

Aus der Klinik für Nuklearmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. med. T.M. Behr

---

**Entwicklung eines Radiopharmakons zur Darstellung von Insulinomen im  
Tiermodell auf Basis des Inkretinhormons GLP-1(7-36)amid und seiner  
Analoga**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Marc Fischer  
aus Mainz

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 10.07.2003.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. T.M. Behr

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Neubauer

meiner Familie  
besonders meiner Großmutter



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Insulinome .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Klinik.....	2
1.1.2	Probleme der Lokalisationsdiagnostik .....	3
<b>1.2</b>	<b>Szintigraphie .....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Grundlagen .....	4
1.2.2	Radioaktive Elemente.....	5
1.2.3	Tracer.....	8
1.2.4	Peptidszintigraphie .....	10
<b>1.3</b>	<b>GLP-1.....</b>	<b>14</b>
1.3.1	Physiologische Wirkung und therapeutische Möglichkeiten .....	15
1.3.2	Stoffwechsel und Analoga.....	17
<b>1.4</b>	<b>Die Ratte als Tumormodell.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung und experimentelle Konzeption .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>22</b>
2.1.1	Tracer-Herstellung.....	22
2.1.1.1	<i>Markierung von Peptiden.....</i>	<i>22</i>
2.1.1.2	<i>Aufreinigung markierter Peptide.....</i>	<i>23</i>
2.1.2	Insulinome im Rattenmodell .....	24
2.1.2.1	<i>Medikamentöse Tumorinduktion .....</i>	<i>24</i>
2.1.2.2	<i>Tumorzelltransplantation .....</i>	<i>24</i>
2.1.3	Szintigraphie.....	25

<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.2.1	Tracer Herstellung.....	27
2.2.1.1	Markierung von Peptiden.....	27
2.2.1.2	Aufreinigung markierter Peptide.....	28
2.2.2	Insulinome im Rattenmodell.....	30
2.2.2.1	Medikamentöse Tumorinduktion.....	30
2.2.2.2	Tumorzelltransplantation.....	31
2.2.3	Szintigraphien.....	32
2.2.3.1	Narkose / Vorbereitung.....	32
2.2.3.2	Planare Aufnahmen.....	32
2.2.3.3	SPECT-Aufnahmen.....	35
2.2.3.4	Auswertung.....	37
2.2.3.5	Kinetik.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Tracer Herstellung.....</b>	<b>40</b>
3.1.1	HPLC.....	40
3.1.1.1	<sup>123</sup> Iod.....	40
3.1.1.2	GLP-1.....	41
3.1.1.3	Exendin3.....	42
3.1.1.4	[Y39]-Exendin4.....	43
3.1.2	Sephadex-Säule.....	44
3.1.2.1	GLP-1.....	44
3.1.2.2	Exendin3.....	47
<b>3.2</b>	<b>Insulinome im Rattenmodell.....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Medikamentöse Tumorinduktion.....	49
3.2.2	Tumorzelltransplantation.....	50

<b>3.3</b>	<b>Szintigraphien</b> .....	<b>51</b>
3.3.1	Planare Aufnahmen .....	51
3.3.1.1	<i>Verteilung des Tracers im Versuchstier</i> .....	51
3.3.1.2	<i>Aktivitätsverteilung in den einzelnen Organen</i> .....	60
3.3.1.3	<i>Kinetik</i> .....	69
3.3.2	SPECT-Aufnahmen .....	71
3.3.3	Tumortragende Ratten .....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklung einer neuen Lokalisationsmethode</b> .....	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>GLP-1-Rezeptorszintigraphie</b> .....	<b>76</b>
4.2.1	Versuche an gesunden Tieren.....	76
4.2.2	Versuche an tumortragenden Tieren .....	79
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>80</b>
<b>4.4</b>	<b>Fazit</b> .....	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>99</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	99
7.2	Tabellenverzeichnis .....	103
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis meiner akademischen Lehrer</b> .....	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>107</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Insulinome

Insulinome gehören zur Gruppe der endokrinen Tumoren des Pankreas. Diese Tumoren führen durch eine ungehemmte Hormonsekretion zu spezifischen Krankheitserscheinungen (Arnold, Frank, 1996).

Endokrine Pankreastumoren sind seltene Tumoren. Erikson et al. (1989) gehen von einer Prävalenz von 10 / 1.000.000 Einwohner aus. Viele Tumorerkrankungen verlaufen offensichtlich symptomlos, da das Vorkommen im allgemeinen Autopsiematerial (bei 0,5 – 1,5 % der Patienten) deutlich höher ist (Creutzfeld, 1985). Sie werden in funktionelle und nicht-funktionelle Tumoren eingeteilt. Dabei werden die funktionellen Tumoren nach ihrem Hauptsyntheseprodukt benannt. Die nicht-funktionellen Tumoren sezernieren ebenfalls Peptide (pankreatisches Polypeptid (PP), Chromogranin, Neurotensin), führen aber zu keiner richtungsweisenden klinischen Symptomatik (Jensen, Norton, 1999). Allen Tumoren dieser Gruppe ist gemeinsam, dass sie duktale Strukturen enthalten und Hormone produzieren, die nicht immer im adulten Pankreas vorkommen. Ihr Ursprung wird in Stammzellen des diffusen neuroendokrinen Systems gesehen (Klöppel et al., 1995). Diesem System entspringen auch die Karzinoide, das medulläre Schilddrüsenkarzinom, das Melanom und das Phäochromozytom. Ihrer biochemischen Eigenschaften wegen werden alle genannten Tumoren auch unter den APUDomen (amine precursor uptake and decarboxylation) zusammengefasst (Jensen, Norton, 1999). In Granula endokriner Tumoren des Pankreas konnte immunhistochemisch in über 50% der Fälle mehr als ein Hormon nachgewiesen werden. In Insulinomen kommen Glukagon in 0 - 44 %, Somatostatin in 0 – 18 %, Gastrin in 3 – 11 %, PP in 18 – 39 % und ACTH-ähnliche Stoffe in 11% vor (Heitz et al. 1982). Einige dieser Tumoren mit multiplen Granula sezernieren nur ein Peptid, andere mehrere (Wynick et al., 1988). Wie oben erwähnt, führen die einzelnen Tumoren unabhängig von den zusätzlich sezernierten Peptiden zu immer denselben spezifischen Symptomen. Eine Erklärung für dieses Phänomen

ist nicht bekannt. Jensen und Norton (1999) vermuten, dass nur ein Hormon in ausreichende Menge sezerniert werden kann, oder die Peptide, die keine Symptome hervorrufen, biologisch inaktiv synthetisiert oder antagonisiert werden.

Insulinome sind mit einem Anteil von 90 % die größte Gruppe der endokrinen Pankreastumoren (Röher et al., 1997). Sie sind größtenteils (> 90 %) benigne und treten in der Regel solitär auf. In 7,6 % der multiplen Fälle liegt eine multiple endokrine Neoplasie (MEN) Typ I zugrunde (Grant, 1996). Die Tumoren kommen im oder am Pankreas vor. Nur in Ausnahmefällen können Primärtumoren im Duodenum, im Ileum, in den Lungen oder in Karzinoiden gefunden werden (Jensen, Norton, 1999).

### 1.1.1 Klinik

Die klinische Symptomatik ist durch die Whipple' Trias gekennzeichnet (Arnold, Frank, 1996), (Stefanini et al., 1974) :

- Hypoglykämien
- Klinische Symptomatik
  - ♦ Neuroglukopenische Symptome  
Somnolenz (26 %), Schwäche (17 %), Schwitzen (11 %), Krämpfe (10 %), Verwirrheitszustände (9 %), Doppelbilder (7 %), Zitterigkeit (6 %), Heißhunger (5 %), geistige Retardierung (2 %), Schwindel (1 %)
  - ♦ Kardiovaskuläre Symptome (17 %)  
Palpitationen, Tachykardien, Stenokardien, Hypertonie
- Prompte Besserung nach oraler oder i.v.-Glukosegabe

Durch die neuroglukopenischen Symptome werden Insulinome häufig als neuropsychiatrische Erkrankungen fehldiagnostiziert. Die Diagnostik kann durch die große Variabilität der hypoglykämischen Anfälle erschwert werden, die von weniger als 6 bis zu über 50 pro Jahr variieren können (Arnold, Frank, 1996).

Sicheres Diagnostikum ist der Fastentest, bei dem unter klinischen Bedingungen und kontinuierlicher Kontrolle von Blutzucker, Insulin und C-Peptid versucht wird, eine Hypoglykämie zu provozieren. Abbruchkriterium für den Test sind o.g. Symptome, verbunden mit einem Blutzucker von  $\leq 40$  mg / dl. Dieser Test fällt bei 70 – 80 %

der Patienten mit Insulinomen innerhalb von 24 Stunden und bei 98 % innerhalb von 48 Stunden positiv aus (Jensen, Norton, 1999).

Differentialdiagnostisch kommen Hypoglykämia factitia, Autoimmunhypoglykämie, Hypoglykämien bei IGF-sezernierenden Tumoren und Nesidioblastose in Frage.

### 1.1.2 Probleme der Lokalisationsdiagnostik

Bei der Lokalisationsdiagnostik versagt die Standarddiagnostik. Eine hohe Sensitivität weisen nur Verfahren auf, die sich durch hohe Invasivität und Aufwand auszeichnen (siehe Tabelle 1.1). Die Somatostatin-Rezeptorzintigraphie erweist sich im Vergleich zu den Ergebnissen bei anderen neuroendokrinen Pankreastumoren als wenig hilfreich (Zimmer et al., 1995). Einige, vor allem chirurgische Studien propagieren deshalb bei benignen, solitären Tumoren die intraoperative Exploration (Röhr et al., 1997).

Für multiple, atypische und maligne Insulinome ist die Diagnostik nur unbefriedigend gelöst. Die Lokalisationsdiagnostik ist ein essentieller Schritt in der Therapie, da nur die chirurgische Extirpation den Blutzucker normalisieren kann. Die konventionelle Langzeittherapie ist wenig Erfolg versprechend (Hiramoto, 2001).

Für die endoskopische Operationstechnik ist eine exakte Lokalisierung des Tumors unbedingt erforderlich, hier sind die laparoskopischen Ultraschallverfahren am sensitivsten (Berendes, 2000).

**Tabelle 1.1: Sensitivität verschiedener Diagnostischer Methoden zur Lokalisation von Insulinomen (aus: Jensen, Norton, 1999)**

	Sensitivität in %
Abdomineller Ultraschall	27 (10 – 39)
Intraoperativer Ultraschall	84 (67 – 90)
Endoskopischer Ultraschall	88 (77 – 93)
CT	30 (0 – 40)
MRT	10 (0 – 25)
selektive Angiographie	60 (35 – 90)
perkutane transhepatische Pfortaderkatheterisierung mit selektiver Insulinbestimmung	80 (67 – 90)
Intraarterieller Calciumstimulationstest	94 (88 – 100)
Somatostatin (SMS) Rezeptorzintigraphie	25 (12 – 50)

### 1.2 Szintigraphie

Im vorhergehenden Kapitel wurde auf die Insulinome als wichtige Grundlage für diese Arbeit eingegangen. In diesem und den folgenden Abschnitten sollen nun Erläuterungen über weitere grundlegende Bereiche folgen, bevor im letzten Teil der Einleitung eine mögliche Verknüpfung dieser Themenfelder beschrieben wird.

#### 1.2.1 Grundlagen

Eine grundlegende Untersuchungsmethode der Nuklearmedizin ist die Szintigraphie. Dabei werden der zu untersuchenden Person radioaktive Pharmaka verabreicht, die außerhalb des Körpers registriert werden. Es werden Stoffe gewählt, die am Stoffwechsel des Körpers teilnehmen, ohne diesen wesentlich zu beeinflussen. Außerdem müssen diese Substanzen  $\gamma$ -Strahlen emittieren, denn nur diese durchdringen den Körper (Schicha, Schober, 2000).

Durch diese Technik entstehen funktionelle Abbildungen von Stoffwechselfvorgängen im Körper. Voraussetzungen dafür sind die Durchblutung und ein lebensfähiger Organismus (Fritsch et al., 1999). Davon zu unterscheiden sind die morphologisch orientierten bildgebenden Verfahren wie Röntgendiagnostik, MRT und Ultraschall.

Bevor in getrennten Abschnitten auf die radioaktiven Substanzen und die damit hergestellten Tracer eingegangen wird, soll hier noch kurz die Funktionsweise der Detektion mit Hilfe der  $\gamma$ -Kamera erläutert werden.

Die aus dem Körper abgegebenen  $\gamma$ -Strahlen treffen auf ein Natrium-Iodid Kristall. In diesem lösen sie kleine Lichtblitze aus, die elektronisch registriert und verstärkt werden. Die so gewonnenen Signale werden von einem Computer in Abbildungen umgerechnet, die die Verteilung und Stärke der aus dem Körper abgegebenen Strahlung wiedergeben. Zur Minimierung von Streustrahlung ist vor der Kamera ein Bleigitter (Kollimator) montiert, das nur senkrecht auf den Kristall treffende  $\gamma$ -Quanten durchlässt (Parallochkollimator) (Büll et al., 1999).

## 1.2.2 Radioaktive Elemente

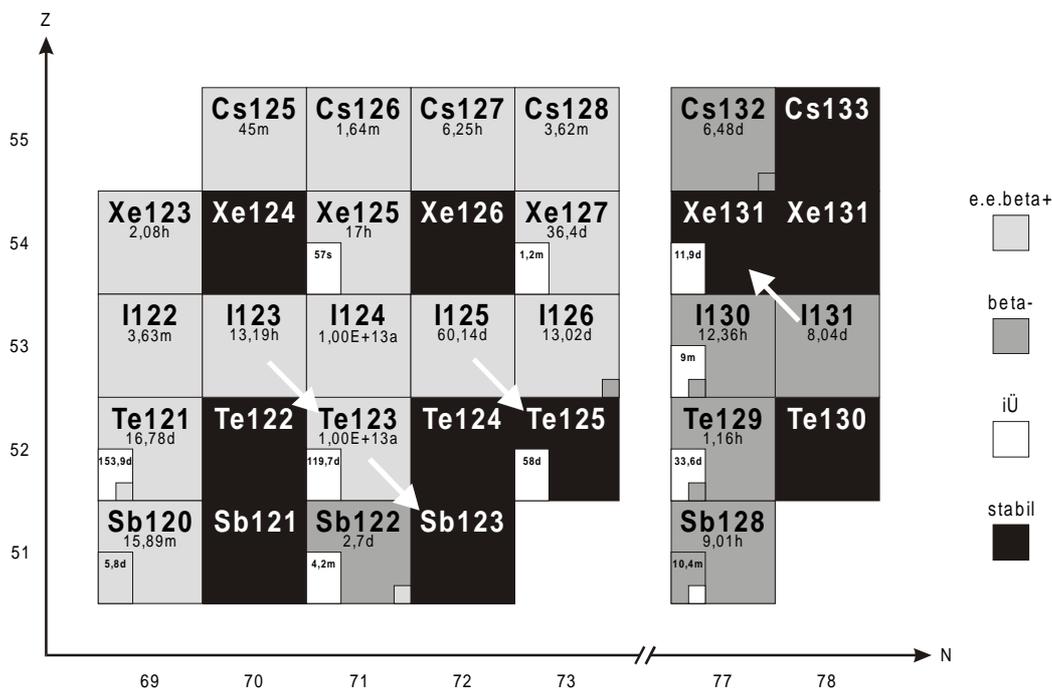
Die drei wichtigsten Arten des radioaktiven Zerfalls sind  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Zerfall. Alle drei Vorgänge haben ihren Ursprung im Atomkern (Grehn, 1988), (Schicha, Schober, 2000):

- $\alpha$ -Zerfall mit einer Emission von 2 Protonen und 2 Neutronen. Diese Art der Strahlung hat eine sehr hohe Wechselwirkung mit dem Organismus und eine sehr geringe Eindringtiefe.
- $\beta$ -Zerfall mit der Emission eines Elektrons. Diese Teilchen dringen einige Zelllagen tief in den Organismus ein, wirken aber weniger zerstörerisch. (Beim  $\beta^+$ -Zerfall wird statt des Elektrons ein Positron frei.)
- $\gamma$ -Quanten besitzen ein hohes Durchdringungsvermögen. Dabei ist das Ausmaß der Wechselwirkung abhängig von der Energie der Quanten.

Die Nuklearmedizin macht es sich zu Nutze, dass praktisch zu jedem Element radioaktive Varianten existieren. Diese sogenannten Isotope sind physikalisch unterschiedliche Atomkerne eines chemischen Elements (gleiche Ordnungszahl, aber unterschiedliche Massenzahl). So ist es möglich, aus einer Vielzahl von Stoffen den passenden herauszusuchen. Wie bereits erwähnt, müssen die diagnostischen Pharmaka in der Nuklearmedizin  $\gamma$ -Strahlen aussenden, da diese am besten außerhalb des Körpers detektiert werden können. Neben den diagnostischen Methoden umfasst die Nuklearmedizin auch therapeutische Techniken, die  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Strahler verwenden. In dieser Arbeit soll vornehmlich auf die diagnostischen Aspekte eingegangen werden.

Welches Isotop verwendet wird, hängt von der Untersuchung ab, bei der es gebraucht wird. Die  $\gamma$ -Energie sollte, abhängig von der Kristalldicke des Detektors, unter 200 keV liegen (Bernier et al., 1994). Eine Halbwertszeit von einigen Stunden bis zu wenigen Tagen ist aus Strahlenschutzgründen günstig. Je kürzer die Halbwertszeit, desto schneller wird der Stoff aus dem Körper eliminiert. Dabei wird die untere Grenze durch praktische Gesichtspunkte vorgegeben. Stoffe mit zu kurzer Halbwertszeit sind bereits zerfallen, bevor mit ihrer Hilfe aussagekräftige Untersuchungen durchgeführt werden können.

Wie bereits oben erwähnt, besitzen die verschiedenen Strahlungsarten ein unterschiedliches Schädigungspotential. Dies wird durch die Größe der Äquivalentdosis berücksichtigt. Dieser Dosisbegriff beinhaltet einen sogenannten Qualitätsfaktor, der die biologische Wirkung angibt. Er beträgt 1 für Photonen- und  $\beta$ -Strahlung, 10 für Neutronen- und 20 für  $\alpha$ -Strahlung (Kaufmann et al., 2001). Die Gruppe der Photonen- und  $\beta$ -Strahlung kann weiter unterteilt werden. So sind die Schäden durch die Strahlenwirkung bei Elektronen-Strahlung am höchsten, gefolgt von weicher Röntgenstrahlung (Mammographie) und am geringsten bei harter Röntgenstrahlung (Knochenaufnahmen).



**Abbildung 1.1:** Auszug aus der Karlsruher Nuklidkarte, eingezeichnet sind die Zerfallswege von  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  und  $^{131}\text{I}$  (e.e.beta+: Elektronen Einfang oder Positronen Emission, iÜ: isomerer Übergang, Z: Protonenzahl, N: Neutronenzahl) (Forschungszentrum Karlsruhe, 1996)

In der vorliegenden Arbeit wurden  $^{123}\text{I}$  und  $^{125}\text{I}$  verwendet. Iod-Isotope eignen sich gut für die Herstellung von radioaktiv markierten Peptiden, da diese Radiopharmaka mit Hilfe der Iodogenmethode relativ leicht hergestellt werden können (siehe Kapitel 1.2.3).  $^{123}\text{I}$  besitzt eine Halbwertszeit von 13,19 Stunden, emittiert einen  $\gamma$ -Quant mit einer Energie von 159 keV und ist damit für Szintigraphien gut geeignet. Die

Halbwertszeit von  $^{125}\text{I}$  ist mit 60 Tagen relativ lang. Damit ist es gut lagerbar. Für Szintigraphien ist es wegen der geringen  $\gamma$ -Energie von 35 keV allerdings nicht geeignet, da der Anteil der im Körper absorbierten Strahlung zu groß ist. Es wurde in der vorliegenden Arbeit nur zu in vitro Versuchen verwendet. Der Vollständigkeit halber soll  $^{131}\text{I}$  erwähnt werden: Dieses Isotop hat eine relativ lange Halbwertszeit von 8 Tagen und emittiert neben einem  $\gamma$ -Quant von 364 keV und einem  $\gamma$ -Quant von 637 keV ein Elektron mit einer Energie von 606 keV ( $\beta^-$ -Strahlung). Damit führt dieses Iod-Isotop zu einem erheblichen radioaktiv bedingten Zelluntergang, der in der Radioiodtherapie klinisch genutzt wird.

### 1.2.3 Tracer

Die Definition eines idealen Radiopharmakons findet sich überall in der nuklearmedizinischen Literatur. Schicha und Schober (2000) sagen über einen idealen Tracer: „... es ist eine Substanz, die einen biochemischen Prozess begleitet, diesen dabei nicht beeinflusst und dabei selbst extern aufgrund der radioaktiven Emission leicht nachweisbar ist.“ Diese Forderungen werden von Behr et al. (2001) noch um folgende Punkte erweitert: Der Tracer muss aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften (v.a. der Größe) an den Ort kommen, den er darstellen soll. Außerdem soll er stabil genug sein, um nicht auf dem Weg dorthin im Körper metabolisiert zu werden.

Des weiteren darf das Radiopharmakon natürlich nicht toxisch sein und muss sich wirtschaftlich herstellen lassen (Schicha, Schober, 2000).

Ein klassisches Beispiel für einen solchen „idealen“ Tracer ist  $^{123}\text{I}$  für die Schilddrüsenszintigraphie, da es sich als Isotop im Stoffwechsel wie normales Iod verhält. Einzig die Herstellung ist kompliziert und teuer, sodass es in der praktischen Routine durch  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ersetzt wird (Büll, Hör, 1990).

Weitere Radiopharmaka sind (Büll et al., 1999):

- Moleküle, z.B. für die Nierenzintigraphie ( $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ ) und die Knochenszintigraphie (Phosphatkomplexe)
- Kolloide, z.B. für die Lungen- und die Lymphszintigraphie
- Erythrozyten und Granulozyten für Blut-, Knochenmark- und Milzuntersuchungen
- Antikörper und Haptene für Tumordarstellungen

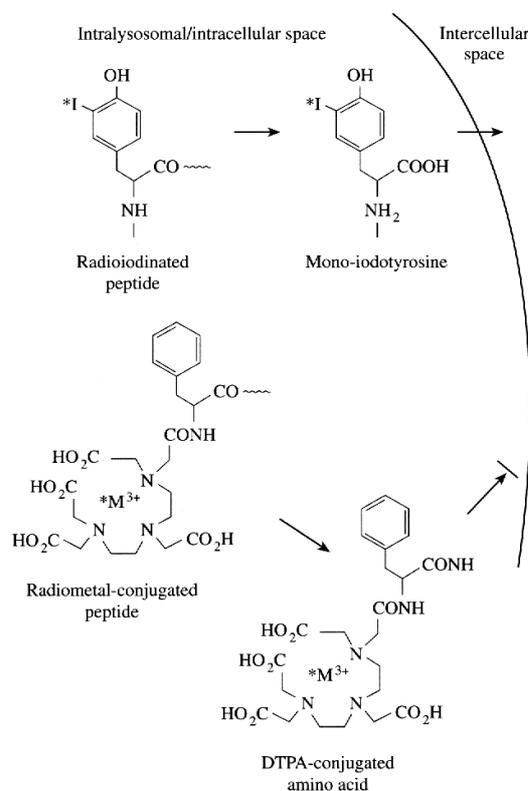
In der vorliegenden Arbeit sollen Eiweißmoleküle als Träger der Radioaktivität verwendet werden, die im Körper als Botenstoffe vorkommen. (Vergleiche Kapitel 1.3) Diese Peptide müssen mit einem radioaktiven Isotop gekoppelt werden. Dazu stehen zwei grundlegende Methoden zur Verfügung: Die Radioiodierung und die Radiometallmarkierung (Behr et al., 2001).

Mit Hilfe der Radioiodierung werden Iod-Atome, je nach Verfahren, an Histidin, Tyrosin und Lysin Seitenketten gebunden. (Behr et al., 2002) Dazu stehen unterschiedliche Techniken zur Verfügung, die in der Literatur kontrovers diskutiert werden. Die Iodogen- und die Chloramine-T Methode werden von Wood et al. (1981) als gleichwertig angesehen. Unterschiede werden nur bei wenigen Peptiden gesehen. Rosenmund et al. (1986) zeigen einen Vorteil der Bolton-Hunter Methode auf und führten aus, dass die beiden vorgenannten Prozeduren die Eiweiße oxidativ schädigen. Van der Laken et al. (2000) wiesen nach, dass auch die Bolton-Hunter Methode zu Veränderungen von markierten Produkten führen kann. Die Radioiodierung kann auch dann fehlschlagen, wenn Aminosäuren, die Einfluss auf die Rezeptor-bindungseigenschaft haben, verändert werden (Behr et al., 1999 a), (Behr et al., 2002).

Im Vergleich zur Radioiodierung ist die Radiometallmarkierung technisch ungleich aufwendiger, da ein Chelat an die Peptidsequenz synthetisiert werden muss. Auch hier stehen wieder verschiedene Techniken zur Verfügung. Diese unterscheiden sich in der bindenden Substanz. Gebräuchliche Chelatbildner sind DTPA, DOTA und DFO. Durch sie können eine Vielzahl von Radiometallen wie  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  oder  $^{55}\text{Co}$  gebunden werden (Meares et al, 1990). Dadurch eröffnet sich ein

breites Spektrum von diagnostischen und therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten.

Dem Nachteil des größeren Aufwandes der Radiometallmarkierung steht der Vorteil eines wesentlich besseren Ergebnisses bei Szintigraphien (mit diesen Stoffen) gegenüber. Der Grund dafür liegt im intrazellulären Abbau der Stoffe. Radioiodierte Peptide werden nach Aufnahme in die Zelle (und teilweise schon im Blut) enzymatisch gespalten. Die Bruchstücke werden teilweise intrazellulär zu neuen Eiweißen aufgebaut, zu einem Großteil aber aus der Zelle abgegeben. Zusätzlich wird Iod durch die im Körper ubiquitär vorhandenen Deiodasen vom Tyrosin abgespalten. Durch alle beschriebenen Prozesse gelangt Radioaktivität zurück in den Kreislauf. Auch radiometallmarkierte Peptide werden intrazellulär gespalten. Dabei wird der Chelatkomplex frei. Dieser kann mangels Transporter nicht aus der Zelle ausgeschleust werden und ist darin „gefangen“ („trapping“) (siehe Abbildung 1.2) (Behr et al., 2001). Die Folge ist eine deutlich höhere Akkumulation von Radioaktivität im Zielgebiet und damit eine bessere Bildgebung.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen konventioneller Radioiodierung und Radiometallmarkierung (Behr et al., 2001).

## 1.2.4 Peptidszintigraphie

Im Bereich der Peptidszintigraphie ist eine beträchtliche Anzahl von Arbeiten veröffentlicht worden. Dabei werden unter anderem Versuche mit VIP (Virgolini et al., 1994) und Gastrin (CCK-B Rezeptor) (Behr et al., 1999 b) unternommen. In der klinischen Praxis ist allein die Somatostatin-Rezeptorzintigraphie etabliert. Dabei wird das 8 Aminosäuren lange Analogon Octreotid verwendet (Krenning et al., 1989).

An dieser Szintigraphie kann die Entwicklung einer Peptidszintigraphie beispielhaft erläutert werden: Erste Ergebnisse über die Verteilung von Somatostatin-Rezeptoren wurden von Reubi et al. ab 1981 veröffentlicht. Dabei handelte es sich um Studien an ZNS und Pankreas (Reubi et al., 1982). Während der Rezeptorstudien wurde das Analogon Octreotid entwickelt und erfolgreich getestet (Reubi, 1985). Zu Beginn der szintigraphischen Versuche wurde  $^{123}\text{I}$  markiertes Octreotid in Tierversuchen verwendet (Bakker et al., 1990). Dazu musste in der Aminosäuresequenz von Octreotid (vergleiche Abbildung 1.3) Phenylalanin in Position 3 durch Tyrosin ersetzt werden, wodurch Tyr-3-Octreotid entstand. Die Bindungseigenschaften wurden durch diese Veränderung nicht beeinflusst. Ein Jahr später berichteten Bakker et al. (1991 a) über erfolgreiche Versuche an Menschen. Im selben Jahr wurden Ergebnisse über Tierversuche mit Indium-markiertem Octreotid veröffentlicht. Dabei wurde die ursprüngliche Aminosäuresequenz vom Octreotid verwendet (siehe Abbildung 1.3). Bakker et al. (1991 b) wiesen dabei auf eine bessere „tumor to background ratio“ hin, die vor allem durch eine geringere hepatobiliäre Clearance (geringere Hintergrundaktivität im Magen-Darm-Trakt) und eine längere Halbwertszeit des neuen Tracers bedingt war. Dies wurde von Krenning et al. (1992) in Studien am Menschen bestätigt.

