Rahmouni, A., Brice, P., Rain, J.-D., Belhadj, K., Gaulard, P., Garderet, L., Lepage, E., Reyes, F. und Meignan, M. fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. *Blood* 106 (2005) 1376–1381.
- Hamacher, K., Coenen, H. H. und Stöcklin, G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J. Nucl. Med* 27 (1986) 235–238.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 (2000) 57–70.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (2011) 646–674.

- Herrmann, A., Hoster, E., Zwingers, T., Brittinger, G., Engelhard, M., Meusers, P., Reiser, M., Forstpointner, R., Metzner, B., Peter, N., Wormann, B., Trumper, L., Pfreundschuh, M., Einsele, H., Hiddemann, W., Unterhalt, M. und Dreyling, M. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27 (2009) 511–518.
- Herrmann, K., Buck, A. K., Schuster, T., Junger, A., Wieder, H. A., Graf, N., Ringshausen, I., Rudelius, M., Wester, H.-J., Schwaiger, M., Keller, U. und Dechow, T. Predictive value of initial <sup>18</sup>F-FLT uptake in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma receiving R-CHOP treatment. *J. Nucl. Med* 52 (2011) 690–696.
- Herrmann, K., Krause, B., Bundschuh, R., Dechow, T. und Schwaiger, M. Monitoring response to therapeutic interventions in patients with cancer. *Semin Nucl Med* 39 (2009) 210–232.
- Herrmann, K., Wieder, H. A., Buck, A. K., Schöffel, M., Krause, B.-J., Fend, F., Schuster, T., Zum Meyer Büschenfelde, C., Wester, H.-J., Duyster, J., Peschel, C., Schwaiger, M. und Dechow, T. Early response assessment using 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine-positron emission tomography in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res* 13 (2007) 3552–3558.
- Higashi, K., Clavo, A. C. und Wahl, R. L. In vitro assessment of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, L-methionine and thymidine as agents to monitor the early response of a human adenocarcinoma cell line to radiotherapy. *J. Nucl. Med* 34 (1993) 773–779.
- Hofmann, W., de Vos, S., Tsukasaki, K., Wachsmann, W, Pinkus, GS, Said, JW, Koeffler, HP. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 98 (2001) 787.
- Horning, S. J., Juweid, M. E., Schöder, H., Wiseman, G., McMillan, A., Swinnen, L. J., Advani, R., Gascoyne, R. und Quon, A. Interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma: an independent expert nuclear medicine evaluation of the Eastern Cooperative Oncology Group E3404 study. *Blood* 115 (2010) 775-7; quiz 918.
- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H. C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wörmann, B., Ludwig, W.-D., Dührsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W. und Unterhalt, M. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111 (2008) 558–565.
- Hsu, P. P. und Sabatini, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* 134 (2008) 703–707.
- Hummel, M. und Hellmich, S. (2008) Informationen zur Krankheit: Non-Hodgkin-Lymphome, Pathologie & Klassifikation (<http://www.lymphome.de/InfoLymphome/index.jsp> Stand:07.06.2013).
- Hüsler, J. Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. Huber, Bern, 2010.
- Ichikawa, A., Kinoshita, T., Watanabe, T. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 337 (1997) 529.
- Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. und Vardiman, J. W. (Hrsg.) Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Francia, 2001.
- Jerusalem, G., Beguin, Y., Fassotte, M. F., Najjar, F., Paulus, P., Rigo, P. und Fillet, G. Whole-body positron emission tomography using <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose for posttreatment evaluation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging. *Blood* 94 (1999) 429–433.
- Jhanwar, Y. S. und Straus, D. J. The Role of PET in Lymphoma. *Journal of Nuclear Medicine* 47 (2006) 1326–1334.
- John R. Grierson, Jeffery L. Schwartz, Mark Muzi, Robert Jordan und Kenneth A Krohn Metabolism of 3'-deoxy-3'-[F-18]fluorothymidine in proliferating A549 cells: Validations for positron emission tomography. *Nucl Med Biol* 31 (2004) 829–837.
- Judenhofer, M. S., Wehrl, H. F., Newport, D. F., Catana, C., Siegel, S. B., Becker, M., Thielscher, A., Kneilling, M., Lichy, M. P., Eichner, M., Klingel, K., Reischl, G., Widmaier, S., Röcken, M., Nutt, R. E., Machulla, H.-J., Uludag, K., Cherry, S. R.,

