

Aus der Klinik für Nuklearmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**<sup>18</sup>F-Natriumfluorid Knochenstoffwechsel und Nierenfunktionsuntersuchungen mittels  
<sup>99m</sup>Tc-Mercaptoacetyltriglycin bei Mäusen in Abhängigkeit von Stamm, Alter,  
Geschlecht und zirkadianem Rhythmus**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Viktoria Josefa Dorau-Rutke**

aus Hamburg

Datum der Promotion:

04. Juni 2021

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Abstract deutsch	3
2	Abstract english	4
3	Zusammenfassung	6
3.1	Einleitung	6
3.2	Material und Methodik	9
3.3	Ergebnisse	13
3.4	Diskussion	23
3.5	Schlussfolgerung	29
3.6	Literaturverzeichnis	30
4	Eidesstattliche Versicherung	35
5	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	36
6	Druckexemplare der Publikation	37
7	Lebenslauf	63
8	Publikationsliste	64
9	Danksagung	65

## 1 Abstract deutsch

**Einleitung:** Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der szintigraphischen Untersuchungsverfahren Skelett-PET und Nierenfunktionsszintigraphie bei Mäusen sowie die Erhebung von Normwerten für den Uptake radioaktiver Tracer in Knochen und Niere in Bezug auf Alter, Geschlecht und zirkadianem Rhythmus. Des Weiteren wurden zwei Mausstämme bezüglich Unterschieden in den Nierenparametern verglichen, sowie SCID-Mäuse auf Nierenschädigungen nach  $^{177}\text{Lu}$ -Somatostatin-Rezeptor-Liganden-Therapie untersucht.

**Methodik:** Der Knochen-Uptake von  $^{18}\text{F}$ -Na wurde mittels dynamischer und statischer Kleintier-PET/MRT ermittelt und die Nierenfunktion mittels dynamischer semistationärer Kleintier-SPECT-Akquisitionen mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3. Um die Einflussfaktoren Alter, Geschlecht und zirkadianer Rhythmus zu untersuchen, wurden in zwei Studien jeweils 12 weibliche und 12 männliche C57BL/6N-Mäuse im Alter von 1-24 Monaten mehrmals jeweils während der Ruhephase sowie der Wachphase in Isoflurannarkose untersucht. In der dritten Studie wurden vergleichend 12 weibliche und 12 männliche gesunde SCID-Mäuse bezüglich der Nierenfunktion sowie der Effekt der  $^{177}\text{Lu}$ -Therapie bei weiteren 6 weiblichen SCID-Mäusen mit neuroendokrinen Tumoren untersucht.

**Ergebnisse:** Der höchste Knochen-Uptake trat im Alter von 1 Monat mit einem Abfall ( $p < 0,001$ ) mit 3 Monaten auf, tendenziell gefolgt von einem Anstieg ab 13 Monaten. Bei den Nieren zeigte sich ebenfalls ein altersabhängiger Einfluss auf  $T_{\text{max}}$ . Bei 1 Monate alten Tieren erfolgte  $T_{\text{max}}$  später als im Alter von 3 Monaten ( $p = 0,035$ ). Im weiteren Altersverlauf zeigten die Mäuse einen kontinuierlich späteren Zeitpunkt von  $T_{\text{max}}$  bis 22 Monate ( $p < 0,001$ ).

Weibchen zeigten ein kleineres Knochenvolumen als Männchen ( $p < 0,001$ ). Zudem zeigten Weibchen sowohl einen höheren Gesamt-Uptake ( $p = 0,026$ ) als auch einen höheren Uptake je ml Knochengewebe ( $p < 0,001$ ). Bei der Nierenfunktion zeigten Weibchen ab einem Alter von 3 Monaten ein späteres  $T_{\text{max}}$  als Männchen ( $p < 0,001$ ).

Nur bei Weibchen im Alter von 3 und 6 Monaten zeigte sich ein signifikant höherer Knochen-Uptake während der Ruhephase. Nur in gepoolten Daten der Nierenstudie erfolgte  $T_{\text{max}}$  während der Ruhephase später als während der Wachphase ( $p = 0,019$ ).

Beim Vergleich zwischen C57BL/6N und SCID Mäusen zeigten sich signifikante geschlechtsabhängige Unterschiede in den Nieren-Uptake-Kinetiken. Außerdem konnte eine Verschlechterung der Nierenfunktion durch  $^{177}\text{Lu}$ -Therapie nachgewiesen werden.

**Schlussfolgerung:** Geschlecht, Alter und zirkadianer Rhythmus sind wichtige Einflussfaktoren bei szintigraphischen Untersuchungen des Skeletts und der Nieren bei Mäusen. Daher müssen beim Studiendesign bezüglich des Knochen-Uptakes neben dem Geschlecht der Tiere bei Männchen das Alter und bei Weibchen das Alter sowie der zirkadiane Rhythmus als Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Bei Nierenstudien sollten die Faktoren Alter und Geschlecht berücksichtigt werden, während der zirkadiane Rhythmus vernachlässigbar erscheint. Zur Beurteilung einer Nephrotoxizität im Rahmen experimenteller Therapiestudien ist die Etablierung von Normwerten in Abhängigkeit von Mausstamm, Alter und Geschlecht wichtig.

## 2 Abstract english

**Introduction:** The aim of this thesis was to establish the scintigraphic procedures bone-PET and kidney-SPECT for mice and collect normal uptake values of radioactive tracers in bone and kidneys with regard to age, sex and circadian rhythm. Furthermore, a comparison of two different strains of mice was conducted to check for differences in scintigraphic kidney parameters. Additionally, SCID mice were tested for kidney damage after treatment with <sup>177</sup>Lu-somatostatine receptor ligands therapy.

**Methods:** Bone uptake of <sup>18</sup>F-Na was determined using dynamic and static PET/MR while kidney function was measured by dynamic semi-stationary SPECT with <sup>99m</sup>Tc-MAG3. To investigate a potential effect of age, sex and circadian rhythm in two studies, 12 female and 12 male C57BL/6N mice, respectively, were anaesthetised with isoflurane and imaged several times between 1-24 months of age during sleep and awake phase. In a third comparative study, kidney function was investigated in 12 female and 12 male healthy SCID as well as the effect of <sup>177</sup>Lu-therapy in further 6 female SCID mice with neuroendocrine tumours.

**Results:** The highest uptake in bone was found at age 1 month with a decrease ( $p < 0.001$ ) at age 3 months, followed by a non-significant increase from age 13 months. There was also an age-related impact on kidney function with respect to T<sub>max</sub>. At age 1 month, mice reached T<sub>max</sub> significantly later than at 3 months ( $p = 0.035$ ). As mice grew older, T<sub>max</sub> was continuously reached at later time points until 22 months ( $p < 0.001$ ).

Females revealed a smaller bone volume than males ( $p < 0.001$ ). Moreover, females showed both a higher total uptake in bone ( $p = 0.026$ ) and a higher uptake per ml bone volume ( $p < 0.001$ ). In

kidney function studies, females reached T<sub>max</sub> later than males from 3 months onwards (p<0.001).

Only in females at the age of 3 and 6 months a higher bone uptake during sleep phase occurred.

Only pooled kidney data indicate a later T<sub>max</sub> during sleep phase (p=0.019) than during awake phase.

Comparing C57BL/6N and SCID mice, significant sex related differences in kidney uptake kinetics were found. Furthermore, kidney damage could be indicated after <sup>177</sup>Lu-therapy.

**Conclusion:** Sex, age and circadian rhythm are important factors of influence on scintigraphic imaging of the skeleton and kidney function in mice. Thus, for studies on bone uptake sex in general, and in males age, and in females age and circadian rhythm should be taken into account. For studies on kidney function, sex and age are important parameters while circadian rhythm seems negligible. For the assessment of nephrotoxic effects of experimental treatment regimens, the establishment of normal values with respect to mouse strain, age and sex seems important.

### 3 Zusammenfassung

#### 3.1 Einleitung

In der Nuklearmedizin kommt es zur Anwendung von offenen Radionukliden zu funktions- und lokalisationsdiagnostischen sowie therapeutischen Zwecken. Hierbei wird bei der Entwicklung und Prüfung neuer Radiopharmazeutika (Tracer, Kopplung eines Radionuklids an einen Vektor) für die bildgebende Diagnostik sowie für die Therapie verschiedener Erkrankungen häufig als Tiermodell die Maus verwendet. Die Ermittlung von Normwerten zur Darstellung von Organfunktionen und Detektion von Einflussfaktoren bei der Maus stellt somit eine essentielle Grundlage für die weitere experimentelle Forschung und translationale Medizin dar. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Erhebung von Normwerten für den  $^{18}\text{F}$ -Natriumfluorid( $^{18}\text{F}$ -NaF)-Knochenstoffwechsel bei Mäusen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und zirkadianem Rhythmus. Hierfür wurde ein Positronen-Emissions-Tomographiegerät (PET) verwendet, das den  $\beta^+$ -Zerfall des Positronenstrahlers  $^{18}\text{F}$ Fluor indirekt mittels der daraus entstehenden Vernichtungsstrahlung in Form von zwei Photonen detektiert. Des Weiteren wurden bei Mäusen Nierenfunktionsuntersuchungen mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyl-triglycin ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3) durchgeführt. Anschließend wurden zusätzlich die Nierenfunktion zweier Mausstämme verglichen, sowie die Untersuchung des Einflusses einer onkologischen Radionuklidtherapie auf die Nierenfunktion durchgeführt. Hierfür diente ein Single-Photonen-Emissions-Computer-Tomographiegerät (SPECT) zur Darstellung des Verteilungsmusters des  $\gamma$ -Strahlers  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).

In der Medizin wird  $^{18}\text{F}$ -NaF meist in der Onkologie zur Visualisierung von Skelettmetastasen genutzt<sup>1</sup>. Ebenso kommt  $^{18}\text{F}$ -NaF bei entzündlichen Gelenkerkrankungen mit Knochenbeteiligung wie Arthritis, Autoimmunerkrankungen oder degenerativen Erkrankungen wie Osteoporose zum Einsatz<sup>2-4</sup>. Erstmals verwendet wurde es 1962 von Blau et al.. Da die damals verwendeten Gammakameras aber nicht auf die hohe Emission von 511 keV von  $^{18}\text{F}$  ausgelegt waren, wurden zunehmend andere  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierte Knochentracer bevorzugt<sup>5, 6</sup>. Die Einführung von PET-Geräten seit 1975 hat die Verwendung von  $^{18}\text{F}$ -NaF befördert, allerdings sind wesentliche Nachteile die hohen Anschaffungskosten der PET-Geräte, wenige Zyklotrone zur Herstellung der PET-Tracer und damit lange Transportwege<sup>7</sup>. Mit der Entwicklung von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Methyldiphosphonat ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP) in den 1970er Jahren bestand lange kein klinisches Interesse an  $^{18}\text{F}$ -NaF. Bis heute ist die Nutzung von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP als Knochentracer

weit verbreitet, während  $^{18}\text{F}$ -NaF primär für wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt wird<sup>7-9</sup>.

Mit der Zunahme der Bedeutsamkeit von  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) als Tracer in der onkologischen Diagnostik kam es zu einem Anstieg von PET-Geräten in nuklearmedizinischen Kliniken sowie zur Optimierung der Herstellung von PET-Tracern und der Transportwege<sup>7</sup>. Folglich gewann  $^{18}\text{F}$ -NaF als Nebenprodukt bei der Herstellung von  $^{18}\text{F}$ -FDG zunehmend mehr wissenschaftliches Interesse. Die Entwicklung von Hybridgeräten in Kombination mit der Computer-Tomographie (CT) oder Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) wie PET/CT und PET/MRT seit 2001 steigerte die Ortsauflösung auf bis zu 4 mm bei Geräten für den klinischen Gebrauch und damit die Genauigkeit der Untersuchung<sup>10</sup>. Zwei Studien von Hillner et al. (2014) bestätigten die Überlegenheit der PET-Untersuchung mit  $^{18}\text{F}$ -NaF gegenüber der Skelettszintigraphie und der SPECT. Sie konnten aufzeigen, dass durch die Erfassung selbst kleiner Läsionen im Knochen das Therapieregime bei Tumorerkrankungen frühzeitig verändert wurde<sup>11, 12</sup>.