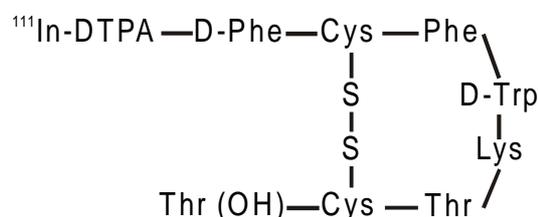
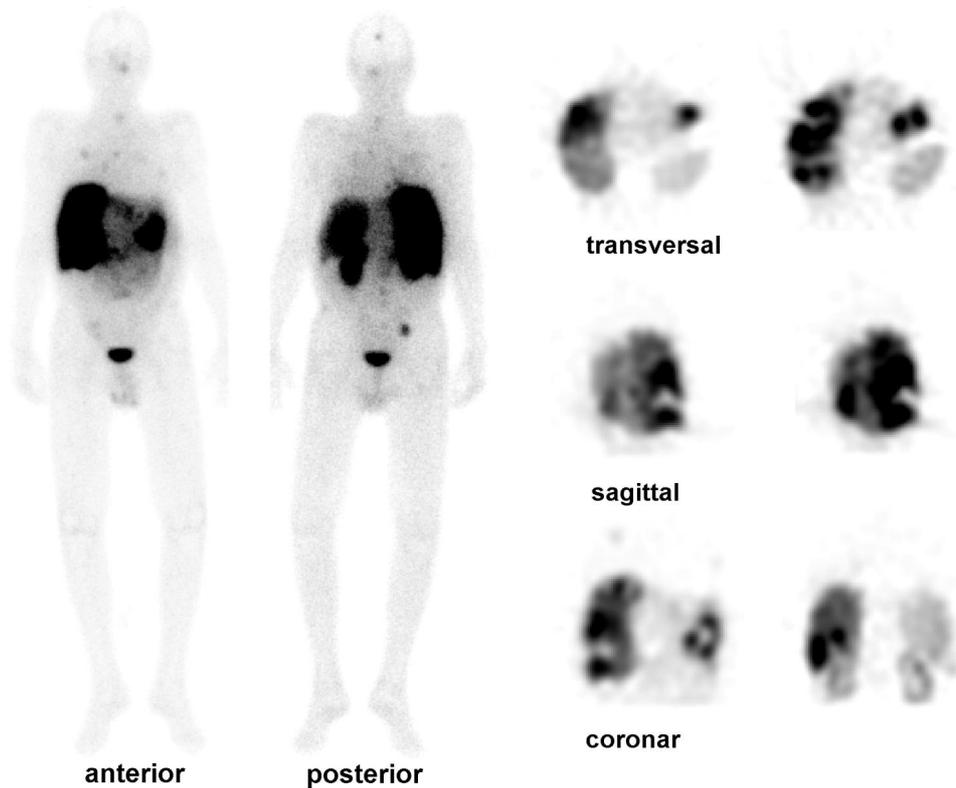


Abbildung 1.3: Aminosäuresequenz von  $^{111}\text{In-DTPA-[D-Phe}^1\text{]-Octreotid}$

Im Laufe weiterer Studien wurde die Somatostatin-Rezeptorszintigraphie an einer großen Anzahl von Patienten und einer Vielzahl von Tumoren getestet. Dabei fanden Krenning et al. (1993) eine hohe Sensitivität bei neuroendokrinen Tumoren (mit Ausnahme von Insulinomen). Versuche an anderen Tumoren, wie Brustkrebs und malignen Lymphomen, erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse, obwohl auch dort Somatostatin-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Joseph et al., 1993). Mit der Entwicklung eines einfachen Kits zur Indiummarkierung von Octreotid stellt die Somatostatin-Rezeptorszintigraphie zur Zeit die einzige kommerziell verfügbare Peptidszintigraphie dar.

Die klinische Überlegenheit der Octreotid-Szintigraphie gegenüber anderen bildgebenden Verfahren zur Lokalisation von neuroendokrinen Tumoren, speziell von Gastrinomen und Karzinoiden, ist in der Literatur gut dokumentiert (Modlin, Tang, 1997), (Krausz et al., 1998). In Abbildung 1.4 ist die szintigraphische Verlaufskontrolle eines 57-jährigen Patienten mit Karzinoid des Dünndarms dargestellt. Es fallen Mehranreicherungen in Leber und Milz (multifokal), sowie eine Mehranreicherung in Projektion auf den rechten Beckenkamm dorsal auf. Die hohe Aktivitätsanreicherung über der Leber ist zum Teil Folge der biliären Clearance von Octreotid. Die sich daraus ergebende Überlagerung mit eventuellen Tumoranteilen stellt einen Nachteil der Methode dar. Zur besseren Lokalisation der Nuklidansammlungen wurden SPECT-Aufnahmen angefertigt und in coronare, sagittale und transversale Ebenen geschnitten. (SPECT bedeutet „single photon emission computer tomography“ und ist eine nuklearmedizinische Aufnahmetechnik, die eine dreidimensionale Rekonstruktion der Bilddaten und variable Schnittebenen ermöglicht.)



**Abbildung 1.4: Szintigraphie mit  $^{111}\text{In}$ -Octreotid bei einem 57-jährigen Patienten mit Karzinoid des Dünndarms und Lebermetastasen. Dargestellt sind Ganzkörper- und SPECT-Aufnahmen.**

Während die Somatostatin-Rezeptorszintigraphie im klinischen Alltag etabliert ist, befinden sich die anderen Peptidszintigraphien noch im Versuchsstadium. Die VIP-Rezeptorszintigraphie wurde von Hessenius et al. (2000) in Frage gestellt. Diese Arbeitsgruppe zeigte für die Szintigraphie eine sehr niedrige Sensitivität, vor allem bei der Suche von Primärtumoren. Dies wird durch einen niedrigeren VIP-Rezeptorbesatz der Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe, vor allem der Leber, erklärt.

## 1.3 GLP-1

Das GLP-1 entsteht aus dem 160 Aminosäuren (AS) langen Proglukagon. Dieses Peptid wird wiederum aus dem 179 AS langen Präproglukagon abgespalten (Bell et al., 1983), das in den L-Zellen des Darms und den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas exprimiert wird (Nowak et al., 1987). Durch intrazelluläres Processing entsteht aus Proglukagon zunächst das major proglucagon fragment (MPGF) (Patzelt, Schug, 1981). Dieses wird dann in GLP-1, ein „spacer-peptide“ und GLP-2 gespalten (Ørskov, 1992 a). Dieser Abbau findet in den L-Zellen und nur zu einem ganz geringen Anteil in den  $\alpha$ -Zellen statt (Conlon, 1988). Dabei liegt GLP-1 zunächst als GLP-1(1-37) vor. Um in die aktive Form überführt zu werden, müssen die ersten sechs Aminosäuren N-terminal, sowie die letzte C-terminal abgespalten werden. Zusätzlich wird das C-terminale Ende amidiert (Holst et al., 1987), (Ørskov et al., 1994).

Die Existenz von GLP-1 wurde 1906 von Moore et al. postuliert. Sie vermuteten eine Substanz, die auf das endokrine Pankreas wirkt, wie das damals schon bekannte Sekretin, welches den exokrinen Anteil stimuliert. Erste Beobachtungen in diese Richtung gehen bis auf das Jahr 1877 zurück, als Bernard beobachtete, dass die intravenöse Glukosegabe bereits bei sehr viel geringeren Mengen eine Glukosurie auslöst als die orale Gabe. 1964 wurde durch Versuche von McIntyre et al. und Elrick et al. bestätigt, dass dieses Phänomen durch eine unterschiedlich starke Insulinantwort ausgelöst wird. Dies führte zur bis heute gültigen Definition des Inkretinmodells von Creutzfeld et al. (1979) und zur Einführung des Begriffs der enteroinsulinären Achse, als Ausdruck für eine hormonelle und nervale Verbindung von Darm und Pankreas.

Das wissenschaftliche Interesse an GLP-1 ist beträchtlich. So wurden innerhalb der letzten vier Jahre jährlich ca. 130 Publikationen über GLP-1 veröffentlicht. Dies entspricht über 40% der seit 1966 in MEDLINE zum Thema veröffentlichten Artikel.

### 1.3.1 Physiologische Wirkung und therapeutische Möglichkeiten

Das große Interesse an GLP-1 begründet sich auf den blutzuckersenkenden Eigenschaften des Peptids, die über verschiedene Systeme vermittelt werden (Drucker, 2001).

Nach dem Modell der enteroinsulinären Achse ist die Hauptwirkung von GLP-1 an den  $\beta$ -Zellen zu suchen, was durch Kolligs et al. (1995) bestätigt wurde. Hier führt das Hormon über cAMP-Erhöhung und eine verstärkte Expression des Insulin-Gens zu einer erhöhten Insulinabgabe (Drucker et al., 1987). Im Gegensatz zu anderen Insulinstimulantien, wie zum Beispiel Sulfonylharnstoffe, ist dieser Prozess abhängig vom Blutzuckerspiegel (Holz et al., 1993). Diese Ergebnisse aus Zellkulturen konnten von d'Alessio et al. (1996) an Pavianen und von Edwards et al. (1999) an Menschen bestätigt werden. Neben Effekten auf die  $\beta$ -Zellen berichteten Schirra et al. (1998) über eine Regulation der Glukagonsekretion durch GLP-1.

Xu et al. (1999) beschrieben neben Einflüssen auf den Blutzucker auch eine Induktion der Inselzell-Proliferation und -Neogenese in Ratten. Diese Ergebnisse decken sich mit Versuchen von Buteau et al (1999) an Zellen und von Edvell et al. (1999) an Mäusen. Die Zunahme an Zellmasse korreliert jedoch trotz verbesserter Blutzuckerregulation nicht mit einer verbesserten oder neu erlangten  $\beta$ -Zell-Funktion. Tourrel et al. (2001) erklären dies durch eine gesteigerte periphere Glukoseutilisation. Sie widersprechen damit der Auffassung von Holz et al. (1993), die eine Rekrutierung passiver  $\beta$ -Zellen für die Blutzuckerregelung durch GLP-1 postuliert hatten.

Mit Hilfe von intrathekal appliziertem GLP-1 konnten Turton et al. (1996) einen Einfluss auf das Nahrungsverhalten von Ratten nachweisen. Dabei stimulierte GLP-1 das Fressverhalten, wohingegen GLP-1 Antagonisten es hemmten (Donahey et al., 1998). Diese Effekte waren jedoch nur von kurzer Dauer. In Versuchen an gesunden übergewichtigen Diabetikern wiesen Nauck et al. (1997) eine verlängerte Magenentleerung durch intravenös appliziertes GLP-1 nach. Ob eine Verbindung der zerebralen und gastroenteralen Regelkreise vorhanden ist, oder ob es sich um zwei getrennte Systeme handelt, wird noch untersucht. Ørskov et al. (1996) fanden mit Hilfe autora-

diographischer Untersuchungen an Rattenhirnen GLP-1 Rezeptoren in der Area Postrema und in subfornikalen Strukturen, die von zirkulierendem GLP-1 erregt werden können. Die Blut-Hirnschranke kann hier überwunden werden, da das Endothel der Kapillaren in diesen Gebieten eine Fensterung aufweist. Eine Anreicherung in anderen Hirnarealen wurde nicht gefunden. Die Einflüsse von GLP-1 auf das Nahrungsverhalten und das Körpergewicht scheinen nicht von essentieller Bedeutung zu sein (Drucker, 2001).

Außerhalb von Pankreas und ZNS kommen GLP-1 Rezeptoren in Magen (Foveolae), Lungen, Herz und Nieren vor (Bullock et al., 1996), (Vella et al., 2000). Turrel et al. (2001) vermuteten in diesen Rezeptoren Schaltstellen für die periphere Glukoseutilisation (s.o.). Damit widersprechen sie der Ansicht von Vella et al. (2000), die in Versuchen an Typ-2 Diabetikern keinen solchen Effekt nachweisen konnten. Die Funktion der Rezeptoren in der Lunge beschrieben Richter et al (1993). Sie wiesen eine Zunahme von Makromolekülen in den Luftwegen und eine Relaxation verengter Pulmonalarterien nach. In einer Publikation von Ruiz-Grande et al. (1992) wurde über lipolytische Eigenschaften am menschlichen Fettgewebe berichtet. Dieser Ansicht wird heute eindeutig widersprochen (Bertin et al., 2001).

Durch die dargestellte Studienlage begründen sich die hohen Erwartungen in die Diabetestherapie mit GLP-1 (Holst, 2000). Diese konnte mit ersten tierexperimentellen Arbeiten erhärtet werden. In Studien an diabetischen Tieren konnten durch GLP-1 und Analoga der Blutzuckerspiegel und das HbA<sub>1c</sub> gesenkt, die Insulinsekretion erhöht und eine Gewichts- und Körperfettabnahme induziert werden (Greig et al., 1999), (Szayna et al., 2000). Dabei werden zur Zeit unterschiedliche Behandlungsregime erprobt. Obwohl noch keine Langzeitergebnisse vorliegen, scheinen die blutzuckersenkenden Eigenschaften von GLP-1 über längere Zeit nachweisbar zu sein (Todd et al., 1997).

### 1.3.2 Stoffwechsel und Analoga

Das größte Problem der klinischen Anwendung von GLP-1 ist die kurze Halbwertszeit (Holst, 2000). Diese liegt bei 20 Minuten in vitro (Deacon et al., 1995) und bei 4-5 Minuten in vivo (Kreymann et al., 1987), (Ørskov et al., 1993).

Der Abbau von GLP-1 erfolgt über mehrere Enzymsysteme sowohl intra- als auch extrazellulär. Das wohl bedeutendste davon ist die Dipeptidyl-peptidase IV (DP IV) (Buckley, Lundquist, 1992). Dieses Enzym spaltet die ersten beiden Aminosäuren N-terminal ab (Mentlein et al., 1993). Zusätzlich dazu wurde ein Abbau durch die neutrale Endopeptidase 24.11 (Hupe-Sodmann et al., 1995), das Angiotensin Converting Enzyme und die Aminopeptidase A beschrieben (Hupe-Sodmann et al., 1997). In der Niere erfolgt eine Ausscheidung von GLP-1 sowie ein Abbau am Bürstensaum der Tubuli (Ørskov et al., 1992 b), (Ruiz-Grande et al., 1993).

Um diesem Problem zu begegnen wurden GLP-1 Analoga gesucht und synthetisiert, die eine längere Plasmahalbwertszeit aufweisen. Einen anderen Weg gehen Holst et al. (1998), indem sie die Halbwertszeit von GLP-1 durch Blockierung der Dipeptidyl-peptidase IV mit Hilfe eines Inhibitors (DP IV-Inhibitor) verlängern.

Zu der Gruppe der natürlichen Analoga gehören zwei Peptide, die aus dem Gift der Krustenechsen isoliert wurden. Das Gift dieser Tiere enthält ein Gemisch aus verschiedenen endogen aktiven Peptiden (Parker et al., 1984). Als erstes GLP-1 Analogon wurde 1990 Exendin3 durch Eng et al. aus dem Sekret von *Heloderma horridum* isoliert. Die Isolierung von Exendin4, einem GLP-1 Agonisten aus dem Gift von *Heloderma suspectum*, erfolgte 1992 ebenfalls durch Eng et al. Die Aminosäuresequenzen von Exendin3 und Exendin4 unterscheiden sich nur an Position zwei und drei. Sie sind zusammen mit der Sequenz von GLP-1 in Tabelle 1.2 wiedergegeben. 1991 veröffentlichten Raufman et al. Ergebnisse über die GLP-1 antagonistischen Eigenschaften von Exendin(9-39). Dies ist der wichtigste GLP-1 Antagonist.

Die Gruppe der synthetischen Analoga, sowohl von GLP-1 als auch von Exendin ist groß. Siegel et al. (1999) und Gallwitz et al. (2000) haben über Versuche mit N-terminal modifiziertem GLP-1 berichtet. Xiao et al. (2001) haben Versuche mit Veränderungen der Aminosäuresequenz durchgeführt. Das älteste und am besten

untersuchte Peptid ist [Ser<sup>8</sup>]GLP-1(7-36)amid (Rizel et al., 1998). Alle Autoren beschreiben eine höhere Stabilität der Analoga in vitro. Einen Vorteil in vivo konnten Xiao et al. (2001) sowohl für N-terminale und mittkettige Modifikationen nachweisen. In Arbeiten zu [Y39]-Exendin4 bestätigten Singh et al. (1994) die Bedeutung der N-terminalen Region für die Rezeptorbindung. In den Versuchen führte ein N-terminal eingefügtes Tyrosin zu stark verringerten Bindungseigenschaften des Peptids.

Im Vergleich von [Ser<sup>8</sup>]GLP-1(7-36)amid mit den Exendin Varianten konnten Thum et al. (2002) eine höhere Stabilität von Exendin4 in vitro nachweisen.

**Tabelle 1.2: Aminosäuresequenzen von GLP-1(7-36)amid, Exendin3 und Exendin4. Die homologen Aminosäuren sind jeweils unterstrichen.**

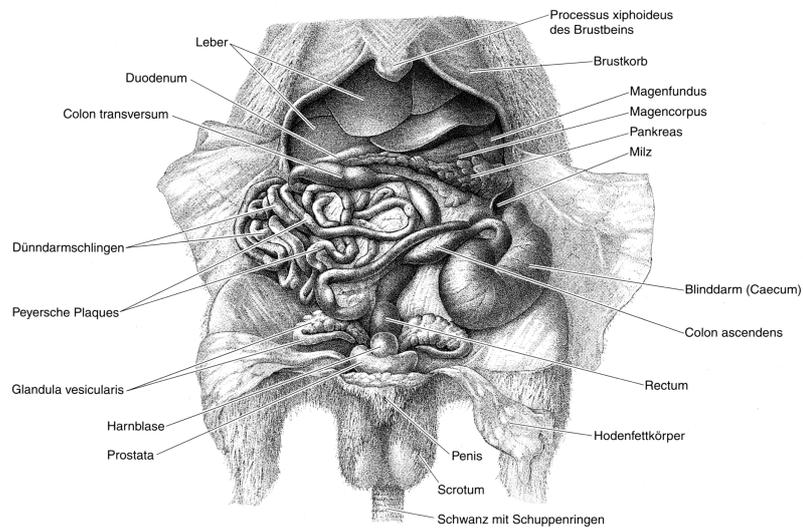
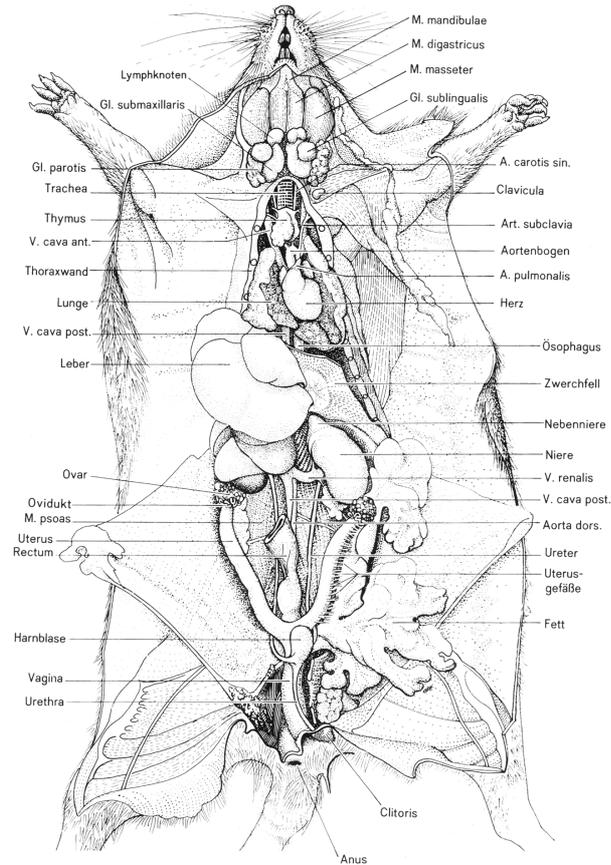
<u>GLP-1 (7-36)</u>	<u>H</u> A <u>E</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>R</u>
Position	7      10                      20                      30
<u>Exendin3</u>	<u>H</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>S</u>
Position	1                      10                      20                      30
<u>Exendin4</u>	<u>H</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>S</u>
Position	1                      10                      20                      30

### 1.4 Die Ratte als Tumormodell

Bevor GLP-1-Analoga zur Tumorszintigraphie eingesetzt werden können, müssen sie in verschiedenen Modellen *in vivo* und *in vitro* überprüft werden. Dabei werden zuerst Experimente auf zellulärer Ebene durchgeführt. Der nächste Schritt sind Experimente in einem Tiermodell. An ein Tiermodell in der onkologischen Forschung werden eine Reihe von Forderungen gestellt: Das Tier soll einen Stoffwechsel und pathogenetische Reaktionen vergleichbar dem Menschen besitzen. Über das Modell sollen ein breites Spektrum von Informationen verfügbar sein, die das Verhalten, sowie physiologische, pharmakologische, toxikologische und biochemische Daten beinhalten. Spontanes Tumorwachstum sollte praktisch nicht auftreten. Dazu kommen eine Reihe von ökonomischen Forderungen, die Verfügbarkeit, Haltung und Zucht betreffen. Die Ratte als Versuchstier erfüllt viele dieser Erwartungen (Peckham, 1980).

In dieser Arbeit wurden zwei Modelle zur Tumorinduktion verwendet: Die medikamentöse Tumorinduktion nach Kazumi et al. (1978) und die Tumorzelltransplantation nach Chick et al. (1977). Diese Methoden werden in Kapitel 2.1.2 weiter besprochen.

Zum Verständnis der in dieser Arbeit abgebildeten Szintigraphien wird hier die Anatomie der Ratte wiedergegeben (siehe Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5:** a) Situs einer weiblichen Ratte. Der Magen-Darm-Trakt ist entfernt.  
 b) Situs der Baucheingeweide einer männlichen Ratte. Der den Magen bedeckende linke Leberlappen ist hochgeklappt. Omentum majus und cranialer Prostatalappen sind der Klarheit willen nicht dargestellt.  
 (Storch, Welsch, 1999, mit freundlicher Genehmigung von © Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

## 1.5 Fragestellung und experimentelle Konzeption

Im vorangegangenen Text wurde die Problematik bei der Lokalisationsdiagnostik von Insulinomen, sowie die Möglichkeiten der Szintigraphie und die Wirkungen von GLP-1 erläutert.

In der vorliegenden Arbeit sollen diese drei Felder zu einer neuen Szintigraphiemethode zusammengeführt und folgende Projekte bearbeitet werden:

- Herstellung eines geeigneten Radiopharmakons für szintigraphische Zwecke.
- Etablierung eines validen Tumormodells in Ratten.
- Untersuchung von Einflussmöglichkeiten auf die Verteilung des Tracers in vivo.
- Bestimmung der Tracerverteilung im Versuchstier und Bestimmung von Halbwertszeiten.
- Darstellung der im Tiermodell induzierten Tumoren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

In diesem Kapitel werden die für die Versuche nötigen Substanzen aufgeführt. Sonstige Chemikalien wurden, falls nicht anders erwähnt, von Sigma, Deisenhofen und Merck, Darmstadt bezogen.

#### 2.1.1 Tracer-Herstellung

##### 2.1.1.1 Markierung von Peptiden

Es wurden folgende Peptide zur Markierung eingesetzt:

- Bachem, Heidelberg:  
Glukakon-Like-Peptide-1 (GLP-1(7-36)amid) ( 3297,68 g / mol )  
Exendin3 ( 4202,63 g / mol )
- MWG Biotech, Ebersberg:  
[Y39]-Exendin4 ( 4267,70 g / mol )

Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide sind in Tabelle 1.2 wiedergegeben.

Zur Markierung wurden folgende Isotope verwendet:

- Amersham, Freiburg:  
Na <sup>125</sup>I ( 643,8 MBq / μg )  
Na <sup>123</sup>I ( 1,23 GBq / μg )
- DuPont, Bad Homburg:  
Na <sup>123</sup>I ( 3,7 GBq / μg )

Dabei handelte es sich um Natriumsalze von Iod. Zur Etablierung der Methode wurde  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , zur Szintigraphie  $\text{Na}^{123}\text{I}$  verwendet.

### 2.1.1.2 Aufreinigung markierter Peptide

Die Aktivitätsbestimmung nach der Auftrennung gewonnener Proben erfolgte mit einem Bohrlochdetektor mit NaI Kristall (Curiemeter E, PTW Freiburg).

#### 2.1.1.2.1 HPLC (high pressure oder high performance liquid chromatography)

Das HPLC System bestand aus:

- Water Associates, Chromatographie Division of Milipore, Milford, Ma, USA:  
HPLC-Pumpen, Modell 510  
Water Automated Gradient Controller  
Water Nova-Pak C18 60 Å 4 µm 3.9 x 150 mm HPLC Säule  
U6K Injektor
- Amersham Pharmacia, Freiburg:  
LKB Bromma 2211 Superrac Probensammler

Ein Speed-Vac System zur Eintrocknung der Proben bestand aus folgenden Komponenten:

- Vacubrand, Werthheim:  
Membran-Vakuumpumpe MD4C
- Christ, Osterode (Harz):  
Kühlfalle Alpha5
- Squant, Holbrock, NY, USA:  
Speed Vac SPD 101 B

#### **2.1.1.2.2 Sephadex PD-10 Säule**

Die Säulen waren mit NaCl 0,9% gefüllt und stammten von Amersham Pharmacia Biotech in Uppsala, Schweden.

### **2.1.2 Insulinome im Rattenmodell**

#### **2.1.2.1 Medikamentöse Tumorinduktion**

Für die Tierversuche wurden folgende Ratten eingesetzt:

- Charles-River WIGA GmbH, Sulzfeld:

200 g Wistar Unilever Ratten

Folgende Medikamente waren nötig:

- Pharmacia, Erlangen:

Streptozotocin (*Zanosar*®)

- Jenapharm, Jena:

Nicotinsäureamid 200 mg Tabletten

Zur Bestimmung des Blutzuckers wurde verwendet:

- Bayer, Leverkusen:

Glucometer Elite

#### **2.1.2.2 Tumorzelltransplantation**

Für die Tierversuche wurden folgende Ratten eingesetzt:

- Møllegaard, Lille Skensved, Dänemark:

300 g NEDH Ratten

Bei den Zellen handelte es sich um:

- ATCC, Manassas, VA, USA:

RINm5F-Zellen

Das Kulturmedium bestand aus:

- Invitrogen, Karlsruhe:

RMPI 1640 Medium mit L-Glutamin

Fetales Rinder Serum (TCS)

HEPES-Puffer

Na-Pyruvat

PenStrep

An speziellem Labormaterial wurde benötigt:

- Greiner bio-one, Frickenhausen:

250 ml und 550 ml Kulturflaschen

### 2.1.3 Szintigraphie

Zu den Tierversuchen wurden folgende Ratten verwendet:

- Charles-River WIGA GmbH, Sulzfeld:

300 g Wistar Unilever Ratten

- Møllegard, Lille Skensved, Dänemark:

300 g NEDH Ratten

Zur Narkose wurden folgende Substanzen angewandt:

- Hexal, Holzkirchen:

Ketamin

- Bayer, Leverkusen:

Xylazin 2 % (*Rompun*®)

Des Weiteren kamen 25 G Schädelvenenkatheter von Braun, Melsungen zur Schaffung eines längerfristigen iv. Zugangs zum Einsatz.

Die Szintigraphie erfolgte mit einer hochauflösenden Gammakamera der Firma General Electrics (MaxiCamera 300 Autotune ZS) mit einem „high-resolution, medium-energy“ Parallellochkollimator. Die SPECT-Aufnahmen wurden mit einer Siemens 3-Kopf-Kamera (Multispect 3) angefertigt.

Beide Kameras waren mit einem Siemens ICON Auswertungssystem auf Apple Basis verbunden.

Im Rahmen der szintigraphischen Versuche kamen außerdem folgende Substanzen in verschiedenen Gruppen zum Einsatz:

- Bayer, Leverkusen:

Perchlorat (*Irenat*®)

- Bachem, Heidelberg:

Exendin4

- probiodrug, Halle:

Isoleucyl Thiazolidine (DP IV-Inhibitor)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tracer Herstellung

#### 2.2.1.1 Markierung von Peptiden

Die Herstellung der markierten Peptide erfolgte nach der von Conlon (1988) beschriebenen Iodogenmethode, die für diese Peptide optimiert wurde.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden 500 µg des Peptides (GLP-1 oder eine Exendinvarianten) zu 400 µl Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) und 100 µl Dichlormethan gegeben. Nach gleichmäßiger Durchmischung der entstandenen Lösung erfolgte eine Verteilung auf Aliquots á 50 µl. Die Lösungen lagerten bei -80 °C, andere für den kurzfristigen Verbrauch bei -20 °C.

Für die Markierung wurden 4 mg Iodogen (1,3,4,6-Tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Di-Phenylglycouril) in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß mit 1 ml Dichlormethan versetzt und auf Eis gelagert.

20 µl davon wurden in vorbereitete Reaktionsgefäße pipettiert, bei denen der Deckel abgeschnitten worden war.

Kontinuierliche Drehung des Gefäßes zwischen den Fingern führte zur Bildung eines dünnen Filmes. Die Wärme der Finger verdampfte das Dichlormethan und hinterließ einen gleichmäßigen Iodogen-Beschlag im unteren Ende des Reaktionsgefäßes.

In das so vorbereitete Reaktionsgefäß wurden nun 111 MBq (3 mCi) Na <sup>123</sup>I bzw. 18,5 MBq (0,5 mCi) Na <sup>125</sup> und 50 µl der Peptidmischung gegeben. Mit Hilfe der Zentrifugation wurde die Lösung im unteren Teil des Reaktionsgefäßes gesammelt. Zur Inkubation wurde die Lösung in einem Bleischutz auf einen Rütteltisch gestellt. Die Inkubationszeiten betragen 20 Minuten für GLP-1 und 25 Minuten für die Exendinvarianten.

Die Reaktion wurde durch Aufnahme der Lösung in eine Spritze beendet.

## 2.2.1.2 Aufreinigung markierter Peptide

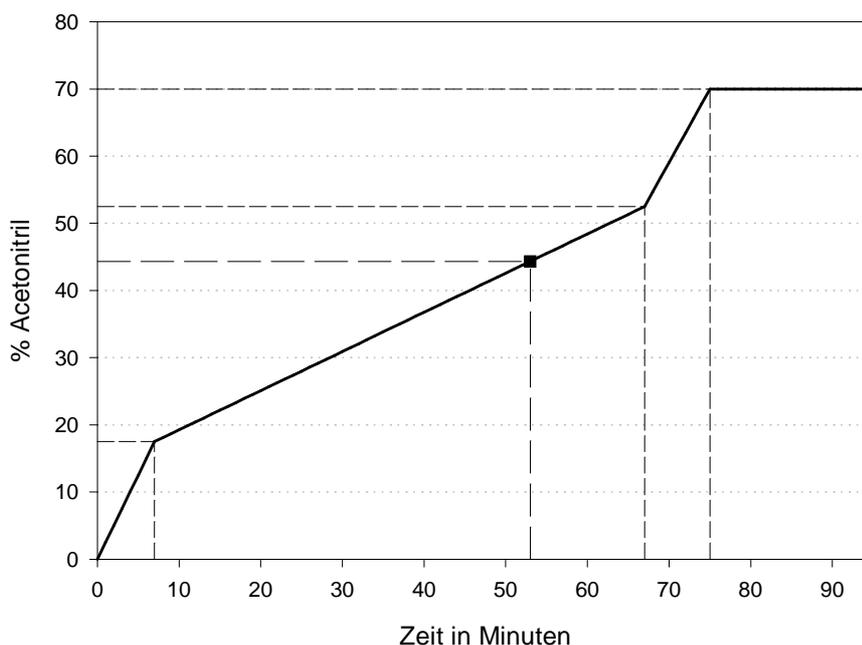
### 2.2.1.2.1 HPLC (high pressure oder high performance liquid chromatography)

Bei der von uns verwandten HPLC funktionierte die Trennung mittels Reversed-Phase-Chromatographie. Dabei befindet sich in der Chromatographiesäule eine apolare „stationäre Phase“, an der eine polare „mobile Phase“ vorbeiströmt, die im Laufe des Versuchs immer apolarer wird (Meyer, 1986). Als Flussmittel in der mobilen Phase dienen Wasser (Lösung A) und eine 70 %ige Acetonitrillösung (Lösung B), jeweils mit einem Zusatz von 0,1 % TFA.

