

Thallium-Diethyldithiocarbamat als Tracer für neuronale Aktivität und cerebralen Kaliummetabolismus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von Diplom-Neurowissenschaftler Tim Wanger

geb. am 26.11.1981 in Schönebeck (Elbe)

Gutachter: Prof. Dr. Frank W. Ohl

PD Dr. Andreas Hess

eingereicht am: 26.06.2012

verteidigt am: 04.03.2013

Kurzfassung

Neuronale Aktivierungsmuster und metabolische Prozesse im zentralen Nervensystem (ZNS) höherer Vertebraten lassen sich auf unterschiedlichste Art und Weise charakterisieren. In vielfacher Hinsicht besonders geeignet für diesen Zweck sind Analoga oder Isotope endogener Metallionen wie Kalium (K^+) und Calcium (Ca^{2+}). Ein Problem bei der Verwendung von Metallionen als Tracer stellt jedoch die geringe Leitfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) für Ionen dar. Zusätzlich wird die Interpretation der Befunde durch eine mögliche Umverteilung des Tracers innerhalb des beobachteten Zeitraumes erschwert. In dieser Arbeit soll unter Verwendung des K^+ -Analogons Thallium (Tl^+) und des Nachweisverfahrens der Thallium-Autometallografie die Tauglichkeit des BHS-gängigen, lipophilen Komplexes Thallium-Diethyldithiocarbamat (TIDDC) als neuronaler Aktivitätsmarker mit zellulärer Auflösung experimentell überprüft und das experimentelle Protokoll am Modell der Ratte sowie der mongolischen Wüstenrennmaus validiert werden. Zum anderen soll die Kinetik der Umverteilung des Tl^+ als Funktion der Zeit im Nagetier-ZNS, mittels empirischer Befunde und einfacher mathematischer Modelle veranschaulicht und beschrieben werden. Die Ergebnisse zeigen, dass es unter Verwendung von TIDDC als Tracer möglich ist, neuronale Aktivitätsmuster im ZNS von freibeweglichen, sich verhaltenden Nagetieren nach relativ kurzen Stimulationszeiten von 5 min hochauflösend zu visualisieren. Die minimal-invasive Applikation des Tracers über einen intravenösen Katheter ermöglicht dabei auch die Erfassung sensibler Verhaltenszustände, wie sie beispielsweise während distinkter Schlafphasen vorliegen. Ferner wird gezeigt, dass es zu einer Umverteilung von Tl^+ nach systemischer Injektion von TIDDC kommt. Die Kinetik der Umverteilung auf der zellulären Ebene im ZNS *in vivo* entspricht dabei der Äquilibrierungskinetik kaliumanaloger Tracer *in vitro*. Nach der Umverteilung des Tracers, manifestiert sich eine stabile Tl^+ -Gleichgewichtsverteilung, welche Rückschlüsse auf die regionale, die zelluläre, sowie die subzelluläre K^+ -Verteilung zulässt. Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass TIDDC ein geeigneter Tracer ist, um sowohl neuronale Aktivität als auch unterschiedliche Aspekte des Kaliumstoffwechsels im ZNS

hochauflösend darzustellen. Im Weiteren liefert sie einen theoretischen Rahmen für die Verwendung K^+ -analoger Tracer in der neuronalen Bildgebung im Allgemeinen.

