

Diss. ETH No. 19373

**Refinement and Standardization of Small Animal PET Scanning
Experimentation and Data Analysis**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

MARIANNE ISABELLE KEHL

Dipl. Naturwissenschaftlerin, ETH Zurich

born April 5th, 1982

citizen of Rebstein SG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P.A. Schubiger, examiner

Prof. Dr. S.M. Ametamey, co-examiner

Dr. M. Honer, co-examiner

2010

Summary

Positron emission tomography (PET) is an excellent imaging tool to investigate biochemical, physiological and pharmacological processes non-invasively in healthy and diseased individuals. In recent years, the development of dedicated small animal PET scanners with high spatial resolution crucially increased the utility of PET in preclinical research. The non-invasiveness of PET allows longitudinal follow-up studies, where animals can be used as their own controls. Such set-ups are considered to give more reliable results than the traditional approach using control groups. However, the use of small animal PET in preclinical research still bears several challenges and major differences compared to clinical PET. In contrast to clinical PET, preclinical PET requires the anesthetic immobilization of small animals during data acquisition. Experimental parameters, such as the administration of anesthetic agents or general animal handling and keeping might hamper the translatability of preclinical results to the clinical setting. Another major difference between clinical and preclinical PET is that quantification or semi-quantification of data is crucial for small animal PET whereas clinical PET is mainly based on visual inspection of patient scans for diagnostic purposes. Despite the fast development of preclinical tomographs, reliable data quantification remains difficult and it is still hardly possible to directly compare data generated at different institutes.

In this thesis, the challenges of small animal PET scanning were approached from different directions but with the common aim to improve, refine and standardize small animal PET experimentation and data analysis. In the first part of this thesis, a detailed performance analysis of the dedicated small animal PET scanner eXplore Vista PET/CT (GE Healthcare) was carried out. In the second part of the study, experimental parameters with a potential impact on PET data were investigated and it was analyzed whether strict standardization of those parameters needs to be applied in order to achieve reliable and reproducible small animal PET data. In a third part, the phenomenon of high retro-ocular PET tracer uptake observed on small animal PET images was investigated using two exemplary tracers. The responsible tissue for the high accumulation was determined and the uptake characteristics were analyzed in detail.

The eXplore Vista was evaluated according to the national electrical manufacturers association (NEMA) standards for performance measurements of small animal PET tomographs (NEMA NU4-2008). These standards provide detailed guidelines how to determine the performance of

small animal PET scanners in order to achieve direct comparability of different systems available. Additional tests were performed in order to evaluate the impact of radioactivity located outside of the field of view (FOV) on data acquisition. The performance evaluation of the eXplore Vista showed competitive results in terms of spatial resolution ($<1.8\text{mm}$ FWHM in the central 3cm), sensitivity (4.2% ACS), uniformity ($7.4\pm 0.9\%$ SD) and recovery coefficient (RC) compared to similar devices described in literature. The optimal energy window for data acquisition was determined 250-700keV and it was found that optimal image quality can be achieved by reconstructing data with a 2D OSEM algorithm applying scatter and random correction. It seems worthwhile for the future, to determine the benefit of the 3D OSEM reconstruction algorithm on image quality.

In order to determine the impact of experimental parameters on small animal PET data, two representative PET tracers ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, a glucose analogue, as an example of a metabolic tracer, which is trapped inside the cell and $[^{18}\text{F}]\text{fallypride}$, a dopamine D_2 receptor ligand, as a typical representative of a tracer with reversible binding kinetics) were investigated. Test-retest PET scanning experiments were performed to examine whether using animals as their own control leads to more reliable study outcome. Furthermore, the benefit of standardization on the reliability of results was investigated by studying gender-specific $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ tissue uptake under standardized and heterogenized conditions. Experimental parameters showed minor impact on $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ tissue uptake. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ brain uptake was only affected by the duration of anesthesia application (27% less brain uptake for animals anaesthetized for 60min compared to 40min). The results indicate that strict standardization of anesthetic protocols and tracer formulation might lead to increased reliability and reproducibility of small animal PET data. However, intra-animal variability of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ brain uptake proved to be larger than inter-animal variability, suggesting that using animals as their own control does not increase the reliability of study results. Therefore, the performance of group size calculation prior to small animal PET studies is highly recommended. This includes the estimation of the variability of the PET tracer uptake to the target tissue. Furthermore, it was shown that strict standardization might reduce reproducibility of small animal PET results by trend. This finding indicates that in contrast to strict standardization, systematic heterogenization of experimental parameters might be more beneficial for the reliability of study outcome as it tends to increase the external validity of results. Therefore, it is recommended to find the balance between standardization of parameters

with significant impact on PET tracer distribution (such as anesthesia duration) and heterogenization of factors with no crucial impact on study outcome. In the future, the next step should be the performance of studies which involve different small animal PET centers in order to investigate closer on external validity of results.

