Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Nuklearmedizin
Prof. Dr. Ambros J. Beer, Ärztlicher Direktor

Multimodale PET- und MRT-Bildgebung im Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) – Modell für die initiale Evaluation spezifischer Radioligandenakkumulation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Andrea Barbara Franziska Koch
geboren in Nabburg
2022

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ambros J. Beer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Volker Rasche
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. Regine Schneider-Stock
Tag der Promotion:	17.11.2023

Teile dieser Dissertation sind erschienen in:

Winter G†, **Koch ABF†,** Löffler J, Lindén M, Solbach C, Abaei A, Li H, Glatting G, Beer AJ, Rasche V: Multi-Modal PET and MR Imaging in the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Model for Initial in Vivo Testing of Target-Specific Radioligands. Cancers 12: 1248 (2020); This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/, © 2020 by the authors, Licensee MDPI, Basel, Switzerland, doi:10.3390/cancers12051248.

† These authors contributed equally to the work.

Winter G, **Koch ABF**, Löffler J, Jelezko F, Lindén M, Li H, Abaei A, Zuo Z, Beer AJ, Rasche V: *In vivo* PET/MRI Imaging of the Chorioallantoic Membrane. Front Phys 8: 151 (2020); This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY), Copyright © 2020 by the authors, doi: 10.3389/fphy.2020.00151.

Die Widmung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Tierversuche in der präklinischen Forschung 1

1.2 Das HET-CAM-Modell 2

1.2.1 Die Entwicklung des Hühnerembryos und die Entstehung der Chorioallantoismembran 2

1.2.3 Anwendung des HET-CAM-Modells in der biomedizinischen Forschung 5

1.3 Das Prostatakarzinom, das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) und der Ligand PSMA-11 6

1.4 Die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 9

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 10

2. Material und Methoden 11

2.1 Materialliste 11

2.2 Zellkultivierung 16

2.3 Durchführung des HET-CAM-Modells 17

2.4 Versuchsvorbereitung 19

2.4.1 Zellaussaat 19

2.4.2 Vorbereitung der Eier für die MRT-Messungen 21

2.5 Die MRT-Messung 22

2.6 Vorbereitung und Applikation von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 22

2.7 Die PET-Messung 24

2.8 Die Gamma Counter-Messung 25

2.9 Histologie 25

2.9.1 Vorbereitung 25

2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 25

2.9.3 Immunhistochemie 27

2.10 Überlagerung der MRT- und PET-Daten 30

2.11 Gamma Counter-Quantifizierung und -Evaluation 31

2.12 Statistische Auswertungen 31

3. Ergebnisse 32

3.1 Das HET-CAM-Modell 32

3.2 *In ovo* MRT- und PET-Bildgebung 33

3.3 Gamma Counter-Evaluation 36

3.4 Histologische Nachweise 41

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 41

3.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von PSMA 41
4. Diskussion 43
4.1 Analyse der spezifischen Bindung von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 im HET-CAM-Modell 43
4.2 Vergleich der Ergebnisse mit korrespondierenden Daten aus Experimenten mit Mäusen 44
4.3 Die Aufnahme des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 im PSMA-negativen Xenograft (PC-3) und im Hühnerembryo 45
4.4 Vorteile der MRT-Bildgebung für die Detektion des Tumorwachstums und die Tumorvolumetrie 45
4.5 Methodische und logistische Aspekte des HET-CAM-Modells 47
4.6 Limitationen des HET-CAM-Modells 49
5. Zusammenfassung 54
6. Literaturverzeichnis 56
Anhang 79
Anhang 1: Auswahl der Hühnerembryonen für die Experimente 79
Anhang 2: Aktivitätsverhältnisse basierend auf den PET-Daten (PSMA$^+$/PSMA$^-$) 81
Anhang 3: Ausgewählte MRT, PET/MRT-Überlagerungen und die zugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven exemplarisch anhand von 16 HET-CAM-Experimenten 83
Anhang 4: Zeit-Aktivitäts-Kurven 87
Anhang 5: Gamma Counter-Rohdaten [Counts Per Minute (CPM)] 90
Anhang 6: Gamma Counter-Daten [%IA] 92
Anhang 7: Verhältnisse der Aktivität (PSMA+/PSMA$^-$) basierend auf der Tumorakkumulation [%IA] 94
Anhang 8: Aktivitätsverhältnisse (PSMA$^+$/PSMA$^-$) 96
Anhang 9: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g] für LNCaP C4-2 + PC-3 und Gesamtaktivität im Hühnerembryo 98
Anhang 10: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g] für LNCaP + PC-3 100
Anhang 11: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g] für LNCaP C4-2 + Hintergrundsignal in der Chorioallantoismembran (CAM) 101
Anhang 12: Aktivitätskonzentrationen (Tumor/Gesamt) 102
Anhang 13: Vergleich der Ergebnisse dieser HET-CAM-Studie mit Daten aus Experimenten mit Mäusen 104
Danksagung 106
Lebenslauf 108

Abkürzungsverzeichnis

%IA	Prozent der injizierten Aktivität
^{18}F-FDG	^{18}F-Fluordesoxyglucose
2-PMPA	engl. 2- (phosphonomethyl)pentanedioic acid
Å	Ångström
a.d.	Destilliertes Wasser, lat. Aqua Destillata
ABC	Avidin-Biotin Komplex, engl. Avidin-Biotin Complex
AMG	Arzneimittelgesetz
bFGF	engl. Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chorioallantoismembran
CPM	engl. Counts Per Minute
CT	Computertomographie
$CuSO_4$	Kupfersulfat
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDD	Embryonaler Entwicklungstag, engl. Embryo Development Day
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FWHM	Volle Halbwertsbreite, engl. full width at half maximum
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HBED-CC	engl. N,N‘-bis-[2-hydroxy-5(carboxyethyl)benzyl]ethylenediamine-N,N‘-diacetic acid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HET-CAM	engl. Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane
MAP	Maximum a posteriori
MBq	Megabequerel

mCi	Millicurie
MRI	engl. Magnetic Resonance Imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
NAAG	engl. N-acetyl-aspartyl-glutamate
NAALADase	engl. N-acetylated-α−linked-acidic dipeptidase
NaCl	Natriumchlorid
Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
NEA	Nichtessenzielle Aminosäuren
NSA	engl. Number of Signal Averages
OSEM	engl. Ordered Subset Expectation Maximization
PBA	Phosphatgepuffertes Albumin, engl. phosphate buffered albumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
Pen. /Strep.	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
PV	Partialvolumen
PVE	Partial-Volumen-Effekte
RARE	engl. Rapid Aquisition with Relaxation Enhancement
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. revolutions per minute
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie, engl. single photon emission computed tomography

T	Tesla
T3	Trijodthyronin
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
Trypsin/EDTA	Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure
TSE	engl. Turbo-Spin-Echo
VOI	engl. Volume-of-Interest

1. Einleitung

1.1 Tierversuche in der präklinischen Forschung

Für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten werden stetig neue Pharmaka entwickelt. Zur Evaluation der Verträglichkeit und Wirksamkeit dieser Substanzen sind klinische Studien an Patienten notwendig. Jedoch sind vor dem Testen von Pharmaka am Menschen präklinische Studien zur Vorevaluation obligat. Dabei wird meist mit Zellversuchen begonnen, den *in vitro* Studien, in welchen oft nur eine Zelllinie verwendet wird. Dadurch lassen sich nicht die pharmakologischen Eigenschaften einer Substanz nach Applikation in einen Menschen wiedergeben, wie z.B. die biologische Distribution einer Substanz über das Blutsystem, ihre Aufnahme in verschiedene Organe, deren Metabolisierung oder die Exkretion. Diese Charakteristika werden unter dem Oberbegriff der Pharmakokinetik zusammengefasst. Die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes wird bisher in Tierversuchen untersucht. Tiermodelle können wesentlich mehr Informationen über das Verhalten einer Substanz im Organismus liefern als Zellstudien, auch wenn diese ebenfalls nur Näherungen zum Menschen sind. Dennoch erlauben sie deutlich bessere Vorhersagen über die Wirkung im menschlichen Organismus. Bisher sind Tierversuche die vielversprechendste Möglichkeit, um Versuchsergebnisse zu erhalten, die man auf die Anwendung im Menschen übertragen kann. Deshalb sind Studien in Tieren aktuell für die Entwicklung neuer Pharmaka noch notwendig und unerlässlich. Meist werden Mäuse oder Ratten für die Experimente verwendet. Mit dem Fokus auf das Wohlergehen der Tiere wird auch hier beständig nach alternativen bzw. verbesserten Methoden gesucht auf Basis der 3R-Prinzipien nach Russel und Burch von 1959. Dabei werden drei verschiedene Ansätze verfolgt. Die Verringerung („Reduction“) der Anzahl von verwendeten Tiere, z.B. durch Optimierung von Methoden bzw. besserer Planung der Versuche, ist ein Ansatz der 3R-Prinzipien. Die Versuchszahl wird also auf ein notwendiges Minimum reduziert. Unter dem Begriff Verbesserung („Refinement“) fällt die Anwendung von Methoden, die zu einer Minimierung des Leidens und zu einer Förderung des Wohlbefindens der Tiere beitragen. Besonders wünschenswert ist natürlich der 3. Aspekt, unter dem nach Möglichkeiten gesucht wird, die Tierversuche durch Alternativmethoden zu ersetzen („Replacement“) [148].

In Deutschland wird das Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)-Modell als vielversprechende Alternative für Tierversuche in verschiedenen Anwendungsfällen betrachtet.

In den letzten Jahren gewinnt dieses Modell an Attraktivität und Popularität in der EU, da Hühnerembryonen bis zum Schlupf nicht zu lebenden Tieren gezählt werden [4]. Allerdings gibt es in der Literatur unterschiedliche Auffassungen darüber, ab wann Hühnerembryonen Schmerzen empfinden. Deshalb wird empfohlen, Experimente so früh wie möglich durchzuführen und Methoden mit einer minimalen Belastung für den Hühnerembryo zu verwenden [3, 15, 21, 40, 49, 50, 107, 145, 146]. In anderen Ländern gibt es bereits mehrere Einschränkungen hinsichtlich der Verwendung des HET-CAM-Modells. In der Schweiz dürfen Studien mit Hühnerembryonen nur bis zum 13. Entwicklungstag durchgeführt werden [38]. In den USA ist die Dauer der Experimente mit Hühnerembryonen vom jeweiligen Bundesstaat abhängig [83-86].

1.2 Das HET-CAM-Modell

Das HET-CAM-Modell bietet im Vergleich zu Experimenten mit Mäusen oder Ratten viele Vorteile. Da dieses Modell in der EU nicht als Tierversuch gilt, kann aufgrund des geringeren administrativen Aufwands umgehend mit den Experimenten begonnen werden. Des Weiteren sind sowohl die Anschaffungs- als auch die Haltungskosten im Vergleich zu Experimenten mit Mäusen oder Ratten deutlich geringer. Aufgrund der ausgeprägten Vaskularisation der Chorioallantoismembran (CAM) und des noch nicht ausgereiften Immunsystems des Hühnerembryos [58, 89, 136, 170], ist das HET-CAM-Modell von großem Interesse für präklinische Studien mit onkologischen Fragestellungen, da Tumoren gut auf der CAM etabliert werden können.

1.2.1 Die Entwicklung des Hühnerembryos und die Entstehung der Chorioallantoismembran

Die Entwicklung eines Hühnerembryos dauert 20 bis 21 Tage bis zum Schlupf [72]. Während der Embryonalentwicklung entstehen vier extraembryonale Membranen: Dottersack, Amnion, Allantois und Chorion, die auch als Serosa bezeichnet wird. Das Chorion ist eine den Embryo samt Dottersack umgebende Hülle und besteht aus Ektoderm und parietalem Mesoderm. Die Allantois ist sowohl entodermalen als auch mesodermalen Ursprungs und dient als Aussackung der Kloake zur Aufbewahrung harnpflichtiger Substanzen, die vor dem Schlupf nicht abgegeben werden können [43].
Am 5. Inkubationstag fusionieren die mesodermalen Anteile von Allantois und Chorion zur Chorioallantoismembran (Abbildung 1). Die CAM besteht somit aus drei Schichten: Ektoderm,

Mesoderm und Entoderm und umgibt nach der Hälfte der Bebrütungszeit das Albumen komplett [143].

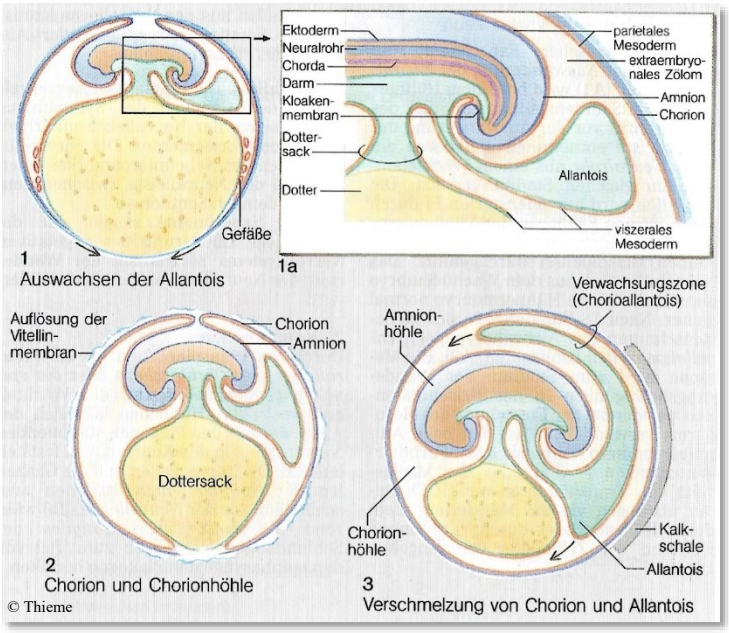


Abbildung 1: Entwicklung der Chorioallantois nach Drews 1997. Am 4. Entwicklungstag des Hühnerembryos wächst die Allantois in das extraembryonale Zölom (Chorionhöhle) vor (1, 1a). Das Wachstum des extraembryonalen Zöloms schreitet voran (2) und bildet nach seiner Vereinigung eine einheitliche Chorionhöhle. Die Allantois verschmilzt mit dem Chorion und bildet die Chorioallantois (3) [43], (© Thieme, weitere Verwendung nur mit Genehmigung des Verlags).

Eine Besonderheit in der Membran ist die Ausbildung eines umfangreichen Gefäßsystems. Dabei kann das Kapillarwachstum in 3 Phasen unterteilt werden. In der frühen Phase (5. bis 7. Inkubationstag) bildet sich ein kapilläres Netzwerk, das durch Aussprossung von Kapillaren in die mesenchymale Schicht zwischen Amnion und Chorion entsteht. In der intermediären Phase (8. bis 12. Inkubationstag) dominiert die Formation kleiner interkapillärer Netze durch intussuszeptives mikrovaskuläres Wachstum. Ab dem 13. und 14. Entwicklungstag ist die grundlegende Morphologie der Membran ausgereift, jedoch wachsen das Kapillarnetzwerk [152] und das Gefäßsystem bis zum 18. Tag weiter [7, 135]. Die Gefäßentwicklung von Hühnerembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien ist in Abbildung 2 dargestellt. Ferner erfolgt ab dem 10. Inkubationstag der Kalziumtransport von der Schale in den Embryo über die CAM zur Bildung der Knochensubstanz [31, 91]. Durch das Epithel der Allantois wird zudem die Diffusion toxischer Substanzen aus der Allantoisflüssigkeit in den Embryo verhindert und dieser dadurch geschützt [64].

Der Gasaustausch des Hühnerembryos findet zunächst im Kapillarnetz des Dottersacks statt. Mit fortschreitendem Wachstum des Hühnerembryos und der Verkleinerung des Dottersacks

übernimmt die CAM diese Aufgabe [43]. Eine weitere Möglichkeit für einen Gasaustausch ist die Luftkammer, die sich nach dem Legen und Abkühlen des Eis zwischen der inneren und äußeren Eihaut am stumpfen Pol bildet [128, 144]. Rokitka und Rahn konnten sowohl eine Zunahme bezüglich der Porendichte als auch der Wasserdurchlässigkeit der Eierschale vom spitzen Pol bis zum stumpfen Pol zeigen [142]. Die Reduktion des Wassergehalts durch Verdunstung führt zu einer Vergrößerung der Luftkammer während der Inkubation [128].

Die Ausbildung des Immunsystems im Hühnerembryo ist ein weiteres für das HET-CAM-Modell relevantes Entwicklungsphänomen. Obwohl die Entwicklung des Immunsystems schon während der Embryonalperiode beginnt, ist das Immunsystem erst nach dem Schlupf vollständig ausgereift. Subpopulationen von B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Retikulozyten können bereits in frühen Entwicklungsstadien in der Milz des Hühnerembryos nachgewiesen werden. Die Ausbildung relevanter Strukturen der Milz, die für ein adäquates Immunsystem benötigt werden, beginnt jedoch erst am 20. Entwicklungstag und ist vor der ersten Woche nach dem Schlupf des Embryos noch nicht abgeschlossen [89, 112, 113]. Auch die weißen Blutkörperchen werden erst im Laufe der Embryonalentwicklung in einer größeren Anzahl gebildet. Friend et al. untersuchten die Entwicklung von Leukozyten in Hühnerembryonen, die am 14. Entwicklungstag nur vereinzelt und erst ab dem 19. und 20. Entwicklungstag in wesentlichen Mengen nachgewiesen werden konnten [62].

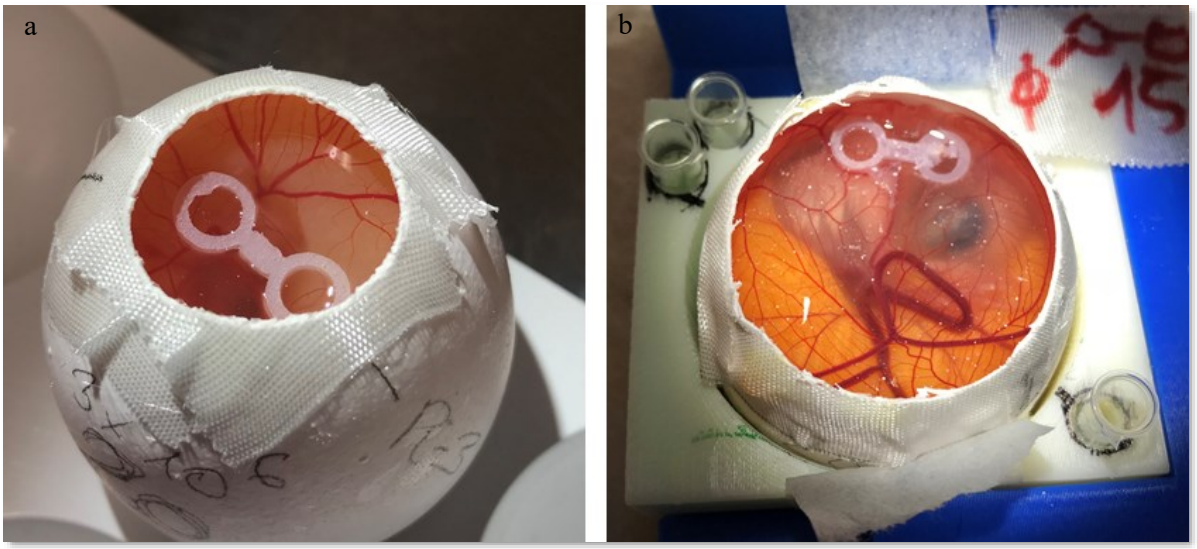


Abbildung 2: Abbildung von Hühnerembryonen, die für die Experimente mit dem Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Modell verwendet wurden. Dargestellt sind zwei an den spitzen Enden geöffnete Hühnereier mit auf der Chorioallantoismembran (CAM) liegenden Silikon-Doppelringen. Die Embryos befinden sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Am 6. Entwicklungstag des Hühnerembryos sind bereits Gefäße in der CAM erkennbar. Auf der Schale wurde die ausgesäte Zellzahl und die Zelllinie mit Bleistift markiert (a). Die rechte Abbildung zeigt einen Hühnerembryo am 12. Entwicklungstag mit einem ausgereifteren Kapillarnetzwerk sowie Gefäße größeren Durchmessers. Das Ei befindet sich in einer speziellen Halterungen und ist von drei Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) -Tubes umgeben (b); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

1.2.3 Anwendung des HET-CAM-Modells in der biomedizinischen Forschung

Durch die Beschaffenheit und Funktion der CAM und aufgrund der starken Ausprägung ihres Gefäßsystems wird die Membran als Oberfläche für die Durchführung von medizinischen und/oder biologischen Experimenten verwendet [126]. Als prominentes Beispiel dient hierfür die Anwendung des HET-CAM-Modells als Alternative für den Draize-Test, bei dem Toxizitätsstudien mit Chemikalien an Kaninchenaugen durchgeführt werden [108, 110].
Aufgrund des noch nicht komplett ausgereiften Immunsystems in der frühen Entwicklungsphase des Embryos eignet sich das HET-CAM-Modell gut für Experimente mit Xenografts [123, 139]. Bereits 1912 untersuchten Murphy und Rous das Wachstum von Sarkomzellen, die in den Hühnerembryo und in die CAM implantiert wurden [122]. 1931 wurden von Woodruff und Goodpasture Methoden zur Inokulation von Vogelpockenviren in die CAM entwickelt [180]. Des Weiteren wird das Modell für Transplantationsstudien [46], die Bewertung von Angiogenese [123], die Erforschung der Wundheilung [134], die Gewinnung neuer Erkenntnisse in Tumorwachstum und Metastasierung [30, 39, 45, 76, 99, 129, 137] und für Medikamenten- und Toxikologiestudien [138] genutzt.
Auch in der Bildgebung findet das HET-CAM-Modell bereits Anwendung, beispielsweise zur Evaluation der Biodistribution von Substanzen in Tumorxenografts und im Hühnerembryo [179]. Die Magnetresonanztomographie (MRT) wird aufgrund der hohen Auflösung und der Möglichkeit einer exakten Darstellung kleinster anatomischer Strukturen für Studien mit dem HET-CAM-Modell verwendet. Faucher et al. untersuchten das Tumorwachstum von Glioblastomzellen, die mit Gadoliniumoxid-Nanopartikeln markiert wurden [56]. Zuo et al. evaluierten die Biodistribution von mit Kontrastmittel angereicherten Pharmaka im Mammakarzinom-Xenograft und im Hühnerembryo [191]. Von Herrmann et al. wurde die Tumorgröße von Neuroblastom-Xenografts untersucht, die mit einem fluoreszierenden Protein und Eisenpartikeln markiert wurden [77]. Doch nicht nur die MRT, sondern auch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die eine hohe Sensitivität aufweist, wird für Untersuchungen mit dem HET-CAM-Modell genutzt. Würbach et al. untersuchten mittels PET den Knochenmetabolismus durch Quantifizierung der Anreicherung des Radioliganden ^{18}F-Fluorid [183]. Zlatopolskiy et al. visualisierten den Tryptophanstoffwechsel mit Hilfe der PET und untersuchten die Anreicherung von Fluortryptophanen, die an verschiedenen Positionen mit ^{18}F markiert wurden, in Mamma- und Prostatakarzinom-Xenografts und im Hühnerembryo [189]. Aufgrund der geringen räumlichen Auflösung der PET wird jedoch in den meisten Studien die

PET bzw. Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT, engl. single photon emission computed tomography) mit einer Computertomographie (CT) kombiniert, um anatomische Strukturen darzustellen. Gebhardt et al. evaluierten mit Hilfe einer PET/CT die Anreicherung von ^{18}F-, ^{64}Cu- und ^{68}Ga-markierten Radioliganden im Hühnerembryo [65]. Eine Anreicherung von neuen Radioliganden im Glioblastom und im Hühnerembryo wurde von Warnock et al. mittels PET/CT analysiert [174]. Haller et al. untersuchten die Biodistribution und Stabilität von ^{18}F-, ^{99m}Tc-, ^{125}I- und ^{177}Lu-markierten Radiopharmaka im Hühnerembryo mit Hilfe von PET und oder SPECT/CT [75]. Dupertuis et al. inokulierten Tumorsphäroide in die CAM und untersuchten sowohl das Tumorvolumen als auch die Aufnahme des Radiotracers ^{18}F-Fluordesoxyglucose (^{18}F-FDG) und des Kontrastmittels Telebrix-38 mittels PET/CT [45]. Als geeignetere Methode für die Bildgebung des HET-CAM-Modells mit Xenografts ist jedoch die Kombination von PET und MRT. Im Vergleich zur CT werden in der MRT unter anderem Weichteilgewebe und Gefäße besonders gut dargestellt, wodurch Tumorxenografts auf der CAM detailliert untersucht werden können. Steinemann et al. evaluierten mit diesen Modalitäten die Auswirkung des antineoplastischen und antiangiogenetischen Inhibitors Animacroxam auf testikuläre Keimzelltumor-Xenografts, die auf der CAM etabliert wurden. Die Tumoren konnten mit Hilfe der MRT klar abgegrenzt und die jeweiligen Volumina bestimmt werden. Zur Untersuchung der Stoffwechselaktivität wurde die unspezifische Aufnahme von Glucose in den Tumoren durch eine ^{18}F-FDG PET ermittelt. Die Fusion von PET und MRT zeigte eine Korrelation zwischen der Tumorgröße und der ^{18}F-FDG-Aufnahme, bzw. eine Korrelation zwischen der Verringerung des Tumorvolumens durch den Inhibitor und der reduzierten ^{18}F-FDG-Aufnahme [161]. Die initiale Evaluation der spezifischen Akkumulation eines neu entwickelten, zielgerichteten Radioliganden in Tumorxenografts, die auf der CAM etabliert wurden, wurde vor der hier vorliegenden Studie bisher jedoch noch nicht mittels kombinierter PET und MRT durchgeführt [178].

1.3 Das Prostatakarzinom, das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) und der Ligand PSMA-11

Das Prostatakarzinom ist mit 22,7 % die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland [140]. Jedes Jahr erkranken etwa 60.000 Männer neu an diesem Tumor. Die Mortalität hat sich bis 2007 stetig verringert und verläuft seitdem annähernd konstant, doch durch die demographische Entwicklung der Bevölkerung wird ein Anstieg der Inzidenz und Prävalenz des Prostatakarzinoms angenommen [109, 140].

Eine Möglichkeit der Früherkennung des Prostatakarzinoms ist die Bestimmung der Konzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum. PSA wird von den Epithelzellen der Prostata sezerniert (physiologisch) und ist organspezifisch. Erhöhte Blutserumkonzentrationen deuten auf eine Malignität hin, werden aber auch bei benignen Erkrankungen, wie z.B. bei einer physiologischen Hyperplasie, die im fortgeschrittenen Alter auftreten kann, gemessen [52].

Doch für eine zielgerichtete Tumordiagnostik und auch Therapie sind spezifische Strukturen notwendig, an denen geeignete Substanzen binden können. Das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) ist physiologisch in der Prostata nachweisbar und wird auf der Membran von Karzinomzellen exprimiert [12, 82]. Die Expression des PSMAs ist in den Tumorzellen jedoch höher und steigt mit der Karzinomprogression an [82, 181]. PSMA wird nachweislich auch in anderen Organen exprimiert, wie z.B. im Gehirn, in der Niere, der Speicheldrüse, im Duodenum und im Colon [87, 154]. Im Vergleich zu prostatischen Geweben ist die Konzentration jedoch 10- bis 1000-fach geringer [158]. Des Weiteren ist PSMA bei der Neovaskularisation maligner Tumoren nachweisbar, jedoch nicht in Gefäßen benigner Gewebe [26].

In der Literatur wird das PSMA Protein auch als Glutamat-Carboxypeptidase II, N-acetylated-α−linked-acidic dipeptidase (NAALADase) oder Folat-Hydrolase bezeichnet (Enzyme Commission (EC)-Nummer 3.4.17.21) [19, 24, 111, 130]. Es handelt sich um ein transmembranes Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 100-120 kDa [51, 54, 121] und einer Länge von 750 Aminosäuren. Das Monomer enthält 3 Domänen: eine helikale, eine apikale und eine Protease-Domäne. Die Protease-Domäne beinhaltet eine ~ 20 Ångström (Å) lange Substratbindetasche mit zwei katalytischen Zinkatomen. Das PSMA Protein liegt funktional als Homodimer vor [34, 117]. Die Kristallstruktur von PSMA ist in Abbildung 3 dargestellt.

Das spezifische Substrat der Glutamat-Carboxypeptidase II ist das N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) [141, 155, 156]. Robinson et al. beschrieben 1987 erstmals die Hydrolyse von NAAG durch die Glutamat-Carboxypeptidase II in N-Acetyl-Aspartat und Glutamat [141]. Dieser Metabolismus konnte auch in weiteren Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden [16, 155, 160]. Der erste beschriebene spezifische Inhibitor der Glutamat-Carboxypeptidase II ist die 2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA). Nach Bindung von 2-PMPA kann NAAG nicht abgebaut werden [88, 156]. Basierend auf den chemischen Strukturen von NAAG und 2-PMPA wurden eine Vielzahl neuer PSMA-spezifischer Liganden für die Radionukliddiagnostik und -therapie des Prostatakarzinoms entwickelt [11, 47, 61, 68, 78, 114]. Eder et al. entwickelten 2012 den PSMA-spezifischen Liganden N,N‘-bis-[2-hydroxy-5(carboxyethyl)benzyl]ethylenediamine-N,N‘-diacetic acid (HBED-CC)-PSMA. Das Peptid ist ein

Harnstoff-basierender PSMA-Inhibitor und besteht aus dem Chelator HBED-CC, einem Linker und der pharmakophoren Gruppe Glu-urea-Lys(Ahx) (Abbildung 3). Radiomarkiert mit ^{68}Ga wird dieser PSMA-spezifische Ligand erfolgreich als PSMA-11 in der nuklearmedizinischen PET-Diagnostik des Prostatakarzinoms eingesetzt [1, 2, 47, 48, 119, 150, 162]. Die verhältnismäßig kurze Zeit zwischen Substanzentwicklung und klinischer Anwendung ist darin begründet, dass keine langjährigen Studien durchgeführt werden mussten. Da in der Nuklearmedizin nach dem Tracer-Prinzip gearbeitet werden kann, bei dem so geringe Substanzmengen eingesetzt werden, dass sie keine metabolische Wirkung haben, gilt hier ein Sonderfall des Arzneimittelgesetzes (AMG). Gemäß §13 Abs. 2b des AMGs dürfen Arzneimittel erlaubnisfrei hergestellt werden, wenn die Herstellung unter fachlicher Verantwortung zum Zweck einer persönlichen Anwendung bei Patienten erfolgt [44]. Diese Arzneimittel können, nach Einwilligung des Patienten, ohne weitere klinische Studien direkt angewendet werden.

Ferner wird das PSMA als Bindungsstelle für Radionuklidtherapeutika zur Behandlung des Prostatakarzinoms diskutiert. Die Anwendung des PSMA-Derivats ^{177}Lu-PSMA-617 als Radionuklidtherapeutikum wird bereits klinisch erprobt und könnte eine vielversprechende zukünftige Möglichkeit für eine zielgerichtete Tumortherapie des Prostatakarzinoms sein [80, 131, 185].