Abstract

Several methods are available to visualize neuronal activity and metabolic processes in vertebrate nervous systems. Analogues and isotopes of endogenous cations such as potassium (K^+) or calcium (Ca^{2+}) are particularly suited to be used as tracers for imaging neural activity. The poor permeability of the blood-brain barrier (BBB) for ions does, however, impose severe limitations on the use of these tracers *in vivo*. In addition, interpretation of imaging data is complicated by potential redistribution of the tracer. This study shows, using the K^+ -analogue thallium (Tl^+) and autometallographic detection of the tracer, that the lipophilic chelate complex thallium diethyldithiocarbamate (TIDDC) passes the BBB and can be used for mapping neuronal activity with single cell resolution in freely moving, behaving rodents, with short stimulation times of 5 min. The tracer is applied via an intravenous catheter, which ensures minimal interference with ongoing animal behaviour, thus allowing for visualization of neural activity patterns during unstable states like sleep. Furthermore, redistribution kinetics of Tl^+ were analyzed in brains of rats and Mongolian gerbils both experimentally and using simple mathematical models. Tl^+ redistributes after a single intravenous injection of TIDDC. The kinetics of the Tl^+ -redistribution at the cellular level in the CNS *in vivo* is similar to the kinetics of equilibration of K^+ -fluxes in cells *in vitro*. After redistribution, a stable Tl^+ -distribution emerges that resembles the CNS K^+ -distribution on the regional, cellular and subcellular level. In conclusion, this study shows that TIDDC can be used as a tracer for mapping neuronal activity and CNS K^+ -metabolism with subcellular resolution. In addition, a theoretical guideline is given for the use of K^+ -analogues for imaging neuronal activity with general implications for the use of metal ions in neuroimaging.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------------------|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | | 10 |
| 1 | Einleitung | 12 |
| 1.1 | Metallionen als Tracer für neuronale Aktivität | 14 |
| 1.1.1 | <i>Anfänge</i> | 15 |
| 1.1.2 | <i>Natrium-Kalium-ATPase</i> | 17 |
| 1.1.3 | <i>Kaliumanaloga</i> | 18 |
| 1.1.4 | <i>Calciumanaloga</i> | 20 |
| 1.2 | Nachweisverfahren | 21 |
| 1.2.1 | <i>SPECT</i> | 22 |
| 1.2.2 | <i>MRI</i> | 24 |
| 1.2.3 | <i>Elementanalyse</i> | 26 |
| 1.2.4 | <i>Histochemie</i> | 29 |
| 1.3 | Lipophile Metallkomplexe und Tracerkinetik | 36 |
| 1.3.1 | <i>Die Blut-Hirn-Schranke</i> | 36 |
| 1.3.2 | <i>Lipophile Metallkomplexe</i> | 39 |
| 1.3.3 | <i>Tracerkinetik</i> | 41 |
| 2 | Zielstellung | 44 |
| 3 | Material und Methoden | 47 |
| 3.1 | Thalliumapplikation und Anästhesie | 47 |
| 3.1.1 | <i>Intraperitoneale Injektion von Thallium(I)acetat</i> | 47 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.2 | <i>Intraperitoneale Injektion von Thallium-Diethyldithiocarbamat</i> | 48 |
| 3.1.3 | <i>Intravenöse Injektion von Thallium-Diethyldithiocarbamat</i> | 48 |
| 3.2 | Stimulation, Muscimolapplikation und Vigilanzkontrolle | 51 |
| 3.2.1 | <i>Nozizeptive Stimulation</i> | 51 |
| 3.2.2 | <i>Akustische Stimulation</i> | 52 |
| 3.2.3 | <i>Intracortikale Mikrostimulation</i> | 52 |
| 3.2.4 | <i>Epidurale Muscimolapplikation</i> | 53 |
| 3.2.5 | <i>Differenzierung diskreter Schlafphasen mittels Elektrocortikografie und Elektromyografie</i> | 54 |
| 3.3 | Transkardiale Perfusion und histochemische Aufarbeitung | 56 |
| 3.3.1 | <i>Transkardiale Perfusion</i> | 56 |
| 3.3.2 | <i>Prozessierung des Gewebes und Färbung</i> | 57 |
| 3.4 | Fotografische Dokumentation und statistische Analyse | 60 |
| 3.5 | Modellierung der Traceraufnahme <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 64 |
| 3.5.1 | <i>In vitro</i> | 64 |
| 3.5.2 | <i>In vivo</i> | 66 |
| 4 | Ergebnisse | 68 |
| 4.1 | Thalliumverteilung im Nager-ZNS nach systemischer Applikation von TIDDC | 68 |
| 4.1.1 | <i>Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC versus TIAC in unstimulierten Tieren</i> | 68 |
| 4.1.2 | <i>Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei nozizeptiver Stimulation</i> | 69 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.3 | <i>Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei akustischer Stimulation</i> | 73 |
| 4.1.4 | <i>Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei elektrischer Stimulation</i> | 73 |
| 4.1.5 | <i>Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei epiduraler Muscimolapplikation</i> | 75 |
| 4.1.6 | <i>Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC im Non-REM-Schlaf und während spontaner Wachphasen</i> | 75 |
| 4.2 | Umverteilung von Thallium im Nager-ZNS nach systemischer Applikation von TIDDC und TIAc | 80 |
| 4.2.1 | <i>Verteilung von Thallium 5 min versus 24 h nach intravenöser Injektion von TIDDC</i> | 81 |
| 4.2.2 | <i>Verteilung von Thallium 15 min, 30 min, 60 min und 180 min nach intravenöser Injektion von TIDDC</i> | 85 |
| 4.2.3 | <i>Verteilung von Thallium zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von TIAc</i> | 87 |
| 4.2.4 | <i>Modellierung der Thalliumaufnahme in vitro</i> | 89 |
| 4.2.5 | <i>Modellierung der Thalliumaufnahme in vivo</i> | 90 |
| 5 | Diskussion | 94 |
| 5.1 | Hochauflösende Darstellung neuronaler Aktivität mittels TIDDC | 95 |
| 5.1.1 | <i>Systemische Applikation von TIDDC versus TIAc</i> | 96 |
| 5.1.2 | <i>Charakterisierung neuronaler Aktivitätsmuster mittels TIDDC</i> | 98 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.1.3 | <i>Potenzielle Mechanismen der Thalliumfreisetzung aus TIDDC</i> | 99 |
| 5.1.4 | <i>Toxizitätserwägungen</i> | 101 |
| 5.1.5 | <i>Intravenöse versus intraperitoneale TIDDC-Applikation</i> | 102 |
| 5.2 | Umverteilung von Thallium im ZNS: Kinetik und Äquilibrium | 103 |
| 5.2.1 | <i>Cerebrale Thalliumverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von TIDDC</i> | 103 |
| 5.2.2 | <i>Einfluss der Kaliumkinetik auf die Thalliumverteilung in vitro und in vivo</i> | 105 |
| 5.2.3 | <i>Weitere Einflussfaktoren auf die Thalliumverteilung</i> | 107 |
| 5.2.4 | <i>Validität des in vivo-Modells</i> | 109 |
| 5.2.5 | <i>Die Thallium-Gleichgewichtsverteilung</i> | 110 |
| 5.2.6 | <i>Implikationen für die Bildgebung mit Metallionen im Allgemeinen</i> | 113 |
| 5.3 | Resümee und Ausblick | 116 |
| | Literaturverzeichnis | 119 |
| | Anhang | 136 |
| | Danksagung | 142 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 143 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| 2-DG | 2-Desoxyglucose |
| A1 | primärer auditorischer Cortex |
| AAF | anteriores auditorisches Feld |
| AMG | Autometallografie |
| A/V | Oberflächen-Volumen (-Verhältnis) |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BLS | Blut-Liquor-Schranke |
| CPu | Striatum (Caudate putamen) |
| DDC | Diethyldithiocarbamat |
| ECoG | Elektrocortikogramm |
| EMG | Elektromyogramm |
| EPL | Externe plexiforme Schicht |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EZR | Extrazellulärraum |
| GCL | Granulärzellschicht (Granule cell layer) |
| GL | Glomerulischicht (Glomerular layer) |
| HMPAO | Hexamethyl-Propylen-Amin-Oxim |
| HSAB | Hard and Soft Acids and Bases |
| ic | Capsula interna (internal capsule) |
| IC | Colliculus inferior (inferior colliculus) |
| IEGs | Immediate early genes |