- Claussen, C. D. und Pichler, B. J. Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. *Nat Med* 14 (2008) 459–465.
- Juweid, M. E., Stroobants, S., Hoekstra, O. S., Mottaghy, F. M., Dietlein, M., Guermazi, A., Wiseman, G. A., Kostakoglu, L., Scheidhauer, K., Buck, A., Naumann, R., Spaepen, K., Hicks, R. J., Weber, W. A., Reske, S. N., Schwaiger, M., Schwartz, L. H., Zijlstra, J. M., Siegel, B. A. und Cheson, B. D. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J. Clin. Oncol* 25 (2007) 571–578.
- Juweid, M., Wiseman, G., Vose, J., Ritchie, J., Menda, Y., Wooldridge, J., Mottaghy, F., Rohren, E., Blumstein, N., Stolpen, A., Link, B., Reske, S., Graham, M. und Cheson, B. Response assessment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma by integrated International Workshop Criteria and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Oncol* 23 (2005) 4652–4661.
- Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y. und Furukawa, Y. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 97 (2001) 1999–2007.
- Kasper, B., Egerer, G., Gronkowski, M., Haufe, S., Lehnert, T., Eisenhut, M., Mechttersheimer, G., Ho, A. D. und Haberkorn, U. Functional diagnosis of residual lymphomas after radiochemotherapy with positron emission tomography comparing FDG- and FLT-PET. *Leuk. Lymphoma* 48 (2007) 746–753.
- Kenny, L., Coombes, R. C., Vigushin, D. M., Al-Nahas, A., Shousha, S. und Aboagye, E. O. Imaging early changes in proliferation at 1 week post chemotherapy: a pilot study in breast cancer patients with 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34 (2007) 1339–1347.
- Kenny, L., Vigushin, D., Al-Nahas, A., Osman, S., Luthra, S., Shousha, S., Coombes, R. und Aboagye, E. Quantification of cellular proliferation in tumor and normal tissues of patients with breast cancer by fluorothymidine-positron emission tomography imaging: evaluation of analytical methods. *Cancer Res* 65 (2005) 10104–10112.
- Kong, X. B., Zhu, Q. Y., Vidal, P. M., Watanabe, K. A., Polsky, B., Armstrong, D., Ostrander, M., Lang, S. A., Muchmore, E. und Chou, T. C. Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (1992) 808–818.
- Kubota, R., Yamada, S., Kubota, K., Ishiwata, K., Tamahashi, N. und Ido, T. Intratumoral Distribution of Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose In Vivo: High Accumulation in Macrophages and Granulation Tissues Studied by Microautoradiography. *Journal of Nuclear Medicine* 33 (1992) 1972–1980.
- Kuwert, T. *Nuklearmedizin*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 2008.
- Leyton, J., Latigo, J. R., Perumal, M., Dhaliwal, H., He, Q. und Aboagye, E. O. Early detection of tumor response to chemotherapy by 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography: the effect of cisplatin on a fibrosarcoma tumor model in vivo. *Cancer Res* 65 (2005) 4202–4210.
- Lister, T. A., Crowther, D., Sutcliffe, S. B., Glatstein, E., Canellos, G. P., Young, R. C., Rosenberg, S. A., Coltman, C. A. und Tubiana, M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J. Clin. Oncol* 7 (1989) 1630–1636.
- Lossos, I., Okada, C., Tibshirani, R. Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 95 (2000) 1797.
- Lu, L., Samuelsson, L., Bergström, M., Sato, K., Fath, K.-J. und Långström, B. Rat Studies Comparing 11C-FMAU, 18F-FLT, and 76Br-BFU as Proliferation Markers. *Journal of Nuclear Medicine* 43 (2002) 1688–1698.
- Machulla, H.-J., Blocher, A., Kuntzsch, M., Piert, M., Wei, R. und Grierson, J. Simplified Labeling Approach for Synthesizing 3'-Deoxy-3'-[18F]fluorothymidine ([18F]FLT). *J Radioanal Nucl Chem* 243 (2000) 843–846.
- Martin, P., Chadburn, A., Christos, P., Furman, R., Ruan, J., Joyce, M. A., Fusco, E., Glynn, P., Elstrom, R., Niesvizky, R., Feldman, E. J., Shore, T. B., Schuster, M. W., Ely, S., Knowles, D. M., Chen-Kiang, S., Coleman, M. und Leonard, J. P. Intensive

- treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies. *Ann. Oncol* 19 (2008) 1327–1330.
- Maschauer, S., Prante, O., Hoffmann, M., Deichen, J. und Kuwert, T. Characterization of <sup>18</sup>F-FDG uptake in human endothelial cells in vitro. *J Nucl Med* 45 (2004) 455–460.
- Mikhaeel, N. G. Use of FDG-PET to monitor response to chemotherapy and radiotherapy in patients with lymphomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33 (2006) 22–26.
- Mikhaeel, N. G., Timothy, A. R., O'Doherty, M. J., Hain, S. und Maisey, M. N. <sup>18</sup>F-FDG-PET as a prognostic indicator in the treatment of aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma-comparison with CT. *Leuk. Lymphoma* 39 (2000) 543–553.
- Miller, T. P. The limits of limited stage lymphoma. *J. Clin. Oncol* 22 (2004) 2982–2984.
- Mlynek, J., Tychsen, J. und Dornbach, B. Vorwort. *Wir erforschen: Gesundheit* (2011).
- Moskowitz, C., Schoder, H., Teruya-Feldstein, J., Sima, C., Iasonos, A., Portlock, C., Straus, D., Noy, A., Palomba, M., O'Connor, O., Horwitz, S., Weaver, S., Meikle, J., Filippa, D., Caravelli, J., Hamlin, P. und Zelenetz, A. Risk-adapted dose-dense immunochemotherapy determined by interim FDG-PET in Advanced-stage diffuse large B-Cell lymphoma. *J Clin Oncol* 28 (2010) 1896–1903.
- Munch-Petersen, B., Cloos, L., Tyrsted, G. und Eriksson, S. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 9032–9038.
- National Cancer Institute at the National Institutes of Health (2011) Cellular Classification of Adult Non-Hodgkin Lymphoma (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adult-non-hodgkins/HealthProfessional/page3> Stand:07.06.2013.
- Ott, K., Herrmann, K., Schuster, T., Langer, R., Becker, K., Wieder, H., Wester, H.-J., Siewert, J.-R., Büschenfelde, C., Buck, A., Wilhelm, D., Ebert, M., Peschel, C., Schwaiger, M., Lordick, F. und Krause, B. Molecular Imaging of Proliferation and Glucose Utilization: Utility for Monitoring Response and Prognosis after Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 18 (2011) 3316–3323.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412 (2001) 341.
- Peters, G. J. (Hrsg.) Deoxynucleoside analogs in cancer therapy: Cancer drug discovery and development. Humana Press, New Jersey, 2006.
- Phan, R., Dalla-Favera, R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432 (2004) 635.
- Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M.-H., Beldjord, K., Bottcher, S., Asnafi, V., Plonquet, A., Siebert, R., Callet-Bauchu, E., Andersen, N., van, D., Klapper, W., Berger, F., Ribrag, V., van, H., Trneny, M., Walewski, J., Dreger, P., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Kneba, M., Kluin-Nelemans, H., Hermine, O., Macintyre, E. und Dreyling, M. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* 115 (2010) 3215–3223.
- Potter, A. und Rabinovitch, P. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res* 572 (2005) 27–44.
- Rasey, J. S., Grierson, J. R., Wiens, L. W., Kolb, P. D. und Schwartz, J. L. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med* 43 (2002) 1210–1217.
- Reske, S. N. und Deisenhofer, S. Is 3'-deoxy-3'-<sup>18</sup>F-fluorothymidine a better marker for tumour response than <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33 (2006) 38–43.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Gascoyne, R. D., Grogan, T. M., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Chiorazzi, M., Giltzane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Henrickson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Fisher, R. I., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H.,

