

Whole Tumor Histogram-profiling of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Images reflects tumorbiological features of Primary Central Nervous System Lymphoma

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

Eingereicht von: Benno Jürgen Helmut Münch

Geburtsdatum/Geburtsort: 04.07.1991 in Berlin

Angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
am Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer: Prof. A. Surov

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.05.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung

1.1 Einleitung	1
1.2 Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems	
1.2.1 Epidemiologie	2
1.2.2 Pathologie	3
1.2.3 Klinik	3
1.2.4 Diagnostik	4
1.2.5 Therapie	5
1.2.6 Prognose	7
1.3 Magnetresonanztomographie und primäre Lymphome des ZNS	
1.3.1 Einführung	7
1.3.2 Diffusion Weighted Imaging	8
1.3.3 Apparent Diffusion Coefficient (ADC) und Malignome	9
1.3.4 DWI/ADC und primäre Lymphome des ZNS	11
1.4 Einordnung	13

2. Publikationsmanuskript

Whole Tumor Histogram-profiling of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Images reflects tumorbiological features of Primary Central Nervous System Lymphoma

3. Zusammenfassung

4. Literaturverzeichnis

5. Darstellung des eigenen Beitrags	29
6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	34
7. Lebenslauf	35
8. Danksagung	37

1.1 Einführung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem klinischen Krankheitsbild der primären Lymphome des zentralen Nervensystems (primary central nervous system lymphoma - PCNSL) und der bildgebenden Diagnostik derselben.

Bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts konnten Rückschlüsse auf zugrunde liegende Prozesse bei neurologischen Auffälligkeiten alleine durch klinische Testungen und Untersuchungen gezogen werden. In der Vorstellung der Krankheitsbilder waren post mortem durch (histo)pathologische Untersuchungen gewonnene Erkenntnisse entscheidend, präoperativ konnte sich der behandelnde Chirurg alleine klinisch eine Vorstellung von Lokalisation und Größe intracranieller Läsionen machen. Ebenso verblieb der medikamentösen Therapie nur die klinische und dann gegebenenfalls pathologische Verlaufskontrolle, um die Wirksamkeit und Effektivität einer Behandlung zu bewerten. Dies wandelte sich radikal mit der Entwicklung der Computertomographie (CT) sowie der Magnetresonanztomographie (MRT). Hierdurch wurde es mit fortschreitender Forschung und Entwicklung über die Jahrzehnte möglich, intracranielle Prozesse immer genauer zu beschreiben. Es konnten differenzialdiagnostische Krankheitsbilder unterschieden werden, der Progress von Raumforderungen dargestellt werden, der operative und konservative Behandlungserfolg gezeigt und Vorstellungen über die Prognose von klinischen Auffälligkeiten entwickelt werden. Dies alles ohne invasive Eingriffe in das Gewebe von Patient*innen, was mit der Eleganz der Methoden und ihrer heutigen großen Verbreitung in sowohl der stationären als auch ambulanten Krankenversorgung zu vollkommen anderen Möglichkeiten in Diagnostik und Therapie geführt hat. Nichtsdestotrotz ist noch kein Ende der Entwicklungen in diesem Feld abzusehen. Durch beispielsweise immer feinere Auflösung von Unterschieden im Gewebe, Darstellungen von molekularen Prozessen oder der Reduzierung strahleninduzierter Belastung von Gewebe wird die Technik stets fortentwickelt, werden neue Klassifikationen für Läsionen aufgestellt, werden neue Therapieregime und diagnostische Vorstellungen erdacht, erprobt und schließlich ihrer klinischen Anwendung zugeführt.

Ein Krankheitsbild, welches hierbei im Fokus der (neuro)radiologischen Forschung stand und steht, sind die primären Lymphome des zentralen Nervensystems. Lange Zeit konnte diese Krankheitsentität alleine histopathologisch durch Aufarbeitung von Operationsresektaten beschrieben werden. Im Laufe der Zeit konnte dann eine immer genauere Differenzierung und differenzialdiagnostische Einordnung vor allem durch Entwicklungen im Bereich der Magnetresonanztomographie erreicht werden. Die endgültige Diagnosesicherung ist jedoch noch immer eine invasive mittels Hirnbiopsie. Zur Entwicklung in Richtung einer immer sichereren Diagnostik und auch Prognoseabschätzung, Therapieverlaufskontrolle oder weiteren Klassifikation mittels nicht invasiver bildgebender Diagnostik wurden viele Anstrengungen und Forschungen unternommen. Einen dieser Schritte möchte die vorliegende Arbeit aufzeigen. Mittels spezieller

MRT-Untersuchungen, der sogenannten diffusionsgewichteten Bildgebung (Diffusion Weighted Imaging - DWI), können Auffälligkeiten im Gewebe anhand von bildgebenden Parametern beschrieben werden. Die Korrelationen dieser gewonnenen Parameter mit Eigenschaften des Gewebes in der histopathologischen Untersuchung waren der Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Studie. Hierdurch wird die Forschung im Bereich der bildgebenden Diagnostik von primären Lymphomen des zentralen Nervensystems um einen weiteren Schritt in Richtung einer genaueren Differenzierungsmöglichkeit erweitert. Zudem können die hier gewonnenen Erkenntnisse in der Zukunft gegebenenfalls auch auf andere Tumorentitäten angewandt werden. Zur Hinführung in diese Thematik werde ich zunächst eine allgemeine Einführung und Charakterisierung des Krankheitsbildes der primären Lymphome des zentralen Nervensystems geben, in einem zweiten Abschnitt stelle ich die Möglichkeiten der Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie genauer dar. Hiernach werde ich noch eine kurze Einordnung der durchgeführten Studie vornehmen.

1.2 Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems

1.2.1 Epidemiologie

Lymphome des zentralen Nervensystems (PCNSL) sind eine seltene Untergruppe mit einer Häufigkeit von circa 5% innerhalb aller neu diagnostizierten primären Hirntumore [1]. Innerhalb der Gruppe der Lymphome sind PCNSL der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome zuzuordnen, hier zeigen sie eine Häufigkeit von 1-2% [2].

Das durchschnittliche Alter von immunkompetenten Patient*innen bei Diagnosenstellung beträgt 60 Jahre, mit zunehmenden Alter steigt die Inzidenz der Krankheitsentität [1].

Innerhalb der letzten 30 Jahre konnte ein rapider Anstieg der Fallzahlen an PCNSL verzeichnet werden. Dieser Anstieg betraf sowohl die Gruppe der immunkompetenten Patient*innen als auch die Gruppe der Patient*innen mit Einschränkungen des Immunsystems [3].

Hervorzuheben sind hier vor allem der Anstieg der mit HIV infizierten Patient*innen seit den 1980er Jahren. Das Risiko für die Entwicklung eines PCNSL durch eine HIV-Infektion ist hierbei um bis zu das 3600fache erhöht. Nach Einführung der hochaktiven anti-retroviralen Therapie (HAART) bei HIV-Patient*innen konnte eine Stabilisierung der Inzidenzzahlen von PCNSL innerhalb dieser Patient*innengruppe im letzten Jahrzehnt beobachtet werden [4]. Innerhalb der Gruppe der älteren Patient*innen dagegen wurde ein weiterer Anstieg der Inzidenzzahlen auch in den letzten Jahren beschrieben [5].

1.2.2 Pathologie

Die histopathologische Aufarbeitung von Operationsresektaten beziehungsweise bioptisch gewonnenen Materials hat in der Diagnostik und Therapie von PCNSL einen sehr hohen Stellenwert. Mit feingeweblichen Untersuchungen lässt sich ein Lymphom von anderen intracraniellen Prozessen sicher unterscheiden und somit adäquat behandeln .

Primäre Lymphome des ZNS lassen sich der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome zuordnen. Innerhalb dieser Gruppe lassen sich bis zu 90% als großzellige B-Zell-Lymphome (Diffuse Large B-Cell Lymphom - DLBCL) beschreiben. Die verbliebenen Anteile werden als Burkitt-, low-grade- oder T-Zell-Lymphome klassifiziert [4].

In der mikroskopischen Untersuchung der DLBCL als häufigste Subgruppe der PCNSL imponieren diese als große Blastenzellen mit pleomorphen Zellkernen und einzelnen oder auch mehreren differenzierten Nucleoli. Oft ist dies begleitet von reaktiven kleinzelligen T-Zell-Lymphozyten, welche die Abgrenzung zu einem entzündlichen Geschehen erschweren können. Das Tumorgewebe zeigt eine hohe zelluläre Dichte, welche als Hinweis auf die hohe proliferative Aktivität mit erhaltener replikativer Immortalität des PCNSL gewertet wird. Die Zellen exprimieren typische Zellmarker der B-Zell Reihe wie CD 19, CD 20 und CD 79a sowie PCNSL typische Biomarker wie das Multiple Myeloma Oncogene 1 (MUM1) und das B-Cell Lymphom 6 Protein (BCL6). Insbesondere in die Untersuchung des BCL6 Biomarkers wurden hierbei Hoffnungen bezüglich einer Prognosenabschätzung gesetzt, diese konnten bisher jedoch nicht erfüllt werden [6].

Als Marker der proliferativen Aktivität in Lymphomen ist das Protein Ki-67 identifiziert worden, welches in verschiedenen Lymphom-Subgruppen zudem Hinweise bezüglich einer Prognosenabschätzung erlaubt [7].

1.2.3 Klinik

Anhand der klinischen Symptomatik ist ein PCNSL nur schwer von differentialdiagnostisch zu bedenkenden intracerebralen Prozessen zu unterscheiden. Wenige Patient*innen zeigen zusätzlich zu neurologischen Symptomen systemische Begleiterscheinungen. Hierbei sind vor allem eine B-Symptomatik, bestehend aus Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß sowie gastrointestinale Beschwerden beschrieben worden [3].

Bis zu 70% der Patient*innen werden auffällig mit fokalen neurologischen Defiziten, welche zu einer schnellen bildgebenden Diagnostik führen. 48% der Patient*innen zeigen

neuropsychiatrische Auffälligkeiten, welche aufgrund der unspezifischen Veränderungen zu einer verzögerten medizinischen Versorgung beitragen können. Wenige Patient*innen (ca. 14%) entwickeln im Verlauf der Erkrankung fokale oder generalisierte Krampfanfälle. Zudem wurden in 4% der Fälle Einschränkungen im Sehvermögen beschrieben, hierbei vor allem Mouches volantes, verschwommenes Sehen oder schmerzhafte gerötete Augen. Trotz der geringen Häufigkeit von Patient*innen mit okulärer Symptomatik wird in bis zu 20% der Fälle von einer okulären Mitbeteiligung durch die PCNSL ausgegangen [8].

1.2.4 Diagnostik

In der Diagnostik von PCNSL steht bei klinischen Verdacht zunächst die zerebrale Bildgebung im Vordergrund. Hierbei ist die Durchführung eines MRT des Neurcraniums mit Kontrastmittel zu veranlassen, falls dies nicht möglich ist, kann auf eine Computertomographie mit Kontrastmittel zurückgegriffen werden.

Bei immunkompetenten Patient*innen zeigen sich PCNSL hierbei im allgemeinen als iso- bzw. hypointens in der T2-Wichtung. In der Computertomographie erscheinen die Läsionen iso- oder hyperdens. Bei Kontrastmittelapplikation ist ein homogenes Anreicherungsmuster zu beobachten, in circa 1% der Fälle fehlt eine Anreicherung nach Kontrastmittelgabe. In 65% der Fälle zeigt sich ein PCNSL solitär, in 35% ist jedoch eine multilokuläre Verteilung zu beschreiben. Anatomisch ist die häufigste Lokalisation für das Krankheitsbild die Großhirn-Hemisphäre (38%), es folgen die Basalganglien (16%), das Corpus callosum (14%), das Ventrikelsystem (12%) sowie in 9% der Fälle das Kleinhirn [4].

In der Bildgebung unterscheiden sich die Befunde bei immunsupprimierte Patient*innen in einigen Punkten: So sind die Läsionen in bis zu 60% der Fälle multifokal zu finden, zudem zeigen sie sich mit einem im Durchschnitt geringeren Durchmesser [9]. Desweiteren treten innerhalb der Läsionen Nekrosezonen auf, welche sich durch ringförmige sowie heterogene Aufnahme von Kontrastmittel darstellen [1].

Durch die konventionelle MRT Bildgebung können so detaillierte Informationen z.B. über die Lokalisation, perifokale Ödeme und die Ausdehnung der Läsionen gewonnen werden. Differentialdiagnostisch ist die Abgrenzung dieser Befunde zu demyelinisierenden Prozessen, anderen primären zerebralen Tumoren oder Schlaganfällen oft schwierig [8].