Finally, the high retro-ocular accumulation of [^{18}F]FDG and [^{18}F]fallypride was characterized by PET scanning, *ex vivo* tissue counting and *ex vivo / in vitro* autoradiography with subsequent eosin and haematoxylin staining of tissue slices. Retro-ocular uptake of [^{18}F]FDG was shown to be due to the Harderian gland (HG), an eye gland present in almost all mammals, with yet unknown function. The strong [^{18}F]FDG accumulation might be explained by a high glucose consumption for lipid synthesis taking place in the HG. In contrast to [^{18}F]FDG, [^{18}F]fallypride accumulation in a similar area could be mainly allocated to the retina. This [^{18}F]fallypride accumulation was exclusively observed *in vivo* in pigmented mice and the administration of a potent dopamine receptor ligand did not show any blocking effect. An explanation for such retro-ocular uptake might be a non-specific accumulation of PET tracers with lipophilic physiochemical properties ($\log P > 1$) to pigmented structures, such as the retina and the porphyrin-containing HG. The closer investigation on the detailed characteristics of retro-ocular PET tracer accumulation in different test animals remains for the future.

Zusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein hervorragendes Bildgebungsverfahren zur nicht-invasiven Untersuchung von biochemischen, physiologischen und pharmakologischen Prozessen in gesunden und kranken Individuen. Die Entwicklung von hochauflösenden Kleintier-PET-Tomographen hat in den letzten Jahren zu einem starken Anstieg der präklinischen Nutzung von PET geführt. Dass es sich bei PET um eine nicht-invasive Methode handelt, ermöglicht die Durchführung langfristiger Folgestudien und damit die Nutzung eines Individuums gleichermaßen als Kontroll- und Testsubjekt. Nichtsdestotrotz birgt der Einsatz von Kleintier-PET immer noch zahlreiche Herausforderungen und gravierende Unterschiede zum klinischen PET. Im Gegensatz zum klinischen PET setzt präklinisches PET eine Immobilisierung der Testtiere durch Narkose voraus. Experimentelle Parameter, wie die Verabreichung von Anästhetika, der allgemeine Umgang mit dem Tier und die Tierhaltung könnten die Translationsfähigkeit von präklinischen Resultaten auf die klinische Situation beeinträchtigen. Ein weiterer zentraler Unterschied zwischen klinischem und präklinischem PET ist die Notwendigkeit, mit quantitativen oder semi-quantitativen Kleintierdaten arbeiten zu können, während beim klinischen PET die visuelle Inspektion von Patientenscans für diagnostische Zwecke in der Regel genügt. Trotz der rasanten Entwicklung der präklinischen Tomographen bleibt es schwierig, Daten verlässlich zu quantifizieren und es ist immer noch so gut wie unmöglich, Daten, die an verschiedenen Instituten generiert wurden, direkt miteinander zu vergleichen.

In dieser Dissertation wurden die Herausforderungen von Kleintier-PET von verschiedenen Richtungen her angegangen, allerdings mit dem übergeordneten Ziel, Kleintier-PET-Experimente und -Datenanalyse zu standardisieren und zu verbessern. Im ersten Teil der Arbeit wurde eine detaillierte Leistungsanalyse des Kleintier-PET-Tomographen eXplore Vista PET/CT (GE Healthcare) durchgeführt. Im zweiten Teil wurden dann experimentelle Parameter untersucht, die einen potentiellen Einfluss auf PET-Daten haben könnten und es wurde analysiert, ob eine strikte Standardisierung dieser Parameter nötig ist für die Generierung von verlässlichen und reproduzierbaren Kleintier-PET-Daten. Im dritten Teil wurde die auf Kleintier-PET-Bildern häufig beobachtete retro-okulare Anreicherung von PET-Tracern anhand von zwei

exemplarischen Tracern untersucht. Das verantwortliche Gewebe für diese Anreicherung wurde bestimmt und die Anreicherungscharakteristik wurde analysiert.

Die Leistung des eXplore Vista PET/CT wurde gemäss den Richtlinien der „National Electrical Manufacturers Association (NEMA)“ Standards für die Leistungsmessungen von Kleintier-PET-Tomographen (NEMA NU4-2008) bestimmt. Diese Standards stellen detaillierte Richtlinien dar, wie die Leistung eines Kleintier-PET-Tomographen überprüft werden muss, um einen direkten Vergleich von verschiedenen Systemen zu ermöglichen. Zusätzliche Tests wurden durchgeführt, um den Einfluss von Radioaktivität ausserhalb des Gesichtsfeldes des Tomographen auf die Messung zu untersuchen. Die Leistungsanalyse des eXplore Vista PET/CT führte zu konkurrenzfähigen Resultaten im Hinblick auf die räumliche Auflösung ($<1.8\text{mm}$ FWHM innerhalb der zentralen 3cm des Gesichtsfeldes), Empfindlichkeit (4.2% ACS), Uniformität ($7.4\pm 0.9\%$ SD) und „Recovery Coefficient (RC)“, verglichen mit anderen Systemen, die in der Literatur beschrieben wurden. Als geeignetes Energiefenster bei der Datengenerierung wurden 250-700keV bestimmt und es wurde befunden, dass ein 2D OSEM Algorithmus mit Streuungs- und Zufallskoinzidenzkorrektur zu optimaler Bildqualität führt.