| | |
|-------------------|--|
| i.p. | intraperitoneal(e) |
| i.v. | intravenös(e) |
| LAMMA | Laser microprobe mass analysis |
| MM | Mamillarkörper |
| MEMRI | Mangan-verstärkte Magnetresonanztomografie (Manganese-enhanced magnetic resonance imaging) |
| MRI | Magnetresonanztomografie (Magnetic Resonance Imaging) |
| Na ₂ S | Natriumsulfid |
| OB | Bulbus olfactorius (Olfactory bulb) |
| PIXE | Particle-induced X-ray emission |
| ROI | Region of Interest |
| SD | Standardabweichung (Standard Deviation) |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean) |
| SXRF | Synchrotron X-ray fluorescence |
| SPECT | Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie (single photon emission computed tomography) |
| TIAc | Thallium(I)acetat |
| TIAMG | Thallium-Autometallografie |
| TIDDC | Thallium-Diethyldithiocarbamat |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

Neuronale Aktivierungsmuster im Gehirn höherer Vertebraten lassen sich auf vielfältige Weise mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen nachvollziehen und beschreiben. Elektrophysiologische und optische Methoden sind in der Lage neuronale Aktivität in Form von Aktionspotentialen und Membranpotentialschwankungen auf verschiedenen räumlichen Ebenen in Echtzeit abzubilden (z. B. Yuste und Konnerth, 2004; Nunez und Srinivasan, 2005; Buzsaki, 2006), während metabolische, bildgebende und immunhistochemische Verfahren vorwiegend indirekt an neuronale Aktivität gekoppelte Vorgänge wie Energieverbrauch, hämodynamische Effekte oder Genexpressionsmuster widerspiegeln (z. B. Sokoloff u. a., 1977; Ogawa u. a., 1990; Kaczmarek und Robertson, 2002).

Als in vielerlei Hinsicht besonders geeignet, das Aktivitätsniveau von Nervenzellen abzubilden, erweisen sich Analoga und radioaktive Isotope endogener Metallionen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie Kalium (K^+) und Calcium (Ca^{2+}). Die neuronalen Transmembranströme dieser Ionen sind unmittelbar an die Signalweiterleitung in Nervenzellen gekoppelt (Kandel u. a., 2000), was es ermöglicht, entsprechende Analoga wie z. B. Thallium- (Tl^+) und Rubidiumionen (Rb^+) bzw. Manganionen (Mn^{2+}) als Marker für aktive Neurone zu verwenden und auf diese Weise ein direktes Maß für vorhergehende prä- und postsynaptische Aktivität zu erhalten. Die Analogien zwischen hirnen-dogenen Ionen und ihren entsprechenden exogenen Pendants, sowie die zugrundeliegenden Aufnahmecharakteristika wurden bereits seit den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts in verschiedenen Modellsystemen *in vitro* erforscht und sind ausführlich dokumentiert (Keynes, 1951b; Hodgkin und Keynes, 1955; Keynes und Ritchie, 1965; Landowne, 1975; Hunter u. a., 1980; Sendtner u. a., 1988; Brismar u. a., 1989; Schielke u. a., 1990; Aschner und Aschner, 1991; Foley und Rhoads, 1994; Pellerin und Magistretti, 1997; Nanitsos u. a., 2004; Rose u. a., 2009). Darüber hinaus existiert eine Vielzahl verschiedener Detektionsverfahren für Metalle in biologischen Proben, die es ent-

sprechend der jeweiligen Fragestellung ermöglichen, neuronale Aktivitätsmuster mit unterschiedlicher räumlicher und zeitlicher Auflösung sichtbar zu machen. Die räumliche Dimension reicht dabei von hochauflösenden Karten des gesamten Gehirns auf der Ebene einzelner Zellen (Goldschmidt u. a., 2004), bis hin zu quantitativen *in vivo*-3D-Datensätzen auf der Ebene einzelner Nuclei (Neubert u. a., 2011), wobei einige Marker auch in der Humanbildgebung eingesetzt werden (Pagnanelli und Basso, 2010).