Zur weiteren Differenzierung der Läsionen steht zudem die Technik der diffusionsgewichteten Bildgebung zur Verfügung (Diffusion Weighted Imaging - DWI). Auf diese werde ich in einem gesonderten Teil eingehen.

Bestätigt sich durch die Anamnese sowie Bildgebung weiter der Verdacht auf ein PCNSL, erfolgt zur weiteren Sicherung eine stereotaktische oder navigationsgestützte Biopsie der Läsion mit anschließender histopathologischer Aufarbeitung des gewonnenen Materials. Für die Vermeidung von falsch negativen Ergebnissen aufgrund der lymphotoxischen Wirkung ist hierbei der Verzicht auf eine präoperative Gabe von Corticosteroiden essentiell, solange die Gabe dieser nicht bei lebensbedrohlichem raumfordernden Aspekt indiziert ist [8].

Im Rahmen der weiteren klinischen Diagnostik werden zudem die Durchführung eines HIV-Tests sowie eine ophthalmologische Mitbeurteilung mittels Spaltlampenuntersuchung und Fundoskopie angeraten. Desweiteren sollte bei Fehlen von Kontraindikationen eine diagnostische Lumbalpunktion mit Veranlassung von Zytologie sowie Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie erfolgen [5].

Bei gesicherter Diagnose eines Lymphoms ist im Anschluß ein Staging des gesamten Körpers zum Ausschluss einer systemischen Erkrankung mit sekundärer Infiltration des ZNS vonnöten. Nach Empfehlung der International PCNSL Collaborative Group wird hierzu die Durchführung eines PET-CT und eine Knochenmarksbiopsie angeraten [10]. Sollte dies nicht möglich sein, ist als Alternative die Durchführung einer CT-Staging Untersuchung des Thorax, Abdomens sowie Beckens mit ergänzender Ultraschall-Untersuchung der Hoden möglich [8].

1.2.5 Therapie

In der Therapie des primären Lymphoms des ZNS wurden im Laufe der Zeit verschiedene Therapieregime erprobt.

Aktuell besteht Einigkeit über die Notwendigkeit des frühestmöglichen Beginns einer Induktionschemotherapie mit dem Ziel einer kompletten Remission des Tumors, sowie darauffolgend eine Erhaltungstherapie zur Eliminierung von verbleibenden mikroskopischen Läsionen und zur Vorbeugung eines Rezidives [8].

Als Chemotherapeutikum der ersten Wahl hat sich hierzu Methotrexat herausgestellt. Dieses ermöglicht in hochdosierter Gabe eine Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke [11] und zeigte eine signifikante Ansprechrate bei intrazerebralen Lymphomen [12]. Eine Kombination mit Rituximab, einem monoklonalen Anti-CD 20 Antikörper erscheint hierbei im Moment am erfolgsversprechendsten [8]. Die Erweiterung der Chemotherapie um Cytarabine, einem zytostatisch wirksamen Antimetaboliten, Thiotepa, einem alkylierenden Zytostatikum, Procarbazin, ebenfalls ein Alkylans, Vincristin, ein Mitosehemmstoff, oder Temozolomid, ebenfalls alkylierend wirksam, wird zur Zeit in verschiedenen Studien untersucht. Eine abschließende Beurteilung

bezüglich einer zu präferierenden Chemotherapie-Kombination sowie einer Dosisempfehlung steht zur Zeit noch aus [8].

Eine weitere Ergänzung der verschiedenen Chemotherapie-Regime bietet die autologe Stammzelltransplantation, welche jedoch stark von dem allgemeinen klinischen Zustand und den Komorbiditäten der Patient*innen abhängig ist. In Studien konnten hier eine Ansprechrate von über 90% und ein progressionsfreies Überleben von mehr als 74 Monaten erreicht werden [13, 14].

In der Vergangenheit konnte mittels Ganzhirn-Bestrahlung (whole brain radiation therapy - WBRT) eine sehr gute Ansprechrate bei PCNSL erreicht werden. Das Langzeit-Überleben nach alleiniger WBRT zeigte sich jedoch insbesondere im Vergleich zur Langzeitüberlebensraten unter Polychemotherapie nur geringfügig gesteigert [15]. Vor allem die Nebenwirkungen einer WBRT in Form der Neurotoxizität, hierbei insbesondere der kognitive Abbau, Inkontinenz und Gleichgewichtsstörungen, trugen außerdem zu einer verringerten Compliance der Patient*innen bei [16]. In aktuellen Therapieempfehlungen wird daher derzeit Abstand genommen von der WBRT bei PCNSL.

Mit der alleinigen neurochirurgischen Resektion der Läsion konnte ein durchschnittliches Überleben der Patient*innen für 1-4 Monate erreicht werden kann [4]. Diese eingeschränkte Prognose wurde erklärt durch die tiefe Infiltration des Gewebes sowie ein multifokales Auftreten des Tumors. Auch wenn sich der Tumor nur auf eine Läsion beschränkt, konnte in Autopsie-Studien eine Infiltration von Tumorzellen im bildmorphologisch unauffälligen Hirngewebe nachgewiesen werden [17].

Im retrospektiven Vergleich zwischen Patient*innengruppen, welche zum einen vor Beginn einer multimodalen Radiochemotherapie eine chirurgische Resektion, zum anderen eine bioptische Sicherung der Läsion erhalten haben, wurde kontrovers diskutiert, ob eine Resektion zu einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens beiträgt. Eine Studie [18] sah hierbei den Vorteil sowohl im Parameter des progressionsfreien Überlebens als auch im Gesamtüberleben bestätigt, von anderen Untersuchungen [8] wurde dies auf den Parameter des progressionsfreien Überlebens relativiert. Die aktuellen Leitlinien spiegeln diesen Konflikt wider und sprechen in diesem Punkt keine Empfehlung aus [5].

Aufgrund einer hohen Rezidiv-Wahrscheinlichkeit bei Patient*innen mit PCNSL werden regelmäßige MRT-Kontrollen nach Abschluss der Behandlung für notwendig erachtet. Im Falle eines Rezidives stehen dabei bisher noch keine etablierten Therapieregime zur Verfügung. Verschiedene medikamentöse Ansätze werden hierbei verfolgt, aktuell beispielsweise im Bereich der Immuntherapie mit Nivolumab [19] sowie im Bereich der Targeted Therapy beispielsweise mit Ibrutinib [20].

1.2.6 Prognose

Die mediane Überlebenszeit von Patient*innen mit PCNSL hat sich seit den 1970er Jahren von 12,5 Monaten auf heutzutage 26 Monate mehr als verdoppelt [21]. Jedoch nimmt dieser Fortschritt die Gruppe der über 70jährigen Patient*innen aus, welche in diesem Zeitraum keine Verbesserung der Lebenszeit erreichen konnten. Dies wird zurück geführt auf die mangelnde Einbindung von älteren Patient*innen in Studien sowie die aufgrund von Komorbiditäten eingeschränkte Möglichkeit von intensiven Therapieregimen.

Nach dieser Einführung zu den primären Lymphomen des zentralen Nervensystems werde ich nun genauer auf die bildgebende Diagnostik bei diesem Krankheitsbild eingehen, hierbei vor allem auf die Möglichkeiten der Magnetresonanztomographie. Zunächst werde ich einen Überblick über die Entwicklung, Grundlagen und die Möglichkeiten der MRT im Allgemeinen geben, darauffolgend stelle ich das Diffusion Weighted Imaging mit seinen klinischen Anwendungsmöglichkeiten insbesondere bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems vor.

1.3 Magnetresonanztomographie und primäre Lymphome des zentralen Nervensystems

1.3.1 Einführung

Das Prinzip der kernmagnetischen Resonanz wurde erstmalig von Bloch und Purcell in den 1940er Jahren beschrieben und hatte lange nur einen Platz in der chemischen Analytik als MR-Spektroskopie [48]. Seit den 1980er Jahren wurden zunehmend die Möglichkeiten der Kernmagnetresonanz in der medizinischen Bildgebung erkannt und weiterentwickelt.

Hierbei wird sich das Prinzip der Kernresonanz zunutze gemacht, in den meisten klinischen Anwendungsbereichen bezogen auf Wasserstoffkerne. Diese werden durch das Anlegen eines

starken äußeren Magnetfelds ausgerichtet. Dann erfolgt die Einstrahlung eines hochfrequenten Radiowellenimpulses, welcher zu einer Anregung der Wasserstoffkerne mit Erreichen eines höheren Energiezustandes führt. Dieser höhere Energiezustand wird nur für geringe Zeit beibehalten, bevor die Wasserstoffkerne wieder in ihren Ausgangszustand zurückkehren. Während dieses als Relaxation bezeichneten Prozesses geben die Wasserstoffkerne die Energie in Form von Radiowellen wieder ab, welche nun durch Detektoren registriert und dann ausgewertet werden können.

Hierbei können verschiedenste Messprotokolle für unterschiedliche Fragestellungen angewendet werden. Oft betrachtete Variablen sind hierbei die longitudinale Relaxationszeit T1 und transversale Relaxationszeit T2. Eine oft genutzte Sequenz ist beispielsweise die sogenannte Fluid-Attenuated Inversion Recovery (FLAIR), welche mit der Unterdrückung des Relaxationssignals von Wasser/Liquor arbeitet.

Zur weiteren Differenzierung der bildgebenden Befunde wird zudem die intravenöse Applikation von Kontrastmittel genutzt. Zur Anwendung kommen hierbei paramagnetische Substanzen, welche zu Veränderungen des Relaxationsprozesses im Gewebe führen. Auffallend in der Bildgebung des Neurocraniums werden hierdurch vor allem Prozesse, welche zu einer Veränderung der Blut-Hirn-Schranke führen oder hirn fremde Strukturen, welche keine Blut-Parenchym-Schranke besitzen. Die am häufigsten genutzte Substanz ist hierbei Gadolinium, welches an sich jedoch eine hohe Gewebs-Toxizität aufweist, weswegen es durch einen organischen Liganden, beispielsweise Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA), umschlossen wird. In dieser Form ist das Kontrastmittel bei Fehlen von Allergien und bei erhaltener Nierenfunktion sehr gut verträglich.

1.3.2 Diffusion Weighted Imaging

Für die Darstellung von mikroskopischen Bewegungen mittels MRT-Bildgebung von Wasserstoffmolekülen existiert das Prinzip der diffusionsgewichteten Sequenzen (Diffusion Weighted Imaging - DWI). Die Entwicklung dieser Technik wurde seit den 1980er Jahren vorangetrieben durch zum Beispiel die Arbeit von Le Bihan et. al, Stejskal und Tanner sowie Chenevert et al [22]. Hierbei wird sich das Prinzip der Diffusion zu Nutzen gemacht - Wasserstoffkerne diffundieren aufgrund ihrer thermischen Energie stets im Rahmen der Brownschen Molekularbewegung. Im menschlichen Gewebe werden dieser freien Diffusion Einschränkungen beispielsweise in Form zellulärer Strukturen oder Makromolekülen entgegengesetzt. Ziel der diffusionsgewichteten Bildgebung ist, durch die Beobachtung dieser Einschränkungen Rückschlüsse auf das betrachtete Gewebe ziehen zu können.

Dies geschieht durch das Anlegen von Gradientenfeldern, welche eine Ortsveränderung der Wasserstoffmoleküle sichtbar machen können. Je nach dem zeitlichen Abstand des Anlegens der

Gradientenfelder erfolgt nun bei sehr kurzen Messungen noch eine freie Diffusion der Wasserstoffkerne, bei längerem zeitlichen Intervall zeigt sich die Einschränkung der Bewegung durch z.B. zelluläre Strukturen. Dieser Vorgang wird mit dem scheinbaren Diffusionsgradienten (Apparent Diffusion Coefficient - ADC) beschrieben.

Zur Verdeutlichung der Dimensionen dieser Messungen: In reinem Wasser mit einer Temperatur von 37° Celsius bewegt sich ein Wassermolekül innerhalb von 50 Millisekunden ungefähr 30 Mikrometer [23]. Da dies ungefähr der Größe zellulärer Strukturen im menschlichen Gewebe entspricht, wird das Wassermolekül in dieser Zeit mit z.B. Zellmembranen oder Makromolekülen in Kontakt treten, was durch Beeinträchtigung der Wasserbewegung zu einer um ein Vielfaches niedrigeren scheinbaren Diffusion führt und somit Rückschlüsse auf die Mikroarchitektur zulässt [22].

