

Aus dem Universitätsklinikum Münster
European Institute for Molecular Imaging
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfers

**Dynamische ^{18}F - Fluorid Kleintier Positronen-
Emissions-Tomographie**

—

**Eine neue Methode zur nicht-invasiven Bestimmung
der Nierenfunktion bei Mäusen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Galla, Frederick
aus Darmstadt
2011

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfers

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Schlatter

3. Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2011

Aus der Universität Münster
European Institute for Molecular Imaging
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfers
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfers
Koreferent: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Schlatter

Zusammenfassung

Dynamische ^{18}F - Fluorid Kleintier Positronen-Emissions-Tomographie
Eine neue Methode zur nicht-invasiven Bestimmung der Nierenfunktion bei Mäusen
Frederick Galla

Ziel dieser Arbeit war es, eine neue nicht-invasive Methode zur Quantifizierung der Nierenfunktion von Mäusen mittels ^{18}F -Fluorid-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zu etablieren. Die ^{18}F -Fluorid-Clearance wurde auf Basis eines dynamischen Ganzkörper- PET- Scans von 60 Minuten Dauer bestimmt. Einer i.v. Injektion von 5 MBq ^{18}F - Fluorid folgte eine erste 60-minütige Akquisition. Um die notwendigen anatomischen Informationen zu erhalten und somit die Bildauswertung zu optimieren, erfolgte anschließend eine Injektion von 3 MBq ^{18}F - FDG (^{18}F -Fluor-Desoxy-Glukose), sowie eine erneute Akquisition von 20 Minuten Dauer. Die „volumes of interest“ (VOIs) wurden im Lumen des linken Herzventrikels, um das Nierenparenchym und um die Blase platziert. Aus den gewonnenen Aktivitätsverteilungen konnten entsprechende Zeit-Aktivitäts-Kurven („time-activity-curves“, TACs) erstellt werden. Die ^{18}F - Clearance wurde als Quotient aus der renal ausgeschiedenen Aktivität (Blasen VOI) und dem Integral der Blutaktivität des linken Ventrikellumens bestimmt. Als Referenzmethode diente die tubuläre Exkretionsrate von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyltriglycerin (TER-MAG3). Zusätzlich wurde die entsprechende seitengetrennte Nierenfunktion der Mäuse kalkuliert. Um die ^{18}F - Fluorid-Clearance quantitativ zu variieren wurden einige Mäuse vor der Datenakquisition mit dem nephrotoxischen Zytostatikum Cisplatin behandelt. Die gewonnen Daten aus der ^{18}F -Fluorid-PET zeigen eine gute Korrelation mit der bereits etablierten Methode der TER-MAG3. Damit ist es jetzt erstmals möglich, die Nierenfunktion bei Mäusen nicht-invasiv zu bestimmen. Das hier entwickelte Verfahren reduziert deutlich verschiedenste, bei invasivem Vorgehen aber nicht zu vermeidende Fehlerquellen und trägt zusätzlich zu einer maßgeblichen Schonung der Versuchstiere bei.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2011

Aktenzeichen tierexperimentelle Arbeit: 9.93.2.10.36.07.253

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	7
1.1 Verfahren zur Nierenfunktionsdiagnostik	8
1.1.1 Laborchemische Verfahren zur Nierenfunktionsdiagnostik ...	8
1.1.2. Nuklearmedizinische Verfahren zur Nierenfunktions- Diagnostik	12
1.1.3 Herausforderungen/Besonderheiten der Nierenfunktions- diagnostik in der präklinischen Forschung	15
1.2 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Materialien, Tiere und Methoden	18
2.1 Versuchstiere	18
2.2 Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie	19
2.2.1 Fluoridproduktion	19
2.2.2 Funktion der Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	20
2.3 Fluoridinjektion und Akquisition	24
2.4 Auswertung der PET-Bilder und quantitative Bewertung	25
2.5 Berechnung der Fluoridclearance	26
2.6 Bestimmung der Referenzparameter durch die tubuläre Exkretionsrate für Mercaptoacetyltriglycin (TER-MAG3)	28
2.7 Statistische Auswertung	29

3. Ergebnisse	29
3.1 Ergebnisse allgemein	29
3.2 Ergebnisse der einzelnen Tiergruppen und Versuchsreihen	38
4. Diskussion und Schlussfolgerung	45
5. Zusammenfassung	50
6. Literatur	51
7. Danksagung	54
8. Curriculum Vitae	56

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Prävalenz von chronischen Nierenerkrankungen zeigt in den letzten Jahren eine stetige Zunahme. Mit steigendem Lebensalter nimmt die Anzahl der erkrankten Patienten deutlich zu und die Verteilung innerhalb der Stadien der chronischen Niereninsuffizienz konzentriert sich auf höhergradige Nierenfunktionsstörungen (1).

Der überwiegende Anteil aller Nierenerkrankungen geht mit einer Einschränkung der Nierenfunktion einher. Beim Menschen kann die Nierenfunktion durch verschiedene Methoden quantifiziert werden. Weit verbreitet sind dabei die Bestimmung von Blut- und Urinparametern, wie z.B. die Bestimmung des Serum-Creatinins, ein körpereigenes, harnpflichtiges Stoffwechselprodukt oder der renalen Creatinin-Clearance (2). Die renale Clearance bezeichnet die Clearance durch die Nieren, d. h. die Entfernung einer Substanz aus dem Blut als spezifische Leistung der Nieren.

Diese klinisch etablierten Methoden sind in der biomedizinischen Grundlagen- und präklinischen Forschung jedoch nur eingeschränkt auf Kleintiere, wie Ratten und Mäuse, übertragbar, die typischerweise in Versuchen genutzt werden, um menschliche Erkrankungen zu imitieren. Blut- und Urinproben, die für die Bestimmung der Nierenfunktion mit klinisch etablierten laborchemischen Methoden benötigt werden, können jedoch insbesondere bei Mäusen nur schwierig gewonnen werden. Zudem bergen die sehr geringen Volumina eine mögliche Fehlerquelle bei der Bestimmung der renalen Funktion, da die Kollektion von Blut- und Urinproben insbesondere bei Mäusen sehr aufwendig ist und es auch auf Grund von sehr geringen Volumina zu möglichen Fehlerquellen bei der Bestimmung der renalen Funktion kommt. Mäuse haben bei einem mittleren Körpergewicht von 30g lediglich ein Blutvolumen von ca. 2,4-2,8 ml (3). Auch wenn einige analytische Methoden diese geringen Stoffmengen quantifizieren können, sind repetitive Messungen mit Entnahme einer Blutprobe nicht möglich, da die Blutvolumina für wiederholte Abnahmen nicht ausreichend sind.

Im Bereich der präklinischen Diagnostik bei Ratten und in noch höherem Maße bei Mäusen ist daher die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Nierenfunktion, die nicht auf Blut- und Urinproben angewiesen ist, wünschenswert. Diese Voraussetzungen erfüllen im Prinzip rein bildbasierte Verfahren zur Messung der

renalen Funktion, da sie im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren eine einfache, schnelle und vor allem nicht-invasive Methode darstellen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine ausschließlich auf Grundlage der Bildgebung basierende Methode zu etablieren und zu validieren, die es ermöglicht, die absolute und seitengetrennte Nierenfunktion bei Mäusen zu quantifizieren. Somit wurde in dieser experimentellen Arbeit mit Hilfe der ^{18}F -Fluorid- PET eine neue, nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Nierenfunktion an Mäusen etabliert.

1.1 Verfahren zur Nierenfunktionsdiagnostik

1.1.1 Laborchemische Verfahren zur Nierenfunktionsdiagnostik

Die laborchemische Nierenfunktionsdiagnostik stellt im klinischen Alltag eine zentrale und aussagekräftige Methode dar, um renale Dysfunktionen und die dazu führenden Pathomechanismen genauer erkennen und behandeln zu können. Um eine quantitative Abschätzung der Nierenfunktion geben zu können, spielt die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) als wichtiger und gebräuchlicher Parameter eine große Rolle. Die GFR kann als zentraler Funktionswert des glomerulären Filterapparates angesehen werden, der über viele renale Mechanismen eine Aussage erlaubt. Hierbei stehen der Elektrolyt- und Salzhaushalt, die Aktivierung von Vitamin D und die Synthese weiterer Hormone (Erythropoetin, Aldosteron), sowie die systemische Blutdruckregulation im Vordergrund. Oftmals verändern sich diese Funktionen in Analogie zur GFR. So steht ein Absinken der GFR für einen renalen Funktionsausfall, der wiederum mit einer Dysregulation im Elektrolyt- und Hormonhaushalt einhergehen kann.

Die GFR gibt das Gesamtvolumen des Primärharns an, das von der Summe aller Glomeruli beider Nieren in einem bestimmten Zeitintervall produziert wird (4). Der Primärharn stellt ein Ultrafiltrat des Blutplasmas dar, welches durch die Kapillarmembranen des Nephrons abgepresst wird. Durch den tubulären Apparat der Niere wird der Primärharn im Verlauf weiter konzentriert und in seiner Zusammensetzung so verändert, dass letztendlich nur harnpflichtige Substanzen im Urin enthalten sind (Abbildung 1).

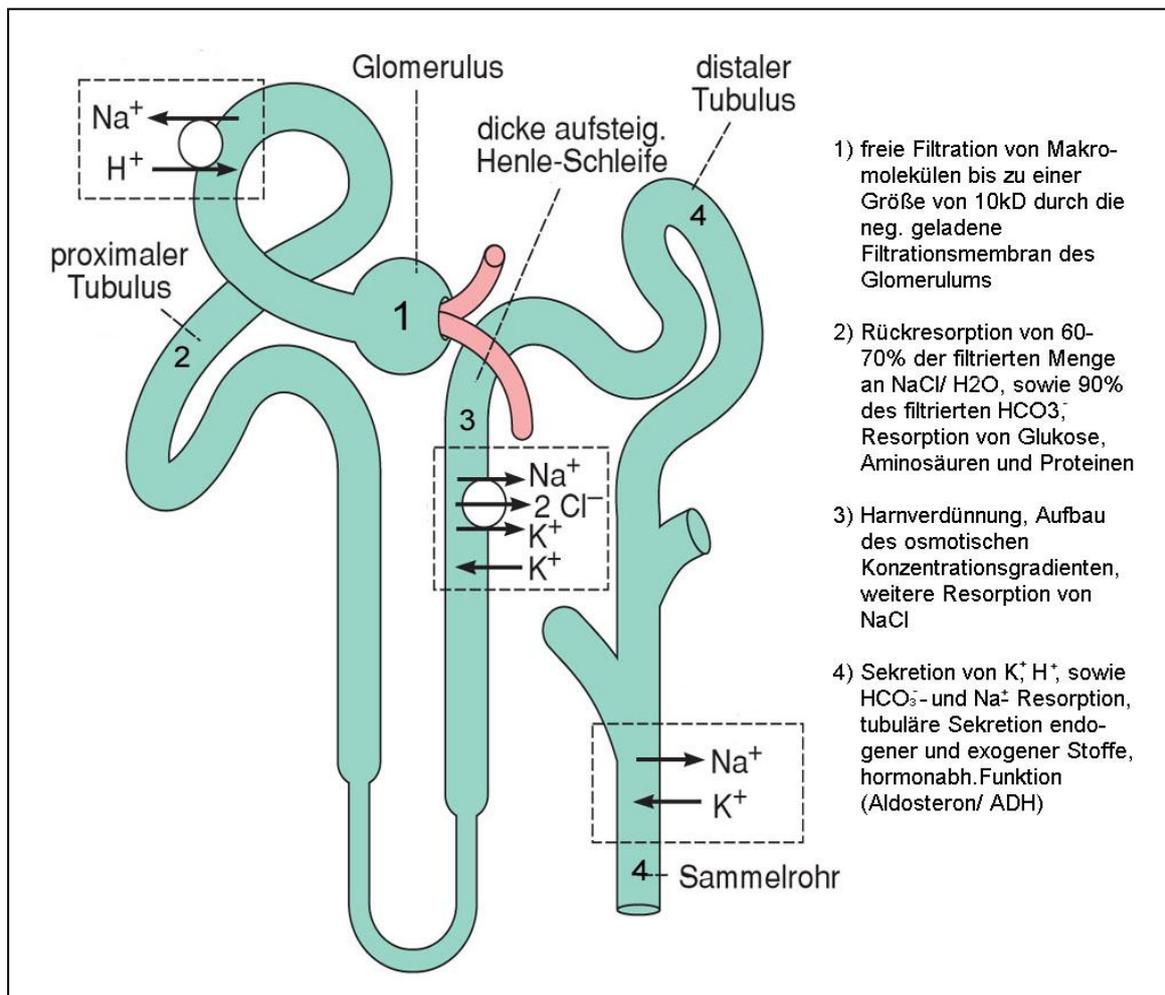


Abbildung 1:

Funktion des Glomerulum und der einzelnen Tubulusabschnitte der Niere. Durch die Rückresorption und Sekretion von Elektrolyten und anderen Substanzen, sowie durch den peritubulären Osmolaritätsanstieg aus dem Primärharn entsteht im Verlauf des Tubulussystems der konzentrierte Urin. (abgeleitet von Deetjen, Speckmann „Physiologie“ 2005)

Es ist möglich die GFR über indirekte, laborchemische Verfahren zu ermitteln. Hierzu werden verschiedene Substanzen im Blut (z.B. Creatinin, Inulin) nachgewiesen und deren Elimination aus dem Plasma durch die Nieren bestimmt (4). Für die Messung der GFR eignen sich alle Substanzen, die glomerulär frei filtriert werden, jedoch nicht

sezerniert, tubulär resorbiert oder renal metabolisiert werden. Auch eine Bindung an Plasmaproteine, die eine Filtration beeinflussen könnte, darf ebenso wenig zu den Charakteristika der Substanz gehören, wie mögliche alternative Wege der Ausscheidung aus dem Organismus (z.B. hepatische Elimination), die durch die entsprechenden Methoden nicht zu erfassen sind. Neben dieser Standardmethode finden sich jedoch auch szintigraphische Möglichkeiten, um die entsprechende Funktion der Nieren zu beurteilen.

In der klinischen Routine wird üblicherweise die Konzentration des Creatinins im Serum bestimmt, um eine Aussage über die Funktion der Niere zu treffen. Creatin wird aus Arginin und Glycin in verschiedenen Syntheseschritten in Niere und Leber produziert. Creatinphosphat, als energiereiche Form des Syntheseprodukts, wird im Zytosol der Muskelzellen aufgrund des hohen Gruppenübertragungspotenzials zu Creatinin dephosphoryliert. Die dabei entstehende Energie wird zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt, welches dem Muskelstoffwechsel unmittelbar zur Verfügung steht. Das Creatinin als zyklisches Amid wird teilweise durch die muskeleigene Creatininkinase rephosphoryliert, zu einem Anteil jedoch auch als Endprodukt glomerulär filtriert und somit renal ausgeschieden. Der Anstieg dieses Serummarkers ist somit sehr spezifisch für eine renale Funktionsstörung, jedoch finden sich hinsichtlich der Sensitivität einige Einschränkungen. Dies hängt damit zusammen, dass viele Nierenerkrankungen in ihren frühen Stadien mit einem vorerst konstanten Wert für die Creatininplasmakonzentration einhergehen. Einen Einfluss der GFR auf die Konzentration des Creatinins im Plasma ist erst ab einer Regression der GFR von 30-50% zu erkennen. Im Intervall unterhalb dieses prozentualen Bereichs finden sich nahezu konstante Werte für die Creatininkonzentration („stummer Bereich“) (5).

Zusätzlich wird die Creatinin-Konzentration im Serum durch viele systemische Parameter beeinflusst, so dass eine bewertende Aussage über die Funktion der Niere immer im Gesamtkontext gesehen werden muss. Als Beispiel dafür dient die Abhängigkeit der Creatinin-Konzentration von der Gesamtmuskelmasse des Körpers, dem Alter, der körperlichen Aktivität und der Nierenperfusion (4). Daher dient die Creatinin-Clearance eher als ein Verlaufsparemeter, da die Ausscheidungsrate stark von individuellen Parametern abhängt.

Deshalb sind Testmöglichkeiten, die von der physiologischen Variabilität des Organismus unabhängig sind, von großer Bedeutung. Eine solche Methode stellt z.B. die Bestimmung der Creatininclearance dar. Sie repräsentiert eine viel präzisere und vor

allem sensitivere Methode zur Nierenfunktionsdiagnostik. Unabhängig von der absoluten Konzentration des Serumcreatinins gibt diese jenes Plasmavolumen an, das pro Zeiteinheit von Creatinin befreit wird.