Neben den oben aufgezählten Vorteilen gibt es jedoch bei allen Verfahren, die Metallionen als Marker bzw. *Tracer* für neuronale Aktivität verwenden ein nicht unerhebliches Problem, nämlich die geringe Leitfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) für Ionen (Somjen, 2004). Dies hat zur Folge, dass man neben langen Stimulationszeiten und zum Teil nah am toxischen Bereich liegenden Dosen (Lin und Koretsky, 1997) zusätzlich Verteilungsgradienten in Kauf nehmen muss (Goldschmidt u. a., 2004), welche aufgrund regional unterschiedlicher Durchlässigkeiten von BHS und Blut-Liquor-Schranke (BLS) auftreten (Smith und Rapoport, 1986). Herkömmliche Strategien die BHS zu umgehen, münden oft in invasiven Ansätzen wie der Applikation hypertonischer Lösungen zur Schrumpfung des Endothels (Pardridge, 2005) oder der Implantation intrathekaler Katheter (Nikai u. a., 2008). Ein alternativer Lösungsansatz für dieses Problem bestünde theoretisch in der Verpackung der ionisierten Metalle mittels lipophiler Partikel, wie beispielsweise Liposomen oder Mizellen (Gilmore u. a., 2008) bzw. in der Kombination mit entsprechenden chelatisierenden Liganden, welche zusammen mit den Ionen einen elektroneutralen, unpolaren und lipophilen Komplex bilden, der ohne Schwierigkeiten die BHS passieren könnte (z. B. de Bruine u. a., 1985). Allerdings wäre es hierbei in Hinblick auf funktionelle Fragestellungen, welche über grob aufgelöste Blutflussmessungen hinausgingen, essentiell sicherzustellen, dass der Komplex nach Passieren der BHS dissoziiert und freie Metallionen aktivitätsabhängig von den Neuronen und Gliazellen aufgenommen werden können.

Unabhängig vom Problem der BHS gilt es bei der Verwendung von Metallionen als Aktivitätsmarker zu beachten, dass die Transmembranströme dieser Ionen bidirektional

sind, d.h. auf den aktivitätsabhängigen Einstrom in die Zelle folgt ein stetig zunehmender Ausstrom, bis Ein- und Ausstrom letztendlich im Gleichgewicht sind. Sind die Ströme jedoch erstmal im Gleichgewicht, so lassen sich keine aktivitätsabhängigen Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen respektive Hirnstrukturen mehr detektieren. Aus diesem Grund ist es von enormer Relevanz, die Verteilungskinetik der entsprechenden Tracer zu kennen und bei der experimentellen Planung in Betracht zu ziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zum einen die Tauglichkeit des lipophilen Komplexes Thallium-Diethyldithiocarbamat (TIDDC) als neuronaler Aktivitätsmarker mit zellulärer Auflösung experimentell überprüft und das experimentelle Protokoll am Modell der Ratte sowie der mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) validiert werden. Zum anderen wird die Verteilungskinetik des K^+ - Analogons Tl^+ im Gehirn dieser Nager mittels empirischer Befunde und einfacher mathematischer Modelle veranschaulicht und ausführlich beschrieben.

Zunächst folgt eine kurze Rekapitulation des historischen Kontextes und der zugrundeliegenden Prinzipien auf denen der Einsatz von Metallionen als Tracer in den Biowissenschaften beruht (Abschnitt 1.1). Nachfolgend werden verschiedene Methoden zur Detektion von Metallen in biologischen Materialien illustriert (Abschnitt 1.2), wobei die Thallium-Autometallografie einen Schwerpunkt bildet, bevor die Problematiken lipophiler Metallkomplexe sowie kinetische Fragestellungen diskutiert werden (Abschnitt 1.3).

1.1 Metallionen als Tracer für neuronale Aktivität

Der Begriff *Tracer* wird im Folgenden sowohl für Radioisotope endogener Kationen, als auch für radioaktive und nicht-radioaktive exogene Kationen, die zur Charakterisierung unterschiedlicher neuronaler und nicht-neuronaler Stoffwechselprozesse bzw. zur Lokalisation von spezifischen Verbindungen und Elementen in biologischen Systemen eingesetzt werden, verwandt.

1.1.1 Anfänge

Einige der ersten Experimente bei denen Metallionen als Tracer zum Einsatz kamen wurden in den frühen 1950er Jahren von Richard Darwin Keynes in Cambridge durchgeführt. Aufgrund seiner Versuche an Nerven von Krabben (Keynes und Lewis, 1951; Keynes, 1951b), sowie am Riesenaxon des Tintenfisches (Keynes, 1951a), in denen radioaktives Kalium (^{42}K) und Natrium (^{24}Na) als Tracer verwandt wurden, konnten erstmals ionenselektiv die neuronalen Membranströme während des Ruhepotentials und bei elektrischer Stimulation quantitativ nachvollzogen werden. Hierzu wurden die herauspräparierten Nerven in eine ^{42}K -haltige Ringerlösung eingelegt und anschließend in eine Messkammer transferiert, unter der sich ein Geiger-Müller-Zählrohr befand (Abb. 1.1A). Durch das fortlaufend in der Kammer zirkulierende Meerwasser wurden Isotope die dem Nerv entwichen, ausgewaschen, weshalb die Abnahme der Radioaktivität über die Zeit ein Maß für den Austausch des intraaxonalen K^+ mit der Umgebung darstellte.