Aufgrund der aktuell höheren Kosten einer PET-Untersuchung im Vergleich zur SPECT-Untersuchung sowie der geringeren Verbreitung von PET-Geräten und den höheren Kosten bei der Herstellung von  $^{18}\text{F}$ -NaF sowie der geringeren Halbwertszeit (109,8 min) und somit einer größeren Zeitabhängigkeit bei den Untersuchungen mit  $^{18}\text{F}$ -NaF, ist die Verwendung von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP bei Knochenuntersuchungen weiterhin das Mittel der Wahl<sup>7, 13, 14</sup>. Ein Vorteil von  $^{18}\text{F}$ -NaF ist die geringere Untersuchungszeit der PET-Geräte, wodurch es zu weniger Bewegungsartefakten kommt; auch wird das Radionuklid durch die geringere Halbwertszeit schneller aus dem Körper eliminiert<sup>7, 13</sup>. Ebenfalls spielt  $^{18}\text{F}$ -NaF insbesondere in der nuklearmedizinischen Knochenstoffwechselforschung eine wesentliche Rolle.

Erste nuklearmedizinische Untersuchungen der Niere fanden bereits 1956 mit  $^{131}\text{I}$ -Diodrast statt<sup>15, 16</sup> und haben sich seitdem stetig weiterentwickelt. Wurden damals mittels dieser Untersuchungen Nierenbeckenstenosen, Nierenarterienstenosen und die tubuläre Nekrose nachgewiesen<sup>17</sup>, liegt der heutige Fokus hauptsächlich auf der Funktionsdarstellung durch die Ermittlung der renalen Clearance, der Funktions-Seitentrennung sowie der Detektion von Funktions- und Abflußstörungen<sup>18</sup>. Hierbei ist die Ausscheidung des Tracers über die Nieren in Abhängigkeit von der Zeit besonders relevant. Der maximale Uptake ( $T_{\text{max}}$ ), die Eliminierung der Strahlung um die Hälfte ( $T_{50}$  bezogen auf  $T_{\text{max}}$ )<sup>19-21</sup> sowie von 75 % ( $T_{25}$ ) sind wichtige diagnostische Parameter. Alter, Geschlecht und zirkadianer Rhythmus sind Faktoren, die Einfluss auf diese Parameter haben können.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 ist der heutzutage verwendete Standardtracer für die Nierenszintigraphie, es wird tubulär aufgenommen und sezerniert<sup>22</sup>.

Häufig werden Radionuklide, die in der Therapie eingesetzt werden, über die Nieren ausgeschieden bzw. teilweise in diesen tubulär akkumuliert und können somit die Nierenfunktion beeinflussen. Dies kann schwerwiegende Folgen für den gesamten Organismus haben, da die Niere neben der Entgiftung des Körpers auch für die Regulation des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes, des pH-Wertes im Blut, des Blutdrucks, sowie der Vitamin-D-Produktion und der Blutbildung durch die Produktion von Erythropoetin zuständig ist. Daher ist von großer Bedeutung, dass bei der Entwicklung neuer Radionuklidtherapien ein negativer Einfluss auf die Nierenfunktion minimiert wird.

Die vorliegende Arbeit wurde initiiert, da bis zum heutigen Stand nur wenige Studien zum Knochen-Uptake von  $^{18}\text{F}$ -NaF und zu Nierenfunktionsuntersuchungen mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 bei Mäusen existieren und keinerlei Vergleichs/Normwerte vorliegen, wie das im klinischen Bereich Standard ist. Damit fehlen aktuell Normwerte für tierexperimentelle und translationale Studien. Neben der Untersuchung von potentiellen Einflussfaktoren wie Mausstamm, Geschlecht, Alter, zirkadianem Rhythmus und Radionuklidtherapien sollten auch standardisierte und reproduzierbare Untersuchungsprotokolle erarbeitet werden.



## 3.2 Material und Methodik

### *Versuchstiere und Studiendesign*

Die Versuche wurden wie vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo; G0353/12) genehmigt durchgeführt.

Für die Ermittlung der Normwerte für den  $^{18}\text{F}$ -NaF-Knochenstoffwechsel<sup>23</sup> sowie für die Nierenfunktionsuntersuchungen<sup>24</sup> wurden jeweils 12 weibliche und 12 männliche gesunde C57BL/6N Mäuse, ein häufig verwendeter Inzuchtstamm, eingesetzt. Die Tiere wurden im Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (BERIC) der Charité – Universitätsmedizin Berlin untersucht und dort in der Tierhaltung unter standardisierten Bedingungen mit einem 12-Stunden-Rhythmus mit Tageslicht (7.00-19.00 Uhr) und Dunkelheit (19.00 – 7.00 Uhr) gehalten. Jedes Tier wurde in Longitudinalstudien zu folgenden Zeitpunkten untersucht: Im jugendlichen Alter von einem Monat, mit 3 Monaten (geschlechtsreif, jedoch nicht vollständig ausgewachsen), mit 6 Monaten (vollständig ausgewachsen), im Alter von 12-13 Monaten (alt) und in einem Greisenalter von 21-24 Monaten. Um mögliche Unterschiede in Abhängigkeit vom zirkadianen Rhythmus feststellen zu können, erfolgten die Untersuchungen in jeder Altersgruppe jeweils in der ersten Hälfte des Tages (8.00 - 14.00 Uhr), welche der Ruhe- und Schlafphase der Mäuse entspricht, sowie in der ersten Hälfte der Nacht (17.00 - 00.30 Uhr) während der Wach- bzw. Aktivitätsphase. Damit die Belastung der Untersuchungen für die juvenilen Mäuse (1 Monat) reduziert wurde, wurde hier jeweils nur eine Untersuchung durchgeführt. Um den Narkoseeffekt auf eine nachfolgende Untersuchung auszuschließen, wurden mindestens 72 Stunden zwischen zwei Untersuchungen eingehalten.

Während der longitudinalen Untersuchung mussten einige Mäuse aufgrund von gesundheitlichen Problemen oder Tod aus der Studie ausgeschlossen werden. So nahm die Zahl der Versuchstiere während der 24 Monate ab. Es wurden keine Ersatztiere neu eingeschlossen, da auf die longitudinale Untersuchungsfolge Wert gelegt wurde. Details zur Anzahl der Tiere zu den einzelnen Studienzeitpunkten sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Um potentielle Mausstammunterschiede in der Nierenfunktion untersuchen zu können, wurden weitere 12 weibliche und 12 männliche gesunde Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mäuse im Alter von 3 Monaten untersucht. Für die Detektion von Nierenfunktionsstörungen durch Radionuklidtherapien bei der Maus wurden zusätzlich 6 weibliche SCID Mäuse im Alter von 5-10 Monaten mit neuroendokrinen Pankreastumoren (NET, 4 orthotop, 2 subkutan), welche zuvor ein bis zwei  $^{177}\text{Lu}$ -Somatostatin-Receptor-Liganden ( $^{177}\text{Lu}$ -SRL)

Therapiezyklen mit etwa 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC oder  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 erhalten haben, untersucht<sup>25</sup>.

Aufgrund des geringen Blutvolumens von 1,7 ml einer 25 g Maus war eine wiederholte Bestimmung von Laborparametern (z.B. Serum-Kreatinin) aus dem Blut am lebenden Versuchstier nicht möglich.

Die Mäuse wurden für die Tracerinjektion und während der Bildakquisition mit einem 1-2 %igen Isofluransauerstoffgemisch narkotisiert. Für die Injektion in die Schwanzvene wurde eine 30 G Kanüle verwendet, an welche ein 0,28 x 0,61 mm Katheter (A. Hartenstein, Portex, Deutschland) befestigt war. Der Katheter wurde mit 2 IE Heparin (Medunasal)/ml 0,9 % NaCl befüllt. Für die Untersuchung des Einflusses des zirkadianen Rhythmus auf den Knochen bzw. die Nierenfunktion erfolgten die Tracerinjektionen (max. 0,2 ml) von ca. 20 MBq  $^{18}\text{F}$ -NaF bzw. 50 MBq  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 entweder zwischen 8.00 und 14 Uhr oder zwischen 17.00 und 0.30 Uhr. Für Kinetikuntersuchungen erfolgte die Injektion direkt nach Beginn der Bildakquisition. Während der Bildakquisition lagen die Mäuse in einem beheizten Narkosebett (37°C), und mit einem Atemkissen unter dem Abdomen wurde die Atemfrequenz überwacht und entsprechend die Narkose justiert.

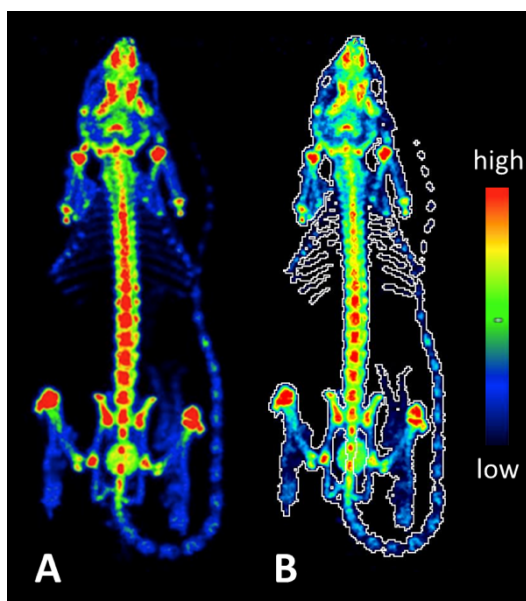
### ***PET/MRT-Bildgebung und Auswertung***

Die  $^{18}\text{F}$ -NaF-Knochenuntersuchungen wurden in einem 1 Tesla nanoScan PET/MRI Gerät (Mediso, Hungary) durchgeführt<sup>23</sup>. Für Kinetikuntersuchungen des Knochenuptakes wurde das erste Tier einer Untergruppe des jeweiligen Untersuchungstages für 120 min untersucht. Die generierten Rohdaten wurden in Listmode generiert, indem einzelne detektierte Strahlenereignisse in zeitlicher Reihenfolge ihres Auftretens einzeln in einer Liste gesammelt und anschließend beliebig, für unsere Auswertungen in 12 x 10 min Bildern rekonstruiert werden konnten. Zusätzlich wurden die letzten 30 min der 120 min Akquisition in ein Bild rekonstruiert. In allen weiteren Tieren erfolgte eine 30 min PET-Akquisition nach ca. 95 min Inkubation (im Wachzustand) des Tracers. Die Schwächungskorrektur der PET-Bilder erfolgte mit dem jeweilig dazugehörigem MRT-Bild.

Bezüglich der Knochen volumina bediente sich unsere Arbeitsgruppe schon vorhandener Aufnahmen mittels Computertomographie (CT; NanoSPECT/CTplus, Mediso, Hungary / Bioscan, France) einer weiteren Studie mit ähnlichem Studiendesign (unpublizierte Daten). Dazu wurden die Knochen volumina der C57BL/6N Mäuse mit deren Körpergewichten korreliert und dann das Gewicht der Mäuse aus der vorliegenden Arbeit zur Analyse ihrer Knochen volumina verwendet. Da weibliche C57BL/6N Mäuse bis zu einem Alter von 3

Monaten und männliche Mäuse bis zu 6 Monaten wachsen und danach nur noch an Körpergewicht zunehmen, wurde die Korrelation entsprechend angepasst.

Für die Quantifizierung des Knochen-Uptakes von  $^{18}\text{F}$ -NaF wurde das Programm PMOD 3.5 (PMOD Technologies Ltd., Switzerland) benutzt. Alle Artefakte sowie nicht Knochen-gebundene Aktivität wurden manuell herausgeschnitten. Anschließend wurde eine Volume-of-Interest (VOI, Abbildung 1) mittels eines Schwellenwerts von 1,5 über das Skelett gelegt und somit der prozentuale Uptake der injizierten Aktivität im gesamten Skelett (%IA) beziehungsweise in Relation zum Knochenvolumen (%IA/ml) berechnet.

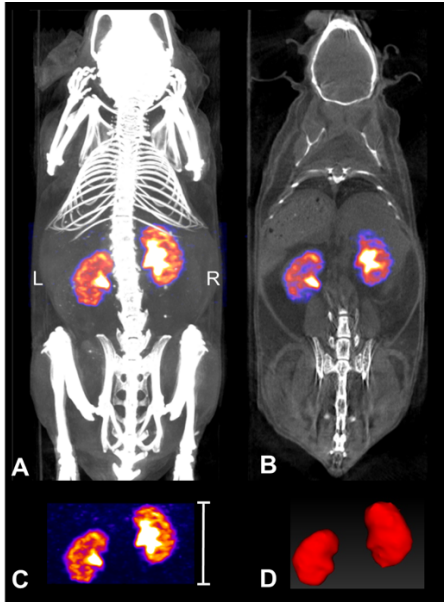


**Abb. 1:** Ganzkörper PET einer 3 Monate alten weiblichen C57BL/6N Maus nach Injektion von 20 MBq  $^{18}\text{F}$ -NaF (A). Volume of Interest (VOI) des Knochen-Uptakes über einer repräsentativen coronaren Schicht (B)<sup>23</sup>.