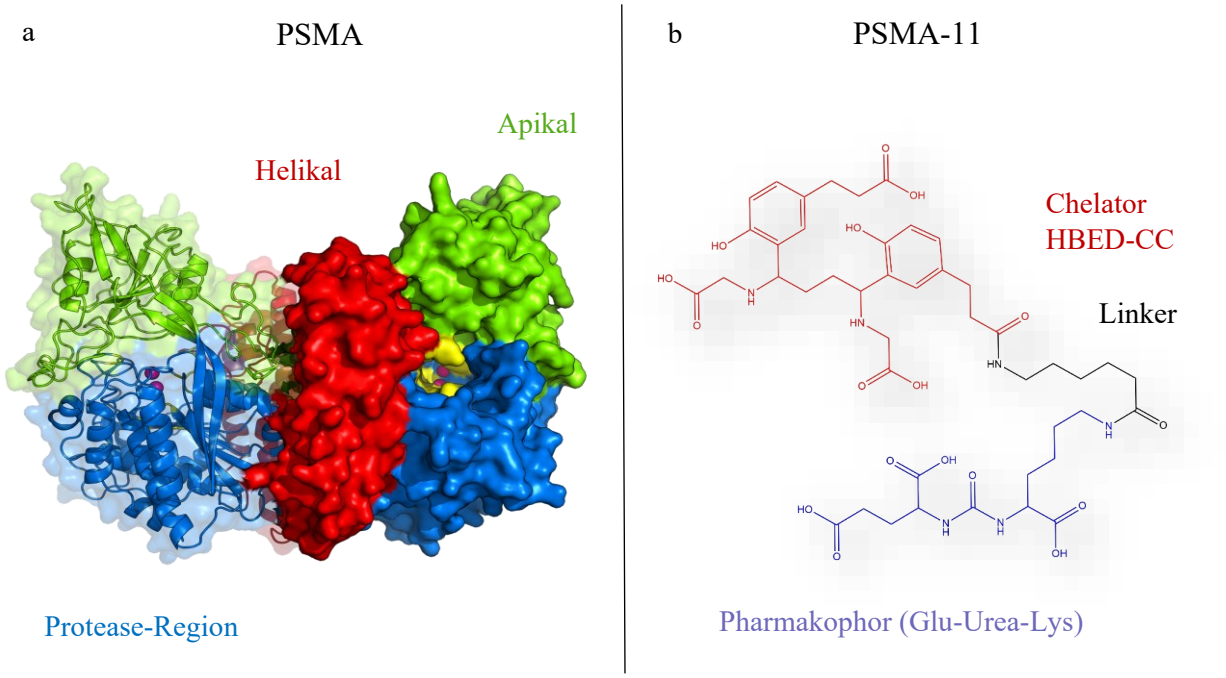


Abbildung 3: Kristallstruktur des Prostata-spezifischen Membranantigens (PSMA) nach Davis et al. (a) [34]. Dargestellt sind die apikale, helikale und die Protease-Region mit 2 katalytischen Zink-Atomen (orange) und den Substrat-Bindetaschen (gelb). Auf der rechten Seite ist die chemische Struktur von PSMA-11 abgebildet (b). Der Chelator N,N‘-bis-[2-hydroxy-5(carboxyethyl)benzyl]ethylenediamine-N,N‘-diacetic acid (HBED-CC) (rot) begünstigt die Interaktion der pharmakophoren Gruppe Glu-urea-Lys (blau) mit der hydrophoben Tasche des PSMAs [34, 48]; (Abdrücke mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gordon Winter, Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Nuklearmedizin).

1.4 Die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien für die Experimente verwendet: LNCaP (DSMZ, D), LNCaP C4-2 (ViroMed Laboratories, USA) und PC-3 (DSMZ, D). Die Zelllinie LNCaP wurde von Horoszewicz et al. aus einer Metastase eines humanen Prostatakarzinoms isoliert [81] und exprimiert sowohl PSA als auch PSMA [37, 151, 157, 166, 169]. Der Nachweis von Androgen- und Östrogenrezeptoren sowohl in LNCaP-Zellen als auch in den Tumorxenografts spricht für eine Hormonsensibilität dieser Zelllinie [81]. Wu et al. entwickelten eine Methode zur Herstellung der LNCaP C4-2-Sublinie als Derivat der LNCaP-Zelllinie. Dazu erfolgte eine Ko-Injektion von LNCaP und MS, einer Zelllinie aus Knochenstroma, in männliche Mäuse. Nach Kastration der Mäuse und einer weiteren Wachstumsperiode wurden Zellen aus dem neu entstandenen Tumor erneut mit MS in bereits kastrierte männliche Mäuse ko-injiziert und es entstand die Zelllinie LNCaP C4-2. Diese Zelllinie exprimiert ebenso PSA, ist jedoch aufgrund der verminderten Anzahl an Androgenrezeptoren im Vergleich zu LNCaP nicht sensibel gegenüber entsprechender Hormongabe [182]. Des Weiteren ist PSMA auch in LNCaP C4-2

nachweisbar [55]. Die PSMA Proteinexpression pro Zelle ist in dieser Zelllinie höher als in LNCaP (~ 1,7 Millionen vs. ~ 1 Million) [166]. Als Kontrollzelllinie wurde in den Experimenten die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 verwendet. Dabei handelt es sich um eine androgenunabhängige Zelllinie aus einer Knochenmetastase eines menschlichen Prostatakarzinoms, die kein PSMA exprimiert [93, 169]. Verglichen mit LNCaP Tumoren sind PC-3 Tumoren weniger vaskularisiert, stärker hypoxisch und wachsen zudem invasiver [165, 167].
Die gut etablierten Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 wurden schon in vielen Studien erfolgreich für diverse Fragestellungen eingesetzt [73, 101, 127, 149, 153, 188] und für die Experimente dieser Studie primär nach ihrer unterschiedlichen Fähigkeit zur PSMA-Expression ausgewählt.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation des HET-CAM-Modells für die Untersuchung der spezifischen Akkumulation neu entwickelter Radioliganden unter der Verwendung einer kombinierten PET und MRT. Aufgrund der besonderen klinischen Relevanz wurde dafür exemplarisch das Prostatakarzinommodell ausgewählt, das in der Klinik für Nuklearmedizin sehr gut etabliert ist. Die Zielstruktur in dieser HET-CAM-Studie ist das PSMA, das in menschlichen Prostatakarzinomen oft überexprimiert wird [163]. Für die Untersuchungen wurde der spezifische Radioligand [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet, der bereits in der klinischen Anwendung zum Einsatz kommt. Die Anreicherung des Liganden soll in Xenografts der PSMA-positiven Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, sowie dessen Derivat LNCaP C4-2, untersucht werden. Als Kontrolle wird die PSMA-negative Zelllinie PC-3 verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sollen demonstrieren, dass das HET-CAM-Modell als Alternative zu Tierversuchen bei initialen Studien neu entwickelter Liganden eingesetzt werden kann [178].

2. Material und Methoden

Teile folgender Kapitel sind in Winter und Koch et al. [178] und Winter et al. [179] erschienen.

2.1 Materialliste

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien mit Bezeichnung, Firma und Katalognummer

Bezeichnung	Firma	Katalognummer
Zelllinien		
LNCaP	DMSZ, D	ACC 256
LNCaP C4-2	ViroMed Laboratories, USA	
PC-3	DMSZ, D	ACC 465
Medien		
Adenin	Sigma-Aldrich, USA	A3159
Apotransferrin	Sigma-Aldrich, USA	T1147
Biotin	Sigma-Aldrich, USA	B4639
DMEM (high glucose 4,5 mg/ml)	Gibco, UK	41966-029
FKS	Biochrom/Merck, D	S0115
Hams F12 Medium	Biochrom, D	F0815
Insulin from bovine pancreas	Sigma-Aldrich, USA	I1882
L-Glutamin	Biochrom/Merck, D	K0282
Na-Pyruvat	PAN-Biotech, D	P04-43100
NEA	PAN-Biotech, D	P08-32100
PBS	Biowest, France	L0615-500
Pen./Strep.	Thermo Scientific, USA	15140/122
RPMI 1640 Medium	Biochrom, D	F1215
T3	Sigma-Aldrich, USA Merck, D	IRMM469
Trypsin/EDTA	Biochrom, D	L2143
Geräte		
Aktivimeter CRC-12	Capintec, USA	
Drehwerkzeug Ladekabel	Dremel, NL	2607225629

Drehwerkzeug 8200	Dremel, NL	F013820077
HEKA-Favorit-Olymp	HEKA Brutgeräte, D	Lab/I
Kaltlichtquelle KL2500 LED	Schott, D	
Kühlgerät	Liebherr, D	471-0481
Kleintier-PET Scanner, Focus 120	Siemens Medical Solutions, Inc., D	
Axioskop 2 plus in Kombination mit AxioCamMRC-TV2/3"C	Zeiss, D	
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, D	
Mini Star Zentrifuge	neoLab, D	D-6020
Multifuge 3 S-R	Heraeus, D	
Radionuklid-Generator	iThemba LABS, ZA	
Rotationsmikrotom Leica JUNG RM 2045	Leica JUNG, D	
Small Animal MRI, Bruker BioSpec 117/16	Bruker Biospin, D	
Thermo Scientific MSC 1.2 1/PE AC	Thermo Scientific, D	51025411
Wasserbad Aqualine AL 12	Lauda, D	
Festmaterial		
C-Chip disposable Haemocytometer	NanoEnTek, USA	DHC-N01
Einbettkassette - Universal weiß mit Deckel	KABE Labortechnik, D	053760
Einmalkanülen 0,3 x 12 mm 0,55 x 25 mm	 Henke-Sass, Wolf, D Braun, D	 471003012 4657675
Eppendorf Reference® (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, D	
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, D	022431081
Färbekästen ROTILABO® blau gelb	ROTH, D	 HA44.1 HA45.1

grün rosa weiß		HA46.1 HA47.1 HA48.1
Falcon Conical Centrifuge Tubes 50 ml	Thermo Fisher Scientific, D	10788561
Falcon Serologiepipetten 5 ml 10 ml 25 ml 50 ml	 Corning Inc., USA Corning Inc., USA Corning Inc., USA Corning Inc., USA	 356543 357551 357525 357550
Falcon Tissue Culture Flask 600 ml	BD, USA	355000
Feindosierungsspritzen 1 ml	Braun, D	9166017V
KL2500 LED	Schott, D	
Leukosilk S 2,5 cm x 9,2 mm	BSN medical, D	46834-00
Menzel-Gläser Deckgläser 24x60 mm	Thermo Fisher Scientific, D	L40357
Menzel-Gläser Superfrost ® PLUS Objektträger	Thermo Fisher Scientific, D	J1840AMNZ
PCR single tube 0,2 ml	Sarstedt, D	72.737.002
Silikon-Doppelringe	Universität Ulm, D	
Thermo Scientific ART Pipetten-spitzen 10 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, D	 2140 2065E 2069 2079
Vorsatzgerät Biegsame Welle (225)	Dremel, NL	26150225JA
Wattestäbchen	Applimed SA, CH	1001208
Chemikalien		

Acetic acid, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, D	33209-1L
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, CA	H-3300
Aqua Destillata (a.d.)	Apotheke Universität Ulm, D	
Entellan® Neu	Merck KGaA, D	107961
Ethanol 100 %, vergällt	Apotheke Universität Ulm, D	
Ethanol 98 %, vergällt	Nuklearmedizin Universität Ulm, D	
Ethanol 96 %, vergällt	Nuklearmedizin Universität Ulm, D	
Ethanol 95 %, vergällt	Nuklearmedizin Universität Ulm, D	
Ethanol 80 %, vergällt	Nuklearmedizin Universität Ulm, D	
Ethanol 70 %, vergällt	Nuklearmedizin Universität Ulm, D	
Ethanol 50 %, vergällt	Nuklearmedizin Universität Ulm, D	
Eosin-Phloxin Lösung, alkoholisch	Merck KGaA, D	102480
Fisher Chemical™ Permount™	Thermo Fisher Scientific, D	15820100
Formaldehyd 36 % (39% m/v)	VWR, D	20909
Isofluran Baxter	Apotheke Universität Ulm, D	
H_2O_2	Merck KGaA, D	H1009
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	Merck KGaA, D	105174
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun SE, D	3570350
Kupfersulfatlösung	Merck KGaA, D	102784
Matrigel Matrix	Corning, USA	354248
Normal Serum (Blocking Serum)	Vector Laboratories, CA	PK-8800
Opsite Spray Flüssigpflaster	smith&nephew, D	66004980
PAP PEN	Science Services, D	N71310
PSMA-HBED-CC (PSMA-11)	ABX GmbH, D	
Toluen	ROTH, D	KK46.1
Salzsäure	Merck KGaA, D	109057

Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, USA	93595-50ML
VECTASTAIN® Elite® ABC Kit Peroxidase (HRP)	Vector Laboratories, CA	PK-6100
Vector® DAB Peroxidase Substrate	Vector Laboratories, CA	SK-4100
Xylol (Isomere) >98 % rein, für die Histologie	ROTH, D	9713
[^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC ([^{68}Ga]Ga-PSMA-11)	Radiopharmazie, Universitätsklinikum Ulm	
Antikörper		
Anti-γ-Prostata-spezifisches Membranantigen Antikörper [YPSMA-1], Maus monoklonal	abcam, UK	ab19071
Biotinylierter Universal Antikörper (Horse Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG)	Vector Laboratories, CA	PK-8800
Software		
Amide (Version 1.0.4)	SourceForge, USA	
GraphPad PRISM (Version 9.0.0)	GraphPad Software, CA	
IBM SPSS Statistics 26	IBM, USA	
microPET Manager	Siemens Medical Solutions, Inc., USA	
microPET SSD	Siemens Medical Solutions, Inc., USA	
3DSlicer (Version 4.10.2)	GitHub, USA	
Vinci Software (Version 5.02)	Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung Köln, D	
Sonstiges		
Hühnereier	LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetriebe GmbH & CoKG, D	
Wasser	Fisher Chemical, D	10449380

2.2 Zellkultivierung

In dieser Arbeit wurden die humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP (DSMZ, ACC 256, D), LNCaP C4-2 (ViroMed Laboratories, USA) und PC-3 (DMSZ, ACC 465, D) verwendet. Die Adhäsionszelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit 600 ml Fassungsvermögen (Falcon Tissue Culture Flask, BD, USA) als Monolayer mit den entsprechenden Nährmedien (siehe Tabelle 2) in einem Inkubator (Thermo Scientific, USA) bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Thermo Scientific, USA). Die dafür notwendigen Reagenzien wurden vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad (Lauda, D) auf 37°C erwärmt. Nach der Entnahme des verbrauchten Kulturmediums erfolgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, engl. phosphate buffered saline) (Biowest, France). Durch Zugabe von 5 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin/EDTA) (Biochrom, D) und Inkubation bei 37 °C für 4 Minuten, wurden die adhärenten Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach vorsichtigem Abklopfen und anschließendem Überprüfen des Ablösens durch Mikroskopieren (Zeiss, D) wurde zur Inaktivierung des Trypsinierungsprozesses 10 ml an Medium zugegeben. Nach sorgfältiger Resuspension wurden die Zellen auf die neuen Kulturflaschen verteilt und mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährmedien für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 (RPMI = Roswell Park Memorial Institute, DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FKS = Fetales Kälberserum, Pen./Strep. = Penicillin/Streptomycin, NEA = Nichtessenzielle Aminosäuren); Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Zelllinie	**LNCaP**	**LNCaP C4-2**	**PC-3**
Grundmedium	RPMI 1640 Medium	DMEM (high Glucose 4,5 mg/ml)	RPMI 1640 Medium
Zusätze	Natrium-Pyruvat (1 mM)	Hams F12 Medium (20 %)	Hams F12 Medium (10 %)
	FKS (10 %)	FKS (5 %)	FKS (10 %)
	Pen./Strep. (1 %)	Pen./Strep. (1 %)	Pen./Strep. (1 %)
	L-Glutamin (2mM)	Adenin (25 µg/ml)	L-Glutamin (2 mM)
	NEA	Apotransferrin (5 µg/ml)	
		Biotin (0,25 µg/ml)	
		Insulin (5 µg/ml)	
		Trijodthyronin (T3) (136,5 µg/ml)	

2.3 Durchführung des HET-CAM-Modells

Für die Durchführung der Experimente mit dem HET-CAM-Modell wurden Hühnereier der Rasse White Leghorn (LSL Rhein-Main, D) verwendet.

Die Hühnereier wurden mit 70 % Ethanol (Nuklearmedizin Universitätsklinikum Ulm, D) desinfiziert und unter Verwendung von Kunststoff-Eierwaben (HEKA Brutgeräte, D) bei 37,8 °C, 5 % CO_2 und 65 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert (HEKA Brutgeräte, D). Die Eier wurden zu Beginn der Inkubation (embryonaler Entwicklungstag, engl. Embryo Development Day (EDD) 0) mit dem stumpfen Pol nach oben zeigend gelagert und kontinuierlich im Rhythmus von zwei Stunden gewendet. An EDD 2 wurden die Eier umgedreht, die Schale auf der spitzen Seite angebohrt (Drehwerkzeug 8200 mit Vorsatzgerät Biegsame Welle (225), Dremel) und das entstandene Loch zur Stabilisierung der Schale großflächig mit zwei Streifen Leukosilk S (BSN medical, D) überklebt. Die Öffnung wurde vorsichtig mit einer gebogenen Schere auf einen Durchmesser von etwa 2 cm ohne Anschneiden der CAM erweitert. Die Befruchtung der Eier wurde durch Schieren mit einer Kaltlichtquelle (Schott, D) kontrolliert und unbefruchtete Eier

aussortiert. Das Abdecken der Öffnung erfolgte mit einem weiteren Streifen Leukosilk S, um die Gefahr der Kontamination zu verringern und gleichzeitig einen Gas- und Luftfeuchtigkeitsaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten. Die geöffneten Eier wurden nicht mehr im Brutschrank gewendet. Die Öffnung in den Hühnereiern wurde an EDD 5 erweitert, um das Einlegen von Silikon-Doppelringen (Durchmesser von 0,5 mm pro Ring) (Universität Ulm, D) auf die CAM zu ermöglichen. In diese Silikon-Doppelringe erfolgte an EDD 6 die Aussaat der Tumorzellen. Es wurden von jeder Zelllinie (LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3) jeweils 1,5 Millionen Zellen pro Ring ausgesät. Pro Ei wurden maximal zwei Zelllinien pipettiert, um folgende Kombinationen zu erhalten: LNCaP und PC-3, LNCaP C4-2 und PC-3 und LNCaP C4-2 allein (siehe 2.4.1). Die Entwicklung der Tumorxenografts und der Hühnerembryonen wurde regelmäßig visuell überprüft und protokolliert. Zwischen EDD 12 und 16 wurden die Messungen am offenen Hühnerei durchgeführt. Nach Vorbereitung der Eier für die Messungen (siehe 2.4.2) wurden hochauflösende MRT-Aufnahmen mit einem Kleintier-MRT (engl. Small Animal (Magnetic Resonance Imaging) MRI, (BioSpin 116/17, Bruker, USA) angefertigt (siehe 2.5). Danach wurde der Ligand [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in ein Blutgefäß der CAM injiziert (siehe 2.6) und dynamische PET-Messungen (Focus 120, Siemens Medical Solutions, Inc., USA) durchgeführt (siehe 2.7). Nach der PET-Messung wurden die Tumoren und ein Teil der CAM für die Gamma Counter (Cobra II, PerkinElmer, USA) -Messungen und für histologische Untersuchungen entnommen (siehe 2.8 und 2.9). Die Embryonen wurden nach Beendigung der Experimente durch Dekapitation getötet. Eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Experimente mit dem HET-CAM-Modell ist in Tabelle 3 und in Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Experimente mit dem Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Modell (EDD = Embryo Development Day); Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

EDD	**Aktion**
0	Start der Inkubation
2	Öffnen der Eier
5	Einlegen der Silikonringe
6	Zellaussaat
12-14	Durchführung der Experimente

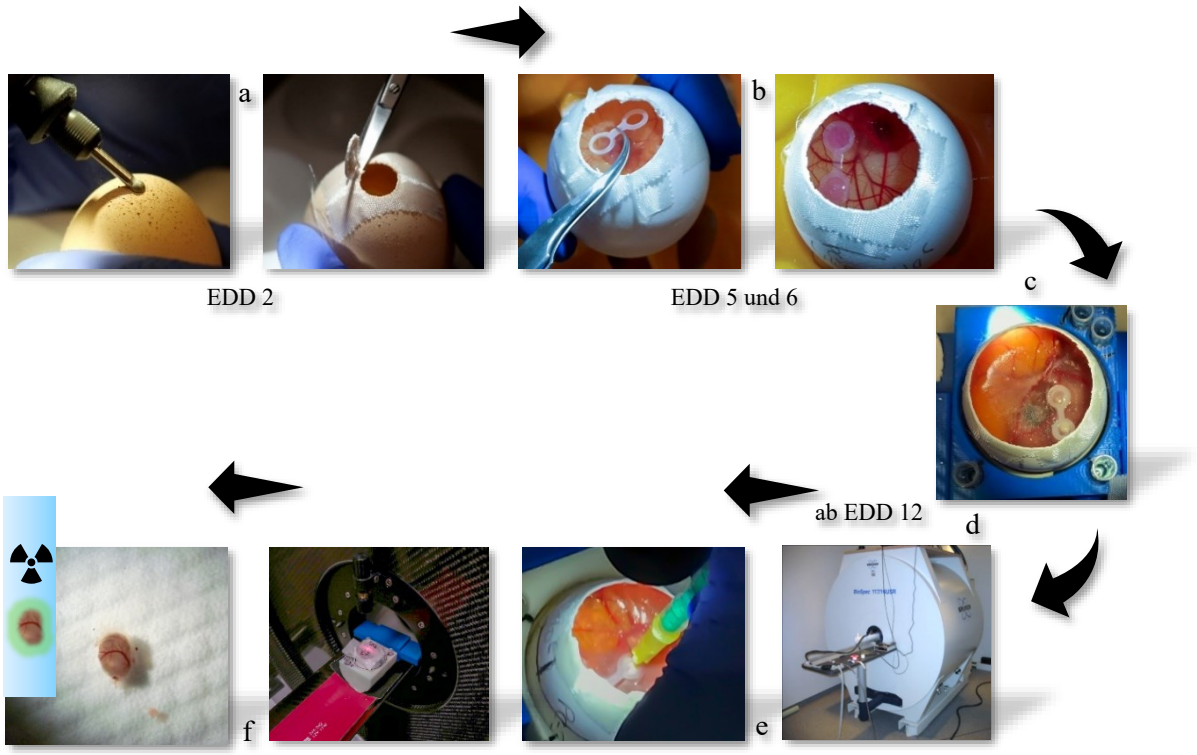


Abbildung 4: Ablauf der Experimente mit dem Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Modell. Der Inkubationsbeginn der Hühnereier wurde als Embryonal Development Day 0 (EDD 0) definiert. Die Eier wurden an EDD 2 vorsichtig geöffnet (a). An EDD 5 und 6 erfolgte das Einlegen der Silikon-Doppelringe und die Aussaat der Zellen (b). Die Entwicklung der Tumorxenografts und der Hühnerembryonen wurde regelmäßig überprüft (c). Zwischen EDD 12 und 16 wurden die bildgebenden Messungen durchgeführt. Im Anschluss an hochauflösende Magnetresonanztomographie (MRT)-Messungen (d) erfolgte die Injektion des Liganden in ein Blutgefäß der Chorioallantoismembran (CAM) (e). Nach dynamischen Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Messungen wurden die Tumoren und ein Teil der CAM entnommen, gewaschen und die akkumulierte Aktivität mittels Gamma Counter-Messungen bestimmt (f); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/; Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

2.4 Versuchsvorbereitung

2.4.1 Zellaussaat

An EDD 6 erfolgte die Zellaussaat von 1,5 Millionen Zellen der Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 oder PC-3 Zellen, angesetzt in einer Lösung bestehend aus 40 % Matrigel Matrix (Corning, USA) und 60 % fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, D). Matrigel wurde vor der Verwendung über Nacht im Kühlschrank aufgetaut, um die notwendige Konsistenz zur Verarbeitung des Gels zu erhalten. Die Eier wurden einer Vitalitätskontrolle unterzogen und verstorbene

Embryonen aussortiert. Anhand der Anzahl der vitalen Eier erfolgte die Berechnung der insgesamt benötigten Zellen und des Volumens an FKS und Matrigel sowie die Abschätzung der benötigten Zellkulturflaschen. Um die adhärenten Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.2 beschrieben trypsiniert. Nach Zugabe des für die Zelllinie entsprechenden Mediums erfolgte die Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Gefäß (Falcon Conical Tubes, BD, USA) und eine anschließende Zentrifugation (Multifuge 3 S-R, Heraeus, D) bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm, engl. revolutions per minute) und 22 °C über 5 min zur Trennung von Zellen und Medium. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets mit dem benötigten Volumen des entsprechenden Mediums resuspendiert. Nach erfolgreicher Resuspension wurde das Gesamtvolumen der Zellsuspension für die Berechnung der Zellzahl notiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau 0,4 % (Sigma-Aldrich, USA) verdünnt. Nach mehrmaliger Resuspension wurden 10 µl des Gemischs in eine Zählkammer (C-Chip disposable Haemocytometer, NanoEnTek, USA) pipettiert. Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung der Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer. Jeder Quadrant hat ein Volumen von 0,1 mm^3 bzw. 10^{-4} cm^3, bei einer Größe von 1x1 mm mit einer Kammertiefe von 0,1 mm. Somit konnte die Zellzahl anhand Formel 1 berechnet werden. Da die für die Eier insgesamt benötigte Menge an Zellen anfangs bestimmt und das Gesamtvolumen der Zellsuspension nach der Resuspension notiert wurde, erfolgte nun die Berechnung der benötigten neuen Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation und anschließendem Dekantieren wurde das Zellpellet in der zuvor berechneten Menge FKS resuspendiert. Zur Vorbereitung der Matrigel Matrix wurde das notwendige Volumen mit einer 1 ml Feindosierungsspritze (Braun, D) und einer 0,55 x 25 mm Kanüle (Braun, D) in ein 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf AG, D) überführt. Eine homogene Zell-Matrigel-Suspension wurde mit Hilfe einer 1000 µl Pipette erstellt. Dafür wurde die Pipettenspitze um 1-2 mm gekürzt, um das Pipettieren zu erleichtern. Die Arbeiten mit Matrigel und der Zell-Matrigel-Suspension erfolgte auf Eis, da Matrigel bei höheren Temperaturen eine feste Matrix bildet. Um ein Auskühlen der Embryos zu verhindern, wurde durch Optimierung der Versuchsabläufe und kurze Wege die Aufenthaltszeit der Eier außerhalb des Inkubators minimiert. Für die Etablierung der Tumorxenografts wurden jeweils 30 µl der Zell-Matrigel-Suspension pro Zelllinie in die Ringe pipettiert. Die Beschriftung und Markierung der Eier erfolgten mit Bleistift.

Formel 1: Formel zur Berechnung der Zellzahl.

$$Teilchen\ pro\ Volumen\ [\mu l] = \frac{(\sum ausgezählte\ Teilchen\ pro\ Quadrant)/4}{ausgezählte\ Fläche\ (mm^2) * Kammertiefe\ (mm) * Verdünnung}$$

2.4.2 Vorbereitung der Eier für die MRT-Messungen

Vor Beginn der MRT-Messungen wurden die Hühnerembryos zur Minimierung von Bewegungsartefakten für 60 min bei 4-8 °C im Kühlschrank inkubiert. Die Öffnung der Eierschale wurde sorgfältig ohne Verletzung der Membran bis auf das mögliche Maximum erweitert. Anschließend wurden 1 ml einer 0,9 % Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (Fresenius Kabi AG, D) auf die Membran pipettiert. Die Eier wurden in einer, speziell für die Messungen mittels 3D-Druck angefertigten Halterung (Universität Ulm, D) platziert und zusätzlich zur Stabilisierung mit Leukosilk S fixiert. Für eine Überlagerung der MRT- und PET-Daten wurde die Halterung mit vier asymmetrisch (1-1-2) verteilten Markern versehen. Dafür wurden vier Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) -Tubes (Sarstedt, D) nach Entfernung der Kappe in dafür vorbereitete Vertiefungen der Halterung gesetzt und 50 µl einer 0,1 molaren Kupfersulfat ($CuSO_4$)-Lösung in jedes Tube pipettiert. Für die PET-Bildgebung erfolgte vor dem Start der Messung eine zusätzliche Gabe von 1 µl der vorliegenden Radioaktivität. Zur Vereinfachung der Wiedererkennung der Tumoren in den MRT- und PET-Aufnahmen wurde die Seite des LNCaP bzw. LNCaP C4-2 Tumors in Richtung der doppelten Marker positioniert (Abbildung 5). Für eine leichte Narkose des Embryos wurde die CAM-Oberfläche mit 3 % Isofluran (Apotheke Universität Ulm, D) beströmt.

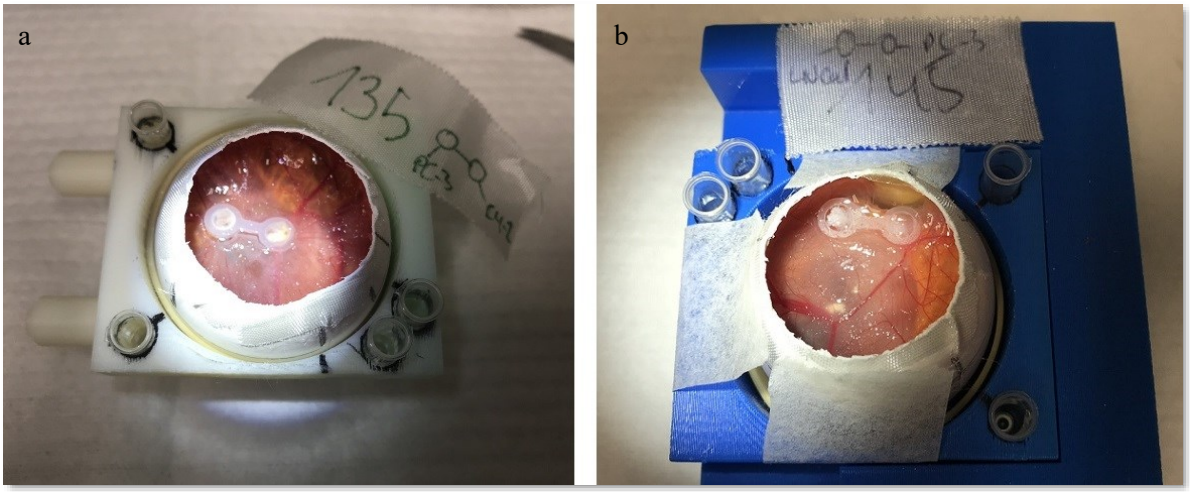


Abbildung 5: Beispiel für vorbereitete Hühnereier, die für die Experimente mit dem Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Modell verwendet wurden, für die Magnetresonanztomographie (MRT)- und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Messungen. Für die Dokumentation erhielten alle Eier eine fortlaufende Nummer, hier 135 (a) und 145 (b). Die Eier wurden in speziellen Halterungen positioniert und Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) -Tubes als Marker entsprechend angeordnet. LNCaP C4-2 (a, rechter Ring) bzw. LNCaP (2, linker Ring) Tumoren wurden in Richtung des doppelten Markers positioniert, um die Wiedererkennung der Position in den MRT-Aufnahmen zu erleichtern. PC-3 Tumoren sind jeweils im anderen Ring gewachsen. Bleistiftmarkierungen auf der Schale unterstützen eine Repositionierung des Eis z.B. nach Messung im Aktivimeter (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

2.5 Die MRT-Messung

Die MRT-Messungen wurden basierend auf der Methode nach Zuo et al. [190, 191] mit einem 11,7 Tesla (T) Kleintier-MRT in der Arbeitsgruppe (AG) von Professor Rasche (Experimental Cardiovascular Imaging, Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm) durchgeführt. Dargestellt wurden Tumorstruktur, -volumen und -lokalisation mittels hochauflösender T2-gewichteter Rapid Aquisition with Relaxation Enhancement (RARE-) Sequenz mit folgenden Aufnahmeparametern: Repetitionszeit (TR)/ Echozeit (TE) = 4320/45 ms; Matrixgröße = 650 × 650; Auflösung in der Ebene = 77 x 91 μm^2; Schichtdicke = 0,5 mm; kein interslice gap; RARE Faktor = 8; Number of Signal Averages (NSA) = 4. Die Anzahl an Schnittbildern variierte zwischen 15 und 30 Schnitte in Abhängigkeit von der Tumorgröße mit einer Akquisitionszeit zwischen 15 und 35 min für eine Aufnahme.