- Delabie, J. und Staudt, L. M. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3 (2003) 185–197.
- Sabattini, E., Bacci, F., Sagrmoso, C. und Pileri, S. A. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica* 102 (2010) 83–87.
- Safar, V., Dupuis, J., Itti, E., Jardin, F., Fruchart, C., Bardet, S., Vera, P., Copie-Bergman, C., Rahmouni, A., Tilly, H., Meignan, M. und Haioun, C. Interim [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Scan in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Anthracycline-Based Chemotherapy Plus Rituximab. *Journal of Clinical Oncology* 30 (2012) 184–190.
- Schicha, H. Nuklearmedizin. Schattauer, Stuttgart [u.a.], 2007.
- Schmitt, C. A., Rosenthal, C. T. und Lowe, S. W. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat. Med* 6 (2000) 1029–1035.
- Schölmerich, J. Vom Labor in den Alltag. *forschung* 36 (2011) 4-5.
- Schwaiger, M. und Peschel, C. Biological imaging for selecting and monitoring cancer therapy; a pathway to individualised therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33 (2006) 1–5.
- Schwaiger, M. und Wester, H.-J. How Many PET Tracers Do We Need? *J Nucl Med* 52 Suppl 2 (2011) 36S-41S.
- Seam, P., Juweid, M. E. und Cheson, B. D. The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood* 110 (2007) 3507–3516.
- Shakirin, G., Braess, H., Fiedler, F., Kunath, D., Laube, K., Parodi, K., Priegnitz, M. und Enghardt, W. Implementation and workflow for PET monitoring of therapeutic ion irradiation: a comparison of in-beam, in-room, and off-line techniques. *Phys Med Biol* 56 (2011) 1281–1298.
- Sharma, S., Paiphansiri, U., Hombach, V., Mailander, V., Zimmermann, O., Landfester, K. und Rasche, V. Characterization of MRI contrast agent-loaded polymeric nanocapsules as versatile vehicle for targeted imaging. *Contrast Media Mol Imaging* 5 (2010) 59–69.
- Sherley, J. L. und Kelly, T. J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 263 (1988) 8350–8358.
- Shields, A. F., Grierson, J. R., Dohmen, B. M., Machulla, H. J., Stayanoff, J. C., Lawhorn-Crews, J. M., Obradovich, J. E., Muzik, O. und Mangner, T. J. Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat. Med* 4 (1998) 1334–1336.
- Shields, A. Positron emission tomography measurement of tumor metabolism and growth: its expanding role in oncology. *Mol Imaging Biol* 8 (2006) 141–150.
- Siebert, J. M., Baumann, D., Zeller, A., Mailänder, V. und Landfester, K. Synthesis of Polyester Nanoparticles in Miniemulsion Obtained by Radical Ring-Opening of BMDO and Their Potential as Biodegradable Drug Carriers. *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 165–175.
- Smith, P. J., Rackstraw, C. und Cotter, F. DNA fragmentation as a consequence of cell cycle traverse in doxorubicin- and idarubicin-treated human lymphoma cells. *Ann. Hematol* 69 Suppl 1 (1994) S7-11.
- Spaepen, K., Stroobants, S., Dupont, P., van Steenweghen, S., Thomas, J., Vandenberghe, P., Vanuytsel, L., Bormans, G., Balzarini, J., Wolf-Peeters, C. de, Mortelmans, L. und Verhoef, G. Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ([18F]FDG) after first-line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: is [18F]FDG-PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? *J. Clin. Oncol* 19 (2001) 414–419.
- Sundseth, R., Joyner, S. S., Moore, J. T., Dornsife, R. E. und Dev, I. K. The anti-human immunodeficiency virus agent 3'-fluorothymidine induces DNA damage and apoptosis in human lymphoblastoid cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (1996) 331–335.

- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J. und Vardiman, J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2008.
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329 (1993) 987–994.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49 (1982) 2112–2135.
- Torizuka, T., Zasadny, K. R., Recker, B. und Wahl, R. L. Untreated primary lung and breast cancers: correlation between F-18 FDG kinetic rate constants and findings of in vitro studies. *Radiology* 207 (1998) 767–774.
- Troost, E., Vogel, W., Merx, M., Slootweg, P., Marres, H., Peeters, W., Bussink, J., van, d., Oyen, W. und Kaanders, J. 18F-FLT PET does not discriminate between reactive and metastatic lymph nodes in primary head and neck cancer patients. *J Nucl Med* 48 (2007) 726–735.
- Vesselle, H., Grierson, J., Muzi, M., Pugsley, J. M., Schmidt, R. A., Rabinowitz, P., Peterson, L. M., Vallières, E. und Wood, D. E. In vivo validation of 3'-deoxy-3'-[(18F)]fluorothymidine ([18F]FLT) as a proliferation imaging tracer in humans: correlation of [18F]FLT uptake by positron emission tomography with Ki-67 immunohistochemistry and flow cytometry in human lung tumors. *Clin. Cancer Res* 8 (2002) 3315–3323.
- Wagner, M., Seitz, U., Buck, A., Neumaier, B., Schultheiss, S., Bangerter, M., Bommer, M., Leithäuser, F., Wawra, E., Munzert, G. und 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* 63 (2003) 2681–2687.
- Walsh, S., Thorselius, M., Johnson, A., Söderberg, O., Jerkeman, M., Björck, E., Eriksson, I., Thunberg, U., Landgren, O., Ehinger, M., Löfvenberg, E., Wallman, K., Enblad, G., Sander, B., Porwit-MacDonald, A., Dictor, M., Olofsson, T., Sundström, C., Roos, G., Rosenquist, R. Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 101 (2003) 4047.
- Weber, W. A., Ott, K., Becker, K., Dittler, H. J., Helmberger, H., Avril, N. E., Meisetschlager, G., Busch, R., Siewert, J. R., Schwaiger, M. und Fink, U. Prediction of response to preoperative chemotherapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging. *J Clin Oncol* 19 (2001) 3058–3065.
- Weber, W. A., Ziegler, S. I., Thodtman, R., Hanauske, A. R. und Schwaiger, M. Reproducibility of metabolic measurements in malignant tumors using FDG PET. *J Nucl Med* 40 (1999) 1771–1777.
- Weinberg, R. A. *The biology of cancer*. Garland Science, New York, 2007.
- Wieder, H. A., Brücher, B. L., Zimmermann, F., Becker, K., Lordick, F., Beer, A., Schwaiger, M., Fink, U., Siewert, J. R., Stein, H. J. und Weber, W. A. Time Course of Tumor Metabolic Activity During Chemoradiotherapy of Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Response to Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 22 (2004) 900–908.
- Wieder, H. A., Geinitz, H., Rosenberg, R., Lordick, F., Becker, K., Stahl, A., Rummeny, E., Siewert, J. R., Schwaiger, M. und Stollfuss, J. PET imaging with [18F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine for prediction of response to neoadjuvant treatment in patients with rectal cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34 (2007) 878–883.
- Williams, M., Connors, J., Dreyling, M., Gascoyne, R., Kahl, B., Leonard, J., Press, O. und Wilson, W. Mantle cell lymphoma: report of the 2010 Mantle Cell Lymphoma Consortium Workshop. *Leuk Lymphoma* 52 (2011) 24–33.
- Wolf, B., Brischwein, M., Lob, V., Ressler, J. und Wiest, J. Cellular signaling: aspects for tumor diagnosis and therapy. *Biomed Tech (Berl)* 52 (2007) 164–168.
- Yang, Y.-J., Ryu, J.-S., Kim, S.-Y., Oh, S. J., Im, K. C., Lee, H., Lee, S.-W., Cho, K. J., Cheon, G.-J. und Moon, D. H. Use of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine PET to monitor early responses to radiation therapy in murine SCCVII tumors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33 (2006) 412–419.

Zhou, M., Gu, L., Li, F., Zhu, Y., Woods, W. G. und Findley, H. W. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 303 (2002) 124–131.