### ***SPECT/CT Bildgebung und Auswertung***

Die SPECT-Untersuchungen zur Nierenzintigraphie wurden mit dem NanoSPECT/CTplus Gerät (Mediso, Hungary /Bioscan, France) durchgeführt. Um die Sekretionskinetik der Nieren untersuchen zu können, wurden 68 Bilder in einer Gesamtdauer von 35 min im semi-stationären Modus dynamisch akquiriert<sup>24, 25</sup>. Die anschließende Bildauswertung erfolgte mit manuellem Einzeichnen einer VOI (Abbildung 2) um die Niere (renaler Cortex, Mark, Nierenbeckenkelchsystem) mittels der Software VivoQuant 1.22 (inviCRO LCC., USA) bzw. PMOD 3.5 (PMOD Technologies Ltd., Switzerland). Zu jeder Niere wurde eine Zeit-Aktivitäts-Kurve (TAC) erzeugt, welche die absolute Aktivität jeder VOI im Verhältnis zur Zeit darstellt. T<sub>max</sub>, T<sub>50</sub> (50

% des Nuklids sind ausgeschieden) und  $T_{25}$  (75 % des Nuklids sind ausgeschieden) wurden anhand der TAC berechnet.



**Abb. 2:** SPECT Bilder einer 12-Monate-alten weiblichen Maus 12 min nach intravenöser Injektion von 30 MBq  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG3. A zeigt fusionierte SPECT/CT Bilder maximaler Intensität, B in coronarer Projektion. Semi-stationäres SPECT mit einem axialen FOV von 14 mm (C; Skala = 14 mm). D zeigt eine 3-dimensionale VOI beider Nieren<sup>24</sup>.

### ***Statistik***

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit R 3.6.3 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) bzw. Matlab R2017b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, United States). Die Ergebnisse sind als Median, Interquartilabstand [IQR, 25.-75. Perzentile] und Minimum-Maximum angegeben sowie mittels Boxplots dargestellt. Gepaarte Daten mit mehr als zwei Gruppen wurden mittels Friedman-Test analysiert. Um den Alphafehler zu korrigieren, wurde die Bonferroni-Holm-Methode eingesetzt, und zum Vergleich ungepaarter Daten der Mann-Whitney-U (MWU) Test genutzt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant bewertet. Der Zusammenhang von zwei metrischen Parametern ist mittels Spearman's rho-Korrelationskoeffizient analysiert worden<sup>23-25</sup>.

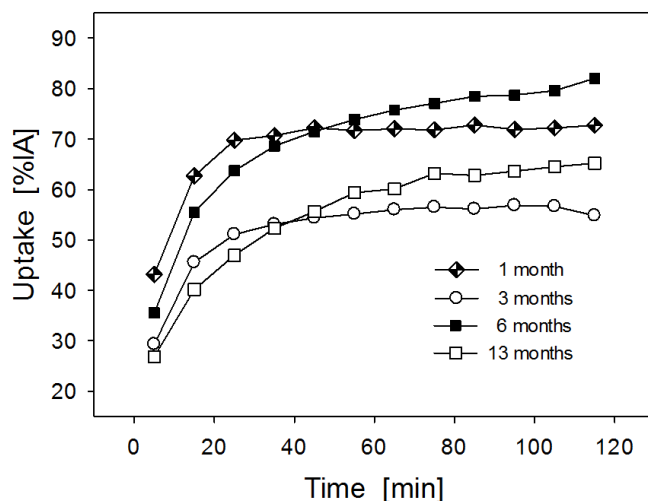
### 3.3 Ergebnisse

#### Knochen

##### *Uptake-Kinetik von $^{18}\text{F-NaF}$*

Abbildung 3 zeigt beispielhaft Kinetikdaten des Knochen-Uptakes zu verschiedenen Altersstufen einer Maus während 120 min nach Injektion von  $^{18}\text{F-NaF}$ .

In gepoolten Daten tritt bei allen Mäusen der Zeitpunkt des maximalen Knochen-Uptakes ( $T_{\text{max}}$ ) im Alter von 1 Monat mit 85 min [60-110] 60-110 auf, bei 3 Monaten mit 86 min [82-90] 72-107 und bei 6 Monaten mit 94 min [72-97] 30-110. Mit 13 Monaten kommt es zu einem signifikant späteren Anstieg des maximalen Uptakes mit 110 min [110-110] 109-110;  $p = 0,019$  bei geschlechtsgepoolten Daten; jedoch nicht reproduzierbar bei geschlechtsabhängigen Daten. Sobald  $T_{\text{max}}$  erreicht wird, kommt es während der weiteren Untersuchungszeit zu keinem Abfall des Plateaus. Folglich wurden alle weiteren PET-Untersuchungen ca. 95 min nach Injektion von  $^{18}\text{F-NaF}$  begonnen, mit einer Dauer von 30 min.



**Abb. 3:** Kinetikkurven von 12 konsekutiven 10 min PET-Bildern des Knochen-Uptakes mit Beginn zum Zeitpunkt der Injektion von jeweils 11-13 MBq  $^{18}\text{F-NaF}$  bei einer weiblichen Maus im Alter von 1, 3, 6 und 13 Monaten<sup>23</sup>.

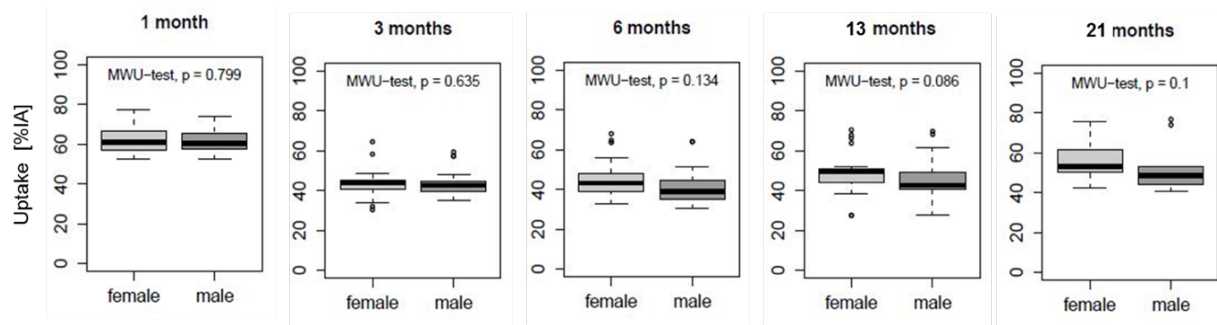
### ***Gesamt-Knochen-Uptake von $^{18}\text{F-NaF}$ (%IA)***

Im Durchschnitt zeigen die Mäuse einen  $^{18}\text{F-NaF}$ -Uptake von 45,4 %IA [41,1-55,8] 27,5-77,6. Tabelle 1 zeigt die ermittelten Werte des Gesamt-Uptakes (%IA) von  $^{18}\text{F-NaF}$  im Skelett in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und zirkadianem Rhythmus.

*Zirkadianer Rhythmus:* Bei gepoolten Daten zeigt sich ein signifikant höherer Uptake während der Schlafphase (48,2 %IA [43,6-57,7] 27,5-77,6) im Vergleich zur Wachphase (43,1 %IA [37,8-52,2] 27,5-76,8;  $p < 0,001$ ). Jedoch geschlechtsspezifisch lässt sich nur bei den Weibchen ein Einfluss des zirkadianen Rhythmus nachweisen, indem der Uptake während der Schlafphase (50,5 %IA [44,8-59,1] 27,5-77,6) signifikant höher als während der Wachphase (43,6 %IA [39,6-50,1] 27,6-75,7;  $p = 0,001$ ) ist. Bei den Männchen ist kein signifikanter Unterschied zwischen Schlafphase (44,6 %IA [41,0-50,6] 30,4-74,0) und Wachphase zu sehen (42,8 %IA [36,7-55,4] 27,5-76,8;  $p = 0,264$ ). Im Hinblick auf die unterschiedlichen Altersgruppen zeigen auch hier nur die Weibchen einen höheren Uptake in der Schlafphase im Alter von 3 Monaten ( $p = 0,007$ ) und 6 Monaten ( $p = 0,034$ ).

*Geschlecht:* Generell haben weibliche Mäuse (48,2 %IA [42,2-57,1] 27,5-77,6) einen signifikant höheren Knochen-Uptake als Männchen (43,8 %IA [39,6-52,6] 27,5-76,8;  $p = 0,026$ ). Jedoch entfällt dieser Unterschied, wenn die Geschlechter innerhalb einer Altersstufe miteinander verglichen werden (Abbildung 4).

*Alter:* Bezogen auf das Alter der Mäuse zeigen sich deutliche Unterschiede im Uptake ( $p < 0,001$ ). Den höchsten Uptake zeigen die jüngsten Mäuse im Alter von 1 Monat (61,1 %IA [57,7-66,4] 52,5-77,6) mit einem signifikanten Abfall im Alter von 3 Monaten (43,6 %IA [40,5-45,4] 30,4-64,5;  $p < 0,001$ ). Zwischen 13 Monaten (47,3 %IA [41,4-50,0] 27,5-70,5) und 21 Monaten (52,2 %IA [48,4-60,4] 40,6-76,8;  $p = 0,015$ ) steigt der Uptake wieder signifikant an. Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung ist sowohl bei den weiblichen als auch den männlichen Mäusen im Alter von 1 bis 3 Monaten der Abfall im Uptake signifikant ( $p < 0,001$ ). Der Anstieg zwischen 13 und 21 Monaten hingegen zeigt nur bei den Weibchen eine Tendenz ( $p = 0,07$ ) und ist bei den Männchen nicht signifikant ( $p = 1,0$ ).



**Abb. 4:**  $^{18}\text{F}$ -NaF Knochen-Uptake (%IA) in Mäusen bezogen auf Alter und Geschlecht<sup>23</sup>.

### ***Knochen-Uptake von $^{18}\text{F}$ -NaF bezogen auf das Knochenvolumen (%IA/ml)***

Allgemein zeigen die CT Untersuchungen von Mäusen, dass Weibchen (1,79 ml [1,66-1,92] 1,25-2,01) im Vergleich zu Männchen (1,99 ml [1,89-2,03] 1,21-2,05) ein signifikant kleineres Knochenvolumen haben ( $p < 0,001$ ). Im Alter von 1 Monat finden sich jedoch noch keine signifikanten Unterschiede im Knochenvolumen zwischen den Geschlechtern ( $p = 0,29$ ). Das Skelett der weiblichen Mäuse wächst bis zu einem Alter von 3 Monaten (1,8 ml [1,73-1,92] 1,66-2,01;  $p < 0,001$ ) und bei den Männchen bis zu einem Alter von 6 Monaten (2,03 ml [1,99-2,05] 1,89-2,05;  $p < 0,001$ ).

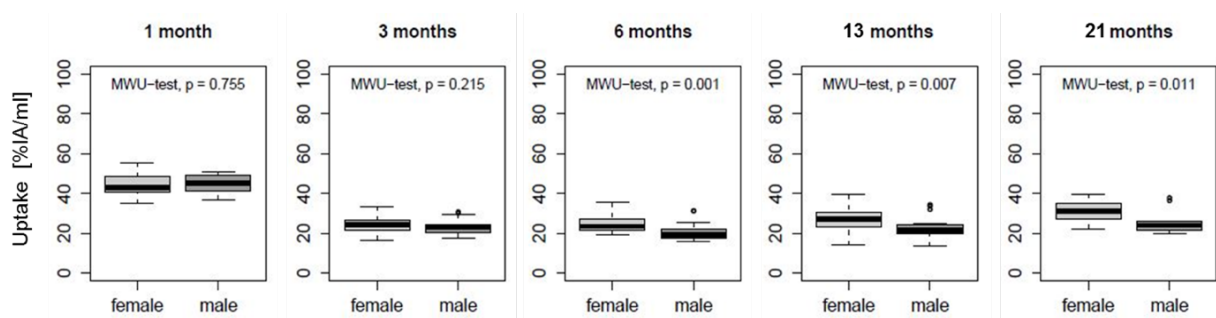
Bei gepoolten Daten zeigen die Mäuse in Relation zum Knochenvolumen einen  $^{18}\text{F}$ -NaF-Uptake von 24,6 %IA/ml [21,2-31,6] 13,6-55,4. Die Spannweite der Werte (Minimum-Maximum) verringert sich somit auf 41,8 % für IA/ml, im Vergleich zu 50,1 % für IA des Gesamt-Uptakes. Eine Zusammenfassung des Knochen-Uptakes bezogen auf das Knochenvolumen (IA%/ml) in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und zirkadianem Rhythmus ist in Tabelle 2 aufgeführt.