2.6 Vorbereitung und Applikation von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11

Für die Experimente wurde der PSMA-spezifische Ligand PSMA-HBED-CC (PSMA-11) (ABX GmbH, D) verwendet. Die ^{68}Ga-Radiomarkierung des Pharmazeutikums zu [^{68}Ga]Ga-

PSMA-HBED-CC ([^{68}Ga]Ga-PSMA-11) erfolgte in der Abteilung für Radiopharmazie (Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Ulm, D) basierend auf den Protokollen von Eder et al. [47] und Schäfer et al. [150]. Für die Radiomarkierung wurde ein 50 Millicurie (mCi) (1850 Megabecquerel (MBq)) ^{68}Ge/^{68}Ga Radionuklid-Generator (iThemba LABS, ZA) verwendet. Das für die MRT-Messungen applizierte NaCl wurde vorsichtig von der Membran abpipettiert und Reste mit Hilfe von Wattestäbchen (Applimed SA, CH) entfernt. Während der Injektion von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 erlaubte eine Kaltlichtquelle die bessere Erkennung der Blutgefäße. 150 µl [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 (1,25 µg/ml) wurden in eine 1 ml Feindosierungsspritze luftblasenfrei aufgezogen (Abbildung 6). Für die Injektion wurde eine 0,3 x 12 mm Einwegkanüle (Braun, D) in einem Winkel von 90 bis 110° vorsichtig manuell gebogen, ohne die Spitze abzustumpfen. Die Auswahl eines geeigneten Blutgefäßes erfolgte auf Basis der visuellen Charakterisierung hinsichtlich der Größe, der Tiefe und der Lage zu den Tumoren. Tiefer liegende Gefäße waren zur Injektion aufgrund der hohen Beweglichkeit ungeeignet. Besonders schmale Gefäße wurden leichter durchstochen und waren deshalb ebenfalls kaum zur Injektion geeignet. Die Injektion sollte außerdem möglichst weit von den Tumoren entfernt stattfinden, um eine mögliche Kontamination bei dem leichten Blutaustritt nach der Injektion zu verhindern. Die Kontamination der Tumoren bei der Injektion, im Folgenden in dieser Arbeit als Paravasat bezeichnet, ist bedingt durch den Austritt von Blut nach der Injektion und die Verteilung des Blutes über die Membran. Die gebogene Kanüle wurde auf die Feindosierungsspritze aufgesetzt und 75 µl [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in ein Blutgefäß der CAM injiziert. Zum Stoppen der Blutung wurden nach dem Herausziehen der Kanüle Wattestäbchen auf die Injektionsstelle aufgedrückt und 150 µl Flüssigpflaster (Opsite Spray, smith&nephew, D) aufgetropft. Vor der Injektion wurde die Radioaktivität in der Spritze mittels Aktivimetermessungen (CRC-12, Capintec, USA) bestimmt. Nach der Injektion erfolgte die Bestimmung sowohl der Gesamtradioaktivität des Eis, als auch der verbleibenden Restaktivität im verwendeten Injektionsbesteck mit demselben Gerät. Die Gesamtradioaktivität im Ei wurde als 100 % der injizierten Aktivität (%IA) für die spätere quantitative Evaluation definiert. Der Injektionsverlauf wurde genau protokolliert, um z.B. eine Paravasation bei der Injektion bzgl. der Datenauswertung berücksichtigen zu können.

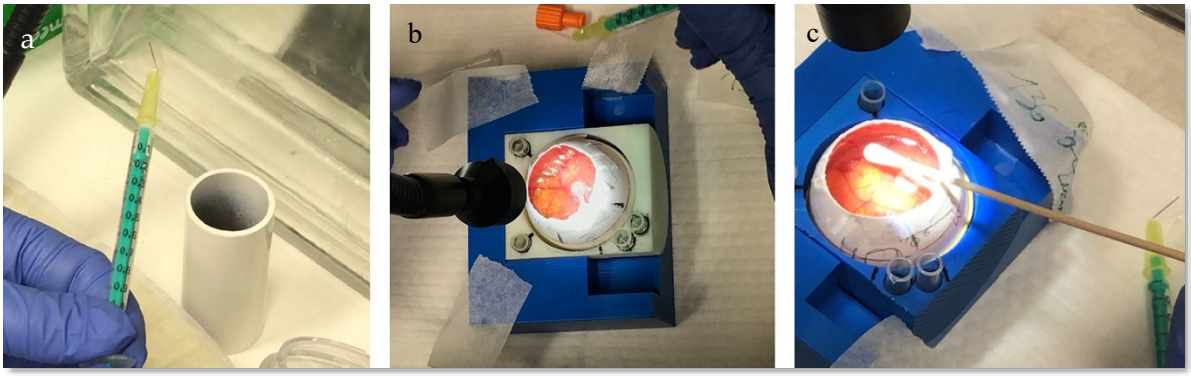


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die Vor- und Nachbereitung der Applikation von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, die im Rahmen dieser Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) – Studie durchgeführt wurde. Für die Injektion in ein Blutgefäß der Chorioallantoismembran (CAM) wurden 150 µl [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in eine Spritze luftblasenfrei aufgezogen und eine leicht gebogene Kanüle aufgesetzt (a). Vor der Injektion des Liganden erfolgte eine genau Begutachtung des Gefäßstatus der CAM, mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (b). Die Blutstillung nach der Injektion erfolgte mit einem Wattestäbchen, ohne die CAM zu verletzen (c); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

2.7 Die PET-Messung

Dynamische PET-Messungen wurden am Kleintier PET-Scanner Focus 120 mit einer räumlichen Auflösung von <1,3 mm und einer Sensitivität von > 7 % durchgeführt. Die PET-Öffnung hat einen Innendurchmesser von 12 cm und eine axiale Länge des „Field-of-View“ von 7,6 cm. Zuerst erfolgte eine Qualitätsmessung mit einer ^{68}Ge-Linienquelle für 10 min mit der Software microPET SSD. Die Tumorxenografts wurden im PET mit Hilfe eines Laserkreuzes zentral im Field of View, dem Bereich der höchsten Auflösung, positioniert. Die Messungen erfolgten mit der gerätespezifischen Software microPET Manager. Die Emissionsmessung wurde über 60 min ohne direktes Histograming durchgeführt (Protokoll: Emission_Ga-68_60min_ohne Histogramm (oH)). Für die Transmissionsmessung zur späteren Schwächungskorrektur wurde eine Cobalt-57-Punktquelle in das Gerät eingelegt und das Ei anschließend exakt repositioniert (Protokoll Tx_515s). Im Anschluss wurden zwei Histogramme (Sinogramme) für eine einzelne statische und eine zusätzliche dynamische (Frames: 12x5 min) Aufnahme erstellt (Protokolle: Emission und 60min_12x5). Die Rekonstruktion erfolgte iterativ nach einem „Ordered Subset Expectation Maximization“ (OSEM)-3D/Maximum a posteriori (MAP) Algorithmus: 4 OSEM-2D, 2 OSEM-3D und 18 MAP Iterationen.

2.8 Die Gamma Counter-Messung

Im Anschluss an die PET-Messungen wurden jeweils die Tumoren und ein Teil der CAM für die quantitative Bestimmung der akkumulierten Radioaktivität entnommen.
Dazu wurden die Tumoren und ein von der Injektionsstelle entfernt liegendes Membranstück entnommen und für 1 min in PBS gewaschen. Vorbereitend für die histologischen Analysen wurden die entnommenen Proben für die Gamma Counter-Messung jeweils in 1 ml einer Fixierlösung mit 4 % Formaldehyd (VWR, D) in PBS überführt. Drei weitere Proben dienten als Leerwert. Nach der Messung wurden die Proben aus den Röhrchen entnommen und für histologische Untersuchungen lichtgeschützt in der Fixierlösung in Einbettkassetten (KABE Labortechnik, D) für 24 h aufbewahrt.

2.9 Histologie

2.9.1 Vorbereitung

Die in der Fixierlösung eingelegten Einbettkassetten wurden im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Ulm) entwässert und konnten dort in Paraffin eingebettet werden. In der Klinik für Innere Medizin II (Universitätsklinikum Ulm) erfolgte das Schneiden der Paraffinblöcke an den zur Verfügung gestellten Mikrotomen. Vor dem Schneiden wurden die Einbettkassetten in einer Gefriertruhe vorgekühlt. Mit einem Rotationsmikrotom (Blockverschiebung Standard 4) wurden 4 µm Schnitte der LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 Tumoren sowie der CAM angefertigt. Die Schnitte wurden in ein erhitztes Wasserbad überführt und auf Objektträger (Menzel-Gläser Deckgläser, Thermo Fisher Scientific, D) aufgetragen. Anschließend erfolgte das Trocknen der Schnitte für 2 Stunden bei 56 °C in einem Wärmeschrank.

2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin (HE) -Übersichtsfärbungen wurden in Anlehnung an das Färbeprotokoll von Merck (H&E Färbung, MERCK, Darmstadt [115]) angefertigt, um geeignete Sektionen für die immunhistochemischen Nachweise auszuwählen. Die Objektträger mit den Schnitten der LNCaP C4-2 und PC-3 Tumoren und der CAM wurden einer Behandlung mit einer absteigen-

den Alkoholreihe, zwei Färbeschritten und einer aufsteigenden Alkoholreihe in 100 ml Färbekästen (Roth, D) unterzogen. Ein tabellarisches Kurzprotokoll der Färbung ist in Tabelle 4 aufgeführt. Für intensivere Färbeergebnisse wurden 0,2 ml Eisessig (Sigma-Aldrich, D) zu 100 ml Eosin-Phloxin-Lösung (Merck KGaA, D) zugegeben. Die Dokumentation der Färbungen wurde in der Klinik für Innere Medizin II (Universitätsklinikum Ulm) an einem Mikroskop (Axioskop 2 plus und AxioCamMRC-TV2/3“C, Zeiss, D) durchgeführt.

Tabelle 4: Protokoll der Hämatoxylin-Eosin (HE) -Übersichtsfärbungen in Anlehnung an das Färbeprotokoll von Merck [115]. Die Färbungen der Objektträger mit den Schnitten der den Hühnereiern entnommenen LNCaP C4-2 und PC-3 Tumoren und der Chorioallantoismembran (CAM) wurden gemäß folgendem Protokoll durchgeführt. Die Behandlung der Schnitte mit den jeweiligen Reagenzien erfolgte in 100 ml Färbekästen) (a.d. = lat. aqua destillata); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Schritt	**Zeit/Inkubationsdauer**
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Ethanol 100 %, vergällt	30 sec
Ethanol 100 %, vergällt	30 sec
Ethanol 96 %	30 sec
Ethanol 96 %	30 sec
Ethanol 70 %	30 sec
Ethanol 70 %	30 sec
a.d.	1 min
Färben in Hämatoxylin-Lösung mod. nach Gill III (filtriert)	3 min
Spülen in HCl-Lösung 0,1 %	2 sec
Leitungswasser, fließend	10 min
Färben in Eosin-Phloxin-Lösung	3 min
Ethanol 70 %	10 sec
Ethanol 96 %	10 sec
Ethanol 96 %	10 sec
Ethanol 100 %, vergällt	10 sec
Ethanol 100 %, vergällt	2 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Eindecken der Xylol-feuchten Präparate mit Entellan® Neu	

2.9.3 Immunhistochemie

Der histologische Nachweis der Expression von PSMA auf der Zelloberfläche erfolgte durch immunhistologische Färbungen mit dem Anti-PSMA Antiköper (YPSMA-1, abcam, UK) unter

Verwendung der Avidin-Biotin Komplex (ABC, engl. Avidin-Biotin Complex) - Methode. Dafür wurde das Färbeprotokoll von Frau Felicitas Genze (Institut für Naturheilkunde und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Ulm) in überarbeiteter Form verwendet.

Zunächst wurden die Schnitte mit Xylol (ROTH, D) entparaffiniert und durch mehrmaliges Waschen in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tabelle 5, Abbildung 7). Um die Epitope auf der Zelloberfläche zu demaskieren, wurden die Schnitte für 5 min in einer, auf 1 molares Citrat basierter Antigen Unmasking Solution (1:100; pH 6,0; Vector Laboratories, CA), gekocht. Nach dem Abkühlen für 10 min wurden die Schnitte in einer 30%igen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) /PBS Lösung über 1 min gewaschen, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blocken. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt für 5 min in PBS. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde zuerst phosphatgepuffertes Albumin (PBA, engl. phosphate buffered albumin) (1 % bovines Serumalbumin (BSA) in PBS) für 60 min auf die, mit einem PAP Pen (Science Services, D) umrandeten Schnitte, aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte in 2 % Normal Serum (Blocking Serum, Vector Laboratories, CA) in PBA für 30 min inkubiert. Zur Bindung des monoklonalen Primärantikörpers YPSMA-1 wurde eine 1:800 des Antikörpers in PBA aufgetropft und die Objektträger über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Der biotinylierte Sekundärantikörper (Vector Laboratories, CA) wurde nach einem weiteren Waschschritt mit PBS (2 x 5 min) in einer 1:200 Verdünnung mit PBA für 60 min in einer feuchten Kammer gebunden. Nach erneutem Waschen mit PBS für 2x5 min wurden die Schnitte mit einer auf Avidin/Biotin-basierten Lösung (VECTASTAIN® Elite® ABC Kit Peroxidase (HRP); Vector Laboratories, CA) für 30 min inkubiert und anschließend wieder für 2x5 min mit PBS gewaschen. Eine Färbereaktion erfolgte durch das Auftragen von Vector® DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories, CA) über 10 min. Das überschüssige Substrat wurde durch zweimaliges Waschen (je 5 min) mit destilliertem Wasser (a.d., lat. Aqua Destillata) entfernt. Für die Gegenfärbung wurde eine Hämatoxylin-Lösung mod. nach Gill III (Merck KGaA, D) verwendet. Die Schnitte wurden mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Toluen (ROTH, D) rehydriert (Tabelle 5) und abschließend mit Fisher Chemical™ Permount™ (Thermo Fisher Scientific, D) eingedeckt. Die Durchführung der Entparaffinierung, Re- und Dehydrierung und der Waschvorgänge erfolgte in 100 ml Färbekästen. Bis auf die Inkubation des primären Antikörpers (4 °C) wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die aufgetragenen Volumina der Lösungen betrugen jeweils 100 µl pro Schnitt.

Tabelle 5: Schritte der Entparaffinierung, De- und Rehydrierung der Objektträger mit den Schnitten der den Hühnereiern entnommenen LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 Tumoren; (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Schritt	**Zeit**
Entparaffinierung und Dehydrierung	
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Ethanol 95%	5 min
Ethanol 95%	5 min
Ethanol 80%	5 min
Ethanol 50%	5 min
Rehydrierung	
Ethanol 95%	2 min
Ethanol 95%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Toluol	2 min
Toluol	2 min

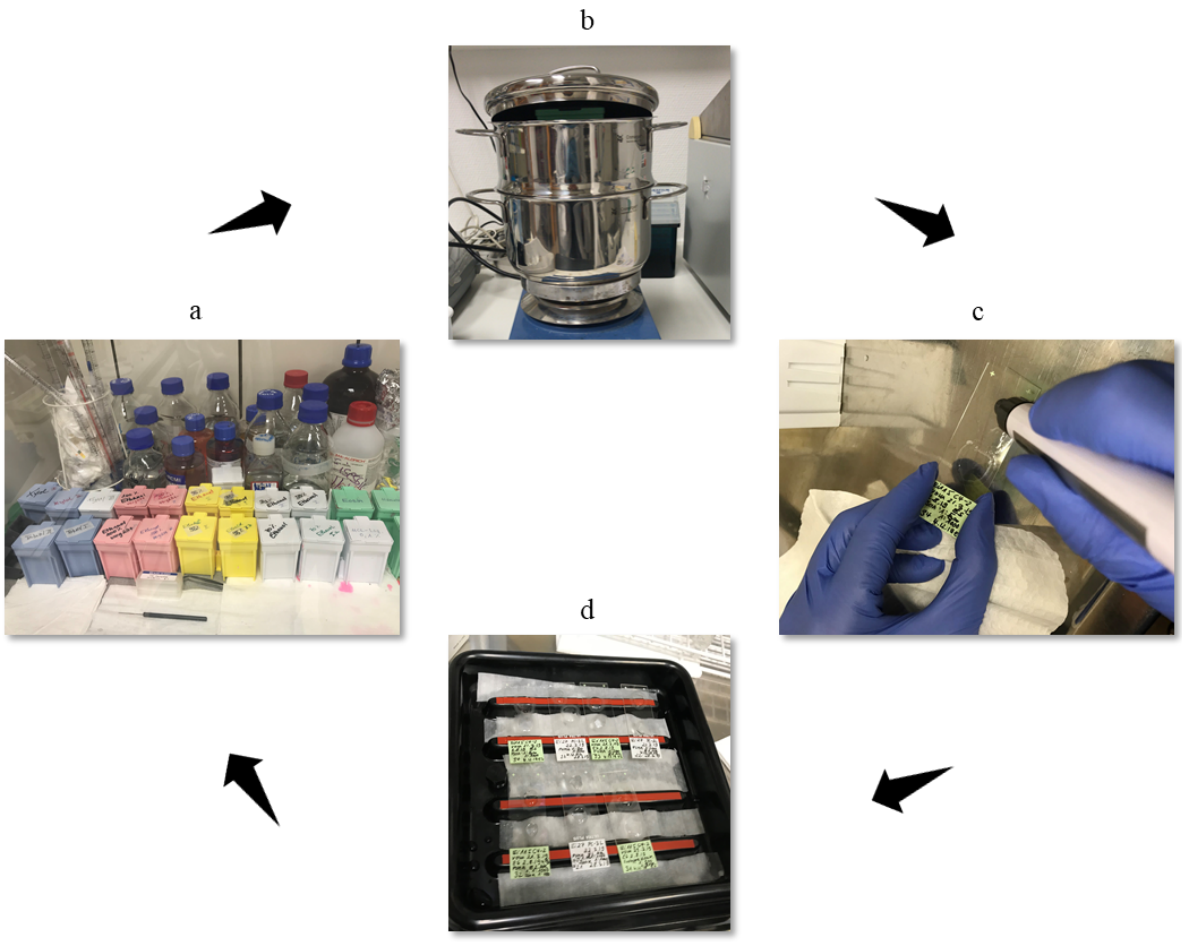


Abbildung 7: Überblick über die Anti-PSMA Antiköper (YPSMA-1) – Antikörperfärbung, die im Rahmen dieser Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) – Studie durchgeführt wurde. Zunächst wurden die Schnitte der den Hühnereiern entnommenen LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 Tumoren in 100 ml Küvetten entparaffiniert und dehydriert (a). Es folgte die Demaskierung mittels Antigen Unmasking Solution mit Hilfe eines Dampfgarers (b). Nach Wasch- und Blockierungsschritten wurden die Schnitte für die weitere Behandlung mit einem PAP Pen umrandet (c). Die Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers, der auf Avidin/Biotin basierten Lösung und des Substrats für die Visualisierung der Bindung erfolgte in einer feuchten Kammer (d). Nach der Gegenfärbung mit einer Hämatoxylin-Lösung mod. nach Gill III wurden die Schnitte rehydriert (a) und anschließend eingedeckt; (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

2.10 Überlagerung der MRT- und PET-Daten

Für die Zuordnung der Aktivität zu Tumor, Embryo und Injektionsstelle wurden die MRT- und PET-Daten mit Hilfe der Programme 3DSlicer ver. 4.10.2 (www.slicer.org) [57] und Amide ver. 1.0.4 überlagert. Eine dafür notwendige Formatumwandlung der PET-Daten erfolgte in der Software Vinci ver. 5.02 (Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung Köln, D) [171]. Die Überlagerung erfolgte anhand beschriebener Referenzmarker (vgl. 2.4.2). Mit Hilfe des „Segmentation Tools“ der Software 3DSlicer wurden die Silikon-Doppelringe und Tumoren in den

MRT-Bildern markiert, um in den PET-Aufnahmen die Aktivität in den Tumorregionen zu lokalisieren. Für die Evaluation der Aktivitätsaufnahme über die Zeit wurden innerhalb der Software Amide Volumes-of-Interest (VOIs) mit einer Größe von 5 x 5 x D mm^3 in die Bereiche der inneren Silikonringe gezeichnet, wobei D mindestens 1,5 mm betrug und entsprechend der Tumorgröße angepasst wurde. Für die Analyse der VOIs wurde der Voxel-basierte Mittelwert der Daten für jedes Frame (12 x 5 min) verwendet.

2.11 Gamma Counter-Quantifizierung und -Evaluation

Gamma Counter-Messungen wurden für die genaue Quantifizierung der Akkumulation der Radioaktivität in den Tumoren durchgeführt. Nach Berechnung der Zerfallskorrektur (Formel 2) erfolgte die Bestimmung des Anteils an aufgenommener Aktivität im Vergleich zur injizierten Aktivität. Zur Evaluation der Akkumulation des Liganden wurde das Verhältnis der aufgenommenen Aktivität in den Tumoren bestimmt und zusätzlich unter Berücksichtigung der jeweiligen Tumorvolumina angegeben (Radioaktivität im Tumor (PSMA+/PSMA-) / Tumorvolumen (PSMA+/PSMA-)). Dabei zeigten Werte > 1 eine höhere Akkumulation in den PSMA-positiven Tumorregionen.

Formel 2: Berechnung der Zerfallskorrektur.

$$N0 = \frac{N(t)}{e^{(-\lambda \cdot t)}}$$

2.12 Statistische Auswertungen

Für die statistische Analyse wurde der Wilcoxon-Vorzeichen Rang-Test mit Hilfe der Software GraphPad Prism ver. 9.0.0 für Windows (www.graphpad.com) verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Teile folgender Kapitel sind in Winter und Koch et al. [178] und Winter et al. [179] erschienen.

3.1 Das HET-CAM-Modell

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation des HET-CAM-Modells als Alternative zu Tierversuchen bei Bindungs- und Verteilungsstudien neuer Radiopharmaka mittels PET und MRT. Bei allen Hühnerembryonen (n=66) konnte in den MRT-Aufnahmen eine detaillierte Visualisierung der Tumore und die Bestimmung des Tumorvolumens der Xenografts der Zelllinien LNCaP C4-2, LNCaP und PC-3 in den Silikon-Doppelringen erfolgen. Davon konnten 42 Hühnerembryonen (64 %) für die finale Auswertung verwendet werden, wohingegen 24 Hühnerembryonen (36 %) ausgeschlossen werden mussten. Die systemische Injektion des Liganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 war in 14 Eiern (21 %) nicht erfolgreich und somit konnte kein PET-Signal in den Hühnerembryonen detektiert werden (Abbildung 8). Ferner mussten 4 Hühnerembryonen trotz erfolgreicher systemischer Injektion aufgrund von Paravasation des Radioliganden in das umliegende Gewebe, inklusive der Tumoren, ausgeschlossen werden. Bei 2 weiteren Hühnerembryonen (3 %) konnten infolge technischer Probleme keine Daten generiert werden. Aufgrund von fehlendem Tumorwachstum der PSMA-positiven Zelllinie wurden 4 Eier für die weitere Auswertung ausgeschlossen.
Bei 5 von 42 Eiern wurde eine geringe Paravasation protokolliert, die nach gründlichem Waschen mit PBS jedoch in die Gamma Counter-Auswertung miteingeschlossen werden konnten. In 5 von 42 Eiern erfolgte kein erfolgreiches Wachstum der PSMA-negativen Zelllinie PC-3 und somit konnte nur die Hintergrundaktivität in der tumorfreien Membranregion („CAM“) analysiert werden.
Insgesamt wurden 42 Eier für die Auswertung (MRT und PET) verwendet: 37 Hühnerembryonen mit sowohl PSMA-positivem als auch PSMA-negativem Tumor (34 x LNCaP C4-2 + PC-3, 3 x LNCaP + PC-3) und 5 Hühnerembryonen mit nur einem PSMA-positivem Tumor (LNCaP C4-2 + CAM). Die vollständigen Daten sind in Anhang 1 angefügt.

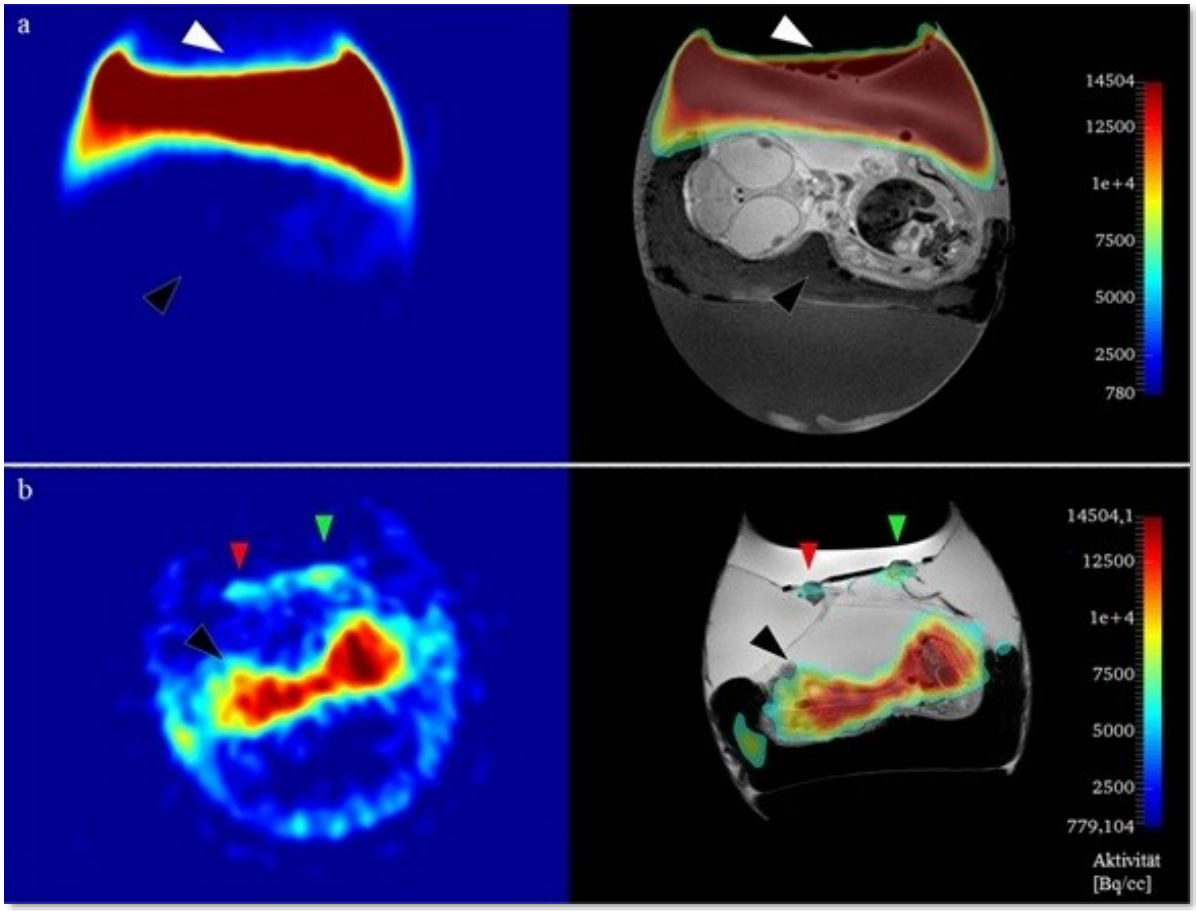


Abbildung 8: Positronen-Emissions-Tomographie (PET) -Aufnahmen (links) und Magnetresonanztomographie (MRT)/PET-Bildüberlagerungen (rechts) einer fehlgeschlagenen (a) und erfolgreichen (b) systemischen Injektion des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Im oberen Bild (a) wurde die Akkumulation des Radioliganden auf der Chorioallantoismembran (CAM) detektiert (weißer Pfeil), jedoch nicht im Hühnerembryo (schwarzer Pfeil). Eine Anreicherung sowohl im Hühnerembryo (schwarzer Pfeil) als auch in den Tumoren von unterschiedlicher Intensität (grüner Pfeil = PSMA positiv, roter Pfeil = PSMA negativ) zeigt sich im unteren Bild (b); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

3.2 *In ovo* MRT- und PET-Bildgebung

Für das in den MRT-Aufnahmen bestimmte Tumorvolumen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) berechnet: LNCaP C4-2 (32,4 ± 7,8 mm^3), LNCaP (29,4 ± 0,01 mm^3) und PC-3 (30,0 ± 2,3 mm^3). Es konnte kein signifikanter Unterschied (p=0,06) festgestellt werden.

Auf Basis der PET-Daten wurde die Akkumulation des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in den Tumoren bestimmt. Dabei zeigte sich in den PSMA-positiven Tumoren eine signifikant höhere Anreicherung (1,36 ± 0,68 MBq/Kubikzentimeter (cc); 1,29 MBq/cc) als in den PSMA-

negativen Tumoren (1,08 ± 0,61 MBq/cc; 0,99 MBq/cc; p=0,04) und als im Hintergrund (CAM; 0,88 ± 0,44 MBq/cc; 0,93 MBq/cc (Mittelwert ± SD; Median). Des Weiteren wurde das Verhältnis der aufgenommenen Radioaktivität in den Tumoren bestimmt. In 23 von 37 Eiern (32 %) betrug das Verhältnis der PSMA-positiven Tumoren im Vergleich zu den PSMA-negativen Tumoren > 1 mit einem Mittelwert und einer SD von: LNCaP C4-2/PC-3 (2,1 ± 1,4; 1,9) und LNCaP/PC-3 (1,9 ± 0,8; 1,9) (Mittelwert ± SD; Median). In Anhang 2 ist eine vollständige Liste der Daten aufgeführt.

Zur qualitativen Auswertung der Anreicherung des Radioliganden wurden die dynamischen PET-Messungen über die Zeit in Zeit-Aktivitäts-Kurven ausgewertet. Die Zeit-Aktivitäts-Kurven sind mit den korrespondierenden MRT-Bildern und der PET/MRT-Überlagerung exemplarisch für 4 Eier (2 x LNCaP C4-2 und PC-3; 1 x LNCaP und PC-3; 1 x LNCaP C4-2 und CAM) in Abbildung 9 dargestellt. Weitere Beispiele ausgewählter HET-CAM-Experimente sind in Anhang 3 und 4 dargestellt. Da der Beginn der Messungen aufgrund der technischen Gegebenheiten 10 min nach der Injektion erfolgte, konnte in den Zeit-Aktivitäts-Kurven kein Perfusionsmaximum dargestellt werden und eine entsprechende kinetische Modellierung zur quantitativen Evaluierung nicht erfolgen. In der Mehrheit der Tumoren wurde in den Zeit-Aktivitäts-Kurven ein konstantes Aktivitätsniveau ermittelt, gefolgt von einem Aktivitätsanstieg bzw. -abfall (Tabelle 6). Im Hühnerembryo selbst wurde eine ungleichmäßige Verteilung der Aktivität mit der höchsten Akkumulation im Bereich des Herzens nachgewiesen.