Es zeigte sich, dass bei Stimulation der Nervenfasern mit elektrischen Pulsen eine erhöhte Permeabilität der neuronalen Membran vorliegt, in deren Folge ein durch die entsprechenden elektrochemischen Triebkräfte bedingter Nettoausstrom von ^{42}K (Abb. 1.1B), respektive ein Nettoeinstrom von ^{24}Na stattfindet. Diese Ergebnisse bestätigten einige grundlegende Annahmen des von den späteren Nobelpreisträgern Alan Lloyd Hodgkin und Andrew Fielding Huxley postulierten Modells zur Entstehung und Weiterleitung des Aktionspotentials im Tintenfischaxon (Hodgkin und Huxley, 1952). Hodgkin und Huxley konnten zwar mit der Voltage-Clamp Technik neuronale Membranströme messen und quantifizieren, jedoch nicht so leicht Aussagen darüber treffen, zu welchen Anteilen die Ströme von Natrium- oder Kalium-Ionen getragen werden. Erst Keynes's Messungen ermöglichten einen Abgleich der mathematisch ermittelten Größen mit der Empirie. Einige der oben aufgeführten Befunde konnten später auch am Vagusnerv von Kaninchen repliziert werden (Keynes und Ritchie, 1965).

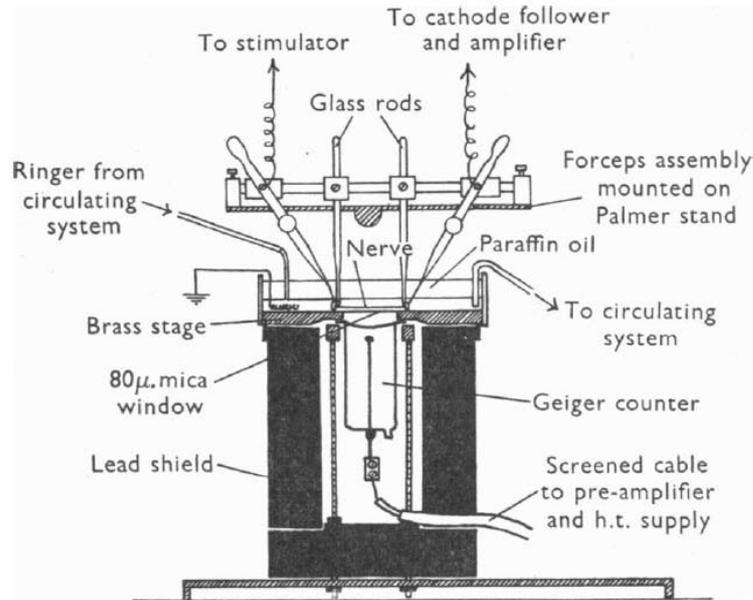
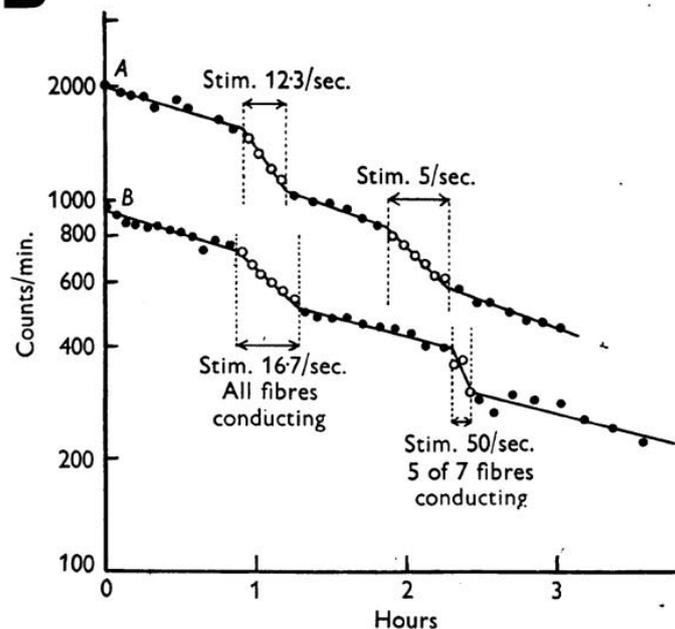
A**B**

Abb. 1.1: (A) Experimenteller Aufbau von Keynes zur Messung radioaktiver Ionenströme am Nerv der Strandkrabbe (*Carcinus maenas*). Über dem Zählrohr befindet sich eine 80 μm dünne Schicht Glimmer, welche den Boden der Messkammer bildet. Entnommen aus Keynes und Lewis (1951). (B) Ausstrom von ^{42}K aus dem Nerv einer Krabbe in Ruhe und während elektrischer Stimulation. Wie man sieht ist die Verlustrate während der Stimulation ungefähr proportional zur Stimulationsrate erhöht. Der Messwertverlauf ist dargestellt für einen kompletten Nerv (A), sowie für ein Bündel von 30 μm Fasern (B). Entnommen aus Keynes (1951b).

1.1.2 Natrium-Kalium-ATPase

Diese initialen Experimente von Keynes und Kollegen gaben allerdings wenig Aufschluss darüber, auf welche Art die ein- und ausströmenden Ionen letztendlich reabsorbiert bzw. wieder aus dem Axon heraus transportiert werden. Ein Mechanismus, der sowohl den Verlust von intrazellulärem K^+ , als auch den Überschuss von intrazellulärem Na^+ ausgleicht, ist jedoch unabdingbar um den mit dem Ruhemembranpotential assoziierten Ionengradienten und damit die Funktionalität der Nervenzelle aufrechtzuerhalten. Hodgkin und Keynes konnten zwar zeigen, dass mit zunehmenden intraaxonalem Na^+ -Spiegel der Ausstrom von Na^+ in Relation erhöht ist (Hodgkin und Keynes, 1956) und dass Inhibitoren der Atmungskette wie Dinitrophenol und Cyanid die aktive Ausfuhr von Na^+ respektive die aktive Aufnahme von K^+ hemmen (Hodgkin und Keynes, 1955), gleichwohl war es ihnen nicht möglich, anhand ihrer Ergebnisse direkte Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen zu ziehen. Auffällig war jedoch, dass die Transportraten von Na^+ und K^+ gegen den elektrochemischen Gradienten jeweils aneinander gekoppelt schienen. Wurden z. B. die K^+ -Einwärtsströme durch Umspülen des Tintenfischaxons mit einer K^+ -freien Meerwasserlösung unterbunden, dann fielen die entsprechenden Na^+ -Auswärtsströme um einen nahezu äquivalenten Betrag ab (Hodgkin und Keynes, 1955).