*Zirkadianer Rhythmus:* Wie beim Gesamt-Uptake zeigt der Knochen-Uptake bezogen auf das Knochenvolumen nur bei weiblichen Mäusen einen Einfluss des zirkadianen Rhythmus, wobei der Uptake während der Schlafphase (29,3 %IA/ml [25,4-35,3] 14,0-55,4) signifikant höher als während der Wachphase (24,6 %IA/ml [20,9-28,0] 14,4-38,8;  $p < 0,001$ ) ist. Bei den Männchen ist kein signifikanter Unterschied zwischen Schlafphase (23,1 %IA/ml [20,4-25,0] 15,7-51,1) und Wachphase zu sehen (21,7 %IA/ml [19,3-30,1] 13,6-50,4;  $p = 0,215$ ). Im Hinblick auf die unterschiedlichen Altersgruppen zeigen auch hier nur die Weibchen einen höheren Uptake in der Schlafphase im Alter von 3 Monaten ( $p = 0,005$ ) und 6 Monaten ( $p = 0,027$ ).

*Geschlecht:* Da die weiblichen Tiere im Gegensatz zu den Männchen bereits beim Gesamt-Uptake höhere  $^{18}\text{F}$ -NaF-Uptake-Werte aufweisen, haben diese mit einem kleineren Knochenvolumen auch einen höheren Uptake je ml Knochengewebe (Weibchen 27,0 %IA/ml [23,1-33,5] 14,0-55,4; Männchen 22,4 %IA/ml [20,0-26,8] 13,6-51,1;  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz zum

Gesamt-Uptake zeigen die Werte je ml Knochengewebe auch in den Altersgruppen 6 bis 21 Monate bei den Weibchen einen signifikant höheren Uptake (Abbildung 5).

*Alter:* Wie beim Gesamt-Uptake zeigt sich auch beim Uptake bezogen auf das Knochenvolumen, dass der Uptake vom Alter der Mäuse abhängig ( $p < 0,001$ ) ist. Der höchste Uptake findet sich im Alter von 1 Monat (44,5 %IA/ml [41,1-48,8] 35,0-55,4), mit einem signifikanten Abfall ( $p < 0,001$ ) mit 3 Monaten (23,6 %IA/ml [20,7-24,9] 16,5-33,6). Zwischen 13 Monaten (24,5 %IA/ml [20,6-29,8] 13,6-39,4) und 21 Monaten (28,1 %IA/ml [24,5-35,3] 20,0-39,8;  $p = 0,098$ ) steigt der Uptake wieder an. Geschlechtsspezifisch zeigt sich ebenfalls bei Weibchen ( $p < 0,001$ ) und Männchen ( $p < 0,001$ ) ein Abfall im Uptake zwischen 1 und 3 Monaten. Jedoch ist kein erneuter Anstieg zwischen 13 und 21 Monaten zu sehen (Weibchen  $p = 0,66$ , Männchen  $p = 1,0$ ).



**Abb. 5:**  $^{18}\text{F}$ -NaF Knochen-Uptake in Relation zum Knochenvolumen (%IA/ml) bei Mäusen bezogen auf Alter und Geschlecht<sup>23</sup>.



**Tabelle 1:**  $^{18}\text{F}$ -NaF Knochen-Gesamt-Uptake (%IA) in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und zirkadianem Rhythmus<sup>23</sup>.

Sex	Age (months)	1 month		3 months		6 months		13 months		21 months	
	(%IA)	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake
females	median	61.1	n.a.	45.4	41.3	44.6	39.3	48.9	49.3	55.8	53.0
	[IQR]	[57.5-66.4]		[44.1-46.7]	[38.1-43.2]	[43.1-49.6]	[36.6-43.1]	[44.0-51.4]	[43.9-50.0]	[50.7-61.0]	[46.6-59.8]
	min – max	52.5-77.6		37.7-64.5	30.4-45.4	39.4-68.1	32.7-64.7	27.5-70.5	27.6-67.9	49.7-72.9	42.1-75.7
	no. of animals	12		12	12	12	12	12	11	10	10
males	median	63.4	58.6	43.6	42.7	43.2	36.4	42.6	43.4	48.9	44.4
	[IQR]	[57.7-67.3]	[57.5-60.3]	[41.7-45.1]	[37.0-44.3]	[38.7-45.3]	[34.3-40.6]	[40.4-48.2]	[41.3-58.3]	[48.2-49.7]	[43.8-53.0]
	min – max	52.5-73.7	55.4-64.5	36.7-57.2	34.8-59.4	30.4-64.2	31.6-64.0	36.6-49.7	27.5-69.8	41.3-74.0	40.6-76.8
	no. of animals	8	4	12	11	12	11	10	10	5	5

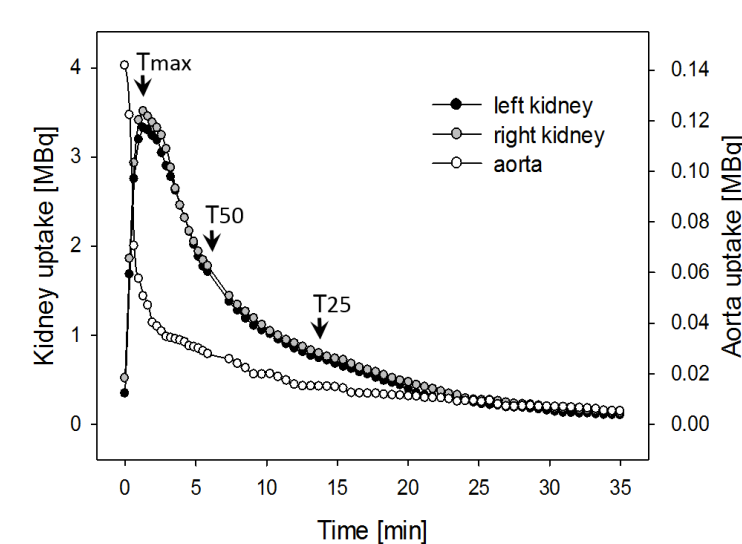
**Tabelle 2:**  $^{18}\text{F}$ -NaF Knochen-Uptake (%IA/ml) in Relation zum Knochenvolumen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus<sup>23</sup>.

Sex	Age (months)	1 month		3 months		6 months		13 months		21 months	
	(%IA/ml)	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake
females	median	42.9	n.a.	26.3	23.4	25.5	22.2	28.5	26.5	31.1	29.7
	[IQR]	[41.1-48.0]		[23.7-27.5]	[20.2-24.6]	[22.5-28.3]	[20.0-23.9]	[23.6-30.6]	[22.8-29.9]	[28.5-35.3]	[26.1-35.6]
	min – max	35.0-55.4		18.8-33.6	16.5-25.0	20.5-35.5	19.3-33.7	14.0-39.4	14.4-38.8	25.9-39.8	22.2-38.4
	no. of animals	12		12	12	12	12	12	11	10	10
males	median	45.2	44.3	23.4	22.6	21.4	18.4	21.4	21.5	24.5	22.3
	[IQR]	[43.3-49.0]	[41.3-46.9]	[21.7-24.3]	[19.6-24.2]	[19.2-22.2]	[16.8-20.5]	[19.8-23.9]	[20.2-30.0]	[23.5-24.6]	[21.4-25.9]
	min – max	40.0-51.1	36.9-50.4	20.3-29.7	17.8-30.8	15.7-31.3	16.4-31.2	18.4-24.6	13.6-34.4	20.1-36.5	20.0-37.8
	no. of animals	8	4	12	11	12	11	10	10	5	5

## Niere

### *Uptake-Kinetik von $^{99m}\text{Tc-MAG3}$ bei C57BL/6N Mäusen*

Abbildung 6 zeigt eine typische TAC für den  $^{99m}\text{Tc-MAG3}$ -Nieren-Uptake und die Clearance bei einer C57BL/6N Maus. Alle untersuchten gesunden Mäuse weisen einen fast kongruenten Verlauf der TAC der rechten und linken Niere auf, mit einem mittleren Unterschied von 2 % [-0,5-4,7] -24,3-30,1. Der Uptake von  $^{99m}\text{Tc-MAG3}$  steigt nach Injektion schnell an und erreicht  $T_{\text{max}}$  bei 1,9 min [1,6-2,2] 1,3-8,2. Der Abfall ist deutlich langsamer mit  $T_{50}$  bei 6,3 min [5,4-7,7] 4,0-34,9 und  $T_{25}$  nach 10,4 min [9,0-12,8] 6,6-34,9. Beim Untersuchungsende nach 35 Minuten sind noch ca. 10 % der Aktivität in den Nieren zu finden.



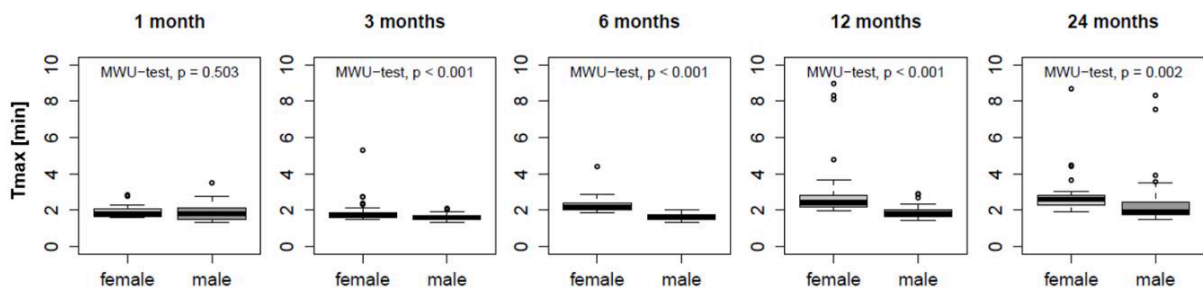
**Abb. 6:** Zeitaktivitätskurven (TAC) dynamischer SPECT-Untersuchungen (68 Einzelbilder) der Nieren bei einer 1 Monate alten weiblichen C57BL/6N Maus. Dargestellt ist der  $^{99m}\text{Tc-MAG3}$ -Uptake der Aorta sowie der linken und rechten Niere.<sup>24</sup>

*Zirkadianer Rhythmus:* Der zirkadiane Rhythmus hat einen signifikanten Einfluss auf den Zeitpunkt des Erreichens von  $T_{\text{max}}$  bei C57BL/6N Mäusen. Während der Schlafphase (2,0 min [1,7-2,4] 1,5-8,2) wird  $T_{\text{max}}$  marginal aber signifikant später erreicht als während der Wachphase (1,8 min [1,6-2,1] 1,3-4,1;  $p = 0,019$ ).  $T_{50}$  ( $p = 0,003$ ) und  $T_{25}$  ( $p = 0,003$ ) treten ebenso signifikant später während der Schlafphase ( $T_{50}$  6,7 min [5,6-8,9] 4,5-34,9;  $T_{25}$  11,3 min [9,5-14,2] 6,6-34,9) als während der Wachphase ( $T_{50}$  5,9 min [5,2 – 7,1] 4,0 – 28,4;  $T_{25}$  9,8 min [8,8-11,5] 6,8-34,9) auf. Geschlechtsspezifisch kann ein Einfluss des zirkadianen Rhythmus bei

beiden Geschlechtern nur noch im Alter von 1 Monat und nur bei Männchen auch im Alter von 22 Monaten beobachtet werden.

*Geschlecht:* Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigen sich deutlich im Erreichen von T<sub>max</sub> und sind in Abbildung 7 dargestellt. Die weiblichen Mäuse (2,1 min [1,8-2,5] 1,5-8,2) erreichen T<sub>max</sub> etwa 24 sec später als die männlichen (1,7 min [1,6-1,9] 1,3-7,6; p < 0,001). Die jüngsten Tiere mit 1 Monat weisen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Nierenfunktion auf. Jedoch ab einem Alter von 3 Monaten erreichen die weiblichen Mäuse T<sub>max</sub> signifikant später. T<sub>50</sub> weist keine signifikanten Unterschiede zwischen Weibchen (6,4 min [5,5-8,1] 4,0-16,3) und Männchen (6,0 min [5,2-7,3] 4,0-34,9; p = 0,19) auf. Hingegen verhalten sich die T<sub>25</sub>-Werte ähnlich wie T<sub>max</sub>, wobei Weibchen (10,8 min [9,7-13,2] 7,1-25,4) T<sub>25</sub> signifikant später erreichen als Männchen (10,0 min [8,5-12,4] 6,6-34,9; p = 0,030).