Ein großes Anwendungsgebiet der diffusionsgewichteten Sequenzen ist die Frühdiagnose des Hirninfarkts, bei dem bereits Minuten nach dem Ereignis Störungen der Diffusion im Gewebe nachweisbar sind. Diese Störungen werden durch den Ausfall der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpen ausgelöst, wodurch extrazelluläre Flüssigkeit in die Zellen einströmt. Hierdurch können bereits in der Frühphase eines Schlaganfalls bildgebende Korrelate für eine klinische Symptomatik dargestellt werden, wodurch eine rasche Entscheidung bezüglich gegebenenfalls möglicher Therapien getroffen werden kann [24].

Zudem wird das oben beschriebene Prinzip zur Rekonstruktion des Verlaufs von Nervenbündeln genutzt. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass sich Moleküle entlang von Axonen der Nervenzellen ungehinderter bewegen können, die Richtung des größten Diffusionskoeffizienten also die Richtung von Nervenfasern widerspiegelt. Hierdurch kann vor neurochirurgischen Eingriffen abgeschätzt werden, inwieweit beispielsweise durch eine Tumorsektion neurologische Funktionsverluste zu erwarten sind.

1.3.3 Apparent Diffusion Coefficient (ADC) und Malignome

Ein weiterer wichtiger Bereich ist jedoch auch die Differenzierung neoplastischer Läsionen mittels diffusionsgewichteter Sequenzen.

Eine erste Anwendung in diesem Bereich ist die Korrelation zwischen ADC-Werten und der Gewebe-Architektur. Malignome unterscheiden sich auf zellulärer Ebene von umliegenden physiologischem Gewebe oder auch benignen Läsionen durch größere Zellkerne, ein sehr Zellorganellen reiches Stroma sowie insgesamt eine höhere Zellzahl, wodurch eine höhere Zelldichte (Zellularität) bedingt ist [25]. Die Diffusion von Wasser in diesem Gewebe zeigt sich stark eingeschränkt, da das Verhältnis zwischen extrazellulärem Raum und intrazellulärem Raum sich

zugunsten des letzteren verschoben zeigt [26]. Dies wird klassischerweise beschrieben als inverse Korrelation zwischen dem ADC-Wert und der Zellularität, Einflüsse auf den ADC-Wert sind hierbei jedoch zudem durch z.B. extrazelluläre Fibrosen, Besonderheiten in der mikroskopischen Architektur der Interzellularräume oder Wachstumscharakteristika der Malignome beispielsweise bei glandulärer Organisation gezeigt worden [22].

Diese Annahme unterstützend konnte zum Beispiel bei Leberläsionen eine Differenzierung zwischen benignen und malignen Raumforderungen mittels ADC-Wert gezeigt werden - benigne differenzierte Strukturen zeigten signifikant höhere ADC-Werte als die als maligne differenzierten [27]. Ebenso ergaben Messungen der ADC Werte von Raumforderungen im Bereich der Mamma signifikante Unterschiede, so wurden beispielsweise bei malignen Läsionen in Studien niedrigere ADC Werte im Vergleich zu benignen Tumoren oder physiologischem Brustgewebe nachgewiesen [28].

Bei der Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und physiologischem Gewebe kann ebenfalls die Einbeziehung der ADC-Werte einen differenzialdiagnostischen Nutzen bringen. So wurden bei der Beurteilung von pathologischen Frakturen in der Wirbelsäule, in diesem Sinne also durch Malignome bzw. Metastasen bedingte Frakturen, niedrigere ADC Werte als bei benignen Ursachen einer Fraktur gemessen [29].

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des Apparent Diffusion Coefficient besteht in der Evaluierung der Therapieantwort bei Gabe von Chemotherapeutika. In vielen Malignomen besteht hierbei eine Korrelation zwischen einem Ansteigen der ADC Werte und einem erfolgreichen Ansprechen auf eine Therapie. Dies konnte beispielsweise für Mamma-Carcinome [30], Lebertumore [31] oder auch Sarkome [32] gezeigt werden.

Zudem wurde die Korrelation zwischen der Prognose von Malignomen und der Bewertung der ADC Werte untersucht. Hier konnte für Rektumkarzinome eine starke negative Korrelation zwischen dem Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung und somit dem Therapieerfolg und den ADC Werten im Tumor vor Beginn der Behandlung nachgewiesen werden [33]. Dies wurde unter anderem pathophysiologisch damit begründet, dass Tumore mit hohen ADC Werten vermehrt Zonen mit nekrotischer Umwandlung aufweisen, welche durch die daraus folgende Hypoxie, Azidose und verminderter Perfusion eine verringerte Bestrahlungs- und Chemotherapiesensibilität aufweisen [22].

Auch für die Evaluierung des Verlaufes nach erfolgter Therapie eines Malignoms bestehen Hinweise, dass mit Hilfe von ADC-Messungen eine Unterscheidung zwischen einem Rezidiv und einer Veränderungen nach Strahlen- bzw. Chemotherapie getroffen werden kann. Dies konnte

beispielsweise für Larynxkarzinome gezeigt werden, hierbei insbesondere im Vergleich mit einer Positronen-Emissions-Tomographie als Verlaufsbeurteilung [33].

Trotz dieser Vielzahl an klinischen bzw. radiologischen Anwendungsmöglichkeiten des Diffusion Weighted Imaging bzw. des Apparent Diffusion Coeffizients besteht noch ein großer Entwicklungsbedarf für die Technik. Dies betrifft vor allem den Bereich der Standardisierung. Beispielsweise wird durch unterschiedliche softwaretechnische Auswertungsprogramme, welche nicht nach Open Source Standards programmiert werden, eine Vergleichbarkeit der Messungen unter verschiedenen Instituten erschwert. Ebenso ist in der Berechnung der ADC Werte aus den DWI Datensätzen aufgrund unterschiedlicher technischer Standards der Gerätehersteller eine Standardisierung erschwert. Und nicht zuletzt ist durch die individuelle Markierung der zu beurteilenden Region of Interest (ROI) stets eine starke Untersucherabhängigkeit gegeben.

1.3.4 DWI/ADC und primäre Lymphome des zentralen Nervensystems

Im Folgenden werde ich nun die Möglichkeiten der Differenzierung von primären Lymphomen mittels der im vorherigen Abschnitt eingeführten Bildgebungsverfahren darstellen.

Wie bereits dargestellt wurde (siehe oben), konnte für verschiedene Malignome eine Korrelation zwischen der Zellularität und dem ADC - Wert ermittelt werden. Dies konnte ebenso für intracranielle Tumore wie beispielsweise PCNSL, Medulloblastome oder Astrozytome nachgewiesen werden [34]. Bei PCNSL wurde hierbei im speziellen eine Absenkung der ADC-Werte beschrieben, welche auf die erhöhte Zellularität im Bereich der Läsionen zurückgeführt wurde [35]. Diese erhöhte Zellularität bei PCNSL wird zurückgeführt auf das hohe Maß an Proliferation bei erhaltener replikativer Aktivität [36].

Im Bereich der intrakraniellen Raumforderungen ist hierbei jedoch das PCNSL nicht die einzige hochproliferative Tumorentität. Vor allem zur frühzeitigen Diagnosestellung und damit zur entscheidenden differenzialdiagnostischen Abschätzung vor Beginn einer Therapie wurden die Möglichkeiten der diffusionsgewichteten MRT-Bildgebung bzw. ADC-Messungen untersucht, da sich die Therapiemöglichkeiten der verschiedenen differenzialdiagnostisch zu bedenkenden Raumforderungen fundamental unterscheiden.

So ist beispielsweise bei Verdacht auf eine intrakranielle Metastase, unter Beachtung einer möglicherweise notfallmäßigen Resektion bei entsprechender Lage bzw. Ausmaß der Raumforderung, zunächst ein ausführliches Staging des restlichen Körpers zur Suche nach dem Primarius und einer gegebenenfalls einfacher gelegenen Stelle zur bioptischen Sicherung indiziert.

Dagegen ist bei hirneigenen Tumoren wie Glioblastomen die möglichst vollständige chirurgische Resektion mit anschließender Radiochemotherapie das therapeutische Mittel der Wahl. Bei PCNSL ist wie bereits beschrieben nach aktueller Empfehlung dagegen zunächst eine möglichst minimalinvasive bioptische Sicherung zum Entscheid über das weitere Procedere essentiell.

In der bildgebenden Diagnostik mittels DWI/ADC wurden hierbei im Vergleich zwischen hochgradigen Astrozytomen und PCNSL bei den zweiten signifikant niedrigere ADC-Werte beschrieben [34]. Auch im Vergleich der ADC-Werte zwischen Glioblastomen, Metastasen und PCNSL zeigte sich bei letztgenannten niedrigere Werte im Rahmen der bildgebenden Untersuchungen [37,38]. Da die Zahl der untersuchten Patient*innen sowie die statistische Signifikanz der Untersuchungsergebnisse in verschiedenen Studien noch nicht als ausreichend beschrieben wurde, zudem die Untersuchungen als retrospektive Studien durchgeführt wurden, ist jedoch zur differenzialdiagnostischen Abklärung die Durchführung weiterer Studien essentiell.

Abseits der differenzialdiagnostischen Abklärung erfolgte die Untersuchung von Korrelationen zwischen histopathologischen Eigenschaften und Auffälligkeiten in der diffusionsgewichteten Bildgebung von PCNSL. Für Lymphome im Allgemeinen wurden hierbei verschiedene Ergebnisse berichtet. So konnten beispielsweise bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und folliculären Lymphomen eindeutige histopathologische Unterschiede in der Zellularität beschrieben werden, jedoch konnten diese nicht mit entsprechenden Veränderungen der ADC-Werte korreliert werden [39]. Für PCNSL hingegen konnte der Nachweis von Korrelationen zwischen der Zellularität und abgesenkten ADC-Werten erbracht werden [25,34,35]. Eine Unterscheidung zwischen der Signifikanz von ADCmean, ADCmin und ADCmax erbrachte das Ergebnis, dass der ADCmean Wert hierbei die größte Korrelation mit der Zellularität aufweist [40]. Wichtig hierbei ist jedoch, dass die Messung der Parameter in der bildgebenden Diagnostik korrekt die neurochirurgisch bioptierte Läsion abbildet, da Heterogenitäten im Tumorgewebe in Form von aggressiv-infiltrierenden versus weniger aktiven Bereichen mit beispielsweise nekrotischen oder hämorrhagischen Anteilen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Die Relevanz der Entscheidung, welche Läsion bei multifokaler Ausbreitung schließlich bioptiert werden sollte, wurde in einer weiteren Studie dargelegt: Läsionen mit möglichst niedrigen ADC-Werten entsprächen Bereichen einer hohen Zellularität, wodurch falsch negative Ergebnisse vermieden und Aussagen höherer Signifikanz bezüglich des aufzubereitenden bioptischen Materials möglich seien [41].

Ein weiterer wichtiger histopathologischer Parameter für die Beurteilung von PCNSL ist die Expression von Ki-67, welcher einen wichtigen Marker der proliferativen Aktivität darstellt und in verschiedenen Lymphom-Subtypen eine prognostische Abschätzung erlaubt [42], zellphysiologisch ist dies bedingt durch den Einfluss des synthetisierten Proteins auf die Zellteilung [43]. Hierzu konnten inverse Korrelationen zwischen dem Ausmaß der Ki-67 Expression und den ADC Werten in intrakraniellen Gliomen nachgewiesen werden [44], ebenso bei Mammakarzinomen [45] oder

kolorektalen Karzinomen [46]. Für PCNSL konnte eine inverse Korrelation zwischen der Ki-67 Expression und ADCmean, ADCmax und ADCmin gezeigt werden, was ein Hinweis für Abhängigkeiten zwischen Parametern der diffusionsgewichteten Messungen und der proliferativen Aktivität von PCNSL ist [40].

Weitere Untersuchungen von Parametern in der diffusionsgewichteten Bildgebung wurden bezüglich einer Prognoseabschätzung des PCNSL unternommen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass prätherapeutische ADC-Messungen Aussagen über das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben in der untersuchten Patient*innen-Kohorte erlauben können. Patient*innen mit einer ADCmin unterhalb eines Grenzwertes wiesen hierbei eine schlechtere Prognose auf [41]. Durch eine solche Abschätzung können Patient*innen mit einem erhöhten Risiko für ein therapierefraktäres PCNSL identifiziert werden und einer angepassten medikamentösen Therapie zugeführt und somit potenziell ein verbessertes klinisches Ergebnis erreicht werden. Diese Möglichkeit der Therapieantwort und Prognoseabschätzung konnte durch eine Studie von Wieduwilt et. al weiter bestätigt werden [47].