Der Begriff der Nierenclearance ist allgemein definiert als das Plasmavolumen, das pro Minute von einer Substanz durch die Filtrationseigenschaft der Nieren gereinigt wird. Für die klassische Formel der Clearance ergibt sich:

$$Clearance = \frac{U * V}{P}$$

wobei U die Konzentration der filtrierte Substanz im Urin, V das Urinvolumen pro gemessener Zeiteinheit und P die Plasmakonzentration der Substanz ist.

Creatinin wird wegen seines geringen Molekulargewichtes frei filtrierte. Kommt es jedoch im Plasma zur Akkumulation des Creatinins kann dieses auch zu einem geringen Prozentsatz über die tubulären Epithelzellen sezerniert werden, was die GFR-Bestimmung dahingehend beeinträchtigen kann und so zu einer Überschätzung der GFR führt (4, 6). Die GFR selbst unterliegt physiologischer Weise einer zirkadianen Rhythmik, so dass sie in den Nachtstunden um ca. 30% niedriger ist als am Tage. Zudem steigt die GFR durch proteinreiche Nahrung postprandial deutlich an. Diese Tatsache muss ebenfalls bei der Interpretation der Messwerte berücksichtigt werden.

Ein experimentell ausschlaggebender Faktor, der die Bestimmung der Creatininclearance erschwert, ist die notwendige Urinsammlung über ein 24-Stunden-Intervall. Die Methode zur quantitativen Messung der ausgeschiedenen Creatininmenge wird oft durch eine insuffiziente Sammlung des Urins beeinflusst und birgt daher eine zusätzliche Fehlerquelle in sich (6, 7).

Eine Alternative zur Messung der Creatininclearance ist die klassische Methode der Inulindauerinfusion. Inulin ist ein Polyfructosid mit einem Molekulargewicht von 5500 Dalton, so dass es ähnlich wie Creatinin in der Niere frei filtrierte wird. Jedoch stellt dieser Stoff kein körpereigenes Produkt des Metabolismus dar und muss somit intravenös infundiert werden. Zusätzlich ist die labortechnische Analyse des Inulins im Blut und im Urin sehr aufwändig und ebenfalls abhängig von einer suffizienten Urinsammlung über 24 Stunden. Eine Interferenz mit einem hohen Blutglukosespiegel

ist beschrieben worden (8). Da es Fälle von anaphylaktischen Reaktionen *post infusionem* von Inulin gegeben hat, wird in einigen Ländern die Anwendung dieser Methode völlig abgelehnt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die derzeitigen klinisch etablierten, laborchemischen Methoden die Nierenfunktion in erster Linie über die Dynamik der Plasmacreatininkonzentration bzw. über die Creatininclearance bestimmen. Diese Methoden stellen jedoch aufgrund erforderlicher Blut- und Urinproben invasive Methoden dar.

Demgegenüber sind Verfahren zur Bestimmung der Nierenfunktion, die auf der Verwendung eines Radionukleids zur Messung der renalen Clearance basieren, oftmals nicht-invasive Methoden und somit hinsichtlich der Fehlerquelle aufgrund der Probengewinnung weniger störanfällig.

1.1.2. Nuklearmedizinische Verfahren zur Nierenfunktionsdiagnostik

Beim Menschen hat sich die nuklearmedizinische, bildgebungsbasierte Bestimmung der Nierenfunktion z.B. über die GFR von ^{51}Cr -Ethylendiamintetraessigsäure (^{51}Cr -EDTA) (9), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Technetium Diethylentriaminpentaessigsäure ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA) (10) oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Technetium Mercaptoacetyltriglycerin ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3), als Marker der tubulären Extraktionsrate (TER), mit relativ hoher Genauigkeit und geringer Fehlerquote etabliert. Die mittlerweile nur noch selten durchgeführte statische Nierenzintigraphie zur Darstellung von Lage, Form, Größe oder Anomalien der Nieren, sowie von Speicherdefekten im Parenchym ist über $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Dimercaptobernsteinsäure ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA) möglich, welches tubulär fixiert wird und keiner renalen Ausscheidung unterliegt (Abbildung 2).

Hierbei handelt es sich um Gammastrahler-markierte Substanzen, die mittels Single-Photonen-Emissions-Tomographie (SPECT) gemessen werden. Die Ansätze eignen sich nicht für eine Messung in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), da bei der PET emittierte koinzidente Gammaquantenpaare, die aus dem Positronenzerfall im Gewebe stammen, die Grundlage bilden. In der klinischen Diagnostik mit einfachen Gammadetektoren wird ^{51}Cr -EDTA als Goldstandard für die Clearancemessung beim Menschen angesehen (11-13). Um dem Ziel einer Methode durch ausschließlich

bildgebende Nierendiagnostik näher zu kommen, ist $^{51}\text{Cr-EDTA}$ jedoch nicht geeignet, da es über eine sehr hohe Photonenenergie verfügt (320 keV), die eine Bildgebung nicht zulässt.

Auch $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ besitzt ähnliche Eigenschaften als glomeruläres Filtrat (10). Es findet sich eine große Variabilität in der Qualität der zur Verfügung stehenden Substanzen (14, 15). Einige weisen einen hohen proteingebundenen Teil auf, der dann wiederum für verfälschte Ergebnisse der quantitativen GFR-Messung verantwortlich ist. Eine Unterschätzung der GFR wäre die Konsequenz (12). Andere $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ -Präparate zeigen einen deutlich geringeren Anteil an Protein-gebundener Fraktion im Plasma, so dass sie sich sehr gut zur GFR-Bestimmung eignen (16). Auf Grund dieser Erkenntnis ist es daher notwendig, die aktuelle Proteinbindung des vorliegenden $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ zu bestimmen, um ggf. eine entsprechende Korrektur des Ergebnisses vornehmen zu können. Weiterhin sollte zur exakten Bestimmung der Markierungsqualität des DTPA durch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ eine Chromatographie durchgeführt werden, um den wirklich markiert vorliegenden Anteil der Substanz darstellen zu können. Eine insuffiziente Stabilität der radioaktiven Markierung durch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ stellt eine weitere Fehlerquelle bei Anwendung dieses Tracers dar (15, 17).

Die Nierenfunktion kann neben der Clearance auch über die tubuläre Extraktion verschiedener Substanzen ermittelt werden. Hierbei gilt Para-Aminohippursäure (PAH) als Referenzsubstanz, da diese vollständig in den kortikalen Nephronen sezerniert wird. Durch Markierung dieser Substanz mit ^{123}Iod oder ^{131}Iod kann PAH als bildgebendes Radiopharmakon genutzt werden. Allerdings ist die Anwendung mit hohem Aufwand und vermehrter Strahlenexposition verbunden.

Eine äquivalente Substanz bildet dagegen das Mercapto-actyl-triglycerin (MAG3), welches über die Markierung mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zu einem wertvollen bildgebenden Radiotracer wird. Es wird über denselben Transportmechanismus aus der Tubuluszelle in das Lumen sezerniert wie PAH (18), hat jedoch nur eine 50%-ige Ejektionsfraktion, da ein hoher Teil proteingebunden im Plasma vorliegt. Bei verringerter Nierenfunktion wird ein nicht zu vernachlässigender Anteil hepatisch eliminiert, so dass auch hier eingeschränkte Aussagekraft bestehen kann (19).

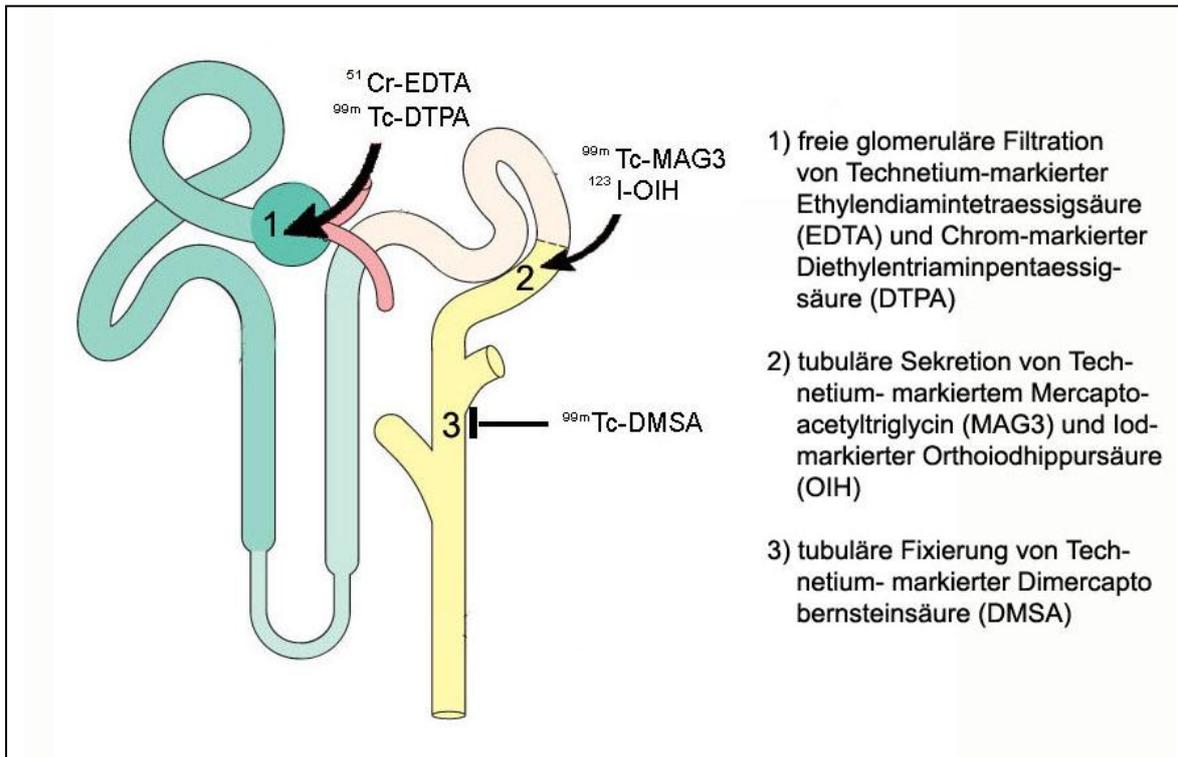


Abbildung 2:

Übersicht über häufig genutzte Radiotracer und ihrer renalen Transportwege in der Nierenszintigraphie. Über die abgebildeten renalen Mechanismen der unterschiedlichen Radiotracer ist es möglich die Nieren in Funktion, Lage und Morphologie zu beurteilen.

Insgesamt bietet die auf Bildgebung basierende nuklearmedizinische Nierendiagnostik zusätzlich den großen Vorteil, dass die seitengetrennte Nierenleistung dargestellt werden kann. Diese getrennte Untersuchung ist zur Aufklärung verschiedenster Pathomechanismen von Nierendysfunktionen von großer Bedeutung und beeinflusst somit ebenfalls die Diagnose und die daraus resultierende Therapieauswahl. Durch diese Eigenschaft kann die Spezifität der Nierenfunktionsdiagnostik deutlich erhöht verbessert. Die TER von MAG3 kann durch eine einzige Blutentnahme nach Applikation des Radiopharmakons und folgender Aktivitätsbestimmung im Serum berechnet werden. Wie viele single-sample-Methoden, bringt auch diese Methode die applizierte Dosis des radioaktiv-markierten Tracers mit der Aktivität des Stoffes im Serum zu einem vorher festgelegten Zeitpunkt nach i.v.- Injektion in Beziehung. Der

Quotient aus Dosis und Serumaktivität kann als ein hypothetisches Verteilungsvolumen des Tracers angesehen werden. Dieses Verhältnis wird dann einer logarithmischen Transformation zugeführt, die letztendlich zu einem Wert für die tubuläre Exkretionsrate führt.

Auf den von der Gammakamera erfassten Bilddaten kann das Nierenparenchym in der frühen Perfusionsphase softwaregesteuert seitengetrent markiert werden. Es entstehen so repräsentative Teilkörperkurven, die die jeweilige Aktivität und damit die Einzelleistung der jeweiligen Niere widerspiegelt. Auf Grund dieser einzelnen Nephrogramme kann die prozentuale Seitenverteilung der Exkretionsrate berechnet werden.

1.1.3 Schwierigkeiten/ Besonderheiten der Nierenfunktionsdiagnostik in der präklinischen Forschung

In der biomedizinischen Forschung werden Kleintiere, wie Ratten und Mäuse, oftmals zur Versuchsdurchführung genutzt, um menschliche Erkrankungen der Nieren zu imitieren. Sowohl enzymatische als auch colorimetrische Methoden zum Nachweis von Creatinin im Plasma, erwiesen sich als wenig sensitiv, um ihre Anwendung bei Mäusen zu etablieren (20). Alternative Methoden wie die Massenspektroskopie und die high-performance liquid chromatography (HPLC) zeigen auch bei geringen Probenvolumina stabile Messdaten, jedoch sind auch diese Methoden invasiv und daher ungeeignet zur Durchführung von Verlaufsstudien, da im Labor das Sammeln von Urin- und Blutproben bei kleinen Nagern oft sehr schwierig ist. Nicht selten resultieren aus der erschwerten Blutabnahme und den geringen Urinvolumina insuffiziente Daten. Zusätzlich zeigt auch das Halten der Mäuse in Stoffwechselfäfigen über eine längere Zeit einen Effekt auf das Verhalten der Tiere, was wiederum die Organfunktion beeinflussen kann (21).

In der Forschung mit Kleintieren wären aus diesen Gründen bildgebende Methoden den klassischen Vorgehensweisen überlegen, da sie ohne die Notwendigkeit von Blut- und Urinproben und somit nicht-invasiv durchgeführt werden können.

Durch die bildgebende Diagnostik besteht aufgrund der fehlenden Invasivität die Möglichkeit, die Tiere in kurzen Abständen individuell erneut zu untersuchen und somit die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Messungen zu minimieren. Eine aufwändige

und kostenintensive Haltung der Tiere in Stoffwechselläufigen ist dabei nicht notwendig. Da bei den o.b. klinisch etablierten, nuklearmedizinischen Methoden, wie bei der Bestimmung der tubulären Extraktionsrate von ^{99m}Tc -MAG-3 zur Bestimmung der Gesamtnierenleistung, in der Regel ebenfalls eine Blutentnahme erforderlich ist, sind auch diese Methoden invasiv und somit für serielle Untersuchungen bei Kleintieren allenfalls eingeschränkt einsetzbar. Zudem erfolgt die Bildgebung, die zur Bestimmung der Seitenanteiligkeits der Nierenfunktion notwendig ist, aufgrund der ^{99m}Tc -Markierung des Tracers an einer Gamma-Kamera, die im Vergleich zu einem Positronen-Emissions-Tomographen eine deutlich schlechtere zeitliche Auflösung hat, die eine übliche dynamische Bildgebung erschwert.

1.2. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine ausschließlich auf Grundlage der Bildgebung basierende Methode zu etablieren und zu validieren, um die absolute und seitengetrennte Nierenfunktion in Mäusen zu quantifizieren.

Ein möglicher Tracer zur Darstellung der Nierenfunktion im Kleintiermodell stellt das Radionuklid ^{18}F -Fluorid dar. Die renale Fluorid-Clearance zeigt eine lineare Abhängigkeit zur GFR (22). Das Fluorid wird frei durch die glomeruläre Membran filtriert und weist eine tubuläre Rückresorption durch Diffusion auf (23, 24). Auf Grund der Analogie zum Creatinin stellt die renale Fluorid-Clearance einen validen Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion dar.

Mithilfe einer dynamischen Messung in einem hoch-auflösenden Kleintier-Ganzkörper-PET wurde nach intravenöser Injektion von ^{18}F -Fluorid über die Bestimmung einer Zeitaktivitätskurve der Blutaktivität und der gesamten renal ausgeschiedenen Fluoridmenge nach einer Stunde sowie über die Generierung der Nieren-Zeitaktivitätskurven sowohl die Gesamtnierenleistung (renale Fluorid-Clearance) als auch die Seitenanteiligkeits der Nieren berechnet werden.

Zur Validierung der Methode wurde die PET-basierte Fluorid-Clearance und die seitengetrennte Nierenfunktion an Mäusen gemessen, die zuvor unterschiedliche Konzentrationen des Zytostatikums Cisplatin appliziert bekommen haben. Cisplatin besitzt eine durch Sauerstoffradikale vermittelte tubulo-toxische Wirkung und beeinflusst so die Clearance verschiedenster Substanzen (25). Der Verlauf der

Messungen beinhaltet neben dem Baseline-Wert vor Applikation des Zytostatikums die renale Clearance 5 und 10 Tage nach der Injektion. Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet, die jeweils unterschiedliche Dosen des Cisplatin appliziert bekamen. Dadurch sollten physiologische und pathophysiologische Zustände nachgestellt und die individuelle nephrotoxische Wirkung des Cisplatin im Verlauf und abhängig von der Applikationsdosis verdeutlicht werden.