*Alter:* Die Analyse der Daten zeigt einen altersabhängigen Einfluss auf T<sub>max</sub> bei C57BL/6N Mäusen. Ein Monat (1,8 min [1,6-2,0] 1,4-3,3) alte Tiere erreichen T<sub>max</sub> 8 sec später als 3 Monate alte Tiere (1,7 min [1,6-1,8] 1,4-2,7; p = 0,035). Ab einem Alter von 3 Monaten wird T<sub>max</sub> mit zunehmendem Alter später erreicht (22 Monate: 2,3 min [1,9-2,7] 1,5-8,7; p < 0,001). Die Werte von T<sub>50</sub> und T<sub>25</sub> verhalten sich ähnlich wie T<sub>max</sub>.



**Abb. 7:** Erreichen von T<sub>max</sub> (min) des <sup>99m</sup>Tc-MAG3 Nieren-Uptakes in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht bei C57BL/6N Mäusen<sup>24</sup>.

### ***Vergleich von Uptake-Kinetiken von <sup>99m</sup>Tc-MAG3 bei C57BL/6N und SCID Mäusen***

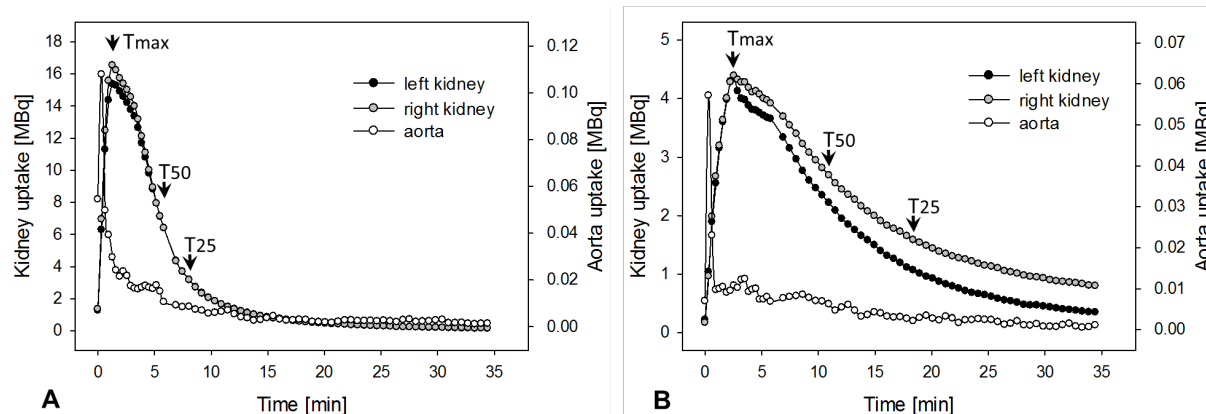
Abbildung 8A zeigt typische Nierenaktivitätskurven (TAC) in gesunden SCID Mäusen. Wie bei den C57BL/6N Mäusen sind die TAC für die linke wie die rechte Niere fast kongruent. Ebenfalls ähnlich zeigt sich ein schneller Anstieg von T<sub>max</sub> nach <sup>99m</sup>Tc-MAG3-Injektion bei den SCID Mäusen. In gepoolten Daten tritt kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,7$ ) von T<sub>max</sub> zwischen beiden Mausstämmen auf. Auch zeigt der Verlauf, gemessen als T<sub>50</sub> ( $p = 0,9$ ) und T<sub>25</sub> ( $p = 0,08$ ), keinen signifikanten Unterschied zwischen C57BL/6N und SCID Mäusen.

Tabelle 3 zeigt, dass geschlechtsspezifisch weibliche C57BL/6N (1,6 min [1,4-1,7] 1,3-2,0) Mäuse T<sub>max</sub> 9 sec später als weibliche SCID Mäuse (1,4 min [1,3-1,5] 1,2-5,3,  $p = 0,05$ ) erreichen. Im Gegensatz dazu tritt bei männlichen C57BL/6N Mäusen (1,4 min [1,3-1,4] 1,2-2,0) T<sub>max</sub> 12 sec früher als bei männlichen SCID Mäusen (1,6 min [1,4-1,7] 1,2-2,0,  $p = 0,04$ ) auf. Für T<sub>50</sub> zeigen sowohl die Weibchen ( $p = 0,8$ ) als auch die Männchen ( $p = 0,9$ ) sowie für T<sub>25</sub> auch die Männchen ( $p = 0,8$ ) keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Mausstämmen. Nur Weibchen zeigen bei T<sub>25</sub> einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ).

Innerhalb eines Mausstamms zeigen weibliche C57BL/6N Mäuse ein späteres T<sub>max</sub> von 14 sec als Männchen ( $p < 0,01$ ), wohingegen bei SCID kein geschlechtsabhängiger Unterschied nachweisbar ist ( $p = 0,14$ ).

### ***Einfluss von <sup>177</sup>Lu-Somatostatin-Rezeptor-Liganden (<sup>177</sup>Lu-SRL) Therapien auf die Nierenfunktion bei SCID Mäusen***

Abbildung 8B zeigt typische Nieren TAC einer mit <sup>177</sup>Lu-SRL behandelten SCID Maus. Im Gegensatz zu gesunden SCID Mäusen zeigt sich ein Einfluss der Radionuklidtherapie auf den Verlauf der TAC beider Nieren, indem die Ausscheidung von <sup>99m</sup>Tc-MAG3 verzögert ist. Auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant sind, zeigen die therapierten weiblichen SCID Mäuse ein späteres T<sub>max</sub> von 2,0 min [1,4-2,7] 1,3-6,9 im Vergleich zu den gesunden weiblichen SCID Mäusen von 1,4 min [1,3-1,5] 1,2-5,3;  $p = 0,15$ . Die verzögerte <sup>99m</sup>Tc-MAG3-Ausscheidung zeigt sich anhand signifikanter Unterschiede von T<sub>50</sub> ( $p = 0,02$ ) mit 2,5 min und T<sub>25</sub> ( $p = 0,01$ ) mit 4,1 min. Die Daten für die renale Ausscheidung (T<sub>max</sub>, T<sub>50</sub> und T<sub>25</sub>) sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



**Abb. 8:** Nieren-Zeit-Aktivitätskurven (TAC) von dynamischen semi-stationären SPECT Aufnahmen (je 68 Bilder) gestartet direkt vor Injektion. A: Normale Nieren TAC von einer gesunden 3 Monate alten weiblichen SCID Maus nach Injektion von 68 MBq  $^{99m}\text{MAG3}$ . B: Nieren TAC von einer 11 Monate alten weiblichen SCID Maus 5 Monate nach Behandlung mit 2 Therapiezyklen  $^{177}\text{Lu-DOTA-JR11}$  (23 MBq und 20 MBq im Abstand von 3 Monaten) nach Injektion von 58 MBq  $^{99m}\text{MAG3}^{25}$ .

**Tabelle 3:**  $^{99m}\text{MAG3}$ -Nieren-Uptake für  $T_{\max}$ ,  $T_{50}$  und  $T_{25}$  für 3 Monate alte C57BL/6N und SCID Mäuse sowie nach  $^{177}\text{Lu-SRL}$ -Therapie bei 5-10 Monate alten SCID Mäusen. Die Ergebnisse sind als Median, Interquartilabstand [IQR, 25.-75. Perzentile] und Minimum-Maximum angegeben<sup>24, 25</sup>.

\*  $p \leq 0.05$  zwischen Mausstämmen gleichen Geschlechts, +  $p \leq 0.05$  zwischen Geschlechtern eines Mausstamms, #  $p \leq 0.05$  zwischen gesunden und  $^{177}\text{Lu-SRL}$  therapierten SCID Mäusen.

Kidney uptake (minutes)		C57BL/6N	SCID	SCID
		(n = 11)	(n = 12)	$^{177}\text{Lu-SRL}$ treatment (n = 6)
females	$T_{\max}$	1.6 [1.4-1.8] 1.3-2.0 */+	1.4 [1.3-1.5] 1.2-5.3	2.0 [1.4-2.7] 1.3-6.9
	$T_{50}$	4.0 [3.5-4.5] 2.9-4.8	3.8 [3.5- 4.3] 3.0- 4.9	6.3 [4.5-10.1] 3.4-11.6 #
	$T_{25}$	7.7 [7.3-8.2] 6.4-9.0	6.5 [5.9-7.2] 4.9-7.8 */+	10.5 [7.7-19.3] 5.8-19.6 #
males	$T_{\max}$	1.4 [1.3-1.4] 1.2-2.0 *	1.6 [1.4-1.7] 1.2-2.0	
	$T_{50}$	4.3 [4.0-5.1] 3.1-6.2	4.5 [4.0- 5.0] 2.9-6.1	
	$T_{25}$	8.0 [7.5-8.8] 5.5-11.6	7.8 [7.3-9.2] 6.2-12.9	

### 3.4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt Untersuchungsprotokolle und Normwerte für den  $^{18}\text{F}$ -NaF-Knochen-Uptake mittels PET und die  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3-Nierenfunktionsszintigraphie mittels SPECT bei Mäusen vor und zeigt die Bedeutung der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht und zirkadianer Rhythmus auf die Untersuchungsergebnisse. Des Weiteren wurden vergleichende Untersuchungen der Nierenszintigraphie zwischen zwei Mausstämmen und die Untersuchung des Einflusses von Radionuklidtherapien auf die Nierenfunktion durchgeführt. Da Mäuse die am häufigsten verwendeten Versuchstiere in präklinischen Studien sind, stellen die Ergebnisse eine wesentliche Grundlage für zukünftige tierexperimentelle Untersuchungen in der Nuklearmedizin dar.

SPECT- sowie PET-Aufnahmen sind nicht invasive Diagnostikmethoden, die in-vivo Studien an Labortieren erlauben<sup>26, 27</sup>. Die hohe Auflösung von präklinischen Kleintiergeräten von 0,3 bis 0,5 mm<sup>28</sup> beim SPECT/CT sowie eine Ortsauflösung von bis zu 0,8 mm bei PET-Hybridgeräten ermöglichen die Darstellung und Abgrenzung selbst kleiner Strukturen auch bei kleinen Versuchstieren wie Mäusen.

#### **Knochen**

Nach Injektion von  $^{18}\text{F}$ -NaF steigt der Uptake im Knochen bei der Maus kontinuierlich an und bleibt, sobald nach 85-110 min  $T_{\text{max}}$  erreicht wird, während der Untersuchungszeit bis 120 min p.i. auf dem erreichten Niveau. Daher sollte bei Mäusen eine PET-Untersuchung zur Bestimmung des  $^{18}\text{F}$ -NaF-Uptake im Knochen 90 min nach Injektion mit einer Dauer von 30 min erfolgen. Bei späteren Aufnahmen nehmen auf Grund der kurzen Halbwertszeit von  $^{18}\text{F}$  von nur 110 min die Zählratenstatistik und damit die Bildqualität ab. Tomographische Ganzkörperuntersuchungsgeräte bei Mäusen ermöglichen so die Quantifizierung der Radioaktivität in kBq/ml. Damit kann der prozentuale Gesamt-Uptake des Skeletts bzw. der Uptake je ml Knochengewebe berechnet werden. In der vorliegenden Studie zeigen alters-, geschlechts- und Tageszeit-gepoolte Daten (Median) von C57BL/6N Mäusen einen Gesamt-Uptake im Skelett von 45,4 %IA bzw. in Relation zum Knochenvolumen von 24,6 %IA/ml. Da Weibchen ein kleineres Knochenvolumen als Männchen aufweisen, stellt der Knochenuptake je ml Knochengewebe (%IA/ml) einen aussagekräftigeren Parameter zur Beurteilung der Knochenstoffwechselsituation gegenüber des Gesamt-Uptakes (%IA) dar.

Bei alters-gepoolten Daten zeigen weibliche Mäuse einen signifikant höheren  $^{18}\text{F}$ -NaF-Knochen-Uptake als männliche Mäuse. Dabei tritt im Altersverlauf der höchste Uptake mit 1 Monat sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen auf. Dies ist die Zeit des größten

Knochenwachstums, so dass hier der höchste Knochenumbau stattfindet und  $^{18}\text{F}$ -NaF vermehrt aufgenommen wird<sup>29, 30</sup>. Anschließend fällt mit zunehmender Verlangsamung des Knochenwachstums der Gesamt-Uptake um ca. 29 % und der Uptake in Relation zum Knochenvolumen um 47 % bis zu einem Alter von 3 Monaten ab. Ein erneuter Anstieg erfolgt dann zwischen 13 und 21 Monaten. Halloran et al. (2002) untersuchten männliche Mäuse und fanden ähnliche altersbedingte Knochenveränderungen wie beim Menschen<sup>31</sup>. Die Ergebnisse sprechen für einen erhöhten Knochenstoffwechsel im Alter.