1.4 Einordnung

Nach dieser Vorstellung des Krankheitsbildes sowie der bildgebenden Diagnostik desselben werde ich eine Einführung zu der vorliegenden Studie geben. Wie bereits beschrieben, ist die Methodik der diffusionsgewichteten Bildgebung mit dem scheinbaren Diffusionskoeffizienten bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems bereits in verschiedenen Studien untersucht worden. Es fehlen jedoch noch eindeutige Empfehlungen zur Implementierung dieser in den Ablauf der Diagnostik und ggf. auch der Therapiekontrolle. Hierzu liefert die vorliegende Studie einen Beitrag. Das besondere an der Untersuchungsmethode ist hierbei, dass nicht nur eine einzelne Region of Interest untersucht wird, sondern ein Volume of Interest (VOI) charakterisiert wird. Hierdurch kann die Gesamtheit der Läsion mit der tumoreigenen Heterogenität erfasst werden. Nach der bildgebenden Diagnostik wurden dann die Ergebnisse dieser mit den histopathologischen Eigenschaften der Läsionen zusammengeführt, um Korrelationen bezüglich der mikroskopischen Tumorarchitektur und proliferativen Aktivität nachzuweisen.

Durch eine solche Erweiterung bzw. Ergänzung des bereits untersuchten Zusammenhangs zwischen den ADC-Messungen in Regions of Interest in primären Lymphomen des zentralen Nervensystems mit der Untersuchung von Volume of Interests kann somit eine noch genauere bildgebende Differenzierung der Läsionen erfolgen. Dies kann als Modell sicherlich auch auf andere Tumorentitäten angewandt werden, jedoch ist hierfür die Durchführung von Studien mit

erweiterten Patient*innenkollektiven essentiell. Um schließlich eine bestmögliche Versorgung von Patient*innen mit primären Lymphomen des zentralen Nervensystems mit möglichst geringen Komplikationsraten und risikoreduzierter Diagnostik zu erreichen, ist die vorliegende Studie somit ein weiteres Stück im medizinischen Fortschritt.

Whole Tumor Histogram-profiling of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Images Reflects Tumorbiological Features of Primary Central Nervous System Lymphoma



Stefan Schob^{*,1}, Benno Münch^{*,1}, Julia Dieckow^{*}, Ulf Quäschling^{*}, Karl-Titus Hoffmann^{*}, Cindy Richter^{*}, Nikita Garnov[†], Clara Frydrychowicz[‡], Matthias Krause[§], Hans-Jonas Meyer^{||,1} and Alexey Surov^{||,1}

^{*}Department for Neuroradiology, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany; [†]Eichamt Leipzig, Leipzig, Germany; [‡]Department for Neuropathology, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany; [§]Clinic for Neurosurgery, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany; ^{||}Clinic for Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany

Abstract

PURPOSE: Diffusion weighted imaging (DWI) quantifies motion of hydrogen nuclei in biological tissues and hereby has been used to assess the underlying tissue microarchitecture. Histogram-profiling of DWI provides more detailed information on diffusion characteristics of a lesion than the standardly calculated values of the apparent diffusion coefficient (ADC)—minimum, mean and maximum. Hence, the aim of our study was to investigate, which parameters of histogram-profiling of DWI in primary central nervous system lymphoma can be used to specifically predict features like cellular density, chromatin content and proliferative activity. **PROCEDURES:** Pre-treatment ADC maps of 21 PCNSL patients (8 female, 13 male, 28–89 years) from a 1.5T system were used for Matlab-based histogram profiling. Results of histopathology (H&E staining) and immunohistochemistry (Ki-67 expression) were quantified. Correlations between histogram-profiling parameters and neuropathologic examination were calculated using SPSS 23.0. **RESULTS:** The lower percentiles (p10 and p25) showed significant correlations with structural parameters of the neuropathologic examination (cellular density, chromatin content). The highest percentile, p90, correlated significantly with Ki-67 expression, resembling proliferative activity. Kurtosis of the ADC histogram correlated significantly with cellular density. **CONCLUSIONS:** Histogram-profiling of DWI in PCNSL provides a comprehensible set of parameters, which reflect distinct tumor-architectural and tumor-biological features, and hence, are promising biomarkers for treatment response and prognosis.

Translational Oncology (2018) 11, 504–510

Introduction

Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) accounts for approximately 5% of all newly diagnosed brain tumors, predominantly affecting older patients [1]. It is a non-Hodgkin-lymphoma (NHL), strictly limited to the central nervous system (CNS), occurring in immuno-competent and immuno-compromised patients [2]. In approximately 90% of all manifestations, PCNSL are diffuse large B-cell type lymphomas [3]. Compared to other high-grade NHL outside the CNS, PCNSL is particularly aggressive and overall survival is poor. So far, management of PCNSL remains controversial and independent from the individual therapeutic approaches, disease recurrence is almost certain in the vast majority

of patients [4]. The high recurrence rate of PCNSL is believed to reflect the peculiarity of the immune-privilege of the CNS, providing

Address all correspondence to: Stefan Schob, Department for Neuroradiology, University Hospital Leipzig, Liebigstraße 20, 04103 Leipzig.

E-mail: Stefan.Schob@Medizin.Uni-Leipzig.de

¹Contributed equally.

Received 9 January 2018; Revised 16 February 2018; Accepted 16 February 2018

© 2018 . Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). 1936-5233

<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.02.006>

a niche for the tumor cells, eventually resulting in minimal residual disease as a starting point for relapse [5].

Although PCNSL represents a rather rare CNS malignancy, a number of controlled trials have investigated promising cyto-reductive treatment regimens [6]. During recent years, whole brain radiation has been applied less frequently, since it bears almost no curative potential, although initial response to therapy is striking [7]. Multidrug-chemotherapy approaches, mostly based on methotrexate, are increasingly performed with beneficial outcomes. Results of complementary, non-methotrexate based chemotherapeutic approaches, for example in combination with autologous stem cell transplantation, might represent an effective alternative possibly associated with superior outcomes [5].

However, reliable, continuous non-invasive monitoring of response to anti-proliferative medication is becoming increasingly important for the oncologist to assess and compare efficacy of PCNSL treatments [8]. Cross sectional imaging, most importantly magnetic resonance imaging (MRI), has been shown to be of excellent accuracy regarding the diagnosis of intracranial lymphoma [9] and therefore is a propitious technique for this purpose. Although conventional MRI, including T2 weighted imaging, T1 weighted imaging, fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) – imaging and gadolinium-enhanced imaging provides detailed information on localization, mass effect, blood brain barrier disruption, peri-focal edema and extent of infiltration of CNS mass lesions, it (very sensitively) visualizes only unspecific phenomena [10] and does not sufficiently reflect histopathological features of brain tumors [11].

Contrarily to conventional MRI, diffusion weighted imaging (DWI), a technique employing opposing gradients to visualize the motion of hydrogen nuclei on a microscopical scale, provides apparent diffusion coefficient (ADC) maps, which reflect micro-structural features of biological tissues, and hence, can be employed as an imaging biomarker in various neoplastic conditions [12,13]. As an example, ADC values derived from small singular region of interest (ROI) measurements in pre-operative ADC maps of PCNSL patients, accurately representing the stereotactically biopsied specimen, precisely predicted the proliferative activity of the respective PCNSL manifestation [14].

However, the singular ROI method in the diagnostic pre-operative or follow-up setting has significant limitations, for example – inherent to the method – it cannot reflect features of the whole continuum of the space occupying lesion, and hence, tumor heterogeneity is not sufficiently depicted. Furthermore, inter-rater variability is another significant concern [15].

As a consequence, the aim of this study was to evaluate whether whole tumor histogram-profiling in preoperative ADC maps of PCNSL patients sufficiently reflects corresponding (immune-) histopathological properties like Ki-67 expression, cellular density and nuclear area, perspective providing a sensitive tool for monitoring therapy-related changes of the tumor-architecture on a microscopical level.

Patients, Procedures and Methods

Patients Collective

Our radiological information system was searched for the diagnosis PCNSL. Twenty-one patients were finally included, all of which had confirmation by stereotactic biopsy and subsequent neuropathological workup in our hospital. The patients' collective was comprised of

8 female and 13 male subjects; ranging from 28 to 89 years with a mean age of 67.7 years. Informed consent was obtained in writing from all patients or caregivers for the asservation of sample remnants and compiling of clinical and radiological data. The study was approved by the local ethics committee (Ethikkommission Universität Leipzig, Az 330-13-18112013). Requirements for the study were sufficient pretreatment MRI scans including DWI. MRI examinations of the included patients did not reveal signs of hemorrhage or calcifications.

MRI specifics

All images were acquired in the clinical diagnostic routine using a 1.5Tesla MRI system (Siemens Magnetom Symphony 1,5T) with the standard Siemens head coil (CP head array, model #1P3146037). DWI was performed using a single shot echo planar sequence with following parameters: Echo time(TE)/Repetition time(TR) = 6000/105 ms, 90° flip angle, 57 transverse sections, slice thickness = 5 mm, field of view (FOV) = 230 mm. Diffusion-sensitizing gradients were applied sequentially in the x, y and z directions with b factors of 0 and 1000 s/mm². ADC maps were then automatically generated by the operating console of the MR scanner. Postcontrast T1-weighted 3D-gradient echo sequence(GRE) imaging was obtained with following parameters: TR/TE = 2150/3.93 ms, flip angle 15°, 1-mm section thickness and 230 mm FOV. A standard dose (0.1 mmol/kg body weight) of gadolinium based contrast agent (Gadovist, Bayer, Leverkusen, Germany) was injected intravenously. Routine anatomic precontrast T1/T2_tirm_tra_dark_fluid (TR/TE = 9000/114, slice thickness 5mm, flip angle 150°, 28 transverse sections) images were also obtained.

All images were available in digital form and analyzed by one experienced radiologist (SS) without knowledge of the histopathological diagnosis on a PACS workstation (syngo.plaza VB20, Siemens, Germany).

Histogram Profiling of ADC Maps

ADC maps and T1weighted post contrast images were exported from our radiological archive in DICOM format *via* the aforementioned Siemens PACS. Using a custom-made DICOM image analysis tool (programmed by N.G. using Matlab, The Mathworks, Natick, MA), whole tumor diffusion profile analysis *via* the histogram approach was performed as follows; T1weighted post-Gadolinium images were displayed in a graphical user interface (GUI) to tag the contrast-enhancing tumor of each patient in all respective MRI sections. All drawn regions of interest (ROIs) were then automatically propagated onto the corresponding ADC maps and the whole lesion histogram profile was consecutively calculated, providing the following set of parameters: ADCmean, ADCmin, ADCmax, ADCp10, ADCp25, ADCp75, ADCp90, ADCmodus, ADCmedian, Skewness, Kurtosis, and Entropy.

Neuropathology

All tumor specimens were used for neuro-histological confirmation of the diagnosis. A 5µm section of each tumor was stained by H&E and a further section was employed for Ki-67 immunohistochemistry to determine the proliferation rate [14], as previously reported.

The (immune-) histopathological images were digitalized with a Jenalumar microscope, carrying a 4.2 digital camera (Zeiss, Jena, Germany). Thereupon, Ki-67 index, cell count, average nuclear area and total nuclear area of each specimen were quantified using the ImageJ particles tool [16] as described previously.