Tabelle 6: Anzahl der im Rahmen dieser Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) – Studie für die finale Auswertung verwendeten Hühnerembryonen mit den Tumoren LNCaP C4-2 (n = 39), LNCaP (n = 3) und PC-3 (n = 37) die eine konstante, steigende oder abfallende Aktivität in den Zeit-Aktivitäts-Kurven aufzeigten. Für die Auswertungen wurden die Tumoren dem Hühnerei entnommen; (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Tumor	Aktivität konstant	Aktivität steigend	Aktivität abfallend
LNCaP C4-2 (n = 39)	48,7 %	30,8 %	20,5 %
LNCaP (n = 3)	66,7 %	33,3 %	
PC-3 (n = 37)	59,5 %	24,3 %	16,2 %

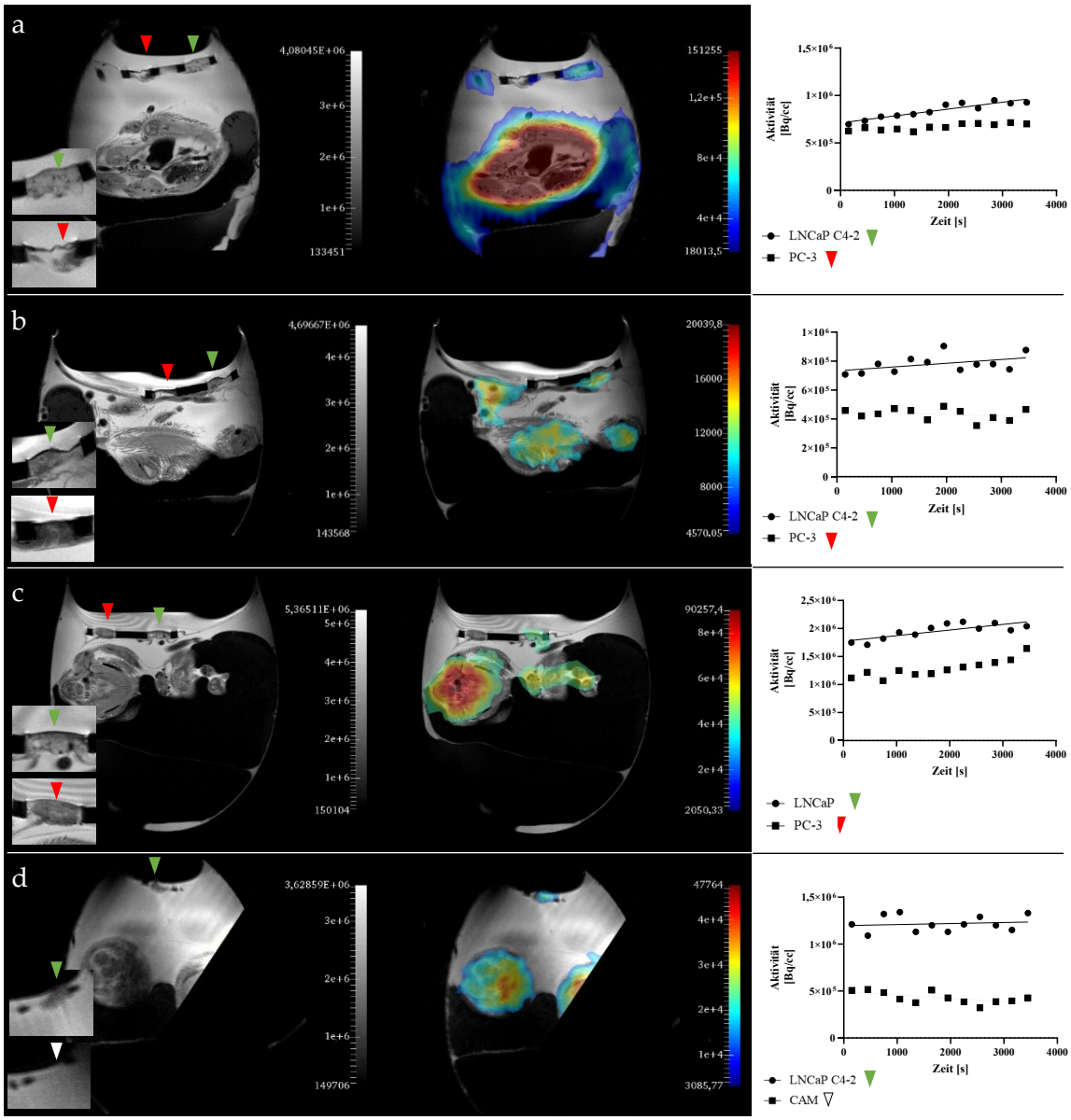


Abbildung 9: Dargestellt sind T2-gewichtete (Turbo-Spin-Echo (TSE)) Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen (links) nach dem Protokoll von Zuo et al. 2017 [191] und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/MRT-Überlagerungen (Mitte) von 4 Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Experimenten mit den dazugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven der ausgewählten PET-Regionen (rechts). Deutlich erkennbar in den MRT-Aufnahmen sind die Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA) -positiven Tumoren LNCaP C4-2 (a, b, d) und LNCaP (c) (grüner Pfeil). Der PSMA-negative Tumor PC-3 ist sichtbar in Beispiel (a, b und c) (roter Pfeil), in Beispiel d jedoch nicht gewachsen (Chorioallantoismembran (CAM) = weißer Pfeil). In den PSMA-positiven Tumoren konnte eine höhere Aktivitätsanreicherung als in den PSMA-negativen Tumoren nachgewiesen werden (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

3.3 Gamma Counter-Evaluation

Die absolute Akkumulation des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 wurde mittels Gamma Counter-Messungen evaluiert und zwischen den Tumoren sowie dem Hintergrund (CAM) verglichen. Dabei konnte eine signifikant höhere Anreicherung in den PSMA-positiven Tumoren im Vergleich zu den PSMA-negativen Tumoren ermittelt werden (n=37; Mittelwert ± SD): $PSMA^+$ (0,27 ± 0,16) %IA und $PSMA^-$ (0,11 ± 0,11) %IA mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$. Auch nach Ausschluss der 5 Eier mit geringer Paravasation (siehe 3.1) konnte eine signifikant höhere Anreicherung in den PSMA-positiven Tumoren (n = 32; Mittelwert ± SD (0,28 ± 0,17) %IA; Median 0,24 %IA) als in PC-3 festgestellt werden ($p < 0,001$). In den 5 Eiern mit geringer Paravasation wurde in den PSMA-positiven Tumoren eine höhere Akkumulation des Liganden als in den PSMA-negativen Tumoren ermittelt (Verhältnisse der Radioaktivität: 3,7; 3,2; 1,5; 4,6; 4,2) mit einem Mittelwert ± SD von 3,4 ± 1,2 und einer Signifikanz von $p = 0,01$.
Für die Subgruppe LNCaP C4-2 und PC-3 allein konnte eine signifikant höhere Anreicherung des Liganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in den PSMA-positiven Tumoren im Vergleich zu den PSMA-negativen Tumoren (n = 38; Mittelwert ± SD): LNCaP C4-2 (0,29 ± 0,2) %IA vs. (versus) PC-3 (0,13 ± 0,14) %IA mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$ nachgewiesen werden. Ferner wurde die Akkumulation in den Tumoren LNCaP und PC-3 untersucht und es konnte auch für diese Subgruppe eine höhere Akkumulation in den PSMA-positiven Tumoren verglichen mit den PSMA-negativen Tumoren (n = 3; Mittelwert ± SD): LNCaP (0,20 ± 0,03) %IA vs. PC-3 (0,04 ± 0,01) %IA ermittelt werden. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte keine statistische Auswertung erfolgen ($p = 0,25$). Der Vergleich der Anreicherung des Liganden in den PSMA-positiven Tumoren zu unspezifischem Hintergrundsignal (CAM) ergab folgende Resultate (n = 5; Mittelwert ± SD): LNCaP C4-2 (0,34 ± 0,24) vs. Hintergrund (CAM; 0,08 ± 0,06). Auch in dieser Subgruppe wurde eine signifikant höhere Anreicherung in den PSMA-positiven Tumoren ($p = 0,0313$) nachgewiesen. Die Ergebnisse der Subgruppen sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Gamma Counter-Rohdaten und die Ergebnisse (%IA) der einzelnen Experimente mit den entsprechenden Aktivitätsverhältnissen ($PSMA^+/PSMA^-$) wurden in Anhang 5 bis 7 aufgeführt.

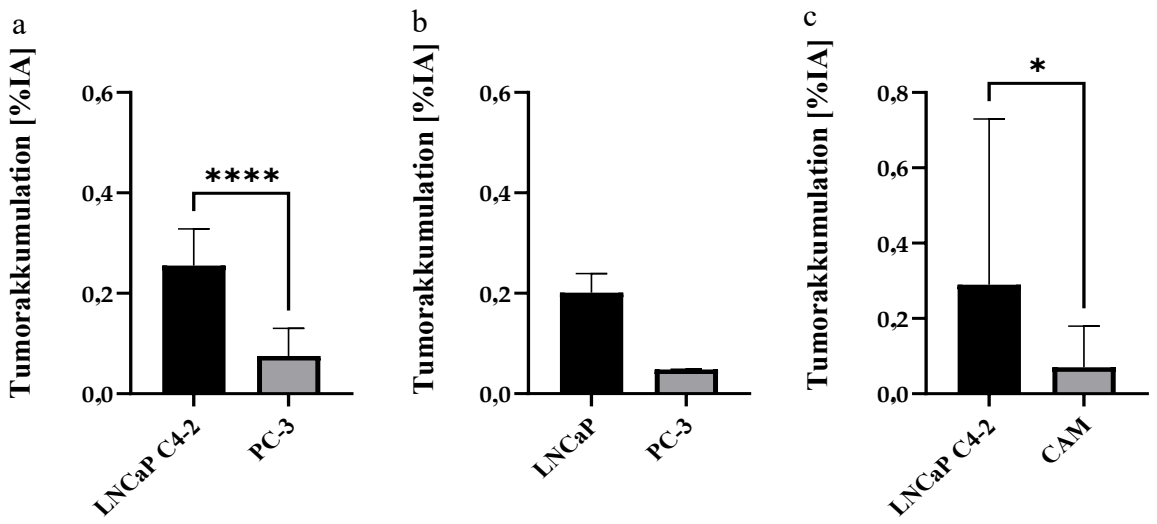


Abbildung 10: Vergleich der Anreicherung des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in den Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)-positiven Tumoren (LNCaP C4-2 und LNCaP) und den PSMA-negativen Tumoren (PC-3), sowie dem Hintergrundsignal in der Chorioallantoismembran (CAM). Dafür wurden die Tumoren und ein Teil der CAM dem Hühnerei entnommen. Von den 3 Vergleichsgruppen wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) der Tumorakkumulation [%IA] ermittelt: a) [LNCaP C4-2 + PC-3] (n = 34), b) [LNCaP + PC-3] (n = 3) und c) [LNCaP C4-2 + [CAM] (n = 5). Angegeben wurden die Signifikanzen der Unterschiede bei den Gruppen mit n > 3; p-Werte: **** $p < 0{,}0001$; * $p < 0{,}05$ (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Der Anteil der applizierten Radioaktivität [%IA/g] (Aktivitätskonzentration) in den Tumoren, bezogen auf die in der MRT-Bildgebung bestimmten Tumorvolumina, wurde ebenfalls ermittelt. Es wurden signifikant höhere Werte in den PSMA-positiven Tumoren als in den PSMA-negativen Tumoren nachgewiesen (Mittelwert: 9,3 %IA/g vs. 3,8 %IA/g; $p < 0{,}0001$). Der Anteil der Aktivität wurde für jede Subgruppe untersucht und größerer Werte für das Verhältnis der Aktivitätskonzentrationen in den PSMA-positiven Tumoren im Vergleich zu den PSMA-negativen Tumoren bzw. dem Hintergrund (CAM) festgestellt (Mittelwert ± SD): 4,0 ± 3,9 (LNCaP C4-2 vs. PC-3); 4,9 ± 0,8 (LNCaP vs. PC-3) und 24,8 ± 48,5 (LNCaP C4-2 vs. CAM). Des Weiteren wurde das Verhältnis der Aktivitätskonzentrationen in den Tumoren bezogen auf die Gesamtaktivität im Hühnerembryo (Tumor/Gesamt) bestimmt. Auch hier wurde eine signifikant höhere Anreicherung des Liganden in den PSMA-positiven Tumoren im Vergleich zu den PSMA-negativen Tumoren nachgewiesen (Mittelwert ± SD): 5,4 ± 3,2 vs. 2,2 ± 2,1; $p < 0{,}0001$.

Die Verteilung der Daten (Anteil der Aktivität im Tumor bezogen auf das Tumorvolumen und auf die Gesamtaktivität im Hühnerembryo) für jedes Experiment ist in Abbildung 11 dargestellt.

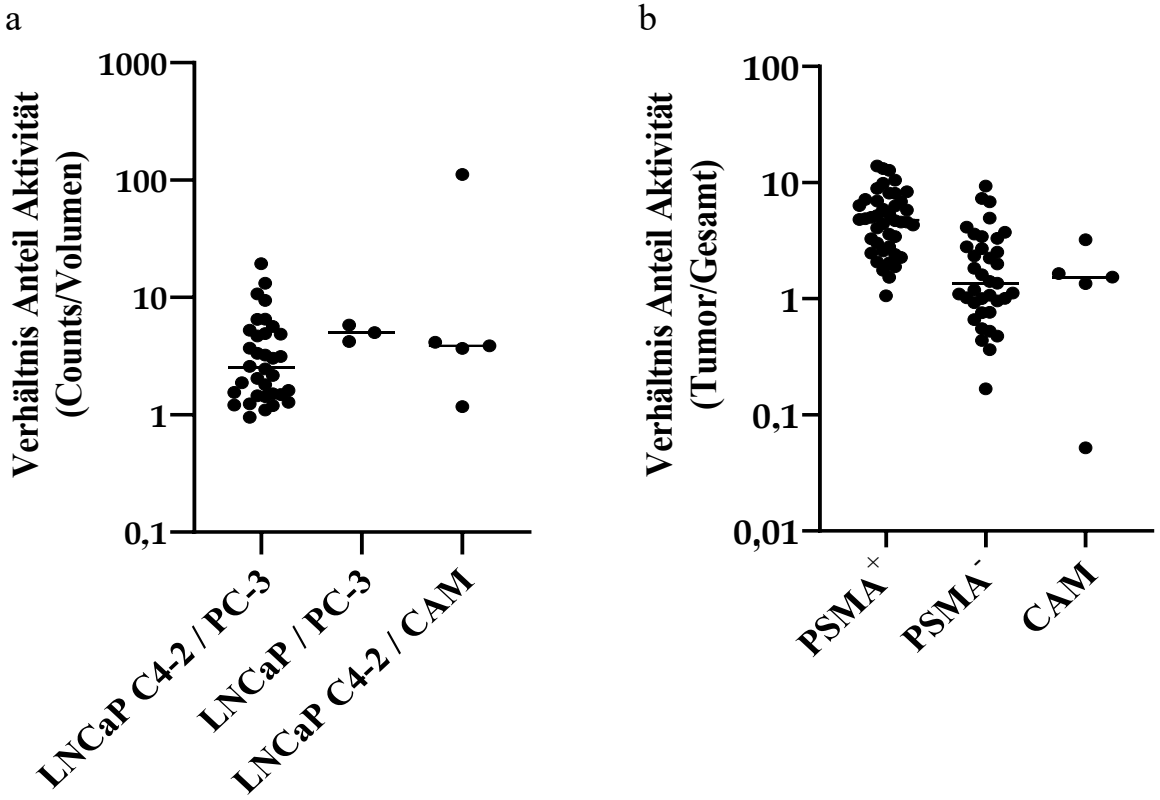


Abbildung 11: Streudiagramme (logarithmische Skalierung) der Verhältnisse der Aktivitätskonzentrationen der Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)-positiven Tumoren (LNCaP C4-2 und LNCaP) und den PSMA-negativen Tumoren (PC-3), sowie dem Hintergrundsignal in der Chorioallantoismembran (CAM), bezogen auf das Volumen (a) bzw. der Verhältnisse der Aktivitätskonzentrationen in den Tumoren und der CAM bezogen auf die Gesamtaktivität im Hühnerembryo (b). Jeder Punkt im Diagramm entspricht einem Experiment, der Median ist als Linie dargestellt. Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Für die Untersuchung der Verhältnisse der Aktivitätskonzentrationen bezogen auf das Volumen wurden 3 Vergleichsgruppen gebildet: LNCaP C4-2 + PC-3, LNCaP + PC-3 und LNCaP C4-2 + CAM. Im direkten Vergleich der Tumoren wurde nur ein Einzelergebnis < 1 bestimmt (a). Im Vergleich der PSMA-positiven Tumoren mit der Gesamtaktivität im Hühnerembryo wurden für alle Experimente Werte > 1 ermittelt (b). Die Tumoren und ein Teil der CAM wurden für die Untersuchung der Verhältnisse der Aktivitätskonzentrationen dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Eine Übersicht der berechneten Verhältnisse der aufgenommenen Aktivität in den drei Subgruppen LNCaP C4-2 + PC-3, LNCaP + PC-3 und LNCaP C4-2 + Hintergrund (CAM) ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammenfassende Übersicht der ermittelten Aktivitätsverhältnisse der aufgenommenen Aktivität ([^{68}Ga]Ga-PSMA-11) der Tumoren (Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)$^{+}$/PSMA^{-}) und das anteilige Verhältnis der Aktivitätskonzentrationen (PSMA^{+}/PSMA^{-} und Tumor/Gesamt) für die Vergleichsgruppen LNCaP C4-2 + PC-3 (n = 34), LNCaP + PC-3 (n = 3) und LNCaP C4-2 + Hintergrund (Chorioallantoismembran (CAM); n = 5) (Median); (PSMA-positiv = LNCaP C4-2 und LNCaP; PSMA-negativ = PC-3). Dafür wurden die Tumoren und ein Teil der CAM dem Hühnerei entnommen. Angegeben ist auch die jeweilige Signifikanz (p-Wert). p-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant angenommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Subgruppe	**Aktivitäts-verhältnis (PSMA^{+}/PSMA^{-}) [Median]**	**Verhältnis der Aktivitätskonzentration (PSMA^{+}/PSMA^{-}) [Median]**	**Verhältnis der Aktivitätskonzentration (Tumor/Gesamt) [Median]**	**p-Wert (zweiseitig)**
LNCaP C4-2 PC-3	3,0	2,5	4,8 1,5	< 0,0001 (****)
LNCaP PC-3	5,0	5,0	4,6 0,9	0,250
LNCaP C4-2 Hintergrund (CAM)	4,1	3,9	5,8 1,5	0,0625

Die Werte des Aktivitätsverhältnisses (PSMA^{+}/PSMA^{-}), der Aktivitätskonzentration [%IA/g] und die Werte des Anteils des Verhältnisses der Aktivität (Tumor/Gesamt) finden sich in Anhang 8 bis 12.

3.4 Histologische Nachweise

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Auswahl geeigneter Schnitte für die immunhistochemischen PSMA-Färbungen wurden HE-Färbungen der Tumoren LNCaP C4-2 und PC-3 angefertigt (Abbildung 12). Eine beispielhafte HE-Färbung der CAM ist ebenfalls abgebildet.

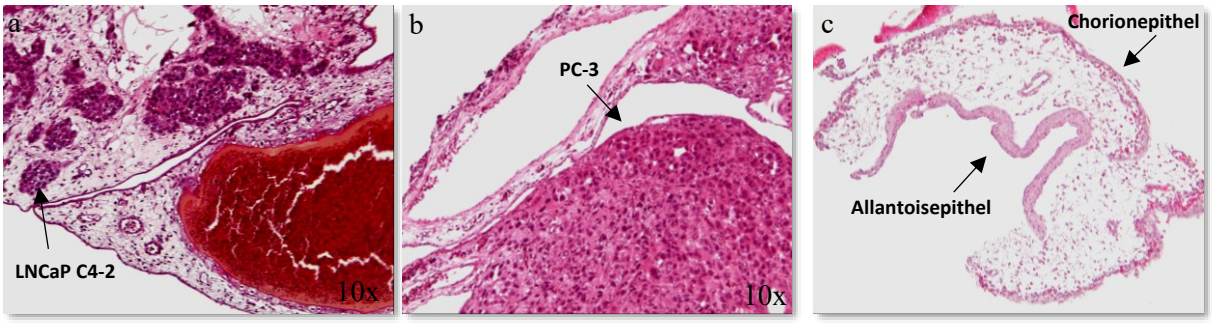


Abbildung 12: Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung der Tumoren LNCaP C4-2 (a), PC-3 (b) und der Chorioallantoismembran (CAM) (c). Sowohl die Tumore als auch das Allantois- und Chorionepithel sind mit Pfeilen markiert. Die LNCaP C4-2 Tumorzellen bilden Tumorinseln aus und sind dadurch deutlich zum restlichen Gewebe abgrenzbar (linkes Bild). Die PC-3 Tumorzellen sind hingegen gleichmäßig verteilt (mittleres Bild). Bereits in HE-Färbungen können gesunde Zellen von Tumorzellen unterschieden werden. Im Gegensatz zu gesunden Zellen sind sowohl in den LNCaP C4-2 als auch in den PC-3 Tumorzellen zelluläre Atypien und ein vergrößerter Zellkern erkennbar. Die CAM ist eine Schicht aus lockerem Zellverband zwischen dem Chorion- und Allantoisepithel (rechtes Bild). Im Gegensatz zu den Tumoren überwiegen im CAM-Schnitt Epithelzellen und Mesoderm. Auf allen drei Bildern sind Blutgefäße (rot) mit Erythrozyten erkennbar; (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

3.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von PSMA

Zum Nachweis der Antigen-Expression in den PSMA-positiven Tumoren wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 13). In allen Schnitten ist das Tumorgewebe von der CAM abgrenzbar. Eine intensive positive Färbung ist in den PSMA-positiven Tumoren LNCaP C4-2 und LNCaP deutlich erkennbar. In den PSMA-negativen PC-3 Tumorzellen ist nur eine schwache Anfärbung einzelner Areale sichtbar.

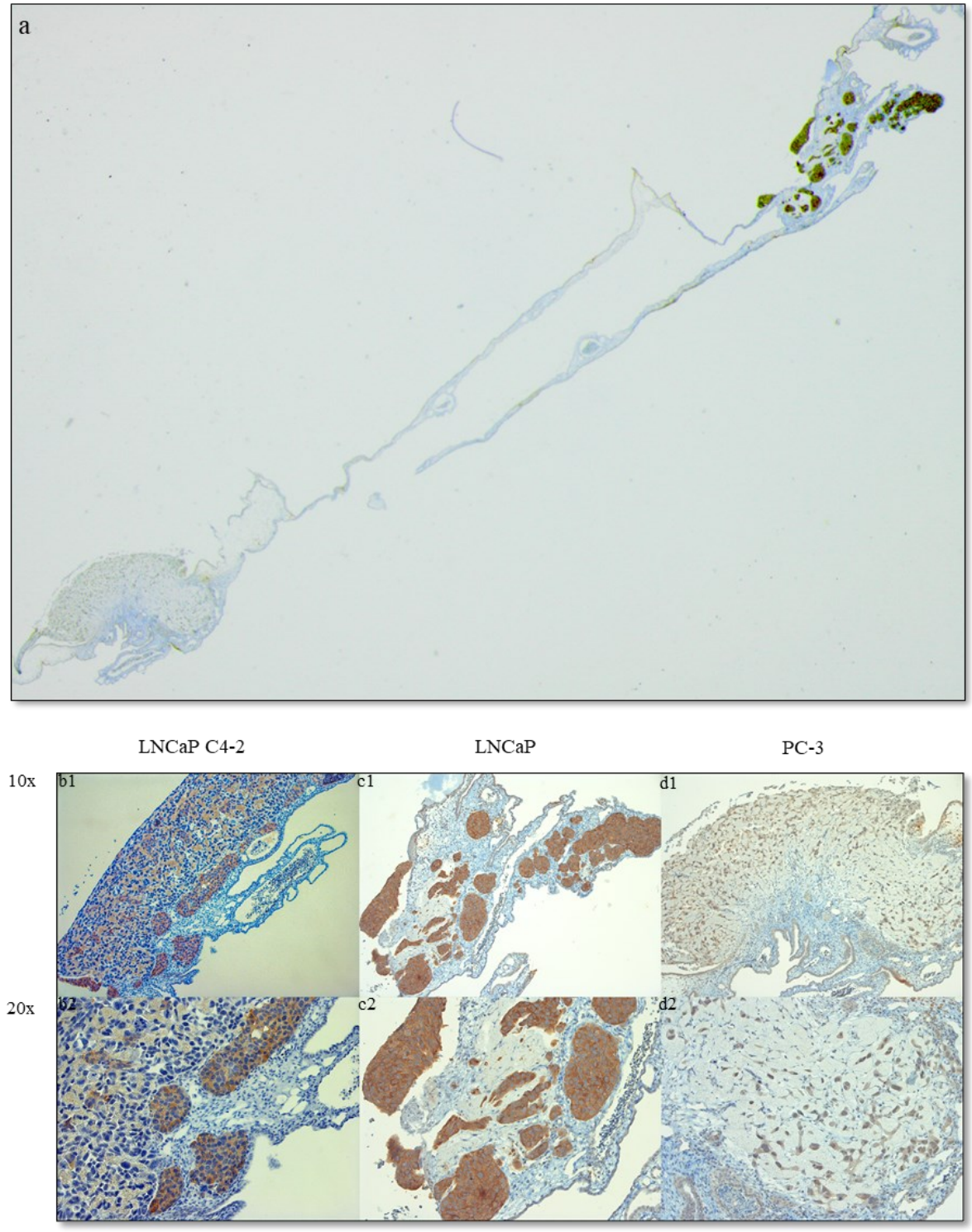


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Tumorxenografts mit dem Anti-γ-PSMA-1 Antikörper. Es wurden für jede Zelllinie histologische Schnitte angefertigt. In der Übersichtsaufnahme (a) sind die beiden Tumoren LNCaP (rechts) und PC-3 (links) auf einem gemeinsamen Schnitt angefärbt. Zur Beurteilung der Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)-Expression wurden die Tumoren in zwei Vergrößerungen (10x: b1, c1, d1; 20x: b2, c2, d3) dargestellt. Eine intensive Anfärbung des PSMA-Proteins ist deutlich in den Schnitten der LNCaP C4-2 (b1, b2) und LNCaP (c1, c2) Tumoren erkennbar (braune Färbung). Der PSMA-negative Tumor PC-3 (d1, d2) konnte kaum angefärbt werden (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Eignung des HET-CAM-Modells zur Evaluation von Tumorakkumulation von spezifischen Radiotracern unter Verwendung von PET- und MRT-Bildgebung analysiert. Der Einsatz des HET-CAM-Modells soll es ermöglichen, die Anzahl der notwendigen Tierversuche, im Sinne der 3R-Prinzipien, zu reduzieren. Für die Evaluation des Modells wurden daher die Ergebnisse mit publizierten Daten aus Tierversuchen verglichen.
Teile folgender Kapitel sind in Winter und Koch et al. [178] und Winter et al. [179] erschienen.

4.1 Analyse der spezifischen Bindung von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 im HET-CAM-Modell

Die Experimente wurden mit dem PSMA-spezifischen PET-Tracer [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 sowie PSMA- positiven als auch PSMA-negativen Prostatakarzinom-Xenografts durchgeführt. In der Mehrheit der Fälle (62 %; n=37) konnte eine größere Akkumulation des Radioliganden in den PSMA-positiven Tumoren nachgewiesen werden. Auch mit der *ex vivo* Gamma Counter-Quantifizierung konnte eine 3-bis 5-fach größere Anreicherung in den PSMA-positiven Tumoren demonstriert werden. Auch die Berechnung des Verhältnisses der Aktivitätskonzentration im Tumor, im Vergleich zur Gesamtaktivität im Hühnerembryo (Tumor/Gesamt), unterstützte die Ergebnisse und wies in den PSMA-exprimierenden Tumoren eine größere Anreicherung als in den PSMA-negativen Tumoren nach. Diese Daten waren ein zusätzlicher Nachweis für die Spezifität des Liganden. Für beide untersuchten PSMA-positiven Zelllinien LNCaP und LNCaP C4-2 konnte, im Vergleich zur PSMA-negativen Zelllinie PC-3, eine deutlich höhere Anreicherung des Radioliganden nachgewiesen werden. Gleichzeitig gab es dabei Unterschiede zwischen der Androgen-abhängigen Zelllinie LNCaP und der Androgen-unabhängigen Zelllinie LNCaP C4-2, für die ein etwas geringeres Verhältnis der Aktivitätskonzentrationen nachgewiesen wurde. Dies könnte durch eine höhere PSMA-Expression der Zelllinie LNCaP erklärt werden. In der Literatur besteht eine uneinheitliche Datenlage bezüglich der unterschiedlichen PSMA-Expression der Zelllinien LNCaP und LNCaP C4-2. Taylor et al. haben *in vitro* eine höhere PSMA Expression anhand der spezifischen mRNA in LNCaP nachgewiesen, gleichzeitig lag die *in vivo* mRNA Expression, sowie die Expression des PSMA Proteins, in LNCaP C4-2 höher [166]. In den Publikationen von Castanares et al., Fan et al. und Michalska et al. wurde eine höhere Expression des PSMA Proteins in LNCaP beschrieben [25, 55, 118]. Die Daten der

letztgenannten Veröffentlichungen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der unterschiedlichen Verhältnisse der Aktivitätskonzentrationen zwischen LNCaP und LNCaP C4-2.

Auf Basis der PET-Messungen wurden Zeit-Aktivitäts-Kurven erstellt, um einen Hinweis auf die Dynamik der Akkumulation des Radioliganden zu erhalten. Der Start der PET-Messungen erfolgte allerdings erst 10 Minuten nach der Injektion des Liganden. Eine Katheter-Injektion, die für die Aufnahme der Daten inklusive des Injektionszeitpunkts notwendig wäre, war mit der vorhandenen technischen Ausrüstung noch nicht möglich. Aus diesem Grund fehlen die frühen Zeitpunkte der Bioverteilung, insbesondere der Perfusionsanstieg durch die Injektion, in den Zeit-Aktivitäts-Kurven und eine entsprechende Kurvenanpassung für die Modellierung der Bioverteilung konnte nicht durchgeführt werden. Auch wenn die Evaluation hinsichtlich des Verlaufs der Zeit-Aktivitäts-Kurven keine eindeutigen Unterschiede zwischen den PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumoren nachweisen konnte, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass diese Form der Datenauswertung auch auf Tumorxenografts im HET-CAM-Modell angewendet werden kann.

4.2 Vergleich der Ergebnisse mit korrespondierenden Daten aus Experimenten mit Mäusen

Um die Eignung des HET-CAM-Modells zur initialen Evaluierung spezifischer Radioliganden-anreicherung zu bewerten, ist ein Vergleich der Ergebnisse mit Resultaten aus Experimenten mit Tierversuchen, dem aktuellen Standardmodell, notwendig. Neben Publikationen zur Verteilung und Tumoranreicherung des in der Arbeit verwendeten Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 wurden auch Veröffentlichungen mit anderen PSMA-spezifischen Radioliganden für den Vergleich ausgewählt, bei denen aber die gleichen Tumormodelle verwendet wurden. In Anhang 13 sind die entsprechenden Studien mit Tierexperimenten, die eine Akkumulation verschiedener Radioliganden in den Tumormodellen LNCaP, LNCaP C4-2 und PC-3 untersucht haben, zusammengefasst. Im Vergleich der absoluten Werte der Verhältnisse der Radioligandenakkumulation in den PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumoren der aufgelisteten Experimente mit den Daten dieser Arbeit, wurde deutlich, dass die Ergebnisse in der gleichen Größenordnung liegen. Das HET-CAM-Modell kann auf Basis dieses Vergleichs als potenzieller Ersatz für das Tiermodell mit Mäusen betrachtet werden.

4.3 Die Aufnahme des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 im PSMA-negativen Xenograft (PC-3) und im Hühnerembryo

Sowohl in den Resultaten dieser HET-CAM-Studie als auch in den Ergebnissen der in 4.2 bzw. Anhang 13 aufgelisteten Tierexperimente ist eine Aufnahme des Liganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in den PSMA-negativen PC-3 Tumoren erkennbar. Während in verschiedenen Publikationen nachgewiesen wurde, dass in der PC-3 Zelllinie keine PSMA Expression stattfindet [66, 186], wurde im HET-CAM-Modell dieser Studie auch im PC-3 Tumorxenograft eine geringe Aufnahme des Liganden sowohl in der PET-Bildgebung als auch histologisch detektiert. In erster Linie könnten hier unspezifische Signale, zum einen aufgrund der Aktivität im Blut in der Bildgebung oder durch unspezifische Färbereaktion in der Histologie betrachtet werden. Entsprechende Kontrollwerte, z.B. über das Tumor/Blut-Verhältnis für PC-3, konnten allerdings mit den aktuellen Methoden im HET-CAM-Modell nicht bestimmt werden. In Mausmodellen wurde ebenfalls die Aufnahme von radiomarkierten PSMA-spezifischen Liganden im PC-3 Tumorxenograft gezeigt [47, 150, 173]. Es ist publiziert, dass die Expression von PSMA *in vivo* auch im Fall von tumorassoziierter Neoangiogenese stattfinden kann [8, 26, 27, 133, 177]. Dieser Prozess könnte als Erklärung für die Expression des Proteins im PC-3 Tumorxenograft im HET-CAM- oder Mausmodell dienen. Des Weiteren zeigten Laidler et al. die PSMA Expression in der PC-3 Zelllinie durch den basic fibroblast growth factor (bFGF) [106]. In verschiedenen Studien mit Fokus auf bFGF wurde ein Zusammenhang zwischen der Hühnerembryonenentwicklung und des Auftretens von bFGF beschrieben [33, 63, 92]. Zusätzlich wurde bFGF in der Flüssigkeit der Chorioallantois nachgewiesen [59]. Diese Beobachtungen implizieren einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von bFGF im HET-CAM-Modell bzw. der tumorassoziierten Neoangiogenese und der Expression von PSMA in PC-3 Tumorxenografts. Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste in zukünftigen Experimenten ein Western Blot zum Nachweis des Proteins in der PC-3 Zelllinie durchgeführt werden.