Der tendenziell erhöhte Uptake im Alter insbesondere bei weiblichen Mäusen spricht wahrscheinlich wie bei der Frau über 55 Jahre für primär geschlechtsbedingte osteoporotische Knochenveränderungen, die im Szintigramm zu einem erhöhten Uptake führen können<sup>32</sup>. Hierbei mögen die Östrogene eine wesentliche Rolle auf den Knochenstoffwechsel spielen<sup>33</sup>. Somit kann ein reduzierter Östrogenspiegel bei älteren Mäusen, bedingt durch eine ovarielle Azyklie zwischen 11 und 16 Monaten<sup>34</sup> zu Knochenumbauveränderungen wie bei Frauen nach der Menopause führen<sup>35</sup>. So zeigen ovariectomierte C57BL/6 Mäuse eine verringerte Vaskularisierung und Volumen des Knochens<sup>33</sup>. Andererseits hebt eine Östrogensubstitution bei ovariectomierten Ratten die erfolgten Änderungen im Knochen wieder auf<sup>33</sup>.

Der zirkadiane Rhythmus hat auf viele physiologische Prozesse im Körper einen Einfluss. Er wird nicht nur durch äußere Einflüsse wie Licht und Dunkelheit definiert, sondern auch durch innere Hormonausschüttungen. Hierzu zählen die Hypothalamus-Hypophysen-Achse, das Schilddrüsen- und das Nebennierenhormonsystem. Auch auf den Knochenumbau hat der zirkadiane Rhythmus einen Einfluss. Studien haben gezeigt, dass ein vermehrter Knochenumbau in der Schlafphase stattfindet<sup>36</sup>. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich bei gepoolten Daten ebenfalls, dass während der Schlafphase der Knochen-Uptake gegenüber der Wachphase erhöht ist. Die Bedeutung der Schlafphase für Umbauprozesse im Knochen zeigt ein Review von Bukowska-Damska et al. von 2019, wo Zusammenhänge zwischen Schichtarbeitern mit Fokus auf Nachtschicht und Osteoporose untersucht wurden. Die Ergebnisse der Studien konnten aufgrund der kleinen Probandenzahl nur Hinweise geben, jedoch drei von vier Studien unterstützen einen positiven Zusammenhang zwischen den Schichtarbeitern und einem erhöhten Risiko an Osteoporose zu erkranken<sup>37</sup>. Werden in unserer Arbeit die Daten jedoch geschlechtsspezifisch analysiert, zeigt sich in den jetzt kleineren Subgruppen nur bei weiblichen Mäusen während der Schlafphase im Alter von 3 und 6 Monaten, ein Lebensabschnitt mit hoher Ovaraktivität, ein höherer Uptake gegenüber der Wachphase.

Insgesamt konnten für den Knochenuptake von  $^{18}\text{F}$ -NaF im Skelettsystem von C57BL/6N Mäusen die Parameter Alter, Geschlecht und Tageszeitpunkt der Untersuchung als Korrelat des



zirkadianen Rhythmus als relevante Einflussfaktoren ermittelt werden und entsprechende alters-, geschlechts- und Schlaf/Wachphasen-bezogenen Uptakewerte zusammengestellt werden als Basis für zukünftige Studien zum Knochenstoffwechsel bei Mäusen. Dabei sind insbesondere die bei den parameter-bezogenen Subgruppen auftretenden Unterschiede gegenüber den gepoolten Daten oft nicht mehr signifikant, was vermutlich primär auf die aus tierschutzrechtlichen Gründen begrenzten Gruppengrößen zurückzuführen ist.

## **Niere**

Die Niere ist neben der Leber das wichtigste Organ des Körpers, um Schadstoffe zu eliminieren. Die meisten medikamentösen Therapien sind von der Nierenfunktion abhängig<sup>38, 39</sup>, weshalb ihre Überwachung einer der wichtigsten Parameter in der klinischen Medizin ist. Der klinisch am weitesten verbreitete Laborparameter zur Überwachung der Nierenfunktion ist das Serum Kreatinin<sup>40</sup>. Abhängig von der Muskelmasse und dem Proteingehalt der Nahrung ist der Wert des Serum Kreatinin jedoch fehleranfällig<sup>41, 42</sup>. Weiterhin einschränkend ist der späte Anstieg von Kreatinin im Blut trotz Nierenschädigung. Erst ein Nierenfunktionsverlust ab 50 % führt zu einem Anstieg des Serum Kreatinins<sup>43</sup>. Die Nierenfunktionsszintigraphie mittels <sup>99m</sup>Tc-MAG3 ist ein deutlich sensitiveres Verfahren zur Bestimmung von Nierenschäden als die Bestimmung des Serum Kreatinin<sup>44, 45</sup>. Zudem erlaubt die Aufnahmetechnik der semi-stationärem SPECT mit Multi-Pinhole-Kollimatoren, wie bei dem in der Studie verwendeten präklinischen SPECT/CT-Gerät, eine schnelle dynamische dreidimensionale Bildgebung zur genauen und quantitativen Beurteilung der seitengetrenten Nierenfunktion<sup>46</sup>.

Eine laborchemische Ermittlung des Serum Kreatinins war aufgrund des geringen Blutvolumens der Maus in der vorliegenden Studie als Vergleich nicht möglich.

### ***Nierenfunktionsuntersuchungen bei der C57BL/6N Maus***

Es zeigte sich, dass Untersuchungszeiten von 30-40 min bei gesunden Mäusen ausreichend sind, um die Funktionsparameter ( $T_{max}$ ,  $T_{50}$  und  $T_{25}$ ) sicher zu berechnen. Die Kinetik der Nierenfunktion bei Mäusen ähnelt der von Menschen und zeigt eine vergleichbare TAC<sup>47</sup>. Bei Menschen wird  $T_{max}$  innerhalb von 5 min erreicht und  $T_{50}$  innerhalb von 15 min, was mit den bei Mäusen erhobenen Daten vergleichbar ist<sup>48, 49</sup>.

Im Alter von 1 Monat mit sexueller Unreife zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Nierenfunktion (TAC) zwischen den Geschlechtern. Ab einem Alter von 3 Monaten erreichen die weiblichen Mäuse dann  $T_{max}$  zu einem signifikant späteren Zeitpunkt, und auch die Elimination des Tracers ( $T_{25}$ ) ist verzögert.

Mehrere Studien beschreiben eine abnehmende Clearance von  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG3 im Alter einhergehend mit einer verzögerten glomerulären Filtrationsrate<sup>50, 51</sup>. Eine Studie von Bridges et al. beschäftigt sich mit den möglichen Ursachen einer abnehmenden Nierenfunktion<sup>52</sup>. Die Autoren sehen für die verminderte Nierenfunktion eine Glomerulasklerose, eine glomeruläre und tubuläre Hypertrophie sowie das Herabsetzen der Plasmaflussrate der Niere durch eine tubulo-intestinale Fibrose als Ursache<sup>52</sup>. Auch wird eine ähnliche Abnahme der Nierenfunktion im Alter in Studien mit Mäusen beschrieben<sup>53</sup>. Auch die Mäuse dieser Arbeit erreichen ebenso mit zunehmendem Alter T<sub>max</sub> später und die Elimination des Tracers (T<sub>50</sub> und T<sub>25</sub>) erfolgt verzögert.

Durch die Abhängigkeit des zirkadianen Rhythmus vom Hormonsystem ist auch ein Einfluss auf die Nierenfunktion wahrscheinlich. Wie schon beim Knochen erwähnt, unterliegen die Hormone des Hypothalamus-Hypophysen-Systems dem zirkadianen Rhythmus. Eines dieser Hormone ist das antidiuretische Hormon (ADH), welches im Hypothalamus gebildet und aus dem Hypophysenhinterlappen freigesetzt wird<sup>54</sup>. Dieses Hormon ist verantwortlich für die vermehrte Bildung von Aquaporinen in den Sammelrohren der Niere, die eine Rückresorption von Wasser und Harnstoff ermöglichen und somit das intravasale Volumen erhöhen. Studien belegen einen Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf die Nierenfunktion beim Menschen. Die Studien postulieren auch eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate um 5 % während der Aktivitätsphase<sup>55, 56</sup>.

Ein wichtiger Faktor bei Ruhe- und Aktivitätsphasen ist die Regulation des Blutdrucks. Regulatoren sind das vegetative Nervensystem durch Aktivierung von Sympathikus und Parasympathikus sowie durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldostern-Systems. Armbruster et. al. (1975) haben eine tageszeitabhängige Reninausschüttung beim Menschen nachgewiesen mit Maximalwerten am Morgen<sup>57</sup>. Ein weiterer Faktor im Tag-Nacht-Zyklus ist sicherlich die verminderte Flüssigkeitsaufnahme während des Schlafes. Dehydratation als Auslöser einer verminderten Nierenfunktion wurde in verschiedenen Studien belegt und ließ sich auch durch eine verlangsamte Exkretion von  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG3 beim Menschen aufzeigen<sup>58</sup>. Im Unterschied zu den Ergebnissen in der Literatur konnte jedoch die vorliegende Arbeit nur bedingt einen zirkadianen Einfluss bei den Mäusen feststellen. Die jüngsten Mäuse sowie die Männchen im Alter von 22-24 Monaten zeigen ein signifikant früheres Erreichen von T<sub>max</sub> während der Wachphase. Ein Einfluss des zirkadianen Rhythmus in den übrigen Altersstufen konnte nicht belegt werden.

### ***Einfluss vom Mausstamm auf die Nierenfunktion (C57BL/6N versus SCID Maus)***

Viele Studien zeigen bei Nagetieren den Einfluss von unterschiedlichen Stämmen und des Geschlechts auf die Nierenfunktion<sup>59-61</sup>. Hackbarth et al. zeigten eine Abhängigkeit der glomerulären Filtrationsrate vom Körpergewicht und dem Gewicht der Nieren, was unterschiedlich in Abhängigkeit von Mausstamm und Geschlecht ist<sup>60, 61</sup>. Die vorliegende Arbeit konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen C57BL/6N (Tmax 1,4 min) und SCID Mäusen (Tmax 1,5 min) nachweisen. Die TAC der untersuchten C57BL/6N und SCID Mäuse sehen mit einem raschen Anstieg auf Tmax und einer anschließend stetigen Eliminierung des Tracers sehr ähnlich aus<sup>62</sup>.

In vorangegangenen Studien zeigte das Geschlecht der Nagetiere Auswirkungen auf verschiedene Nierenerkrankungen<sup>63</sup>. Die vorliegende Arbeit zeigt ebenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede der Nierenfunktion bei unterschiedlichen Mausstämmen. Die Ergebnisse belegen einen signifikant späteren Zeitpunkt für Tmax bei weiblichen C57BL/6N Mäusen im Vergleich zu männlichen. Im Gegensatz zu C57BL/6N Mäusen erreichen weibliche SCID Mäuse Tmax schneller als männliche SCID Mäuse, jedoch nicht signifikant. Diese Unterschiede weisen auf einen relevanten Einfluss der verschiedenen Stämme auf die Nierenfunktion hin, wenn das Geschlecht berücksichtigt wird. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu Daten bei Menschen, welche keine geschlechtsspezifischen Unterschiede aufzeigen<sup>51</sup>.

### ***Einfluss von <sup>177</sup>Lu-Somatostatin-Rezeptor-Liganden (<sup>177</sup>Lu-SRL) Therapien auf die Nierenfunktion bei der SCID Maus***

Radioligandentherapien sind effektive und vielversprechende Therapien in der Nuklearmedizin: <sup>90</sup>Yttrium (<sup>90</sup>Y) oder <sup>177</sup>Lutetium (<sup>177</sup>Lu), gebunden an ein Somatostatinanalogon (z.B. DOTATOC), werden seit etwa 20 Jahren zur Behandlung von metastasierten neuroendokrinen Tumoren, die häufig einen Somatostatinrezeptorbesatz aufweisen, eingesetzt<sup>64</sup>. Eine bekannte Nebenwirkung der <sup>177</sup>Lu-SRL Therapie ist die Nierentoxizität<sup>65</sup>. Die Aufnahme von <sup>177</sup>Lu-SRL erfolgt über den proximalen Tubulus der Niere mittels Endozytose durch Rezeptormoleküle (Megalin-Cubulin)<sup>66, 67</sup>. Das Verstehen der der Nephrotoxizität zugrundeliegenden Prozesse ist wichtig, um sowohl potentiell protektive Maßnahmen zu untersuchen als auch die Dosis des Therapeutikums zu bestimmen, welche zu einer Einschränkung der Nierenfunktion führt<sup>68</sup> bzw. ein akutes bis chronisches Nierenversagen verursachen kann<sup>69, 70</sup>.