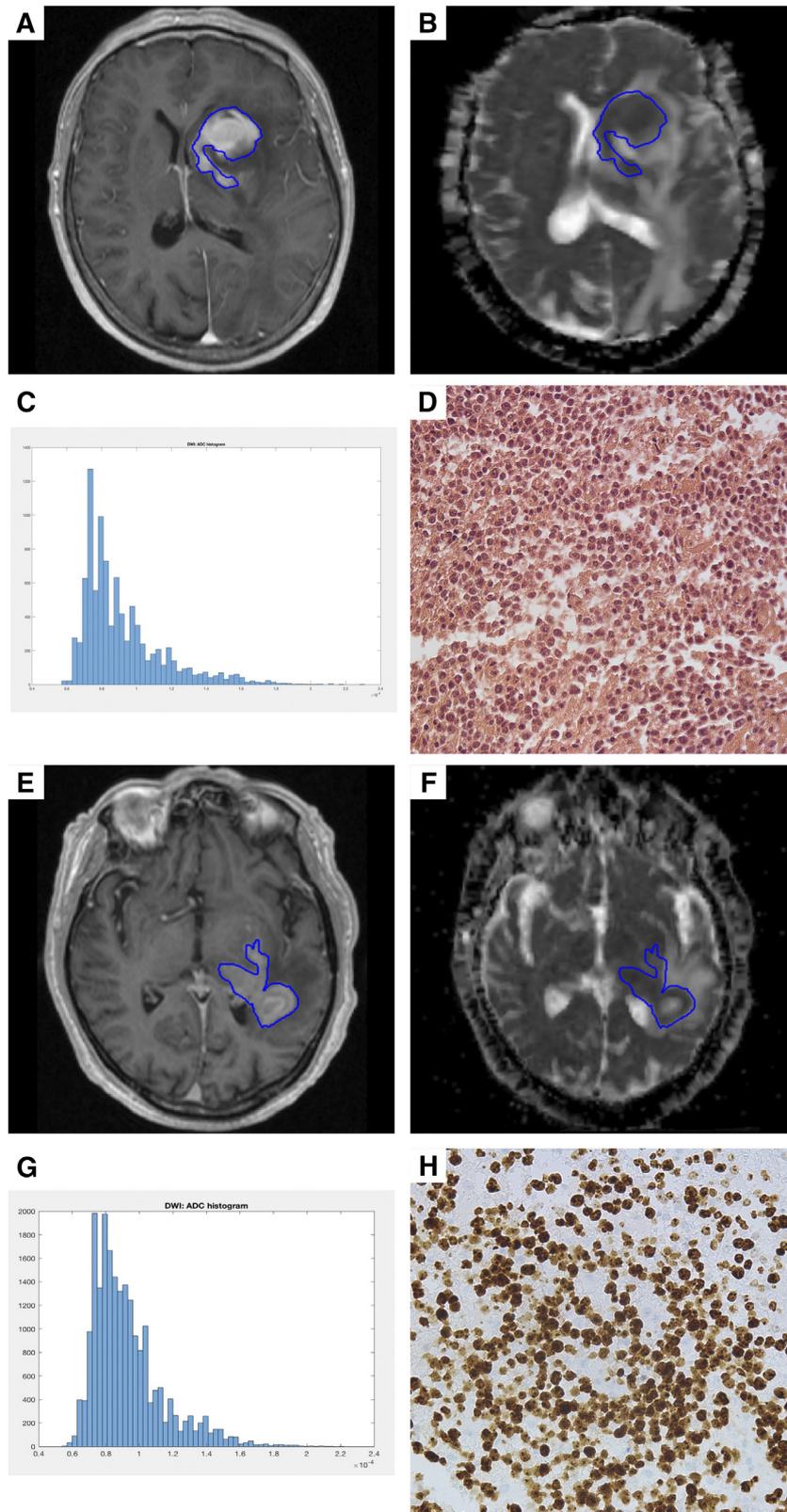


Figure 1. MR-Imaging, Ki-67 staining and ADC histograms of two exemplary PCNSL patients. A-D and E-H show two examples of PCNSL. A and E are giving the T1 post contrast images of both individuals, B and F display the corresponding section of the ADC map. C and G show the respective ADC histograms. D and H represent Ki-67 staining of the biopsy specimen.

Table 1. DWI Histogram Profiling and Neuropathologic Parameters of All Investigated PCNSL

Parameters	Mean ± Standard Deviation	Minimum	Maximum
ADC _{mean} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	98.56 ± 16.49	73.02	137.55
ADC _{min} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	57.45 ± 19.40	13.37	92.11
ADC _{max} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	190.49 ± 48.22	86.54	313.53
P10 ADC, × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	77.16 ± 13.49	54.81	106.70
P25 ADC, × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	85.34 ± 15.76	60.09	120.20
P75 ADC, × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	109.95 ± 19.85	75.33	157.38
P90 ADC, × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	125.19 ± 21.75	76.18	172.29
Median ADC, × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	95.88 ± 18.18	72.40	137.29
Mode ADC, × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	90.68 ± 22.50	55.34	140.30
Kurtosis	4.72 ± 3.05	2.17	14.63
Skewness	0.85 ± 0.77	-0.42	2.51
Entropy	4.22 ± 0.69	2.79	5.55
Cell count, n	1288.62 ± 366.69	319	1922
Total Nuclear Area, μm	106617.71 ± 44549.13	19988.01	216517.76
Average Nuclear Area, μm	86.49 ± 46.41	53.20	267.91
Ki-67, %	76.19 ± 12.54	50.0	95.0

Statistical Analysis

Statistical analysis including graphics creation was performed using SPSS 23.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Firstly, DWI histogram profile information and (immune-) histopathological data were investigated using descriptive statistics. Secondly, data was tested for Gaussian distribution using the Shapiro-Wilk Test. Finally, correlation analysis for normally distributed parameters was performed using Pearson Correlation Coefficient. In case of non-Gaussian distribution, Spearman-Rho Rank-Order Correlation was performed. *P* < .05 was taken to indicate statistical significance in all instances.

Results

Two examples of cranial MRI including the corresponding whole-tumor ADC-histograms and Ki-67 stainings from patient suffering from PCNSL are given in Figure 1).

The results of the descriptive analysis on DWI data and histopathological information are summarized in Table 1). Shapiro-Wilk-Test revealed Gaussian distribution for ADC_{mean},

ADC_{min}, ADC_{max}, ADC_{p10}, ADC_{p25}, ADC_{p75}, ADC_{p90}, ADC_{modus}, ADC_{median}, Skewness, Entropy, cell count, total nuclear area and Ki-67 (data not shown). Non-Gaussian distribution was determined for Kurtosis and average nuclear area (data not shown).

Pearson’s correlation coefficient was used to investigate the association between ADC_{mean}, ADC_{p10}, ADC_{p25}, ADC_{p75}, ADC_{p90}, ADC_{modus}, ADC_{median}, Skewness, Entropy, cell count, total nuclear area and Ki-67. Spearman-Rho Rank-Order Correlation was calculated to investigate the association between Kurtosis, cell count, average nuclear area, total nuclear area and Ki-67. Also, correlations between average nuclear area and all evaluated DWI histogram data were calculated using Spearman-Rho Rank-Order. Significant correlations were identified for the following pairs of parameters; ADC_{mean} and Ki-67 (*r* = -0.434, *p* = 0.049), ADC_{mean} and total nuclear area (*r* = -0.462, *p* = 0.035), ADC_{p10} and cell count (*r* = -0.435, *p* = 0.049), ADC_{p10} and total nuclear area (*r* = -0.455, *P* = .038), ADC_{p25} and total nuclear area (*r* = -0.458, , *P* = .037) ADC_{p90} and Ki-67 (*r* = -0.439, , *P* = .047), Kurtosis and cell count (*r* = 0.458, , *P* = .037). The results of the correlative analysis are summarized in Table 2). Figure 2) is showing the identified significant correlations as dot plots.

Discussion

In this study we aimed to investigate, whether whole tumor ADC histogram-profiling sufficiently reflects microscopical tumor-architecture and proliferative activity of PCNSL.

To our best knowledge, this work is the first showing statistically significant associations between ADC histogram-profiling parameters and prognostically relevant (immune-)histopathological features in a collective of PCNSL patients.

In detail, kurtosis of the whole tumor ADC histogram correlated with cellular density of the investigated PCNSL, indicating that increased kurtosis reflects high cellularity in this specific malignant neoplastic CNS lesion. This finding conforms with the results of a recently published investigation of malignant tumors in the thyroid

Table 2. Correlations of DWI-Histogram Profile Parameters with Cellular Density, Total Nuclear Area and Average Nuclear Area as Well as Ki-67 in All Investigated PCNSL

DWI Histogram Profile Parameters	Cell Count (n)	Total Nuclear Area (μm ²)	Average Nuclear Area (μm ²)	Ki-67 (%)
ADC _{mean} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.390 <i>P</i> = .080	<i>r</i> = -0.462 <i>P</i> = .035	<i>r</i> = - 0.254 <i>P</i> = .267	<i>r</i> = -0.434 <i>P</i> = .049
ADC _{min} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.275 <i>p</i> = 0.228	<i>r</i> = -0.338 <i>P</i> = .135	<i>r</i> = -0.289 <i>P</i> = .204	<i>r</i> = -0.223 <i>P</i> = .332
ADC _{max} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = 0.200 <i>P</i> = .386	<i>r</i> = -0.048 <i>P</i> = .835	<i>r</i> = -0.153 <i>P</i> = .597	<i>r</i> = -0.373 <i>P</i> = .096
ADC _{p10} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.435 <i>P</i> = .049	<i>r</i> = -0.455 <i>P</i> = .038	<i>r</i> = - 0.234 <i>P</i> = .308	<i>r</i> = -0.409 <i>P</i> = .066
ADC _{p25} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.400 <i>P</i> = .072	<i>r</i> = -0.458 <i>P</i> = .037	<i>r</i> = -0.255 <i>P</i> = .264	<i>r</i> = - 0.380 <i>P</i> = .089
ADC _{p75} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.368 <i>P</i> = .100	<i>r</i> = -0.406 <i>P</i> = .068	<i>r</i> = -0.202 <i>P</i> = .381	<i>r</i> = -0.388 <i>P</i> = .082
ADC _{p90} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.343 <i>P</i> = .128	<i>r</i> = -0.411 <i>P</i> = .064	<i>r</i> = -0.202 <i>P</i> = .379	<i>r</i> = -0.439 <i>P</i> = .047
ADC _{Median} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.368 <i>P</i> = .100	<i>r</i> = -0.419 <i>P</i> = .059	<i>r</i> = -0.235 <i>P</i> = .306	<i>r</i> = -0.363 <i>P</i> = .106
ADC _{Modus} , × 10 ⁻⁵ mm ² s ⁻¹	<i>r</i> = -0.256 <i>P</i> = .262	<i>r</i> = -0.373 <i>P</i> = .096	<i>r</i> = -0.265 <i>P</i> = .245	<i>r</i> = -0.232 <i>P</i> = .311
Kurtosis	<i>r</i> = -0.458 <i>P</i> = .037	<i>r</i> = 0.175 <i>P</i> = .448	<i>r</i> = -0.136 <i>P</i> = .558	<i>r</i> = 0.035 <i>P</i> = .882
Skewness	<i>r</i> = 0.338 <i>P</i> = .134	<i>r</i> = 0.201 <i>P</i> = .383	<i>r</i> = -0.001 <i>P</i> = .998	<i>r</i> = -0.036 <i>P</i> = .876
Entropy	<i>r</i> = 0.053 <i>P</i> = .820	<i>r</i> = -0.023 <i>P</i> = .923	<i>r</i> = 0.067 <i>P</i> = .774	<i>r</i> = -0.263 <i>P</i> = .248

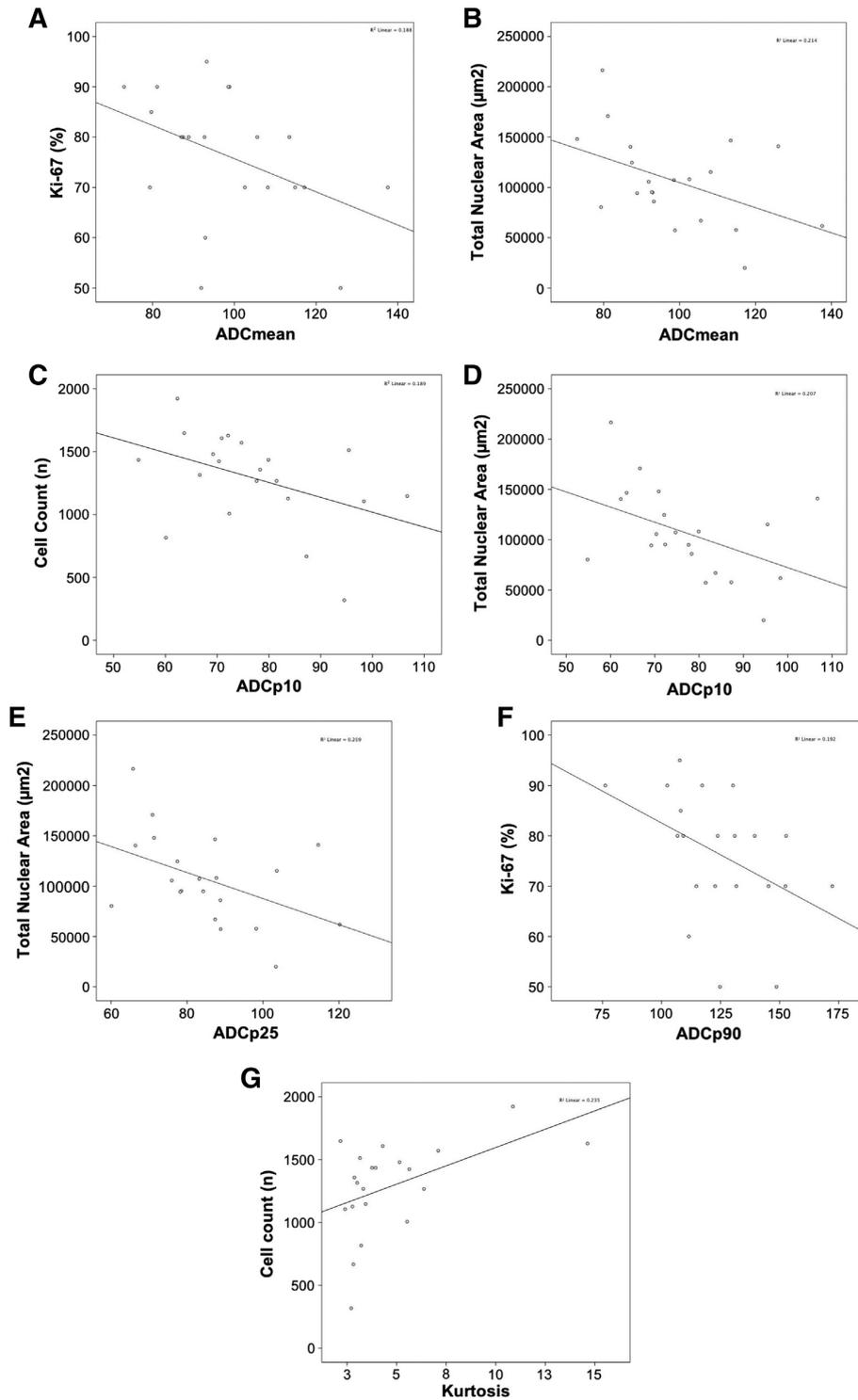


Figure 2. Identified correlations between immune-histopathological parameters and whole-tumor ADC-profiling. ADCmean values correlate with Ki-67 expression and average nuclei area. The lower percentiles, p10 and p25 correlate with structural parameters of the histopathological analysis – cell count and average nuclei area. P90, contrarily, only correlates with Ki-67 expression. The peakedness of the ADC histogram – kurtosis – correlates with cell count.