Um den Einfluss von experimentellen Parametern auf Kleintier-PET-Daten zu untersuchen, wurden zwei exemplarische PET-Tracer verwendet ($[^{18}\text{F}]$ FDG, ein Glucose-Analogon als Beispiel eines metabolischen Tracers und $[^{18}\text{F}]$ Fallypride, ein Dopamin D_2 Rezeptor-Ligand als typisches Beispiel eines Tracers mit reversibler Bindungskinetik). Test-Retest PET-Experimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Verwendung ein und desselben Tieres als Test- und Kontrollsubjekt in höherer Verlässlichkeit des Studienergebnisses resultieren würde. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Standardisierung von Testbedingungen vorteilhaft wäre. Dies wurde getestet, indem geschlechtsspezifische Unterschiede in der Gewebeanreicherung von $[^{18}\text{F}]$ FDG unter standardisierten und heterogenisierten Bedingungen bestimmt wurden. Experimentelle Parameter zeigten nur einen kleinen Einfluss auf die Gewebeaufnahme von $[^{18}\text{F}]$ FDG. Die $[^{18}\text{F}]$ FDG Hirnaufnahme wurde lediglich von der Dauer der Anästhesie signifikant beeinflusst (27% weniger Hirnanreicherung in Tieren, die über 60min unter Narkose standen, verglichen mit solchen, die über 40min anästhesiert waren). Die Resultate weisen darauf hin, dass eine strikte Standardisierung der Anästhesieprotokolle und Tracerformulierungen zu einer erhöhten Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit von Kleintier-PET-Daten führt. Andererseits erwies sich die intra-individuelle Variabilität der $[^{18}\text{F}]$ FDG Hirnanreicherung nicht

als geringer verglichen mit der inter-individuellen Variabilität. Dies deutet darauf hin, dass die Verwendung ein und desselben Tieres als Test- und Kontrollsubjekt nicht zu einer erhöhten Studienverlässlichkeit führt. Daher wird empfohlen, immer eine Gruppengrössenberechnung im Vorfeld einer Studie durchzuführen. Eine solche Berechnung würde auch eine Abschätzung der Aufnahmevariabilität des zu untersuchenden PET-Tracers ins Zielgewebe beinhalten. Es wurde ausserdem gezeigt, dass die strikte Standardisierung von experimentellen Parametern tendenziell eine verringerte Reproduzierbarkeit von Kleintier-PET-Resultaten zur Folge hat. Eine systematische Heterogenisierung von experimentellen Parametern könnte daher für die Verlässlichkeit von Studien vorteilhaft sein, da angenommen werden kann, dass die externe Gültigkeit der Resultate dadurch ansteigt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird empfohlen, nur solche Parameter zu standardisieren, welche einen signifikanten Einfluss auf die PET-Traceranreicherung haben (zum Beispiel Dauer der Anästhesie) und die restlichen Parameter zu heterogenisieren. In Zukunft sollte eine Studie in Betracht gezogen werden, die verschiedene Kleintier-PET-Zentren einschliesst, um die externe Gültigkeit von Resultaten genauer zu untersuchen.

Schliesslich wurde die retro-okulare Anreicherung von [^{18}F]FDG und [^{18}F]Fallypride mittels PET-Scanning, *ex vivo* Gewebemessung, *ex vivo* / *in vitro* Autoradiographie und anschliessender Eosin/Hämatoxilin-Färbung von Gewebeschnitten charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass [^{18}F]FDG retro-okular hauptsächlich in die Harderdrüse (HD) aufgenommen wird. Diese Drüse findet sich in fast allen Säugern, ihre Funktion ist aber bis heute noch nicht mit Bestimmtheit geklärt. Die hohe HD-Aufnahme von [^{18}F]FDG könnte mit einem hohen Glucose-Bedarf erklärt werden, welcher durch die in der HD stattfindenden Lipid-Synthesen zu Stande kommt. Im Gegensatz zu [^{18}F]FDG wurde die starke [^{18}F]Fallypride-Anreicherung nicht der HD, sondern hauptsächlich der Retina zugeordnet. Diese [^{18}F]Fallypride-Aufnahme wurde allerdings nur *in vivo* in pigmentierten Tieren festgestellt und eine Blockade mittels eines potenten Dopamin Rezeptor-Liganden war nicht möglich. Eine Erklärung für diesen Befund könnte eine unspezifische Anreicherung von Radiopharmazeutika mit erhöhter Lipophilie ($\log P > 1$) in pigmentierten Geweben, wie der Retina oder der porphyrin-haltigen HD, sein. Für die Zukunft erscheint eine genauere Untersuchung der detaillierten Charakteristik dieser retro-okularen PET-Tracer-Anreicherung in verschiedenen Tierstämmen lohnenswert.