Um einen gleichmäßigen Fluss während der Chromatographie zu gewährleisten, erfolgte die Entgasung der Flussmittel an jedem Versuchstag neu. Dazu wurden die Flüssigkeiten 15 Minuten mit Stickstoff durchperlt und für weitere 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Mit Hilfe von Laborfilm wurden die Gefäße luftdicht verschlossen. Die HPLC Anlage wurde vor den Experimenten gespült, indem sie erst mit 100 % Lösung B durchflossen und danach vollständig mit Lösung A gefüllt wurde.

Zur Injektion in die HPLC wurde der nach Kapitel 2.2.1.1 hergestellte Tracer mit einer Hamiltonspritze aufgenommen, in der sich 500 µl Lösung A und 100 µl Kaliumiodid befanden. Nach Aufnahme des markierten Peptides erfolgte eine Spülung des Reaktionsgefäßes mit 50 µl Lösung A, die ebenfalls in die Hamiltonspritze aufgenommen wurde. Vor Injektion in den Injektor erfolgte eine Aktivitätsbestimmung der Probe mittels Bohrlochcuriemeter.

Zur Auftrennung wurde ein Gradient aus mehreren linearen Teilstücken verwendet. Dabei stieg die Acetonitrilkonzentration im Flussmittel innerhalb der ersten 7 Minuten auf 17,5 %. Danach folgte ein flacherer Anstieg auf 52,5 % über 60 Minuten. In den darauffolgenden 8 Minuten stieg die Konzentration auf den Endwert von 70 % an, der für 20 Minuten konstant blieb (siehe Abbildung 2.1). Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,9 ml / Minute.



**Abbildung 2.1: Acetonitrilkonzentration während der HPLC, Markierter Punkt: erwarteter GLP-1 Peak**

Im Mittelbereich wurde der Anstieg flach gehalten, um eine genauere Trennung zu erreichen. Nach Gotthardt (1995) erscheint der GLP-1 Peak bei einer Acetonitrilkonzentration von 44 %. Um eine genaue Identifikation von Bruchstücken zu ermöglichen, wurde der flache Teil bereits bei einer Konzentration von 17,5 % begonnen. Der steile Anstieg am Anfang sollte das freie Iod auswaschen, Endanstieg und Plateau eventuell noch vorhandene Reste von Peptid von der Säule spülen.

Zur Etablierung der Methode, zur Fehlerfindung und zur Analyse der mittels Sephadex-Säule (siehe Kapitel 2.2.1.2.2) gewonnenen Proben kam ein modifizierter Acetonitril-Gradient zur Anwendung. Der langsame Anstieg wurde dabei von 60 auf 80 Minuten verlängert, um eine größere Trennschärfe zu erreichen.

Alle Proben wurden mittels eines Probensammlers in Fraktionen á einer Minute gesammelt. Die Bestimmung des Aktivitätsgehalts mit Hilfe eines Bohrlochcuriemeters diente als Qualitätskontrolle für jede Markierung. Dieses Verfahren ermöglichte es außerdem, die Fraktionen mit der höchsten Aktivität auszuwählen.

Auf Grund der Toxizität von Acetonitril (Pozzani et al., 1959) mussten die Proben vor Injektion mit Hilfe eines Speed-Vac Systems eingetrocknet und in NaCl<sub>aq</sub> 0,9 % wieder aufgenommen werden.

#### **2.2.1.2.2 Sephadex-Säule**

Die Trennung auf dieser Säule funktioniert nach dem Prinzip der Gelchromatographie, bei der die zu trennenden Stoffe nach Teilchengröße sortiert werden (Meyer, 1986). Die Säule enthält poröse Kugeln, die kleinere Teilchen länger zurückhalten als größere.

Die Säule wurde in einem Bleimantel an einem Laborstativ eingespannt.

Zur Auftrennung aus der Sephadex-Säule wurde der nach 2.2.1 hergestellte Tracer mit einer Spritze aufgenommen und die Aktivität mittels eines Bohrlochcuriemeters gemessen. Diese Lösung wurde auf eine mit reichlich NaCl<sub>aq</sub> 0,9 % vorgespülte Säule gegeben. Es wurde mit jeweils 200 µl NaCl<sub>aq</sub> 0,9 % nachgespült. Die erhaltenen Fraktionen wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt und deren Aktivität in einem Bohrlochcuriemeter gemessen.

Die Analyse ausgewählter Proben zur Validierung der Methode erfolgte gemäß Kapitel 2.2.1.2.1 auf der HPLC.

### **2.2.2 Insulinome im Rattenmodell**

#### **2.2.2.1 Medikamentöse Tumorinduktion**

Die medikamentöse Tumorinduktion erfolgte nach der von Kazumi et al. (1978 und 1981) beschriebenen Methode. Dabei kamen, wie in den genannten Artikeln beschrieben, Wistar Ratten zum Einsatz.

In 2 Versuchen wurden je 8 männlichen und 8 weiblichen Wistar Ratten 500 mg / kg KG Nicotinamid intraperitoneal und nach 15 Minuten 65 mg / kg KG Streptozotocin intravenös injiziert. Die Injektion erfolgte in eine Schwanzvene. Die Nikotinamid Tabletten waren vorher in einem Mörser zerkleinert und in NaCl<sub>aq</sub> 0,9% gelöst worden.

Die Kontrolle der Versuchstiere erfolgte durch wöchentliche Gewichts- und 14-tägige Blutzuckermessung.

### 2.2.2.2 Tumorzelltransplantation

Das verwendete Modell der Tumorzelltransplantation von Insulinomen wurde 1977 von Chick et al. im Rattenmodell entwickelt. Die verwendete RIN-m5F Zellreihe isolierten Gazdar et al. (1980) aus radioaktiv induzierten Pankreas-Tumoren. RIN-m5F Zellen sind Insulin sezernierende Zellen, die als Modell für Insulinome gelten. In diesem Versuch kamen NEDH-Ratten zum Einsatz, die RIN-m5F Zellen nicht abstoßen.

Die Zellen wurden nach der von Praz et al. (1983) beschriebenen Methode bei 100 % Luftfeuchtigkeit und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % in Kulturflaschen gehalten. Dabei wurden die üblichen Sterilitätskriterien beachtet. Die Passagierung erfolgte 14-tägig. Ein Mediumwechsel (siehe Tabelle 2.3) fand alle 3 Tage statt.

Für die subkutane Injektion von RIN-m5F-Zellen zur Tumorinduktion fanden die Zellen einer dicht bewachsenen 550 ml Kulturflasche pro Ratte Verwendung. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von der Flasche abgelöst und abzentrifugiert. Es folgte eine Reinigung erst mit Kulturmedium und danach mit HEPES-Puffer, bevor die Zellen in 1 ml NaCl<sub>aq</sub> 0,9 % resuspendiert und über eine 14 G Kanüle injiziert wurden.

Die Injektion erfolgte bei 8 Ratten subkutan in den linken Hinterlauf.

Nachdem mittels Zellinjektion ein Tumormodell etabliert worden war, erfolgte die weitere Tumorübertragung mittels Gewebestücken (Hansen, 1995). Diese wurden in Narkose operativ transplantiert. Als Implantationsort diente wieder der subkutane Bereich des linken Hinterlaufs.

**Tabelle 2.3: RINm-5F Kulturmedium**

Konzentration		Verwendete Menge
	RMPI 1640 Medium mit L-Glutamin	500 ml
10 %	fetales Rinder Serum (FCS)	50 ml
10 mM	HEPES-Puffer	5 ml $\pm$ 1 M
1 mM	Na-Pyruvat	5 ml $\pm$ 100 mM
1 %	PenStrep	5 ml

## 2.2.3 Szintigraphien

### 2.2.3.1 Narkose / Vorbereitung

Zur Durchführung der Szintigraphien und der Tumortransplantationen waren Narkosen notwendig. Für die Narkose wurden den Ratten 5-10 mg / kg KG Rompun und 100 mg / kg KG Ketamin intraperitoneal injiziert. Während des Einsetzens der Narkose wurden die Ratten von Außenreizen, vor allem von Lärm abgeschottet. Nachinjektionen erfolgten intravenös über eine Schwanzvene. Dabei kam die o.g. Mischung zum Einsatz. Kurz vor Ende der Narkose wurde nur noch Ketamin nachinjiziert. Nachinjektionen waren nur während der Szintigraphien nötig.

Für die szintigraphischen Aufnahmen wurde zur Applikation des radioaktiven Tracers ein Schädelvenenkatheter in einer Schwanzvene platziert und fixiert. War es in Ausnahmefällen nicht möglich die Schwanzvenen zu punktieren, erfolgte die Injektion in die V. dorsalis penis.

Zur besseren Darstellung der Baueingeweide wurden die Ratten mit dem Bauch nach oben auf einem Styroporblock fixiert.

### 2.2.3.2 Planare Aufnahmen

In den Versuchen für diese Arbeit sollten mögliche Peptide für eine GLP-1 Rezeptor-Szintigraphie getestet werden. Dafür wurde mit Hilfe planarer Aufnahmen die Peptidverteilung in Wistar Ratten untersucht, die in mehrere Gruppen eingeteilt wurden (siehe Tabelle 2.4). Die in den Vorversuchen (siehe Kapitel 3.1) aussichtsreichen Peptide (GLP-1(7-36)amid und [Y39]-Exendin4) kamen dabei zum Einsatz. Als Vergleichsgruppe diente eine Gruppe von Ratten, die Na <sup>123</sup>I injiziert bekamen. In

den einzelnen Gruppen wurden wiederum Untergruppen gebildet, in denen an verschiedenen Tieren die Szintigraphie mit einer Gabe von Irenat, einem DP IV-Inhibitor und dem entsprechenden unmarkierten Peptid in unterschiedlicher Zusammenstellung erfolgte.

Nachdem die Peptide an gesunden Ratten untersucht worden waren, wurden einzelne tumortragende NEDH Ratten mit Exendinvarianten szintigraphiert. Dabei sollten sowohl Daten über die Aktivitätsanreicherung im Tumor, als auch Ausgangspunkte für weiterführende Arbeiten gesammelt werden.

**Tabelle 2.4: Verteilung der Ratten im Szintigraphie Versuch**

Jod	4 Ratten
Jod, Irenat	4 Ratten
GLP-1	4 Ratten
GLP-1, Irenat	8 Ratten
GLP-1, Irenat, DP IV-Inhibitor	8 Ratten
GLP-1, Irenat, DP IV-Inhibitor, unmarkiertes GLP-1	4 Ratten
[Y39]-Exendin4	4 Ratten
[Y39]-Exendin4, Irenat	8 Ratten
[Y39]-Exendin4, Irenat, DP IV-Inhibitor	4 Ratten
[Y39]-Exendin4, Irenat, DP IV-Inhibitor, unmarkiertes Exendin4	4 Ratten

Nach erfolgreicher Narkose wurden die Versuchssubstanzen nach folgendem Schema injiziert:

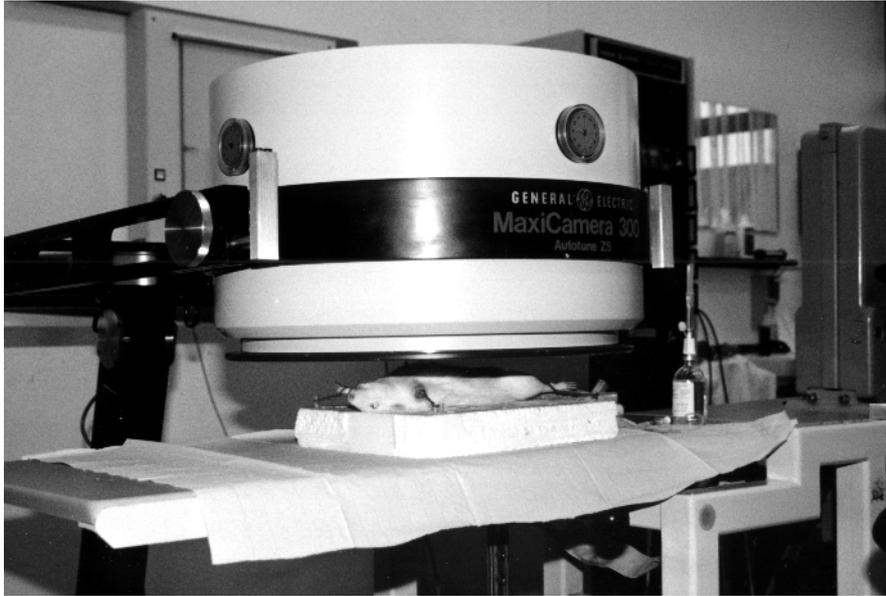
- Die Applikation von Irenat erfolgte 30 Minuten vor Tracerinjektion in einer Dosierung von 40 mg intravenös. Diese Gabe wurde am Abend des Versuchstages intravenös oder intraperitoneal wiederholt.
- Den DP IV-Inhibitor bekamen die Versuchstiere in einer Dosierung von 100  $\mu$ mol 15 Minuten vor, sowie direkt nach der Injektion intravenös appliziert.
- Das unmarkierte GLP-1 bzw. Exendin4 wurden mit dem Tracer zusammen in die Spritze aufgenommen und verabreicht. Dabei kamen 25  $\mu$ g unmarkiertes Peptid zum Einsatz
- Der Tracer wurde langsam in die Schwanzvene gespritzt. Die Versuchstiere erhielten dabei 11 – 15 MBq / kg KG (0,3 - 0,4 mCi / kg KG) in einem Volumen von 1 ml injiziert. Der Beginn der Injektion markierte den Beginn der Szintigraphie.

Bei den planaren Aufnahmen konnte auf Grund der Größe der Versuchstiere der ganze Körper abgebildet werden. Der Messung lag ein Protokoll zugrunde, das auf einer Mehrphasentechnik basierte:

**Tabelle 2.5: Aufnahmeprotokoll der planaren Aufnahmen**

	Anzahl der Bilder	Dauer der Sequenzaufnahmen
1. Minute	120	500 ms
2. bis 60. Minute	59	1 Minuten
61. bis 65. Minute	1	5 Minuten
120. bis 125. Minute	1	5 Minuten
18 Std. nach Aufnahmebeginn	1	10 Minuten

Die Aufnahmen wurden mit einem 1,2-fachen Zoom der Kamera (Hardwarezoom) in einer 128 x 128 Pixel Matrix erstellt. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 2.2 zu sehen.



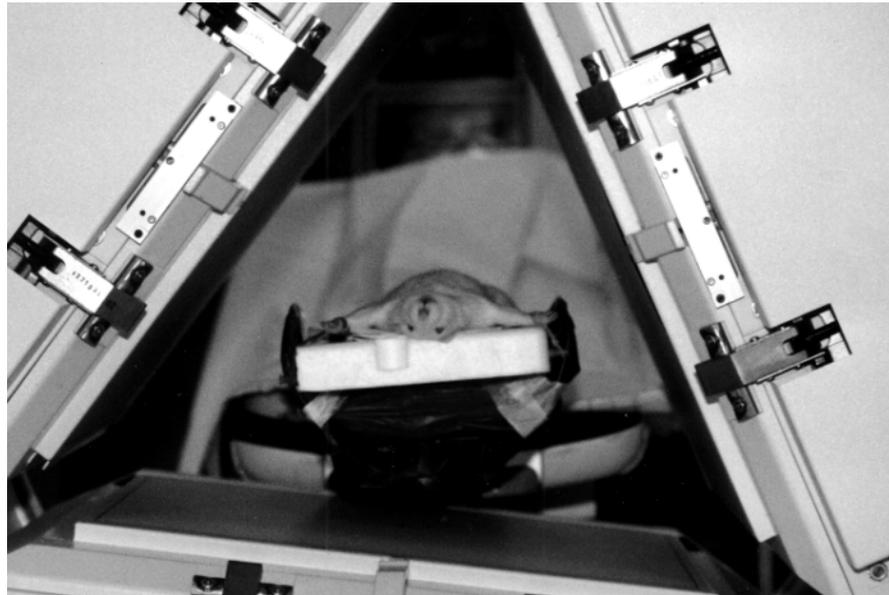
**Abbildung 2.2: Versuchsanordnung bei planaren Aufnahmen**

Während der Szintigraphie erfolgte eine Überwachung der Versuchstiere, um Apnoe-phasen und ein Nachlassen der Narkose frühzeitig zu erkennen. In Fällen von Dyspnoe reichte die Gabe von 1 l O<sub>2</sub> pro Minute über einen über das Gesicht gestülpten Plastikbecher in der Regel aus, um die Ratten zu stabilisieren. Nur in seltenen Ausnahmefällen mussten die Versuchstiere über einen Schlauch beatmet werden. Ließ die Narkose nach, wurde nach der unter 2.2.3.1 beschriebenen Methode verfahren.

Nach erfolgreicher Versuchsdurchführung wurden die Tiere zum Aufwachen in einen ruhigen Raum gebracht.

### **2.2.3.3 SPECT-Aufnahmen**

Zur besseren Darstellung der Eingeweide, besonders der Lungen und des Pankreas, wurden bei acht Wistar Ratten SPECT (single photon emission computer tomography) Aufnahmen angefertigt. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 2.3 zu sehen.



**Abbildung 2.3: Versuchsanordnung in der 3-Kopf-Kamera**

Die Ratten wurden in zwei Gruppen untersucht:

**Tabelle 2.6: Verteilung der Ratten im SPECT Versuch**

GLP-1, Irenat, DP IV-Inhibitor	4 Ratten
GLP-1, Irenat, DP IV-Inhibitor, unmarkiertes GLP-1	4 Ratten

Die SPECT-Aufnahme erfolgte mit folgenden Parametern:

- Detektorabstand vom Rotationszentrum: 15 cm
- Rotationsumfang: 360 °
- 48 Schritte (entspricht Winkelschritten von 7,5 °)
- Dauer des Winkelschrittes: 1 Minute
- Insgesamt 144 Aufnahmen mit drei Köpfen

Der weitere Versuchsablauf entsprach dem in 2.2.3.2 beschriebenen Verfahren.

### 2.2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Szintigraphien erfolgte mit Hilfe des von Siemens mitgelieferten Auswertungsprogramms „Region Ratio“. Dabei wurden folgende Aufnahmen verwertet:

- Einzelbilder 5 Minuten p.i., 10 Minuten p.i., 15 Minuten p.i., 20 Minuten p.i., Dauer jeweils 60 Sekunden
- Summationsbild 40 Minuten p.i., Dauer 3 Minuten (39. – 41. Minute p.i.)
- Einzelbilder 60 Minuten p.i. und 120 Minuten p.i., Dauer jeweils 5 Minuten
- Einzelbild am nächsten Morgen (8 Stunden p.i.), Dauer 10 Minuten

Bei diesem Bild wurde zum Ausgleich des radioaktiven Zerfalls jeweils der genaue zeitliche Abstand zur Injektion in die Berechnung mit einbezogen.

Bei der Auswertung wurde auf die in der Nuklearmedizin etablierte Technik der Region of Interest (ROI) zurückgegriffen. Dabei werden am Auswertungscomputer in einer szintigraphischen Aufnahme eine Region von Bildpunkten (pixel) umfahren. Jeder Punkt enthält als Information die Anzahl (counts) der radioaktiven Quanten, die von der Kamera an dieser Stelle detektiert wurden. Der Computer berechnet nun die Größe der Region in Bildpunkten und summiert dann die counts aller Bildpunkte. Zusätzlich kann der Wert des Bildpunktes mit den meisten counts oder der durchschnittliche Wert der counts einer Region ( $\text{counts} / \text{pixel}$ ) angegeben werden. (siehe Abbildung 2.4). Die Regionen können mit Hilfe der Auswertungssoftware über die Aufnahmen der gesamten Sequenz gelegt werden. Dadurch ist es möglich, Aussagen über zeitliche Abläufe zu treffen. (Schicha, Schober, 2000)

An der ersten Aufnahme des Versuchstiers wurden alle ROI manuell eingezeichnet und auf die folgenden Bilder kopiert. Aufgrund technischer Gegebenheiten musste die Einzeichnung der ROI jeweils nach vier Bildern wiederholt werden.

1 ANTERIOR				2 STATIC			
STUDY 1		FRAME 180		STUDY 2		FRAME 1	
#	SIZE	MAX	SUM	#	SIZE	MAX	SUM
	pixels	cts	cts		pixels	cts	cts
1	129	89	8098	1	29	107	2216
2	40	77	2284	2	201	64	8597

**Abbildung 2.4:** Demonstration der ROI-Technik mit Hilfe der verwendeten Auswertungssoftware: Im linken Bild sind ROI um Nieren (1) und Herz (2), im rechten um Blase (1) und Leber (2) gelegt.

In die o.g. Bilder wurden folgende Regionen (ROI) eingezeichnet:

- Ganzkörper
- Thorax
- Mediastinum / Herz
- Rechter Oberbauch (Leberregion)
- Linker Oberbauch (in diesem Bereich projizieren sich bei planaren Aufnahmen Magen, Pankreas und Milz untrennbar übereinander)
- Nieren
- Unterbauch

Für die weitere Berechnung erfolgte nun eine Standardisierung der Anzahl der counts im Bereich der ROI, gewichtet nach der Zeit, und eine Korrektur gemäß des Zerfallsgesetzes. Zur Auswertung wurde die absolute Anzahl der counts einer ROI in prozentuale Relation zur absoluten Anzahl der counts gesetzt, die nach 5 Minuten im Bereich der gesamten Ratte vorhanden waren (% der injizierten Gesamtaktivität).

Aus den so gewonnenen Daten konnten für alle Versuchsgruppen Zeit-Aktivitätsverläufe für jede Region erstellt werden.

Bei den Versuchen wurde auf Konstanz, bezogen auf das Gewicht der Tiere und die injizierte Aktivität geachtet.

Die SPECT-Datensätze wurden mit Hilfe der gefilterten Rückprojektion rekonstruiert. Dazu wurde ein Butterworth-Filter 7. Ordnung mit einem cut-off von 0,6 verwendet. Aus dem Volumendatensatz wurden coronare Schichten erstellt. Diese Schnittbilder wurden mit dem Programm Region Ratio ausgewertet. Dabei wurde jedes Organ eng eingegrenzt und die Schicht gewählt, in der das Organ mittig getroffen wurde, um eine Miterfassung von umgebendem Gewebe zu vermeiden.

Da bei den SPECT-Aufnahmen die Daten nicht auf die Anzahl der nach Injektion über der Ratte vorhandenen counts bezogen werden konnte, wurde hier mit dem durchschnittlichen Wert der counts einer Region (counts / pixel) gearbeitet.

### 2.2.3.5 Kinetik

Aus den Zeit-Aktivitätskurven konnte eine 2-Phasen-Kinetik mit der Formel 2.1 berechnet werden. Dazu wurde eine gängige Statistiksoftware verwendet. Offensichtlich nicht passende Werte wurden bei der Berechnung der Kinetik nicht berücksichtigt, sie sind aber in den Grafiken mit abgebildet.

$$y = a \cdot e^{-b \cdot x} + c \cdot e^{-d \cdot x} \quad \text{Formel 2.1}$$

Die Halbwertszeit des schnellen Anteils der Kinetik berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b} \quad \text{Formel 2.2}$$

Die Standardabweichung der Halbwertszeit berechnet sich nach dem Gesetz der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung (Papula, 1997):

$$\frac{\Delta T_{1/2}}{T_{1/2}} = \frac{\Delta b}{b} \quad \text{daraus folgt: } \Delta T_{1/2} = \frac{\Delta b \cdot T_{1/2}}{b} \quad \text{Formel 2.3}$$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tracer Herstellung

Die Ergebnisse der Markierungen werden hier anhand der Aufreinigungsergebnisse besprochen. Dabei wurde die Aufreinigung mittels Sephadex-Säule gegen die HPLC referenziert, da die HPLC ein Standardverfahren darstellt (Meyer, 1986) und auf Voruntersuchungen (Gotthardt, 1995) zurückgegriffen werden konnte.

#### 3.1.1 HPLC

##### 3.1.1.1 $^{123}\text{Iod}$

Als Referenz zu den folgenden Untersuchungen wurde eine HPLC mit  $\text{Na } ^{123}\text{I}$  durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Acetonitrilgradient als Linie mit abgebildet und auf der zweiten Ordinate aufgetragen. Die HPLC zeigt einen scharfen Peak um die 10. Minute.

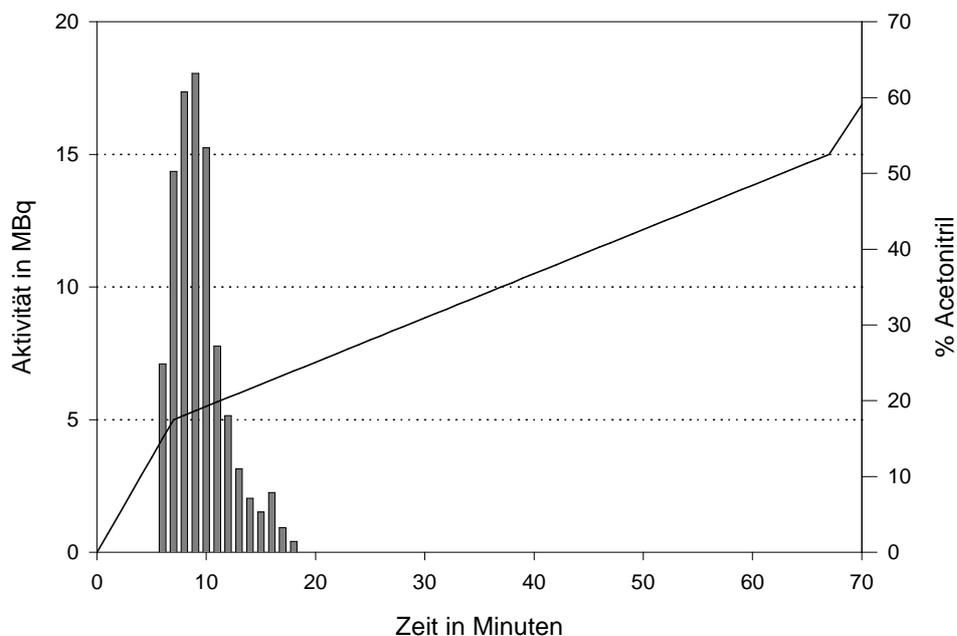


Abbildung 3.1: HPLC von  $^{123}\text{Iod}$

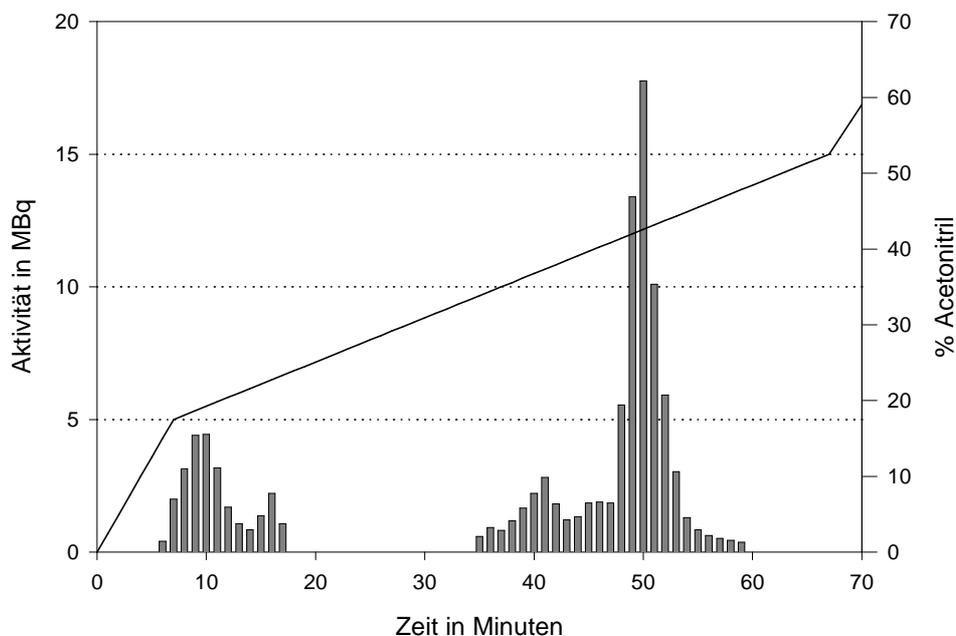
#### 3.1.1.2 GLP-1

Die verwendete Iodogenmethode führt zur Bindung des Iods an die Seitengruppe der Aminosäure Tyrosin (Behr et al., 2002), die in GLP-1(7-36)amid an Position 13 vorhanden ist.

Das so markierte Peptid zeigte bei der Aufreinigung mittels HPLC einen scharfen Peak nach 50 Minuten (entsprechend einer Acetonitrilkonzentration von 43 %). Die Werte von der 35. bis zur 59. Minute zusammengenommen ergeben eine verzerrte M-förmige Konfiguration. Der scharfe Peak nach 10 Minuten entspricht dem ungebundenen Iod (vergleiche Abbildung 3.1). In Abbildung 3.2 ist eine solche Markierung dargestellt.

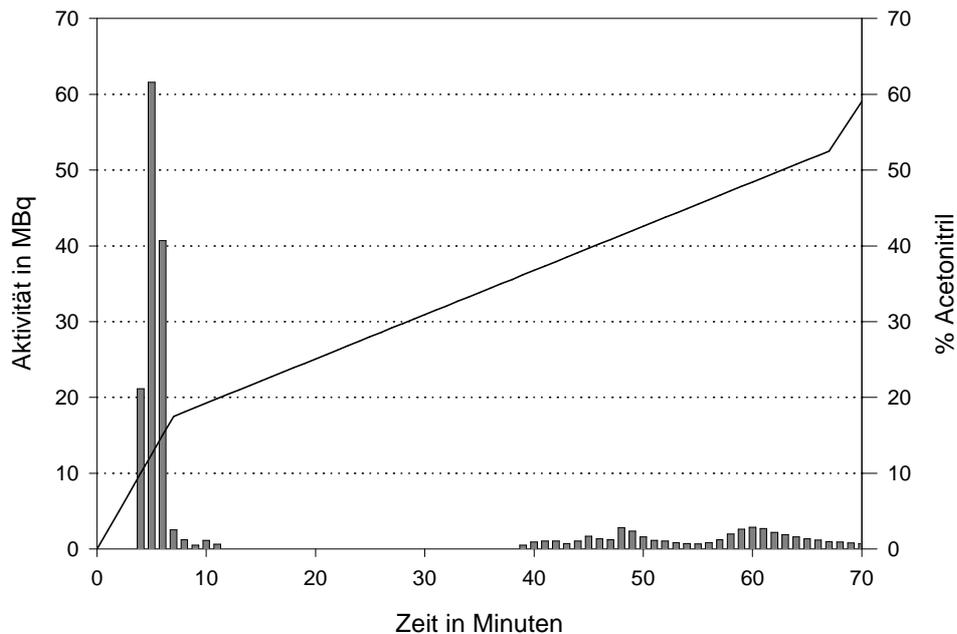
Dabei fällt die gute Markierungsausbeute auf, die sich bei der GLP-1 Markierung regelmäßig zeigte. Die Ausbeute der Markierung (Aktivität des markiertem GLP-1 / auf die Säule aufgebrachte Aktivität) betrug 36 %.