Die Ergebnisse wurden mit der klinisch erprobten labortechnischen tubulären Extraktionsrate von MAG3 verglichen. Abbildung 3 zeigt den zeitlichen Ablauf der durchgeführten PET- Messungen.

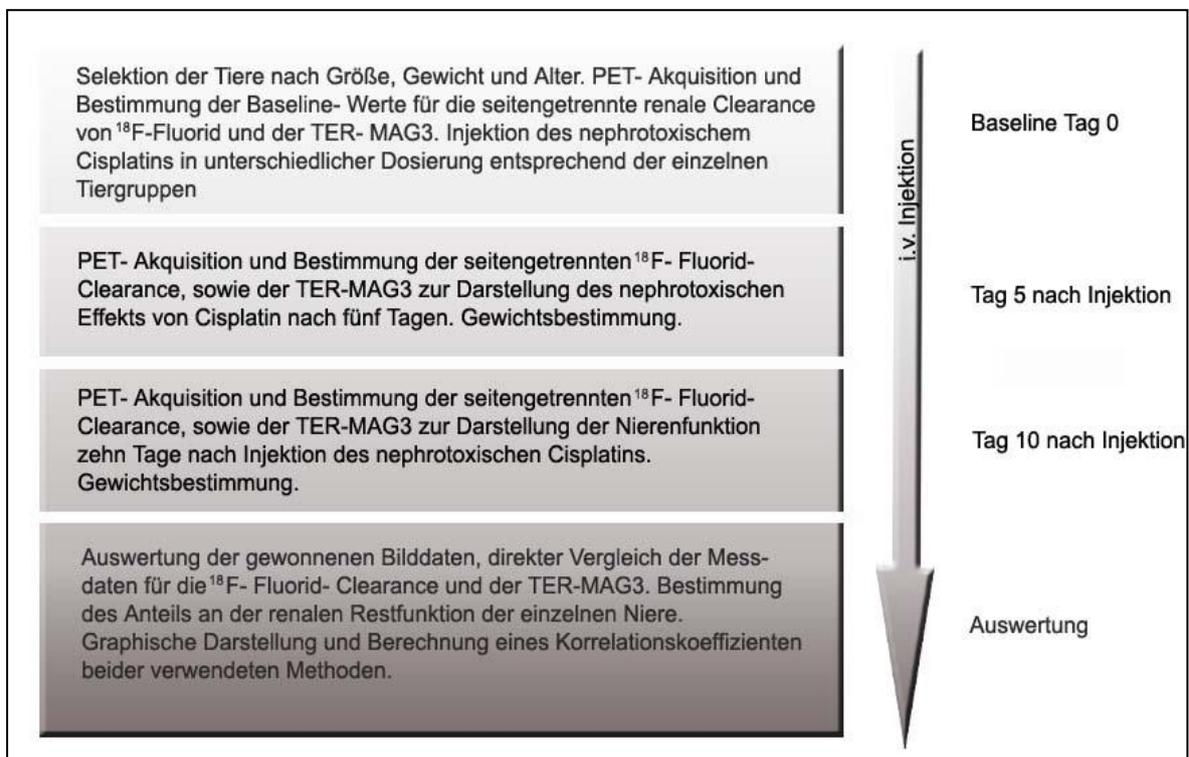


Abbildung 3:

Zeitlicher Ablauf der einzelnen PET- Akquisitionen nach Injektion unterschiedlicher Dosen des nephrotoxischen Pharmakons Cisplatin. Zuvor erfolgte die Bestimmung der Baseline- Werte innerhalb der verschiedenen Tiergruppen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurden 63 männliche FVB Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Germany) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 27.4 ± 1.5 g und einem Alter von 8 ± 1.2 Wochen zur Zeit des PET- Scans für die Versuche verwendet. Die Tiere hatten während der gesamten Projektdauer freien Zugang zu standardisiertem Futter (Ssniff, Soest, Germany) und Leitungswasser aus einem Spender.

Um eine vom physiologischen Zustand abweichende Nierenfunktion mit einem breiten Spektrum der GFR zu erreichen, wurden die Versuchstiere in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt: die einzelnen Gruppen erhielten eine Injektion unterschiedlicher Konzentration des nephrotoxischen Zytostatikums Cisplatin. In den unterschiedlichen Gruppen wurde die dosisabhängige Nephrotoxizität des Cisplatins durch die Clearance des radioaktiven Fluorids gemessen und korreliert.

Folgende Gruppen wurden in den Versuchsprotokollen festgelegt:

1. Korrelation der FCl_{BSA} und der Referenzmethode $TER-MAG_{BSA}$ ($n=24$):

Um die Korrelation der beiden Methoden in einem breiten Bereich der GFR betrachten und auswerten zu können, wurde die FCl_{BSA} und die $TER-MAG_{BSA}$ als vergleichbare Einheit eingeführt. Diese Einheit drückt die jeweilige Nierenfunktion mit konstantem Bezug zur Körperoberfläche (body surface area (BSA)) und damit zum Körpergewicht der Versuchstiere aus. Als Bezugsparameter wurde dafür das mittlere Gewicht einer standardisierten Maus von 25g gewählt. Die FCl_{BSA} und die $TER-MAG_{BSA}$ wurde bei unbehandelten ($n=14$), sowie bei Tieren gemessen, die zuvor eine unterschiedlich hohe Dosis Cisplatin injiziert bekamen ($n=10$). Die PET-Scans wurden dabei als Baseline-Scan, sowie fünf und zehn Tage nach Applikation des Cisplatins durchgeführt.

2. Verlaufskontrolle über zehn Tage von behandelten und unbehandelten Tieren ($n=24$):

Durch die Applikation unterschiedlich hoher Dosen des nephrotoxischen Zytostatikums Cisplatin war es möglich ein variierendes Ausmaß der Nierenschäden im proximalen Tubulus zu verursachen, um somit die Messung der GFR in verschiedenen Bereichen

(10 bis 248 $\mu\text{l}/\text{min}$) und deren Regression innerhalb des Messzeitraumes abbilden zu können (25, 26). Die Konzentrationen des intraperitoneal injizierten Cisplatin betragen 5, 10 und 15 mg/kg Körpergewicht ($n=5$ in jeder Gruppe). Acht weitere Mäuse dienten als unbehandelte Kontrollgruppe. Nach einem Baselinescan zur Ermittlung des physiologischen Zustands der renalen Filterkapazität der einzelnen Versuchstiere folgten die Messungen fünf und zehn Tage nach intraperitonealer Injektion. Während dieses Zeitintervalls wurden die Tiere einzeln in Käfigen gehalten. Die Bestimmung der Nierenfunktion am Tag fünf nach Cisplatin-Injektion diente zusätzlich zur quantitativen Kalkulation der seitengetrennten Nierenleistung und wurde im Folgenden mit der Anteiligkeit an der Gesamt-GFR der einzelnen Niere zum Zeitpunkt des Baseline-Scans verglichen.

3. Reproduzierbarkeit der Methode ($n=16$):

Um die Reproduzierbarkeit der PET-basierten Methode validieren zu können, wurde die FCI_{BSA} von acht unbehandelten Tieren innerhalb von fünf Tagen zweimal bestimmt. Durch den Vergleich dieser Werte an zwei differierenden Zeitpunkten (Tag 0 und 5) sollte die Stabilität der durch die PET gewonnenen Daten ermittelt werden.

2.2 Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

2.2.1 Fluoridproduktion

Sowohl ^{18}F -Fluorid als auch ^{18}F -FDG wurden vor Ort unter Benutzung eines RDS 111 Zyklotron (CTI, Knoxville, TE, USA) nach Wireland et. al (27) produziert.

Das Zyklotron ist ein Teilchenbeschleuniger bei dem die beschleunigten Teilchen durch ein Magnetfeld in eine Kreisbahn gebracht werden. Im Inneren der Kreisbahn befindet sich eine Quelle für negativ geladene Wasserstoffionen, die im Verlauf des Bahnradius durch sog. „gaps“ beschleunigt werden. Hierbei handelt es sich um Beschleunigungsstrecken, die durch ein elektrisches Feld zwischen zwei D-förmigen Elektroden (engl. „dees“) aufgebaut werden. Die anliegende Frequenz der Wechselspannung an diesen „dees“ muss so gewählt werden, dass beim Durchfliegen des Spalts die Elektroden entsprechend gepolt sind, um das Teilchen durch das entstehende elektrische Feld auf seiner Kreisbahn zu beschleunigen (sog. Phasenlage).

Durch die zunehmende Energie der Ionen vergrößert sich der Umlaufradius der Kreisbahn. Bei ausreichender Energie werden die negativ geladenen Wasserstoffionen aus dem Magnetfeld extrahiert und durch eine Graphitfolie („Stripper“) gelenkt. Diese nimmt die beiden Elektronen des Wasserstoffions auf, wodurch dann ein positiv geladenes Proton entsteht.

Diese Protonen treffen auf mit dem Sauerstoffisotop ^{18}O angereichertes H_2^{18}O . Durch die hohe Energie der Protonen (15 MeV) nimmt ein kleiner Teil des ^{18}O ein Proton auf und gibt ein Neutron ab. Durch diesen Austausch entsteht das radioaktive Fluorisotop ^{18}F aus der Reaktion: $p + ^{18}\text{O} \Rightarrow ^{18}\text{F} + n$.

2.2.2 Funktionsprinzip der Kleintier-Positronen-Emissionstomographie (PET)

Die Fluoridclearance wurde im Ganzkörper-Kleintier-PET quadHIDAC (Oxford Positron Systems Ltd, Oxford, UK) (28) bestimmt.

Die PET basiert auf dem physikalischen Phänomen, dass Positronen und Elektronen nebeneinander nicht getrennt existieren können. Diese beiden Teilchen besitzen dieselbe Masse ($m_e = 9,1093897 \cdot 10^{-31}$ kg) und jeweils eine Ladung von $1,602 \cdot 10^{-19}$ Coulomb bei unterschiedlichem Vorzeichen. Treffen ein Positron und ein Elektron aufeinander so rekombinieren diese beiden Teilchen. Die Energie dieser beiden Teilchen muss bei ihrer Fusion erhalten bleiben. Es entstehen zwei Gammateilchen, die jeweils mit der Energie von $E = 0,511$ MeV abgestrahlt werden. Die Abstrahlungsrichtung der beiden entstehenden Gammateilchen ist dabei nicht willkürlich. Beide Teilchen entfernen sich mit Lichtgeschwindigkeit diametral in einem Winkel von 180° voneinander. Diese Eigenschaft der Vernichtungsstrahlung macht sich die Bildgebung bei der PET zu nutzen.

Die beim Zerfall eines Elektron-Positron-Paares emittierten Gammateilchen werden von einem Ringdetektor erkannt. Ein entstehendes Gamma paar erregt dabei die jeweils gegenüberliegenden Detektoren auf dem Ring. Über eine Koinzidenzschaltung ist das Erkennen der Gleichzeitigkeit des Ereignisses möglich. Die Verteilung des Radionukleids im Versuchstier, sowie eine Serie von Schnittbildern kann letztendlich auf Grund des zeitlichen und räumlichen Auftretens der detektierten Zerfallsereignisse errechnet werden. Die Energie der nachzuweisenden Vernichtungsstrahlung ist mit diskret 511 keV im Kristall- PET durch eine Kombination aus Szintillationskristall und

Photomultiplier möglich. Das Detektormaterial besteht dabei aus einem Bismutgermanat (BGO- Kristall) oder Lutetiumyttriumoxoorthosilicat (LSO- Kristall) (Abbildung 4).

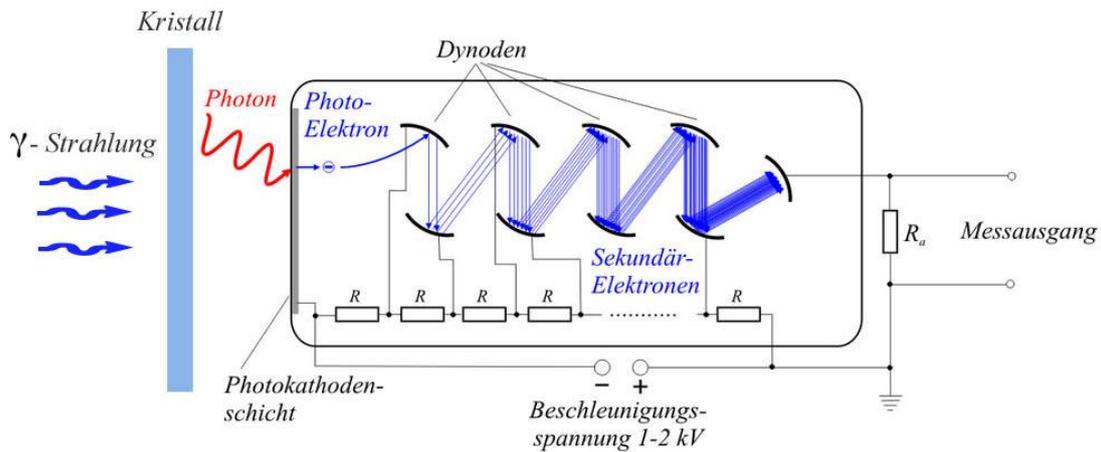


Abbildung 4:

Die vom Kristall aufgenommene Energie der diamitral ausstrahlenden Gammateilchen wird in Form eines Lichtsignals als Photon an die lichtensitive Schicht eines Sekundärelektronenverstärkers abgegeben. Diese Photokathode emittiert daraufhin Elektronen. Die freiwerdenden Photoelektronen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und erhalten so die Potenz aus einer Dynode weitere Sekundärelektronen auszulösen. Durch diese Verstärkung des ursprünglichen Signals mit einem Faktor von 10^5 bis 10^6 ist die Transformation des einfallenden Lichtes durch den Kristall in ein elektrisches Abbild am Messausgang möglich. Das elektrische Signal ist dabei proportional zur Energie des absorbierten Lichtes (Grafik abgeleitet von Wikipedia.de, Photomultiplier, Autor: J. Krieger)

Das HIDAC (High Density Avalanche Chamber) PET verwendet zur Detektion der γ -Quanten aus der Positronen- Annihilation eine Driftkammer (multiwire proportional chambers) ähnlich eines Geiger- Mueller- Zählrohrs. Das einfallende γ -Quant interagiert mit dem Material eines Konverters und es resultieren Elektronen, die durch Öffnungen des Detektors beschleunigt werden und so weitere Elektronen eines Gases hoher Dichte ionisieren und zahlreiche freie Elektronen entstehen lassen.

Zur Erhöhung der Sensitivität besteht ein Detektorkopf aus sechs aufeinander gestapelten 250 x 210 mm² große Driftkammern.

Senkrecht zueinander verlaufende Kathodendrähte innerhalb der Kammern liefern die x/y-Koordinaten, während durch die geschichteten Ionisationskammern eine Wechselwirkungstiefe bestimmt werden kann. Somit kann auch bei diesem Prinzip der PET das einfallende Signal in ein verstärktes elektrisches und ortskodiertes Signal transformiert werden (Abbildung 5).

Der Scanner bildet sich aus zwei gegenüberliegende, rotierende Detektoren und ermöglichen ein Gesichtsfeld (FOV = field of view) von 28cm axial und 17cm im Durchmesser. Die räumliche Auflösung des Kleintier-PETs liegt mit ca. 0,7 mm konstant über das gesamte FOV im Submillimeterbereich (28).