4.4 Vorteile der MRT-Bildgebung für die Detektion des Tumorwachstums und die Tumorvolumetrie

Die Überlagerung der hochauflösenden MRT-Aufnahmen mit den hochsensitiven PET-Bildern ermöglichte eine anatomische Lokalisation der Radioligandenakkumulation und lieferte zudem

Informationen über ein erfolgreiches makroskopisches Tumorwachstum und über das Tumorvolumen. Dabei wurde nachgewiesen, dass nach Applikation der Tumorzellen in einigen Fällen kein makroskopischer Tumor gebildet wurde. Schwierigkeiten bei der Tumoretablierung treten aber nicht nur im HET-CAM-Modell, sondern auch in Experimenten mit Mäusen auf [100, 124, 132]. Allerdings ermöglicht im Tierexperiment die Palpation den Tumornachweis. Diese Methode ist im HET-CAM-Modell nicht möglich. Eine Auswertung, die ausschließlich auf den PET-Daten basiert und keine MRT-Daten mit einbezieht, ist dadurch potenziell fehlerbehaftet. Ein entsprechender Fehler tritt auf, wenn keine Anreicherung im PET nachgewiesen werden kann und deswegen eine fehlende Spezifität angenommen wird, obwohl kein Tumor vorhanden ist. Das Tumorwachstum wird oft auch durch mikroskopische Analysen bestätigt [129, 168, 174]. Durch ein Gerät mit entsprechendem Arbeitsabstand, Auflichteinheit und ausreichender Tiefenschärfe vorausgesetzt, kann auch mit dieser Technik das Tumorwachstum beurteilt werden. Diese Technik stand im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Die Evaluation mittels MRT bietet neben der visuellen Bestätigung des Tumorwachstums außerdem die Möglichkeit, das Tumorvolumen genau zu bestimmen. Dieser Vorteil und die Option, durch die Überlagerung der PET- und MRT-Daten den Messbereich (VOI) für die Bestimmung der angereicherten Aktivität exakt auszuwählen, sind Argumente für die MRT-Bildgebung im HET-CAM-Modell.

In den MRT-Aufnahmen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorvolumina der PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumoren festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten und bestätigen, dass die größere Radioligandenaufnahme in den PSMA-positiven Tumoren aus der spezifischen Rezeptorbindung resultiert und nicht durch verschiedene Tumorvolumina erklärt werden kann. Aus diesem Grund korrelierten auch die Gamma Counter-Analysen gut, bei denen die absoluten Werte der Tracer-Aufnahme (%IA) gut mit den Aktivitätskonzentrationen (%IA/Gramm) übereinstimmten. Obwohl kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorvolumina der PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumoren festgestellt werden konnte, kann auf Basis bestehender Publikationen, sowie der Erfahrung in der Klinik für Nuklearmedizin mit den Tumorxenograftmodellen in Mäusen, angenommen werden, dass der LNCaP Tumorxenograft *in vivo* stärker vaskularisiert und weniger hypoxisch ist als der PC-3 Tumorxenograft [165, 167]. Diese Unterschiede könnten ebenfalls zu einer größeren Ligandenaufnahme in den LNCaP Tumorxenografts geführt haben. Die Auswirkungen hinsichtlich der Vaskularität und Hypoxie auf die Aufnahme von Radioliganden sollten deshalb für Xenografts von LNCaP sowie dessen Derivat LNCaP C4-2 in weiteren Studien untersucht werden.

Aufgrund der hohen Auflösung bei der MRT-Bildgebung ist es außerdem möglich, auch in den kleinen Strukturen der HET-CAM-Tumorxenografts zusätzliche Bildkontraste zu liefern, wodurch Substrukturen dargestellt werden können, die sonst erst im histologischen Schnitt erkennbar sind [191]. Für zukünftige HET-CAM-Studien könnten MR-spektroskopische Analysen außerdem physiologische und molekulare Vorgänge darstellen und damit eine tiefgreifendere Charakterisierung der Tumoren ermöglichen, da die Tumoren an der Membranoberfläche gut zugänglich liegen.

Für eine verbesserte Bildqualität und um eine Verfälschung der Bilder zu vermindern, bestand die Notwendigkeit einer Immobilisation des Embryos. Eine vielversprechende Methode war das Kühlen des Embryos bei 4 °C, das gute Ergebnisse lieferte und keine Effekte auf das Überleben des Embryos hatte [10, 190]. Auch während der Experimente kam es zu keiner Auswirkung auf das Tumor- und Embryonalwachstum. Nguyen et al. haben gezeigt, dass zwar bei 4 °C die Internalisierung von PSMA, aber nicht die Ligandenbindung beeinflusst werden kann [125]. Da eine Akkumulation im Tumor sowohl auf einer Ligandenbindung als auch auf einer Internalisierung beruht, kann eine Verringerung der Akkumulation aufgrund der durch die Kühlung bedingten niedrigen Temperatur der Hühnerembryonen nicht ausgeschlossen werden. Ein Ausbleiben der Internalisierung könnte zu einer Sättigung der Bindungsstellen führen. Allerdings wurden in dieser HET-CAM-Studie die PET-Messungen erst ca. 1,5 h nach dem Abkühlen gestartet. Es kann angenommen werden, dass dieser Zeitraum für die Wiedererwärmung der Hühnerembryonen ausreichend war. Sollte in zukünftigen HET-CAM-Studien eine Wiedererwärmung der Hühnerembryonen nicht möglich sein, müssen alternative Immobilisierungstechniken, wie z.B. die Anwendung von flüssigen Betäubungsmitteln oder Inhalationsnarkotika, in Betracht gezogen werden.

4.5 Methodische und logistische Aspekte des HET-CAM-Modells

Für die finale Evaluation konnten nur 64 % (n=42) der Hühnerembryonen verwendet werden. Der Hauptgrund für den Ausschluss der Hühnerembryonen aus den Auswertungen war in 14 Fällen eine fehlgeschlagene Injektion des Radioliganden. Um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Injektion zu erhöhen, wurden vergleichsweise große Blutgefäße ausgewählt und die kleinsten vorhandenen Standardkanülen (30G) verwendet. Auch bei optimal ausgeführter Injektion entstand in den meisten Fällen eine Wunde in den Blutgefäßen, die ein Nachbluten verursachte. Jedoch konnten die Wunden durch den Einsatz von Wattestäbchen und Ge-

webskleber oft verschlossen werden. Durch das Nachbluten nach der Injektion kann eine Kontamination der Tumoren und damit eine Verfälschung der Messwerte verursacht werden. Zwischen EDD 12 bis EDD 16 ist die Entwicklung der Wundheilung in Hühnerembryonen noch nicht vollständig abgeschlossen [175, 176] und der Mechanismus der Wundheilung benötigt 3 bis 4 Tage [176]. Da die Experimente dieser HET-CAM-Studie in allen Fällen innerhalb eines Tages durchgeführt wurden, war dies nicht relevant. Ein weiterer wichtiger und zeitlich eher relevanter Mechanismus bei Verletzungen von Blutgefäßen ist die Vasokonstriktion, bei der sich die Gefäße verengen und somit ein Blutaustritt vermindert wird [103, 104]. Auch dieser Prozess ist zum Zeitpunkt der Experimente im Hühnerembryo noch nicht vollständig entwickelt [67]. Die Verwendung von kleineren Blutgefäßen für die Injektion könnte bei optimierter Technik verwendet werden, jedoch würde bei der aktuellen Methode die Rate einer Fehlinjektion erhöht werden. Weitere Methoden zum Stillen von Blutungen bei der Injektion könnten Thema weiterer Studien zur Optimierung des HET-CAM-Modells sein.

In 5 Experimenten ereignete sich nach der Injektion eine geringe Paravasation. Diese 5 Hühnerembryonen wurden nicht von der Auswertung ausgeschlossen, obwohl die PET- und Gamma Counter-Messungen unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Für diese Hühnerembryonen betrug, basierend auf den PET-Daten, das Verhältnis der Aktivität der PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumoren < 1. Die korrespondierenden Gamma Counter-Daten ergaben Werte > 1. Eine Verfälschung der Ergebnisse der PET-Messungen ist durch das Vorhandensein von Restaktivität auf den Tumoren aufgrund des Paravasats denkbar und wahrscheinlich. Vor den Gamma Counter-Messungen wurden die entnommenen Tumoren gewaschen und somit das Paravasat von der Oberfläche entfernt. Dadurch entsprachen die Gamma Counter-Daten eher den Aktivitätsverhältnissen zwischen den PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumoren. Trotz einer verhältnismäßig hohen Ausschlussrate von 36 %, stieg die Erfolgsquote bei der Injektion im Verlauf des Projektes aufgrund zunehmender Erfahrung der Experimentatoren kontinuierlich an. Es ist zu erwarten, dass in zukünftigen Experimenten eine geringere Fehlerrate auftritt.

Das HET-CAM-Modell bietet im Vergleich zu Experimenten mit Tieren bezüglich der Kosten und des administrativen Aufwands große Vorteile. Die Kosten für den Kauf der Eier sowie die Haltungskosten und der Aufwand sind deutlich geringer im Vergleich zu Experimenten mit Mäusen. Eine tägliche Kontrolle der Hühnerembryonen ist z.B. nicht notwendig [75].

Das HET-CAM-Modell stellt eine gute Möglichkeit dar, um einfach und schnell Studien mit unterschiedlichen Tumormodellen durchzuführen. Tumorxenografts basierten dabei nicht nur auf menschlichen Tumorzelllinien, sondern konnten auch erfolgreich mit Zelllinien aus Nagetieren oder mit von Patienten gewonnenem Material etabliert werden [6, 36, 76, 97, 172, 189,

190]. Dieses breite Spektrum an Einsatzmöglichkeiten erlaubt potenziell den Ersatz von etablierten Mausmodellen durch das HET-CAM-Modell, z.B. für die Durchführung von initialen Studien zur *in vivo* Substanzcharakterisierung mit Tumorxenografts. Die Validität und Zuverlässigkeit des HET-CAM-Modells müssen natürlich in weiteren Studien nachgewiesen werden.

4.6 Limitationen des HET-CAM-Modells

Zu den Limitierungen des HET-CAM-Modells gehört das enge Zeitfenster für die Experimente, da der Schlupf der Embryonen nach 21 Tagen stattfindet. Auch wenn gemäß Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L358/1 1986 Hühnerembryonen bis zum Schlupf nicht zu lebenden Tieren gezählt werden, wurde in unseren Studien versucht, die Untersuchungen so früh wie möglich durchzuführen [4].
Der Beginn der Studien wird durch die Entwicklung der CAM und das Tumorwachstum limitiert. Die Inokulation der Tumorzellen erfolgte in dieser Studie erst an EDD 5 und 6, da laut Knighton et al. die Wachstumsrate von Tumoren auf der CAM in diesem Zeitraum am größten sei [98]. Die Tumoren auf Basis der hier eingesetzten Prostatakarzinomzelllinien erreichen nach durchschnittlichen weiteren 6 Tagen eine Größe, mit der Messungen durchgeführt werden können. Dadurch ist der Beginn der Messungen erst ab EDD 12 möglich.
Bereits während der Bebrütungs- bzw. Inkubationszeit wird außerdem die Schmerzwahrnehmung ausgebildet. Ein Konsens besteht darin, dass vor dem 7. Bebrütungstag von keiner Schmerzempfindung des Hühnerembryos ausgegangen wird. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist das Schmerzempfinden aber bis zum 15. Entwicklungstag ausgebildet [3, 15, 21, 40, 49, 50, 107, 145, 146]. Im Hinblick auf ethische Aspekte sollten deshalb Experimente mit dem HET-CAM-Modell so früh wie möglich durchgeführt werden. Es bleibt abzuwarten, ob das Tierschutzgesetz die Verwendung des HET-CAM-Modells in Zukunft einschränken wird.
Als eine zusätzliche Limitierung unserer Studie muss die Bestimmung des Tumorgewichts diskutiert werden. Aufgrund der geringen Tumorgröße konnte das Tumorgewicht nicht durch direktes Wiegen gemessen werden, sondern wurde auf Basis der MRT-gemessenen Tumorvolumina bestimmt. Das direkte Wiegen würde bei den kleinen Tumoren nach dem Waschen zu großen Abweichungen führen, da bereits geringe Mengen Puffer großen Einfluss auf das ermittelte Gewicht haben. Die *ex vivo* gemessenen absoluten Aktivitäten und Aktivitätskonzentrationen korrelierten auf Basis dieser Gewichtsbestimmungen sowohl gut miteinander als auch mit den *in vivo* PET-Daten. Somit war die Methode der Gewichtsbestimmung von geringer Relevanz.

Das Fehlen von Blockierungsexperimenten für eine exaktere Bestimmung und Validierung der spezifischen Radioligandenaufnahme in den PSMA-positiven Tumoren muss ebenfalls als Limitierung in dieser Studie betrachtet werden. Für diese Experimente ist eine doppelte Injektion im HET-CAM-Modell notwendig, die aufgrund des Fehlens von geeigneter Laborausstattung nicht durchgeführt werden konnte. Auch eine Durchführung mehrerer Einzelinjektionen war nicht möglich, denn zusätzlich zu einer weiteren Volumenbelastung wäre das Risiko des Auftretens von Blutungen eine Gefahr für das Überleben des Embryos gewesen. Die Verwendung von Tumoren mit und ohne Zielprotein ohne eine Durchführung von Blockierungsexperimenten ist dennoch eine gute Methode zur Überprüfung und Bewertung der Spezifität der Radioligandenanreicherung und ist bereits für Mausexperimente etabliert [28, 29, 42].
Des Weiteren ist der in unserer Studie verwendete Radioligand [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 gut charakterisiert und unsere Resultate stimmen mit Daten aus Mausexperimenten mit den gleichen Tumorzelllinien überein [47, 150, 173]. Um Resultate aus murinen Experimenten mit Ergebnissen aus dem HET-CAM-Modell vergleichen zu können, muss die unterschiedliche Größe der Tumoren in murinen Modellen und im HET-CAM-Modell bedacht werden. Aufgrund der deutlich kleineren Tumoren im Hühnerei könnte bereits bei geringeren Konzentrationen an applizierter Substanz ein Sättigungseffekt im HET-CAM-Modell erreicht werden. De Jong et al. untersuchten die Radioligandenaufnahme bei unterschiedlichen Mengen von Peptiden anhand von ^{111}In-DOTA-Tyr^3-Octreotid in Ratten mit Pankreaskarzinom Xenografts. Eine maximale Radioligandenaufnahme in den Tumoren konnte bei 0,0029 µg/g Körpergewicht nachgewiesen werden. Sowohl geringere als auch größere Mengen an injiziertem Peptid führten zu einer geringeren Aufnahme des Radioliganden in den Tumorxenografts [35]. Das durchschnittliche Gewicht einer Ratte bzw. eines Hühnereis beträgt ca. 170 g (Lewis) [71, 164] bzw. 65 g [60]. Auf Basis der Publikation von De Jong et al. sollten im Hühnerei demzufolge insgesamt ca. 0,19 µg Peptid appliziert werden, um eine optimale Verteilung ohne Sättigungseffekt zu erreichen. In dieser Studie wurden durchschnittlich 0,0975 µg [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 injiziert. Verglichen mit den Ergebnissen von De Jong et al. wird kein Sättigungseffekt für diese Peptidmengen erwartet. Gleichzeitig könnte eine höhere Konzentration vorteilhaft sein, um eine optimale Anreicherung zu erzielen. Wird das durchschnittliche Gewicht einer Maus von ca. 21 g (Balb c/c) [5] betrachtet, würde eine maximale Radioligandenaufnahme bei insgesamt 0,06 µg erreicht werden. Verglichen mit der Peptidmenge, die in dieser HET-CAM-Studie appliziert wurde, wäre im Mausmodell bereits eine Sättigung erreicht. Somit sollte bei einem Vergleich von Resultaten bzgl. der Radioligandenaufnahme in Tumoren in verschiedenen Tiermodellen die unterschiedliche

Größe der Tumoren und das Gesamtgewicht des Tieres bzw. des Eis bedacht werden. Für abschließende Aussagen zur Sättigung mit [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in Prostatakarzinom-Xenografts im Hühnerembryo müssen weitere Studien, mit Fokus auf die Radioligandenaufnahme bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen, durchgeführt werden.

Eine weitere Herausforderung ist die genaue Quantifizierung der Radioligandenakkumulation aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung von PET-Scannern. Dabei treten neben diesen Quantitätseinschränkungen auch Qualitätseinschränkungen auf. Die Effekte, die durch die schlechte räumliche Auflösung des PET-Scanners bedingt sind, werden auch als Partial-Volumen-Effekte (PVE) zusammengefasst. Der PVE kann als scheinbarer Verlust der Aktivität in kleinen Objekten und Regionen definiert werden. Dabei treten sowohl das „Spill-over" als auch der „Tissue-fraction-effect" auf [53]. Bei einem „Spill-over" strahlt die Aktivität der Zielregion in ein angrenzendes Gebiet über und kann dort gemessen werden. Dabei beinhaltet „Spill-over" bei genauer Betrachtung zwei separate Effekte: „Spill-out" und „Spill-in". „Spill-out" bedeutet, dass die Aktivität der Zielregion in ein angrenzendes Gebiet strahlt. Bei einem „Spill-in" strahlt die Aktivität umliegender Strukturen in die Zielregion hinein. Beim dem „Tissue-fraction-effect" - auch „sampling effect" genannt – wird das Vorhandensein verschiedener Gewebearten in einem Voxel (z.B. Tumorgewebe und normales Gewebe) betrachtet. Ein Voxel als kleinste Einheit kann nicht mehr aufgeteilt werden, so dass die verschiedenen Gewebearten nicht mehr separiert werden können (z.B. kleine Blutgefäße in Geweberegionen) [53, 159]. Tumoren mit einer Größe geringer als die 3-fache Halbwertsbreite (FWHM, engl. full width at half maximum) sind vom PVE betroffen [79]. Durch den Durchmesser der Silikonringe wurden die Tumorzellen bei der Applikation auf einen Bereich von 5 x 5 mm beschränkt und wuchsen maximal 2,5 mm in die Tiefe. Die bestmögliche räumliche Auflösung des Focus 120 PET-Scanners beträgt 1,13 mm FWHM (tangential; [96]) und somit sind Tumoren mit einer Größe von < 3,39 mm vom PVE betroffen. Ferner ist das Ausmaß des PVEs abhängig von der Art des Radionuklids. Die mittlere Positronenreichweite für ^{68}Ga in Wasser beträgt 2,9 mm [9]. Folglich wird mit diesem Radionuklid eine geringere Gesamtauflösung erreicht, als es die technischen Eigenschaften des Scanners erlauben würden. Dies ist ein bekanntes Problem in der PET-Bildgebung [18, 23, 94]. Weitere Studien sind mit PSMA-Liganden geplant, die mit ^{18}F oder ^{89}Zr markiert sind. Diese Radionuklide haben eine Positronenreichweite von 0,6 mm (^{18}F) bzw. 1,3 mm (^{89}Zr) [32], wodurch eine bessere Gesamtauflösung und ein geringerer Einfluss des PVEs erwartet werden kann.

Bezogen auf die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten HET-CAM-Studien kann der PVE eine Unterschätzung der Aktivitätskonzentration und eine Überschätzung des

Tumorvolumens auf Basis der PET-Daten verursachen. Das Einstrahlen der Aktivität aus benachbarten Blutgefäßen oder dem Embryo in den Tumor könnte gleichzeitig eine Überschätzung der Aktivitätskonzentration bewirken.

In dieser HET-CAM-Studie waren die Tumorvolumina der PSMA-positiven und PSMA-negativen Tumorxenografts ähnlich. Obwohl die absolute Radioligandenaufnahme in den einzelnen Tumoren aufgrund des PVEs voraussichtlich unterschätzt wurde, konnte nach der Analyse der Verhältnisse der unterschiedlichen Radioligandenaufnahme in den Tumoren eine korrekte Interpretation der Ergebnisse erfolgen.

Es werden bereits unterschiedliche Möglichkeiten zur Behebung des PVEs in der Literatur beschrieben [14, 79, 95, 159], beispielsweise basierend auf der CT-Bildgebung [20] oder während der Bildrekonstruktion [90]. Allerdings stellt die Bestimmung der exakten Korrekturfaktoren für Tumoren unterschiedlicher Größe und Radioligandenaufnahme im Verhältnis zum umliegenden Gewebe eine Herausforderung dar. Zusätzlich führt eine Partialvolumen (PV) -Korrektur meist zu einem stärkeren Bildrauschen [53]. Deshalb sollte in Bezug auf die Vor- und Nachteile einer PV-Korrektur gründlich evaluiert werden, ob von komplexen Berechnungen zur Behebung des PVEs profitiert werden kann. Als eine alternative Möglichkeit zur PV-Korrektur könnte die autoradiographische Technik in Betracht gezogen werden, denn die höhere Auflösung dieser Technik führt zu einer Verringerung des PVEs. Obwohl es bereits auch Ansätze zur PV-Korrektur anhand von MRT-Daten gibt [70, 120, 187], stellt auch hier die Anwendung eine große Herausforderung dar. Im Hinblick auf weitere HET-CAM-Studien sollte der PVE durch Auswahl des geeigneten Radionuklids sowie der Maximierung der Tumorgrößen berücksichtigt werden, um eine mögliche Ungenauigkeit der Ergebnisse zu minimieren.

Das Wachstum von Tumorxenografts auf der CAM kann als weitere Herausforderung betrachtet werden. Für jede Zelllinie ist vorrangig die Menge an notwendigen Zellen spezifisch für das jeweilige Tumorwachstum, da die Wachstumsbedingungen auf der CAM gleich sind. Trotz Titrierungsversuchen mit unterschiedlichen Zellzahlen, war die Bestimmung einer eindeutigen Mindestzellzahl für die jeweilige Zelllinie schwierig. Obwohl für eine größere Vergleichbarkeit eine identische Anzahl von Hühnerembryonen mit den verschiedenen Zelllinien geplant war, konnte deswegen nur eine geringerer Anzahl Hühnerembryonen mit LNCaP Tumorxenografts (n=5) im Vergleich zu LNCaP C4-2 Tumorxenografts (n=39) etabliert und für die Auswertung verwendet werden. Für zukünftige Studien mit dem HET-CAM-Modell müssen deshalb die Bedingungen für das Tumorwachstum weiter optimiert werden.

Obwohl bereits verschiedene Publikationen zur Etablierung von Tumorxenografts auf der CAM veröffentlicht wurden [45, 129, 137, 174, 189], gibt es nur wenige Studien über die Anwendung

des HET-CAM-Modells zur Analyse der Biodistribution von Radiopharmaka. Problematisch für die Analyse der Biodistribution von Radiopharmaka im HET-CAM-Modell ist die noch nicht abgeschlossene Organentwicklung des Hühnerembryos. Hier fehlen Studien, inwieweit die einzelnen Organansätze in ihrem jeweiligen Entwicklungsstadium eine vergleichbare Anreicherung bzw. Metabolisierung einer applizierten Substanz, im Vergleich zum vollentwickelten Organ, aufweisen. Diese Studien sind bereits in der Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin in Planung.

Bei dem HET-CAM-Modell handelt es sich ferner um ein abgeschlossenes System, weshalb Ausscheidungsprodukte des Hühnerembryos, anders als im adulten Tier, nicht exkretiert werden. Im Hühnerembryo reichern Abfallprodukte des Stoffwechsels primär in der Allantoisflüssigkeit an [116], die in zukünftigen Studien mit untersucht werden sollte.

5. Zusammenfassung

Für die Entwicklung und Validierung neuer zielgerichteter Radiopharmaka zur Untersuchung von spezifischer Akkumulation und Biodistribution ist vor der Durchführung klinischer Studien am Patienten eine präklinische Evaluation zur Verträglichkeit und Wirksamkeit dieser Substanzen notwendig. Da die pharmakokinetischen Eigenschaften einer Substanz im menschlichen Organismus nicht durch Zellversuche analysiert werden können, sind aufgrund mangelnder alternativer Modelle meist Studien mit Tierversuchen notwendig. Diese Experimente werden häufig mit Mäusen oder Ratten durchgeführt. Gemäß der 3R-Prinzipien (Reduction, Refinement, Replacement) werden im Hinblick auf das Wohlergehen der Tiere verbesserte bzw. alternative Methoden zu Tierversuchen gesucht. Eine vielversprechende Alternative ist das Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) – Modell, da Hühnerembryonen in Deutschland bis zum Schlupf nicht zu lebenden Tieren gezählt werden. Auf der Chorioallantoismembran (CAM), die den Hühnerembryo umgibt, können aufgrund ihrer ausgeprägten Vaskularisation und des noch nicht vollständig ausgereiften Immunsystems des Hühnerembryos, Tumoren gut etabliert und somit präklinische Studien mit onkologischen Fragestellungen durchgeführt werden.

In dieser Studie wurde die Eignung des HET-CAM-Modells für die Untersuchung der spezifischen Akkumulation eines Radioliganden, unter der Verwendung einer kombinierten Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Magnetresonanztomographie (MRT), evaluiert. Aufgrund der besonderen klinischen Relevanz wurde hierfür das Prostatakarzinommodell ausgewählt. Das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA), das in menschlichen Prostatakarzinomen oft überexprimiert wird, wurde als Zielstruktur verwendet. PSMA-positive und -negative Prostatakarzinom-Xenografts wurden auf der CAM etabliert und die Akkumulation des PSMA-spezifischen Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, der bereits in der klinischen Anwendung zum Einsatz kommt, in den Tumorxenografts untersucht. Die Bestimmung der Tumorvolumina erfolgte mittels MRT und die quantitative Evaluation der Akkumulation des Radioliganden wurde mittels PET durchgeführt (n = 42). Eine genaue Quantifizierung der Anreicherung des Radioliganden in den Tumoren erfolgte durch Gamma Counter-Messungen *ex vivo*. Es konnte eine 3- bis 5-fach höherer Anreicherung des Radioliganden in den PSMA-positiven Tumoren im Vergleich zu den PSMA-negativen Tumoren demonstriert werden. Zum histologischen Nachweis der Expression von PSMA auf der Zelloberfläche wurden abschließend Antikörperfärbungen durchgeführt, die eine intensivere Anfärbung des PSMA Proteins in den PSMA-positiven als in den PSMA-negativen Tumoren zeigten.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte das große Potential des HET-CAM-Modells, unter Verwendung der kombinierten Bildgebungsverfahren PET und MRT, für die initiale Evaluation der spezifischen Radioligandenakkumulation nachgewiesen werden. Das HET-CAM-Modell hat im Vergleich zu Experimenten mit Mäusen viele Vorteile, wie z.B. geringere Anschaffungs- und Haltungskosten, weniger administrativen Aufwand und dementsprechend einen umgehenden Beginn der Experimente. Trotz verschiedener Limitationen des Modells, zu denen ein geringes Zeitfenster für die Durchführung der Experimente oder der Entwicklungszustand der verschiedenen Organe zählen, konnte durch diese Studie das Anwendungspotential des HET-CAM-Modells für die initiale Evaluation der Radioligandenakkumulation in Tumorxenografts nachgewiesen werden. Unter diesem Aspekt ist z.B. das kurze Zeitfenster für die Durchführung der Experimente nur von geringer Bedeutung. Zur Validierung der Daten dieser Studie müssen in Zukunft noch weitere Studien mit dem HET-CAM-Modell durchgeführt werden. Eine erfolgreiche Etablierung dieses Modells kann eine erhebliche Reduktion von Tierversuchen, im Sinne der 3R-Prinzipien, ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

[1] Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, Eisenhut M, Linhart HG, Hadaschik BA, Holland-Letz T, Giesel FL, Kratochwil C, Haufe S, Haberkorn U, Zechmann CM: PET imaging with a [68Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. Eur J Nucl Med Mol Imaging 40: 486-495 (2013)

[2] Afshar-Oromieh A, Zechmann CM, Malcher A, Eder M, Eisenhut M, Linhart HG, Holland-Letz T, Hadaschik BA, Giesel FL, Debus J, Haberkorn U: Comparison of PET imaging with a (68)Ga-labelled PSMA ligand and (18)F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging 41: 11-20 (2014)

[3] Aleksandrowicz E, Herr I: Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. ALTEX 32: 143-147 (2015)

[4] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 358/1 von 1986: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=OJ:L:1986:358:FULL&from=DE (01.11.2021)

[5] Animal Resources Centre: Rat and Mice Weights: http://www.arc.wa.gov.au/?page_id=125 (18.01.2022)

[6] Armstrong PB, Quigley JP, Sidebottom E: Transepithelial Invasion and Intramesenchymal Infiltration of the Chick Embryo Chorioallantois by Tumor Cell Lines. Cancer Res 42: 1826-1837 (1982)

[7] Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J: Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A Structural and autoradiographic Study. Dev Biol 38: 237-248 (1974)

[8] Baccala A, Sercia L, Li J, Heston W, Zhou M: Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Tumor-Associated Neovasculature of Renal Neoplasms. Urology 70: 385-390 (2007)

[9] Bailey DL, Karp JS, Surti S: Physics and Instrumentation in PET. In: Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN (Hrsg) Positron Emission Tomography, Springer, London, S. 13-39 (2005)

[10] Bain MM, Fagan AJ, Mullin JM, McNaught I, McLean J, Condon B: Noninvasive Monitoring of Chick Development In Ovo Using a 7T MRI System From Day 12 of Incubation Through to Hatching. J Magn Reson Imaging 26: 198-201 (2007)

[11] Banerjee SR, Foss CA, Castanares M, Mease RC, Byun Y, Fox JJ, Hilton J, Lupold SE, Kozikowski AP, Pomper MG: Synthesis and Evaluation of Technetium-99m- and Rhenium-Labeled Inhibitors of the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). J Med Chem 51: 4504-4517 (2008)

[12] Barve A, Jin W, Cheng K: Prostate cancer relevant antigens and enzymes for targeted drug delivery. J Control Release 187: 118-132 (2014)

[13] Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Mier W, Haberkorn U, Kopka K, Eder M: Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med 56: 914-920 (2015)

[14] Bettinardi V, Castiglioni I, Bernardi ED, Gilardi MC: PET quantification: strategies for partial volume correction. Clin Transl Imaging 2: 199-218 (2014)

[15] Bjørnstad S, Austdal LPE, Roald B, Glover JC, Paulsen RE: Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. J Pharmacol Exp Ther 355: 386-396 (2015)

[16] Blakely RD, Robinson MB, Thompson RC, Colye JT: Hydrolysis of the Brain Dipeptide N-Acetyl-L- Aspartyl-LGlutamate: Subcellular and Regional Distribution, Ontogeny, and the Effect of Lesions on N-Acetylateda-Linked Acidic Dipeptidase Activity. J Neurochem 50: 1200-1209 (1988)

[17] Boschi S, Lee JT, Beykan S, Slavik R, Wie L, Spick C, Eberlein U, Buck AK, Lodi F, Cicoria G, Czernin J, Lassmann M, Fanti S, Herrmann K: Synthesis and preclinical evaluation of an Al^{18}F radiofluorinated GLU-UREA-LYS(AHX)-HBED-CC PSMA ligand. Eur J Nucl Med Mol Imaging 43: 2122-2130 (2016)

[18] Bunka M, Müller, Vermeulen C, Haller S, Türler A, Schibli R, van der Meulen NP: Imaging quality of ^{44}Sc in comparison with five other PET radionuclides using Derenzo phantoms and preclinical PET. Appl Radiat Isot 110: 129-133 (2016)

[19] Bzdega T, Turi T, Wroblewska B, She D, Chung HS, Kin H, Neale JH: Molecular Cloning of a Peptidase Against N-Acetylaspartylglutamate from a Rat Hippocampal cDNA Library. J Neurochem 69: 2270-2277 (1997)

[20] Cal-Gonzalez J, Vaquero JJ, Herraiz JL, Pérez-Liva, Soto-Montenegro ML, Pena-Zalbidea S, Desco M, Udias JM: Improving PET Quantification of Small Animal [^{68}Ga]DOTA-Labeled PET/CT Studies by Using a CT-Based Positron Range Correction. Mol Imaging Biol 20: 584-593 (2018)

[21] Campbell MLH, Mellor DJ, Sandøe P: HOW SHOULD THE WALFARE OF FETAL AND NEUROLOGICALLY IMMATURE POSTNATAL ANIMALS BE PROTECTED? Anim Welf 23: 369-379 (2014)