Ihre experimentellen Daten ließen Hodgkin und Keynes einen aktiven Transportmechanismus postulieren, welcher parallel zu und unabhängig von den passiven gradientenabhängigen Kanalströmen wirkt. Nach diesem Schema werden die im Zuge neuronaler Aktivität verminderten Ionengradienten durch einen zyklischen Prozess unter Energieverbrauch wiederhergestellt (Abb. 1.2A). Dieses Postulat erwies sich in vielerlei Hinsicht als zutreffend, indem es einige zentrale Eigenschaften des kurz darauf vom dänischen Mediziner Jens Christian Skou charakterisierten Enzyms vorwegnahm (Skou, 1957), welches später als verantwortlich für den aktiven Ionentransport identifiziert und fortan

als *Natrium-Kalium-ATPase* (Na/K-ATPase) bezeichnet wurde (Skou, 1965) (Abb. 1.2B).

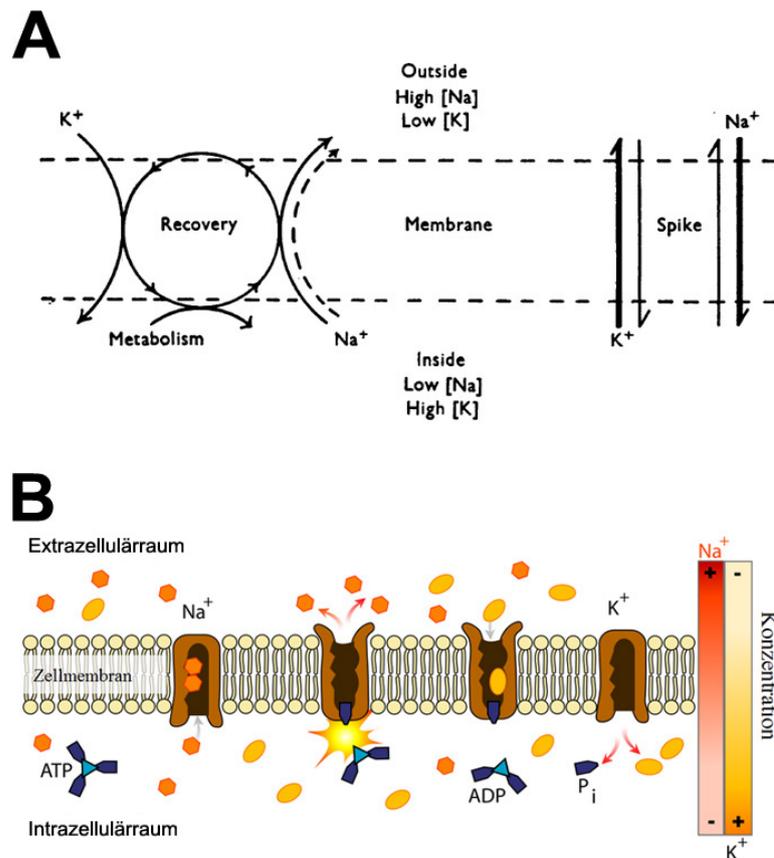


Abb. 1.2: (A) Schema von Hodgkin und Keynes zur Illustration der postulierten aktiven und passiven Ionenströme. Der gestrichelte Pfeil weist darauf hin dass der Na⁺-Auswärtstransport größer ist als der K⁺-Einwärtstransport. Entnommen aus Hodgkin und Keynes (1955). (B) Schematische Darstellung des aktiven Transportprozesses der von Skou identifizierten Natrium-Kalium-ATPase. Unter Hydrolyse von einem Molekül ATP werden zunächst drei Na⁺ aus der Zelle transportiert, bevor anschließend zwei K⁺ in den Intrazellulärraum befördert werden. Quelle: Wikimedia Commons.

1.1.3 Kaliumanaloga

Die Affinität der Na/K-ATPase für Na⁺ und K⁺ resultiert, wie auch die Selektivität beim passiven Transport von Ionen durch Membrankanäle, unter anderem aus elektrostatischen Wechselwirkungen die stark von den jeweiligen Ionenradien abhängen (Hille, 1992). Dass der Kristallradius eines Ions einen reliablen Prädiktor des Penetrationsverhaltens an der Zellmembran darstellt, ist seit langem bekannt (Mullins, 1959). Danach

sollten die monovalenten Ionen der Metalle Thallium (Tl^+ , Radius: 1.44 Angström) und Rubidium (Rb^+ , Radius: 1.48 Angström) sich im Organismus ähnlich verhalten wie K^+ (Radius: 1.33 Angström).