gland, showing that cellularity in thyroid carcinoma is associated with kurtosis of the whole tumor ADC histogram [17]. Our findings are further corroborated by the study of Kyriazi et al. [18], who were able to demonstrate that changes in ADC histogram kurtosis correlate with response to cyto-reductive chemotherapy in metastatic ovarian and primary peritoneal cancer, as well as with the study of Foroutan et al. [19], who demonstrated early changes in ADC histogram kurtosis as a sign of response to anti-proliferative treatment in a xenotransplant model of osteosarcoma.

Interestingly, skewness and entropy of the whole tumor ADC histogram were not significantly correlated with (immune-) histopathological features in our investigation. Other malignant entities – for example cervical carcinomas, however, revealed correlations between entropy and skewness of ADC histograms and histopathological features, which is probably a consequence of the distinct cellular- and matrix-architecture of the respective tumors, which are composed of a stromal and an epithelial compartment, other than the typically very homogeneous PCNSL [20,21].

Additionally, the lower percentiles of whole tumor diffusion profiling (p10 and p25) showed significant correlations with measures of cellularity and chromatin content, features representing tumor viability and progression. This result is underlined by a previous work investigating uterine cervical carcinomas with and without metastatic dissemination [20]. This study revealed significantly different values in the tenth percentile of whole tumor ADC values when comparing manifestations of the disease, which already had gained the ability to spread metastatically with non-metastasized manifestations. Our findings further coincide with the earlier work of Kyriazi and coworkers, which demonstrated changes in ADC p10 values as an expression of response to chemotherapy in ovarian and peritoneal cancer [18].

The ninetieth percentile of whole tumor diffusion profiling (p90) showed a statistically significant, inverse correlation with the expression of Ki-67, a nuclear protein being only detectable during active proliferation [22]. An almost identical correlation was identified in thyroid carcinomas, as published previously [17]. This, so far, suggests a specific sensitivity of the 90th percentile for the reflection of the proliferative activity of malignant tumors.

In concordance with the results of our previously published study, which used a singular ROI for ADC quantification [14], mean values of whole tumor diffusion profiling did correlate significantly with Ki-67 expression and total nuclear area, representing surrogate markers for active proliferation and chromatin content in the tumor. The mean value of ADC quantification obtained *via* both, the whole lesion and the singular-one-slice ROI approach, has been demonstrated to very well reflect cellularity and proliferative activity in different malignant conditions [23], even though singular ROIS are significantly less accurate than the whole lesion approach [15]. However, the mean value of ADC quantification as a singular parameter cannot sufficiently provide a whole spectrum of information about the complexity of the micro-architecture of a neoplastic tissue, but rather creates a significantly filtered and condensed approximation.

Thus we conclude that whole tumor ADC histogram profiling, giving a comprehensible number of different parameters that relatively specifically reflect different aspects of clinical relevant tumor biology, is a very useful extension of the commonly employed singular ROI technique.

Our study suffers from some limitations. Firstly, it is only a retrospective study and confined to a small quantity of PCNSL patients. Secondly, the study did not include 3T images and therefore is only representative for the lower magnetic field strength. Furthermore, comparability of the obtained values between different 1.5T scanners is still uncertain and must be validated in further investigations.

Conclusions

Whole tumor histogram-profiling of ADC maps provides a comprehensible set of parameters, which are very useful for pre-treatment estimation of tumor biological properties of PCNSL. The technique is a promising candidate for a non-invasively obtained biomarker, probably allowing for sensitive and specific estimation of tumor response to cyto-reductive treatment regimens. However, further prospective studies are warranted to validate our findings.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Clinician Scientist Program of the Medical Faculty of the University Leipzig.

References

- [1] Tang YZ, Booth TC, Bhogal P, Malhotra A, and Wilhelm T (2011). Imaging of primary central nervous system lymphoma. *Clin Radiol* **66**, 768–777.
- [2] Batchelor T and Loeffler JS (2006). Primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol* **24**, 1281–1288.
- [3] Gerstner ER and Batchelor TT (2011). Primary Central Nervous System Lymphoma. Primary Central Nervous System Tumors. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 333–353.
- [4] Visagan MR, Cheserem MB, Stapleton MS, Bridges DL, and Eralil MG (2017). PP78. Primary CNS Lymphoma Outcomes in a Single Centre: A 7 Year Study. *Neuro-Oncology* **19**, i21.
- [5] Schorb E, Finke J, Ferreri AJM, Ihorst G, Mikesch K, Kasenda B, Fritsch K, Fricker H, Burger E, and Grishina O, et al (2016). High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplant compared with conventional chemotherapy for consolidation in newly diagnosed primary CNS lymphoma—a randomized phase III trial (MATRix). *BMC Cancer*, 1–9.
- [6] DeAngelis L and Neuro-oncology M (2015). Primary CNS lymphoma treatment—the devil is in the details. *Nature Publishing Group*, 1–2.
- [7] Fallah J, Qunaj L, and Olszewski AJ (2016). *Therapy and outcomes of primary central nervous system lymphoma in the United States: analysis of the National Cancer Database. Blood Advances* **1**, 112–121.
- [8] Wieduwilt MJ, Valles F, Issa S, Behler CM, Hwang J, McDermott M, Treseler P, O'Brien J, Shuman MA, and Cha S, et al (2012). *Immunotherapy with intensive consolidation for primary CNS lymphoma: a pilot study and prognostic assessment by diffusion-weighted MRI. Clin Cancer Res* **18**, 1146–1155.
- [9] Haldorsen IS, Espeland A, and Larsson EM (2011). *Central nervous system lymphoma: characteristic findings on traditional and advanced imaging. American Journal of Neuroradiology* **32**, 984–992.
- [10] Upadhyay N and Waldman AD (2011). *Conventional MRI evaluation of gliomas. BJR* **84**(2), S107–S111.
- [11] Schob S, Frydrychowicz C, Gawlitza M, Bure L, Preuss M, Hoffmann K-T, and Surov A (2016). *Signal Intensities in preoperative MRI do not reflect proliferative activity in meningioma. Translational Oncology* **9**, 274–279.
- [12] Padhani AR, Liu G, Mu-Koh D, Chenevert TL, Thoeny HC, Takahara T, Dzik-Jurasz A, Ross BD, Van Cauteren M, and Collins D, et al (2009). *Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations. Neoplasia* **11**, 102–125.
- [13] Le Bihan D (2013). *Apparent diffusion coefficient and beyond: what diffusion MR imaging can tell us about tissue structure. Radiology* **268**, 318–322.

- [14] Schob S, Meyer J, Gawlitza M, Frydrychowicz C, Müller W, Preuss M, Bure L, Quäschling U, Hoffmann K-T, and Surov A (2016). *Diffusion-weighted MRI reflects proliferative activity in primary CNS lymphoma. PLoS ONE* **11** e0161386.
- [15] Ahn SJ, Shin HJ, Chang J-H, and Lee S-K (2014). *Differentiation between primary cerebral lymphoma and glioblastoma using the apparent diffusion coefficient: comparison of three different ROI methods. PLoS ONE* **9** e112948.
- [16] Surov A, Caysa H, Wienke A, Spielmann RP, and Fiedler E (2015). *Correlation between different ADC fractions, cell count, Ki-67, total nucleic areas and average nucleic areas in meningeothelial meningiomas. Anticancer Res* **35**, 6841–6846.
- [17] Schob S, Meyer H, Dieckow J, Pervinder B, Pazaitis N, Höhn A, Garnov N, Horvath-Rizea D, Hoffmann K-T, and Surov A (2017). *Histogram analysis of diffusion weighted imaging at 3t is useful for prediction of lymphatic metastatic spread, proliferative activity, and cellularity in thyroid cancer. IJMS* **18**, 821–912.
- [18] Kyriazi S, Collins DJ, Messiou C, Pennert K, Davidson RL, Giles SL, Kaye SB, and de Souza NM (2011). *Metastatic ovarian and primary peritoneal cancer: assessing chemotherapy response with diffusion-weighted MR imaging—value of histogram analysis of apparent diffusion coefficients. Radiology* **261**, 182–192.
- [19] Foroutan P, Krahling JM, Morse DL, Grove O, Lloyd MC, Reed D, Raghavan M, Altiok S, Martinez GV, and Gillies RJ (2013). *Diffusion MRI and novel texture analysis in osteosarcoma xenotransplants predicts response to anti-checkpoint therapy. PLoS ONE* **8** e82875.
- [20] Schob S, Meyer HJ, Pazaitis N, Schramm D, Bremicker K, Exner M, Höhn A-K, Garnov N, and Surov A (2017). *ADC histogram analysis of cervical cancer aids detecting lymphatic metastases—a preliminary study. Mol Imaging Biol* **61**, 69.
- [21] Just N (2014). *Improving tumour heterogeneity MRI assessment with histograms. Br J Cancer* **111**, 2205–2213.
- [22] Tisell LE, Oden A, Muth A, Altiparmak G, Mólne J, Ahlman H, and Nilsson O (2003). *The Ki67 index a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma. Br J Cancer* **89**, 2093–2097.
- [23] Chen L, Liu M, Bao J, Xia Y, Zhang J, Zhang L, Huang X, and Wang J (2013). *The correlation between apparent diffusion coefficient and tumor cellularity in patients: a meta-analysis. PLoS ONE* **8** e79008.

Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr.med.

Whole Tumor Histogram-profiling of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Images reflects tumorbiological features of Primary Central Nervous System Lymphoma

Eingereicht von: Benno Jürgen Helmut Münch

Geburtsdatum/Geburtsort: 04.07.1991 in Berlin

Angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer: Prof. A. Surov

Einreichung: 08/2018

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Parametern in der bildgebenden Diagnostik mittels Diffusion-Weighted Imaging und histopathologischen Eigenschaften von primären Lymphomen des zentralen Nervensystems.

Hierzu wurden die bioptischen Resektate von 21 Patient*innen mit der gesicherten Diagnose eines primären Lymphoms des zentralen Nervensystems neuropathologisch untersucht. Es wurden der Ki-67 Index, die Zellzahl und das durchschnittliche sowie gesamte Zellkern-Areal bestimmt.

In der bildgebenden Diagnostik erfolgte die Untersuchung der MRT Bildgebung der Patient*innen. Die MRT Daten wurden vor der neurochirurgisch durchgeführten bioptischen Sicherung der Läsionen erhoben und beinhalteten mindestens eine Diffusions-gewichtete Aufnahme, ein ADC Mapping, eine T1 Sequenz vor und nach Kontrastmittelgabe sowie eine T2_tirm_tra_dark_fluid Sequenz.

Es erfolgte dann eine Markierung der kontrastmittelaufnehmenden Läsionen in der T1 Sequenz nach Kontrastmittelgabe in jeder axialen Schicht, welche von der Raumforderung betroffen war. Bei multilokulären Befunden wurde die Läsion ausgewählt, welche schlußendlich neurochirurgisch bioptiert wurde. Mittels eines DICOM Image Analysis Programms auf der Basis von Matlab wurden dann die getätigten Markierungen auf die korrespondierenden ADC-Maps übertragen, sodass schlußendlich eine diffusions-gewichtete MRT Untersuchung des Gesamt-Tumors ermöglicht wurde. In dem berechneten Histogramm Datensatz wurde folgende Parameter einbezogen: ADC

mean, ADC min, ADC max, ADC p10, ADC p25, ADC p75, ADC p90, ADCmodus, ADCmedian, Skewness, Kurtosis und Entropy.