Ziel war daher eine Validierung der Nierenzintigraphie mit <sup>99m</sup>Tc-MAG3 für die Erfassung von Nierenfunktionsveränderungen nach der Behandlung mit <sup>177</sup>Lu-SRL bei tumortragenden SCID Mäusen. Hier zeigen die Ergebnisse erwartungsgemäß eine Einschränkung der Nieren-

funktion bei Mäusen nach einer Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -SRL. Auch wenn  $T_{\text{max}}$  ähnlich schnell wie bei gesunden Mäusen erfolgt, tritt  $T_{50}$  und  $T_{25}$  signifikant verzögert auf als Hinweis auf eine verzögerte intrarenale Sekretion, passend zu einer durch  $^{177}\text{Lu}$ -SRL erwarteten tubulären Schädigung, da wie bereits erwähnt  $^{177}\text{Lu}$ -SRL über den proximalen Tubulus aufgenommen wird und diesen schädigen<sup>71</sup>.

### 3.5 Schlussfolgerung

Die präklinische Radionuklidbildgebung mit PET und SPECT eignet sich gut für longitudinale, quantitative in-vivo Untersuchungen des Knochen-Uptakes und der Nierenfunktion bei Mäusen. Hierfür konnten standardisierte Untersuchungsprotokolle sowohl für die Skelett-PET als auch die Nierenfunktionsszintigraphie bei der Maus erstellt werden.

Geschlecht, Alter und der zirkadiane Rhythmus sind wichtige Einflussfaktoren. So zeigte sich beim Knochen-Uptake ein Einfluss des zirkadianen Rhythmus, wobei weibliche Mäuse im Gegensatz zu Männchen einen höheren Uptake während der Schlafphase haben. Insgesamt lag der Knochen-Uptake bei weiblichen Tieren durchgängig höher als bei männlichen Mäusen. Im Altersverlauf fand sich bei beiden Geschlechtern im Alter von 1 Monat der höchste Knochen-Uptake, der nachfolgend mit der Skelettreife abnahm. Folglich müssen beim Design von Studien zum Knochen-Uptakes bei männlichen Mäusen das Alter und bei weiblichen Mäusen der zirkadiane Rhythmus sowie das Alter als Einflussfaktoren berücksichtigt werden, wobei das Geschlecht ebenfalls einen wesentlichen und signifikanten Parameter darstellt.

Auch auf die Nierenfunktion zeigte sich ein deutlicher Einfluss von Alter und Geschlecht bei der Maus, während der zirkadiane Rhythmus keinen eindeutigen Effekt aufwies. Deshalb sollten bei Nierenstudien mit Mäusen die Faktoren Alter und Geschlecht berücksichtigt werden, während der zirkadiane Rhythmus vernachlässigbar erscheint. Beim Vergleich zwischen C57BL/6N und SCID Mäusen zeigten sich signifikante geschlechtsabhängige Unterschiede in den Nieren-Uptake-Kinetiken. Für experimentelle Therapiestudien ist daher zur Beurteilung einer Nephrotoxizität die Etablierung von Normwerten in Abhängigkeit von Mausstamm und Geschlecht wichtig. Die  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG3 Nierenfunktionsszintigraphie erwies sich zudem als eine ausreichend sensitive Methode zum Nachweis von Nierenschädigungen durch  $^{177}\text{Lu}$ -SRL mit Verschlechterung der Nierenfunktion.

Die Vorstellung standardisierter Untersuchungsprotokolle für dedizierte Kleintiergeräte und die Erhebung von Normwerten für den Knochen-Uptake und die Nierenfunktion bei Mäusen in Abhängigkeit relevanter Einflussgrößen wie Alter und Geschlecht der Tiere sowie Tageszeitpunkt der Untersuchung schafft somit eine Grundlage für zukünftige tierexperimentelle und translationale Studien.

### 3.6 Literaturverzeichnis

1. Townsend DW. Dual-modality imaging: combining anatomy and function. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49:938-955.
2. Ovadia D, Metser U, Lievshitz G, Yaniv M, Wientroub S, Even-Sapir E. Back pain in adolescents: assessment with integrated 18F-fluoride positron-emission tomography-computed tomography. *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2007;27:90-93.
3. Schiepers C, Nuyts J, Bormans G, Dequeker J, Bouillon R, Mortelmans L, Verbruggen A, De Roo M. Fluoride kinetics of the axial skeleton measured in vivo with fluorine-18-fluoride PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 1997;38:1970-1976.
4. Raynor W, Houshmand S, Werner T, Alavi A. Skeletal molecular imaging of benign diseases with 18F-sodium fluoride PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016;57:1255-1255.
5. Blau M, Nagler W, Bender M. Fluorine-18: a new isotope for bone scanning. *J Nuclear Med*. 1962;3.
6. Blau M, Ganatra R, Bender MA. 18F-fluoride for bone imaging. Paper presented at: Seminars in nuclear medicine, 1972.
7. Grant FD, Fahey FH, Packard AB, Davis RT, Alavi A, Treves ST. Skeletal PET with 18F-fluoride: applying new technology to an old tracer. *Journal of nuclear medicine*. 2008;49:68-78.
8. Beheshti M, Mottaghy F, Payche F, Behrendt F, Van den Wyngaert T, Fogelman I, Strobel K, Celli M, Fanti S, Giammarile F. 18 F-NaF PET/CT: EANM procedure guidelines for bone imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42:1767-1777.
9. Blake GM, Frost ML, Fogelman I. Quantitative radionuclide studies of bone. *J Nucl Med*. 2009;50:1747-1750.
10. Delbeke D, Schöder H, Martin WH, Wahl RL. Hybrid imaging (SPECT/CT and PET/CT): improving therapeutic decisions. Paper presented at: Seminars in nuclear medicine, 2009.
11. Hillner BE, Siegel BA, Hanna L, Duan F, Shields AF, Coleman RE. Impact of 18F-fluoride PET in patients with known prostate cancer: initial results from the National Oncologic PET Registry. *Journal of Nuclear Medicine*. 2014;55:574-581.
12. Hillner BE, Siegel BA, Hanna L, Duan F, Shields AF, Quinn B, Coleman RE. Impact of 18F-fluoride PET on intended management of patients with cancers other than prostate cancer: results from the National Oncologic PET Registry. *Journal of Nuclear Medicine*. 2014;55:1054-1061.
13. Czernin J, Satyamurthy N, Schiepers C. Molecular mechanisms of bone 18F-NaF deposition. *Journal of Nuclear Medicine*. 2010;51:1826-1829.
14. Subramanian G, McAfee J. A New Complex of 99mTc for Skeletal Imaging. *Radiology*. 1971;99:192-196.
15. Boyd J, Morgan L, BLUM A. The use of radioisotopes in the clinical study of renal function. *Southern medical journal*. 1959;52:1.
16. Winter CC. A clinical study of a new renal function test: the radioactive diodrast renogram. *The Journal of urology*. 1956;76:182-196.

17. Farmelant MH, Burrows BA. The renogram: physiologic basis and current clinical use. Paper presented at: Seminars in nuclear medicine, 1974.
18. Gates GF. Split renal function testing using Tc-99m DTPA. A rapid technique for determining differential glomerular filtration. *Clinical nuclear medicine*. 1983;8:400-407.
19. Bares R, Müller-Schauenburg W. Nuclear medicine diagnosis of the kidneys. *Der Radiologe*. 2000;40:938-945.
20. Itoh K. 99m Tc-MAG3: review of pharmacokinetics, clinical application to renal diseases and quantification of renal function. *Annals of nuclear medicine*. 2001;15:179-190.
21. Taylor A. Radionuclide renography: a personal approach. Paper presented at: Seminars in nuclear medicine, 1999.
22. Coveney JR, Robbins MS. Comparison of Technetium-99m MAG3 Kit with HPLC-Purified Technetium-99m MAG3. *J Nucl Med*. 1987;28:1881-1887.
23. Dorau-Rutke V, Huang K, Lukas M, Schulze MO, Rosner C, Gregor-Mamoudou B, Steffen IG, Brenner W, Beindorff N. 18F-sodium fluoride bone deposition quantitation with PET in Mice: Variation with age, sex, and circadian rhythm. *Nuklearmedizin* 2020;59: 428-437. doi: 10.1055/a-1205-0082.
24. Huang K, Lukas M, Steffen IG, Lange C, Huang EL, Dorau V, Brenner W, Beindorff N. Normal Values of Renal Function measured with 99mTechnetium Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian Rhythm. *Nuklearmedizin*. 2018;57:224-233.
25. Mohan A-M, Lukas M, Albrecht J, Dorau-Rutke V, Koziolk EJ, Huang K, Prasad S, Brenner W, Beindorff N. Relationship of Renal Function in Mice to Strain, Sex and 177Lutetium-Somatostatin Receptor Ligand Treatment. *Nuklearmedizin* 2020; 59: 381–386. doi: 10.1055/a-1103-1661.
26. Meikle SR, Kench P, Kassiou M, Banati RB. Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Physics in Medicine & Biology*. 2005;50:R45.
27. Peremans K, Cornelissen B, Van Den Bossche B, Audenaert K, Van de Wiele C. A review of small animal imaging planar and pinhole SPECT  $\gamma$  camera imaging. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2005;46:162-170.
28. Nuyts J, Vunckx K, Defrise M, Vanhove C. Small animal imaging with multi-pinhole SPECT. *Methods*. 2009;48:83-91.
29. Hsu WK, Virk MS, Feeley BT, Stout DB, Chatziioannou AF, Lieberman JR. Characterization of osteolytic, osteoblastic, and mixed lesions in a prostate cancer mouse model using 18F-FDG and 18F-fluoride PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49:414-421.
30. Schliephake H, Berding G, Knapp W, Sewilam S. Monitoring of graft perfusion and osteoblast activity in revascularised fibula segments using [18F]-positron emission tomography. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 1999;28:349-355.
31. Halloran BP, Ferguson VL, Simske SJ, Burghardt A, Venton LL, Majumdar S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. *Journal of bone and mineral research*. 2002;17:1044-1050.
32. Brenner W, Sieweke N, Bohuslavizki K, Kampen W, Zuhayra M, Clausen M, Henze E. Age- and sex-related bone uptake of Tc-99m-HDP measured by whole-body bone scanning. *Nuklearmedizin*. 2000;39:127-132.

33. Prisby RD. Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone. *Journal of Endocrinology*. 2017;235:R77-R100.
34. Felicio LS, Nelson JF, Finch CE. Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biology of reproduction*. 1984;31:446-453.
35. Pavone V, Testa G, Giardina S, Vescio A, Restivo DA, Sessa G. Pharmacological therapy of osteoporosis: a systematic current review of literature. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:803.
36. Flammersfeld R. Über den circadianen Proliferationsrhythmus in der proximalen Tibiametaphyse bei der jungen Ratte während der enchondralen Ossifikation [Inaugural-Dissertation]: Medical Faculty, Ruhr-Universität, Bochum; 1988.
37. Bukowska-Damska A, Skowronska-Jozwiak E, Peplonska B. Night shift work and osteoporosis: evidence and hypothesis. *Chronobiology international*. 2019;36:171-180.
38. Jia JB, Lall C, Tirkes T, Gulati R, Lamba R, Goodwin SC. Chemotherapy-related complications in the kidneys and collecting system: an imaging perspective. *Insights Imaging*. 2015;6:479-487.
39. Kunin CM. Nephrotoxicity of antibiotics. *JAMA*. 1967;202:204-208.
40. Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *Bmj*. 2006;333:733-737.
41. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, Price CP. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney international*. 1995;47:312-318.
42. Swedko PJ, Clark HD, Paramsothy K, Akbari A. Serum creatinine is an inadequate screening test for renal failure in elderly patients. *Archives of internal medicine*. 2003;163:356-360.
43. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annual review of medicine*. 1988;39:465-490.
44. Esteves FP, Halkar RK, Issa MM, Grant S, Taylor A. Comparison of camera-based <sup>99m</sup>Tc-MAG3 and 24-hour creatinine clearances for evaluation of kidney function. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;187:W316-319.
45. Halkar R, Taylor A, Manatunga A, Issa MM, Myrick SE, Grant S, Shenvi NV. Monitoring renal function: a prospective study comparing camera-based technetium-99m mercaptoacetyltriglycine clearance and creatinine clearance. *Urology*. 2007;69:426-430.
46. Lange C, Apostolova I, Lukas M, Huang KP, Hofheinz F, Gregor-Mamoudou B, Brenner W, Buchert R. Performance evaluation of stationary and semi-stationary acquisition with a non-stationary small animal multi-pinhole SPECT system. *Molecular Imaging and Biology*. 2014;16:311-316.
47. Brolin G, Edenbrandt L, Granerus G, Olsson A, Afzelius D, Gustafsson A, Jonsson C, Hagerman J, Johansson L, Riklund K. The accuracy of quantitative parameters in <sup>99m</sup>Tc-MAG 3 dynamic renography: a national audit based on virtual image data. *Clinical physiology and functional imaging*. 2016;36:146-154.
48. Ali Jafri R, Britton K, Nimmon C, Solanki K, Al-Nahhas A, Bomanji J, Fettich J, Hawkins L. Technetium-99m MAG3, a comparison with iodine-123 and iodine-131 orthoiodohippurate, in patients with renal disorders. *J Nucl Med*. 1988;29:147-158.