Tatsächlich konnten unter anderem Mullins und Moore (1960) zeigen dass Tl^+ im Bereich nicht toxischer Dosen ein ähnlich geartetes Ein- und Ausstromverhalten an der Membran von Froschmuskeln zeigt wie K^+ . Gehring und Hammond's (1967) kinetische Untersuchungen der Isotope ^{42}K und ^{204}Tl , welche an Ratten, Hunden und Schafen durchgeführt wurden, bestätigten dass die Bewegungen der beiden Ionen in verschiedenen Geweben ein hohes Maß an Analogie aufweisen und ließen darauf schließen, wie auch *in vitro*-Versuche an Kaninchennieren (Britten und Blank, 1968), dass Tl^+ in der Lage ist, die Kaliumbindungsstellen der Na/K-ATPase zu okkupieren. Darüber hinaus war Landowne (1975) durch Stimulationsexperimente am Riesenaxon des Tintenfisches in der Lage aufzuzeigen, dass es beim Reizen der Nervenfasern durch elektrische Pulse zu einer gegenüber dem Ruhezustand verstärkten (Wieder-)Aufnahme von ^{204}Tl kommt, welche äquivalent zu der von ^{42}K ist. Bei Gabe des Glykosides Ouabain, einem Inhibitor der Na/K-ATPase, reduzierte sich sowohl der Ruheestrom als auch der aktivitätsabhängige Einstrom von ^{204}Tl drastisch. Neuere Veröffentlichungen konnten weiterhin zeigen, dass Tl^+ ein geeigneter Substituent für K^+ in Bindungsstudien der Na/K-ATPase und von Nukleinsäuren ist (Gill u. a., 2005; Jakobsen u. a., 2006).

Ein entsprechendes kaliumanaloges Verhalten ist in ähnlichem Maße auch für Rb^+ beschrieben. Rubidiumionen substituieren intrazelluläres K^+ in Muskeln von Fröschen und Ratten *in vitro* (Lubin und Schneider, 1957; Adrian, 1964), sowie *in vivo* (Relman u. a., 1957) und vermögen die Membran an Nerven und Muskeln von Fröschen in K^+ -freier Lösung zu depolarisieren (Sandow und Mandel, 1951; Sjodin, 1959; Adrian, 1964). Weiterhin sind sie in der Lage anstelle von K^+ die Na/K-ATPase zu aktivieren (Adrian und Slayman, 1966; Rang und Ritchie, 1968), wenn auch mit geringerer Effektivität als Tl^+ (Rang und Ritchie, 1968).

1.1.4 Calciumanaloga

Aufgrund der primären Ausrichtung dieser Arbeit wurde bislang ausführlich auf die Aufnahmemechanismen von Kalium bzw. kaliumanaloger Ionen eingegangen. In der Praxis werden jedoch auch Analoga des divalenten Calciumions (Ca^{2+}), als Tracer in verschiedenen Anwendungsfeldern benutzt, wobei insbesondere zweiwertige Manganionen (Mn^{2+}) als Kontrastmittel in der Mangan-verstärkten Magnetresonanztomografie (MEMRI: *Manganese-enhanced magnetic resonance imaging*) (Silva u. a., 2004; Silva, 2012) von praktischer Bedeutung sind (siehe Abschnitt 1.2.2).

Ca^{2+} ist seit langem als zuverlässiger Indikator für neuronale Aktivität bekannt. So kommt es z. B. während der mit dem Aktionspotential assoziierten Erregungsweiterleitung im Neuron an den präsynaptischen Endigungen zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, was einen massiven, für die exozytische Neurotransmitterfreisetzung essentiellen Ca^{2+} Einstrom zur Folge hat (Nicholls u. a., 2001). Auch im Bereich der Postsynapse und des Somas findet im Zuge neuronaler Aktivität ein massiver Ca^{2+} -Einstrom statt (Yuste und Tank, 1996; Contreras u. a., 1997). Aufgrund des vergleichbaren Ionenradius wird Mn^{2+} in verschiedenen Geweben ähnlich wie Ca^{2+} behandelt, was durch zahlreiche *in vitro*-Studien belegt ist (Meiri und Rahamimoff, 1972; Hunter u. a., 1980; Kita u. a., 1981; Drapeau und Nachshen, 1984; Narita u. a., 1990; Aschner und Aschner, 1991; Shibuya und Douglas, 1993). Drapeau und Nachshen's (1984) Versuche an isolierten Nervenendigungen von Ratten zeigten beispielsweise, dass die Isotope ^{54}Mn und ^{45}Ca um die Aufnahme durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle konkurrieren, wobei ^{54}Mn sogar in der Lage war die Exozytose zu stimulieren, wenngleich mit deutlich verringerter Effektivität gegenüber ^{45}Ca . Ferner konnten Narita u. a. (1990) zeigen, dass die elektrische Stimulation von Froschnerven in Mn^{2+} -haltiger Lösung eine erhöhte Transmitterfreisetzung an der motorischen Endplatte nach sich zieht, welche wiederum selektiv durch den Calciumkanalblocker Verapamil inhibiert wird.

Zusammengefasst dokumentieren diese Studien, dass die monovalenten Kationen Tl^+ und Rb^+ , sowie das divalente Kation Mn^{2+} , geeignete Analoga darstellen, um Kalium- bzw. Calciumströme in verschiedenen Modellsystemen *in vivo* und *in vitro* nachzuvollziehen. Im nachfolgenden Abschnitt sollen nun die verschiedenen Möglichkeiten des Nachweises von Metallionen veranschaulicht und einige Beispiele für den mannigfaltigen Einsatz als Tracer in unterschiedlichen Anwendungsfeldern gegeben werden.