Hierauf erfolgte die statistische Aufarbeitung der Daten und Untersuchung auf vorhandene Korrelationen mittels des Analyse-Programms SPSS 23.0. Dazu erfolgte zunächst die beschreibende Analyse der Daten mittels Mittelwert, Standardabweichung und Feststellung von Minimum und Maximum. Sodann erfolgte die Untersuchung der Daten bezüglich einer Gauß-/Normal-Verteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests.

Schlußendlich erfolgte dann eine Untersuchung der Korrelationen mittels des Pearson Korrelationskoeffizienten für die normalverteilten Daten sowie mittels Spearman-Rho Rank-Order Korrelation für die nicht normalverteilten Daten. Ein statistisches Signifikanzniveau von $P < 0,05$ wurde festgelegt.

Es lässt sich zusammenfassend bezüglich der Ergebnisse darstellen, dass verschiedene statistisch signifikante Korrelationen zwischen Parametern der diffusions-gewichteten Bildgebung sowie histopathologischer Parameter bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems gefunden wurden.

Im Detail konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Kurtosis des ADC-Histogramms und der histopathologischen Zellzahl gezeigt werden, zwischen den niedrigeren Perzentilen der ADC Werte (p10, p25) und der Zellzahl sowie der Zellkern beinhaltenden Areale und eine signifikante Korrelation zwischen dem ADCmean Wert und dem Ki-67 Index sowie des gesamten Zellkern beinhaltenden Areals. Zudem wurde eine inverse Korrelation zwischen der 90. ADC Perzentile und dem Ki-67 Index festgestellt.

Hieraus sind verschiedene Schlussfolgerungen möglich. Zum einen zeigt die diffusions-gewichtete Untersuchung des gesamten Tumors Korrelationen mit Parametern der histopathologischen Differenzierung, welche sich im klinischen Verlauf bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems widerspiegeln. Die Technik ist also eine gute Ergänzung der bereits beschriebenen Differenzierung mittels diffusionsgewichteter singulärer Region of Interest Untersuchung. Somit können bereits vor neurochirurgischer Sicherung der Läsionen und somit vor Beginn einer Behandlung Aussagen über die wahrscheinliche Tumorarchitektur bzw. histopathologische Eigenschaften getroffen werden.

Zum anderen scheint diese Technik im Rahmen weiterer Studien und Forschungen ein verheißungsvoller Kandidat für die Entwicklung bildgebender Marker zur Kontrolle beispielsweise des Tumorverhaltens bei medikamentöser Therapie zu sein.

Außerdem ist es denkbar, die Ergebnisse der Untersuchungen bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems auf andere Tumorentitäten zu erweitern, und somit die Vorteile dieser nicht invasiven und leicht verfügbaren Methode bei verschiedenen Krankheitsbildern anzuwenden. Für diese Weiterentwicklung der Technik bedarf es jedoch noch ausführlicher Studien, insbesondere die Vergrößerung der Patient*innenkollektive, eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen technischen Systemen und Untersuchern und prospektive Studiendesigns sind noch zu erreichende Ziele.

4. Literaturverzeichnis

- [1] Tang YZ, Booth TC, Bhopal P, Malhora A, and Wilhelm T (2011): Imaging of primary central nervous system lymphoma. *Clin Radiol* 66, 768-777
- [2] Schorb E, Finke J, Ferreri AJM, Ihorst G, Mikesch K, Kasenda B, Fritsch K, Fricker H, Burger E, and Grishina O, et al (2016): High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplant compared with conventional chemotherapy for consolidation in newly diagnosed primary CNS lymphoma—a randomized phase III trial (MATRix). *BMC Cancer*, 1–9.
- [3] Bataille B, Delwail V, Menet E, Vandermarcq P, Ingrand P, Wager M, Guy G and Lapierre F (2000): Primary intracerebral malignant lymphoma: report of 248 cases. *Journal of Neurosurgery* 92: 261-266
- [4] Batchelor T and Loeffler JS (2006). Primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol* 24, 1281–1288.
- [5] Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, et al; European Association for Neuro-Oncology Task Force on Primary CNS Lymphoma. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):e322–e332.
- [6] Giannini C, Dogan A, and Saloma D (2014): CNS Lymphoma: A Practical Diagnostic Approach. *J Neuropathol Exp Neurol* Vol 73, No. 6, pp. 478-494
- [7] Schob S, Meyer J, Gawlitza M, Frydrychowicz C, Müller W, Preuss M, Bure L, Quäschling U, Hoffmann K-T, and Surov A (2016): Diffusion-weighted MRI reflects proliferative activity in primary CNS lymphoma. *PLoS ONE* 11
- [8] Schaff LR, Grommes C (2018): Updates on Primary Central Nervous Lymphoma. *Current Oncology Reports* 20: 11
- [9] Johnson BA, Fram EK, Johnson PC, et al. (1997): The variable MR appearance of primary lymphoma of the central nervous system: comparison with histopathologic features. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:563e72.
- [10] Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJ, Gospodarowicz M, Pulczynski EJ, Zucca E, et al. (2005): Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):5034–43.
- [11] Borsi JD, Moe PJ (1987): A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in a dose range of 0.5 g to 33.6 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 1987;60(1):5–13.
- [12] Batchelor T, Carson K, O'Neill A, Grossman SA, Alavi J, New P, et al. (2003): Treatment of primary CNS lymphoma with methotrexate and deferred radiotherapy: a report of NABTT 96-07. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1044–9
- [13] Omuro A, Correa DD, Moskowitz CH, Matasar MJ, Kaley TJ et al. (2015): R-MPV followed by high-dose chemotherapy with TBC and autologous stem-cell transplant for newly diagnosed primary CNS lymphoma. *Blood* 2015; 125(9): 1403-10
- [14] Illerhaus G, Kasenda B, Ihorst G, Egerer G, Lamprecht M, Keller U, et al. (2016) High-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem cell transplantation for newly diagnosed primary CNS lymphoma: a prospective, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2016;3(8): e388–97.
- [15] Shibamoto Y, Ogino H, Hasegawa M, Suzuki K, Nishio M, Fujii T, et al. (2005): Results of radiation monotherapy for primary central nervous system lymphoma in the 1990s. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62(3):809–13
- [16] Thiel E, Korfel A, Martus P, Kanz L, Griesinger F, Rauch M, et al. (2010): High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(11): 1036–47.
- [17] Lai R, Rosenblum MK, DeAngelis LM. (2002): Primary CNS lymphoma: a whole-brain disease? *Neurology.* 2002;59(10):1557–62

- [18] Weller M, Martus P, Roth P, Thiel E, Korfel A, (2012): German PSG. Surgery for primary CNS lymphoma? Challenging a paradigm. *Neuro-Oncology*. 2012;14(12):1481–4.
- [19] Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, Mukundan S, MGM R, Chapuy B, et al. (2017) PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/ refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood*. 2017;129(23):3071–3.
- [20] Grommes C, Pastore A, Palaskas N, Tang SS, Campos C, Schartz D, et al. (2017) Ibrutinib unmasks critical role of Bruton tyrosine kinase in primary CNS lymphoma. *Cancer Discov*. 2017;7(9):1018–29.
- [21] Mendez JS, Quinn OT, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J, Grommes C. (2017): Changes in survival of primary central nervous system lymphoma based on a review of national databases over 40 years. *J Clin Oncol*. 2017;35(15_suppl):2040
- [22] Padhani AR, Liu G, Koh DM, Chenevert TL, Thoeny HC, et al. (2009) Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations. *Neoplasia*. 2009 Feb; 11(2); 102-25
- [23] Norris DG (2001). The effects of microscopic tissue parameters on the diffusion weighted magnetic resonance imaging experiment. *NMR Biomed* 14 (2), 77–93.
- [24] Johnston KC, Wagner DP, Wang XQ, Newman GC, Thijs V, Sen S, and Warach S (2007). Validation of an acute ischemic stroke model: does diffusion-weighted imaging lesion volume offer a clinically significant improvement in prediction of outcome?. *Stroke* 38 (6), 1820–1825.
- [25] Chen L, Liu M, Bao J, Xia Y, Zhang J, et al. (2013) The Correlation between Apparent Diffusion Coefficient and Tumor Cellularity in Patients: A Meta- Analysis. *PLoS ONE* 8(11): e79008
- [26] Koh DM, Collins DJ (2007) Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology. *AJR Am J Roentgenol* 188: 1622–1635.
- [27] Taouli B, Vilgrain V, Dumont E, Daire JL, Fan B, and Menu Y (2003). Evaluation of liver diffusion isotropy and characterization of focal hepatic lesions with two single-shot echo-planar MR imaging sequences: prospective study in 66 patients. *Radiology* 226, 71–78.
- [28] Guo Y, Cai YQ, Cai ZL, Gao YG, An NY, Ma L, Mahankali S, and Gao JH (2002). Differentiation of clinically benign and malignant breast lesions using diffusion-weighted imaging. *J Magn Reson Imaging* 16, 172–178.
- [29] Bhugaloo AA, Abdullah BJJ, Siow YS, Ng KH. (2006): Diffusion-weighted MR imaging in acute vertebral compression fractures: differentiation between malignant and benign causes. *Biomed Im- aging Interv J* 2006; 2:e12
- [30] Yankeelov TE, Lepage M, Chakravarthy A, Broome E, Niermann K, Kelley M, Meszoely I, Mayer I, Herman C, and McManus K (2007). Integration of quantitative DCE-MRI and ADC mapping to monitor treatment response in human breast cancer: initial results. *Magn Reson Imaging* 25, 1–13.
- [31] Kamel IR, Reyes DK, Liapi E, Bluemke DA, and Geschwind JF (2007). Functional MR imaging assessment of tumor response after 90Y microsphere treat- ment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J Vasc Intervent Radiol* 18, 49–56.
- [32] Uhl M, Saueressig U, van Buijen M, Kontrny U, Niemeyer C, Köhler G, Ilyasov K, and Langer M (2006). Osteosarcoma: preliminary results of in vivo assessment of tumor necrosis after chemotherapy with diffusion- and perfusion-weighted magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 41, 618–623.
- [32] Dzik-Jurasz A, Domenig C, George M, Wolber J, Padhani A, Brown G, and Doran S (2002). Diffusion MRI for prediction of response of rectal cancer to chemoradiation. *Lancet* 360 (9329), 307–308.
- [33] Vandecaveye V, de Keyzer F, Vander Poorten V, et al. (2006) Evaluation of the larynx for tumour recurrence by diffusion-weighted MRI after radiotherapy: ini- tial experience in four cases. *Br J Radiol* 2006; 79:681–687