Der auf diese Weise hergestellte Tracer hatte eine spezifische Aktivität von 2,56 MBq / nmol.



**Abbildung 3.2: Aufreinigung von markiertem GLP-1 mittels HPLC**

Zur Qualitätssicherung wurde die Aufreinigung aller Markierungen vollständig protokolliert, um fehlgeschlagene Markierungen bemerken zu können. Diese traten vor allem zu Beginn der Experimente auf. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 3.3.



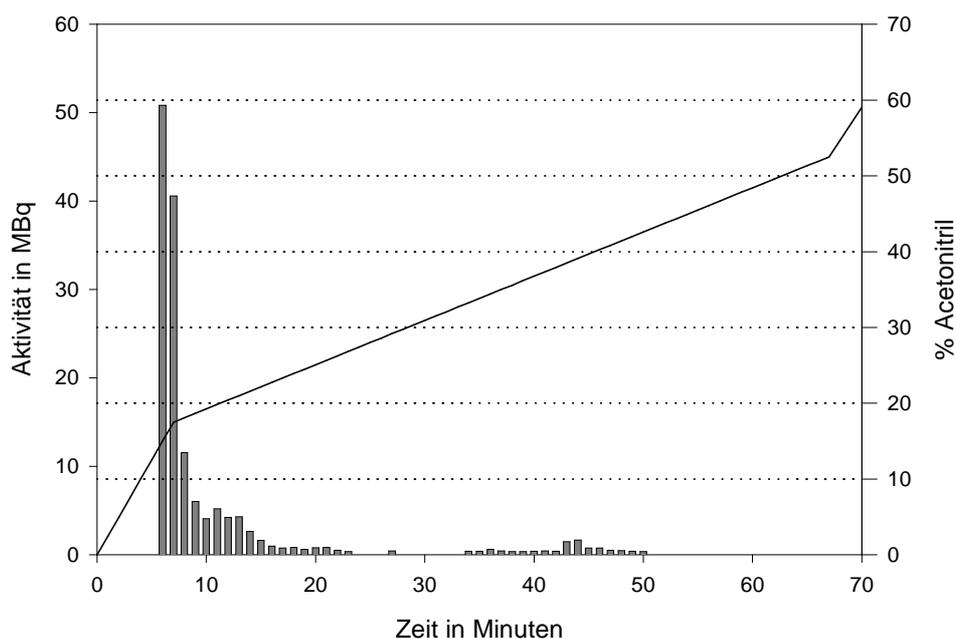
**Abbildung 3.3: Aufreinigung von markiertem GLP-1, fehlender Peptid-Peak**

### 3.1.1.3 Exendin3

In der Struktur des GLP-1 Analogons Exendin3 fehlt die Aminosäure Tyrosin. Allerdings ist Histidin an Position 1 vorhanden.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, ist Exendin3 mit der Iodogenmethode nur sehr schlecht markierbar. Das Bild der Markierung ähnelt in hohem Maße einer fehlgeschlagenen GLP-1 Markierung (vergleiche Abbildung 3.3). Es entsteht nur ein sehr geringer Peak nach 44 Minuten (Acetonitrilkonzentration von 40 %).

Diese Ausbeute war mit 2 % so gering, dass Versuchsreihen damit unterlassen wurden. Der Tracer hatte eine spezifische Aktivität von 0,26 MBq / nmol. Es wurden einzelne Ratten mit diesem Tracer zur Tumordarstellung szintigraphiert.



**Abbildung 3.4:    Aufreinigung von markiertem Exendin3 mittels HPLC**

#### **3.1.1.4 [Y39]-Exendin4**

Das Problem mit der Markierung von Exendin3 führte zur Synthese von Exendin-Analoga, die Tyrosin enthalten (Singh et al., 1994). Bei dem Analogon [Y39]-Exendin4 wurde die letzte Aminosäure Serin durch Tyrosin ersetzt.

In dieser Arbeit wurde dieses Peptid verwendet, das sich relativ gut markieren ließ. Die Ausbeute betrug 9 %, die spezifische Aktivität 0,74 MBq / nmol.

In Abbildung 3.5 fällt der etwas verbreiterte, M-förmige Peak auf, der sein Maximum bei 55 Minuten (Acetonitrilkonzentration 46 %) hat.

Vergleicht man Abbildung 3.5 mit Abbildung 3.2 so fällt auf, dass bei der Markierung mit [Y39]-Exendin4 das Verhältnis von gebundenem zu freiem Iod deutlich geringer ist als bei der Markierung von GLP-1.

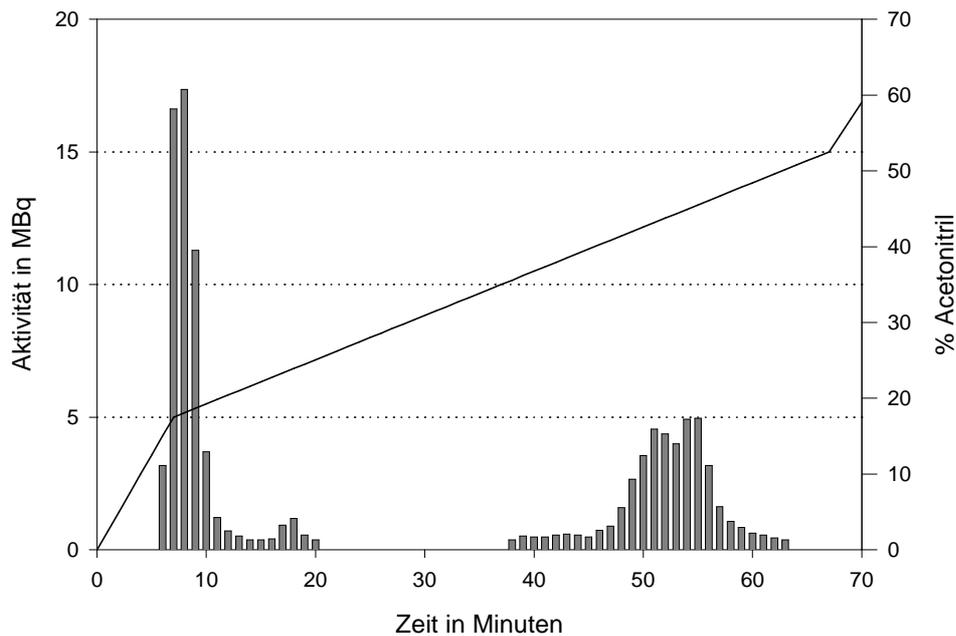


Abbildung 3.5: Aufreinigung von markiertem [Y39]-Exendin4 mittels HPLC

### 3.1.2 Sephadex-Säule

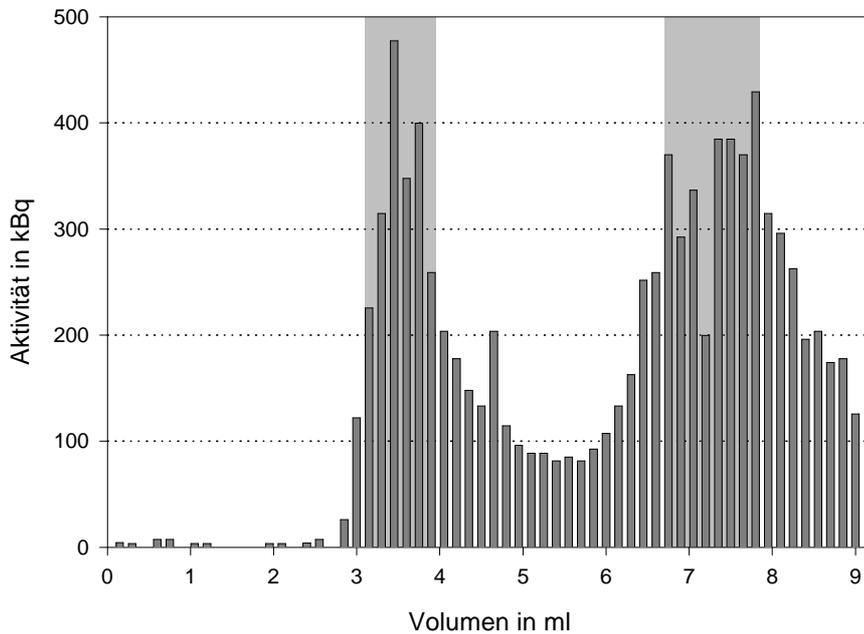
Die Aufreinigung mit der Sephadex PD-10 Säule hat den Vorteil, dass physiologische Kochsalzlösung als Flussmittel verwendet werden kann. Damit muss der gewonnene Tracer vor der Injektion in die Versuchstiere nicht erst eingetrocknet werden. Die Aufreinigung mit der Sephadex PD-10 Säule wurde für GLP-1- und Exendin3-Markierungen getestet.

#### 3.1.2.1 GLP-1

Für die Versuche wurde das Peptid nach der üblichen Methode markiert. Bei der Aufreinigung des markierten GLP-1 wurde jeweils 150  $\mu\text{l}$  0,9%  $\text{NaCl}_{\text{aq}}$  mit einer Pipette auf die Säule gegeben.

In Abbildung 3.6 fällt der zweigipfelig zusammenlaufende Peak dieser Trennmethode auf. Aufgrund der Charakteristik der Säule erscheint der Peak des markierten eptids vor dem des freien Iods.

Die beiden grauen Bereiche in Abbildung 3.6 entsprechen dem Bereich, der nachfolgend mit einer HPLC erneut aufgetrennt wurde.



**Abbildung 3.6: GLP-1 Markierung nach Aufreinigung auf einer Sephadex PD-10 Säule**

In Abbildung 3.7 ist die Fraktion des markierten Peptids aufgetrennt. Hier erkennt man einen Peak, der bei 59 Minuten erscheint (Acetonitrilkonzentration 48 %), einen Peak bei 6 Minuten (am ehesten freies Iod) und einen bei 36 Minuten.

In Abbildung 3.8 erkennt man einen Peak bei ca. 10 Minuten. Hierbei handelt es sich um die Darstellung des freien Iod (vergleiche Abbildung 3.1).

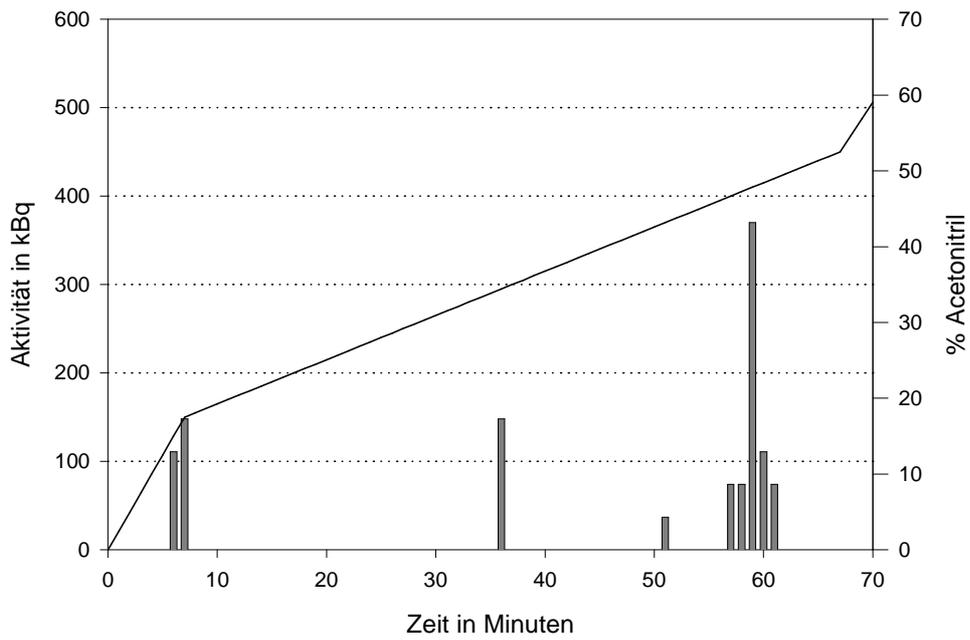


Abbildung 3.7: Auftrennung des ersten Peaks gemäß Abbildung 3.6 mittels HPLC

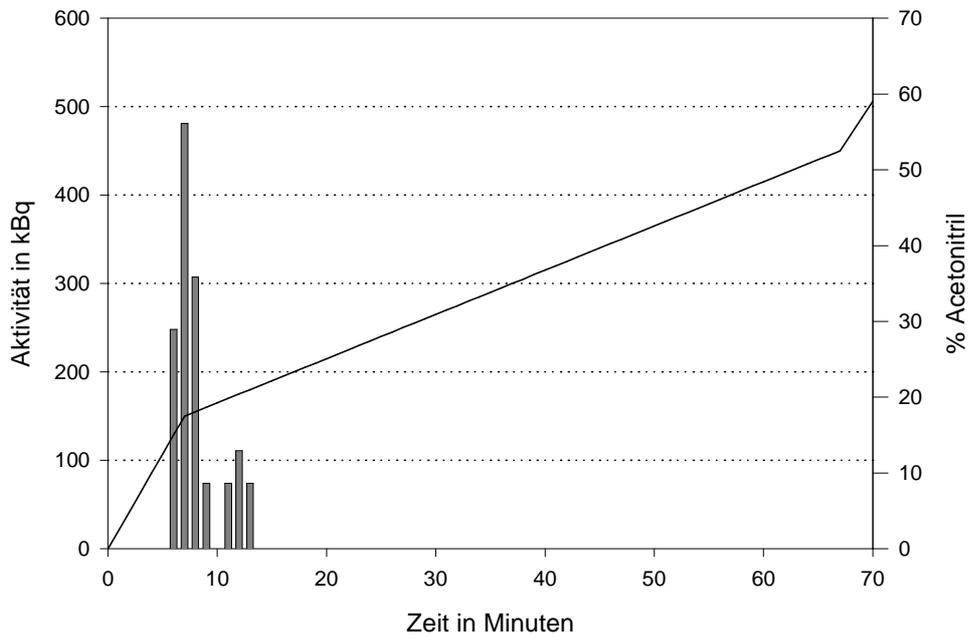
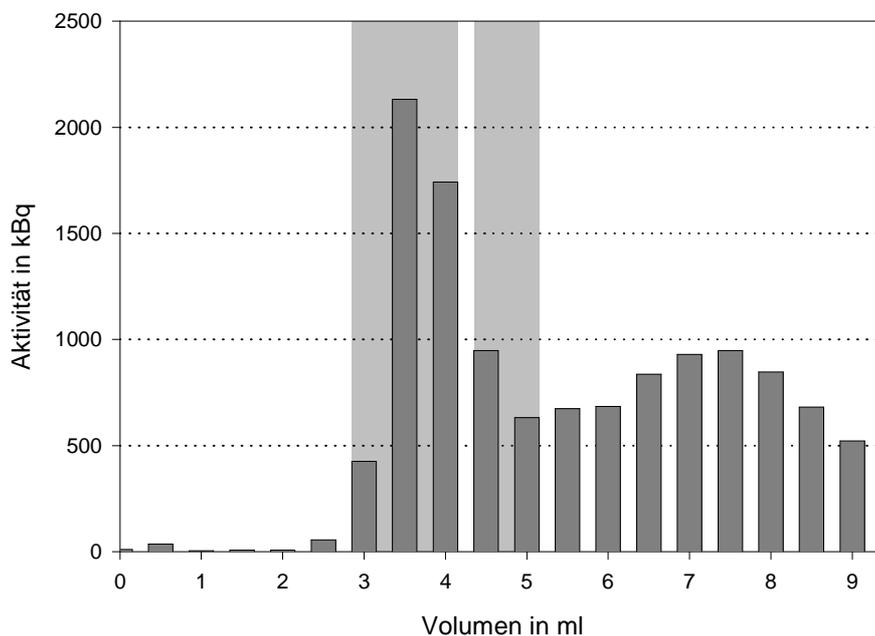


Abbildung 3.8: Auftrennung des zweiten Peaks gemäß Abbildung 3.6 mittels HPLC

#### 3.1.2.2 Exendin3

Bei der Exendin3 Markierung wurde im Prinzip analog zum Versuch mit GLP-1 verfahren. Allerdings wurden hier Fraktionen von 500  $\mu$ l gewählt. Außerdem wurde auf die Bestätigung des Peaks des freien Iods verzichtet und dafür die Fraktion des markierten Peptids genauer untersucht.

Auch hier entsprechen die grauen Bereiche denjenigen Fraktionen, die zur präziseren Analyse mittels HPLC aufgetrennt wurden.



**Abbildung 3.9: Exendin3 Markierung nach Aufreinigung auf einer Sephadex PD-10 Säule**

In Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11 zeigen sich die aus der HPLC-Auftrennung bekannten Peaks (vergleiche Abbildung 3.2). In beiden Fraktionen konnte damit neben dem markiertem Peptid freies Iod nachgewiesen werden.

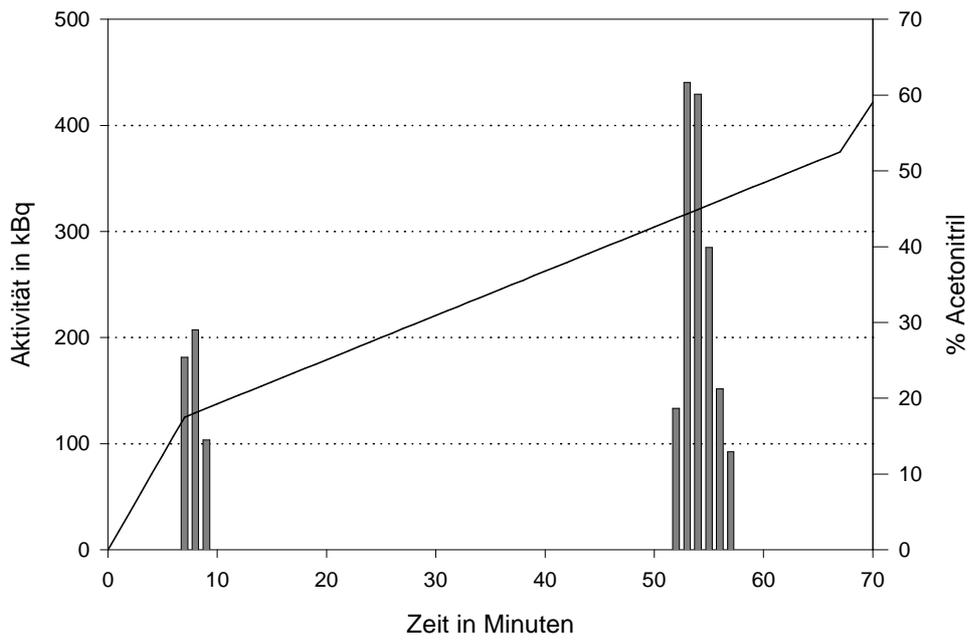


Abbildung 3.10: Auftrennung des ersten Peaks gemäß Abbildung 3.9 mittels HPLC

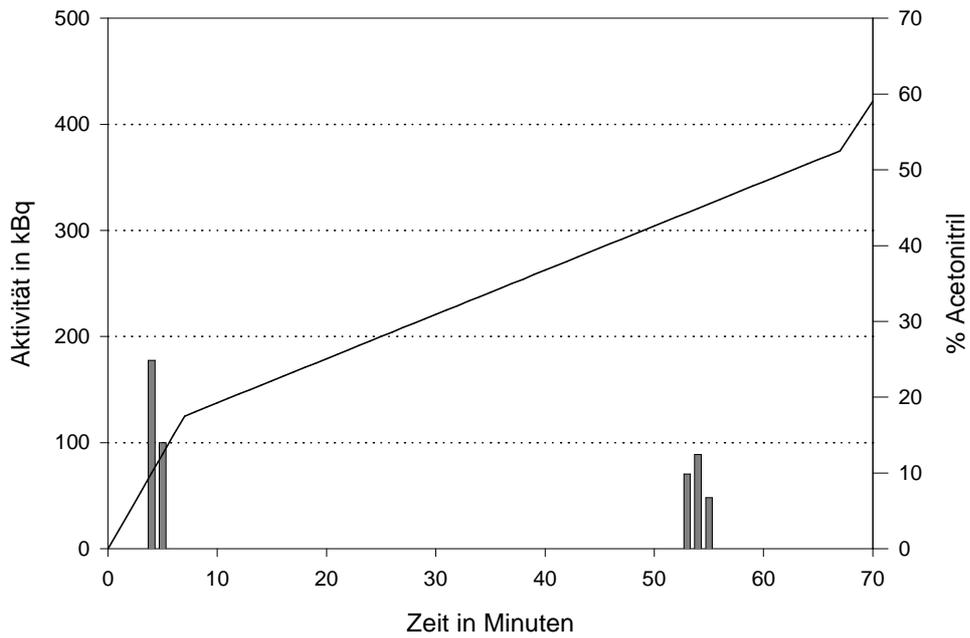


Abbildung 3.11: Auftrennung des zweiten Peaks gemäß Abbildung 3.9 mittels HPLC

## 3.2 Insulinome im Rattenmodell

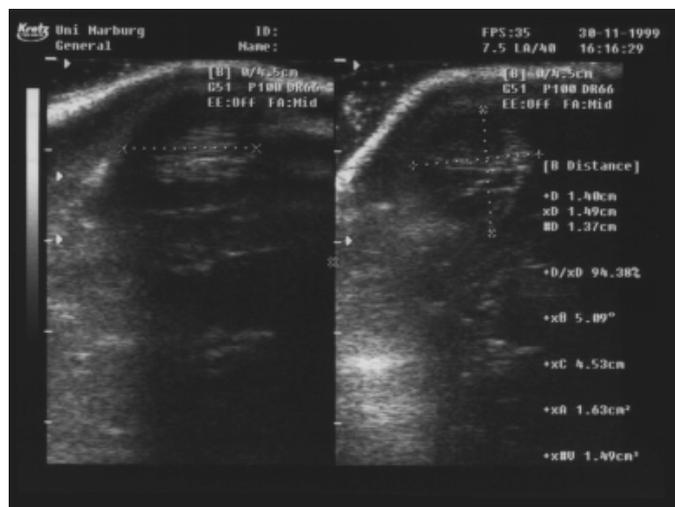
### 3.2.1 Medikamentöse Tumorinduktion

Bei keiner der 32 Ratten konnte ein Insulinom nachgewiesen werden. Statt dessen traten bei allen Zeichen eines Diabetes Mellitus mit Polydipsie (deutlich erhöhter Trinkwasserverbrauch) und Polyurie (stark verschmutzte Streu im Käfig) auf. Der Versuch wurde nach sechs Monaten bei einem mittleren Blutzuckerwert von  $280 \pm 114$  mg / dl abgebrochen. Der Normwert bei Ratten liegt zwischen 98 und 152 mg / dl (Ringler, Dabich, 1979).

### 3.2.2 Tumorzelltransplantation

Bei sechs von acht Ratten waren innerhalb eines Monats deutliche Tumoren am Hinterlauf sichtbar (siehe Abbildung 3.12), der Blutzucker war mit Werten unter 70 mg / dl deutlich erniedrigt, teilweise nicht mehr messbar. Dieses Ergebnis entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten (Hansen, 1995).

Im Laufe des 2. Monats nach Implantation bzw. Transplantation verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Tiere deutlich und sie nahmen an Gewicht ab. Die aus den Tumoren in neue Ratten transplantierten Filialgeschwüre wuchsen ebenfalls innerhalb eines Monats.



**Abbildung 3.12:** Ultraschallbild eines 1,40 x 1,49 cm messenden Insulinoms im Rattenhinterlauf; ein Monat nach Zelltransplantation

### 3.3 Szintigraphien

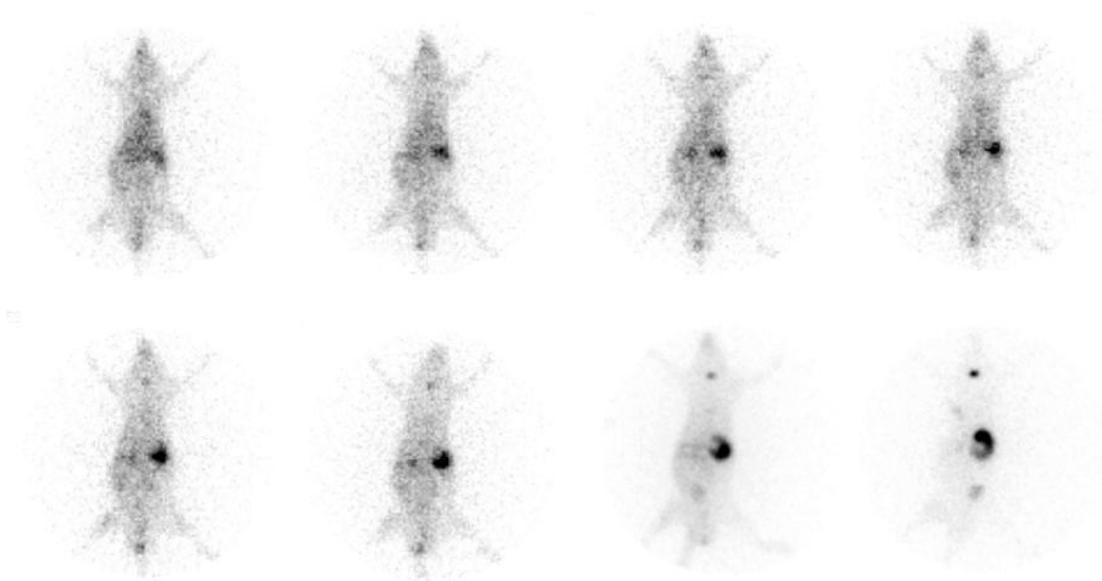
#### 3.3.1 Planare Aufnahmen

##### 3.3.1.1 Verteilung des Tracers im Versuchstier

In diesem Kapitel soll die Verteilung der Tracer in den Ratten mit Hilfe von Szintigraphien dargestellt werden. Dabei wird eine subjektive, rein visuelle Auswertung beschrieben. Dieses Verfahren wurde gewählt, da es in der Nuklearmedizin oft angewandt wird.

Die hier beschriebenen Untersuchungen beziehen sich zunächst auf Einzeltiere, die eine charakteristische Verteilung der verwendeten Radiotracer zeigen. Alle dargestellten Abbildungen erlauben nur eine deskriptive Auswertung. Da die einzelnen Bilder in der Graustufenskala unterschiedlich kalibriert sind, kann die Signalintensität zwischen verschiedenen Bildern nicht in Relation gesetzt werden.

Dieser Vergleich ist anhand von Zeit-Aktivitätskurven möglich und erfolgt in Kapitel 3.3.1.2 mit Hilfe der beschriebenen Region of Interest (ROI). Diese Kurven repräsentieren außerdem das Rattenkollektiv einer Versuchsgruppe und lassen so objektive Vergleiche zu.



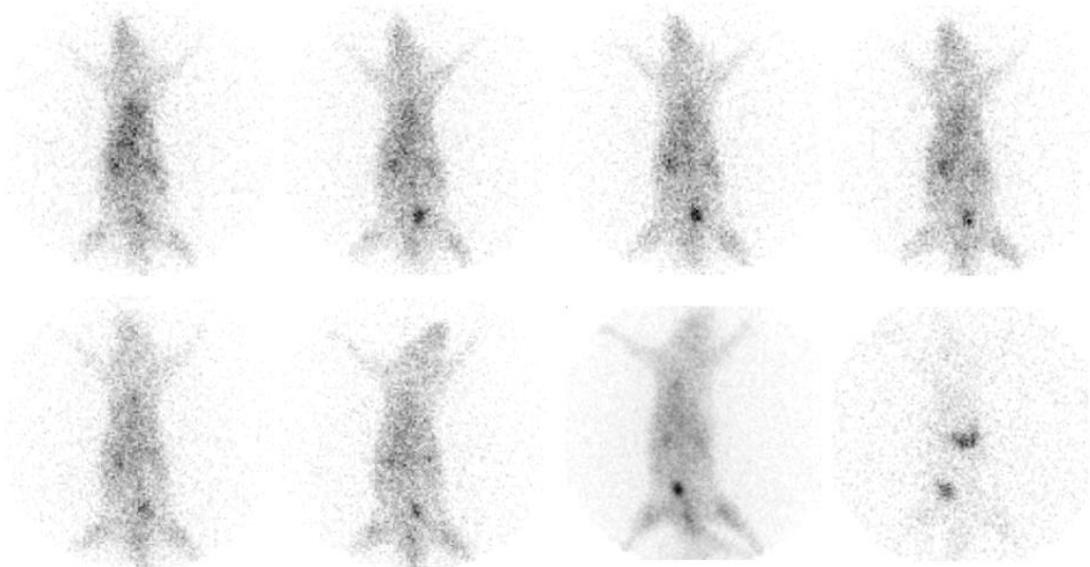
**Abbildung 3.13:** Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{Iod}$ , Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag

In Abbildung 3.13 sieht man die Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{Iod}$ . Zu Beginn zeigt sich eine gleichmäßige Nuklidverteilung im Abdomen und im unteren Thorax der Ratte. Sehr schnell (bereits nach 10 Minuten) stellt sich im linken Oberbauch der Magen durch eine Mehrbelegung dar. Außerdem findet sich eine Aktivitätsanreicherung in den Nieren, wobei die linke Niere vom Magen überlagert wird. Eine Stunde nach Versuchsbeginn sind die Nieren kaum noch signalgebend. Bereits zu Beginn der Untersuchung beginnt die Schilddrüse der Ratte Aktivität anzureichern.

Eine Stunde nach Beginn des Versuchs hat sich die Aktivität weitestgehend auf den Magen und, in zunehmendem Verlauf, auf die Schilddrüse konzentriert.

Die Blase ist diskret nachweisbar.