[22] Cardinale J, Schäfer M, Benesová M, Bauder-Wüst U, Leotta K, Eder M, Neels OC, Haberkorn U, Giesel FL, Kopka K: Preclinical Evaluation of ^{18}F-PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. J Nucl Med 58: 425-431 (2017)

[23] Carter LM, Kesner AL, Pratt EC, Sanders VA, Massicano AVF, Cutler CS, Lapi SE, Lewis JS: The Impact of Positron Range on PET Resolution, Evaluated with Phantoms and PHITS Monte Carlo Simulations for Conventional and Non-conventional Radionuclides. Mol Imaging Biol 22: 73-84 (2020)

[24] Carter RE, Feldman AR, Coyle JT: Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 749-753 (1996)

[25] Castanares MA, Copeland BT, Chowdhury WH, Liu MM, Rodriguez R, Pomper MG, Lupold SE, Foss CA: Characterization of a Novel Metastatic Prostate Cancer Cell Line of LNCaP Origin. Prostate 76: 215-225 (2016)

[26] Chang SS, Reuter VE, Heston WDW, Bander NH, Grauer LS, Gaudin P: Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. Cancer Res 59: 3192-3198 (1999)

[27] Chang SS, Reuter VE, Heston WDW, Gaudin PB: Metastatic Renal Cell Carcinoma Neovasculature expresses Prostate-specific Membrane Antigen. Urology 57: 801-805 (2001)

[28] Chen Y, Foss CA, Byun Y, Nimmagadda S, Pullambhatla M, Fox JJ, Castanares M, Lupold SE, Babich, JW, Mease RC, Pomper MG: Radiohalogenated Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Based Ureas as Imaging Agents for Prostate Cancer. J Med Chem 51: 7933-7943 (2008)

[29] Chen Y, Pullambhatla M, Foss CA, Byun Y, Nimmagadda S, Srinivasan, Sgouros G, Mease RC, Pomper MG: 2-(3-{1-Carboxy-5-[(6-[^{18}F]fluoro-pyridine-3-carbonyl)-amino]- pentyl}-ureido)-pentanedioic acid, [^{18}F]DCFPyL, a PSMA-based PET Imaging Agent for Prostate Cancer. Clin Cancer Res 17: 7645-7653 (2011)

[30] Cimpean AM, Ribatti D, Raica M: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. Angiogenesis 11: 311-319 (2008)

[31] Coleman JR, DeWitt SM, Batt P, Terepka AR: Electron probe analysis of calcium distribution during active transport in chick chorioallantoic membrane. Exptl Cell Res 63: 216-220 (1970)

[32] Conti M, Eriksson L: Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. EJNMMI Phys 3: 8 (2016)

[33] Danesi R, Bianchi SD, Soldani P, Campagni A, La Rocca RV, Myers CE, Paparelli, Del Tacca M: Suramin inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. Br J Cancer 68: 932-938 (1993)

[34] Davis MI, Bennett MJ, Thomas LM, Bjorkman PJ: Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 5981-5986 (2005)

[35] De Jong M, Breeman WAP, Bernard BF, Gameren AV, de Bruin E, Bakker WH, van der Pluijm ME, Visser TJ, Mäcke HR, Krenning EP: Tumour uptake of the radiolabelled somatostatin analogue [$DOTA^0$,TYR^3]octreotide is dependent on the peptide amount. Eur J Nucl Med 26: 693-698 (1999)

[36] DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu H, Harrington DA, Yu W, Lewis MT, Sikora AG: The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. Am J Cancer Res 8: 1642-1660 (2018)

[37] Denmeade S, Sokoll LJ, Dalrymple S, Rosen DM, Gady AM; Bruzek D, Ricklis RM, Isaacs JT: Dissociation Between Androgen Responsiveness for Malignant Growth vs. Expression of Prostate Specific Differentiation Markers PSA, hK2, and PSMAin Human Prostate Cancer Models. Prostate 54: 249-257 (2003)

[38] Der Schweizerische Bundesrat: Tierschutzverordnung (TSchV) 455.1 von 2020: https://fedlex.data.admin.ch/filestore/fedlex.data.admin.ch/eli/cc/2008/416/20200714/de/pdf-a/fedlex-data-admin-ch-eli-cc-2008-416-20200714-de-pdf-a.pdf (18.01.2022)

[39] Deryugina EI, Quigley JP: Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. Histochem Cell Biol 130: 1119-1130 (2008)

[40] Deutscher Bundestag - Zum Schmerzempfinden von Hühnerembryonen von 2020: https://www.bundestag.de/resource/blob/805020/58284d172e611640db4dc17ec59d0865/WD-8-075-20-pdf-data.pdf (31.10.2021)

[41] Dos Santos JC, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Lehnert W, Leotta K, Morgenstern A, Kopka K, Haberkorn U, Mier W, Kratochwil C: Development and dosimetry of ^{203}Pb/^{212}Pb-labelled PSMA ligands: bringing the "lead" into PSMA-targeted alpha therapy? Eur J Nucl Med Mol Imaging 46: 1081-1091 (2019)

[42] Dos Santos JC, Bijer B, Bauder-Wüst U, Schäfer M, Leotta K, Eder M, Benesová M, Kleist C, Giesel F, Kratochwil C, Kopka K, Haberkorn U, Mier W: Development of Novel PSMA Ligands for Imaging and Therapy with Copper Isotopes. J Nucl Med 61: 70-79 (2020)

[43] Drews U: Extraembryonale Organe. In: Taschenatlas der Embryologie, Thieme Stuttgart, S. 156-157 (1993)

[44] Dritter Abschnitt - Arzneimittelgesetz (AMG): https://www.buzer.de/gesetz/7031/b24596.htm (31.10.2021)

[45] Dupertuis YM, Delie F, Cohen M, Pichard C: In ovo method for evaluating the effect of nutritional therapies on tumor development, growth and vascularization. Clin Nutr Exp 2: 9-17 (2015)

[46] Ebert, JD: THE EFFECTS OF CHORIOALLANTOIC TRANSPLANTS OF ADULT CHICKEN TISSUES ON HOMOLOGOUS TISSUES OF THE HOST CHICK EMBYO. Proc Natl Acad Sci U S A 40: 337–347 (1954)

[47] Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Hull W-E, Wängler C, Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M: 68Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. Bioconjug Chem 23: 688-697 (2012)

[48] Eder M, Neels O, Müller M, Bauder-Wüst U, Remde Y, Schäfer M, Hennrich U, Eisenhut M, Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, Kopka K: Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. Pharmaceuticals 7: 779-796 (2014)

[49] Eide AL, Glover JC: Development of the Longitudinal Projection Patterns of Lumbar Primary Sensory Afferents in the Chicken Embryo. J Comp Neurol 353: 247-259 (1995)

[50] Eide AL, Glover JC: Developmental dynamics of functionally specific primary sensory afferent projections in the chicken embryo. Anat Embryol 195: 237-250 (1997)

[51] Elgamal AA, Holmes EH, Su SL, Tino WT, Simmons SJ, Peterson M, Greene TG, Boynton AL, Murphy GP: Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA): Current Benefits and Future Value. Semin Surg Oncol 18: 10-16 (2000)

[52] Epstein JI, Lotan T: The Lower Urinary Tract and Male Genital System. In: Abbas A, Aster J, Kumar V (Hrsg) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 9. Auflage, Elsevier Saunders, Philadelphia, S. 983-989 (2015)

[53] Erlandsson K, Buvat I, Pretorius PH, Thomas BA, Hutton BF: A review of partial volume correction techniques for emission tomography and their applications in neurology, cardiology and oncology. Phys Med Biol 57: R119-159 (2012)

[54] Fair WR, Israeli RS, Heston WDW: Prostate-Specific Membrane Antigen. Prostate 32: 140-148 (1997)

[55] Fan X, Wang L, Guo Y, Tu Z, Li L, Tong H, Xu Y, Li, Fang K: Ultrasonic Nanobubbles Carrying Anti-PSMANanobody: Construction and Application in Prostate Cancer-Targeted Imaging. PLoS ONE 10: e0127419 (2015)

[56] Faucher L, Guay-Bégin A, Lagueux J, Côté M, Petitclerc É, Fortin M: Ultra-small gadolinium oxide nanoparticles to image brain cancer cells in vivo with MRI. Contrast Media Mol Imaging 6: 209-218 (2011)

[57] Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin JC, Pujol S, Bauer C, Jennings D, Fennessy F, Sonka M, Buatti J, Aylward S, Miller JV, Pieper S, Kikinis R: 3D Slicer as an Image Computing Platform for the Quantitative Imaging Network. Magn Reson Imaging 30: 1323-1341 (2012)

[58] Fellah JS, Jaffredo T, Nagy N, Dunon D: Development of the Avian Immune System. In: Schat KA, Kaspers B, Kaiser P (Hrsg) Avian Immunology, 2. Auflage, Elsevier, Amsterdam, S. 45-64 (2014)

[59] Flamme I, Schulze-Osthoff K, Jacob HJ: Mitogenic activity of chicken chorioallantoic fluid is temporally correlated to vascular growth in the chorioallantoic membrane and related to fibroblast growth factors. Development 111: 683-690 (1991)

[60] Flock DK 2019/01: Internal Egg Quality: trends and opportunities to respond to changing demand: https://lohmann-breeders.com/lohmanninfo/internal-egg-quality-trends-and-opportunities-to-respond-to-changing-demand/ (18.01.2022)

[61] Foss CA, Mease RC, Fan H, Wang Y, Ravert HT, Dannals RF, Olszewski RT, HEston WD, Kozikowski AP, Pompder MG: Radiolabeled Small-Molecule Ligands for Prostate-Specific Membrane Antigen: In vivo Imaging in Experimental Models of Prostate Cancer. Clin Cancer Res 11: 4022-4028 (2005)

[62] Friend JV, Crevel TC, Williams TC, Parish WE: IMMATURITY OF THE INFLAMMATORY RESPONSE OF THE CHICK CHORIOALLANTOIC MEMBRANE. Toxic in Vitro 4: 324-326 (1990)

[63] Funakoshi Y, Matsuda S, Uryu K, Fujita H, Okumura N, Sahanaka M: An immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor in the developing chick. Anat Embryol 187: 415-423 (1993)

[64] Gabrielli MG, Materazzi G, Bondi AM, Menghi G: Developmental expression of glycocomponents in the chick chorioallantoic membran. Anat Embryol 207: 63-71 (2003)

[65] Gebhardt P, Würbach L, Heidrich A, Heinrich L, Walther M, Opfermann T, Sørensen B, Saluz HP: Dynamic behaviour of selected PET tracers in embryonated chicken eggs. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol 32: 371-377 (2013)

[66] Ghosh A, Wang X, Klein E, Heston WDW: Novel Role of Prostate-Specific Membrane Antigen in Suppressing Prostate Cancer Invasiveness. Cancer Res 65: 727-731 (2005)

[67] van Golde JMCG, Mulder TALM, Scheve E, Prinzen FW, Blanco CE: Hyperoxia and local organ blood flow in the developing chick embryo. J Physiol 515.1: 243-248 (1999)

[68] Graham K, Lesche R, Gromov AV, Böhnke N, Schäfer M, Hassfeld J, Dinkelborg L, Kettschau G: Radiofluorinated Derivatives of 2-(Phosphonomethyl)pentanedioic Acid as Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) for the Imaging of Prostate Cancer. J Med Chem 55: 9510-9520 (2012)

[69] Greifenstein L, Engelbogen N, Lahnif H, Sinnes JP, Bergmann R, Bachmann M, Rösch F: Synthesis, Labeling and Preclinical Evaluation of a Squaric Acid Containing PSMA Inhibitor Labeled with ^{68}Ga: A Comparison with PSMA-11 and PSMA-617. ChemMedChem 15: 695-704 (2020)

[70] Gutierrez D, Montandon M, Assal F, Allaoua M, Ratib O, Lövblad K, Zaidi H: Anatomically guided voxel-based partial volume effect correction in brain PET: Impact of MRI segmentation. Comput Med Imaging Graph 36: 610-619 (2012)

[71] Hajri A, Bruns C, Marbach P, Aprahamian M, Longnecker DS, Damgé C: Inhibition of the Growth of Transplanted Rat Pancreatic Acinar Carcinoma with Octreotide. Eur J Cancer 27: 1247-1252 (1991)

[72] Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. Dev Dyn 195: 231-272 (1992)

[73] Han B, Xie H, Chen Q, Zhang J: Sensitizing hormone-refractory prostate cancer cells to drug treatment by targeting 14-3-3σ. Mol Cancer Ther 5: 903-912 (2006)

[74] Han X, Liu C, Liu F, Xie Q, Liu T, Guo X, Xu X, Yang X, Zhu H, Yang Z: ^{64}Cu-PSMA-617: A novel PSMA-targeted radio-tracer for PET imaging in gastric adenocarcinoma xenografted mice model. Oncotarget 8: 74159-74169 (2017)

[75] Haller S, Ametamey SM, Schibli R, Müller C: Investigation of the chick embryo as a potential alternative to the mouse for evaluation of radiopharmaceuticals. Nucl Med Biol 42: 226-233 (2015)

[76] Harris, JJ: THE HUMAN TUMOR GROWN IN THE EGG. Ann N Y Acad Sci 76: 764–774 (1958)

[77] Herrmann A, Taylor A, Murray P, Poptani H, Sée V: Magnetic Resonance Imaging for Characterization of a Chick Embryo Model of Cancer Cell Metastases. Mol Imaging 17: 1536012118809585 (2018)

[78] Hillier SM, Maresca KP, Lu G, Merkin RD, Marquis JC, Zimmermann CN, Eckelman WC, Joyal JL, Babich JW: ^{99}mTc-Labeled Small-Molecule Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen for Molecular Imaging of Prostate Cancer. J Nucl Med 54: 1369-1376 (2013)

[79] Hoffman EJ, Huang S, Phelps ME: Quantitation in Positron Emission Computed Tompgraphy: 1. Effect of Object Size. J Comp Assist Tomogr 3: 299-308 (1979)

[80] Hofman MS, Emmett L, Sandhu S, Iravani A, Joshua AM, Goh JC, Pattison DA, Tan TH, Kirkwood ID, Ng S, Francis RJ, Gedye C, Rutherford NK, Weickhardt A, Scott AM, Lee ST, Kwan EM, Azad AA, Ramdave S, Redfern AD, Macdonald W, Guminski A, Hsiao E, Chua W, Lin P, Zhang AY, McJannett MM, Stockler MR, Violet JA, Williams SG, Martin AJ, Davis ID: [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 versus cabazitaxel in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (TheraP): a randomised, open-label, phase 2 trial. Lancet 397: 797-804 (2021)

[81] Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Ming Chu T, Mirand EA, Murphy GP: LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. Cancer Res 43: 1809-1818 (1983)

[82] Horoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP: Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostate cancer patients. Anticancer Res 7: 927-935 (1987)

[83] IACUC Boston University: https://www.bu.edu/researchsupport/forms-policies/iacuc-use-of-live-embryonated-eggs-of-egg-laying-vertebrate-species/ (29.10.2021)

[84] IACUC Brown University: https://www.brown.edu/research/sites/research/files/policies/avian-embryo-use-policy-and-notification-form.pdf (29.10.2021)

[85] IACUC Iowa State University: https://www.bu.edu/researchsupport/forms-policies/iacuc-use-of-live-embryonated-eggs-of-egg-laying-vertebrate-species/ (29.10.2021)

[86] IACUC Texas Tech University: https://www.ttuhsc.edu/research/divisions/integrity-office/animal-care/documents/P17_UseAvianEggs_121418.pdf (29.10.2021)

[87] Israeli RS, Powell CT, Corr JG, Fair WR, Heston WDW: Expression of the Prostate-specific Membrane Antigen. Cancer Res 54: 1807-1811 (1994)

[88] Jackson PF, Cole DC, Slusher BS, Stetz SL, Ross LE, Donzanti BA, Trainor DA: Design, Synthesis, and Biological Activity of a Potent Inhibitor of the Neuropeptidase N-Acetylated r-Linked Acidic Dipeptidase. J Med Chem 39: 619-622 (1996)

[89] Jeurissen SHM: The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. Immunology 80: 29-33 (1993)

[90] Jødal L, Le Loirec C, Champion C: Positron range in PET imaging: an alternative approach for assessing and correcting the blurring. Phys Med Biol 57: 3931-3943 (2012)

[91] Johnston PM, Comar CL: Distribution and Contribution of Calcium from the Albumen, Yolk and Shell to the Developing Chick Embryo. Am J Physiol 183: 365-370 (1955)

[92] Joseph-Silverstein J, Consigli SA, Lyser KM, Pault CV: Basic Fibroblast Growth Factor in the Chick Embryo: Immunolocalization to Striated Muscle Cells and Their Precursors. J Cell Biol 108: 2459-2466 (1989)

[93] Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: Establishment and Characterization of a human Prostatic Carcinoma Cell Line (PC-3). Invest Urol 17: 16-23 (1979)

[94] Kemerink GJ, Visser MGW, Franssen R, Beijer E, Zamburlini M, Halders SGEA, Brans B, Mottaghy FM, Teule GJJ: Effect of the positron range of ^{18}F, ^{68}Ga and ^{124}I on PET/CT in lung-equivalent materials. Eur J Nucl Med Mol Imaging 38: 940-948 (2011)

[95] Kessler RM, Ellis JR, Eden M: Analysis of Emission Tomographic Scan Data: Limitations Imposed by Resolution and Background. J Comput Assist Tomogr 8: 514-522 (1984)

[96] Kim JS, Lee JS, Im KC, Kim SJ, Kim S, Lee DS, Moon DH: Performance Measurement of the microPET Focus 120 Scanner. J Nucl Med 48: 1527-1535 (2007)

[97] Klingenberg M, Becker J, Eberth S, Kube D, Wilting J: The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. BMC Cancer 14: 339 (2014)

[98] Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J: Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. Br J Cancer 35: 347-356 (1977)

[99] Komatsu A, Higashi Y, Matsumoto K: Various CAM tumor models. Enzymes 46: 37-57 (2019)

[100] Koshida K, Konaka H, Imao T, Egawa M, Mizokami A, Namiki M: Comparison of two in vivo models for prostate cancer: Orthotopic and intratesticular inoculation of LNCaP or PC-3 cells. Int J Urol 11: 1114-1121 (2004)

[101] Kramer L, Winter G, Baur B, Kuntz A, Kull T, Solbach C, Beer AJ, Lindén M: Quantitative and correlative biodistribution analysis of 89Zr-labeled mesoporous silica nanoparticles intravenously injected into tumor-bearing mice. Nanoscale 9: 9743-9753 (2017)

[102] Kularatne SA, Zhou Z, Yang J, Post CB, Low PS: Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted ^{99m}Tc-Radioimaging Agents. Mol Pharm 6: 790-800 (2009)

[103] Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Hemodynamic Disorders, Thromboembolism, and Shock. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC (Hrsg) Robbins Basic Pathology, 10. Auflage, Elsevier, S. 101-103 (2018 a)

[104] Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Inflammation and Repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC (Hrsg) Robbins Basic Pathology, 10. Auflage, Elsevier, S. 87-93 (2018 b)

[105] Kuo H, Pan J, Zhang Z, Lau J, Merkens H, Zhang C, Colpo N, Lin K, Bénard F: Effects of Linker Modification on Tumor-to-Kidney Contrast of ^{68}Ga-Labeled PSMA-Targeted Imaging Probes. Mol Pharm 15: 3502-3511 (2018)

[106] Laidler P, Dulinska J, Lekka M, Lekki J: Expression of prostate specific membrane antigen in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. Arch Biochem Biophys 435: 1-14 (2005)

[107] Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Grandin T, Greenacre C, Gwaltney-Brant S, McCrackin MA, Meyer R, Miller D, Shearer J, Turner T, Yanong R: AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animal: 2020 Edition. AVMA American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL, USA (2020): https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf (29.10.2021)

[108] Leighton, J, Nassauer, J, Tchao, R: The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. Fd Chem Toxic 23**:** 293-298 (1985)

[109] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL, http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/ (20.01.2022)

[110] Luechtefeld T, Maertens A, Russo D, Rovida C, Zhu H, Hartung T: Analysis of Draize Eye Irritation Testing and its Prediction by Mining Publicly Available 2008-2014 REACH Data. ALTEX 33: 123-134 (2016)

[111] Luthi-Carter R, Berger UV, Barczak AK, Enna M, Coyle JT: Isolation and expression of a rat brain cDNA encoding glutamate carboxypeptidase II. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 3215-3220 (1998)

[112] Mast J, Goddeeris M: IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE DEVELOPMENT OF THE STRUCTURAL ORGANISATION OF THE CHICKEN SPLEEN. Vlaams Diergeneeskd Tijdschr 67: 36-44 (1998)

[113] Mast J, Goddeeris M: Development of immunocompetence of broiler chickens. Vet Immunol Immunopathol 70: 245-256 (1999)

[114] Mease RC, Dusich CL, Foss CA, Ravert HT, Dannals RF, Seidel J, Prideaux A, Fox JJ, Sgouros G, Kozikowski AP, Pomper MG: N-[N-[(S)-1,3-Dicarboxypropyl]Carbamoyl]-4-[^{18}F]Fluorobenzyl-l-Cysteine, [^{18}F]DCFBC: A New Imaging Probe for Prostate Cancer. Clin Cancer Res 14: 3036-3043 (2008)

[115] Merck: https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Hematoxylin-solution-modified-acc.-to-Gill-III,MDA_CHEM-105174 (06.05.2022)

[116] Merckx G, Tay H, Lo Monaco M, van Zandvoort M, De Spiegelaere W, Lambrichts I, Bronckaers A: Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. Tissue Eng Part B Rev 26: 519-539 (2020)

[117] Mesters JR, Barinka C, Li W, Tsukamoto T, Majer P, Slusher BS, Konvalinka J, Hilgenfeld R: Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. EMBO J 25: 1375-1384 (2006)

[118] Michalska M, Schultze-Seemann S, Bogatyreva L, Hauschke D, Wetterauer U, Wolf P: In vitro and in vivo effects of a recombinant anti-PSMA immunotoxin in combination with docetaxel against prostate cancer. Oncotarget 7: 22531-42 (2016)

[119] Miksch J, Bottke D, Krohn T, Thamm R, Bartkowiak D, Solbach C, Bolenz C, Beer M, Wiegel T, Beer AJ, Prasad V: Interobserver variability, detection rate, and lesion patterns of ^{68}Ga-PSMA-11-PET/CT in early-stage biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. Eur J Nucl Mol Imaging 47: 2339-2347 (2020)

[120] Müller-Gärtner HW, Links JM, Prince JL, Bryan RN, McVeigh E, Leal JP, Davatzikos C, Frost JJ: Measurement of Radiotracer Concentration in Brain Gray Matter Using Positron Emission Tomography: MRI-Based Correction for Partial Volume Effects. J Cereb Blood Flow Metab 12: 571-583 (1992)

[121] Murphy GP, Elgamal AA, Su SL, Bostwick DG, Holmes EH: Current Evaluation of the Tissue Localization and Diagnostic Utility of Prostate Specific Membrane Antigen. Cancer 83: 2259-2269 (1998)

[122] Murphy JB, Rous P: THE BEHAVIOR OF CHICKEN SARCOMA IMPLANTED IN THE DEVELOPING EMBRYO. J Exp Med 15: 119-132 (1912)

[123] Murphy JB: TRANSPLANTABILITY OF TISSUES TO THE EMBRYO OF FOREIGN SPECIES: ITS BEARING ON QUESTIONS OF TISSUE SPECIFICITY AND TUMOR IMMUNITY. J Exp Med 17: 482-493 (1913)

[124] Nemeth JA, Harb JF, Barroso U, He Z, Grignon DJ, Cher ML: Severe Combined Immunodeficient-hu Model of Human Prostate Cancer Metastasis to Human Bone. Cancer Res 59: 1987-1993 (1999)

[125] Nguyen DP, Xiong PL, Liu H, Pan, S, Leconet W, Navarro V, Guo M, Moy J, Kim S, Ramirez-Fort MK, Batra JS, Bander NH: Induction of PSMA and Internalization of an Anti-PSMA mAb in the Vascular Compartment. Mol Cancer Res 14:1045-1053 (2016)

[126] Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML: The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. Angiogenesis 17: 779-804 (2014)

[127] Osborne JR, Kalidindi TM, Punzalan BJ, Gangangari K, Spratt DE, Weber WA, Larson SM, Pillarsetty NVK: Repeatability of [^{68}Ga]DKFZ11-PSMA PET Scans for Detecting Prostate-specific Membrane Antigen-positive Prostate Cancer. Mol Imaging Biol 19: 944-951 (2017)

[128] Patten BM: The Gametes and Fertilization. In: Patten BM (Hrsg) Early Embryology of the Chick, 4. Aufl, The Maple Press Company York, PA, S. 10-37 (1957)

[129] Pawlikowska P, Tayoun T, Oulhen M, Faugeroux V, Rouffiac V, Aberlenc A, Pommier AL, Honore A, Marty V, Bawa O, Lacroix L, Scoazec JY, Chauchereau A, Laplace-Builhe, Farace F: Exploitation of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) as a platform for anti-metastatic drug testing. Sci Rep 10: 16876 (2020)

[130] Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, Qiao CH, Lin S, Tong WP, May F, Mukherjee B, Heston WDW: Prostate-specific Membrane Antigen: A Novel Folate Hydrolase in Human Prostatic Carcinoma Cells. Clin Cancer Res 2: 1445-1451 (1996)

[131] Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schäfers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lützen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzel A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bögemann M, Fendler WP, Krause BJ: German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. J Nucl Med 58: 85-90 (2017)

[132] Rembrink K, Romijn JC, van der Kwast TH, Rübben H, Schröder FH: Orthotopic Implantation of Human Prostate Cancer Cell Lines: A Clinically Relevant Animal Model for Metastatic Prostate Cancer. Prostate 31: 168-174 (1997)

[133] Rhee H, Ng KL, Tse BW, Yeh MC, Russell PJ, Nelson C, Thomas P, Samaratunga H, Vela I, Gobe G, Wood S: Using prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in clear cell renal cell carcinoma for imaging advanced disease. Pathology 48: 613-643 (2016)

[134] Ribatti, D, Vacca, A, Ranieri, G, Sorino, S, Roncali, L: The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an *in vivo* Wound Healing Model. Path Res Pract 192: 1068–1076 (1996 a)

[135] Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on angiogenesis. Int J Dev Biol 40: 1189-1197 (1996 b)

[136] Ribatti D: CHICK EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE AS A USEFUL TOOL TO STUDY ANGIOGENESIS. Int Rev Cell Mol Biol 270: 181-224 (2008)

[137] Ribatti D: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. Exp Cell Res 328: 314-324 (2014)

[138] Ribatti D: The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. Mech Dev 141: 70-77 (2016)

[139] Ribatti D: The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. Reprod Toxicol 70: 97-101 (2017)

[140] Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: https://krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile (30.10.2021)

[141] Robinson MB, Blakely RD, Couto R, Coyle JT: Hydrolysis of the Brain Dipeptide N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamat. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. J Biol Chem 30: 14498-14506 (1987)

[142] Rokitka MA, Rahn H: Regional differences in shell conductance and pore density of avian eggs. Respir Physiol 68: 371-376 (1987)

[143] Romanoff AL: The Extraembryonic Membranes. In: The Avian Embryo, The Macmillan Company, New York, S. 1116-1124 (1960)

[144] Romijn C, Roos J: The air space of the Hen´s Egg and its changes during the period of incubation. J Physiol 94: 365-379 (1938)

[145] Rosenbruch, M: Frühe Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies als Modell in der experimentellen Biologie und Medizin. ALTEX Altern Anim Exp 11: 199-206 (1994)

[146] Rosenbruch, M: Zur Sensitivität des Embryos im bebrüteten Hühnerei. ALTEX Altern Anim Exp 14: 111-113 (1997)

[147] Rousseau E, Lau J, Kuo H, Zhang Z, Merkens H, Hundal-Jabal N, Colpo N, Lin K, Bénard F: Monosodium Glutamate Reduces ^{68}Ga-PSMA-11 Uptake in Salivary Glands and Kidneys in a Preclinical Prostate Cancer Model. J Nucl Med 59: 1865-1868 (2018)

[148] Russell WMS, Burch RL: The Principles of Humane Experimental Technique, Methuen & Co, London, S. 1-238 (1959)

[149] Sakao K, Vyas AR, Chinni SR, Amjad AI, Parikh R, Singh SV: CXCR4 Is a Novel Target of Cancer Chemopreventative Isothiocyanates in Prostate Cancer Cells. Cancer Prev Res 8: 365-374 (2015)

[150] Schäfer M, Bauder-Wüst U, Leotta K, Zoller F, Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M, Eder M: A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ^{68}Ga-PET imaging of prostate cancer. EJNMMI Res 2: 23 (2012)

[151] Schülke N, Varlamova OA, Donovan GP, Ma D, Gardner JP, Morrissey DM, Arrigale RR, Zhan C, Chodera AJ, Surowitz KG, Maddon PJ, Heston WDW, Olson WC: The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12590-12595 (2003)

[152] Schlatter P, König M, Karlsson L, Burri P: Quantitative Study of Intussusceptive Capillary Growth in the Chorioallantoic Membrane (CAM) of the Chicken Embryo. Microvasc Res 34: 65-73 (1997)

[153] Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H: Modulation of Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B- and Mitogen-Activated Protein Kinase-Pathways by Tea Polyphenols in Human Prostate Cancer Cells. J Cell Biochem 91: 232-242 (2004)

[154] Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WDW, Cordon-Cardo C: Prostate-specific Membrane Antigen Expression in Normal and Malignant Human Tissues. Clin Cancer Res 3: 81-85 (1997)

[155] Slusher BS, Robinson MB, Tsai G, Simmons M, Richards SS, Coyle JT: Rat Brain IV-Acetylated a-linked Acidic Dipeptidase Activity. J Biol Chem 34: 21297-21301 (1990)

[156] Slusher BS, Vornov JJ, Thomas AG, Hurn PD, Harukuni I, Bhardwaj A, Traystman RJ, Robinson MB, Britton P, Lu XM, Tortella FC, Wozniak KM, Yudkoff M, Potter BM, Jackson PF: Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. Nat Med 5: 1396-1402 (1999)

[157] Smith-Jones PM, Vallabahajosula S, Goldsmith SJ, Navarro V, Hunter CJ, Bastidas D, Bander NH: *In Vitro* Characterization of Radiolabeled Monoclonal Antibodies Specific for the Extracellular Domain of Prostate-specific Membrane Antigen. Cancer Res 60: 5237-5243 (2000)

[158] Sokoloff RL, Norton KC, Gaisor CL, Marker KM, Grauer LS: A Dual-Monoclonal Sandwich Assay for Prostate-specific Membrane Antigen: Levels in Tissues, Seminal Fluid and Urine. The Prostate 43:150–157 (2000)

[159] Soret M, Bacharach SL, Buvat I: Partial-Volume Effect in PET Tumor Imaging. J Nucl Med 48: 932-945 (2007)

[160] Stauch BL, Robinson MB, Forloni G, Tsai G, Coyle JT: The effects of N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase) inhibitors on [^{3}H]NAAG catabolism in vivo. Neurosci 100: 295-300 (1989)

[161] Steinemann G, Dittmer A, Schmidt J, Josuttis D, Fährling M, Biersack B, Beindorff N, Koziolek EJ, Schobert R, Brenner W, Müller T, Nitzsche B, Höpfner M: Antitumor and

antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. Mol Oncol 13: 2679-2696 (2019)

[162] Sterzing F, Kratochwil C, Fiedler H, Katayama S, Habl G, Kopka K, Afshar-Oromieh A, Debus J, Haberkorn U, Giesel FL: (68)Ga-PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. Eur J Nucl Med Mol Imaging 43: 34-41 (2016)

[163] Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, Bostwick DG: Prostate-specific membrane antigen Expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. Urology 52: 637-640 (1998)

[164] Taconic: lohm: https://www.taconic.com/rat-model/lewis (18.01.2022)

[165] Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang C, Huang J: PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. Prostate 71: 1668-1679 (2011)

[166] Taylor RM, Severns V, Brown DC, Bisoffi M, Sillerud LO: Prostate Cancer Targeting motifs: Expression of α_v β_3, Neurotensin Receptor I, Prostate Specific Membrane Antigen, and Prostate Stem Cell Antigen in Human Prostate Cancer Cell Lines and Xenografts. Prostate 72: 523-532 (2012)

[167] Thalmann GN, Anezinis PE, Chang S, Zhau HE, Kim E, Hopwood VL, Pathak S, von Eschenbach AC, Chung LWK: Androgen-independent Cancer Progression and Bone Metastasis in the LNCaP Model of Human Prostate Cancer. Cancer Res 54: 2577-2581 (1994)

[168] Troebs J, Asam C, Pion E, Prantl L, Aung T, Haerteis S: 3D monitoring of tumor volume in an in vivo model. Clin Hemorheol Microcirc 76: 123-131 (2020)

[169] Troyer JK, Beckett ML, Wright GL: DETECTION AND CHARACTERIZATION OF THE PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) IN TISSUE EXTRACTS AND BODY FLUIDS. Int J Cancer 62: 552-558 (1995)

[170] Vargas A, Zeisser-Labouebe M, Lange N, Gurny R, Delie F: The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 59: 1162-1176 (2007)

[171] Vollmar S, Hampl JA, Kracht L, Herholz K: Integration of Functional Data (PET) into Brain Surgery Planning and Neuronavigation, In: Buzug TM, Holz D, Bongartz J, Kohl-Bareis M, Hartmann U, Weber S (Hrsg) Advances in Medical Engineering, Springer Berlin Heidelberg, S, 98-103 (2007)

[172] Vu BT, Shahin SA, Croissant J, Fatieiev Y, Matsumoto K, Doan TL, Yik T, Simargi S, Conteras A, Ratliff L, Jimenez CM, Raehm L, Khashab N, Durand J, Glackin C, Tamanoi F: Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the efect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. Sci Rep 8: 8524 (2018)

[173] Wang Y, Shao G, Wu J, Cui C, Zang S, Qui F, Jia R, Wang Z, Wang F: Preparation of ^{68}Ga-PSMA-11 with a Synthesis Module for Micro PET-CT Imaging of PSMA Expression during Prostate Cancer Progression. Contrast Media Mol Imaging 8: 1-9 (2018)

[174] Warnock G, Turtoi A, Blomme A, Bretin F, Bahri MA, Lemaire C, Libert LC, Seret AEJJ, Luxen A, Castronovo V, Plenevaux AREG: In Vivo PET/CT in a Human Glioblastoma Chicken Chorioallantoic Membrane Model: A New Tool for Oncology and Radiotracer Development. J Nucl Med 54: 1782-1788 (2013)

[175] Weiss P, Matoltsy AG: Absence of Wound Healing in Young Chick Embryos. Nature 180: 854 (1957)

[176] Weiss P, Matoltsy AG: Wound Healing in Chick Embryos in Vivo and in Vitro. Dev Biol 1: 302-326 (1959)

[177] Wernicke AG, Kim S, Liu H, Bander NH, Pirog EC: Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in the Neovasculature of Gynecologic Malignancies: Implications for PSMA-targeted Therapy. Appl Immunohistochem Mol Morphol 25: 271-276 (2017)

[178] Winter G†, Koch ABF†, Löffler J, Lindén M, Solbach C, Abaei A, Li H, Glatting G, Beer AJ, Rasche V: Multi-Modal PET and MR Imaging in the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Model for Initial *in Vivo* Testing of Target-Specific Radioligands. Cancers 12: 1248 (2020 a)
† These authors contributed equally to the work.