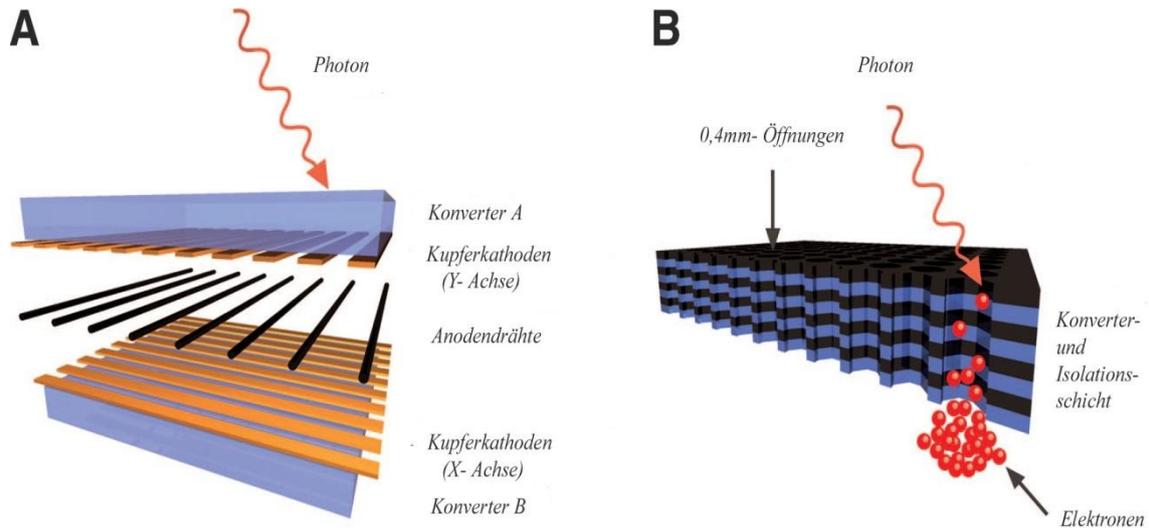


Abbildung 5:

Aufbau eines Detektors des quadHIDAC- PET. (A) Ein eintreffendes Photon wird in ein Elektron umgewandelt und in Richtung der Anodendrähte beschleunigt. (B) Jeder Konverter enthält isolierte Schichten mit eingearbeiteten Öffnungen in hoher Dichte. Das Photon interagiert mit dem Konvertermaterial und führt über die Ionisation eines Gases zu freien Elektronen, die im Verlauf des elektrischen Feldes beschleunigt werden. Die Ortskodierung der eintreffenden Photonen wird durch Kupferelektroden in x-/y-Anordnung und die Schichtung in der z- Achse der einzelnen Ionisationskammern ermöglicht. (aus Schafers KP, Performance evaluation of the 32-module quadHIDAC small-animal PET scanner. J Nucl. Med. 2005 Jun;46(6):996-1004)

2.3 Fluoridinjektion und Akquisition

Die renale Elimination des i.v. applizierten ^{18}F -Fluorids wurde aus den Daten eines dynamischen Ganzkörper-PET-Scans von 60 Minuten errechnet. Die applizierte intravenöse Dosis des ^{18}F -Fluorid betrug 5 MBq bei einem Injektionsvolumen von 100 μl . Die Injektion erfolgte über einen fixierten Schwanzvenenkatheter. Nach Injektion des Radiotracers wurde der Katheter mit 200 μl physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Injektion erfolgte über eine Applikatorpumpe, um exakte Volumina und standardisierte Infusionsraten (3000 $\mu\text{l}/\text{min}$) voraussetzen zu können.

Zur genauen Bestimmung der den Testtieren applizierten Aktivität, wurde die Differenz der Aktivität in der Injektionsspritze vor und nach Injektion des Tracers errechnet.

15 Minuten vor Injektion des Fluorids wurden die Tiere mit 200 μl physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) intravenös hydriert. Diese Hydrierung diente dazu, den individuellen Wasserhaushalt der Tiere zu normieren und eine entsprechende Filtrationsleistung der Niere zu erreichen, um spätere Messwerte vergleichen zu können. Während der Akquisition wurden die Mäuse mit einer O_2 /Isofluran-Gasinhaleation (1,25% Isofluran bei 0,3 l/min O_2) narkotisiert. Sowohl bei der Injektion, als auch während der Akquisition unter Narkose wurde die Körpertemperatur der Tiere über eine Wärmeplatte auf physiologischem Niveau gehalten.

Während des Scans wurden in regelmäßigen Abständen die Atemfrequenzen der narkotisierten Tiere erfasst, um die Narkosetiefe der Tiere durch Isofluraninhalation quantifizieren zu können (durchschnittliche Frequenz ca. 80-100 Atemzüge/Min), da diese Einfluss auf die Funktion der Niere haben kann (29).

Der dynamische Fluorid-PET-Datensatz wurde aus einem Listmode-Stream in 54 Zeitfenstern dreidimensional ((1*30 s, 15*2 s, 10*6 s, 12*10 s, 3*20 s, 3*100 s, 10*300 s) in einer Pixelgröße von $0.4*0.4*0.4 \text{ mm}^3$ rekonstruiert.

Zusätzlich zu den PET-Aufnahmen der Fluoridverteilung über 60 Minuten wurde im Anschluss eine weitere Akquisition über 20 Minuten nach Applikation von 3 MBq des Radiotracers ^{18}F -Fluor-Deoxyglukose (^{18}F -FDG) vorgenommen ohne dabei die Position der Tiere im Scanner zu verändern. Dieser Datensatz wurde in der gleichen Matrix wie oben statisch rekonstruiert. ^{18}F -Fluor-Deoxyglukose wird von den Zellen des Myokards auf gleiche Weise wie Glukose aufgenommen. Die Glukosetransporter (Glut 1-5) in der

Zellmembran erkennen das Molekül trotz des Austausches einer Hydroxylgruppe durch das markierende ^{18}F und transportieren es passiv nach intrazellulär. Im Herzmuskel spielen die insulinabhängigen Glut-4 Transporter eine zentrale Rolle. Intrazellulär kommt es durch die Hexokinase-Reaktion zu einem „metabolic trapping“, wobei die ^{18}F -FDG phosphoryliert wird und somit die Zelle nicht mehr verlassen kann. Es kommt somit zu einer Anreicherung von ^{18}F -FDG im Herzmuskel.

Durch diese Anreicherung im Myokard lässt sich im PET der Herzmuskel darstellen. Im Verlauf dieser Arbeit gelang es dadurch das Lumen des linken Ventrikels deutlich von dessen Myokard abzugrenzen, um später dort die Aktivität des ^{18}F -Fluorid im Blut bestimmen zu können.

2.4 Auswertung der PET-Bilder und quantitative Bewertung

Nach Akquisition des PET-Scans wurden die entstandenen Bilddaten mit einem in der Arbeitsgruppe entwickelten Softwareprogramm ausgewertet (Matlab, TIM). Diese Software ermöglicht es, die Bilddaten auszusteuern und zu skalieren, einzelne Schnittbilder axial, coronar und transversal zu rekonstruieren und Regionen in Organen/Kompartimenten zu definieren, um die Konzentration eines entsprechenden Tracers lokal zu bestimmen (Abbildung 1a). Über diese sogenannten „Regions of Interest“ (ROI) kann der zeitliche Verlauf der Traceraktivität in einem bestimmten Areal als Maß für die Organfunktion untersucht werden. Durch Aufsummation der einzelnen Schnittebenen innerhalb der ROI's entsteht ein Volumenäquivalent bezeichnet als „Volume of Interest“ (VOI). Die resultierenden sogenannten „time-activity-curves“ (TAC's) dienen im späteren Verlauf der Berechnung der Blutkonzentration des Fluorids im linken Ventrikel (Abbildung 1b).

ROI's zur Bestimmung der Blutaktivität wurden manuell in das Lumen des linken Ventrikels platziert, um den zeitlichen Verlauf der Fluoridkonzentration während der Perfusionsphase im Blutpool zu bestimmen. Um dieses Lumen exakt markieren zu können, wurden die Schnittbilder des oben genannten ^{18}F -FDG-Scans genutzt, da sich hier das Myokard deutlich abgrenzen lässt (Abbildung 1a). Die in den ^{18}F -FDG-Bildern markierten ROI's wurden folgend auf die im Fluorid-Scan entstandenen Bilder übertragen, so dass die bestimmte Aktivität der des Ventrikellumens entspricht. Dieser

Transfer der ROI's ist möglich, da sich unter Narkose und Fixierung die Lage der Tiere zwischen den Aufnahmen mit Fluorid und FDG nicht verändert hat und somit die markierten Areale einander entsprechen. Die optimale Größe der gewählten ROI's wurde durch eine fortlaufende Analyse verschiedener ROI-Dimensionen bestimmt (Abbildung 2). Die Auswertung der Daten wurde dabei von zwei unabhängigen Personen durchgeführt.

Die ROIs für die Aktivitätsanalyse in den Nieren wurden 20 Minuten und die für die Blase 60 Minuten *p.i.* des ¹⁸F-Fluorid markiert (Abbildung 1c). Durch die Festlegung der ROI's entstanden somit drei TAC's, die den zeitlichen Verlauf der Traceraktivität im Ventrikellumen (arterielles Blut), in den Nieren und in der Blase beschreiben (Abbildung 1d). Für die Konzentration des Fluorids in der Blase ist jedoch nur der absolute Wert nach Abschluss der Akquisition von Bedeutung, da dieser die filtrierte Menge des ¹⁸F-Fluorid während der Zeit im PET darstellt.

2.5 Berechnung der Fluoridclearance

Die Berechnungsgrundlage der Fluoridclearance wurde aus der klassischen Formel für die allgemeine Clearance abgeleitet. Diese setzt sich aus dem Quotienten der gesamt ausgeschiedenen Menge des Stoffes im Urin und der Blutkonzentration des filtrierte Stoffes zusammen. Der Nenner des Quotienten berechnet sich dabei aus dem Produkt der Urinkonzentration eines filtrierte Stoffes (C_U in mg/dl) und dem Harnvolumen V_U (in ml). Im Zähler finden sich die Blutkonzentration des Stoffes (C_P in mg/dl), sowie die Dauer der Urinkollektion (t in min) wieder:

$$\text{Clearance} = \frac{C_U * V_U}{C_P * t}$$

Der Nenner repräsentiert hierbei den Anteil des Fluorids, der dem renalen Filtrationsvorgang zugänglich ist. Da neben der renalen Aufnahme des Fluorids ein hoher Uptake in das Knochensystem besteht (30), kann die injizierte Fluoridmenge nicht als Berechnungsparameter in die obige Formel einfließen, da ein großer Anteil des applizierten Radiotracers nicht der renalen Clearance zur Verfügung steht.

Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der Blutkonzentration das Integral über die TACs für den Blutpool gewählt. Dieses Integral reflektiert die Menge an ^{18}F -Fluorid in der Nierenarterie, die der renalen Clearance zu jedem Zeitpunkt des Scans zur Verfügung steht.

Dieser Parameter ist somit unabhängig von einem Uptake des applizierten Fluorids in anderen Körperkompartimenten, wie z.B. das Knochensystem. Daher ergibt sich zur Berechnung der Fluoridclearance (FCI) folgende Formel:

$$FCI = \frac{A_{FU}}{\int_0^{60} C_{FB}(t) dt}$$

mit A_{FU} = Fluoridaktivität im Urin, C_{FB} = Fluoridkonzentration im Blut und t = Zeit.

Die durch die o.g Formel berechneten Clearancewerte für ^{18}F -Fluorid wurden zur Standardisierung aller Daten auf die Körperoberfläche einer 25g schweren Maus bezogen, da dies dem durchschnittlichen Gewicht der Versuchstiere entsprach. Die Körperoberfläche (BSA= body surface area) wurde dabei nach folgender Gleichung nach Smuts et al (31) bestimmt:

$$BSA = 7.76 * BW^{2/3}$$

mit BSA= body surface area (m^2) und BW= body weight (g).

FCI_{BSA} ($\mu\text{l}/\text{min}$) als Einheit der ^{18}F -Fluorid- Clearance wurde daher als ein körperrgewichtabhängiger Parameter definiert, der sich auf die Körperoberfläche einer 25g schweren Maus bezieht. Für diese Körperoberfläche geht aus der genannten Gleichung ein Wert von $66,35 \text{ cm}^2$ hervor.

Die auf der Bildgebung basierende Nierenfunktionsdiagnostik ermöglicht die seitengetrennte Analyse der Filtrationsfraktion der einzelnen Niere und die Berechnung der jeweiligen TAC`s. Die renale Funktion des einzelnen Organs wurde aus dem Quotienten des Intergrals der TAC`s der linken und der rechten Niere nach ca. 60-100 Sekunden nach Tracerinjektion und Akquisitionsstart berechnet. Dieser Quotient nach

Oberhausen et al (32) drückt somit den Anteil der jeweiligen Niere an der Gesamtfluoridclearance aus:

$$FCl = \frac{\int C_{Nr}(t)dt}{\int C_{Ni}(t)dt}$$

mit C_{Nr} = Fluoridkonzentration der rechten Niere und C_{Ni} = Fluoridkonzentration der linken Niere.

2.6 Bestimmung der Referenzparameter durch die tubuläre Exkretionsrate für Mercaptoacetyltriglycin (TER-MAG3)

Die tubuläre Exkretionsrate von ^{99m}Tc -Mercaptoacetyltriglycin (TER-MAG3) als eine invasive Methode zur Bestimmung der Nierenfunktion stellte die Referenzmethode zur Validierung der ^{18}F -Fluorid-Clearance dar. Das mit ^{99m}Tc -markierte Hippuran-Analogon wird nahezu vollständig im Tubulussystem der Niere sezerniert. Ein toxischer Effekt durch das applizierte Cisplatin spiegelt sich daher in einer Regression der TER-MAG3-Werte wieder und kann zum Vergleich mit der ebenfalls abfallenden ^{18}F -Fluorid-Clearance herangezogen werden. Die TER-MAG3 wurde dabei nach der „single-sample“ Methode nach Bubeck et al. (33) bestimmt. Die Blutproben der Mäuse wurden 20 Minuten nach i.v. Injektion von 5 MBeq ^{99m}Tc -Mercaptoacetyltriglycin durch eine Punktion des retroorbitalen Venenplexus gewonnen, um die entsprechende Blutaktivität der Probe zu bestimmen.

Die berechneten Werte der TER-MAG3 wurden ebenfalls auf die Körperoberfläche einer Standardmaus von 25g Körpergewicht bezogen, um den Vergleich mit der ^{18}F -Fluorid-Clearance zu ermöglichen. Auch im Falle der TER-MAG wurde diese Einheit auf Grund des konstanten Bezugs zur Körperoberfläche als $\text{TER-MAG}_{\text{BSA}}$ in $\mu\text{l}/\text{min}$ bezeichnet.

Die Vorbereitung der Tiere, sowie die Injektion des Tracers wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie es auch bei den schon beschriebenen PET- Akquisitionen im Rahmen der ^{18}F -Fluorid-Applikation durchgeführt wurde.

2.7 Statistische Auswertung

Die in der Bildakquisitionen gewonnen Daten wurden mit einer standardisierten Software analysiert und ausgewertet (SPSS 15.0). Der Zusammenhang zwischen der TER-MAG_{3BSA} und der FCl_{BSA} wurde im Rahmen einer Korrelationsfunktion und einer orthogonalen Regression (Deming regression, equal variances) untersucht.

Die Studien zur Verlaufsbeobachtung der Nierenfunktion nach Cisplatin-Injektion wurden mit einer ANOVA Varianz-Analyse evaluiert. Die Daten wurden als Mittelwerte der akquirierten Messpunkte angegeben. Die Abweichung dieser Daten spiegelt sich im „standard error of the mean“ (SEM) wieder. Dieser repräsentiert den Durchschnittsfehler der Standardabweichung als Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel der Anzahl der beobachteten Tiere, der Proben oder der durchgeführten Experimente.

Das Signifikanzniveau α als maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei der Datenerhebung bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse allgemein

Das große FOV, die hohe Qualität und Auflösung des Kleintier-PET ermöglichten es, bis zu vier Mäuse simultan zu untersuchen. Das kleinste Zeitintervall zwischen zwei rekonstruierten Schnittbildern betrug dabei zwei Sekunden. Sowohl die TAC's des Blutes, gemessen im Lumen des linken Ventrikels, als auch der zeitliche Verlauf der Aktivität im Nierenparenchym und der Harnblase konnten nicht-invasiv ohne die Kollektion von Urin- oder Blutproben bestimmt werden.

Die Anordnung der Tiere im PET, sowie der Geräteaufbau ist der Abbildung 6 zu entnehmen.



Abbildung 6:

Anordnung der Versuchstiere im Kleintier-PET unter Isofluran- Narkose. Das PET ermöglicht es, Bilddatensätze von bis zu vier Tieren gleichzeitig zu erfassen. Um eine konstante Narkosetiefe während der Akquisitionszeit zu gewährleisten, kann die Konzentration des Narkosegases in der zuführenden zentralen Gasleitung (1) über separate Zugänge (2) und Inhalationsmasken (3) für jede Maus atemfrequenzadaptiert verändert werden. Die physiologische Körpertemperatur wird durch eine Heizplatte (4) unterhalb der Auflage aufrechterhalten. Die Applikation des PET-Tracers ist über jeweils einen Schwanzvenenkatheter (5) für jedes Tier separat möglich. Nach Adjustierung einer stabilen Narkosetiefe wird die Datenakquisition im PET (6) begonnen.

Durch die hohe räumliche Auflösung und eine ausreichende Sensitivität des PET konnten diese dynamischen Aktivitätsverläufe der einzelnen Kompartimente errechnet werden, so dass eine Kalkulation der ^{18}F -Fluorid-Clearance möglich war. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7-9 dargestellt. Dabei zeigt Abbildung 7 die TACs des linken Ventrikels, Abbildung 8 zwei Ganzkörperaufnahmen des PET und Abbildung 9 die charakteristischen Konzentrationsverlauf des ^{18}F - Fluorids in den einzelnen Kompartimenten Niere, Blase und Knochen.