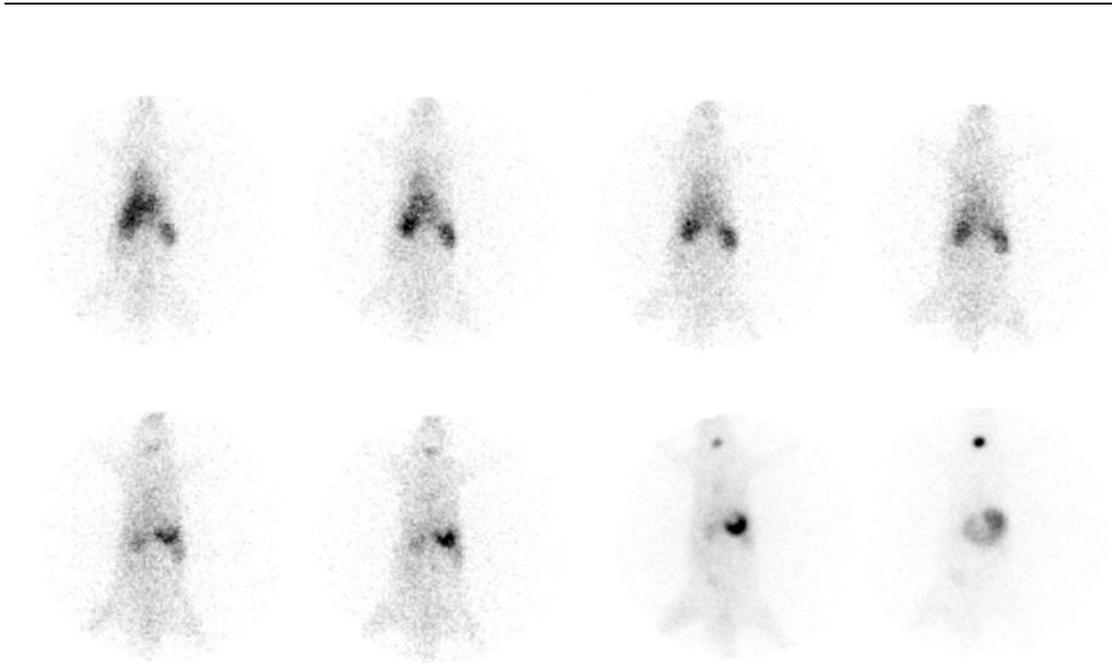
Zusätzlich fällt eine schwache Nuklid-Mehrbelegung im Bereich der Schnauze auf. Diese Anreicherung findet sich in allen Versuchsgruppen und wird deshalb bei den folgenden Auswertungen nicht mehr erwähnt.



**Abbildung 3.14: Szintigraphie einer Ratte mit <sup>123</sup>Iod bei zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag**

Im Vergleich zur reinen <sup>123</sup>Iod Szintigraphie zeigt sich bei der Szintigraphie mit der zusätzlichen Gabe von Irenat in Abbildung 3.14 eine deutlich längere diffuse Verteilung des Nuklids im Körper der Ratte. Die Organe sind weniger gut abgrenzbar.

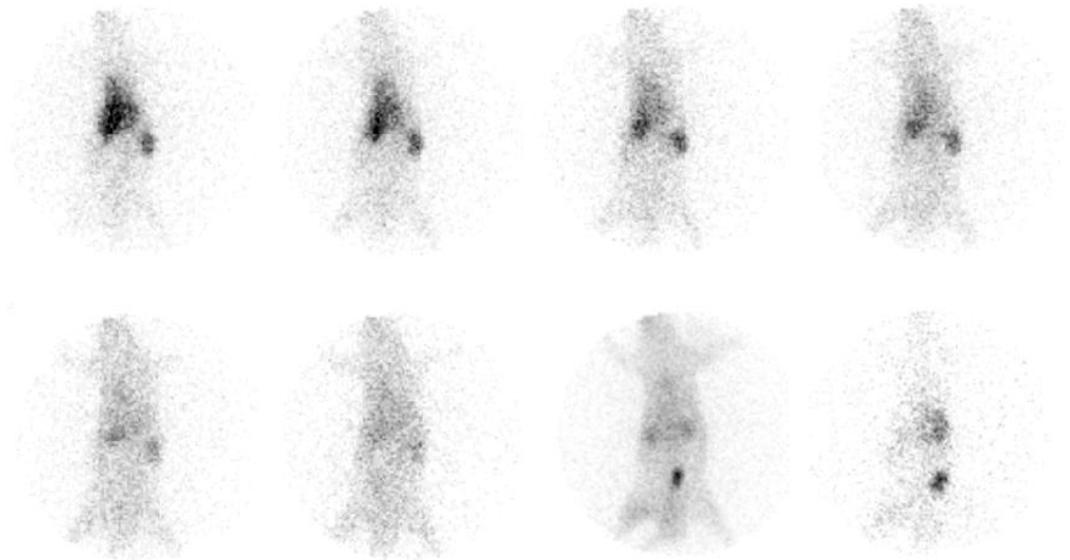
Die Schilddrüse stellt sich nicht dar, der Magen ist auf der Spätaufnahme deutlich erkennbar. Bei dieser Szintigraphie ist die Blase im Vergleich zu den anderen Organen besser abgrenzbar als im vorhergehenden Beispiel.



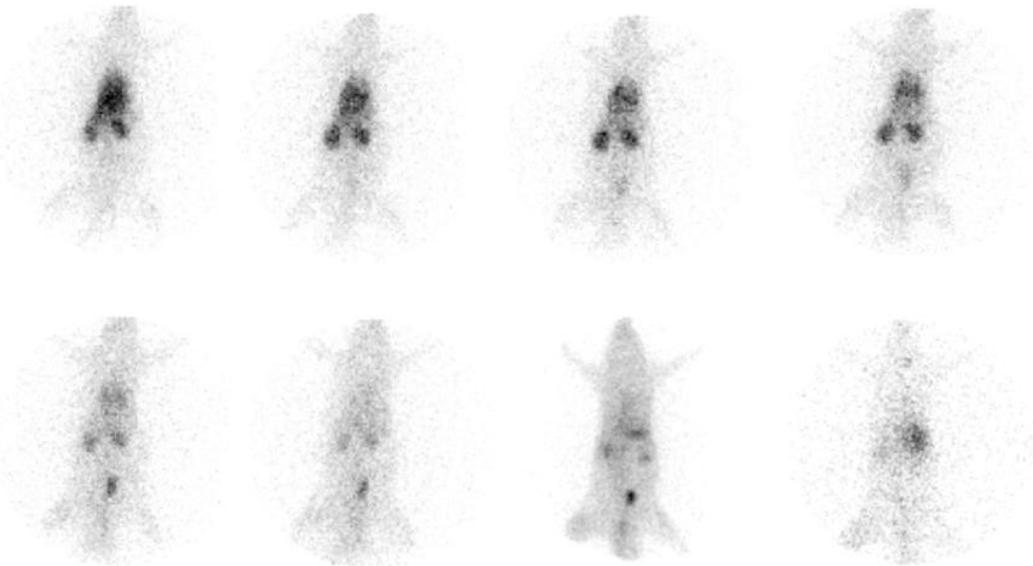
**Abbildung 3.15:** Szintigraphie einer Ratte mit <sup>123</sup>I-GLP-1, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag

In Abbildung 3.15 sieht man die Szintigraphie einer Ratte mit <sup>123</sup>Iod-GLP-1. Bereits nach 5 Minuten stellen sich beide Nieren, die Leber (im rechten Oberbauch), sowie das Herz dar. Die Aktivitätsanreicherung über dem Herzen zeigt einen Abfall bis zur 20. Minute. Ab der 15. Minute kommt es zu einer Mehranreicherung im Bereich des Magens, der im Laufe des Versuchs deutlich erkennbar wird. In der Spätaufnahme hat es den Anschein, dass vom Magen ausgehend auch der Darm teilweise dargestellt wird. Die Schilddrüse ist ab der 40. Minute immer deutlicher sichtbar.

Im Unterschied zur reinen <sup>123</sup>Iod-GLP-1-Szintigraphie ist bei der Szintigraphie in Abbildung 3.16, bei der die Ratte zusätzlich Irenat erhielt, die Schilddrüse nicht und der Magen erst sehr spät sichtbar. Die Blase ist in den späten Aufnahmen gut zu erkennen.



**Abbildung 3.16:** Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag

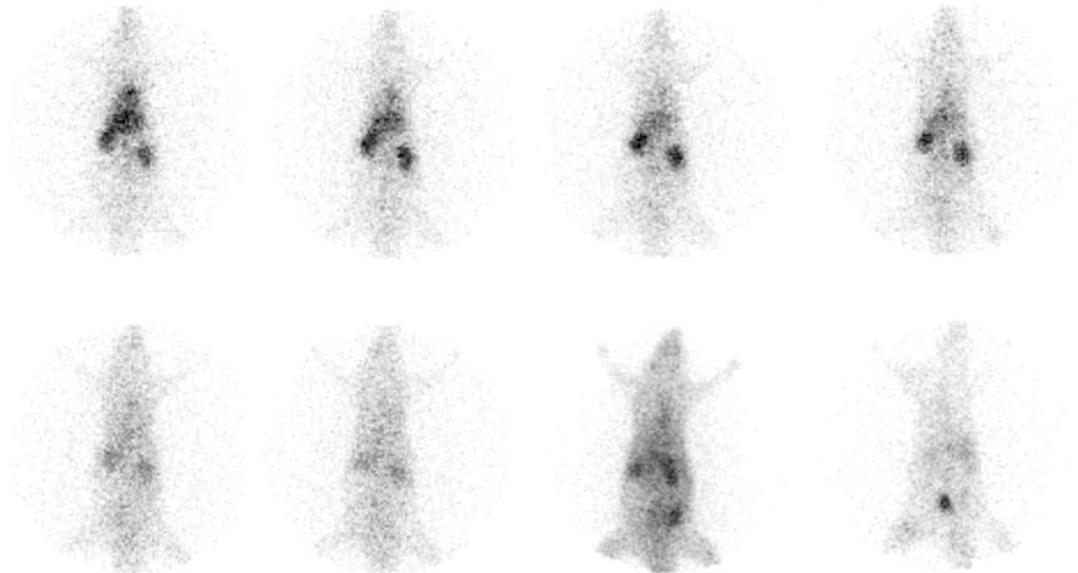


**Abbildung 3.17:** Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag

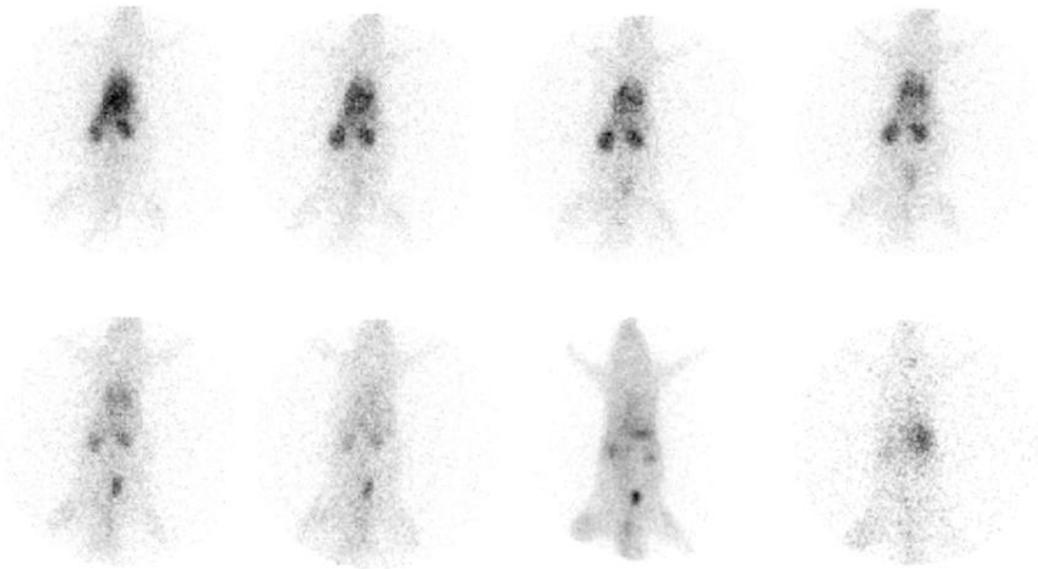
Die Abbildung 3.17 zeigt eine  $^{123}\text{I}$ -Iod-GLP-1-Szintigraphie, bei der die Ratte zusätzlich Irenat und einen DP IV-Inhibitor erhalten hat. Nach 5 Minuten stellt sich die Region des Herzens sehr prominent dar, so dass hier eventuell noch die angrenzen-

den Lungenhilii signalgebend sind. In der 5-Minuten-Aufnahme zeigen sich außerdem eine Nuklid-Mehranreicherung über den Nieren und im Oberbauch (Leber). Im Versuchsverlauf lässt die Aktivität im Oberbauch und über dem Herzen nach, wohingegen das Nierensignal bei 10 Minuten ein Maximum hat. Im weiteren Versuchsverlauf stellt sich die Blase dar, der Magen ist auf der Spätaufnahme zu erkennen.

Bei der in Abbildung 3.18 dargestellten Szintigraphie erhielt die Ratte  $^{123}\text{I}$ -GLP-1. Zusätzlich zum Tracer wurde unmarkiertes GLP-1, Irenat und ein DP IV-Inhibitor appliziert. Im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen stellen sich die einzelnen Organe kontrastärmer und schwächer dar. Dies fällt in der Herzregion besonders ausgeprägt aus. Die Nieren zeigen ein Maximum bei 15 Minuten. In der Spätaufnahme ist der Magen nur schwach, die Blase deutlich zu erkennen.



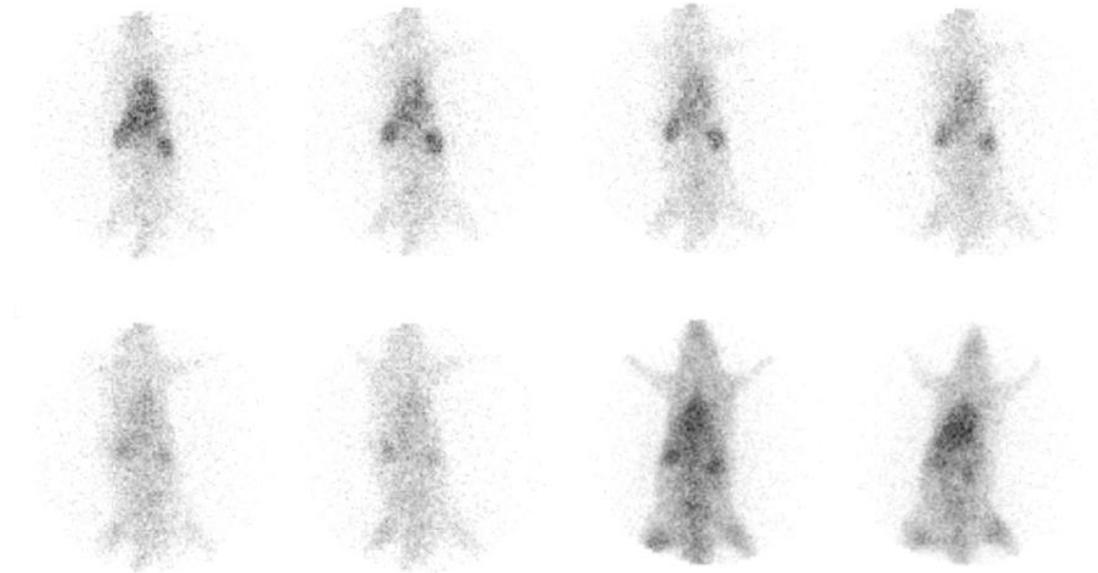
**Abbildung 3.18:** Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor und unmarkiertem Peptid, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag



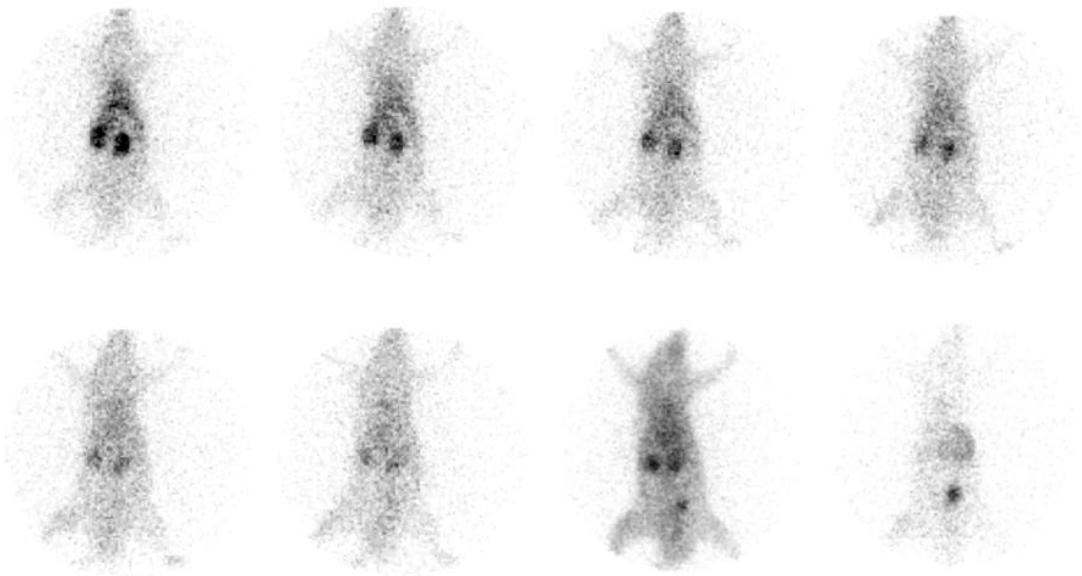
**Abbildung 3.19: Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag**

In Abbildung 3.19 wird die  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 Szintigraphie einer Ratte gezeigt. In der 5-Minuten-Aufnahme stellt sich eine relativ homogene Aktivitätsverteilung über dem Herz, der Leber und den Nieren dar. Die Aktivität im Bereich der Leber lässt sich schneller nach als in den anderen beiden Regionen. Eine Stunde nach Injektion beginnt in Projektion auf die linke Niere der Magen erkennbar zu werden. In der Spätaufnahme fallen Magen und Schilddrüse auf. Die Blase ist mit wechselnder Intensität dargestellt und in der Spätaufnahme deutlich sichtbar.

Die in Abbildung 3.20 gezeigte  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4-Szintigraphie, bei der die Ratte zusätzlich Irenat erhielt, ergibt einen ähnlichen Befund wie die vorhergehende Untersuchung. Im Gegensatz zu Abbildung 3.19 stellen sich Magen und Schilddrüse in keiner Aufnahme dar, auch die Blase erscheint schwächer. In der Spätaufnahme zeigt sich eine Nuklid-Mehranreicherung im Bereich der Leber.



**Abbildung 3.20:** Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 bei zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag

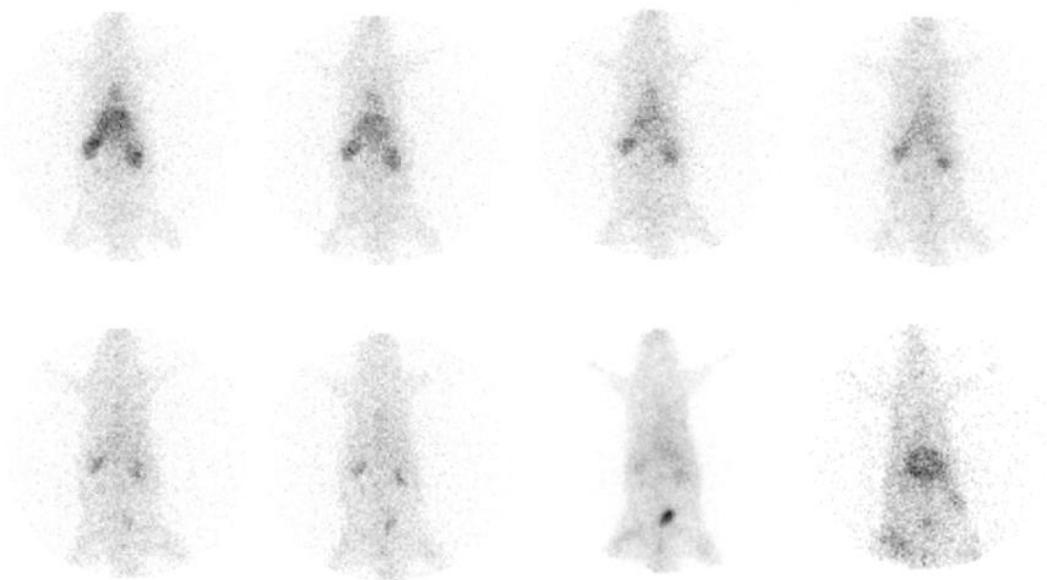


**Abbildung 3.21:** Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag

Bei der in Abbildung 3.21 gezeigten  $^{123}\text{I}$ -Iod-[Y39]-Exendin4 Szintigraphie mit Irenat und DP IV-Inhibitor sind zu Beginn der Aufnahme hauptsächlich die Nieren bildge-

bend. Herz und Leber reichern nur schwach an. Die Blase ist ab 60 Minuten nach Injektion erkennbar. In der Spätaufnahme stellt sich der Magen dar.

In Abbildung 3.22 sieht man die Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4, die zusätzlich Irenat und einem DP IV-Inhibitor erhalten hat. Zu Beginn reichern hauptsächlich die Nieren und die Leber, sowie das Herz etwas schwächer an. 40 Minuten nach Injektion sind nur noch die Nieren deutlich abgrenzbar, die Blase wird erkennbar. Eine Stunde nach Versuchsbeginn ist die Blase das Organ mit der meisten Aktivität. In der Spätaufnahme stellt sich der Magen, sowie der Darm als fleckförmige Aktivitätsverteilung im Unterbauch dar.



**Abbildung 3.22: Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und unmarkiertem Peptid, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag**

### 3.3.1.2 Aktivitätsverteilung in den einzelnen Organen

In diesem Abschnitt sollen die Verläufe der Zeit-Aktivitätskurven über verschiedenen Regionen erläutert werden. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Abbildungen, die im Anschluss an diese Abhandlung dargestellt sind. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass eine Zerfallskorrektur durchgeführt worden ist. Damit geben die Kurven nicht die effektive, sondern die biologische Halbwertszeit der Stoffe über den einzelnen Regionen wieder.

Wird die ROI über die gesamte Ratte gelegt, verlaufen die Zeitaktivitätskurven in allen Gruppen mehr oder minder uniform. Innerhalb der ersten Stunde ist kein nennenswerter Abfall zu verzeichnen. Der 2 Stunden Wert liegt bei einigen Versuchsgruppen (vor allem GLP-1 und [Y39]-Exendin4 Gruppen) um 20 % unterhalb der injizierten Aktivität. Die Gruppe, die kein Irenat appliziert bekommen hat, weist bei allen drei Tracern den höchsten Wert auf. Dies wird auf der Aufnahme am nächsten Tag am deutlichsten. Hier liegt die Restaktivität der Versuchsgruppen ohne Irenat über 54 %, wohingegen die Gruppen mit Irenat unter 41 % liegen.

In der ROI über dem Thorax (ohne Herz und Mediastinum) zeigt sich bei den Versuchsgruppen mit  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  ein uneinheitlicher Kurvenverlauf innerhalb der ersten 40 Minuten, danach kommt es zu einem langsamen, gleichförmigen Abfall der Aktivität. Die Gruppen mit  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  zeigen innerhalb der ersten Stunde praktisch unveränderte Aktivitätswerte, die danach gleichförmig langsam abfallen. Ähnlich verhalten sich die Gruppen mit  $^{123}\text{Iod}$ , die innerhalb der ersten Stunde nur geringe Veränderungen zeigen.

In der ROI über dem Herz / Mediastinum zeigt sich in allen Gruppen eine abnehmende Kinetik vom 2-Phasen-Typ. Dies ist bei den  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  Gruppen am ausgeprägtesten, bei den  $^{123}\text{Iod}$  und  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  ohne DP IV-Inhibitor Gruppen am diskretesten. Dabei zeigt die Gruppe, die  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  mit Irenat und einen DP IV-Inhibitor erhalten hat, die größten Standardabweichungen über dieser Region.

In der ROI über dem rechten Oberbauch zeigen sich Aktivitätsverläufe, die dem Abfall einer 2-Phasen-Kinetik entsprechen. Die einzelnen Gruppen eines Tracers unterscheiden sich praktisch nicht. In den Gruppen, die  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  erhalten haben, stellt sich der Abfall zu Beginn der Kinetik am steilsten dar. Die Gruppen, bei denen  $^{123}\text{Iod}$  der Tracer war, zeigen den langsamsten Abfall.

In der ROI über dem linken Oberbauch zeigen alle Versuchsgruppen innerhalb der ersten 20 Minuten einen leichten Aktivitätsabfall. Ausgenommen davon ist die Gruppe, die nur  $^{123}\text{Iod}$  erhalten hat: Hier klettert die Aktivitätskurve bis zur Aufnahme 2 Stunden nach Injektion kontinuierlich an. Den gleichen Effekt zeigen die anderen beiden Gruppen ohne Irenat ab dem 20 Minuten Wert. Bei dem Wert am nächsten Tag liegen die Gruppen ohne Irenat mit 12 % Restaktivität über dieser Region deutlich höher als die mit Irenat (Restaktivität kleiner 5 %). In den Gruppen mit Irenat verändert sich die Aktivität von 20 Minuten bis 60 Minuten nach der Injektion praktisch nicht und nimmt danach leicht ab.

In der ROI über den Nieren zeigt sich in den Gruppen mit  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  als Tracer eine Anflutungs-Kurve mit einem Maximum zwischen 10 und 15 Minuten nach Versuchsbeginn. Darauf folgt ein kontinuierlicher Abfall, der wiederum einer 2-Phasen-Kinetik folgt. Bei den Gruppen, die  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  injiziert bekommen haben, konnte keine Anflutung festgestellt werden. Hier nimmt die Aktivität von Anfang an ab und zeigt den typischen exponentiellen Verlauf. Die Gruppe mit  $^{123}\text{Iod}$  zeigt einen treppenartigen Verlauf mit einer Stufe zwischen 20 und 40 Minuten nach Injektion und zum Spätwert hin. Auffällig in allen Gruppen ist die hohe Standardabweichung des 40-Minuten-Wertes.

In der ROI über dem Unterbauch zeigen sich bei  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  und bei  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  praktisch identische Verläufe mit einem Aktivitätsmaximum zwischen 40 und 60 Minuten, gefolgt von einem leichten Abfall. Die Kurven in den  $^{123}\text{Iod}$  Gruppen verlaufen bis 60 Minuten nach Injektion praktisch linear auf unverändertem Niveau und fallen danach leicht ab.