## 7 Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Native SU-DHL-4-Zellen unter dem Mikroskop in einer 200fachen Vergrößerung (Objektiv x Okular) in einer Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml.....	22
Abb. 2: Native SU-DHL-4-Zellen unter dem Mikroskop in einer 100fachen Vergrößerung (Objektiv x Okular) in einer Konzentration von $1,4 \times 10^6$ Zellen pro ml.....	23
Abb. 3: Schematische Darstellung der MTT-Versuchsanordnung auf einer 96er Wellplatte .....	25
Abb. 4: Untersuchungssituation mit dem Inveon™ Animal-PET-Scanner bei einer SCID-Maus .....	33
Abb. 5 (A): Extinktionsmessung des MTT Assay 24h nach Chemotherapie mit Nachweis stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration .....	41
Abb. 5 (B): Prozentualer Anteil stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration im MTT Assay 24h nach Chemotherapie .....	41
Abb. 6 (A): Extinktionsmessung des MTT Assay 48h nach Chemotherapie mit Nachweis stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration .....	42
Abb. 6 (B): Prozentualer Anteil stoffwechselaktiver Zellen abhängig von der Doxorubicinkonzentration im MTT Assay 48h nach Chemotherapie .....	42
Abb. 7 (A): Viabilität der Lymphomzellen in Abhängigkeit der Doxorubicinkonzentrationen unter Angabe der Zellzahl 24h (blaue Säulen) und 48h (lila Säulen) nach Chemotherapie.....	44
Abb. 7 (B): Viabilität der Lymphomzellen in Abhängigkeit der Doxorubicinkonzentrationen mit Prozentangabe im Vergleich zur Kontrolle 24 (blaue Säulen) und 48h (lila Säulen) nach Chemotherapie.....	44
Abb. 8 (A): [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake 24 und 48h nach Doxorubicintherapie mit cpm-Werten abzüglich des Leerwertes abhängig von den Konzentrationen 0 bis 400 ng/ml....	45
Abb. 8 (B): [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake 24 und 48h nach Doxorubicintherapie mit cpm-Werten abzüglich des Leerwertes in Prozentangabe in Beziehung zu unbehandelten Kontrollzellen als 100%, in Abhängigkeit von den Konzentrationen 0 bis 400 ng/ml.....	46
Abb. 9 (A): [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Traceraufnahme gemessen in cpm abzüglich Leerwert (Medium+FLT), abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen 0 bis 400 ng/ml, 24h (hellblau) und 48h (dunkelblau) nach Chemotherapie.....	47
Abb. 9 (B): [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-Traceraufnahme gemessen in cpm abzüglich Leerwert (LW) in Prozentangabe in Bezug zur Kontrolle, abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen 0 bis 400 ng/ml, 24h (hellblau) und 48h (dunkelblau) nach Chemotherapie.....	47
Abb. 10: Effekte auf den Zellzyklus unter steigenden Doxorubicinkonzentrationen, 48h nach Chemotherapie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.....	48
Abb. 11: Zellzyklusanalyse mittels FACS 48h nach Chemotherapie: Prozentualer Anteil jeder einzelnen Zellzyklusphase am Gesamtzyklus, Vergleich der Kontrollzellen zu den aufsteigenden Doxorubicinkonzentrationen von 6 bis 400 ng/ml.....	49
Abb. 12: Tumorwachstum in Prozent, bezogen auf Therapiebeginn (Tag 0), dargestellt sind die einzelnen Doxorubicinkonzentrationen im Verlauf von Tag 0 bis Tag 9...	50

Abb. 13 (A): Tumorwachstum in den verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen in Prozent bezogen auf Tag 0 (Therapiebeginn) mit Kontrollgruppe, gemessen an Tag 2 und 9 nach Therapie .....	51
Abb. 13 (B): Tumorwachstum in den verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen in Prozent bezogen auf Tag 0 (Therapiebeginn) ohne Kontrollgruppe, gemessen an Tag 2 und 9 nach Therapie .....	51
Abb. 14: Therapieschema des Tiermodells.....	52
Abb. 15: [ <sup>18</sup> F]FLT-PET-Scans (obere Reihe): 1. vor (pre-Tx) und nach Therapie mit 50µg Doxorubicin, sowie 2. vor (pre-Tx) und nach Therapie mit 200µg Doxorubicin im Vergleich zu [ <sup>18</sup> F]FDG-PET-Scans (untere Reihe) mit gleicher Vorgehensweise wie bei [ <sup>18</sup> F]FLT.....	53
Abb. 16: Prozentuale Angabe der TBR-Medianwerte des [ <sup>18</sup> F]FLT-PET, nach Chemotherapie, abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen inklusive Kontrolle immer in Bezug zu den Werten vor Therapie (pre-Tx) .....	54
Abb. 17: Prozentuale Angabe der TBR-Medianwerte des [ <sup>18</sup> F]FDG-PET, nach Chemotherapie, abhängig von den Doxorubicinkonzentrationen inklusive Kontrolle immer in Bezug zu den Werten vor Therapie (pre-Tx) .....	55
Abb. 18: Biodistribution von Tumor, Herz, Leber, Niere und Gehirn: TMR-Medianwerte, gemessen ca. 120 Min. nach Tracerinjektion von [ <sup>18</sup> F]FDG .....	56
Abb. 19: Biodistribution von ausgewählten Organen: TMR-Medianwerte, gemessen ca. 120 Min.nach Tracerinjektion von [ <sup>18</sup> F]FLT.....	56
Abb. 20: Histologie und Immunhistochemie der Tumore mit HE, Caspase 3 und Ki-67....	58
Abb. 21: Molekulare Bildgebung: coronarer FLT-PET-Scan von Patient 4 mit klassischem MCL; transversaler FLT-PET-Scan in der Halsregion, CT-Scan ebenda, Fusionsbild FLT-PET-Scan mit den zwei Anreicherungen .....	60
Abb. 22: Frühe Therapie-Prädiktion mit FLT-PET. Aufnahmen von Patient 5 vor Therapie und am Tag 7 nach Beginn der Chemotherapie. CT-Aufnahmen, PET-Scans, PET-CT-Scans: pre-treatment: Starke Anreicherung in der Halsregion, in beiden Axillae, linke Nierengegend und in der Leber. Tag 7 post-treatment: Abnahme der Anreicherung in der Halsregion, den Axillae und in der linken Nierengegend .....	62
Abb. 23: Schokomaus.....	98