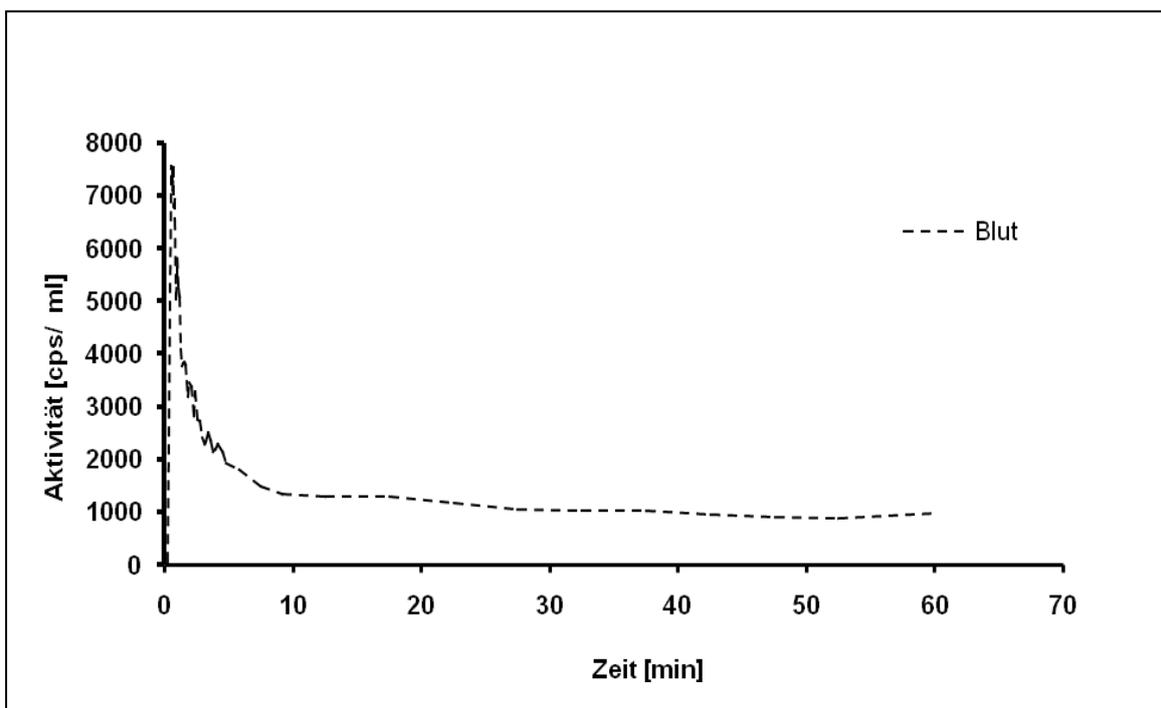


Abbildung 7:

„Time-activity-curves“ (TAC) des arteriellen Blutes im linken Ventrikels innerhalb des Akquisitionsintervalls von 0-60 Minuten. Die Gesamtaktivität ist dabei definiert als das Integral über die Funktion im angegebenen Zeitintervall. Zur Auswertung wurde die optimale VOI-Größe von 2 mm^3 gewählt.

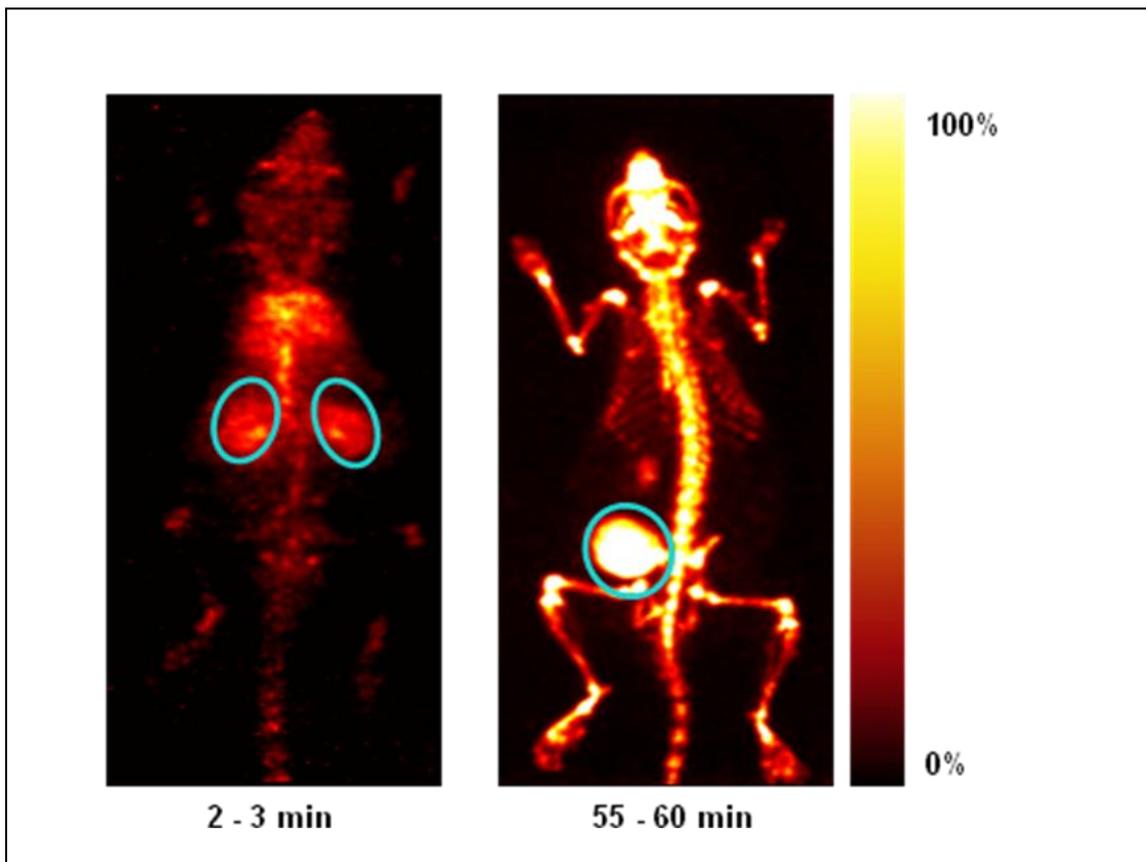


Abbildung 8:

Bilddaten der Kleintier- PET einer Kontrollmaus zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während des Scans als dynamische Ganzkörper-Aufnahme nach i.v. Injektion von 5 MBq ^{18}F -Fluorid (coronal maximum a posterior (MAP) projections 120-130 s p.i. and 3300-3600 s p.i.). Zu einem frühen Zeitpunkt nach ca. 120-180 Sekunden p.i ist das Nierenparenchym in der hochauflösenden Projektion des Scanners deutlich durch die Aufnahme des ^{18}F -Fluorids von der Umgebung abzugrenzen. Zum Ende der Scanzeit reichert sich die Aktivität in der Blase des Tieres an, so dass diese nach ca. 55-60 Minuten erkennbar wird. Durch die hohe Bildqualität ist es daher möglich, die ROI's auf diesen Schnittbildern zu definieren, um daraus die entsprechenden TAC's zu erstellen.

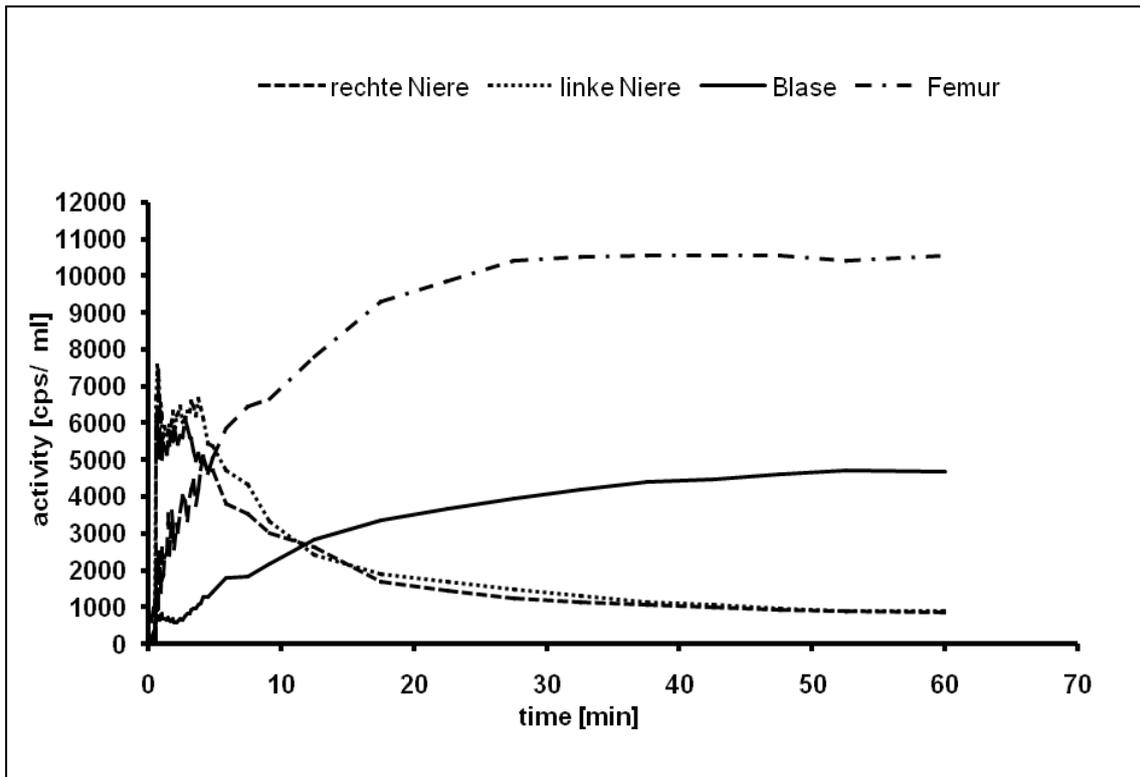


Abbildung 9:

*Charakteristische TACs der einzelnen Kompartimente Blase, linkes und rechtes Nierenparenchym und des Femur (Knochen) einer Kontrollmaus. Die Aktivität der einzelnen Regionen wurde dabei von 0-60 Minuten nach Injektion des ^{18}F -Fluorids gemessen. Die Auswertung der Aktivität des ^{18}F -Fluorid pro Volumen im Urin 60 Minuten p.i., das Urinvolumen repräsentiert durch das Blasenvolumen, sowie die Aktivität des ^{18}F -Fluorid pro Volumen im Blut wurde zur Berechnung der ^{18}F -Fluorid-Clearance herangezogen. Die Datenakquisition basierte dabei auf 54 frames über die gesamte Messzeit (1*30 s, 15*2 s, 10*6 s, 12*10 s, 3*20 s, 3*100 s, 10*300 s).*

Eine weitere große Herausforderung im Rahmen der Datenakquisition war die Standardisierung der Auswertung der Blutaktivität im linken Ventrikellumen, um quantitative und reproduzierbare Werte für dieses Kompartiment zu erhalten.

Wie bereits erwähnt wurde die optimale Dimension der VOIs durch zwei unabhängige Betrachter ermittelt und ein Durchschnittswert aus den Daten gebildet. Wichtig für die Auswertung der Blutaktivität ist die Definition einer VOI im Ventrikellumen. Die Wahl der Größe der VOIs hat dabei einen Effekt auf den letztendlichen Wert der ^{18}F -Fluorid-Clearance. Somit ist generell eine Abhängigkeit der Datenauswertung vom Betrachter gegeben. Beispiele für mögliche VOI-Größen, sowie die Daten und der Effekt unterschiedlicher VOI-Dimensionen sind in Abbildung 10 und 11 dargestellt. Die optimale Größe der VOIs wurde im Folgenden durch eine fortlaufende Analyse von zehn verschiedenen Durchmessern der VOIs untersucht. Die Auswertung wurde dabei von zwei unabhängigen Betrachtern durchgeführt.

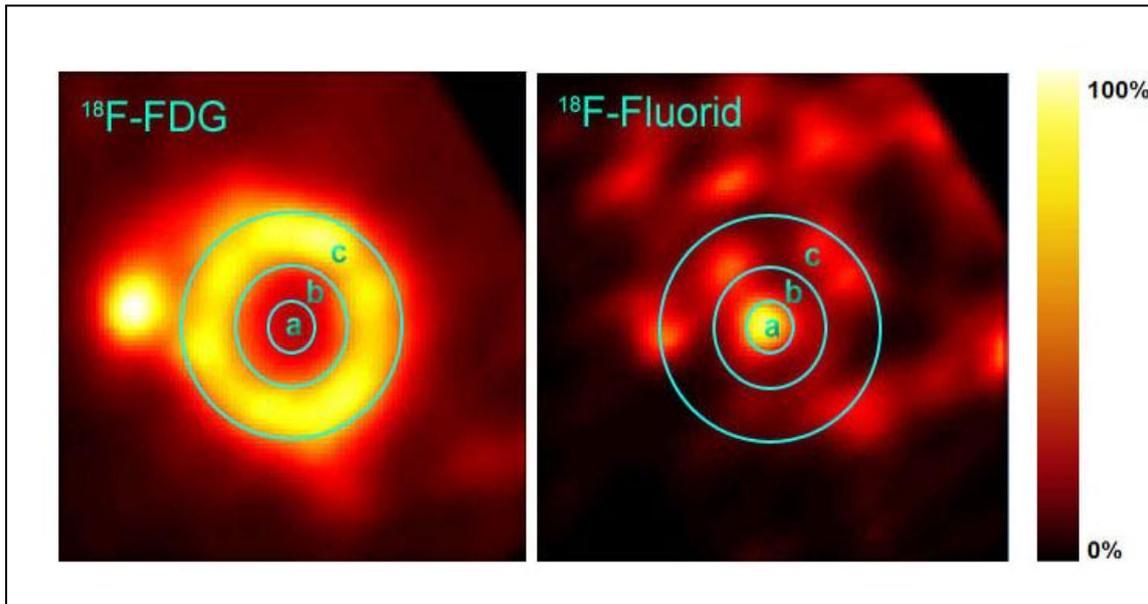


Abbildung 10

PET-Aufnahme des linken Ventrikels in einem transversalen Schnitt des Herzens nach Injektion des radioaktiven Tracers ^{18}F -Fluorodeoxyglucose. Durch die Anreicherung des Tracers im metabolisch aktiven Myokard lässt sich das Ventrikellumen vom Herzmuskelgewebe bildgebend trennen. Die auf diesen ^{18}F -FDG-Scan eingefügten VOIs wurden auf das ^{18}F -Fluorid-Abbild übertragen. Durch diesen Transfer ist es möglich das Ventrikellumen auch auf dem ^{18}F -Fluorid-Scan genau zu definieren. Die markierten Areale verdeutlichen dabei drei verschiedenen VOI-Dimensionen (a: $0,04 \text{ mm}^3$, b: $4,02 \text{ mm}^3$, c: $16,08 \text{ mm}^3$). Die Wahl der VOI- Dimension nimmt dabei Einfluss auf das Ergebnis für die Berechnung der FCl_{BSA} (siehe auch Abbildung 5).