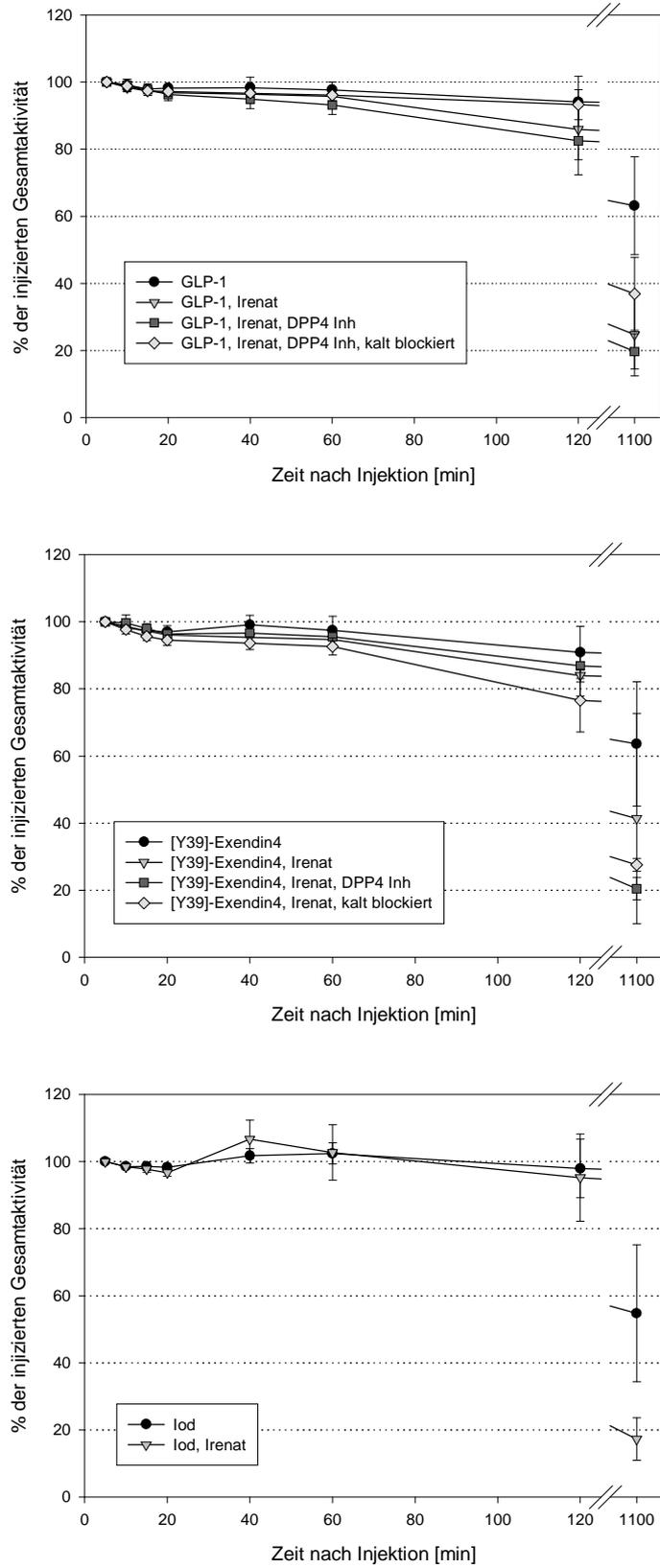


Abbildung 3.23: Aktivitätsverteilung über der gesamten Ratte

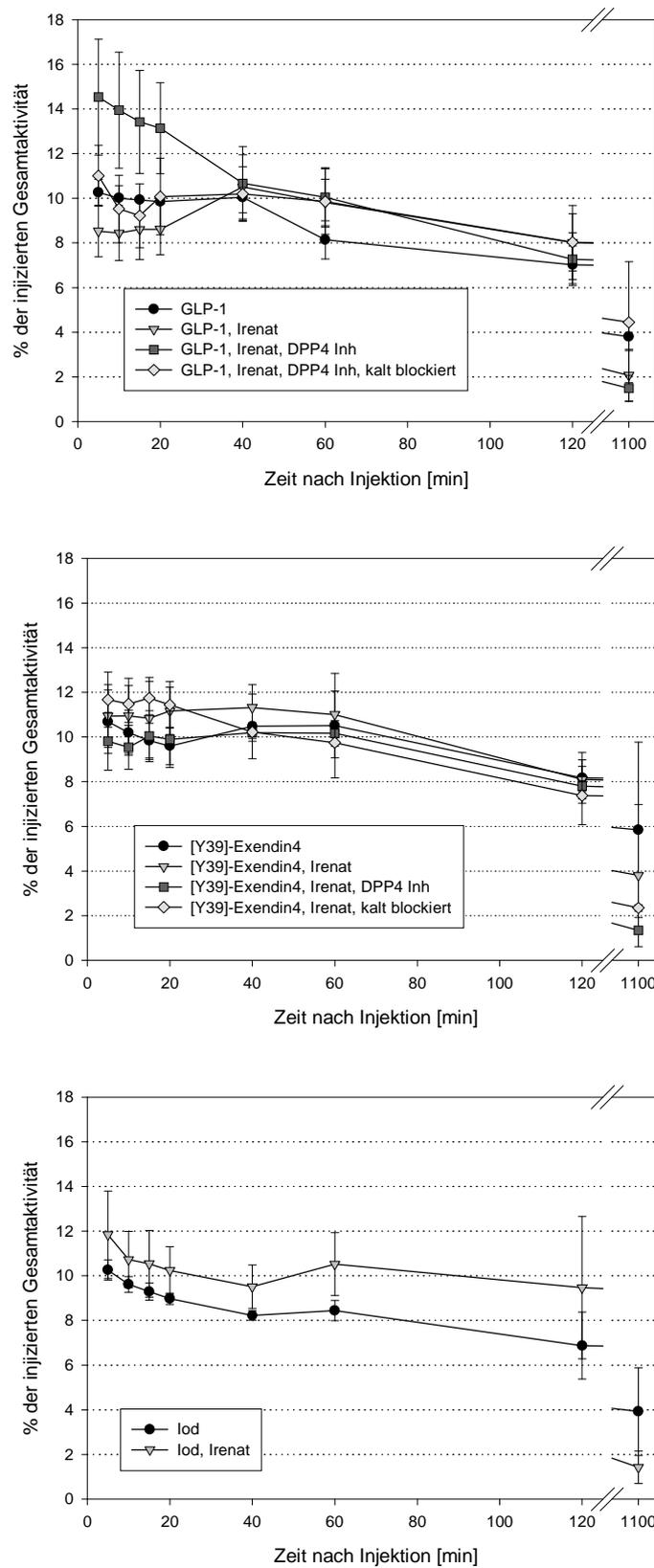


Abbildung 3.24: Aktivitätsverteilung über dem Bereich des Thorax (ohne Herz / Mediastinum)

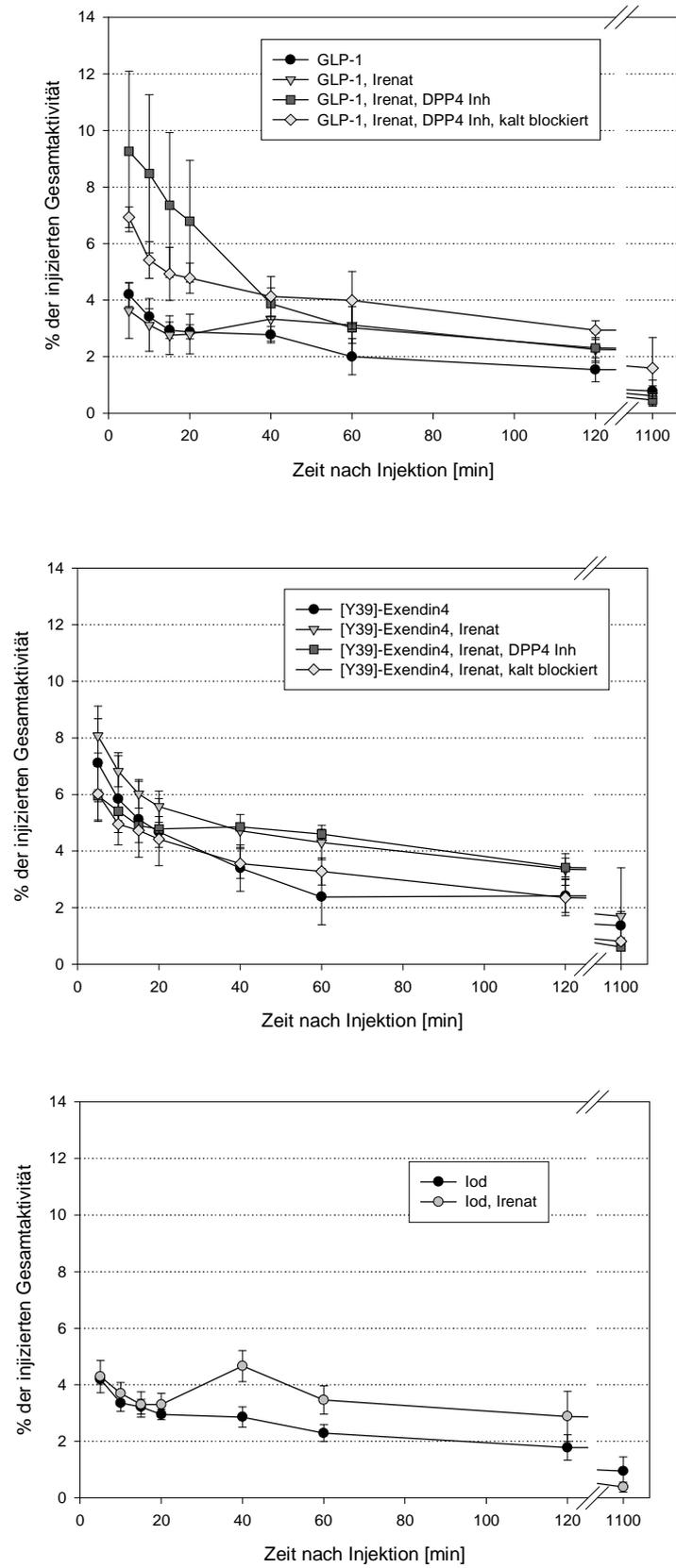


Abbildung 3.25: Aktivitätsverteilung über dem Bereich des Herzens und des mittleren bis unteren Mediastinums

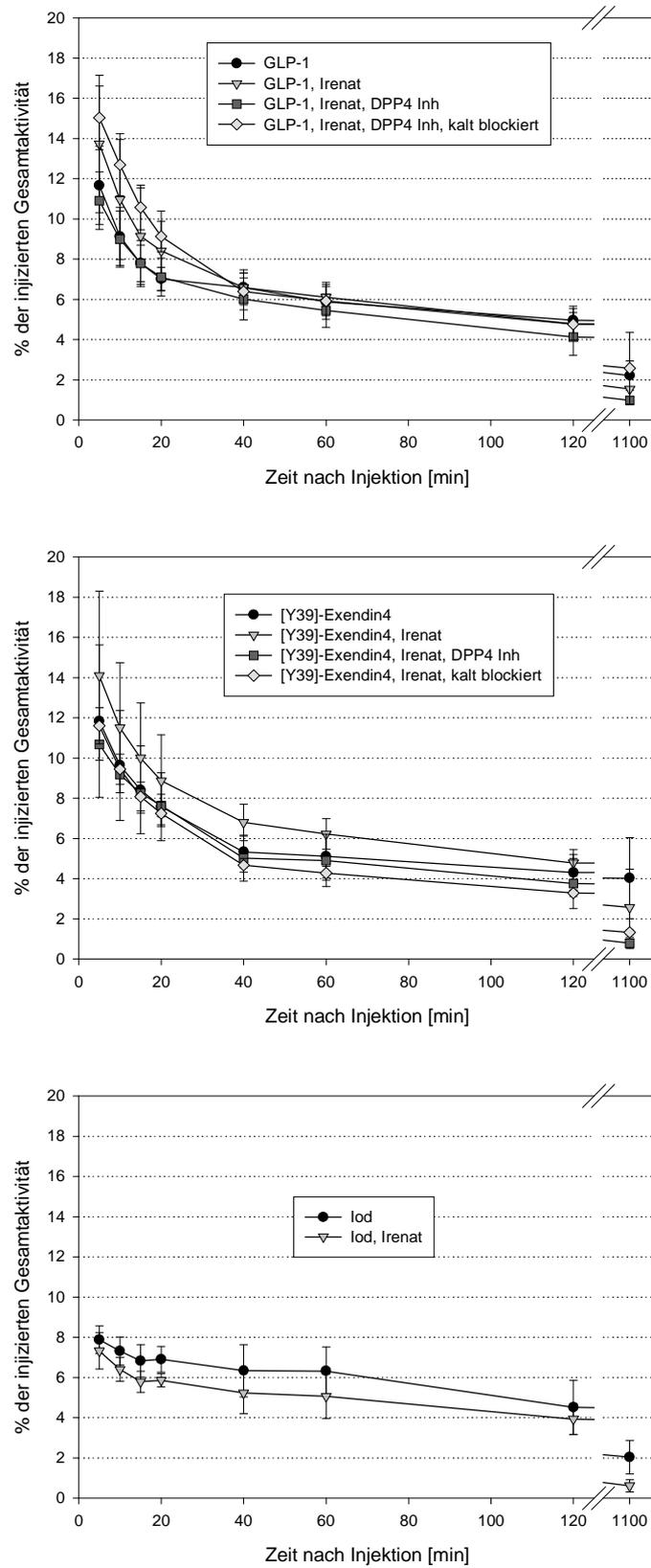


Abbildung 3.26: Aktivitätsverteilung über dem Bereich des rechten Oberbauchs

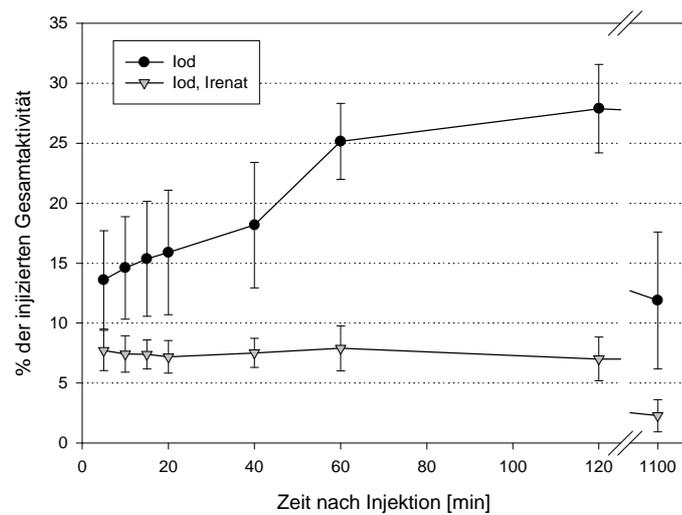
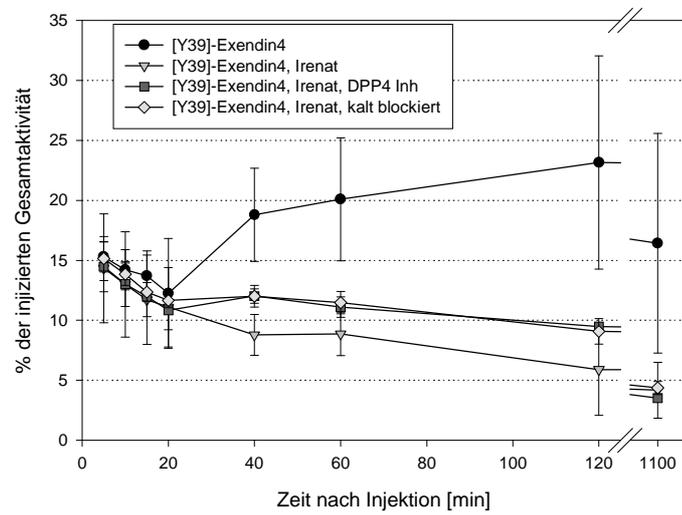
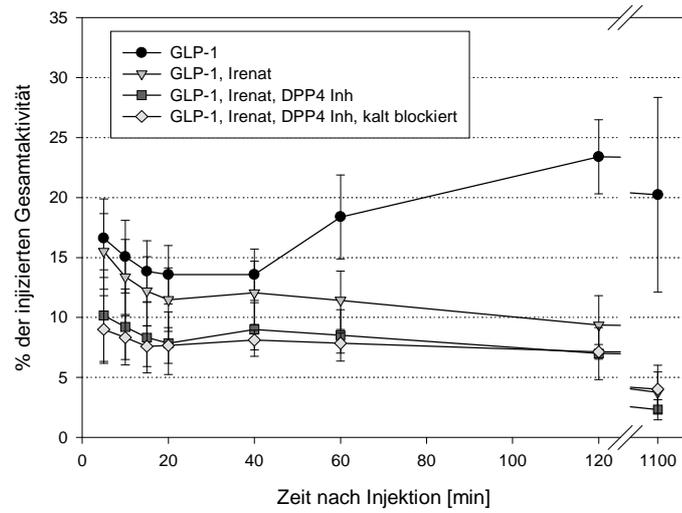


Abbildung 3.27: Aktivitätsverteilung über dem Bereich des linken Oberbauchs

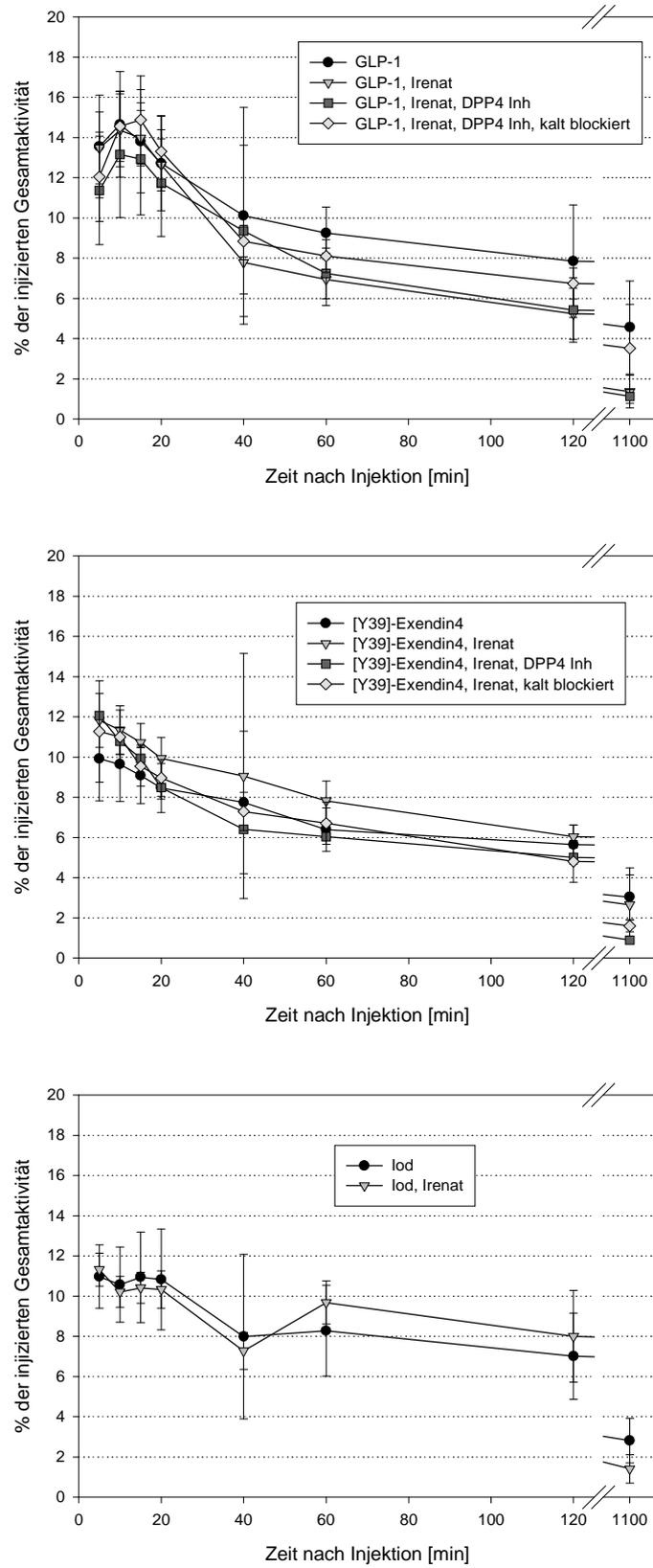


Abbildung 3.28: Aktivitätsverteilung über dem Bereich beider Nieren

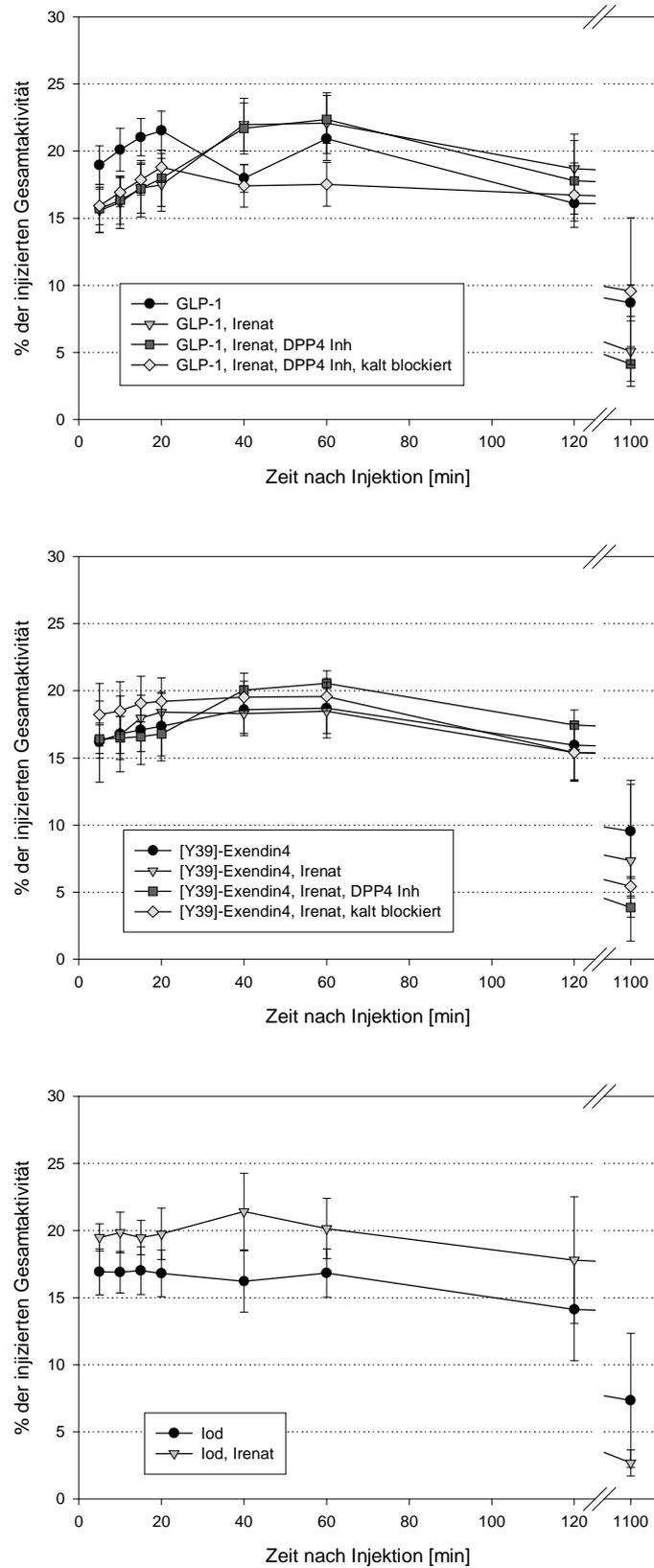


Abbildung 3.29: Aktivitätsverteilung über dem Bereich des Unterbauchs (ohne Blase)

### 3.3.1.3 Kinetik

Wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben, wurden die Halbwertszeiten des schnellen Anteils der 2-Phasen-Kinetik berechnet. Die Werte sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben und liegen zwischen 1,99 und 6,17 Minuten. Die Standardabweichungen bewegen sich zwischen 0,11 und 3,27 Minuten. Eine Ausnahme bildet die Halbwertszeit der <sup>123</sup>Iod-GLP-1-Szintigraphie mit Irenat und einem DP IV-Inhibitor. Deren Halbwertszeit liegt bei 19,75 Minuten mit einer Standardabweichung von 8,95 Minuten.

Der Korrelationskoeffizient (R) liegt bei allen Regressionen über 0,95 (Heinecke et al., 1992).

Die dazugehörenden Abbildungen finden sich auf der folgenden Seite.

**Tabelle 3.1: Halbwertszeiten des schnellen Anteils der 2-Phasen-Kinetik über der Region Herz / Mediastinum**

	Halbwertszeit [Minuten]	Standard- abweichung [Minuten]	Korrelations- koeffizient (R)
Iod	1,99	1,36	0,9922
Iod + Irenat	2,41	0,73	0,9523
GLP-1	2,61	2,12	0,9858
GLP-1 + Irenat	3,56	2,32	0,9938
GLP-1 + Irenat, DP IV-Inhibitor	19,75	8,95	0,9961
[Y39]-Exendin4	5,43	0,11	0,9999
[Y39]-Exendin4 + Irenat	6,17	0,13	0,9999
[Y39]-Exendin4 + Irenat, DP IV-Inhibitor	2,34	3,27	0,9709

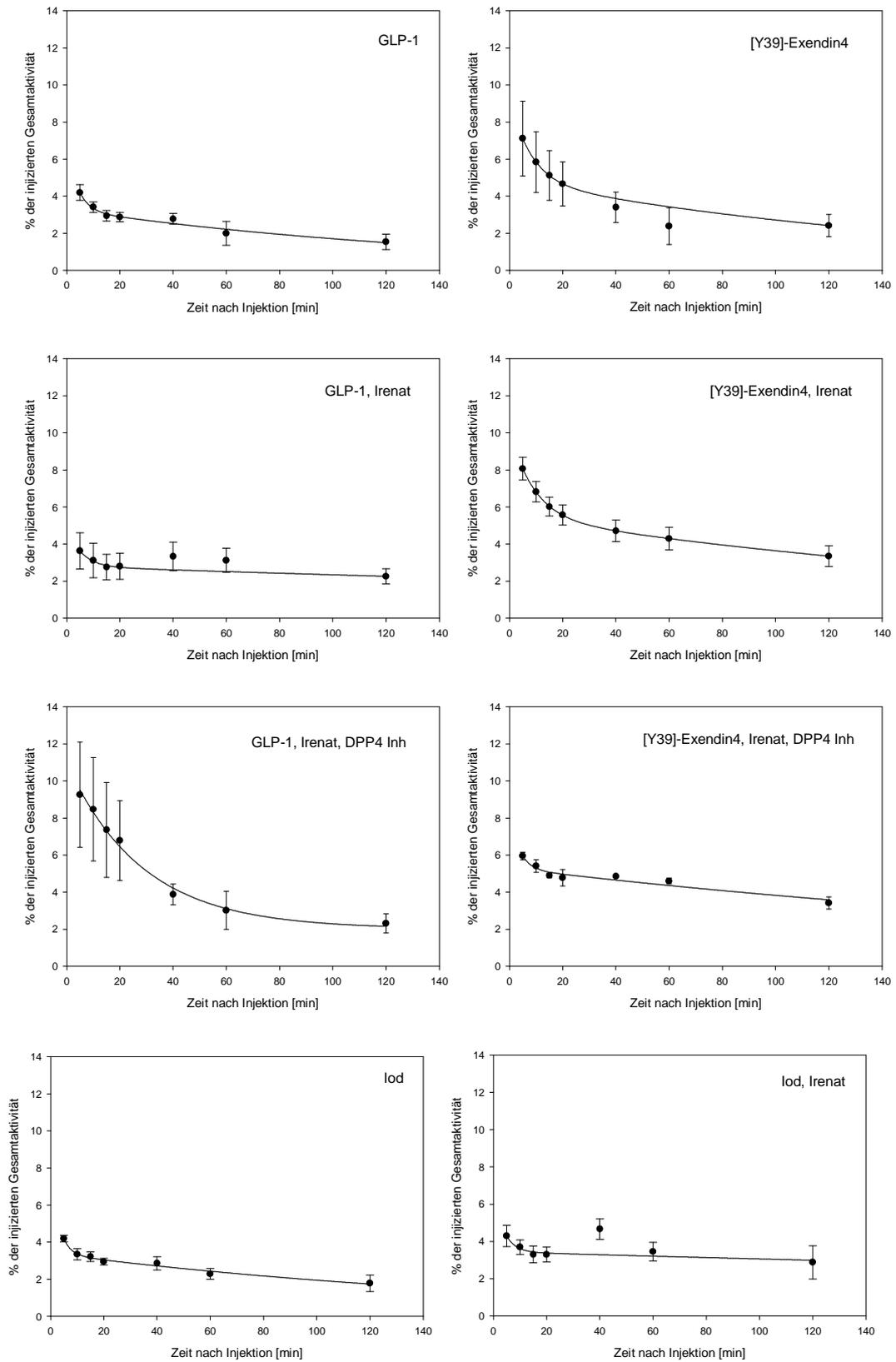


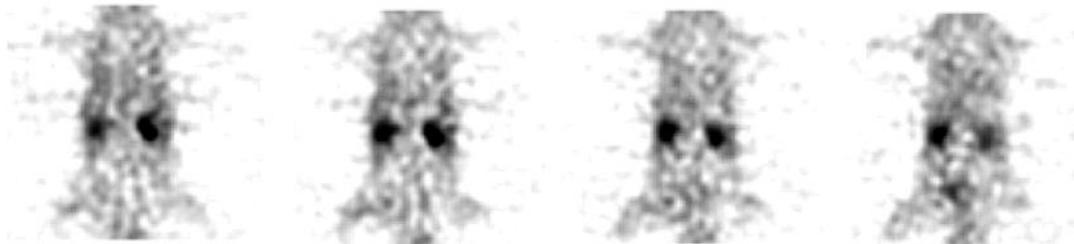
Abbildung 3.30: Regressionsgerade einer 2-Phasen-Kinetik über der Region Herz / Mediastinum mit den tatsächlichen Messpunkten

### 3.3.2 SPECT-Aufnahmen

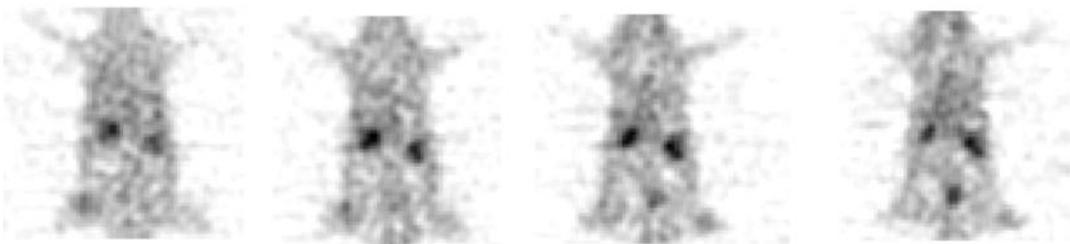
Zur Untersuchung der Eingeweide, besonders von Pankreas und Lungen, wurden SPECT-Aufnahmen angefertigt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 3.31 und Abbildung 3.32 dargestellt.

Die SPECT-Aufnahmen weisen keine ausreichende Ortsauflösung auf, um das Pankreas einer Ratte sicher unterscheiden zu können. In der Lunge ist die akkumulierte Aktivität zu gering, um sichere Aussagen zu machen.

Einzig die Nieren sind aufgrund Ihrer Aktivitätsanreicherung deutlich abgrenzbar. Eine weitere Auswertung der Daten erfolgte nicht.



**Abbildung 3.31:** SPECT-Aufnahmen einer Ratte in coronarer Schnittführung nach Injektion von  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor



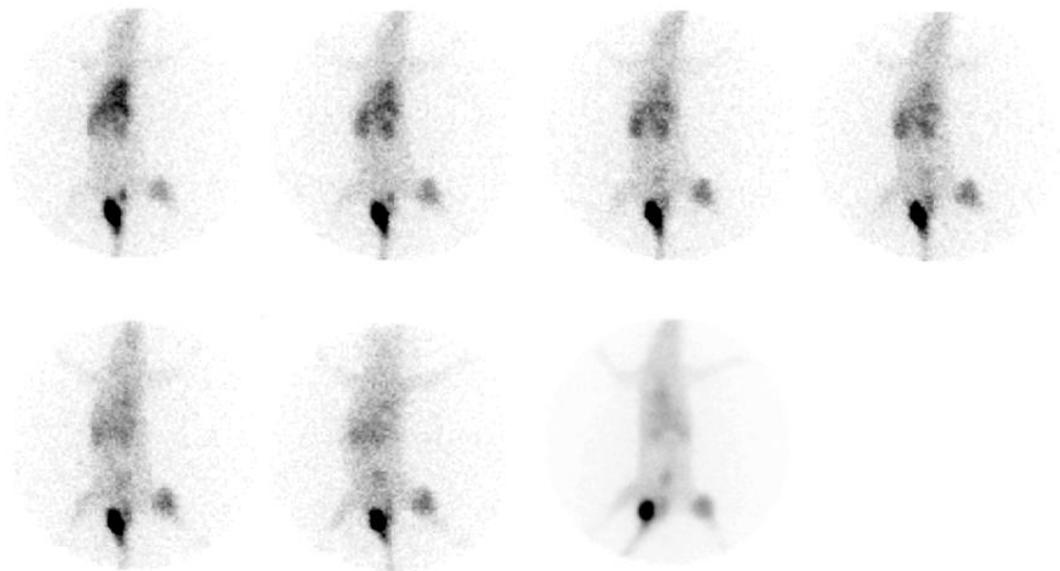
**Abbildung 3.32:** SPECT-Aufnahmen einer Ratte in coronarer Schnittführung nach Injektion von  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat, DP IV-Inhibitor und unmarkiertem Peptid

### 3.3.3 Tumortragende Ratten

Die tumortragenden Ratten zeigen sowohl bei  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$ , bei  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  als auch bei  $^{123}\text{Iod-Exendin3}$  eine deutliche Darstellung des Tumors im Hinterlauf.