49. Taylor AT. Radionuclides in nephrourology, part 1: radiopharmaceuticals, quality control, and quantitative indices. *Journal of Nuclear Medicine*. 2014;55:608-615.
50. Lapidus J, Zierdt D. Compatibility of normal renal function with aging. *Jama*. 1967;201:778-779.
51. Briggs D, Smith W. Technetium-99m-MAG3 renal studies: normal range and reproducibility of physiologic parameters as a function of age and sex. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1994;35:1612-1617.
52. Bridges CC, Zalups RK. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2017;20:55-80.
53. Luippold G, Pech B, Schneider S, Osswald H, Muhlbauer B. Age dependency of renal function in CD-1 mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002;282:F886-F890.
54. Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A. *Taschenlehrbuch Physiologie*: Georg Thieme Verlag; 2010.
55. Bonny O, Firsov D. Circadian regulation of renal function and potential role in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2013;22:439-444.
56. Koopman M, Koomen G, Krediet R, De Moor E, Hoek F, Arisz L. Circadian rhythm of glomerular filtration rate in normal individuals. *Clinical science*. 1989;77:105-111.
57. Armbruster H, Vetter W, Uhlschmid G, Zaruba K, Beckerhoff B, Nussberger J, Vetter H, Siegenthaler W. Circadian rhythm of plasma renin activity and plasma aldosterone in normal man and in renal allograft recipients. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association European Dialysis and Transplant Association*. 1975;11:268-276.
58. Achong DM, Tenorio LE. Abnormal MAG3 renal scintigraphy resulting from dehydration. *Clinical nuclear medicine*. 2003;28:683-684.
59. Hackbarth H, Baunack E, Winn M. Strain differences in kidney function of inbred rats: 1. Glomerular filtration rate and renal plasma flow. *Laboratory animals*. 1981;15:125-128.
60. Hackbarth H, Hackbarth D. Genetic analysis of renal function in mice. 1. Glomerular filtration rate and its correlation with body and kidney weight. *Laboratory animals*. 1981;15:267-272.
61. Hackbarth H, Hackbarth D. Genetic analysis of renal function in mice. 2. Strain differences in clearances of sodium, potassium, osmolar and free water, and their correlations with body and kidney weight. *Laboratory animals*. 1982;16:27-32.
62. Esteves FP, Taylor A, Manatunga A, Folks RD, Krishnan M, Garcia EV. 99mTc-MAG3 renography: normal values for MAG3 clearance and curve parameters, excretory parameters, and residual urine volume. *American Journal of Roentgenology*. 2006;187:W610-W617.
63. Silbiger S, Neugarten J. Gender and human chronic renal disease. *Gender medicine*. 2008;5:S3-S10.
64. De Jong M, Valkema R, Jamar F, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Breeman WA, Bakker WH, Smith C, Pauwels S, Krenning EP. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. Paper presented at: *Seminars in nuclear medicine*, 2002.

65. Gupta SK, Singla S, Bal C. Renal and hematological toxicity in patients of neuroendocrine tumors after peptide receptor radionuclide therapy with <sup>177</sup>Lu-DOTATATE. *Cancer Biotherapy and radiopharmaceuticals*. 2012;27:593-599.
66. Vegt E, De Jong M, Wetzels JF, Masereeuw R, Melis M, Oyen WJ, Gotthardt M, Boerman OC. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *Journal of nuclear medicine*. 2010;51:1049-1058.
67. Vegt E, Melis M, Eek A, de Visser M, Brom M, Oyen WJ, Gotthardt M, de Jong M, Boerman OC. Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2011;38:623-632.
68. Svensson J, Berg G, Wängberg B, Larsson M, Forssell-Aronsson E, Bernhardt P. Renal function affects absorbed dose to the kidneys and haematological toxicity during <sup>177</sup>Lu-DOTATATE treatment. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42:947-955.
69. Kunikowska J, Krolicki L, Sowa-Staszczak A, Pawlak D, Hubalewska-Dydejczyk A, Mikolajczak R. Nephrotoxicity after PRRT - still a serious clinical problem? Renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with <sup>90</sup>Y-DOTATATE and <sup>90</sup>Y/<sup>177</sup>Lu-DOTATATE. *Endokrynol Pol*. 2013;64:13-20.
70. Valkema R, Pauwels SA, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Jamar F, de Jong M, Barone R, Walrand S, Kooij PP, Bakker WH, Lasher J, Krenning EP. Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with (90)Y-DOTA(0),Tyr(3)-octreotide and (177)Lu-DOTA(0), Tyr(3)-octreotate. *J Nucl Med*. 2005;46 Suppl 1:83S-91S.
71. Yin J, Wang J. Renal drug transporters and their significance in drug–drug interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6:363-373.

#### 4 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Viktoria Josefa Dorau-Rutke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*<sup>18</sup>F-Natriumfluorid Knochenstoffwechsel und Nierenfunktionsuntersuchungen mittels  
<sup>99m</sup>Techneium-Mercaptoacetyltriglycin bei Mäusen in Abhängigkeit von Stamm, Alter,  
Geschlecht und zirkadianem Rhythmus*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autorin bin, entsprechen den Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft und werden von mir verantwortet. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Bernau, 18.08.2020

---

Viktoria Josefa Dorau-Rutke

## 5 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Viktoria Josefa Dorau-Rutke hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1) **Dorau-Rutke V\***, Huang K, Lukas M, Rosner C, Schulze MO, Gregor-Mamoudou B, Koziolk EJ, Aschenbach JR, Eary JF, Steffen IG, Brenner W, Beindorff N. *<sup>18</sup>F-sodium fluoride bone deposition quantitation with PET in Mice: Variation with age, sex, and circadian rhythm.* Nuklearmedizin 2020 Jul 16. doi: 10.1055/a-1205-0082. [Epub ahead of print]. PMID: 32674198. (IF 2018 1,270)

Beitrag im Einzelnen:

1. Gesamte Planung und Durchführung der Tierversuche (Juni 2014 - Februar 2016)
2. Auswertung der gesamten Bilddaten
3. Interpretation der Statistikdaten
4. Erstellung und Revision des Manuskripts inkl. Literaturrecherche.

2) Huang K\*, Lukas M, Steffen IG, Lange C, Huang EL, **Dorau V**, Brenner W, Beindorff N. *Normal Values of Renal Function measured with <sup>99m</sup>Techneium Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian Rhythm.* Nuklearmedizin. 2018 Dec;57(6):224-233. doi: 10.3413/Nukmed-0999-18-09. Epub 2018 Dec 18. (IF 2018 1,270)

Beitrag im Einzelnen:

1. Mitwirkung bei der Durchführung der Tierversuche
2. Mitwirkung bei der Auswertung der Bilddaten der Tierversuche
3. Mitwirkung bei der Manuskripterstellung, inkl. Revision

3) Mohan AM\*, Lukas M, Albrecht J, **Dorau-Rutke V**, Koziolk EJ, Huang, K, Prasad S, Brenner W, Beindorff N. *Relationship of Renal Function in Mice to Strain, Sex and <sup>177</sup>Lutetium-Somatostatin Receptor Ligand Treatment.* Nuklearmedizin 2020 Feb 19. doi: 10.1055/a-1103-1661. [Epub ahead of print]. (IF 2018 1,270)

Beitrag im Einzelnen:

1. Mitwirkung bei der Planung sowie Durchführung der Tierversuche
2. Mitwirkung bei der Auswertung der Bilddaten
3. Mitwirkung bei der Manuskripterstellung, inkl. Revision

\* Erstautorenschaft

Bernau, 18.08.2020

---

Viktoria Josefa Dorau-Rutke

## **6 Druckexemplare der Publikation**

### **Publikation 1**

**Dorau-Rutke V**, Huang K, Lukas M, Schulze MO, Rosner C, Gregor-Mamoudou B, Steffen IG, Brenner W, Beindorff N.

***18F-sodium fluoride bone deposition quantitation with PET in Mice: Variation with age, sex, and circadian rhythm.***

Nuklearmedizin 2020;59: 428-437. doi: 10.1055/a-1205-0082. Epub 2020 Jul 16. PubMed PMID: 32674198

**<https://doi.org/10.1055/a-1205-0082>**





















## **Publikation 2**

Huang K, Lukas M, Steffen IG, Lange C, Huang EL, **Dorau V**, Brenner W, Beindorff N.

**Normal Values of Renal Function measured with <sup>99m</sup>Techetium  
Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian  
Rhythm.**

Nuklearmedizin. 2018 Dec;57(6):224-233. doi: 10.3413/Nukmed-0999-18-09. Epub 2018  
Dec 18. PubMed PMID: 30562811.

**<https://doi.org/10.3413/Nukmed-0999-18-09>**























### **Publikation 3**

Mohan A-M, Lukas M, Albrecht J, **Dorau-Rutke V**, Koziolk EJ, Huang K, Prasad S, Brenner W, Beindorff N.

#### **Relationship of Renal Function in Mice to Strain, Sex and <sup>177</sup>Lutetium-Somatostatin Receptor Ligand Treatment.**

Epub February 19,2020; Nuklearmedizin 2020; 59: 381–386; doi: 10.1055/a-1103-1661.

PubMed PMID: 32074660

**<https://doi.org/10.1055/a-1103-1661>**











## **7 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 8 Publikationsliste

1. **Dorau-Rutke V**, Huang K, Lukas M, Schulze MO, Rosner C, Gregor-Mamoudou B, Steffen IG, Brenner W, Beindorff N. 18F-sodium fluoride bone deposition quantitation with PET in Mice: Variation with age, sex, and circadian rhythm. *Nuklearmedizin* 2020;59: 428-437. doi: 10.1055/a-1205-0082.
2. Mohan AM, Lukas M, Albrecht J, **Dorau-Rutke V**, Koziolk EJ, Huang K, Prasad S, Brenner W, Beindorff N. Relationship of Renal Function in Mice to Strain, Sex and <sup>177</sup>Lutetium-Somatostatin Receptor Ligand Treatment. *Nuklearmedizin* 2020; 59: 381–386. doi: 10.1055/a-1103-1661.
3. Huang K, Lukas M, Steffen IG, Lange C, Huang EL, **Dorau V**, Brenner W, Beindorff N. Normal Values of Renal Function measured with <sup>99m</sup>Technetium Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian Rhythm. *Nuklearmedizin*. 2018 Dec;57(6):224-233. doi: 10.3413/Nukmed-0999-18-09. Epub 2018 Dec 18.
4. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der European Association of Nuclear Medicine: Beindorff N, **Dorau V**, Huang KP, Rosner C, Schulze O, Lukas M, Lange C, Koziolk EJ, Gregor-Mamoudou B, Steffen IG, Brenner W. Longitudinal PET studies on bone uptake of F-18-fluoride in healthy mice with respect to age, sex and circadian rhythm. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44 (Suppl. 2), S509 (2017)



## **9 Danksagung**

Ich danke Professor Dr. med. Winfried Brenner für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Klinik für Nuklearmedizin der Charité am Campus Virchow-Klinikum anfertigen zu dürfen.

Mein ausgesprochener Dank gilt Dr. med. vet. Nicola Beindorff für die Bereitstellung des Themas sowie die engagierte und geduldige Betreuung.

Ich danke außerdem meinen Kollegen der Arbeitsgruppe BERIC, K. Huang, E. Huang und A. Bartelheimer, für die Mitarbeit im Labor sowie die Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Extra dank geht an Dr. med. Ingo Steffens für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Besonders danken möchte ich meiner Freundin Dr. Jorina Jurth für die konstante Motivation und Unterstützung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner wundervollen Familie (meinen Eltern und meiner Patentante) für die stetige Unterstützung und den Rückhalt während des Studiums und während der fordernden Zeit der Dissertation bedanken.