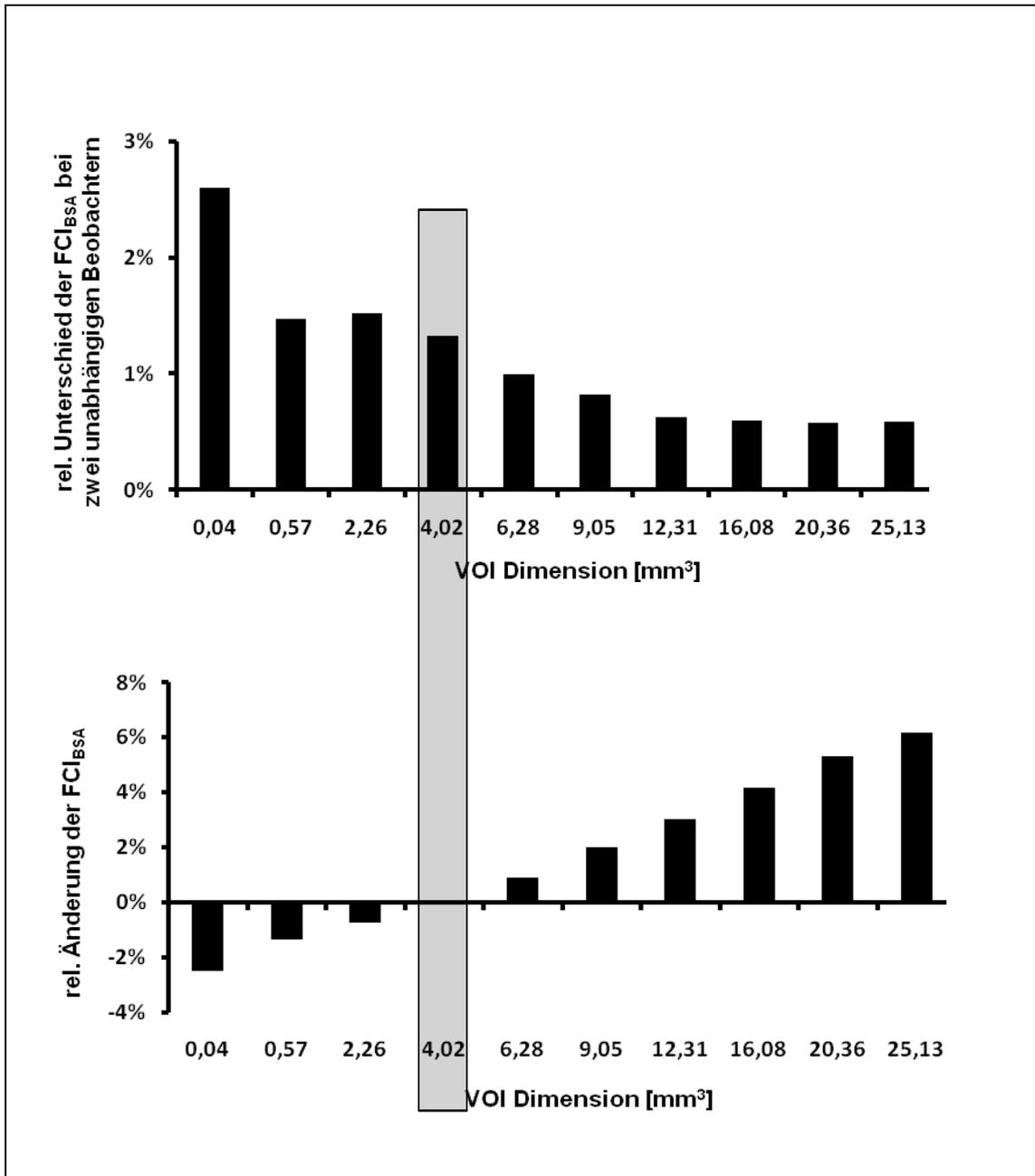


Abbildung 11:

Das obere Diagramm zeigt die Abhängigkeit der ^{18}F -Fluorid-Clearance von der Größe der gewählten VOIs. Die FCl_{BSA} nimmt mit ansteigender VOI- Dimension linear zu, da die sich die gemessene Aktivität im Blut durch ein größeres Betrachtungsvolumen verringert. Das untere Diagramm zeigt den relativen Unterschied der berechneten FCl_{BSA} - Werte in Abhängigkeit von der VOI- Dimension.

Hier zeigt sich eine sehr geringe Abweichung der einzelnen berechneten FCl_{BSA} -Werte innerhalb der analysierten Intervalle von $< 3\%$. Zusätzlich zeigt sich bei zunehmender VOI-Dimension ein abnehmender relativer Unterschied der Einzelwerte der FCl_{BSA} bei zwei unabhängigen Beobachtern. Dieser Effekt kann durch die zunehmende Größe der markierten Fläche erklärt werden. Je mehr Fläche des Ventrikellumens markiert ist, desto höher ist die entsprechende Schnittmenge der untersuchten Areale durch zwei unabhängige Personen. Die optimale Dimension der VOIs wurde bei einem Volumen von $4,02 \text{ mm}^3$ festgelegt (markierte Fläche), da hier die Bestimmung der FCl_{BSA} nahezu frei von spill-over-Effekten ist und der Unterschied im Ergebnis dieses Parameters im Rahmen einer unabhängigen Auswertung durch beide Beobachter in diesem Bereich unter $1,5\%$ liegt.

In der bildgebenden nuklearmedizinischen Diagnostik ist es wichtig, spill-over Effekte im vorliegenden Fall durch das Myokard durch dortige Anreicherung des Tracers in Bezug auf das Ventrikellumen zu minimieren, vor allem, wenn man die Blutaktivität aus der Ventrikel-VOI berechnen will. Bei diesem Effekt handelt es sich um den Einfluss der Aktivitätsverteilung in der Umgebung auf das eigentlich gemessene Volumen. Um diesen Einfluss des Myokards auf die gemessene Aktivität im Ventrikellumen zu vermeiden, wäre es daher optimal, die Blut-TACs aus kleinen, zentral im Lumen der linken Herzkammer liegenden VOIs zu berechnen. In diesem Fall wären jedoch die Unterschiede der relativen FCl_{BSA} -Werte bei wiederholter Auswertung der Bilddaten durch zwei unabhängige Beobachter maximal. Darüber hinaus muss die VOI-Größe mindestens die dreidimensionale Auflösung des PET erreichen, um die Erfassung des gesamten radioaktiven Signals im Ventrikel garantieren zu können. Im Rahmen der experimentellen Versuchsreihe mit dem hochauflösenden quadHIDAC-Scanner liegt dieser Bereich bei unter 1 mm^3 . Mit dem Ziel, diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde die optimale zylindrische VOI-Dimension während aller Versuchsreihen auf $4,02 \text{ mm}^3$ und $1,6 \text{ mm}$ VOI-Durchmesser festgelegt, da hier der Abstand der markierten Fläche zum Myokard ausreichend ist, um mögliche spill-over-Effekte zu vermeiden. Weiterhin entspricht dies einer mehr als doppelten volumetrischen Auflösung des PET-Scanners. Die Ergebnisse der unabhängigen Auswertung der FCl_{BSA} unterscheiden sich in diesem Größenbereich der VOIs um nur

knapp 1,5% und sind daher minimal. Durch die systematische Analyse dieser Abhängigkeit der einzelnen Parameter war es möglich, ein einheitliches Auswertungsprotokoll zu erstellen. Alle Ergebnisse sind im Rahmen dieser Datenauswertung von einer leichten systematischen Unterschätzung des radioaktiven Signals im Blut und einer Überschätzung der Nierenfunktion betroffen. Dieser Einfluss ist jedoch bei allen gewonnenen Daten in gleicher Weise vorhanden und kann somit in die Quantifizierung mit einbezogen werden.

3.2 Ergebnisse der einzelnen Tiergruppen und Versuchsreihen

1.) Korrelation der FCI_{BSA} und der Referenzmethode TER-MAG3 $_{BSA}$ (n= 24):

Die Daten aus den ^{18}F -Fluorid-Scans von 24 Mäusen wurden der tubulären Extraktionsrate von MAG3 gegenübergestellt, um eine Korrelation dieser beiden Methoden ersichtlich zu machen. Die Standardisierung der Einheiten beider Methoden ermöglicht einen unmittelbaren Vergleich der Werte. Die Abbildung 12 zeigt eine signifikante Korrelation der Daten mit einem Korrelationskoeffizient von $r=0,86$.

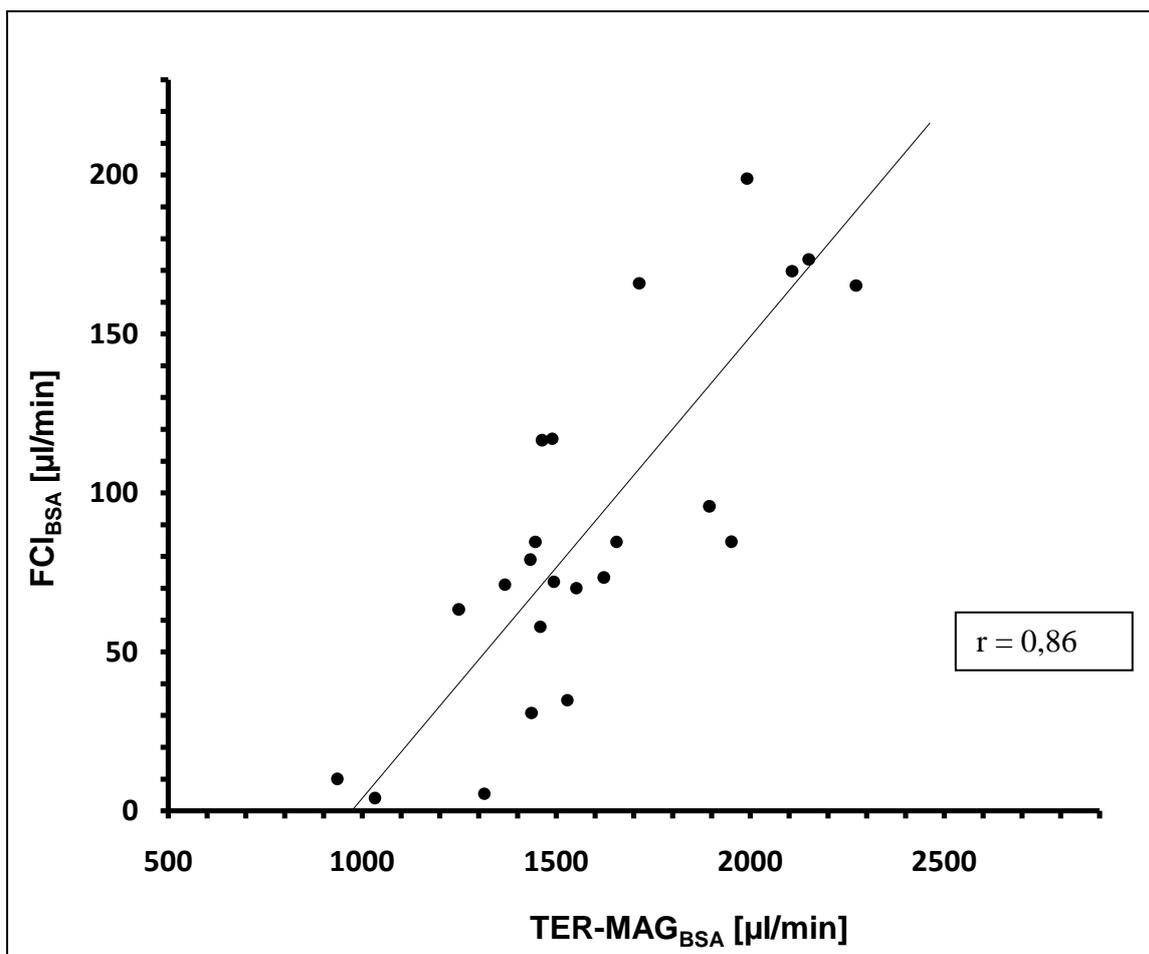


Abbildung 12:

Korrelation der individuellen Messwerte der auf der PET- basierenden ^{18}F -Fluorid-Clearance (FCl_{BSA}) und der tubulären Extraktionsrate für MAG3 ($\text{TER-MAG3}_{\text{BSA}}$) einzelner Versuchstiere ($n= 24$). Um die Korrelation der unterschiedlichen Methoden in differierenden Bereichen der Nierenfunktion zu validieren, wurden die FCl_{BSA} und die $\text{TER-MAG3}_{\text{BSA}}$ bei unbehandelten Mäusen ($n= 14$) und bei Mäusen nach Cisplatin-Injektion ($n=10$) gemessen. Die Scans erfolgten dabei an Tag 5 und Tag 10 nach Injektion unterschiedlicher Dosen Cisplatin. Die FCl_{BSA} lag durch die Intervention in einem Bereich zwischen ca. 10 und 210 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der Korrelationskoeffizient beider Methoden liegt bei $r= 0,86$.

2.) Verlaufsstudie der Nierenfunktion nach Injektion unterschiedlicher Cisplatin- Dosen, sowie ohne Applikation einer nephrotoxischen Substanz:

Die Verlaufsstudie über 10 Tage wurde in unterschiedlichen Subgruppen von Versuchstieren durchgeführt. Wie bereits im Rahmen der Korrelationsanalyse erwähnt, wurde durch die Cisplatin-Applikation ein dosisabhängiger proximal tubulo-toxischer Nierenschaden verursacht (25, 34). Die applizierten Dosen betragen 5, 10 und 15 mg/kg KG. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Mäuse, deren Nierenfunktion zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt wurde. Die aus den dynamischen PET-Akquisitionen errechnete FCI_{BSA} lag dabei zwischen 10 und 248 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die absolute renale FCI_{BSA} zeigte signifikante Unterschiede zwischen der 15 mg/kg KG Subgruppe und der Kontrollgruppe an Tag 5 p.i.. Einen ebenfalls signifikanten Abfall der Nierenfunktion zeigte sich in der 10 mg/kg KG Subgruppe im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe an Tag 5 p.i.. Die FCI_{BSA} der 5 mg/kg KG Subgruppe unterschied sich nur signifikant an Tag 5 p.i. im direkten Vergleich mit dem eigenen individuellen Wert des Baselinescans am Tag 0. Im weiteren Verlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied am Tag 10 nach Cisplatin-Injektion bei allen drei Versuchsgruppen. Zu diesem Zeitpunkt ist demnach bereits eine Regeneration der renalen Filtrationsfähigkeit eingetreten. Abbildung 13 zeigt die Verlaufskontrolle der einzelnen Subgruppen. Die absolute FCI_{BSA} innerhalb der behandelten Gruppen, sowie die relative Veränderung der FCI_{BSA} im Vergleich zum individuellen Baseline-Scan an Tag 0, zeigten signifikante Unterschiede (*) der Nierenfunktion zwischen der Kontrollgruppe und der mit 15 mg/kg KG behandelten Tiergruppe an Tag 5 nach Injektion des Cisplatins. Ebenfalls die mit 10 mg/kg KG behandelten Tiere zeigten an Tag 5 p.i. diese signifikante Regression der Nierenfunktion auf.

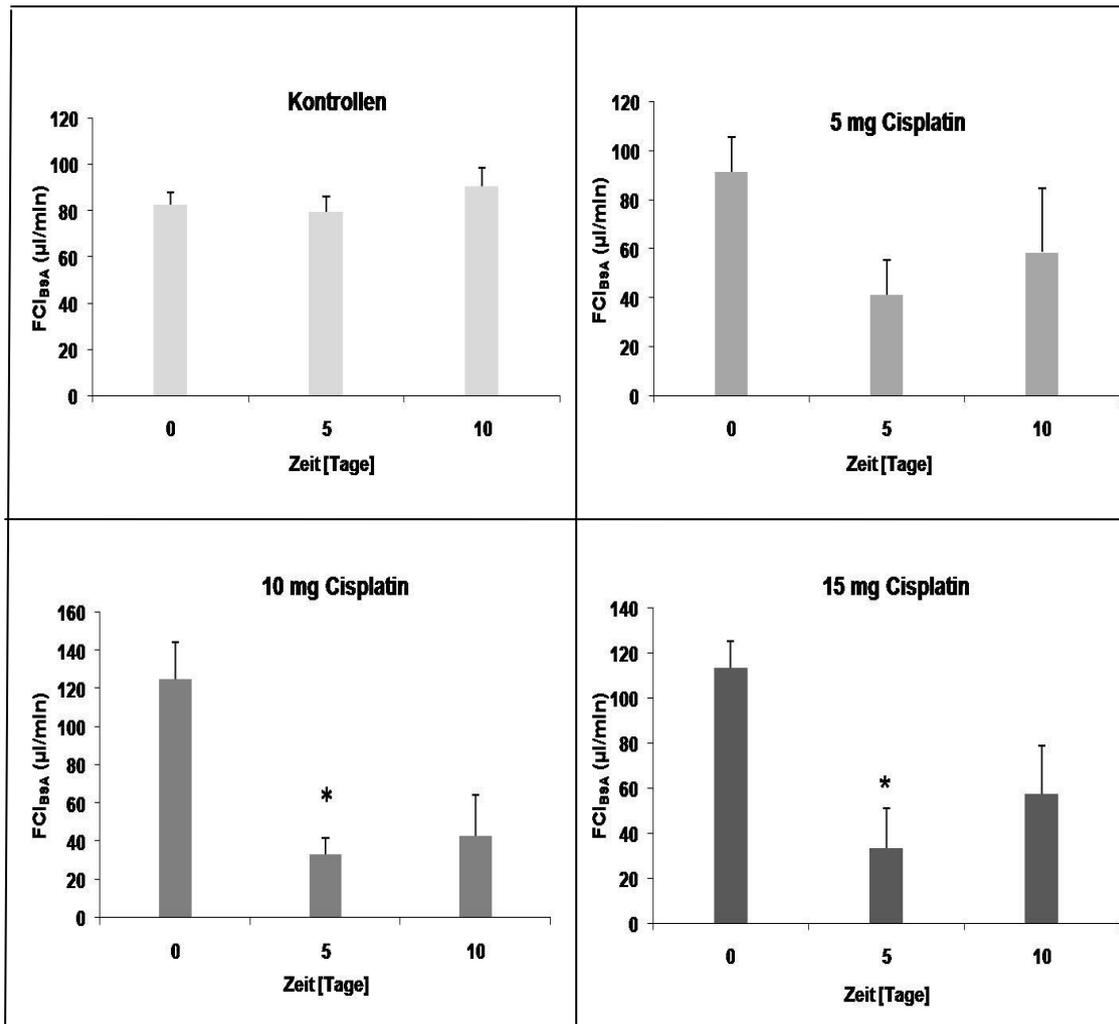


Abbildung 13:

Zeitliche Entwicklung der absoluten FCI_{BSA} bei Mäusen ohne und nach Gabe verschiedener Cisplatin- Konzentrationen zur Initiierung proximal tubulärer Schäden. Die Effekte zeigen dabei eine dosisabhängige Ausprägung. Gegenübergestellt wurden im Rahmen der Experimente drei unterschiedliche Subgruppen von Versuchstieren, die unterschiedliche Dosen Cisplatin (5 (n= 5), 10 (n= 5) und 15 (n= 5) mg/kg KG) i.v. verabreicht bekamen, und gesunde Tiere (n= 8), die als Kontrollgruppe dienten. Die Fehlerbalken in den Diagrammen zeigen die SEM.