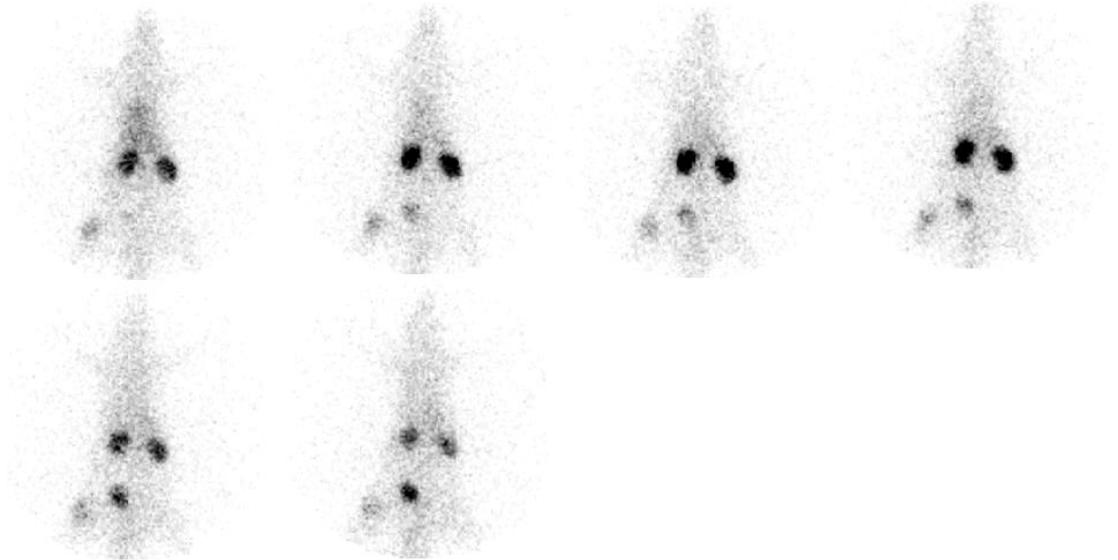
Das Verhältnis Tumor zum Hintergrund (tumor to background ratio) beträgt bei  $^{123}\text{Iod-GLP-1}$  1,48 : 1 nach 20 Minuten, 1,41 : 1 nach 40 Minuten, 1,45 : 1 nach 60 Minuten und 1,50 : 1 nach 120 Minuten.

Bei  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  beträgt das Verhältnis 2,52 : 1 nach 20 Minuten, 2,51 : 1 nach 40 Minuten, 2,25 : 1 nach 60 Minuten und 2,08 : 1 nach 120 Minuten. In Abbildung 3.33 fällt die starke Aktivitätsanreicherung am Schwanzansatz der Ratte auf. Dabei handelt es sich um einen Artefakt. Bei dieser Ratte wurden ca. 3,5 MBq  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  paravasal injiziert.



**Abbildung 3.33:** Szintigraphie einer tumortragenden NEDH Ratte mit  $^{123}\text{Iod-[Y39]-Exendin4}$  und zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60 und 120 Minuten. Der Tumor befindet sich im linken Hinterlauf. Die Anreicherung im Schwanz der Ratte ist ein Artefakt durch paravasal injizierten Tracer.

Bei  $^{123}\text{I}$ -Exendin3 beträgt das Verhältnis 2,84 : 1 nach 15 Minuten, 2,74 : 1 nach 20 Minuten, 2,47 : 1 nach 40 Minuten und 2,3 : 1 nach 60 Minuten (vergleiche Abbildung 3.34).



**Abbildung 3.34:** Szintigraphie einer tumortragenden NEDH Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -Exendin3; Auf eine Gabe von Irenat wurde verzichtet. Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40 und 60 Minuten. Der Tumor befindet sich im rechten Hinterlauf.

Die Szintigraphie einer Ratte mit  $^{123}\text{I}$ -Exendin3 wurde ohne die Gabe von Irenat angefertigt. In Abbildung 3.34 fehlt im Vergleich zu den vorher beschriebenen Versuchen die Darstellung von Schilddrüse und Magen-Darm-Trakt. Dafür stellen sich die Nieren und die Blase deutlich dar.

Im Bereich des linken Oberbauches zeigt sich eine leichte Aktivitätsanreicherung, die nicht der Form des Magens gleicht und möglicherweise dem Pankreas entspricht. Diese Anreicherung ist, bedingt durch den Druck, auf der Abbildung nur schwer zu erkennen.

## **4 Diskussion**

Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung einer neuen Szintigraphiemethode zur Lokalisationsdiagnostik von Insulinomen. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, entziehen sich die Insulinome einer einfachen und sensitiven präoperativen Lokalisationsdiagnostik. Neben Insulinomen findet sich dieses Problem auch bei einer Reihe von endokrinen Tumoren. Die nuklearmedizinische Standarddiagnostik für diese Tumoren, speziell Karzinoide, ist die Somatostatin-Rezeptorszintigraphie. Zur suffizienten Darstellung wird der Somatostatin-2-Rezeptor, der nur von ca. 80 % der Tumoren exprimiert wird, oder der Somatostatin-5-Rezeptor benötigt (Modlin, Tang, 1997). Dabei variiert die Expressionsrate bei den verschiedenen Tumoren zum Teil erheblich.

Es ist davon auszugehen, dass der GLP-1-Rezeptor nicht nur auf der Oberfläche von Insulinom-Zellen, sondern auch auf einer Reihe von anderen endokrinen Tumorzellen vorhanden ist. Neben der Insulinomdarstellung könnte eine GLP-1-Rezeptorszintigraphie auch eine Hilfestellung bei somatostatin-negativen Tumoren darstellen.

### **4.1 Entwicklung einer neuen Lokalisationsmethode**

Grundlage dieser Dissertation waren Experimente mit GLP-1 in Zellkulturen (Gotthardt, 1995). Dabei wurden Daten über Stoffwechsel und Bindungseigenschaften des Peptids gewonnen, die eine Verwendung als Tracer für eine Szintigraphie nahe legen.

Zur Radioiodierung wurde die Iodogenmethode verwendet, da sie für GLP-1 erfolgreich beschrieben wurde. Sie ermöglicht außerdem, verschiedene Tracer ohne die aufwendige Synthese einer Radiometall-Bindungsstelle zu testen. Eine schlechtere Bildgebung wurde bewusst in Kauf genommen.

$^{123}\text{I}$ -GLP-1 und  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 wurde als Tracer für die Biodistributionsversuche an gesunden Ratten verwendet. Bei den Szintigraphien der tumortragenden Tiere kam zusätzlich  $^{123}\text{I}$ -Exendin3 zum Einsatz.

Wie zu erwarten war (Conlon, 1988), lieferte die Markierung von GLP-1 eine hohe Markierungsausbeute. Für die Iodogenmethode wird die Aminosäure Tyrosin benötigt, die in Exendin3 fehlt. Eine Markierung wurde allerdings auch am Histidin beschrieben, das in Exendin3 und Exendin4 an Position eins enthalten ist. In den vorliegenden Versuchen zeigte Exendin3 schlechte Iodierungseigenschaften, die sich in der Literatur auch für Exendin4 finden (Singh et al., 1994). Eine mögliche Erklärung liegt in der Tertiärstruktur der Eiweiße, die Aminosäuren räumlich abschirmen kann. Zur Radioiodierung von Exendin wurde auf ein Modell von Singh et al. (1994) zurückgegriffen. In dieser Arbeit wurde anstelle von Serin (Position 39) Tyrosin in das Exendin4 eingefügt. Diese Synthese ist wegen der Kettenlänge und der Aminosäuresequenz relativ aufwendig. Dabei ist vor allem das Prolin-Tripel an Position 36 bis 38 kritisch und führt oft zu Kettenabbrüchen. Das so gewonnene Peptid lässt sich mit einer etwas verlängerten Inkubationszeit gut markieren.

Die Aufreinigung der Markierungen mittels Sephadex-Säule erwies sich als nicht praktikabel. Die nachgeschalteten Analysen mittels HPLC zeigten, dass es zu keiner verlässlichen Trennung von freiem Iod und Peptid kam.

Bei Verwendung der HPLC zur Aufreinigung fällt sowohl bei  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 als auch bei  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 ein angedeutet M-förmiger Gradient auf, der bei  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 ausgeprägter ist. In diesem Doppelpeak spiegelt sich eine Eigenschaft von Tyrosin wieder, das mit Hilfe der Iodogenmethode einfach und doppelt iodiert werden kann. Bei der verwendeten HPLC-Methode könnten sich im Bereich der diiodierten Peptide theoretisch auch langkettige Peptidbruchstücke finden. Daher wurden in dieser Arbeit nur mono-iodierte Peptide injiziert.

Neben einem Tracer wurde für die Entwicklung der neuen Szintigraphiemethode ein valides Tiermodell benötigt. Dazu sollten in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Ansätze etabliert werden. Das Modell der Zelltransplantation sollte Tumoren an eindeutig reproduzierbarer Stelle liefern, um exakte Daten zur Tumordarstellung zu

erhalten. Diese sollten dann im zweiten Schritt anhand der medikamentösen Tumorinduktion, die ein wirklichkeitsnahes Modell darstellt, überprüft werden.

Mit Hilfe der Tumorzelltransplantation konnte ein zuverlässiges Modell etabliert werden. Durch die subkutane Lage war es möglich, die Tumoren durch Ultraschall zu kontrollieren und leicht weiter zu transplantieren.

Das Modell der medikamentösen Tumorinduktion konnte nicht eingesetzt werden. Die im Experiment eingeschlossenen Tiere entwickelten statt der erwarteten Tumoren einen Diabetes. Da mit dem Modell der Zelltransplantation ein valides Tumormodell vorhanden war, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt, um weitere Versuchstiere zu sparen.

## **4.2 GLP-1-Rezeptorszintigraphie**

### **4.2.1 Versuche an gesunden Tieren**

Zur Beurteilung der Aktivitätsverteilung an gesunden Ratten wurden nur Kameradaten verwendet. Diese ermöglichten es, die verwendeten Peptide hinsichtlich der Eignung zur Szintigraphie zu beurteilen. Dabei konnte der experimentelle Aufwand und der Tierverbrauch eingegrenzt werden. Eine pharmakologische Beurteilung ist mit Hilfe dieser Daten nur eingeschränkt möglich, da die Überlagerungen nicht unterschieden werden können.

Bei Betrachtung der Aktivitäts-Verläufe im gesamten Körper der Ratte haben die Zeit-Aktivitätskurven mehr oder minder die Form einer Treppe. Die Ratten konnten während der szintigraphischen Aufnahmen keine Aktivität nach außen abgeben. Ein Aktivitätssprung erfolgte dann, wenn die Versuchstiere zurück in den Käfig gelegt wurden und über den Urin Aktivität ausgeschieden wurde.

Über den Lungen zeigen sich sehr uneinheitliche Aktivitätsverläufe, die auf eine hohe Variabilität zwischen den Versuchstieren hinweisen. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den Ergebnissen nicht um eine spezifische Rezeptorbindung handelt - vielmehr kommen hier Infektionen im Bereich der Lunge in Frage. Diese Infekte sind bei den Versuchstieren häufig. Auch mit Hilfe der SPECT-Aufnahmen ließen

sich keine genaueren Aussagen treffen. Dabei war unter anderem die Auflösung der verwendeten 3-Kopf-Kamera limitierend. Bessere Ergebnisse könnte hier ein Kleintierkollimator bringen.

Für die in Kapitel 3.3.1.1 beschriebene Aktivitätsanreicherung im Bereich der Schnauze kommen ebenfalls krankhafte Veränderungen (im Sinne einer Rhinitis) in Frage. Eine physiologische Anreicherung kann aber auch durch eine Iodanreicherung in den Speicheldrüsen hervorgerufen werden.

Im Bereich des linken Oberbauchs zeigt sich bei den beiden Tracern  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 und  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4, sowie bei der Kontrollgruppe mit Na  $^{123}\text{I}$  eine Kletterkurve, wenn die Versuchstiere kein Irenat erhalten hatten. Dieser Effekt wird durch die Iodanreicherung in der Magenschleimhaut und Sekretion in das Lumen hervorgerufen. Die Kletterkurve entsteht durch die Akkumulation von Aktivität im Magen. Die fehlende Aktivitätsanreicherung in Magen und Darm (Unterbauch-Region) bei Irenatgabe zeigt, dass GLP-1 und [Y39]Exendin4 nicht über den Magen-Darm-Trakt ausgeschieden werden.

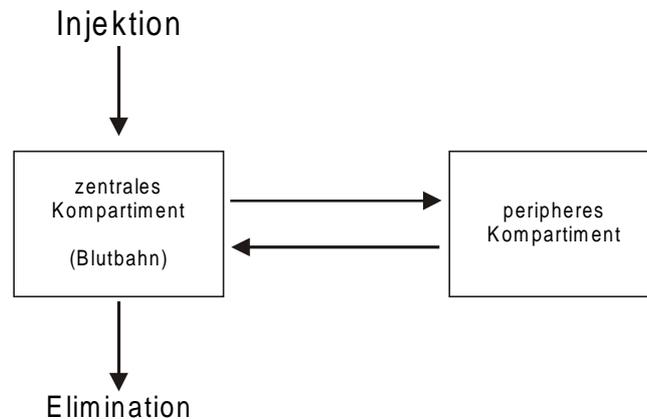
Sowohl die Tracer auf Exendin- als auch GLP-1 Basis werden renal eliminiert. Dies ist anhand der Anreicherung über den Nieren und der Blase in den Aktivitäts-Verläufen deutlich sichtbar.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Kinetiken und die Zeit-Aktivitätskurven der verwendeten Tracer eng beieinander lagen. Darauf hat auch eine Stabilisierung mit einem DP IV-Inhibitor und die Blockade der Rezeptoren mit unmarkiertem Peptid keinen wesentlichen Einfluss. Es ist jedoch bekannt, dass stabilere Peptide im Vergleich zu instabilen, nativen eine höhere Anreicherung im Tumor aufweisen (Somatostatin – Octreotid). Aus der Literatur ist eine höhere metabolische Stabilität für Exendin bekannt, daher ist hier ein höherer Tumoruption zu erwarten.

Über dem Herzen folgen die Zeit-Aktivitätskurven dem Verlauf einer Mehr-Phasen Kinetik. Dieser Verlauf ist bei  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 deutlicher zu erkennen, möglicherweise durch die höhere metabolische Stabilität bedingt.

Da in dieser Arbeit nur die Bluthalbwertszeiten untersucht werden sollten, wurde ein vereinfachtes pharmakologisches Kompartimentenmodell verwendet (vergleiche Abbildung 4.1). Hier sind die peripheren Kompartimente zu einem einzigen zusam-

mengefasst. Damit wurde ein 2-Kompartimenten Modell geschaffen, das mit Hilfe einer 2-Phasen-Kinetik beschrieben werden kann.



**Abbildung 4.1:** Darstellung eines vereinfachten pharmakologischen Kompartimentenmodells

Die errechneten Halbwertszeiten sind kurz. Die Korrelationskoeffizienten zeigen eine gute Übereinstimmung der errechneten Funktionen mit den experimentell gefundenen Daten. Dabei unterscheiden sich die Halbwertszeiten von Iod und den Peptiden kaum. Die Werte entsprechen den in der Literatur beschriebenen Halbwertszeiten (Kreymann et al., 1987), (Ørskov et al., 1993). Außerdem liegen sie im Bereich der für Somatostatin, Octreotid und Gastrin beschriebenen Daten. Obwohl die Halbwertszeiten von Octreotid und Somatostatin eng beieinander liegen, kommt es beim Octreotid durch eine höhere metabolische Stabilität zu einer deutlich kontrastreichereren Bildgebung (s.o.).

Im Laufe der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden 1999 von Hassan et al. Untersuchungen zur Biokinetik von GLP-1 in Ratten veröffentlicht. Die Ergebnisse dieser Gruppe sind mit systematischen Fehlern behaftet und sollen hier kurz diskutiert werden:

Die Auswertungsmethode der szintigraphischen Aufnahmen gleicht bei Hassan et al. den Methoden der vorliegenden Arbeit. Allerdings diskutierten sie die Instabilität des Tracers ( $^{131}\text{I}$ -GLP-1) nicht. Es wurde deshalb nicht berücksichtigt, dass es sich bei der Radionuklidverteilung um ein Iod / GLP-1 Mischbild handelte. Aus einer gering gesteigerten Anreicherung im ZNS (2% wurden erwartet, 6% wurden gemessen) schlossen Hassan et al. auf einen Übertritt von GLP-1 über die Blut-Hirn-Schranke.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten widersprechen dieser These ebenso wie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. (Ørskov et al. 1996) Bei der Tracerherstellung benutzten Hassan et al. Na <sup>131</sup>I. Der Einsatz dieses Isotops bei Versuchen ist auf Grund der Kontaminationsgefahr, der hohen Strahlenbelastung bei Internalisierung (vor allem durch den  $\beta$ -Anteil) und der langen Halbwertszeit von Seiten des Strahlenschutzes fragwürdig. Das Isotop wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

### 4.2.2 Versuche an tumortragenden Tieren

Für die Insulinomdiagnostik ergibt sich aus den bislang bekannten und in dieser Arbeit gewonnenen Daten erstmals die Möglichkeit einer wenig invasiven und potentiell hoch sensitiven, präoperativen Lokalisationsdiagnostik.

Der Vergleich zwischen <sup>123</sup>I-GLP-1, <sup>123</sup>I-Exendin3 und <sup>123</sup>I-[Y39]-Exendin4 zeigt für <sup>123</sup>I-Exendin3 die besten Ergebnisse bei der tumor-to-background-ratio. Es ist dem <sup>123</sup>I-[Y39]-Exendin4 geringgradig und dem <sup>123</sup>I-GLP-1 deutlich überlegen. Außerdem erwies sich die Markierung von Exendin3 als außerordentlich stabil.

<sup>123</sup>I-Exendin3 ist stabil gegenüber den Deiodasen, da die Markierung nicht an der Aminosäure Tyrosin, sondern an Histidin erfolgt. Das Peptid wird vollständig über die Nieren ausgeschieden, so dass eine Überlagerung mit diagnostisch interessanten Organen, wie zum Beispiel der Leber, nicht stattfindet.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten bestätigen Ergebnisse von Thum et al. (2002), die eine höhere Stabilität von Exendin gegenüber GLP-1 gefunden haben. Bezüglich der Frage der Synthese und Markierung ist, wie oben ausgeführt, das GLP-1 dem Exendin überlegen. [Y39]-Exendin4 löst zwar die Probleme der Markierung, ist aber sehr kompliziert zu synthetisieren.

## 4.3 Ausblick

Wie oben beschrieben, können Kameradaten keine exakte Pharmakodynamik wiedergeben. Zur Klärung der Frage, ob der gefundene Unterschied zwischen Exendin3 und [Y39]-Exendin4 signifikant ist, müssen mittels Organentnahme exakte biokinetische Daten ermittelt und Studien zur Bestimmung der Organdosis durchgeführt werden.

Auch wenn der Einsatz verschiedener Tracer möglich wäre ([Ser<sup>8</sup>]GLP-1(7-36)amid, eventuell in Kombination mit einem DP IV-Inhibitor), erscheinen Exendinbruchstücke am aussichtsreichsten. Für die Auswahl von GLP-1-Analoga für die Peptidszintigraphie sind Informationen über die räumliche Konfiguration der Bindungsstellen von GLP-1 nötig, deren Erforschung noch am Anfang steht (Xiao et al., 2000). Eine Arbeit von Parker et al. (1998) beschreibt Aminosäuren, die einen wesentlichen Einfluss auf die Rezeptorbindung haben. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren an Position 7 (His), 12 (Phe), 13 (Thr), 19 (Tyr), 28 (Phe) und 32 (Leu). Die räumliche Konfiguration dieser Aminosäuren innerhalb der Tertiärstruktur von GLP-1 ist für die Bindung und damit Internalisierung des Peptids essentiell, daher muss in Frage gestellt werden, ob die Entwicklung eines kurzkettigen GLP-1-Analogons überhaupt möglich ist.

Auf Grund der Daten der vorliegen Arbeit sollten radiometallmarkierte GLP-1-Analoga auf Exendinbasis entwickelt werden. Mit radiometallmarkierten Tracern lässt sich eine bessere Bildgebung erzielen (Bakker et al., 1991 b).

Theoretisch wäre auch ein Einsatz in der Radiotherapie von Insulinomen möglich. Dazu müsste eine <sup>90</sup>Y-DOTA-Variante synthetisiert werden. Besonders kritisch erscheint dabei die Situation der  $\beta$ -Zellen im Pankreas zu sein, deren Zerstörung zu einer diabetischen Stoffwechsellaage führen kann. Diese Nebenwirkung tritt allerdings auch bei der Chemotherapie maligner Insulinome mittels Streptozotocin auf. Das Beispiel der Radio-Octreotid-Therapie mit <sup>90</sup>Y-DOTATOC zeigt, dass eine Radio-Therapie von Insulinomen durchaus möglich werden kann.

### 4.4 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte eine neue Szintigraphiemethode entwickelt werden, die eine wenig invasive, präoperative Lokalisation von Insulinomen ermöglichen könnte.

Bei den verwendeten Tracern scheint das Exendin3 die besten Ergebnisse zu liefern, da die Bindung von  $^{123}\text{I}$  am Histidin deutlich stabiler ist als die an Tyrosin. Mit Hilfe von  $^{123}\text{I}$ -Exendin3 ist eine Tumordarstellung mit einer hohen tumor-to-background-ratio möglich.

Diese könnte durch Verwendung einer Radiometallmarkierung weiter verbessert werden. Zukünftige Arbeiten werden mit diesem Tracer, ähnlich der vorliegenden Dissertation, Versuche zur Tumordarstellung durchführen müssen. Zusätzlich werden mittels Organentnahme exakte pharmakologische Daten erhoben werden müssen.

## 5 Zusammenfassung

Die non-invasive Lokalisationsdiagnostik von Insulinomen ist ein Problem, das bis heute nicht zufriedenstellend gelöst ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Radiopharmaka zur szintigraphischen Darstellung von Insulinomen auf der Basis von GLP-1-Analoga entwickelt. Mit Hilfe dieser Radiopharmaka wurden im Tiermodell induzierte Tumoren dargestellt. Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Markierung von GLP-1 und seines Analogons Exendin3, sowie der Variante [Y39]-Exendin4 mittels Radioiodierung und Aufreinigung der gewonnenen Tracer mittels HPLC und Sephadex-Säule.
2. Etablierung eines validen Insulinom-Modells in Ratten.
3. Untersuchungen zur Verteilung verschiedener Radiopharmaka in gesunden Versuchstieren. Dabei wurde die Bluthalbwertszeit und der Einfluss verschiedener stabilisierender Substanzen, sowie der Einfluss von unmarkiertem Peptid szintigraphisch bestimmt. Eine Kontrollgruppe wurde mit Na <sup>123</sup>I untersucht.
4. Darstellung der im Tumormodell induzierten Tumoren mit den aus 1. und 3. hervorgegangenen Tracern.

Die Markierung von GLP-1 führte zu einem Radiopharmakon mit einer hohen spezifischen Aktivität. Exendin3 ließ sich relativ schlecht markieren, da hier die Aminosäure Tyrosin nicht vorhanden ist. Die synthetisierte Exendin4 Variante [Y39]-Exendin4 mit der Aminosäure Tyrosin an Position 39 führte zu einem Tracer mit einer befriedigenden spezifischen Aktivität.

Das Insulinom-Modell in Ratten konnte mit Hilfe der Tumorzelltransplantation erfolgreich etabliert werden. Dazu wurden RINm5F-Zellen in Kultur angezüchtet und NEDH-Ratten subkutan injiziert. Eine weitere Übertragung erfolgte durch Transplantation von Tumorstücken.

Die Untersuchung der Verteilung der Radiopharmaka in den Versuchstieren zeigte eine schnelle Elimination des Tracers über die Nieren. GLP-1 zeigte eine Akkumula-

tion in den Nieren. Über den Bereichen des Herzens und der Leber konnten typische Aktivitätsverläufe für eine 2-Phasen-Kinetik beobachtet werden. Die daraus errechneten Bluthalbwertszeiten lagen für GLP-1 und [Y39]-Exendin4 innerhalb weniger Minuten, [Y39]-Exendin4 zirkulierte etwas länger im Blut. Aus beiden Peptiden wurde freies Iod in die Blutbahn abgespalten. Dadurch kam es zu einer charakteristischen Aktivitätsanreicherung in Schilddrüse und Magen. Eine Stabilisierung der Peptide mit einem DP IV-Inhibitor führte zu keiner signifikanten Verlängerung der Bluthalbwertszeit.

Im Gegensatz zu  $^{123}\text{I}$ -GLP-1 und  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 zeigte  $^{123}\text{I}$ -Exendin3 ein sehr stabiles Verhalten, es kam zu keiner Abspaltung von freiem Iod, was durch eine fehlende Darstellung der Schilddrüse dokumentiert werden konnte.

Die Insulinomdarstellung war sowohl mit  $^{123}\text{I}$ -GLP-1,  $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4, als auch mit  $^{123}\text{I}$ -Exendin3 möglich. In allen Fällen wurde das Radiopharmakon schnell im Tumor angereichert. Mit Hilfe von Exendin3 konnte die beste tumor-to-background-ratio erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte eine GLP-1-Rezeptorszintigraphie entwickelt werden. Die GLP-1 Analoga Exendin3 und [Y39]-Exendin4 zeigten sehr gute Darstellungseigenschaften mit einer hohen tumor-to-background ratio. Mit diesen Peptiden könnte eine sensitive und wenig invasive präoperative Diagnostik zur Lokalisation von Insulinomen möglich werden.

Mit Einführung einer Radiometallmarkierung und durch Erprobung künstlicher Peptide (GLP-1-Analoga) könnte ein klinisch einsetzbares Radiopharmakon entstehen.

## 6 Literaturverzeichnis

**d'Alessio DA, Vogel R, Prigeon R, Laschansky E, Koerker D, Eng J, Ensick JW,** 1996: Elimination of the action of glukagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. *J Clin Invest*, 97: 133-8

**Arnold R, Frank M,** 1996: Endokrine Pankreastumoren. In: Hahn EG, Riemann JF (Hrsg.): *Klinische Gastroenterologie* in 2 Bänden, Band 2, 3. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-477703-7

**Bakker WH, Krenning EP, Breemann WA, Koper JW, Kooji PP, Reubi JC, Klijn JG, Visser TJ, Docter R, Lamberts SW,** 1990: Receptor Scintigraphy with a Radioiodinated Somatostatin Analogue: Radiolabelling, Purification, Biologic Activity, and In Vivo Application in Animals. *J Nucl Med*, 31: 1501-9

**Bakker WH, Krenning EP, Breemann WA, Koper JW, Kooji PP, Reubi JC, Koeper JW, de Long M, Laméris JS, Vissner TJ, Lamberts SW,** 1991 a: In Vivo Use of Radioiodinated Somatostatin Analogue: Dynamics, Metabolism, and Binding to Somatostatin Receptor-Positive Tumors in Man. *J Nucl Med*, 32: 1184-9

**Bakker WH, Krenning EP, Reubi JC, Breemann WA, Setyono-Han B, de Long M, Kooji PP, Bruns V, van Hagen PM, Marbach P, Vissner TJ, Pless J, Lamberts SW,** 1991 b: In Vivo Application of [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-Octreotide for Detection of Somatostatin-Receptor Positive Tumors in Rats. *Life Science*, 49: 1593-1601

**Behr TM, Béhé M, Becker W,** 1999 a: Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology. *QJ Nucl Med* 43(9), 260-80

- Behr TM, Jenner N, Béhé M, Argenstein C, Gratz S, Mach R, Hamann L et al.,** 1999 b: Cholezystokinin-B/gastrin receptor binding peptides: from preclinical development to initial clinical results. *J Nucl Med*, 40: 1029-44
- Behr TM, Gotthardt M, Barth A, Béhé M,** 2001: Imaging tumours with peptide-based radioligands. *QJ Nucl Med*, 45(2): 189-200
- Behr TM, Gotthardt M, Becker W, Béhé M,** 2002: Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. *Nucl Med*, 41: 71-9
- Bell GI, Sanches-Pescador R, Layborn PJ, Naharian RC,** 1983: Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*, 304: 368-71
- Berendes, FJ, Cuesta MA, Kazemier A, van Eijck CHJ, de Herder WW, van Muiswinkel JA, Brunnig HA, Bonjer HJ,** 2000: Laparoscopic detection and resection of insulinomas. *Surgery*, 128: 386-91
- Bernard C,** 1877: *Leçons sur le diabète*. Paris : J.B. Baillière
- Bernier DR, Christian PE, Langan JK (Hrsg.),** 1994: *Nuclear Medicine technology and techniques*. 3. Auflage, St. Louis, USA, Mosby – Year Book, Inc., ISBN 0-815-11991-7
- Bertin E, Arner P, Bolinder J, Hagström-Toft E,** 2001: Action of Glucagon and Glucagon-Like Peptide-1-(7-36) Amide on Lipolysis in Human Subcutaneous Adipose Tissue and Skeletal Muscle in Vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1229-1234
- Buckley DI, Lundquist P,** 1992: Analysis of the degradation of insulinotropin (GLP-1(7-37)) in human plasma and production of degradation resistant analogues. *Regul Peptides*, 40: 117 (Abstact)

- 
- Büll U, Hör G**, 1990: Klinische Nuklearmedizin. 2. Auflage, Weinheim, Ed. Medizin VCH, ISBN 3-257-15427-2
- Büll U, Schicha H, Biersack HJ, Knapp WH, Reiners C, Schober O**, 1999: Nuklearmedizin. 3. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-118503-1
- Bullock BP, Heller RS, Habener JF**, 1996: Tissue Distribution of Messenger Ribonucleic Acid Encoding the Rat Glucagon-Like Peptide-1 Receptor. *Endocrinology* 137: 2968-78
- Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M**, 1999 : Glukagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription from pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*, 42: 856-64
- Chick WL, Warren S, Chute R, Like AA, Lauris V, Kitchen KC**, 1977: A transplantable insulinoma in the rat., *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 628-632
- Conlon JM**, 1988: Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationship and physiological roles. *Diabetologia*, 31: 563-8
- Creutzfeldt W**, 1979: The incretin concept today. *Diabetologia*, 16: 75-85
- Creuzfeld W**, 1985: Endocrine tumors of the pancreas. In: Volk BW, Arquilla ER (Hrsg.): *The Diabetic Pancreas*. New York, USA, Plenum Press, ISBN 0-30-631011-2
- Deacon CF, Johnson AH, Holst JJ**, 1995: Degradation of glucagons-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an n-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 952-7

- Donahey JCK, Van Dijk G, Woods SC, Seeley**, 1998: Intraventricular GLP-1 reduces short- but not long-term food intake or body weight in lean and obese rats. *Brain Res*, 779: 75-83
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Haberner JF**, 1987: Glukagon-like Peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 3434-38
- Drucker DJ**, 2001: Minireview: The Glucagon-Like Peptides. *Endocrinology*, 142: 521-7
- Edvell A, Lindstrom P**, 1999: Initiation of increased pancreatic islet cell growth in young normoglycemic mice (Umea +/-). *Endocrinology* 140: 778-83
- Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatel MA, Bloom SR**, 1999: Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* 48: 86-93
- Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y**, 1964: Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* 24: 1076-82
- Eng J, Andrews PC, Kleinman WA, Sinhg L, Raufman JJ**, 1990: Purification and Structure of Exendin-3, a New Pancreatic Secretagogue Isolated from *Heloderma horridum* Venom. *JBC*, 265(33): 20259-62
- Eng J, Kleinman WA, Sinhg L, Sinhg G, Raufman JJ**, 1992: Isolation and Characterisation of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from *Heloderma suspectum* Venom. *JBC*, 267(11): 7402-5
- Eriksson B, Oberg K, Skogseid B**, 1989: Neuroendocrine Pancreatic endocrine tumors. Clinical findings in a prospective study of 84 patients. *Acta Oncol*, 28(3): 373-7