[179] Winter G, Koch ABF, Löffler J, Jelezko F, Lindén M, Li H, Abaei A, Zuo Z, Beer AJ and Rasche V: *In vivo* PET/MRI Imaging of the Chorioallantoic Membrane. Front Phys 8: 151 (2020 b)

[180] Woodruff AM, Goodpasture EW: The Susceptibility of the Chorio-Allantoic Membrane of the Chick Embryos to Infection with the Fowl-Pox Virus. Am J Pathol 7(3): 209-222 (1931)

[181] Wright GL, Haley C, Beckett ML, Schellhammer PF: Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Normal, Benign, and Malignant Prostate Tissues. Urol Oncol 1: 18-28 (1995)

[182] Wu H, Hsieh J, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LWK: Derivation of androgen-independent human LNCaP Prostatic Cancer Cell Sublines: Role of bone stromal cells. Int J Cancer 57: 406-412 (1994)

[183] Würbach L, Heidrich A, Opfermann T, Gebhardt P, Saluz HP: Insights into Bone Metabolism of Avian Embryos In Ovo Via 3D and 4D 18F-fluoride Positron Emission Tomography. Mol Imaging Biol 14: 688-698 (2012)

[184] Wüstemann T, Bauder-Wüst U, Schäfer M, Eder M, Benesova M, Leotta K, Kratochwil C, Haberkorn U, Kopka K, Mier W: Design of Internalizing PSMA-specific Glu-ureido-based Radiotherapeuticals. Theranostics 6: 1085-1095 (2016)

[185] Yadav MP, Ballal S, Sahoo RK, Dwivedi SN, Bal C: Radioligand Therapy With ^{177}Lu-PSMA for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. AJR 213: 275-285 (2019)

[186] Yao V, Berkman CE, Choi JK, O´Keefe DS, Bacich DJ: Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA), Increases Cell Folate Uptake and Proliferation and Suggests a Novel Role for PSMAin the Uptake of the Non-Polyglutamated Folate, Folic Acid. Prostate 70: 305-316 (2010)

[187] Zaidi H, Ruest T, Schoenahl F, Montandon M: Comparative assessment of statistical brain MR image segmentation algorithms and their impact on partial volume correction in PET. Neuroimage 32: 1591-1607 (2006)

[188] Zhao F, Huang W, Zhang Z, Mao L, Han Y, Yan J, Lei M: Triptolide induces protective autophagy through activation of the CaMKKβ-AMPK signaling pathway in prostate cancer cells. Oncotarget 7: 5366-5382 (2015)

[189] Zlatopolskiy B, Zischler J, Schäfer D, Urusova EA, Guliyev M, Bannykh O, Endepols H, Neumaier B: Discovery of 7-[18F]Fluorotryptophan as a Novel Positron Emission Tomography (PET) Probe for the Visualization of Tryptophan Metabolism in Vivo. J Med Chem 61: 189-206 (2018)

[190] Zuo Z, Syrovets T, Genze F, Abaei A, Ma G, Simmet T, Rasche V: High-resolution MRI analysis of breast cancer xenograft on the chick chorioallantoic membrane. NMR Biomed 28: 440-447 (2015)

[191] Zuo Z, Syrovets T, Wu Y, Hafner S, Vernikouskaya I, Liu W, Ma G, Weil T, Simmet T, Rasche V: The CAM cancer xenograft as a model for initial evaluation of MR labelled compounds. Sci Rep 7: 46690 (2017)

Anhang

Anhang 1: Auswahl der Hühnerembryonen für die Experimente

Tabelle 8: Übersicht der Hühnerembryonen, die für die Experimente mit dem Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)-Modell verwendet wurden (n = 66). Angegeben ist das Tumorwachstum jedes Hühnerembryos (LNCaP C4-2, LNCaP und PC-3; + = Tumorwachstum, - = kein Tumorwachstum), sowie die fehlgeschlagenen Injektionen des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in ein Blutgefäß der Chorioallantoismembran (CAM) (F = Injektion fehlgeschlagen; n = 14). Bei 2 Hühnerembryonen konnten infolge technischer Probleme keine Daten generiert werden (T = Technische Probleme; n = 2). Ferner sind die Hühnerembryonen mit Auftreten eines Paravasats nach der Injektion des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 gekennzeichnet (P = Protokolliert, n = 5; X = Ausgeschlossen, n = 4); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Hühnerembryo (Nr.)	**Tumorwachstum**			**Injektion fehlgeschlagen (F)**	**Technische Probleme (T)**	**Paravasat**
	LNCaP C4-2	**PC-3**	**LNCaP**			**Protokolliert (P) Ausgeschlossen (X)**
1	+	+				
2	+	+				
3	+	+				
4	+	-				
5	+	-				
6	+	+				X
7	+	+				X
8	-	-				
9	+	+		F		
10	+	+				
11	+	+				
12	+	+				
13	+	-				
14	-	-				
15	+	+				
16	+	-				
17	+	+				
18	+	-				
19	+	+		F		
20	+	-		F		
21	+	+				
22	+	+				
23	+	+				P
24	+	+				P
25	+	+		F		
26	+	+				
27	+	+				
28	+	+				
29	+	+				

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 8

30	-	+				
31	+	+				
32	+	+		F		
33	+	+			T	
34	+	+				X
35	+	+		F		
36	+	+				
37	-	-				
38	+	+				
39	+	+		F		
40	+	+				
41	+	+				
42	+	+				
43	+	+				
44	+	+				
45	+	+				P
46	+	+				X
47	+	+				
48	+	+		F		
49	+	+		F		
50	+	+				
51	+	+				
52	+	+				
53	+	+		F		
54	+	+				P
55	+	+			T	
56		+	+			P
57		+	+	F		
58		+	+			
59		+	+	F		
60		+	+			
61	+	+		F		
62	+	+				
63	+	+				
64	+	+		F		
65	+	+				
66	+	+				

Anhang 2: Aktivitätsverhältnisse basierend auf den PET-Daten ($PSMA^+/PSMA^-$)

Tabelle 9: Übersicht der Aktivitätsverhältnisse der aufgenommenen Aktivität ([^{68}Ga]Ga-PSMA-11) der *in ovo* Tumoren (Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)+/PSMA-) basierend auf den Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Daten (PSMA-positiv = LNCaP C4-2 und LNCaP; PSMA-negativ = PC-3) für LNCaP C4-2 + PC-3 (n = 34), LNCaP + PC-3 (n = 3), LNCaP C4-2 + Chorioallantoismembran (CAM) (n = 5). Angegeben sind ferner die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane der Verhältnisse der Aktivitätsanreicherung ($PSMA^+/PSMA^-$) der 3 Subrgruppen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Hühnerembryo (Nr.)	Verhältnis der Aktivitätsanreicherung (PSMA+/PSMA-)		
	LNCaP C4-2 + PC-3	LNCaP + PC-3	LNCaP C4-2 + CAM
1	2,4		
2	1,9		
3	1,8		
4			2,0
5			3,7
10	3,2		
11	1,5		
12	0,6		
13			2,5
15	1,0		
16			0,9
17	0,9		
18			2,4
21	1,3		
22	1,3		
23	0,3		
24	1,2		
26	2,3		
27	1,8		
28	2,1		
29	1,9		
31	2,0		
36	2,9		
38	2,3		
40	0,9		
41	0,4		
42	0,9		
43	1,6		
44	0,7		
45	0,3		
47	0,5		
50	7,9		
51	2,0		

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 9

52	1,1		
54	0,6		
56		0,4	
58		1,3	
60		2,5	
62	1,0		
63	1,2		
65	1,0		
66	1,1		
n	34	3	5
Mittelwert	1,58	1,40	2,30
SD	1,34	1,05	1,01
Median	1,25	1,30	2,40

Anhang 3: Ausgewählte MRT, PET/MRT-Überlagerungen und die zugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven exemplarisch anhand von 16 HET-CAM-Experimenten

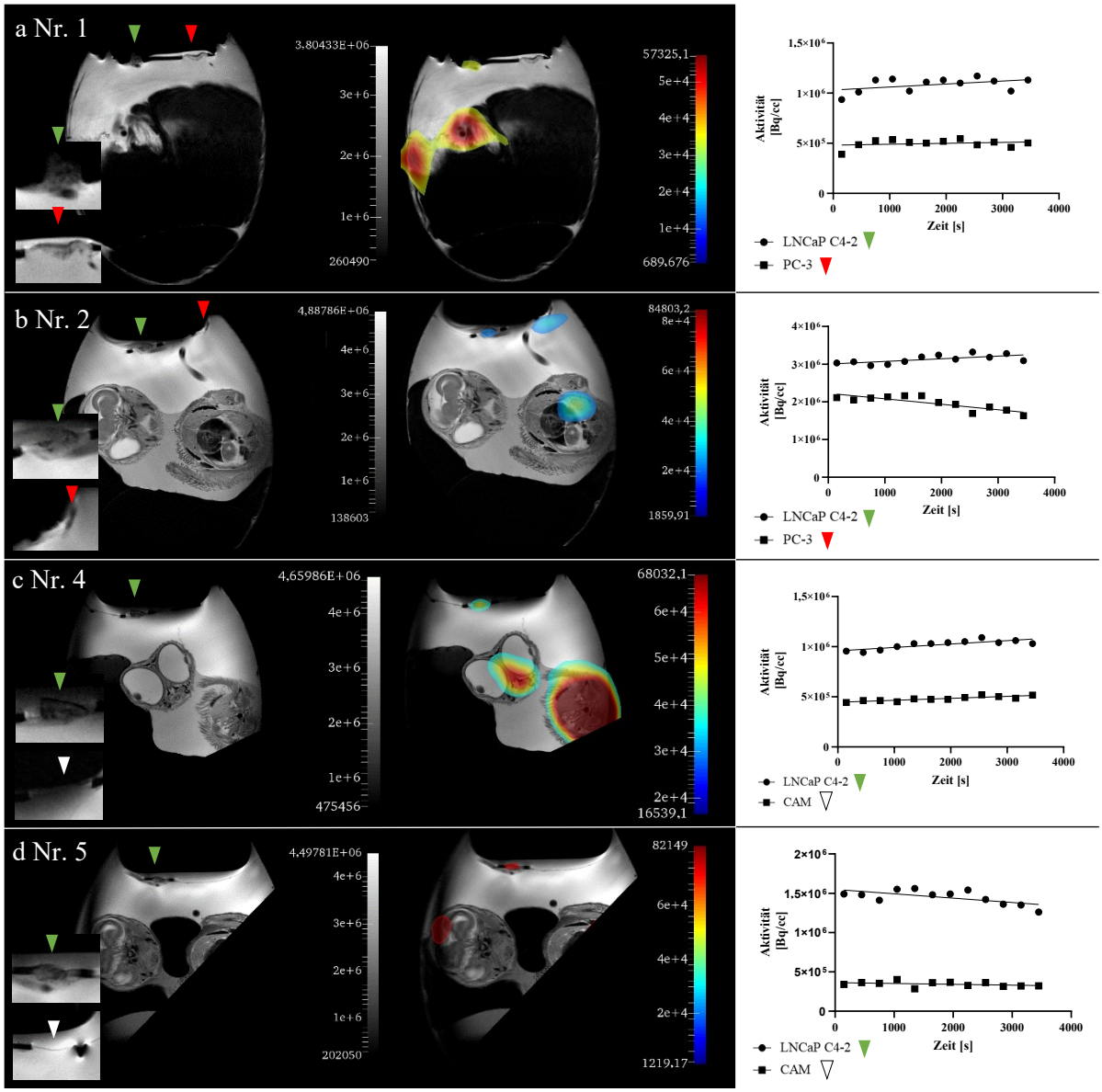


Abbildung 14: Dargestellt sind T2-gewichtete (Turbo Spin Echo (TSE)) Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen (links) nach dem Protokoll von Zuo et al. 2017 [191] und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/MRT-Überlagerungen (Mitte) von 4 Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Experimenten mit den dazugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven der ausgewählten PET-Regionen. Die Nummerierungen der Hühnerembryonen beziehen sich auf Anhang 1. Deutlich erkennbar in den MRT-Aufnahmen ist der PSMA-positive Tumor LNCaP C4-2 (a, Nr.1; b, Nr. 2; c, Nr. 4 und d, Nr. 5) (grüner Pfeil). Der PSMA-negative Tumor PC-3 ist sichtbar in Beispiel a und b (roter Pfeil), in Beispiel c und d jedoch nicht gewachsen (CAM = weißer Pfeil). Dabei zeigt sich in den PSMA-positiven Tumoren eine höhere Aktivitätsanreicherung als in den PSMA-negativen Tumoren); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

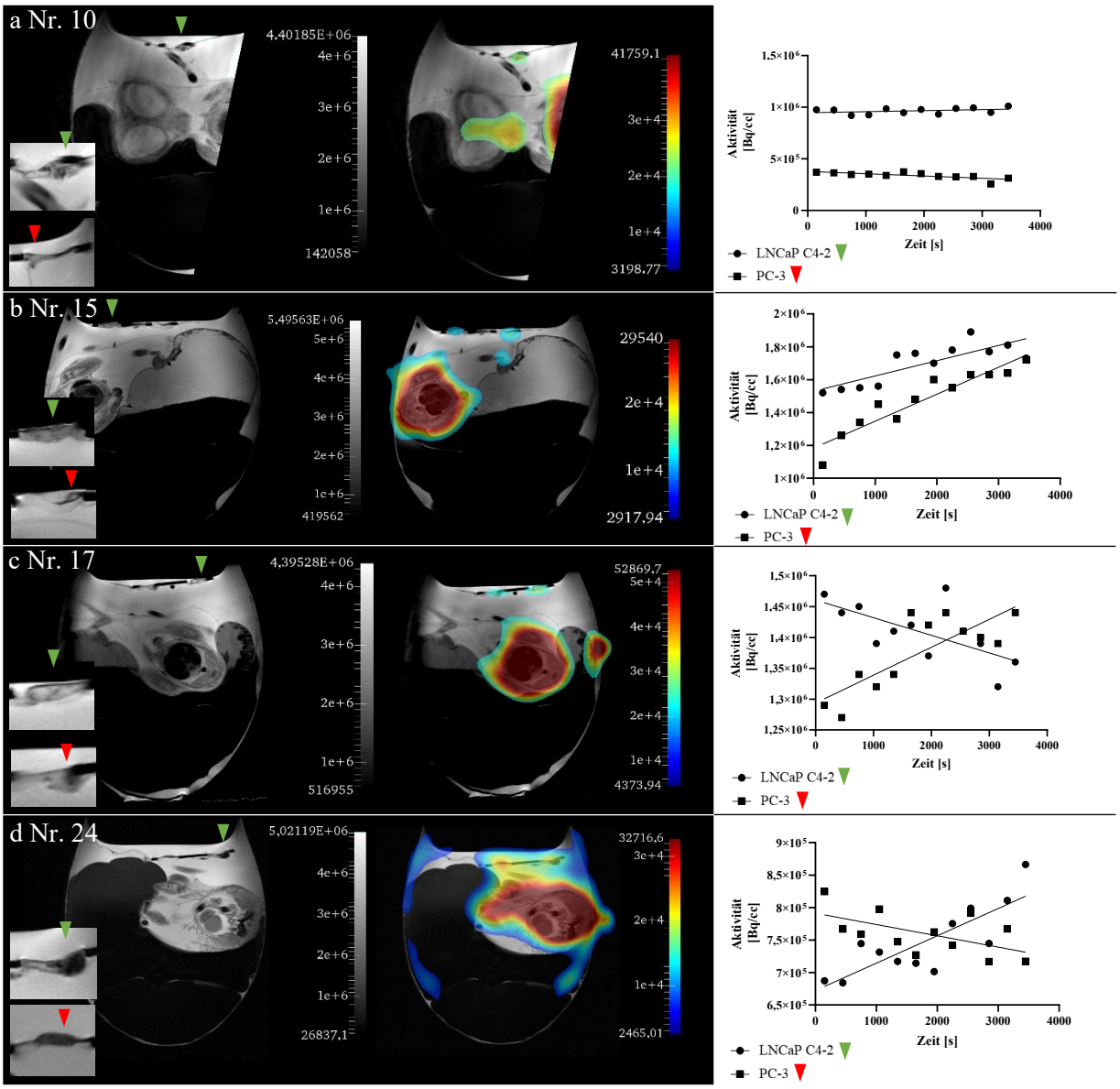


Abbildung 15: Dargestellt sind T2-gewichtete (Turbo Spin Echo (TSE)) Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen (links) nach dem Protokoll von Zuo et al. 2017 [191] und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/MRT-Überlagerungen (Mitte) von 4 Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Experimenten mit den dazugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven der ausgewählten PET-Regionen. Die Nummerierungen der Hühnerembryonen beziehen sich auf Anhang 1. Deutlich erkennbar in den MRT-Aufnahmen sind die PSMA-positiven Tumoren LNCaP C4-2 (grüner Pfeil) und die PSMA-negativen Tumoren PC-3 (roter Pfeil) (a, Nr. 10; b, Nr. 15; c, Nr. 17 und d, Nr. 24); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

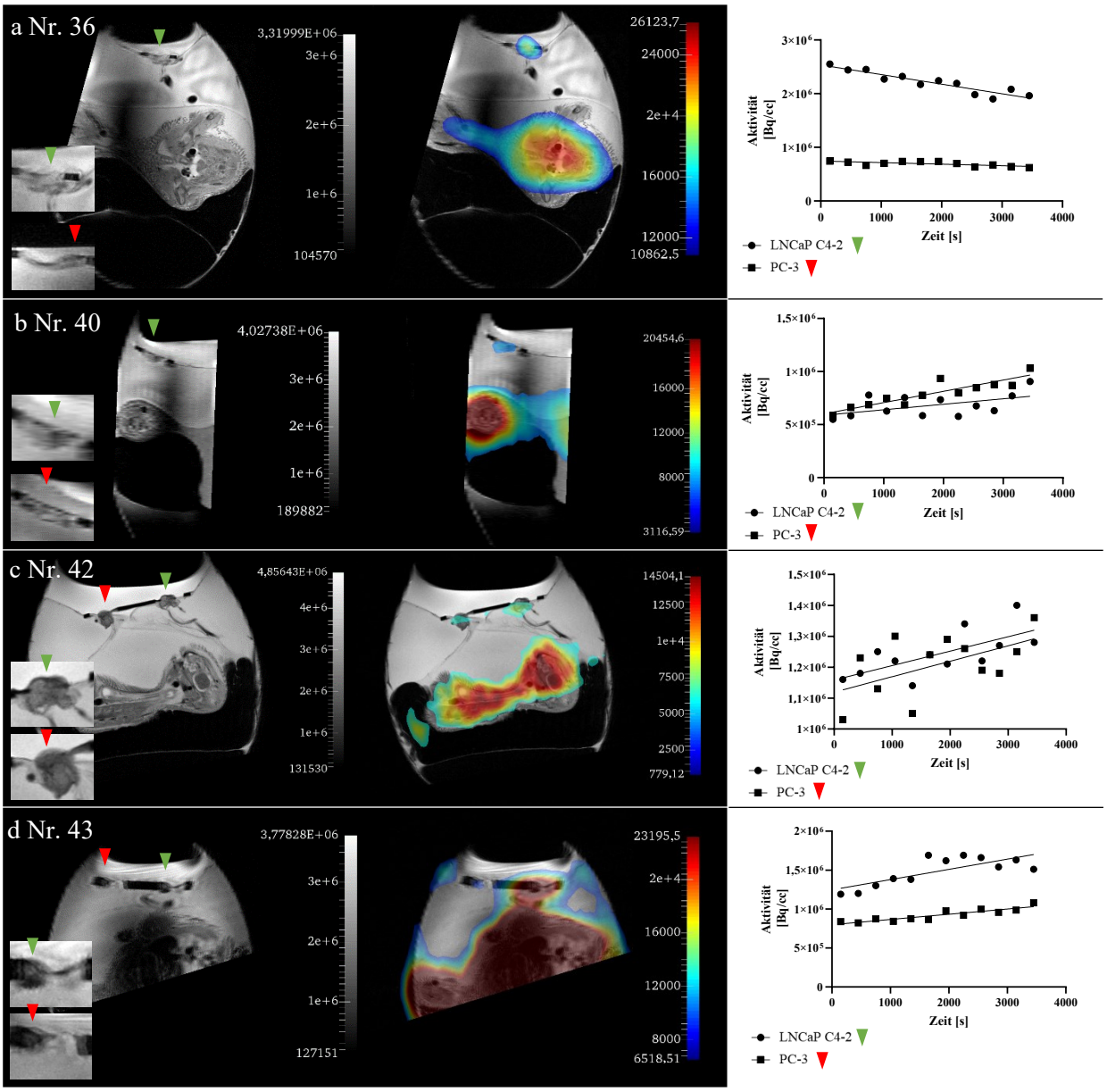


Abbildung 16: Dargestellt sind T2-gewichtete (Turbo Spin Echo (TSE)) Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen (links) nach dem Protokoll von Zuo et al. 2017 [191] und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/MRT-Überlagerungen (Mitte) von 4 Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Experimenten mit den dazugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven der ausgewählten PET-Regionen. Die Nummerierungen der Hühnerembryonen beziehen sich auf Anhang 1. Deutlich erkennbar in den MRT-Aufnahmen sind die PSMA-positiven Tumoren LNCaP C4-2 (grüner Pfeil) und die PSMA-negativen Tumoren PC-3 (roter Pfeil) (a, Nr. 36; b, Nr. 40; c, Nr. 42 und d, Nr. 43); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

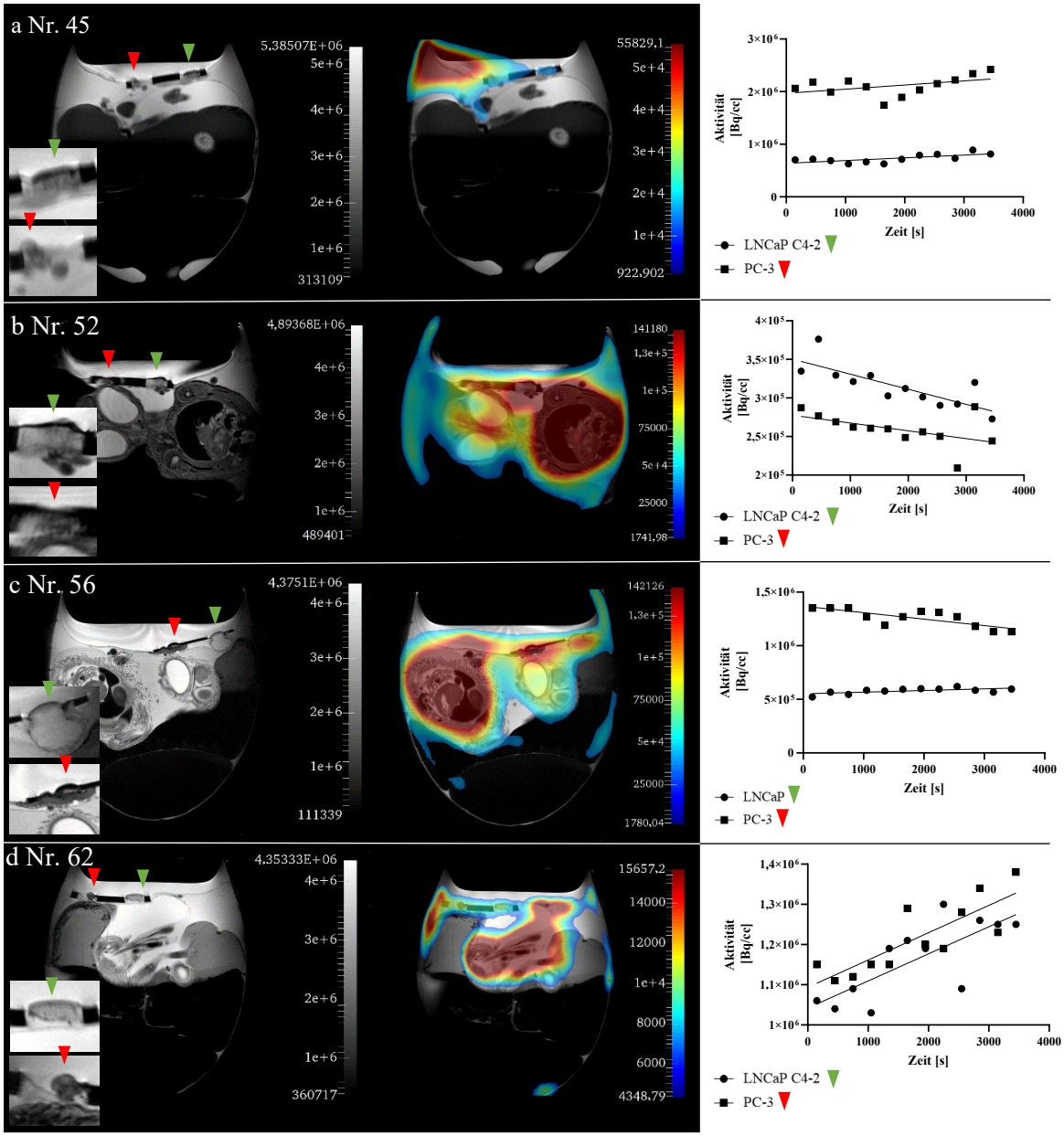
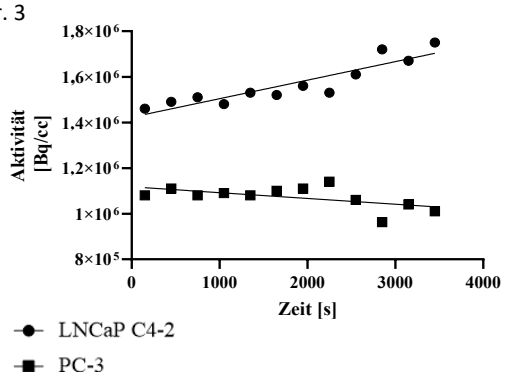


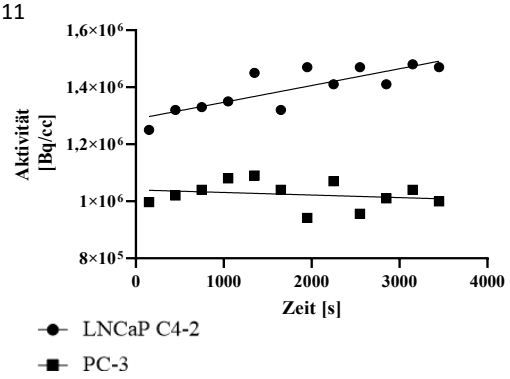
Abbildung 17: Dargestellt sind T2-gewichtete (Turbo Spin Echo (TSE)) Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen (links) nach dem Protokoll von Zuo et al. 2017 [191] und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/MRT-Überlagerungen (Mitte) von 4 Hen´s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) -Experimenten mit den dazugehörigen Zeit-Aktivitäts-Kurven der ausgewählten PET-Regionen. Die Nummerierungen der Hühnerembryonen beziehen sich auf Anhang 1. Deutlich erkennbar in den MRT-Aufnahmen sind die PSMA-positiven Tumoren LNCaP C4-2 (a,b,d) und LNCaP (c) (grüner Pfeil). Der PSMA-negative Tumor PC-3 ist sichtbar in Beispiel a,b,c und d (roter Pfeil) (a, Nr. 45; b, Nr. 52; c, Nr. 56 und d, Nr. 62); (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Anhang 4: Zeit-Aktivitäts-Kurven