Zur Untersuchung des systemisch- nephrotoxischen Effekts des Cisplatins wurde zusätzlich die seitengetrennte Nierenfunktion berechnet. Durch die bildgebende PET- Diagnostik ist es möglich, unilaterale von bilateralen Nierenschäden zu differenzieren. Die hohe Auflösung der Bilddaten ermöglicht es, jede Niere einzeln zu betrachten und die entsprechenden TACs zu akquirieren.

Die generierten Aktivitätskurven zeigten dabei im Baseline-Scan (n= 14) eine symmetrische Nierenfunktion beider Organe mit einer durchschnittlichen Anteiligkeit an der Gesamtclearance des ^{18}F - Fluorids von $47 \pm 1,4\%$ für die linke Niere und $53 \pm 1,4\%$ für die rechte Niere.

Zur Darstellung des systemischen Effekts des Cisplatins wurde der prozentuale Anteil jeder Niere an Tag 5 nach Injektion des Zytostatikums errechnet, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Ausprägung der Nephrotoxizität aus den vorangegangenen Versuchsreihen erkennbar war. Trotz der deutlichen Verminderung der renalen Clearancefunktion fünf Tage nach Applikation des Cisplatins, blieb das Verhältnis der Anteile an der Gesamtfiltrationsleistung beider Nieren nahezu gleich. Ein signifikanter Unterschied zu den Baselinescans konnte daher, wie erwartet, nicht gefunden werden.

Die Abbildung 14 zeigt den Anteil der rechten und linken Niere an der an der totalen ^{18}F - Fluorid-Clearance bei allen drei Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Auf Grund des systemischen Effekts des Cisplatins zeigte sich trotz abnehmender renaler Gesamtfunktion kein signifikanter Unterschied in der Seitenanteiligkeit fünf Tage nach Injektion des Cisplatins.

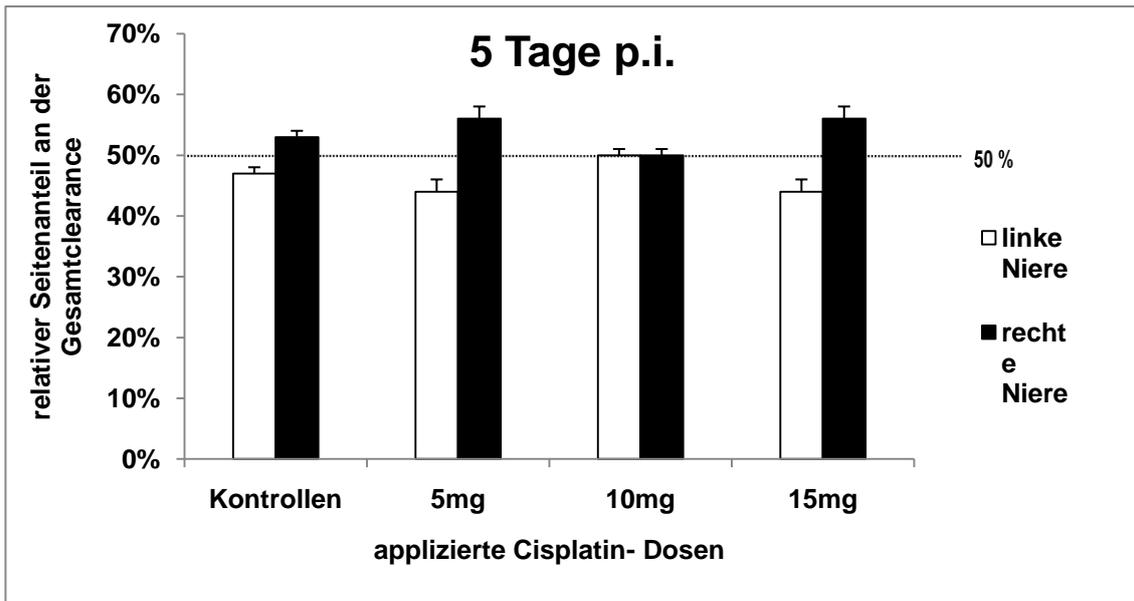


Abbildung 14:

Errechnete relative Nierenfunktion der linken und rechten Niere im direkten Vergleich. Die Kontrolltiere zeigen eine symmetrische Nierenfunktion mit einer mittleren Anteiligkeit der linken von 47% ($\pm 1,4$) und 53% ($\pm 1,4$) der rechten Niere. Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM. Beispiele für die Aktivitätsverläufe der einzelnen Niere sind in Abbildung 9 gezeigt.

3.) Reproduzierbarkeit der Methode:

Die Bestimmung der FCI_{BSA} durch die PET zeigte eine gute Reproduzierbarkeit. 94% der errechneten Werte liegen dabei im 95%-Konfidenzintervall. Die Abbildung 15 zeigt die Daten in einem Bland-Altman-Diagramm mit 16 Messpunkten. Test und Retest wurden innerhalb von fünf Tagen durchgeführt.

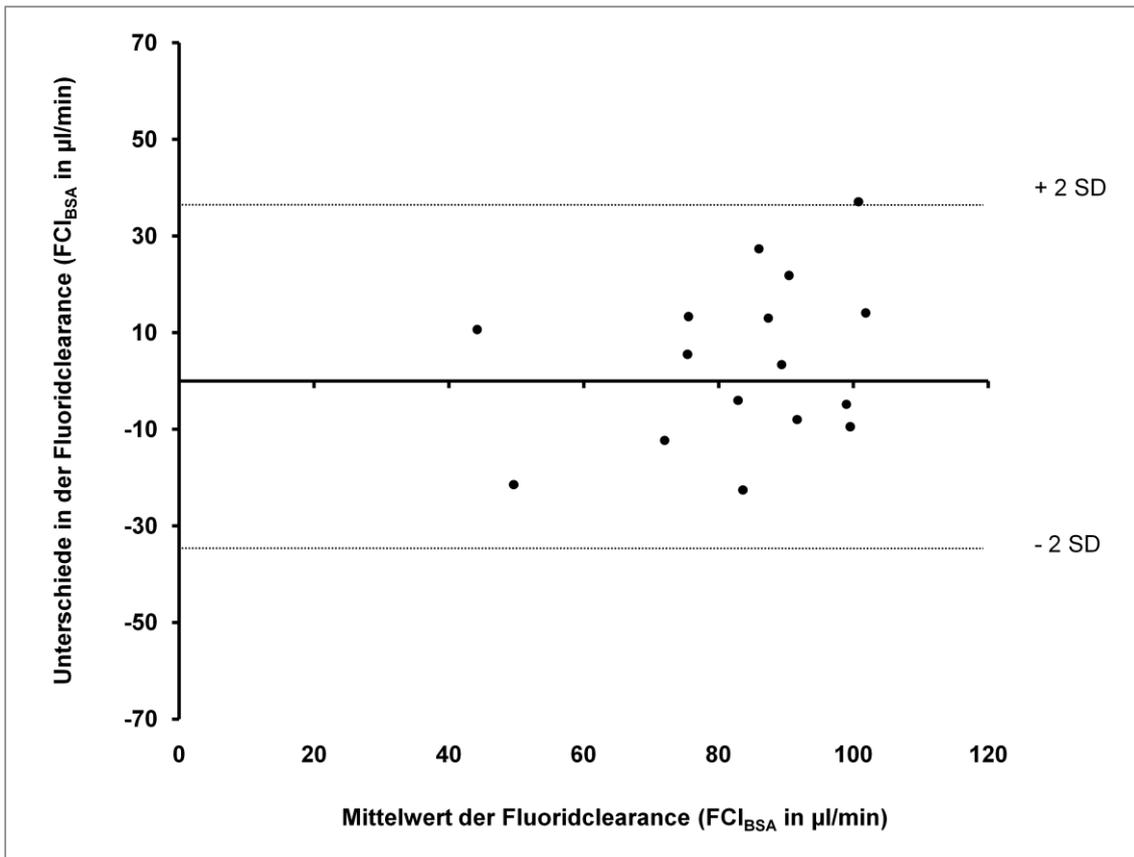


Abbildung 15:

Bland-Altman-Analyse zur Darstellung der Reproduzierbarkeit der Quantifizierung der Nierenfunktion mit ^{18}F -Fluorid. Alle Clearancewerte liegen innerhalb des Intervalls der zweifachen Standardabweichung.

4. Diskussion und Schlussfolgerung

Die Quantifizierung der Nierenfunktion beim Menschen kann durch verschiedene Methoden durchgeführt werden. Weit verbreitet sind hier laborchemische Methoden wie die Bestimmung des Creatinins im Serum oder der Creatinin- Clearance. Diese etablierten Methoden sind jedoch nur eingeschränkt auf Kleintiermodelle zu übertragen, da die Kollektion von Blut- und Urinproben insbesondere bei Mäusen sehr aufwendig ist und es auch auf Grund von sehr geringen Volumina zu möglichen Fehlerquellen bei der Bestimmung der renalen Funktion kommt. So weisen Mäuse mit einem mittleren Gewicht von 30g lediglich ein Blutvolumen von ca. 2,4-2,8 ml auf (3). Selbst bei Entnahme kleiner Volumina ist eine z.B. zeitabhängige Serienmessung der Nierenfunktion daher nicht möglich, auch wenn einige Methoden zur Analyse kleiner Stoffproben zur Verfügung stehen (20). Weitere Studien zeigten, dass colorimetrische oder Pikrinsäure-basierte Methoden zur Bestimmungen der Creatinin- Clearance nicht sensitiv genug für ein Kleintiermodell sind und es zu Interferenzen mit Chromogenen im Mausplasma kommen kann (35). Dieser Effekt führt zu einer 5- 8,5- fachen Überschätzung der Clearance. Zusätzlich ist die Prozedur der Blutentnahme, z.B. durch Punktion des retroorbitalen Venen-Plexus als gängige Methode, für das Tier sehr belastend und es verbietet sich eine häufige Wiederholung im kurzen zeitlichen Verlauf. Andererseits werden Kleintiere wie Ratten und Mäuse jedoch in der biomedizinischen Forschung, oftmals zur Versuchsdurchführung genutzt, um z.B. Erkrankungen der menschlichen Nieren zu imitieren. Dazu gehört nicht nur krankheitsbedingtes Nierenversagen, sondern auch die Grundlagenforschung, wie z.B. die Entwicklung neuer Techniken zur Nierentransplantation.

Deshalb kommt der Etablierung einer nicht-invasiven Methode zur Nierenfunktionsdiagnostik bei Kleintieren eine große Bedeutung zu, da es sonst derzeit nicht möglich ist, die Nierenfunktion auf angemessene und einfache Art und Weise zu quantifizieren. Die ^{18}F -Fluorid-PET stellt eine solche schnell durchführbare und reproduzierbare Methode zur Nierenfunktionsdiagnostik dar. Das vollständig nicht-invasive Vorgehen führt dabei zur Reduzierung vieler Fehlerquellen, die andere Methoden in ihrer Aussagekraft einschränken, und zur weitestgehenden Schonung der

Tiere. Zusätzlich sind aufwendige Vorgehensweisen (24h-Urinkollektion, Abnahme sehr geringer Blutmengen) im Vergleich zu anderen Methoden nicht notwendig.

In dieser experimentellen Arbeit wurde deshalb eine neue, nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Nierenfunktion an Mäusen etabliert. Mit Hilfe der ^{18}F -Fluorid- PET gelang es, ein an Ratten berichtetes Verfahren (36) an Mäusen zu verifizieren und zu verbessern. Das hier beschriebene ausschließlich bildgebende Verfahren ist geeignet, sowohl die komplette wie auch die seitengetrennte Nierenfunktion an Mäusen zu analysieren. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen sehr gut mit der etablierten TER-MAG Technik zur Bestimmung der tubulären Exkretionsrate unter Verwendung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyltriglycin überein.

Voraussetzung für die hier an der Maus etablierte Technik ist die Verfügbarkeit eines hochauflösenden Kleintier PETs. Dieses ist am European Institute for Molecular Imaging mit dem Gerät quadHIDAC, das sich durch ein besonders großes Sichtfeld auszeichnet (28 cm axial FOV), vorhanden und konnte deshalb direkt für die hier anstehenden Untersuchungen eingesetzt werden. Durch die hohe örtliche Auflösung des Scanners von 0,7 mm und eine aufwändige Rekonstruktionstechnik (OSEM Rekonstruktions- Algorithmus) können Partialvolumen-Effekte reduziert und regionale Aktivitäten sehr gut differenziert werden. Mit diesem Scanner ist es dadurch möglich, die Radioaktivität des Fluorisotops als Ganztierexperiment dynamisch, also zeit- und orts aufgelöst, zu vermessen. Weiterhin ergibt sich daraus in vivo die Möglichkeit die Nierenfunktion seitengetreunt darzustellen und zu analysieren. Diese, nur durch rein bildgebende Methoden durchführbare, seitengetreunte Nierenfunktionsdiagnostik ermöglicht es zwischen systemischen und lokalen nephrotoxischen Effekten zu differenzieren.

Der Vorteil des PET ist es, dass parallel zur Nieren-VOI die Aktivität im arteriellen Blut durch eine VOI im linken Ventrikel und die renal ausgeschiedene Aktivität in einer Blasen-VOI bestimmt werden kann, ohne das das Tier im PET-Scanner bewegt werden muss. Dieses ist für die Validität des Verfahrens zwingend notwendig, da sich nur so reproduzierbare Referenzwerte zur Standardisierung erheben lassen.

Um eine exakte Abgrenzung des linksventrikulären Volumens zu erreichen, wurde ^{18}F -Fluor-Deoxyglucose (^{18}F -FDG) eingesetzt. Diese markierte Glucose ist, wie bereits ausgeführt, bestens geeignet, da sie sich im Herzmuskel anlagert. Die auf den ^{18}F -FDG-

Bildern definierten ^{18}F -FDG-VOIs wurden mit den Bildern des ^{18}F -Fluorid-Scans überlagert, um so eine optimale Blut-TAC aus dem ^{18}F -Fluorid-Scan zu errechnen. Eine mögliche Fehlerquelle durch fälschliche Superposition der markierten VOIs kann durch anatomische, sowie extrakorporale Fixpunkte ausgeschlossen werden. Die optimale Dimension der VOIs wurde durch zwei unabhängige Beobachter durch eine serielle Analyse von zehn VOI-Größen festgestellt, wodurch gezeigt werden konnte, dass die im Blutvolumen enthaltene Aktivität vom Beobachter unabhängig ist. Die Differenz bei Mehrfachbestimmungen ($n=8$) betrug im Mittel lediglich 1,3 %. Die Auswahl der VOI-Dimension betrachtet dabei zwei Einflussfaktoren. Zum einen minimiert ein maximal kleines VOI im Zentrum des Ventrikellumens spill-over-Effekte des Myokards. Auf der anderen Seite zeigen großgewählte VOIs eine bessere Übereinstimmung der Clearance-Werte bei unabhängiger Auswertung durch zwei Beobachter. Dies ist dadurch zu erklären, dass große VOIs in ihrer Lage im Lumen des Ventrikels weniger Variabilität zulassen, als kleine zentral-gelegene VOIs. Durch die serielle Analyse von verschiedenen VOI-Dimensionen fanden beide Faktoren Beachtung und es konnte eine optimale Auswahl der VOI-Größe ermittelt werden, bei der negative Effekte durch spill-over minimal und eine gute Reproduzierbarkeit der Daten gegeben ist. Es stellt sich aber dennoch die Frage, inwieweit die hier verwendeten lokalen VOIs repräsentativ für die Aktivität im gesamten Blutvolumen sind. Dies wurde bereits an Ratten gezeigt, an denen mit der hier verwendeten Technik eine signifikante Korrelation zwischen dem mit PET bestimmten linksventrikulären Volumen und dem durch arterielle Blutentnahme bestimmten Aktivitätswert erhalten wurde (36). Dieses Ergebnis konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden, sodass hieraus keine fehlerhafte Beeinflussung der Messungen zu erwarten ist.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle, die diskutiert werden muss, könnte sich aus der Verteilung des ^{18}F -Fluorids im gesamten Körper des Tieres ergeben (37). An Ratten wurde gezeigt, dass Fluorid neben der Ausscheidung über die Niere auch sehr stark in Knochengewebe eingebaut wird. Dies ist natürlich auch bei der Maus der Fall. Auf die Bestimmung der Clearance-Funktion hat dies jedoch keinen Einfluss, da die aus der integrierten TAC erhaltene Menge an ^{18}F -Fluorid des linksventrikulären Blutvolumens, das hier als Referenz verwendet wurde, das Blutvolumen und damit die Menge an ^{18}F -Fluorid in der renalen Arterie wiedergibt. Dies ist aber die für die Clearance relevante

Konzentration, sodass der in die Knochen eingebaute Anteil an ^{18}F -Fluorid auf die Clearancebestimmung keinen Anteil hat.