- 
- Forschungszentrum Karlsruhe**, 1996: Karlsruher Nuklidkarte. 6. Auflage, Lage / Lippe, Marktdienste Haberbeck GmbH, ISBN 3-921879-18-3
- Fritsch HW, Höffken H, Rogausch D, Barth A, Joseph K**, 1999: NUKLEUS - Nuklearmedizinisches Lehr- und Unterrichtssystem. Klinik für Nuklearmedizin, Klinikum der Philipps-Universität Marburg, <http://www.med.uni-marburg.de/knukmed/nukleus/nukleus.htm>
- Gallwitz B, Ropeter T, Morys-Wortmann C, Mentlein R, Siegel EG, Schmidt WE**, 2000: GLP-1-analogies resistant to degradation by dipeptidyl-peptidase IV in vitro. Regul Pept, 86: 103-11
- Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, Lauris V**, 1980: Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor., Proc Natl Acad Sci USA, 77: 3519-23
- Gotthardt M**, 1995: Postsekretorische Degradation des Inkretinhormons GLP-1(7-36)amid, Inauguraldissertation, Philipps-Universität Marburg
- Grant CS**, 1996: Insulinoma. Clin Gastroenterol, 10(4): 645-671
- Grehn J (Hrsg.), von Hessberg A, Holz HG, Kruse J, Krüger H, Schmidt HD**, 1988: Metzler Physik. 2. Auflage, Stuttgart, J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung, ISBN 3-476-50209-0
- Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wran Y, Zhou J, Garant MJ, Egan JM**, 1999: Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentration. Diabetologia, 42: 45-50

**Hansen AK**, 1995: Transplantation of Rat Islet Tumor Cells into inbred NEDH Rats. In: Hansen AK, Dagnæs-Hansen F (Hrsg.): An Introduction to the Use of Rodent Models in Diabetes Research., Skensved, DK, Møllegaard Breeding Center, S 51-53

**Hassan M, Eskilsson A, Nilsson C, Jonsson C, Jacobsson H, Refai E, Larsson S, Effendic S**, 1999: In Vivo Dynamic Distribution of <sup>131</sup>I-Glucagon-Like Peptide-1 (7-36) Amide in the Rat Studied by Gamma-camera. Nucl Med Biol, 26(4): 413-20

**Heinecke A, Hutsch E, Reppes R**, 1992: Medizinische Biometrie: Biomathematik und Statistik. 1. Auflage, Berlin, Springer-Verlag, ISBN 3-540-52010-4

**Heitz PU, Kasper M, Polak JM, Klöppel G**, 1982: Pancreatic endocrine tumors. Hum Pathol, 13(3): 263-71

**Hessenius C, Bäder M, Meinhold H, Böhmig M, Faiss S, Reubi JC, Wiedemann B**, 2000: Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas or neuroendocrine tumors. Eur J Nucl Med, 27: 1684-93

**Hiramoto JS, Feldstein VA, LaBerge JM, Norton JA**, 2001: Intraoperative Ultrasound and Preoperative Localization Detects All Occult Insulinomas. Arch Surg, 136: 1020-6

**Holst JJ, Ørskov C, Vagn Nielsen O, Schwarzt TW**, 1987: Truncated GLP-1, an insulin releasing hormone from the distal gut. FEBS Lett, 211: 169-74

**Holst JJ, Deacon CF**, 1998: Inhibition of the activity of dipeptidylpeptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. Diabetes, 47(11): 1663-70

**Holst JJ**, 2000: Gut hormone as pharmaceuticals: From Enteroglucagon to GLP-1 and GLP-2. Regul Pept, 93: 45-51

- 
- Holz GG, Kuhlreiber WM, Haberner JF**, 1993: Pancreatic beta-cell are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*, 361: 362-5
- Hupe-Sodmann, McGregor GP, Bridenbaugh R, Göke R, Göke B, Thole HH, Zimmermann B, Voigt K**, 1995: Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagons-like peptides. *Regul Peptides*, 58: 149-56
- Hupe-Sodmann, Göke R, Göke B, Thole HH, Zimmermann B, Voigt K, McGregor GP**, 1997: Endoproteolysis of Glucagon-like Peptide (GLP)-1(7-36) amide by Ectopeptidases in RINm5F Cells, *Peptides*, 18(5) : 625-632
- McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS**, 1964: New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet*, 41: 20-1
- Jensen RT, Norton JA**, 1999: Endocrine Neoplasms of the Pancreas. In: Yamada T , Alpers DH, Laine L, Owyang C, Powell DW (Hrsg.): *Textbook of Gastroenterology*, Volume Two, 3. Auflage, Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0-397-58735-X
- Joseph K, Stapp J, Reinecke J, Skamel HJ, Höffken H, Benning R, Neuhaus C, Lenze H, Trautmann ME, Arnold R**, 1993: Receptor Scintigraphy with <sup>111</sup>In-Pentetreotide for Endocrine Gastroenteropancreatic Tumors. *Horm Metab Res*, 27 (Suppl.): 28-35
- Kauffann GW, Moser E, Sauer R**, 2001: *Radiologie*. 2. Auflage, München, Urban & Fischer Verlag, ISBN 3-437-42380-0
- Kazumi T; Yoshino G; Fujii S; Baba S**, 1978: Tumorigenic Action of Streptozotocin on the Pancreas and Kidney in Male Wistar Rats., *Cancer Research*, 38: 2144-7;

**Kazumi T, Sakamoto C, Ohki A, Yoshino G, Otsuki M, Baba S**, 1981: Insulin Release from the Isolated Perfused Rat Pancreas Containing Insulinomas Induced by Streptotocin and Nicotinamid: Effect of Glucose and Response to Tumor removal. *Endocrinology*, 109(2): 607-10

**Klöppel G, Schröder S, Heitz PU**, 1995: Histopathology and immunopathology of pancreatic endocrine tumors. In: Mignon M, Jensen RT: *Endocrine tumors of the pancreas : recent advances in research and management*. Basel, Schweiz, S. Karger, ISBN 3-80-555953-4

**Kolligs F, Fehmann HC, Göke R, Göke B**, 1995: Reduction of the Incretin Effect in Rats by the Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Antagonist Exendin(9-39) Amide. *Diabetes*, 44: 16-9

**Krausz Y, Bar-Ziv J, de Jong RB, Ish-Shalom S, Chisin R, Shibley N, Glaser B**, 1998: Somatostatin-receptor scintigraphy in the management of gastroenteropancreatic tumors. *Am J Gastroenterol*, 93(1): 66-70

**Krenning EP, Bakker WH, Breeman WA, Koper JW, Kooij PP, Ausema L, Lameris JS, Reubi JC, Lamberts SW**, 1989: Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet*, 1(8632): 242-4

**Krenning EP, Bakker WH, Kooij PP, Breemann WA, Oei HY, de Long M, Reubi JC, Vissner TJ, Bruns V, Kwekkeboom DJ, Reijs AEM, van Hagen PM, Koper JW, Lamberts SWJ**, 1992: Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyt-3-Octreotide. *J Nucl Med*, 33: 652-8

---

**Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breemann WAP, Kooji PPM, Oei HY, van Hagen PM, Postema PTE, de Long M, Reubi JC, Vissner TJ, Reijs AEM, Hofland LJ, Koper JW, Lamberts SWJ**, 1993: Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]- and [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med*, 20: 716-31

**Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR**, 1987: Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 2(8571): 1300-4

**van der Laken CJ, Boermann OC, Oyen WJ, van de Veen MT, van der Meer JW, Corstens FH**, 2000: Radiolabeled interleukin-8: specific scintigraphic detection of infection within a few hours. *Journal of nuclear medicine*, 31(3): 463-9

**Meares CF, Moi MK, Diril H, Kukis DL, McCall MJ, Deshapande SV, DeNardo SJ, Snook D, Epenetos AA**, 1990: Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *Br J Cancer (Suppl)*, 10:21-6

**Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE**, 1993: Dipeptidyl-peptidase IV hydrolases GIP. GLP-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.*, 214: 829-35

**Meyer V**, 1986: *Laborbücher Chemie: Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*. 4. Auflage, Frankfurt a.M., Diesterweg, ISBN 3-425-05452-X

**Meyers Lexikonredaktion (Hrsg.)**, 1999: *Meyers großes Taschenlexikon*: in 25 Bänden. 7. Auflage, Mannheim, Bibliographisches Institut & F.A Brockhaus AG, ISBN 3-411-11007-4

**Modlin IM, Tang LH**, 1997: Approaches to the Diagnosis of Gut Neuroendocrine Tumors: The Last Word (Today). *Gastroenterology*, 112: 583-90

- Moore B, Edie ES, Abraham JH**, 1906: On treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucosa membrane. *Biochem J*, 219: 227-32
- Nauck MA, Niedereichholz Uettler R, Hols JJ, Ørskov C, Creutzfeld W, Williams B**, 1997: Glucagon-like peptide 1 inhibits the gastric emptying outweighs its insulinotropic effect in healthy humans. *Am J Physiol* 273: E981-8
- Nowak U, Wilks A, Buell G, McEwens SF**, 1987: Identical mRNA for preproglucagon in pancreas and gut. *Eur J Biochem*, 164: 533-8
- Ørskov C**, 1992 a: GLP-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia*, 35: 701-11
- Ørskov C, Andreasen J, Holst JJ**, 1992 b: All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 74(2): 379-84
- Ørskov C, Wettergren A, Holst JJ**, 1993: Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*, 42(5): 658-61
- Ørskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ**, 1994: Tissue and plasma concentration of amidated and glycine extended glucagons-like peptide 1 in humans. *Diabetes*, 43(4): 535-9
- Ørskov C, Poulsen SP, Møller M, Holst JJ**, 1996: Glukagon-Like Peptide I Receptor in Subfornical Organ and the Area Postrema Are Accessible to Circulating Glucagon-Like Peptide I. *Diabetes*, 45: 832-5
- Papula L**, 1997: *Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*, Band 3., 2. Auflage, Braunschweig, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 3-528-14937-X

- 
- Parker DS, Raufmann JP, O'Donohue TL, Bledsoe M, Yosida H, Pisano JJ,** 1984: Amino Acid Sequences of Helospectins, New members of the glucagons Superfamily, Found in Gila Monster Venom. *JBC*, 259(19): 11751-5
- Parker JC, Andrews KM, Rescek DM, Masefski W Jr., Andrews GC, Contilo LG, Stevenson RW, Singelton DH, Suleske RT,** 1998: Structure-function analysis of a series of glucagons-like peptide-1 analogs. *J Peptide Res*, 52: 398-409
- Patzelt C, Schug G,** 1981: The major proglucagon Fragment: an abundant islet protein and secretory product. *FEBS Lett*, 129: 127-30
- Peckham JC,** 1980: *Experimental Oncology*. In. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH: *The laboratory Rat*. Band 2, New York, USA, Academic Press, ISBN 0-12-074902-5
- Pozzani UC, Carpenter CP, Pal PE, Weil CS, Nair JH, Syracuse MS,** 1959: An Investigation of the Mamillian Toxicity of Acetonitril, *Journal of Occupational Medicine*, December: 634-42
- Praz GA, Halban PA, Wollheim CB, Blondel B Strauss AJ, Renold AE,** 1983: Regulation of immunoreactive insulin release from a rat cell line (RINM5F), *Biochem J*, 210: 345-52
- Raufman JJ, Sinhg L, Eng J,** 1991: Exendin-3, a Noval Peptide from *Heloderma horridum* Venom, Interacts with Vasoactive Peptide Receptors and a Newly Described Receptor on Dispersed Acini from Guinea Pig Pancreas. *JBC*, 266(5): 2897-2902
- Reubi JC, Perrin MH, Rivier JE, Vale W,** 1981: High affinity binding sites for a somatostatin-28 analog in rat brain. *Life sciences()*, 28(19): 2191-8

- Reubi JC, Rivier JE, Perrin MH, Brown M, Vale W**, 1982: Specific high affinity binding sites for somatostatin-28 on pancreatic beta-cells: differences with brain somatostatin receptors. *Endocrinology*, 110(3): 1049-51
- Reubi JC**, 1985: A somatostatin analogue inhibits chondrosarcoma and insulinoma tumour growth. *Acta Endol*, 109(1): 108-14
- Richter G, Feddersen O, Wagner U, Barth P, Göke R, Göke B**, 1993: GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am J Physiol*, 265: L374-81
- Ringler DH, Dabich L**, 1979: Hematology and Clinical Biochemistry. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH: The laboratory Rat. Band 1, New York, USA, Academic Press, ISBN 0-12-074901-7
- Ritzel U, Leonhardt U, Oettleben M, Rühmann A, Eckhart K, Spiess J, Ramadori G**, 1998: A Synthetic glucagons-like peptide-1 analog with improved plasma stability. *J Endocrinol*, 158: 93-102
- Röher HD, Simon D, Starke A, Goretzki PE**, 1997: Spezielle diagnostische und therapeutische Aspekte beim Insulinom. *Chirurg*, 68: 116-21
- Rosenmund A, Kuyas C, Haeberli A**, 1986: Oxydative radioiodination damage to human lactoferrin. *The Biochemical journal*, 240(1): 239-45
- Ruiz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valvedere I**, 1992: Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides*, 13:13-6
- Ruiz-Grande C, Alarcón C, Alcántara A, Castilla C, López Novoa JM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I**, 1993: Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1. *Horm Metab Res*, 25(12): 612-6

- 
- Schicha H, Schober O (Hrsg.),** 2000: Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung, 4. Auflage, Stuttgart, Schattauer, ISBN 3-7945-1932-9
- Schira J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Göke B, Katschinski M,** 1988: Exendin(9-39)amide is an Antagonist of Glukagon-like Peptide1(7-36)amide in Humans. *J Clin Invest*, 101(7): 1421-30
- Siegel EG, Gallwitz B, Scharf G, Mentlein R, Morys-Wortmann C, Fölsch UR, Schrezenmeir J, Drescher K, Schmidt WE,** 1999: Biological activity of GLP-1-analogues with N-terminal modifications. *Regul Pept*, 79: 93-102
- Singh G, Eng J, Raufman JP,** 1994: Use of  $^{125}\text{I}$ -[Y $^{39}$ ]exendin-4 to characterize exendin receptors on dispersed pancreatic acini and gastric chief cells from guinea pig, *Regulatory Peptides*, 53: 47-59
- Stefanini P, Carboni M, Patrassi N, Basoli A,** 1974: Beta-Islet cell tumors of the pancreas: results of a study on 1,067 cases. *Surgery*, 75(4): 597-609
- Storch V , Welsch U (Hrsg.),** 1999: Kükenthals Leitfaden für das zoologische Praktikum. 23. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Seiten 415 und 417, © Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0901-2
- Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, Holloway HW, Spencer RG, Greig NH, Egan JM,** 2000: Exendin-4 Decelerates Food Intake, Weight Gain, and Fat Deposition in Zucker Rats. *Endocrinology* 141: 1936-41
- Thum A, Hupe-Sondermann K, Göke R Göke B, McGregor GP,** 2002: Endoproteolysis by isolated membrane peptides reveal metabolic stability of glucagon-like-peptide-1 analogs, exendins -3 and -4. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 110: 113-8

- Todd JF, Wilding JP, Edwards CM, Ghatel MA, Bloom SR, 1997:** Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1): a trail of treatment in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*, 27: 533-6
- Tourel C, Bailbé D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B, 2001:** Glukagon-Like Peptide-1 and Exendin-4 Stimulate  $\beta$ -Cell Neogenesis in Streptozotocin-Treated Newborn Rats Resulting in Persistently Improved Glucose Homeostasis at Adult Age. *Diabetes* 50, 1562-70
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JPH, Smith DM, Ghatel MA, Herbert J, Bloom SR, 1996:** A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69-72
- Vella A, Shah P, Basu R, Basu A, Holst JJ, Rizza RA, 2000:** Effect of glucagon-like peptide 1(7-36) amide on glucose effectiveness and insulin action in people with type 2 diabetes. *Diabetes*, 49(4): 611-7
- Virgolini I, Raderer M, Kurtaran A, Angelberger P, Banyai S, Yang Q, Li S, Banyai M, Pidlich J, Niederle B, 1994:** Vasoactive intestinal peptide-receptor imaging for the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors. *N Engl J Med*, 331(17): 1116-21
- Wood WG, Watcher C, Scriba PC, 1981:** Experiences using chloramines-T and 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3  $\alpha$ , 6  $\alpha$ -diphenylglycoluril(Iodogen) for radioiodination of materials for radioimmunoassay. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 19(10): 1951-6
- Wynick D, Williams SJ, Bloom SR 1988** Symptomatic secondary hormone syndromes in patients with established malignant pancreatic endocrine tumors. *N Engl J Med*, 319(10): 605-7

- 
- Xiao Q, Jeng W, Wheeler MB**, 2000: Characterisation of glucagons-like peptide-1 receptor-binding determinants. *J Mol Endocrinol*, 25: 321-35
- Xiao Q, Giguere J, Parisien M, Jeng W, St-Pierre SA, Brubaker PL, Wheeler BM**, 2001: Biological Activities of Glucagon-Like Peptide-1 Analogues in Vitro and in Vivo. *Biochemistry*, 40: 2860-9
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S**, 1999: Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increases beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-6
- Zimmer T, Stölzel U, Liehr RM, Bäder M, Fett U, Hamm B, Wiedenmann B, Riecken EO**, 1995: Somatostatinrezeptor-Szintigraphie und endoskopischer Ultraschall zur Diagnostik von Insulinomen und Gastrinomen. *DMW*, 120(4): 87-93

# 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Auszug aus der Karlsruher Nuklidkarte, eingezeichnet sind die Zerfallswege von $^{123}\text{I}$ , $^{125}\text{I}$ und $^{131}\text{I}$ (e.e.beta+: Elektronen Einfang oder Positronen Emmission, iÜ: isomerer Übergang, Z: Protonenzahl, N: Neutronenzahl)  (Forschungszentrum Karlsruhe, 1996).....	7
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen konventioneller Radioiodierung und Radiometallmarkierung (Behr et al., 2001).....	10
Abbildung 1.3:	Aminosäuresequenz von $^{111}\text{In}$ -DTPA-[D-Phe1]-Octreotid.....	11
Abbildung 1.4:	Szintigraphie mit $^{111}\text{In}$ -Octreotid bei einem 57 jährigen Patienten mit Karzinoid des Dünndarms und Lebermetastasen. Dargestellt sind Ganzkörper- und SPECT-Aufnahmen.....	12
Abbildung 1.5:	a) Situs einer weiblichen Ratte. Der Magen-Darm-Trakt ist entfernt.  b) Situs der Baueingeweide einer männlichen Ratte. Der den Magen bedeckende linke Leberlappen ist hochgeklappt. Omentum majus und cranialer Prostatalappen sind der Klarheit willen nicht dargestellt.  (Storch, Welsch, 1999, mit freundlicher Genehmigung von © Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)  Aus: Kükenthals Leitfaden für das zoologische Praktikum. 23. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Seiten 415 und 417, © Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0901-2.....	20

---

Abbildung 2.1:	Acetonitilkonzentration während der HPLC, Markierter Punkt: erwarteter GLP-1 Peak .....	29
Abbildung 2.2:	Versuchsanordnung bei planaren Aufnahmen.....	35
Abbildung 2.3:	Versuchsanordnung in der 3-Kopf-Kamera .....	36
Abbildung 2.4:	Demonstration der ROI Technik mit Hilfe der verwendeten Auswertungssoftware: Im linken Bild sind ROI um Nieren (1) und Herz (2), im rechten um Blase (1) und Leber (2) gelegt. ....	38
Abbildung 3.1:	HPLC von <sup>123</sup> Iod .....	40
Abbildung 3.2:	Aufreinigung von markiertem GLP-1 mittels HPLC .....	41
Abbildung 3.3:	Aufreinigung von markiertem GLP-1, fehlender Peptid-Peak...	42
Abbildung 3.4:	Aufreinigung von markiertem Exendin3 mittels HPLC.....	43
Abbildung 3.5:	Aufreinigung von markiertem [Y39]-Exendin4 mittels HPLC..	44
Abbildung 3.6:	GLP-1 Markierung nach Aufreinigung auf einer Sephadex PD- 10 Säule .....	45
Abbildung 3.7:	Auftrennung des ersten Peaks gemäß Abbildung 3.6 mittels HPLC.....	46
Abbildung 3.8:	Auftrennung des zweiten Peaks gemäß Abbildung 3.6 mittels HPLC.....	46
Abbildung 3.9:	Exendin3 Markierung nach Aufreinigung auf einer Sephadex PD-10 Säule.....	47
Abbildung 3.10:	Auftrennung des ersten Peaks gemäß Abbildung 3.9 mittels HPLC.....	48
Abbildung 3.11:	Auftrennung des zweiten Peaks gemäß Abbildung 3.9 mittels HPLC.....	48
Abbildung 3.12:	Ultraschallbild eines 1,40 x 1,49 cm messenden Insulinoms im Rattenhinterlauf; ein Monat nach Zelltransplantation.....	50
Abbildung 3.13:	Szintigraphie einer Ratte mit <sup>123</sup> Iod, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag .....	52

Abbildung 3.14:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ od bei zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag.....	53
Abbildung 3.15:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -GLP-1, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag .....	54
Abbildung 3.16:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag.....	55
Abbildung 3.17:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag .....	55
Abbildung 3.18:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor und unmarkiertem Peptid, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag.....	56
Abbildung 3.19:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag..	57
Abbildung 3.20:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 bei zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag .....	58
Abbildung 3.21:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag..	58
Abbildung 3.22:	Szintigraphie einer Ratte mit $^{123}\text{I}$ -[Y39]-Exendin4 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und unmarkiertem Peptid, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 Minuten und am nächsten Tag.....	59
Abbildung 3.23:	Aktivitätsverteilung über der gesamten Ratte .....	62

---

Abbildung 3.24:	Aktivitätsverteilung über dem Bereich des Thorax (ohne Herz / Mediastinum).....	63
Abbildung 3.25:	Aktivitätsverteilung über dem Bereich des Herzens und des mittleren bis unteren Mediastinums .....	64
Abbildung 3.26:	Aktivitätsverteilung über dem Bereich des rechten Oberbauchs	65
Abbildung 3.27:	Aktivitätsverteilung über dem Bereich des linken Oberbauchs .	66
Abbildung 3.28:	Aktivitätsverteilung über dem Bereich beider Nieren.....	67
Abbildung 3.29:	Aktivitätsverteilung über dem Bereich des Unterbauchs (ohne Blase).....	68
Abbildung 3.30:	Regressionsgerade einer 2-Phasen-Kinetik über der Region Herz / Mediastinum mit den tatsächlichen Messpunkten.....	70
Abbildung 3.31:	SPECT-Aufnahmen einer Ratte in coronarer Schnittführung nach Injektion von <sup>123</sup> I-GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat und DP IV-Inhibitor .....	71
Abbildung 3.32:	SPECT-Aufnahmen einer Ratte in coronarer Schnittführung nach Injektion von <sup>123</sup> I-GLP-1 bei zusätzlicher Gabe von Irenat, DP IV-Inhibitor und unmarkiertem Peptid.....	71
Abbildung 3.33:	Szintigraphie einer tumortragenden NEDH Ratte mit <sup>123</sup> Iod-[Y39]-Exendin4 und zusätzlicher Gabe von Irenat, Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40, 60 und 120 Minuten. Der Tumor befindet sich im linken Hinterlauf. Die Anreicherung im Schwanz der Ratte ist ein Artefakt durch paravasal injizierten Tracer.....	72
Abbildung 3.34:	Szintigraphie einer tumortragenden NEDH Ratte mit <sup>123</sup> Iod-Exendin3; Auf eine Gabe von Irenat wurde verzichtet. Aufnahmen nach 5, 10, 15, 20, 40 und 60 Minuten. Der Tumor befindet sich im rechten Hinterlauf. ....	73
Abbildung 4.1:	Darstellung eines vereinfachten pharmakologischen Kompartimentenmodells .....	78

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Sensitivität verschiedener Diagnostischer Methoden zur Lokalisation von Insulinomen (aus: Jensen, Norton, 1999).....	4
Tabelle 1.2:	Aminosäuresequenzen von GLP-1(7-36)amid, Exendin3 und Exendin4. Die homologen Aminosäuren sind jeweils unterstrichen. .....	18
Tabelle 2.3:	RINm-5F Kulturmedium.....	32
Tabelle 2.4:	Verteilung der Ratten im Szintigraphie Versuch .....	33
Tabelle 2.5:	Aufnahmeprotokoll der planaren Aufnahmen.....	34
Tabelle 2.6:	Verteilung der Ratten im SPECT Versuch.....	36
Tabelle 3.1:	Halbwertszeiten des schnellen Anteils der 2-Phasen-Kinnetik über der Region Herz / Mediastinum .....	69

## 8 Abkürzungsverzeichnis

APUD	amine precursor uptake and decarboxylation
AS	Aminosäure(n)
beta-	radioaktiver Zerfall mit Emission eines Elektrons
Bq	Becquerell, SI-Einheit für die Aktivität einer radioaktiven Substanz. 1 Bq ist die Aktivität einer Strahlungsquelle, bei der pro Sekunde im Mittel ein Atomkern eines radioaktiven Nuklids zerfällt:  $1[\text{Bq}] = 1 [\text{s}^{-1}]$ (Meyers Lexikonredaktion, 1999).
CCK-B	Cholezystokinin-B
Ci	Curie, alte Einheit der Aktivität 1 Ci = 37 GBq
DFO	Desferrioxamine
DOTA	Tetra-azacyclododecan-N,N',N'',N'''-tetra-acetat
DOTATOC	DOTA-Tyr <sup>3</sup> -Octreotid (Verwendung in der Radio-Therapie)
DP IV	Dipeptidyl-peptidase IV
DTPA	Diethylen-triamin-pentaacetat
e.e.beta+	Elektronen Einfang oder Positronen Emission
GLP-1	Glukakon like Peptide 1
HPLC	high pressure oder high performance liquid chromatography
i.v.	intravenös
IGF	Insulin like Growthfactor
iÜ	isomerer Übergang

eV	Elektronenvolt, Einheit der Energie in der Atomphysik
MAG <sub>3</sub>	Mercaptoacetyltriglycin
N	Anzahl der Neutronen im Atomkern
MEN	multiple endokrine Neoplasie
NEDH	New England Deaconess Hospital, Boston USA, Ursprung des Rattenstamms
PP	Pankreatisches Polypeptid
ROI	Region of Interest (siehe Kapitel 2.2.3.4)
s.c.	subkutan
SMS	Somatostatin
SPECT	single photon emission computer tomography
TFA	Trifluoressigsäure
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
Z	Anzahl der Protonen im Atomkern

## **9 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer**

**Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren:**

**an der Philipps-Universität Marburg:**

Arnold; Aumüller; Barth; Basler; Baum; Behr; Bertalanffy; Bien; Bolm; Brilla; Cetin; Czubayko; Daut; Donner-Banzhoff; Effendy; Engel; Engenhardt-Cabillic; Fehmann; Feuser; Fruhstorfer; Fuhrmann; Gemsa; Geus; Görg; Gotthardt; Gotzen; Grau; Gressner; Griss; Groß; Grzeschik; Happle; Hartung; Hasilik; Hellinger; Hesse; Höltermann; Hoffmann; Jaques; Joseph; Kälble; Kern; Kleine; Klenk; Klose; Köhler; Konermann; Koolman; Kretschmer; Krieg; Kroll; Lammel; Lang; Lange; Lemberg; Lennartz; Maisch; McGregor; Mogck; Moll; Moosdorf; Mueller; Mutters; Nies; Oertel; Penzel; Peter; Petermann; Pfab; Radsak; Rawert; Remschmidt; Richter; Röhm; Rosenow; Rothmund; Schachtschabel; Schäfer; Schlegel; Schmidt; Schneider; Schönhofer; Schüffel; Schuermann; Schulz; Schwarz; Seifart; Seitz; Seyberth; Slencka; Sommer; Steiniger; Stiletto; Stempel; Sturm; Vohland; Voigt; Wagner; Walther; Weihe; Werner; Westermann; v. Wichert; Wilhelm

**an der Mbarara University of Science and Technology, Mbarara, Uganda:**

El Baz, Elsholz, Gaung, Herpay

**am Coventry and Warwickshire University Teaching Hospital, Coventry, England:**

Al-Dabbagh, Aldrige, Bormann, Cherry, Clegg, Spalding, Wade

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt meinen Doktorvätern, Herrn Prof. Dr. Joseph, der mir mit hilfreichen Gesprächen geholfen hat, systematische Fehler während meiner Experimente zu vermeiden und Herrn Prof. Dr. Behr, der diese Arbeit weitergeführt hat. Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Gotthardt, der mir in schwierigen Zeiten immer zur Seite stand und mich immer wieder motivieren konnte. Er half mir, die verschiedenen Probleme, die im Laufe meiner Arbeit auftraten, zu bewältigen und wir haben in dieser Zeit ein freundschaftliches Verhältnis entwickelt.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für Nuklearmedizin, allen voran Frau Pollum, Herrn Dipl.-Phys. Schurrat und Herrn Dipl.-Phys. Fritsch; außerdem Herrn Dipl.-Chem. Dr. Béhé für viele gute Ratschläge und das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jungclas danke ich für die guten Ausführungen in Radiophysik und die Hilfen zur Berechnung der Kinetiken, bei denen mich auch Herr Dipl.-Phys. Dr. Barth unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Czubayko und Herrn Mallertscheck für die Erklärungen aus pharmakologischer Sicht.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Forschungsbereichs III, allen voran Herrn Demant, Herrn Schmidt und Frau PD Dr. Lankat-Buttgereit für die Unterstützung bei den Tierexperimenten und die Hilfe bei Problemen im Labor. Herrn Prof. McGregor und Herrn Stöckert danke ich für die Einführung in die Peptidmarkierung. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Donner-Banzhoff für die Beantwortung meiner Fragen zur Statistik und Herrn Prof. Dr. Bartenstein aus der Klinik für Nuklearmedizin der Universität Mainz, der es mir ermöglichte in seiner Abteilung Daten auszuwerten und mir damit lange Wege ersparte.

Nicht zuletzt gilt der Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Verlobten, Frau Dr. Anke Dittmar, die mich stets motiviert haben und mir mit vielen Tipps und Ratschlägen jederzeit zur Seite standen.