- [34] Guo AC, Cummings TJ, Dash RC, Provenzale JM.(2002) Lymphomas and High-Grade Astrocytomas: Comparison of Water Diffusibility and Histologic Characteristics1. *Radiology*. 2002; 224: 177–183.
- [35] Cotton F, Ongolo-Zogo P, Louis-Tisserand G, Streichenberger N, Hermier M, Jouvet A, et al. (2006) Diffusion and perfusion MR imaging in cerebral lymphomas. *J Neuroradiol*. 2006; 33: 220–228.
- [36] Zacharia TT, Law M, Naidich TP, Leeds NE.(2008) Central Nervous System Lymphoma Characterization by Diffusion-Weighted Imaging and MR Spectroscopy. *Journal of Neuroimaging*. 2008; 18: 411–417.
- [37] Wang S, Kim S, Chawla S, Wolf RL, Knipp DE, Vossough A, O'Rourke DM, Judy KD, Poptani H, Melhem ER. (2011) Differentiation between glioblastomas, solitary brain metastases, and primary cerebral lymphomas using diffusion tensor and dynamic susceptibility contrast-enhanced MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Mar;32(3):507-14. doi: 10.3174/ajnr.A2333. Epub 2011 Feb 17.
- [38] Kickingereder P, Wiestler B, Sahm F, Heiland S, Roethke M, Schlemmer H-P, et al. (2014) Primary Central Nervous System Lymphoma and Atypical Glioblastoma: Multiparametric Differentiation by Using Diffusion-, Perfusion-, and Susceptibility-weighted MR Imaging. *Radiology*. 2014; 272: 843–850.
- [39] Wu X, Pertovaara H, Dastidar P, Vornanen M, Paavolainen L, Marjomäki V, et al. (2013) ADC measurements in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: a DWI and cellularity study. *European Journal of Radiology*. Elsevier Ireland Ltd; 2013; 82: e158–e164.
- [40] Schob S, Meyer J, Gawlitza M, Frydrychowicz C, Müller W, Preuss M, Bure L, Quäschling U, Hoffmann K-T, and Surov A (2016). Diffusion-weighted MRI reflects proliferative activity in primary CNS lymphoma. *PLoS ONE* 11 e0161386.
- [41] Barajas RF Jr1, Rubenstein JL, Chang JS, Hwang J, Cha S (2010). Diffusion-weighted MR imaging derived apparent diffusion coefficient is predictive of clinical outcome in primary central nervous system lymphoma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010 Jan;31(1):60-6. doi: 10.3174/ajnr.A1750. Epub 2009 Sep 3.
- [42] He X, Chen Z, Fu T, Jin X, Yu T, Liang Y, et al (2014). Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*; 2014; 14: 1–13.
- [43] Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):513-22.
- [44] Guzman-De-Villoria JA (2015). Added value of advanced over conventional magnetic resonance imaging in grading gliomas and other primary brain tumors. 2015;: 1–10.
- [45] Mori N, Ota H, Mugikura S, Takasawa C, Ishida T, Watanabe G, Tada H, Watanabe M, Takase K and Takahashi S (2015): Luminal-type breast cancer: correlation of apparent diffusion coefficients with the Ki-67 labeling index. *Radiology* 274: 66-73, 2015.
- [46] Zhang XY, Sun YS, Tang L, Xue WC and Zhang XP (2011): Correlation of diffusion-weighted imaging data with apoptotic and proliferation indexes in CT26 colorectal tumor homografts in balb/c mouse. *J Magn Reson Imaging* 33: 1171-1176, 2011.
- [47] Wieduwilt MJ, Valles F, Issa S, Behler CM, Hwang J, McDermott M, Treseler P, O'Brien J, Shuman MA, and Cha S, et al (2012). Immunochemotherapy with intensive consolidation for primary CNS lymphoma: a pilot study and prognostic assessment by diffusion-weighted MRI. *Clin Cancer Res* 18, 1146–1155.
- [48] Ramsey NR (1985). Early history of magnetic resonance. *Bull Mag Reson* 1985; 7:94-99.

5. Darstellung des eigenen wissenschaftlichen Beitrages bei geteilter Erstautorenschaft

Die vorliegende Arbeit wurde unter geteilter Erstautorenschaft publiziert, im Folgenden werde ich den eigenen wissenschaftlichen Beitrag darstellen.

Zu Beginn der Arbeit durchsuchte ich die Patientendatenbank der Klinik für Radiologie nach Patienten mit einem primären Lymphom des zentralen Nervensystems. Hiernach analysierte ich die Suchergebnisse bezüglich der Einschlußfähigkeit der gefundenen Patientendaten und wählte diese dementsprechend aus. Danach erfolgte die Akquise der Bilddatensätze zur weiteren Analyse.

Hiernach erfolgte die Messung der in der Arbeit beschriebenen Parameter an den Bilddatensätzen. Hierzu wurde ein DICOM Analyse Tool verwendet, in welches ich durch S.Schob ausführlich eingearbeitet wurde. Es erfolgte dann die Erfassung der untersuchten Parameter, die Ergebnisse der Messungen konnte ich dann ausführlich mit S.Schob und A.Surov diskutieren. Anschließend erfolgte dann eine Kontrolle der Messungen durch S.Schob.

Die statistische Analyse und Korrelation der gewonnenen radiologischen Datensätze mit den histopathologischen Daten erfolgte dann unter Nutzung des Programms SPSS 23.0 gemeinsam mit S.Schob.

Währenddessen führte ich zudem eine Literaturrecherche unter Nutzung der Pubmed-Datenbank durch und entwickelte gemeinsam mit S.Schob die Konzeption der Publikation.

Schlußendlich erfolgte dann das Verfassen eines Entwurfes der Publikation und das Erstellen sowie die Auswahl der Visualisierung der Ergebnisse und Methodik gemeinsam mit S.Schob. Die Überarbeitung des Entwurfs und die Finalisierung erfolgte dann zusammen mit S.Schob und A.Surov.



Leipzig, den 13.08.2018 (S.Schob)

5. Darstellung des eigenen wissenschaftlichen Beitrages bei geteilter Erstautorenschaft

Die vorliegende Arbeit wurde unter geteilter Erstautorenschaft publiziert, im Folgenden werde ich den eigenen wissenschaftlichen Beitrag darstellen.

Zu Beginn der Arbeit durchsuchte ich die Patientendatenbank der Klinik für Radiologie nach Patienten mit einem primären Lymphom des zentralen Nervensystems. Hiernach analysierte ich die Suchergebnisse bezüglich der Einschlußfähigkeit der gefundenen Patientendaten und wählte diese dementsprechend aus. Danach erfolgte die Akquise der Bilddatensätze zur weiteren Analyse.

Hiernach erfolgte die Messung der in der Arbeit beschriebenen Parameter an den Bilddatensätzen. Hierzu wurde ein DICOM Analyse Tool verwendet, in welches ich durch S.Schob ausführlich eingearbeitet wurde. Es erfolgte dann die Erfassung der untersuchten Parameter, die Ergebnisse der Messungen konnte ich dann ausführlich mit S.Schob und A.Surov diskutieren. Anschließend erfolgte dann eine Kontrolle der Messungen durch S.Schob.

Die statistische Analyse und Korrelation der gewonnenen radiologischen Datensätze mit den histopathologischen Daten erfolgte dann unter Nutzung des Programms SPSS 23.0 gemeinsam mit S.Schob.

Währenddessen führte ich zudem eine Literaturrecherche unter Nutzung der Pubmed-Datenbank durch und entwickelte gemeinsam mit S.Schob die Konzeption der Publikation.

Schlußendlich erfolgte dann das Verfassen eines Entwurfes der Publikation und das Erstellen sowie die Auswahl der Visualisierung der Ergebnisse und Methodik gemeinsam mit S.Schob. Die Überarbeitung des Entwurfs und die Finalisierung erfolgte dann zusammen mit S.Schob und A.Surov.



Leipzig, den 13.08.2018 (N.Garnov)

5. Darstellung des eigenen wissenschaftlichen Beitrages bei geteilter Erstautorenschaft

Die vorliegende Arbeit wurde unter geteilter Erstautorenschaft publiziert, im Folgenden werde ich den eigenen wissenschaftlichen Beitrag darstellen.

Zu Beginn der Arbeit durchsuchte ich die Patientendatenbank der Klinik für Radiologie nach Patienten mit einem primären Lymphom des zentralen Nervensystems. Hiernach analysierte ich die Suchergebnisse bezüglich der Einschlußfähigkeit der gefundenen Patientendaten und wählte diese dementsprechend aus. Danach erfolgte die Akquise der Bilddatensätze zur weiteren Analyse.

Hiernach erfolgte die Messung der in der Arbeit beschriebenen Parameter an den Bilddatensätzen. Hierzu wurde ein DICOM Analyse Tool verwendet, in welches ich durch S.Schob ausführlich eingearbeitet wurde. Es erfolgte dann die Erfassung der untersuchten Parameter, die Ergebnisse der Messungen konnte ich dann ausführlich mit S.Schob und A.Surov diskutieren. Anschließend erfolgte dann eine Kontrolle der Messungen durch S.Schob.

Die statistische Analyse und Korrelation der gewonnenen radiologischen Datensätze mit den histopathologischen Daten erfolgte dann unter Nutzung des Programms SPSS 23.0 gemeinsam mit S.Schob.

Währenddessen führte ich zudem eine Literaturrecherche unter Nutzung der Pubmed-Datenbank durch und entwickelte gemeinsam mit S.Schob die Konzeption der Publikation.

Schlußendlich erfolgte dann das Verfassen eines Entwurfes der Publikation und das Erstellen sowie die Auswahl der Visualisierung der Ergebnisse und Methodik gemeinsam mit S.Schob. Die Überarbeitung des Entwurfs und die Finalisierung erfolgte dann zusammen mit S.Schob und A.Surov.


Leipzig, den 13.08.2018 (C. Frydrychowicz)

5. Darstellung des eigenen wissenschaftlichen Beitrages bei geteilter Erstautorenschaft

Die vorliegende Arbeit wurde unter geteilter Erstautorenschaft publiziert, im Folgenden werde ich den eigenen wissenschaftlichen Beitrag darstellen.

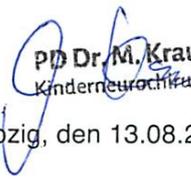
Zu Beginn der Arbeit durchsuchte ich die Patientendatenbank der Klinik für Radiologie nach Patienten mit einem primären Lymphom des zentralen Nervensystems. Hiernach analysierte ich die Suchergebnisse bezüglich der Einschlußfähigkeit der gefundenen Patientendaten und wählte diese dementsprechend aus. Danach erfolgte die Akquise der Bilddatensätze zur weiteren Analyse.

Hiernach erfolgte die Messung der in der Arbeit beschriebenen Parameter an den Bilddatensätzen. Hierzu wurde ein DICOM Analyse Tool verwendet, in welches ich durch S.Schob ausführlich eingearbeitet wurde. Es erfolgte dann die Erfassung der untersuchten Parameter, die Ergebnisse der Messungen konnte ich dann ausführlich mit S.Schob und A.Surov diskutieren. Anschließend erfolgte dann eine Kontrolle der Messungen durch S.Schob.

Die statistische Analyse und Korrelation der gewonnenen radiologischen Datensätze mit den histopathologischen Daten erfolgte dann unter Nutzung des Programms SPSS 23.0 gemeinsam mit S.Schob.

Währenddessen führte ich zudem eine Literaturrecherche unter Nutzung der Pubmed-Datenbank durch und entwickelte gemeinsam mit S.Schob die Konzeption der Publikation.

Schlußendlich erfolgte dann das Verfassen eines Entwurfes der Publikation und das Erstellen sowie die Auswahl der Visualisierung der Ergebnisse und Methodik gemeinsam mit S.Schob. Die Überarbeitung des Entwurfs und die Finalisierung erfolgte dann zusammen mit S.Schob und A.Surov.


pp Dr. M. Krause
Kinderneurochirurgie

Leipzig, den 13.08.2018 (M. Krause)

5. Darstellung des eigenen wissenschaftlichen Beitrages bei geteilter Erstautorenschaft

Die vorliegende Arbeit wurde unter geteilter Erstautorenschaft publiziert, im Folgenden werde ich den eigenen wissenschaftlichen Beitrag darstellen.

Zu Beginn der Arbeit durchsuchte ich die Patientendatenbank der Klinik für Radiologie nach Patienten mit einem primären Lymphom des zentralen Nervensystems. Hiernach analysierte ich die Suchergebnisse bezüglich der Einschlußfähigkeit der gefundenen Patientendaten und wählte diese dementsprechend aus. Danach erfolgte die Akquise der Bilddatensätze zur weiteren Analyse.

Hiernach erfolgte die Messung der in der Arbeit beschriebenen Parameter an den Bilddatensätzen. Hierzu wurde ein DICOM Analyse Tool verwendet, in welches ich durch S.Schob ausführlich eingearbeitet wurde. Es erfolgte dann die Erfassung der untersuchten Parameter, die Ergebnisse der Messungen konnte ich dann ausführlich mit S.Schob und A.Surov diskutieren. Anschließend erfolgte dann eine Kontrolle der Messungen durch S.Schob.

Die statistische Analyse und Korrelation der gewonnenen radiologischen Datensätze mit den histopathologischen Daten erfolgte dann unter Nutzung des Programms SPSS 23.0 gemeinsam mit S.Schob.

Währenddessen führte ich zudem eine Literaturrecherche unter Nutzung der Pubmed-Datenbank durch und entwickelte gemeinsam mit S.Schob die Konzeption der Publikation.

Schlußendlich erfolgte dann das Verfassen eines Entwurfes der Publikation und das Erstellen sowie die Auswahl der Visualisierung der Ergebnisse und Methodik gemeinsam mit S.Schob. Die Überarbeitung des Entwurfs und die Finalisierung erfolgte dann zusammen mit S.Schob und A.Surov.



Leipzig, den 13.08.2018 (C.Richter)

6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Bernd Hübner

Kiel, den 17.07.2018

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bedanken bei meinen Eltern, welche mir in jedem Abschnitt meines Lebens eine unvergleichbare Sicherheit und Unterstützung geboten haben.

Und bei Rebecca, welche mir mit Rat und Tat zur Seite steht und immer die nötige Geduld aufbringen konnte.

Sowie Stefan Schob und Alexey Surov für die Unterstützung und Anleitung zu der vorliegenden Arbeit.