Grundsätzlich stellt sich aber die Frage, inwieweit die gemessene Clearance mit der GFR übereinstimmt. Die Transportprozesse des Fluorids in der Niere sind gut verstanden. Fluorid wird in der einen Richtung passiv aus den glomerulären Kapillaren herausgefiltert und gegenläufig diffusiv reabsorbiert. Die Reabsorption beträgt konstant etwa 24% des herausgefilterten Fluorids (23, 24, 38). Deshalb kann die „Clearance“-Messung als Maß für die GFR genommen werden, obwohl die beiden Parameter zahlenmäßig nicht übereinstimmen. Dies wurde auch am Menschen gezeigt, wobei die „Clearance“-Werte aus Urin- oder Blutproben bestimmt und in Korrelation zur GFR gesetzt wurden (38). Durch die Rückdiffusion könnte es bei der „Clearance“-Messung zu einer leichten Unterbestimmung der wirklichen GFR kommen. Dagegen wird aber die Bestimmung der Clearance unter Einsatz von Inulin als idealer GFR-Marker angesehen, obwohl hier drei relativ fehlerbehaftete Schritte über Injektion, Blutabnahme und Urinsammlung enthalten sind. Auch die Validität der gängigen Verfahren zur Nierenfunktionskontrolle über Bestimmung der Creatinin- oder Harnstoffclearance ist nicht unumstritten, da Creatinin auch durch den proximalen Tubulus sekretiert wird und Harnstoff im Nephron reabsorbiert werden kann. Insofern stellt die hier etablierte Methode eine sehr gute Alternative dar. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass alle hier generierten „Clearance“-Werte sich auf VOIs des linken Ventrikels beziehen, und somit die Gesamtblut-Radioaktivität widerspiegelt. Üblicherweise bezieht sich aber die „Clearance“-Rate auf die Ausscheidung der entsprechenden Substanzen aus dem Plasma (4). Deshalb wird erwartet, dass die hier bestimmte Clearance auch durch diesen Umstand niedrigere Zahlenwerte liefert, als die gängigen GFR-Bestimmungen. Da aber gezeigt wurde, dass die Verhältnisse der Radioaktivitäten von Plasma/linker Ventrikel und Plasma/ Gesamtblut über 60 Minuten nach ^{18}F -Injektion konstant sind (30), können wir davon ausgehen, dass die Bestimmung der Clearance über das Gesamtblut der erwarteten Radioaktivität im Plasma entspricht und die Methode daher als valide bezeichnet werden kann.

Ein weiterer Parameter, der die Nierenfunktion beeinträchtigen kann, ist die Narkose während der Akquisitionszeit. Diese Narkose ist unabdingbar, um mögliche

Bewegungen der Tiere während des Scans zu verhindern. Nur so ist eine fehlerfreie Auswertung der Bilddaten möglich.

Der Einfluss der Narkose auf die GFR kann möglicherweise zum einem durch eine Abnahme der renalen Perfusion, aber auch durch neurogene Mechanismen wie z.B. die Zunahme des parasympathischen Tonus erklärt werden (39). Es war daher notwendig die Narkosetiefe während der PET sehr genau zu adjustieren, um einen konstanten und reproduzierbaren Narkoseeinfluss garantieren zu können. Während der gesamten Narkosezeit mit einem Gasgemisch aus 1.25 % Isofluran und 0.3 l Sauerstoff/ min wurden deshalb die Atemfrequenzen der Tiere in definierten Zeitabständen gemessen. Die Frequenzen wurden dabei auf einem physiologischen Niveau bei 80-100 Atemzügen/ min gehalten. Ebenfalls wurde eine physiologische Körpertemperatur durch angebrachte Heizplatten garantiert. Bei Veränderung der Atemfrequenzen während der Aufnahme wurde dieser durch Narkoseanpassung unmittelbar entgegengewirkt, so dass von einem konstanten Einfluss der Narkose über die gesamte Akquisitionszeit auszugehen ist. Sicherlich ist ein nach wie vor vorliegender Effekt des Narkosegases auf die Nierenfunktion nicht auszuschließen, dieser ist jedoch durch das genau definierte Versuchsprotokoll bei allen Tieren gleichermaßen vorliegend, so dass einzelne Daten nicht beeinflusst werden.

5.Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine neue nicht-invasive Methode zur Quantifizierung der Nierenfunktion von Mäusen mittels ^{18}F -Fluorid- PET zu etablieren.

Die gewonnenen Daten aus der ^{18}F - Fluorid PET zeigen eine gute Korrelation mit der bereits etablierten Methode der TER- MAG3. Die Methode bietet erstmals die Möglichkeit zeitliche Verlaufskontrollen der Nierenfunktion bei Mäusen unter nephrotoxischer Therapie zu erstellen und so den Einfluss verschiedener applizierter Substanzen auf die Funktion der Niere darzustellen. Darüberhinaus ist die seitengetrennte Analyse der Nierenfunktion durch das Verfahren möglich geworden. Großer Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Möglichkeiten der quantitativen Nierenfunktionsdiagnostik ist es, dass die Nierenfunktionsbestimmung bei Mäusen durch das PET nicht-invasiv möglich wird und somit die Urin- und Blutprobenkollektion sehr kleiner Volumina nicht mehr notwendig ist. Das hier entwickelte Verfahren reduziert somit verschiedenste, bei invasivem Vorgehen aber nicht zu vermeidende Fehlerquellen und trägt zusätzlich zu einer maßgeblichen Schonung der Versuchstiere bei.

6.Literatur

References

1. National Health and Nutrition Examination Surveys. Prevalence of chronic kidney disease stages by age group in NHANES 1988-1994 and 1999-2000. *Journal of the American Medical Association*. 2007.
2. Toto RD. Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1995 Nov;4(6):505,9; discussion 503-4.
3. Riches AC, Sharp JG, Thomas DB, Smith SV. Blood volume determination in the mouse. *J Physiol*. 1973 Jan;228(2):279-84.
4. Rahn KH, Heidenreich S, Bruckner D. How to assess glomerular function and damage in humans. *J Hypertens*. 1999 Mar;17(3):309-17.
5. Deetjen S, Hescheler, editor. *Physiologie*. 4. Auflage ed. Elsevier Urban Fischer Verlag; 2005.
6. Lorenz JN. Considerations for the evaluation of renal function in genetically engineered mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 Jan;10(1):65-9.
7. Roberts J, Chen B, Curtis LM, Agarwal A, Sanders PW, Zinn KR. Detection of early changes in renal function using ^{99m}Tc-MAG3 imaging in a murine model of ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct;293(4):F1408-12.
8. Florijn KW, Barendregt JN, Lentjes EG, van Dam W, Prodjosudjadi W, van Saase JL, et al. Glomerular filtration rate measurement by "single-shot" injection of inulin. *Kidney Int*. 1994 Jul;46(1):252-9.
9. Chantler C, Garnett ES, Parsons V, Veall N. Glomerular filtration rate measurement in man by the single injection methods using ⁵¹Cr-EDTA. *Clin Sci*. 1969 Aug;37(1):169-80.
10. Rehling M, Moller ML, Thamdrup B, Lund JO, Trap-Jensen J. Simultaneous measurement of renal clearance and plasma clearance of ^{99m}Tc-labelled diethylenetriaminepenta-acetate, ⁵¹Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate and inulin in man. *Clin Sci (Lond)*. 1984 May;66(5):613-9.
11. Blaufox MD, Aurell M, Bubeck B, Fommei E, Piepsz A, Russell C, et al. Report of the radionuclides in nephrourology committee on renal clearance. *J Nucl Med*. 1996 Nov;37(11):1883-90.
12. Brochner-Mortensen J. Current status on assessment and measurement of glomerular filtration rate. *Clin Physiol*. 1985 Feb;5(1):1-17.

13. Stacy BD, Thorburn GD. Chromium-51 ethylenediaminetetraacetate for estimation of glomerular filtration rate. *Science*. 1966 May 20;152(725):1076-7.
14. Carlsen JE, Moller ML, Lund JO, Trap-Jensen J. Comparison of four commercial tc-99m(sn)DTPA preparations used for the measurement of glomerular filtration rate: Concise communication. *J Nucl Med*. 1980 Feb;21(2):126-9.
15. Russell CD, Bischoff PG, Rowell KL, Kontzen F, Lloyd LK, Tauxe WN, et al. Quality control of tc-99m DTPA for measurement of glomerular filtration: Concise communication. *J Nucl Med*. 1983 Aug;24(8):722-7.
16. Rehling M, Nielsen LE, Marqvorsen J. Protein binding of 99Tcm-DTPA compared with other GFR tracers. *Nucl Med Commun*. 2001 Jun;22(6):617-23.
17. Zimmer AM, Pavel DG. Rapid miniaturized chromatographic quality-control procedures for tc-99m radiopharmaceuticals. *J Nucl Med*. 1977 Dec;18(12):1230-3.
18. Taylor A. Radionuclide renography: A personal approach. *Semin Nucl Med*. 1999 Apr;29(2):102-27.
19. Muller-Suur R, Bois-Svensson I, Mesko L. A comparative study of renal scintigraphy and clearance with 99mTc-MAG3 and 123I-hippurate in patients with renal disorders. *Contrib Nephrol*. 1990;79:32-5.
20. Takahashi N, Boysen G, Li F, Li Y, Swenberg JA. Tandem mass spectrometry measurements of creatinine in mouse plasma and urine for determining glomerular filtration rate. *Kidney Int*. 2007 Feb;71(3):266-71.
21. Yildiz A, Hayirli A, Okumus Z, Kaynar O, Kisa F. Physiological profile of juvenile rats: Effects of cage size and cage density. *Lab Anim (NY)*. 2007 Feb;36(2):28-38.
22. Spak CJ, Berg U, Ekstrand J. Renal clearance of fluoride in children and adolescents. *Pediatrics*. 1985 Mar;75(3):575-9.
23. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res*. 1994 Jun;8(1):5-14.
24. Whitford GM, Pashley DH, Stringer GI. Fluoride renal clearance: A pH-dependent event. *Am J Physiol*. 1976 Feb;230(2):527-32.
25. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jan;14(1):1-10.
26. Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology*. 2008 Jul 30;249(2-3):184-93.

27. Wieland BW, Bida GT, Padgett HC, Go H. Current status of CTI target systems for the production of PET radiochemicals. Proceedings of the 3rd Workshop on Targetry and Target Chemistry. 1989.
28. Schafers KP, Reader AJ, Kriens M, Knoess C, Schober O, Schafers M. Performance evaluation of the 32-module quadHIDAC small-animal PET scanner. *J Nucl Med.* 2005 Jun;46(6):996-1004.
29. Tankersley CG, Fitzgerald RS, Kleeberger SR. Differential control of ventilation among inbred strains of mice. *Am J Physiol.* 1994 Nov;267(5 Pt 2):R1371-7.
30. Hawkins RA, Choi Y, Huang SC, Hoh CK, Dahlbom M, Schiepers C, et al. Evaluation of the skeletal kinetics of fluorine-18-fluoride ion with PET. *J Nucl Med.* 1992 May;33(5):633-42.
31. Smuts D. B. Zur berechnung der körperoberfläche von maus, meerschweinchen und kaninchen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 1933(1):105-10.
32. Oberhausen E. Nuclear medicine measurement of lateraly separated kidney-clearance. *Rontgenpraxis.* 1974 Jan;27(1):11-6.
33. Bubeck B, Piepenburg R, Grethe U, Ehrig B, Hahn K. A new principle to normalize plasma concentrations allowing single-sample clearance determinations in both children and adults. *Eur J Nucl Med.* 1992;19(7):511-6.
34. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lopus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jan;14(1):1-10.
35. Meyer MH, Meyer RA,Jr, Gray RW, Irwin RL. Picric acid methods greatly overestimate serum creatinine in mice: More accurate results with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1985 Jan;144(1):285-90.
36. Schnockel U, Reuter S, Stegger L, Schlatter E, Schafers KP, Hermann S, et al. Dynamic (18)F-fluoride small animal PET to noninvasively assess renal function in rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008 Dec;35(12):2267-74.
37. Charkes ND, Brookes M, Makler PT,Jr. Studies of skeletal tracer kinetics: II. evaluation of a five-compartment model of [18F]fluoride kinetics in rats. *J Nucl Med.* 1979 Nov;20(11):1150-7.
38. Park-Holohan SJ, Blake GM, Fogelman I. Quantitative studies of bone using (18)F-fluoride and (99m)tc-methylene diphosphonate: Evaluation of renal and whole-blood kinetics. *Nucl Med Commun.* 2001 Sep;22(9):1037-44.
39. Kharasch ED, Frink EJ,Jr, Artru A, Michalowski P, Rooke GA, Nogami W. Long-duration low-flow sevoflurane and isoflurane effects on postoperative renal and hepatic function. *Anesth Analg.* 2001 Dec;93(6):1511,20, table of contents.

7. Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. O. Schober danke ich für seine Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit, dafür dass er mir den Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat und insbesondere dafür, dass er bereits im Rahmen meines Schulpraktikums mein Interesse an der Nuklearmedizin geweckt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfers für die Betreuung während meiner Zeit als Doktorand und dafür, dass er mir als Ansprechpartner bei Fragen und Diskussionen stets zur Seite gestanden hat.

Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle für die überaus sympathische und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und ihre Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit bei Frau Dr. Uta Schnöckel bedanken.

Für die stets flexible und präzise Mitarbeit, sowie tatkräftige Unterstützung der Medizinisch- Technischen Assistentinnen danke ich ganz herzlich Frau Anne Kanzog und Frau Christine Bätza.

Den Mitarbeitern(innen) der Medizinischen Klinik D des Universitätsklinikums Münster, Herr Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Schlatter, Herr Priv. Doz. Dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli, Dr. med. Stefan Reuter und Frau Julia Humberg gilt mein Dank für eine reibungslose Zusammenarbeit und die hervorragende fachliche Unterstützung, die zum Erfolg dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die jahrelange ideelle und finanzielle Unterstützung, bei der Westfälischen Wilhelms Universität Münster bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung durch Vergabe eines Promotionsabschlusstipendiums

Nicht zuletzt möchte ich einen meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin großen Dank aussprechen, die mich während meiner Arbeit immer wieder aufgebaut, ermuntert und gestützt haben

Daher danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Prof. Dr. Hans- Joachim Galla und Ulla Galla, und meinen beiden Brüdern, Dr. Dipl.- Phys. Tobias Galla und Dipl.- Phys. Sebastian Galla für den familiären Zusammenhalt, die konstruktiven Diskussionen und Anregungen, sowie für die Durchsicht meiner Arbeit.

Auch meiner Großmutter Edith Galla möchte ich an dieser Stelle für ihre stets aufmunternden und unterstützenden Worte danken.

Abschließend möchte ich meiner lieben Freundin Kun von ganzem Herzen für ihre Zuwendung, sowie für die Ruhe und Geduld, die Sie mir an jedem Tag entgegengebracht hat, meinen Dank aussprechen. Ihre liebevolle Unterstützung hat mir sehr geholfen, die zusätzliche Herausforderung der wissenschaftlichen Arbeit zu bestehen.