## Tabellen:

<b>Tab. 1a:</b> Aktuelle WHO-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome, reife (periphere) B-Zell-Neoplasien, modifiziert nach Hummel und Hellmich 2008, Prozentzahlen aus Jhanwar 2006, S.1327 .....	7
<b>Tab. 1b:</b> Klinische Einteilung der häufigeren B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, adaptiert nach The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project (1982), S.2112–2135, Hummel und Hellmich (2008) und nach Jhanwar (2006),S.1327...7	7
<b>Tab. 2:</b> Ann Arbor Klassifikation der Hodgkin-Lymphome, modifiziert nach Cotswold, auch angewandt auf die Non-Hodgkin-Lymphome, adaptiert nach Carbone et al.(1971),S.1860-1861 und Lister et al.(1989),S.1630-1636.....	8
<b>Tab. 3:</b> Patientencharakteristika (n=8): Geschlecht, Alter, Ann-Arbor-Stadium, Histologie, Therapie, Ki-67-Index in %, MIPI-Ki-67-Score, [ <sup>18</sup> F]FLT-SUVmax mit Angabe des Mittelwerts (MW), Standardabweichung (SD) und Wertebereich (WB).....	59

## 8 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich dafür bedanken, dass ich meine Promotionsarbeit an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Schwaiger durchführen durfte.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Buck, der stets das große Ganze im Auge behielt, für die Überlassung des Promotionsthemas und die gute Betreuung und Beratung während der Bearbeitungszeit.

Herrn Dr. Nicolas Graf danke ich für die Betreuung und ausführliche Beantwortung aller praktischen Fragen, insbesondere die Zellkultur betreffend.

Herrn Dr. Ken Herrmann und Herrn PD Dr. Tobias Dechow danke ich für die intensiven Gespräche und immer neuen Impulse innerhalb unserer Arbeitsgruppe.

Ebenfalls danke ich Zhoulei Li, Anette Frank, Frau Prof. Dr. med. Dr. phil. Reingard Senekowitsch-Schmidtke, Anja Baumgart und allen anderen Mitarbeitern des nuklearmedizinischen Labors und in den Laboren in der Trogerstraße, sowie in der Schneckenburgerstraße für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ich danke Frau Sybille Reder und Frau Elisabeth Aiwanger für die Hilfe bei den Mäuse-PET-Messungen.

Für Hilfestellung rund um die Promotionsarbeit danke ich Herrn Dr. Kremer, Frau Dr. Neff und Herrn Dr. Tibor Schuster.

Allen Teilnehmern der klinischen Studie danke ich für ihr freiwilliges Engagement.

Herrn Dr. Jürgen den Hollander, der den Kontakt zum Doktorvater herstellte, danke ich für die wertvollen Tipps für einen guten Start in die Arbeit.

Meiner Freundin Barbara Numberger danke ich für unermüdlich gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich fortwährend in der Entstehungszeit der Promotion ermuntert und unterstützt haben. Jedoch konnte mein Vater leider die Fertigstellung der Arbeit nicht mehr miterleben.

Ich danke meinen Freunden, die mich in schwierigen Zeiten unterstützt und auf andere Gedanken gebracht haben.

**Abb. 23:** Schokomaus



Auf zu neuen Ufern!