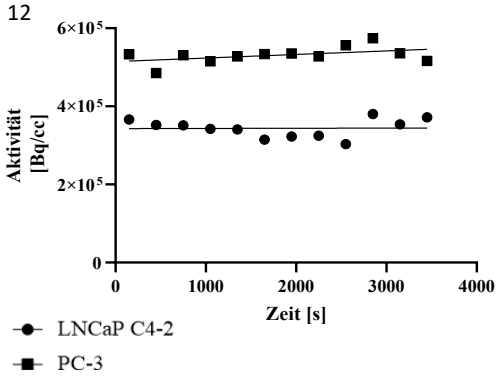
a Nr. 3



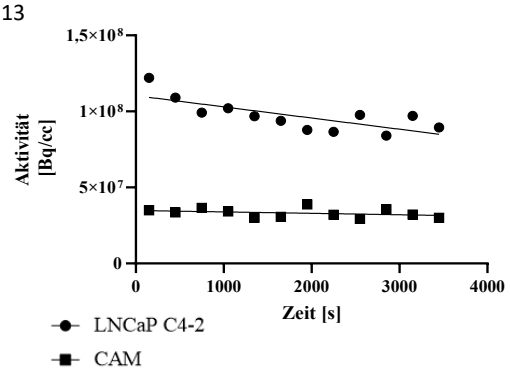
b Nr. 11



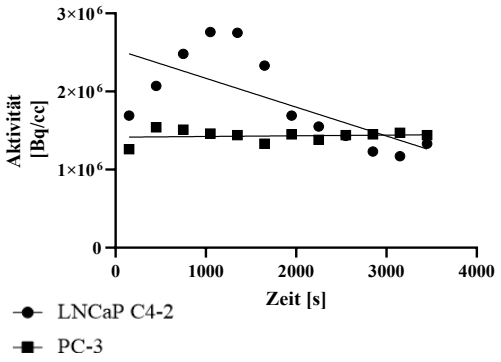
c Nr. 12



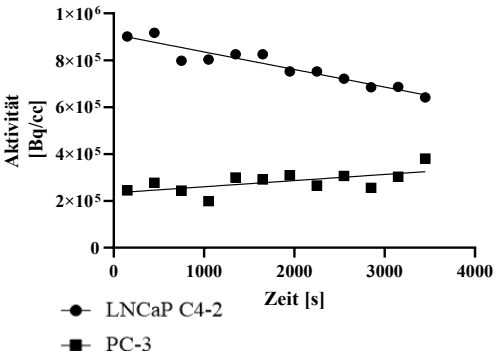
d Nr. 13



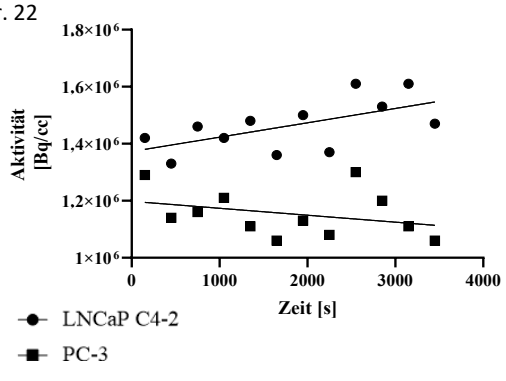
e Nr. 16



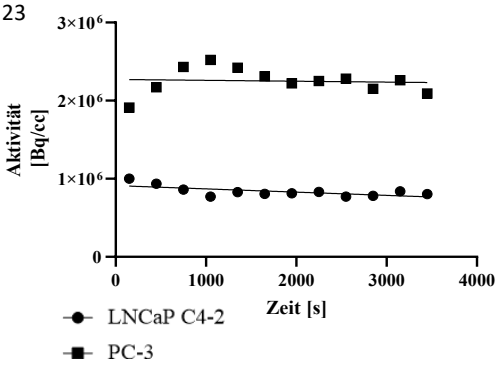
f Nr. 21



g Nr. 22



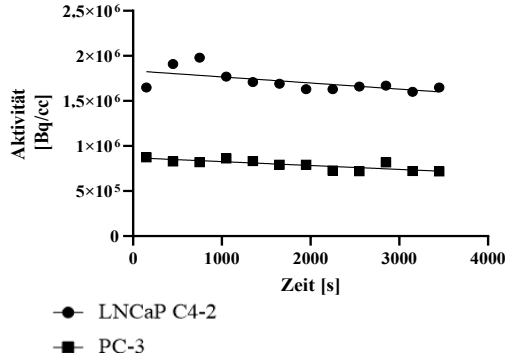
h Nr. 23



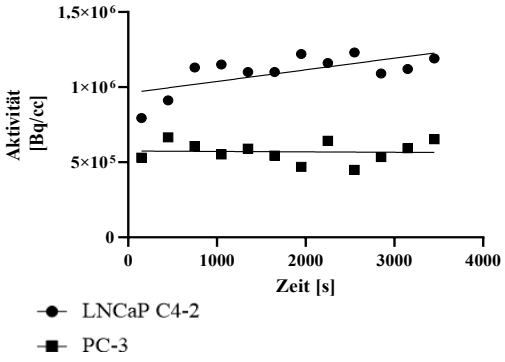
Fortsetzung

Fortsetzung Abbildung 18

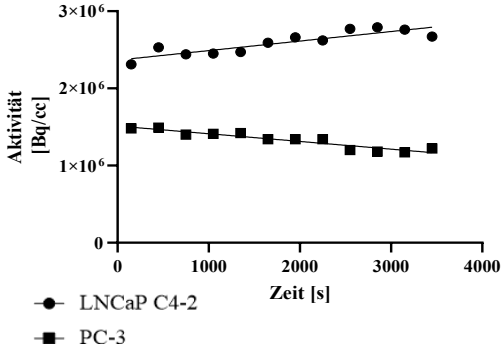
i Nr. 26



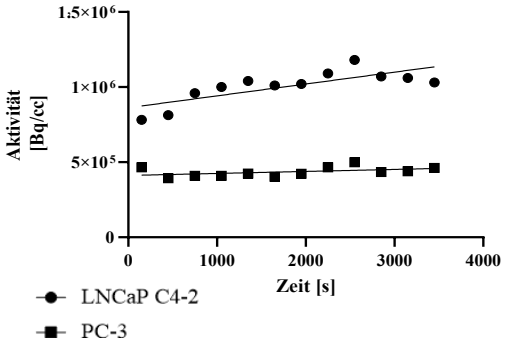
j Nr. 27



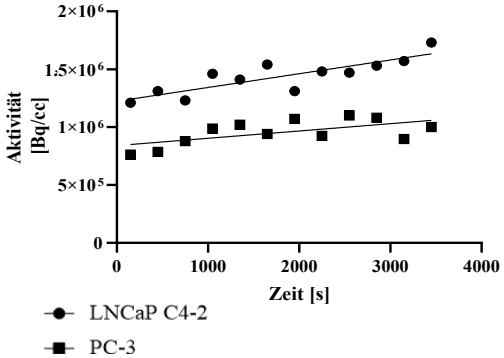
k Nr. 28



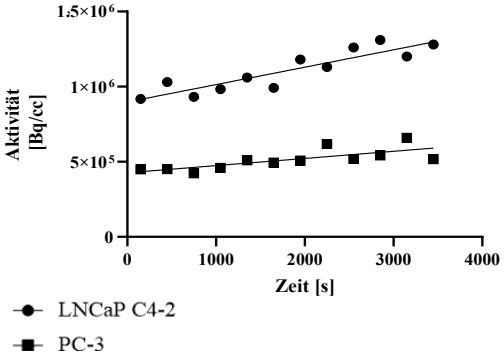
l Nr. 29



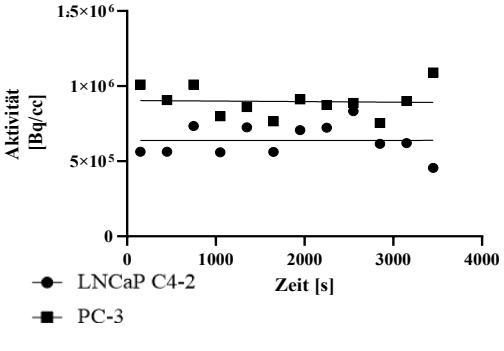
m Nr. 31



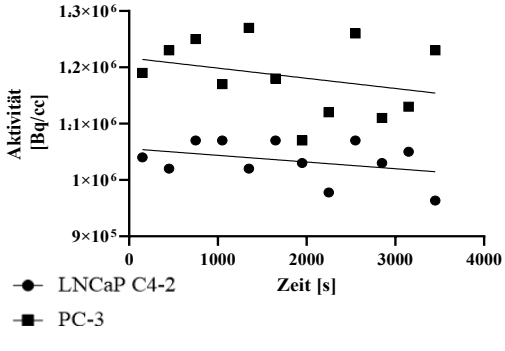
n Nr. 38



o Nr. 41



p Nr. 44



Fortsetzung

Fortsetzung Abbildung 18

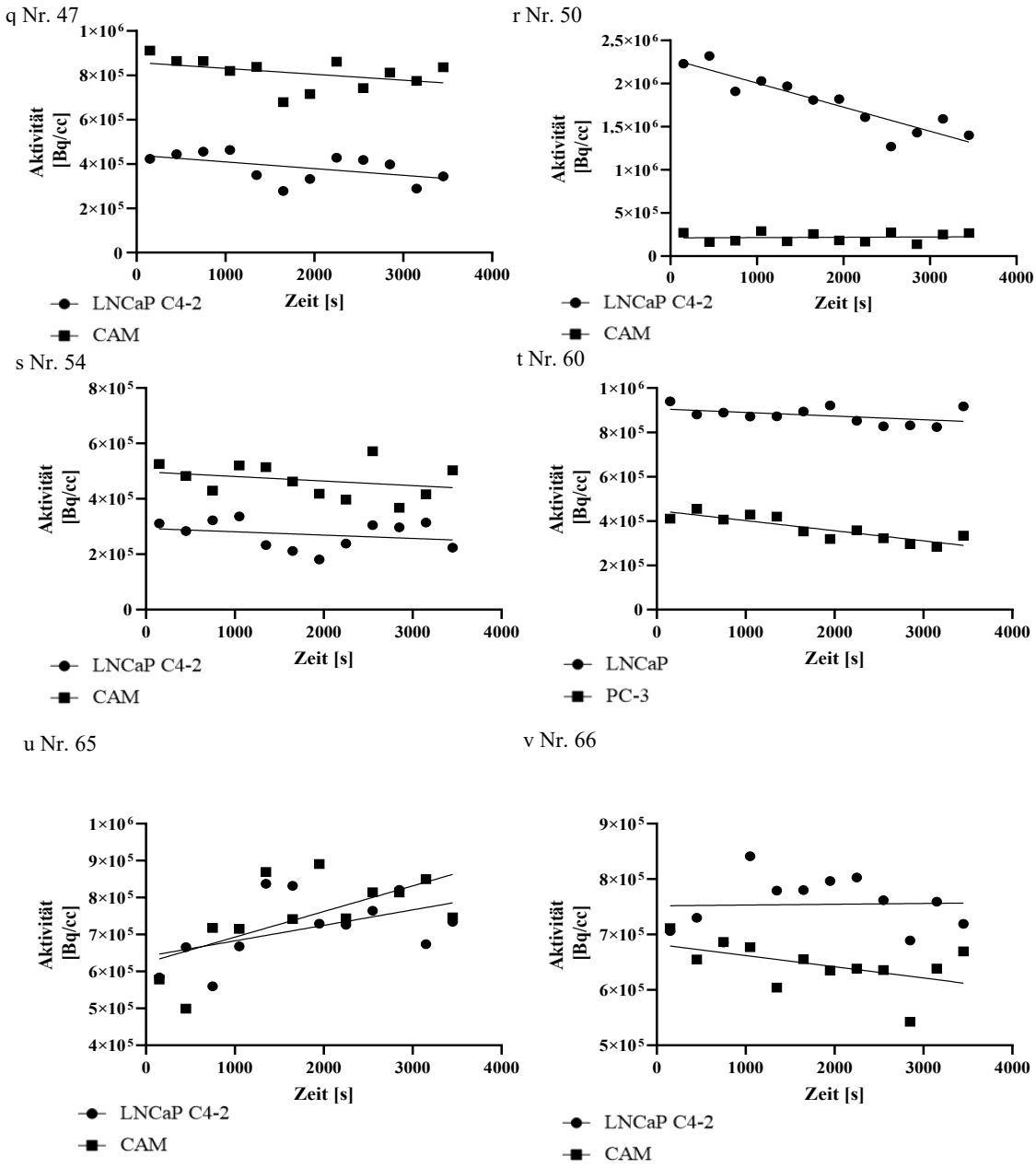


Abbildung 18: Zeit-Aktivitäts-Kurven der Tumorregionen und des Hintergrunds (Chorioallantoismembran (CAM)) aller Eier, die für eine Magnetresonanztomographie (MRT)- und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Auswertung verwendbar waren (abzüglich der 4 Beispiele in 3.2 und der 16 Beispiele aus Anhang 3): LNCaP C4-2 + PC-3 (a bis v exklusive d und t), LNCaP + PC-3 (t) und LNCaP C4-2 + CAM (d). Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Die Nummerierungen der Hühnerembryonen beziehen sich auf Anhang 1. Für die Auswertungen wurden die Tumoren und die CAM dem Hühnerei entnommen; (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Anhang 5: Gamma Counter-Rohdaten [Counts Per Minute (CPM)]

Tabelle 10: Gamma Counter-Rohdaten [Counts Per Minute (CPM)] der Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)-positiven Tumoren (LNCaP C4-2 und LNCaP) und den PSMA-negativen Tumoren (PC-3), sowie der Hintergrundsignale in der Chorioallantoismembran (CAM). Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Die Zuordnung der Tumoren zu den Hühnereiern (n = 66) findet sich in Anhang 1. Für die Messungen mittels Gamma Counter wurden die Tumoren und ein Teil der CAM dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Hühnerembryo (Nr.)	Gamma Counter-Rohdaten [CPM]		
	PSMA$^+$ (LNCaP C4-2 & LNCaP)	PSMA$^-$ (PC-3)	Hintergrundsignal (CAM) (Mittelwert)
1	19983,6	8155,4	40,0
2	15653,8	2318,1	32,0
3	109736,8	50694,6	85,0
4	56910,3	11630,6	35,0
5	51309,2	13988,6	30,0
6	16516,8	13354,4	22,7
7	10908,3	5160,7	26,0
8	32069,8	31222,9	25,7
9	1507,4	543,4	23,0
10	14661,3	8156,5	21,2
11	18547,1	11565,3	20,5
12	9654,8	4752,5	28,0
13	16550,2	4018,6	27,0
14	1526,7	5363,3	24,0
15	15157,8	15854,8	29,0
16	6672,8	5674,2	20,0
17	28799,6	24018	29,1
18	15960,6	182	39,3
19	1224,6	308	28,3
20	135	118	23,7
21	12991,7	1859,2	30,7
22	30678,2	10075,2	36,6
23	28284,3	7633	29,0
24	29730,6	9248,9	28,3
25	8750,4	5588,6	27,3
26	16359	3403	28,7
27	13942,1	4041,2	25,5
28	18633,3	12828,3	29,0
29	42113,5	2193,6	28,5
30	23011,6	571	20,8
31	5795,5	3724,1	24,0
32	221	211,4	25,8
33	16401	1146,4	23,9
34	2947,2	1483	24,8
35	12513,1	4630,9	22,0

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 10

36	13767,7	2633,2	23,6
37	986,4	1990,4	26,0
38	15174,8	13765,3	25,3
39	18469,7	8422,5	26,0
40	7336	5174,5	21,3
41	2847,5	1851,7	23,0
42	5306,4	4382,9	26,8
43	46066,4	30551,9	28,3
44	23202,5	7387,5	26,3
45	45659,7	30685,3	27,7
46	10293	3143,6	22,0
47	5216,7	821,4	24,7
48	1885,2	5351,1	26,0
49	3431,5	3293,6	24,8
50	5668,7	820,9	22,0
51	8938,4	696,4	20,8
52	173394	16234,8	24,5
53	6304	3947,5	25,3
54	17837,3	3824	22,3
55	2817,2	750,9	19,6
56	48464,4	11470,4	23,5
57	2335,7	1321,9	22,5
58	27994,9	5633,2	22,5
59	30413,6	22952	24,0
60	27239,8	4743,1	26,0
62	15706,7	5547,9	25,5
63	60224,9	47028,4	26,2
64	15326,9	312	26,1
65	4549,8	1385,8	24,3
66	2733,2	442	23,7

Anhang 6: Gamma Counter-Daten [%IA]

Tabelle 11: Gamma Counter-Daten [Tumorakkumulation (%IA)] der Tumoren LNCaP C4-2, LNCaP und PC-3, sowie der Hintergrundsignale in der Chorioallantoismembran (CAM) der 3 Subgruppen (LNCaP C4-2 + PC-3, LNCaP + PC-3 und LNCaP C4-2 + CAM) der einzelnen Experimente (n = 66) zur Evaluation der Akkumulation des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane der Tumorakkumulation [%IA]: (LNCaP C4-2 (n = 34) + PC-3 (n = 34)), ((LNCaP (n = 3) + PC-3 (n = 3)) und (LNCaP C4-2 (n = 5) + CAM (n = 5)). Für die Messungen mittels Gamma Counter wurden die Tumoren und ein Teil der CAM dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

	Gamma Counter-Daten [%IA]					
	(LNCaP C4-2 + PC-3)		**(LNCaP + PC-3)**		**(LNCaP C4-2 + CAM)**	
Hühnerembryo (Nr.)	**LNCaP C4-2**	**PC-3**	**LNCaP**	**PC-3**	**LNCaP C4-2**	**CAM**
1	0,13	0,05				
2	0,49	0,07				
3	0,28	0,13				
4					0,34	0,07
5					0,24	0,07
10	0,26	0,14				
11	0,11	0,07				
12	0,12	0,06				
13					0,73	0,18
15	0,35	0,37				
16					0,09	0,08
17	0,43	0,37				
18					0,29	0,003
21	0,17	0,02				
22	0,25	0,08				
23	0,11	0,03				
24	0,32	0,10				
26	0,11	0,02				
27	0,21	0,06				
28	0,07	0,05				
29	0,56	0,03				
31	0,28	0,18				
36	0,44	0,08				
38	0,19	0,17				
40	0,14	0,10				
41	0,18	0,12				
42	0,33	0,27				
43	0,73	0,49				
44	0,62	0,20				
45	0,22	0,15				
47	0,14	0,02				
50	0,42	0,06				
51	0,48	0,04				
52	0,42	0,04				

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 11

54	0,28	0,06				
56			0,20	0,05		
58			0,24	0,05		
60			0,17	0,03		
62	0,30	0,11				
63	0,21	0,17				
65	0,17	0,05				
66	0,05	0,01				
n	34	34	3	3	5	5
Mittelwert	0,28	0,12	0,20	0,04	0,34	0,08
SD	0,17	0,11	0,03	0,01	0,24	0,06
Median	0,26	0,08	0,20	0,05	0,29	0,07

Anhang 7: Verhältnisse der Aktivität (PSMA+/PSMA$^-$) basierend auf der Tumorakkumulation [%IA]

Tabelle 12: Verhältnisse der Aktivität (Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)+/PSMA$^-$) der 3 Subgruppen (LNCaP C4-2 + PC-3 (n = 34)), (LNCaP + PC-3 (n = 3)) und (LNCaP C4-2 + Chorioallantoismembran (CAM) (n = 5)) basierend auf der Tumorakkumulation [%IA] des Radioliganden [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 der einzelnen Experimente (n = 66). Die Gamma Counter-Daten zur Berechnung der Verhältnisse der Aktivität (PSMA+/PSMA$^-$) basierend auf der Tumorakkumulation [%IA] finden sich in Anhang 6. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane der Verhältnisse der Aktivität (PSMA+/PSMA$^-$) basierend auf [%IA] der 3 Subgruppen. Die Tumoren und ein Teil der CAM wurden dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Hühnerembryo (Nr.)	Verhältnis der Aktivität [basierend auf %IA] (PSMA$^+$/PSMA$^-$)		
	LNCaP C4-2 + PC-3	LNCaP + PC-3	LNCaP C4-2 + CAM
1	2,6		
2	7,0		
3	2,2		
4			4,9
5			3,4
10	1,9		
11	1,6		
12	2,0		
13			4,1
15	0,9		
16			1,1
17	1,2		
18			115,2
21	8,5		
22	3,1		
23	3,7		
24	3,2		
26	5,5		
27	3,5		
28	1,4		
29	18,7		
31	1,5		
36	5,2		
38	1,1		
40	1,4		
41	1,5		
42	1,2		
43	1,5		
44	3,1		
45	1,5		
47	6,4		
50	7,0		

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 12

51	13,0		
52	10,6		
54	4,6		
56		4,2	
58		4,9	
60		5,7	
62	2,8		
63	1,3		
65	3,3		
66	6,3		
n	34	3	5
Mittelwert	4,12	4,93	25,73
SD	3,88	0,75	50,03
Median	2,96	4,92	4,06

Anhang 8: Aktivitätsverhältnisse ($PSMA^+/PSMA^-$)

Tabelle 13: Aktivitätsverhältnisse (Prostata-spezifisches Membranantigen $(PSMA)^+/PSMA^-$) der 3 Subgruppen (LNCaP C4-2 + PC-3 (n = 34)), (LNCaP + PC-3 (n = 3)) und (LNCaP C4-2 + Chorioallantoismembran (CAM) (n = 5)) der einzelnen Experimente (n = 66). Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane der Aktivitätsverhältnisse ($PSMA^+/PSMA^-$) der 3 Subgruppen. Die Tumoren und ein Teil der CAM wurden dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

	Anteil Verhältnis Aktivität ($PSMA^+/PSMA^-$)		
Hühnerembryo (Nr.)	**LNCaP C4-2 + PC-3**	**LNCaP + PC-3**	**LNCaP C4-2 + CAM**
1	2,45		
2	4,91		
3	2,16		
4			3,86
5			3,67
10	1,80		
11	1,61		
12	2,04		
13			4,14
15	0,95		
16			1,17
17	1,20		
18			111,63
21	5,66		
22	2,58		
23	3,69		
24	3,22		
26	4,85		
27	3,03		
28	1,45		
29	19,36		
31	1,24		
36	5,25		
38	1,10		
40	1,43		
41	1,55		
42	1,21		
43	1,51		
44	3,13		
45	1,49		
47	6,52		
50	9,41		
51	13,18		
52	10,70		
54	4,70		
56		4,21	
58		5,00	

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 13

60		5,79	
62	1,87		
63	1,27		
65	3,33		
66	6,50		
n	34	3	5
Mittelwert	4,01	5,00	24,89
SD	3,98	0,79	48,50
Median	2,52	5,00	3,86

Anhang 9: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g] für LNCaP C4-2 + PC-3 und Gesamtaktivität im Hühnerembryo

Tabelle 14: Gesamtaktivität im Hühnerembryo [MBq], sowie die Aktivitätskonzentrationen [%IA/g; kBq/mm^3] der Tumoren LNCaP C4-2 (n = 34) und PC-3 (n = 34) der Subgruppe LNCaP C4-2 + PC-3 der einzelnen Experimente (n = 66). Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane. Die Tumoren wurden dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

	LNCaP C4-2 + PC-3				
Hühnerembryo (Nr.)	**Gesamtaktivität im Hühnerembryo [MBq]**	**LNCaP C4-2 [kBq/mm^3]**	**LNCaP C4-2 [%IA/g]**	**PC-3 [kBq/mm^3]**	**PC-3 [%IA/g]**
1	2,27	0,10	4,30	0,04	1,78
2	0,51	0,06	12,04	0,01	2,45
3	5,92	0,56	9,39	0,26	4,40
4	4,42				
5	2,74				
10	1,99	0,17	8,70	0,10	4,89
11	2,51	0,09	3,74	0,06	2,35
12	2,10	0,08	3,94	0,04	1,96
13	0,40				
15	0,60	0,07	11,74	0,07	12,49
16	1,13				
17	1,44	0,21	14,72	0,18	12,47
18	0,78				
21	1,06	0,04	3,43	0,01	0,60
22	1,00	0,12	12,38	0,05	4,85
23	3,67	0,14	3,86	0,04	1,06
24	2,31	0,25	10,85	0,08	3,41
26	1,87	0,07	3,79	0,01	0,80
27	1,01	0,07	7,01	0,02	2,34
28	3,41	0,08	2,29	0,05	1,60
29	1,64	0,31	18,97	0,02	1,00
31	0,37	0,03	7,50	0,02	6,14
36	0,49	0,07	14,90	0,01	2,87
38	1,02	0,07	6,38	0,06	5,89
40	0,82	0,04	4,77	0,03	3,38
41	0,28	0,02	6,08	0,01	3,97
42	0,30	0,03	11,13	0,03	9,34
43	1,10	0,27	24,76	0,18	16,62
44	1,18	0,25	20,97	0,08	6,78
45	1,46	0,11	7,49	0,07	5,10
47	0,72	0,03	4,66	0,01	0,73
50	0,29	0,04	14,25	0,00	1,53
51	0,79	0,13	16,19	0,01	1,24
52	5,75	0,82	14,29	0,08	1,34

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 14

54	0,85	0,08	9,48	0,02	2,04
56	4,46				
58	1,59				
60	2,21				
62	0,83	0,06	6,67	0,03	3,61
63	3,61	0,26	7,11	0,20	5,65
65	0,33	0,02	5,68	0,01	1,73
66	0,98	0,02	1,67	0,00	0,26
n	42,00	34	34	34	34
Mittelwert	1,72	0,14	9,27	0,06	4,02
SD	1,45	0,16	5,61	0,06	3,78
Median	1,12	0,08	7,50	0,03	2,66

Anhang 10: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g] für LNCaP + PC-3

Tabelle 15: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g; kBq/mm^3] der Tumoren LNCaP (n = 3) und PC-3 (n = 3) der Subgruppe LNCaP + PC-3. Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane. Die Tumoren wurden dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

	LNCaP + PC-3			
Hühnerembryo (Nr.)	**LNCaP [kBq/mm3]**	**LNCaP [%IA/g]**	**PC-3 [kBq/mm3]**	**PC-3 [%IA/g]**
56	0,32	7,10	0,08	1,71
58	0,13	8,18	0,03	1,65
60	0,12	5,58	0,02	0,98
n	3	3	3	3
Mittelwert	0,19	6,95	0,04	1,45
SD	0,11	1,31	0,03	0,41
Median	0,13	7,10	0,03	1,65

Anhang 11: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g] für LNCaP C4-2 + Hintergrundsignal in der Chorioallantoismembran (CAM)

Tabelle 16: Aktivitätskonzentrationen [%IA/g; kBq/mm^3] der Tumoren LNCaP 4-2 (n = 5) und dem Hintergrundsignal in der Chorioallantoismembran (CAM) (n = 5) der Subgruppe LNCaP C4-2 + CAM. Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane. Die Tumoren und die CAM wurden dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

	LNCaP C4-2 + Hintergrund (CAM)			
Hühnerembryo (Nr.)	**LNCaP C4-2 [kBq/mm3]**	**LNCaP C4-2 [%IA/g]**	**CAM [kBq/mm3]**	**CAM [%IA/g]**
4	0,40	9,03	0,10	2,36
5	0,22	8,06	0,06	2,22
13	0,10	24,94	0,02	6,07
16	0,04	3,16	0,03	2,76
18	0,08	9,68	0,00	0,09
n	5	5	5	5
Mittelwert	0,17	10,98	0,04	2,70
SD	0,15	8,22	0,04	2,15
Median	0,10	9,03	0,03	2,36

Anhang 12: Aktivitätskonzentrationen (Tumor/Gesamt)

Tabelle 17: Aktivitätskonzentrationen (Tumor/Gesamt) der Tumoren LNCaP C4-2, LNCaP und PC-3, sowie der Hintergrundsignale in der Chorioallantoismembran (CAM) der 3 Subgruppen (LNCaP C4-2 + PC-3 (n = 34)), (LNCaP + PC-3 (n = 3)) und (LNCaP C4-2 + CAM (n = 5)) der einzelnen Experimente (n = 66). Als Radioligand wurde [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 verwendet. Angegeben sind auch die Mittelwerte, die Standardabweichungen (SD) und die Mediane. Die Tumoren und die CAM wurden dem Hühnerei entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Hühnerembryo (Nr.)	Anteil Verhältnis Aktivität (Tumor/Gesamt)					
	(LNCaP C4-2 + PC-3)		(LNCaP + PC-3)		(LNCaP C4-2 + CAM)	
	LNCaP C4-2/ Gesamt	PC-3/ Gesamt	LNCaP/ Gesamt	PC-3/ Gesamt	LNCaP C4-2/ Gesamt	CAM/ Gesamt
1	2,46	1,02				
2	6,93	1,41				
3	5,38	2,52				
4					6,28	1,64
5					4,88	1,35
10	4,80	2,70				
11	1,89	1,19				
12	2,03	1,01				
13					13,20	3,21
15	6,86	7,30				
16					1,76	1,53
17	8,07	6,83				
18					5,80	0,05
21	2,07	0,36				
22	7,14	2,80				
23	2,40	0,66				
24	6,33	1,99				
26	2,26	0,47				
27	4,06	1,36				
28	1,53	1,07				
29	10,48	0,55				
31	4,40	3,60				
34	0,00	0,00				
36	8,34	1,61				
38	3,58	3,31				
40	2,57	1,83				
41	3,42	2,24				
42	5,88	4,93				
43	13,90	9,33				
44	12,74	4,12				
45	5,02	3,42				
47	2,79	0,44				
50	8,90	0,96				
51	9,84	0,76				

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 17

52	8,12	0,76				
54	5,19	1,12				
56			4,57	1,10		
58			4,56	0,92		
60			3,00	0,53		
62	4,31	2,33				
63	4,69	3,73				
65	3,28	1,00				
66	1,06	0,17				
n	34	34	3	3	5	5
Mittelwert	4,68	2,02	4,05	0,85	6,38	1,56
SD	3,51	2,14	0,90	0,29	4,20	1,12
Median	4,31	1,19	4,56	0,92	5,80	1,53

Anhang 13: Vergleich der Ergebnisse dieser HET-CAM-Studie mit Daten aus Experimenten mit Mäusen

Tabelle 18: Übersicht der tierexperimentellen Daten verschiedener Publikationen, in denen der Radiotracer [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 (Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-HBED-CC) oder ähnliche Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)-spezifische Radioliganden zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen dieser Arbeit verwendet wurden (Mittelwert ± Standardabweichung). Die Verhältnisse der Aktivitätskonzentrationen wurden basierend auf den publizierten Daten berechnet († Verhältnis des Mittelwerts; * kalkulierte Werte aus den Diagrammen) entnommen (modifiziert nach Winter, Koch et al. 2020 [178], https://doi.org/10.3390/cancers12051248, Licensee MDPI, Basel, Switzerland (open access), CC BY 4.0, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/); (Universitätsklinikum Ulm, 2017-2020).

Ligand	**Tumor-akkumulation [%IA/g]**			**Verhältnis der Aktivitäts-konzentrationen (PSMA+/PSMA-)**	**Zeit Inku-bation [h]**	**Quelle**
	LNCaP	**LNCaP C4-2**	**PC-3**			
^{68}Ga-PSMA-11	-	9,27 ± 5,61	4,02 ± 3,78	2,3; (4,0)†	1	[178]
^{68}Ga-PSMA-11	6,95 ± 1,31	-	1,45 ± 0,41	4,8; (4,9)†	1	[178]
^{68}Ga-PSMA-11	7,70 ± 1,45	-	1,30 ± 0,12	5,9	1	[47]
^{68}Ga-PSMA-11	4,89 ± 1,34	-	1,30 ± 0,12	3,8	1	[150]
^{68}Ga-PSMA-11	7,28 ± 0,82	-	1,21 ± 0,07	6,0	1	[173]
^{68}Ga-PSMA-11	5,89 ± 2,82	-	-	-	1	[150]
^{68}Ga-PSMA-11	12,75 ± 2,49	-	-	-	1	[69]
^{68}Ga-PSMA-11	8,91 ± 0,86	-	-	-	1	[105]
^{68}Ga-PSMA-11	8,42 ± 1,40	-	-	-	1	[147]
^{68}Ga-PSMA-11	7,19 ± 0,86	-	-	-	1	[147]
^{68}Ga-PSMA-11	8,20 ± 2,44	-	-	-	1	[147]
^{68}Ga-PSMA-11	8,67 ± 1,97	-	-	-	1	[147]
^{68}Ga-PSMA-11-Dimer	8,22 ± 1,78	-	0,93 ± 0,53	8,8	1	[150]
^{18}F-PSMA-11	55,7 ± 11,8	-	3,1 ± 0,9	18,0	6	[17]
^{18}F-PSMA-1007	8,04 ± 2,39	-	1,05 ± 0,11	7,7	1	[22]
[^{11}C]DCMC	8,73 ± 0,73	-	1,65 ± 0,29	5,3	0,5	[61]
[^{11}C]DCIT	5,07 ± 1,02	-	1,78 ± 0,63	2,8	0,5	[61]
^{68}Ga-HE$_0$	2,38 ± 0,05	-	0,84 ± 0,18	2,8	1	[150]
^{68}Ga-HE$_1$	2,41 ± 1,24	-	2,67 ± 1,25	0,9	1	[150]
^{68}Ga-HE$_2$	10,66 ± 4,19	-	1,99 ± 0,40	2,5	1	[150]
^{68}Ga-HE$_3$	3,22 ± 0,22	-	1,66 ± 0,41	1,9	1	[150]
^{203}Pb-PSMA-CA012	-	8,4 ± 3,7	-	-	1	[41]
DUPA-^{99m}Tc	11,2	-	-	-	4	[102]

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 18

^{68}Ga-CHX-A''-DTPA Konjugat	~3*	-	-	-	1	[184]
^{68}Ga-CHX-A''-DOTA Konjugat	~7*	-	-	-	1	[184]
^{68}Ga-PSMA-617	8,47 ± 4,09	-	-	-	1	[13]
^{177}Lu-PSMA-617	11,20 ± 4,17	-	-	-	1	[13]
^{64}Cu-PSMA-617	-	-	3,47 ± 0,48	-	24	[74]

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.