1.2 Nachweisverfahren

Metallionen können auf vielerlei Art in biologischen Proben *in vivo*, *in vitro*, sowie *in situ* nachgewiesen werden, wobei sich eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden in verschiedenen medizintechnischen Einsatzgebieten im Humanbereich, sowie in der biologischen Grundlagenforschung etabliert hat. Die Auflösung der räumlichen Dimension reicht dabei von der Ebene regionaler cerebraler oder kardialer Strukturen, bis hin zur Unterscheidung subzellulärer Komponenten mittels histochemischer oder elementanalytischer Verfahren (Abb. 1.3). Der Schwerpunkt der anschließenden Ausführungen wird auf dem histochemischen Ansatz der *Thallium-Autometallografie* (TIAMG) liegen, da dieses Nachweisverfahren in den die vorliegende Arbeit betreffenden Experimenten zum Einsatz kam.

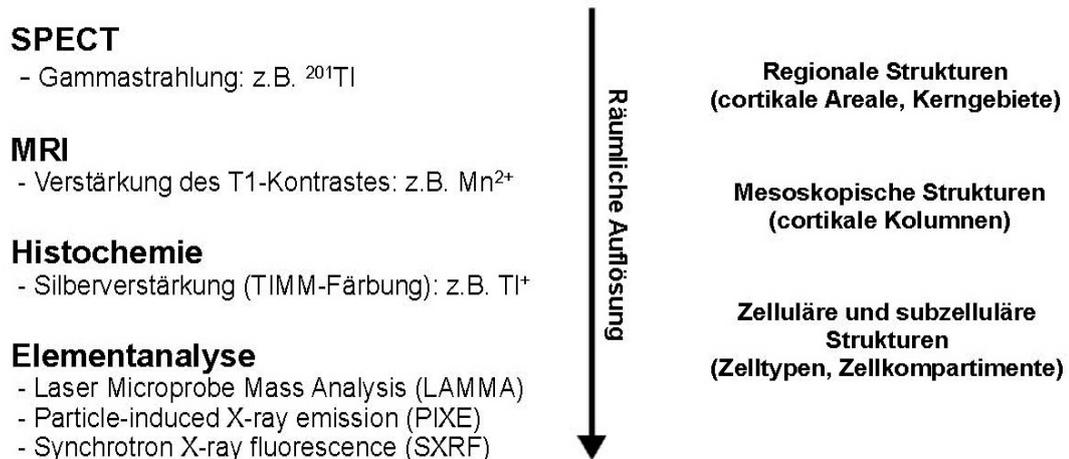


Abb. 1.3: Schema zur Veranschaulichung verschiedener Detektionsmethoden von Schwermetallen in biologischen Proben. Für Details siehe Text.

1.2.1 SPECT

Die Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie (SPECT: *single photon emission computed tomography*) ist ein funktionell bildgebendes Verfahren und neben der Szintigrafie eines der wichtigsten Werkzeuge der nuklearmedizinischen Diagnostik. Es beruht auf der Detektion von emittierten Gammaquanten und findet Anwendung bei der Untersuchung von Herzmuskel-, Knochen-, Hirn- und Tumorgewebe (Beller, 1994; Wenning u. a., 1998; Freyschmidt und Galanski, 2003; Sundin u. a., 2007; Van Paesschen u. a., 2007). Tl^+ z. B. wird von vitalen Herzmuskelzellen über die Na/K-ATPase aufgenommen, weshalb das Isotop ^{201}Tl neben Technetium (^{99m}Tc) seit Ende der 1970er Jahre in großem Umfang für myokardiale Durchblutungsmessungen zum Einsatz kommt (Beller, 1994; Patel und Beller, 2006), wobei ^{201}Tl nach wie vor den Goldstandard bei der Infarkt-diagnostik darstellt (Pagnanelli und Basso, 2010).

Weiterhin werden verschiedene SPECT-Tracer zur Untersuchung des cerebralen Blutflusses herangezogen, wobei die räumliche Auflösung im Humanbereich bei 4 - 6 mm liegt, was z. B. die Lokalisation epileptischer Foki ermöglicht (Abb. 1.4A). Im Kleintierbereich hingegen werden mittlerweile Auflösungen von ca. 500 μm erreicht, da hier, im Gegensatz zu den standardmäßig in Human-SPECT Scannern verwendeten Parallelloch-Kollimatorblenden, sogenannte Multipinhole-Kollimatoren zum Einsatz kommen, welche eine stärkere Vergrößerung des projizierten Bildes und somit eine höhere räumliche Auflösung ermöglichen (Beekman und van der Have, 2007). Diese technischen Voraussetzungen erlauben funktionelle Analysen auf der Ebene anatomisch abgrenzbarer Hirnnuklei *in vivo* (Abb. 1.4B), wobei es möglich ist den Tracer außerhalb des Scanners während eines bestimmten Verhaltens des Tieres zu injizieren und dann anschließend die aktivitätsabhängige Verteilung von ^{201}Tl oder ^{99m}Tc -Hexamethyl-

Propylen-Amin-Oxim ($^{99m}\text{TcHMPAO}$) im anästhesierten Tier zu messen (Neubert u. a., 2011). In der experimentellen Schlaganfallforschung eröffnet die ^{201}Tl -Kleintier-SPECT Bildgebung neue diagnostische Möglichkeiten in Hinblick auf die Bewertung der Viabilität des Gewebes, sowie bezüglich der Wachstumsdynamik des Infarktareals nach fokaler Ischämie *in vivo* (Goldschmidt u. a., 2009).

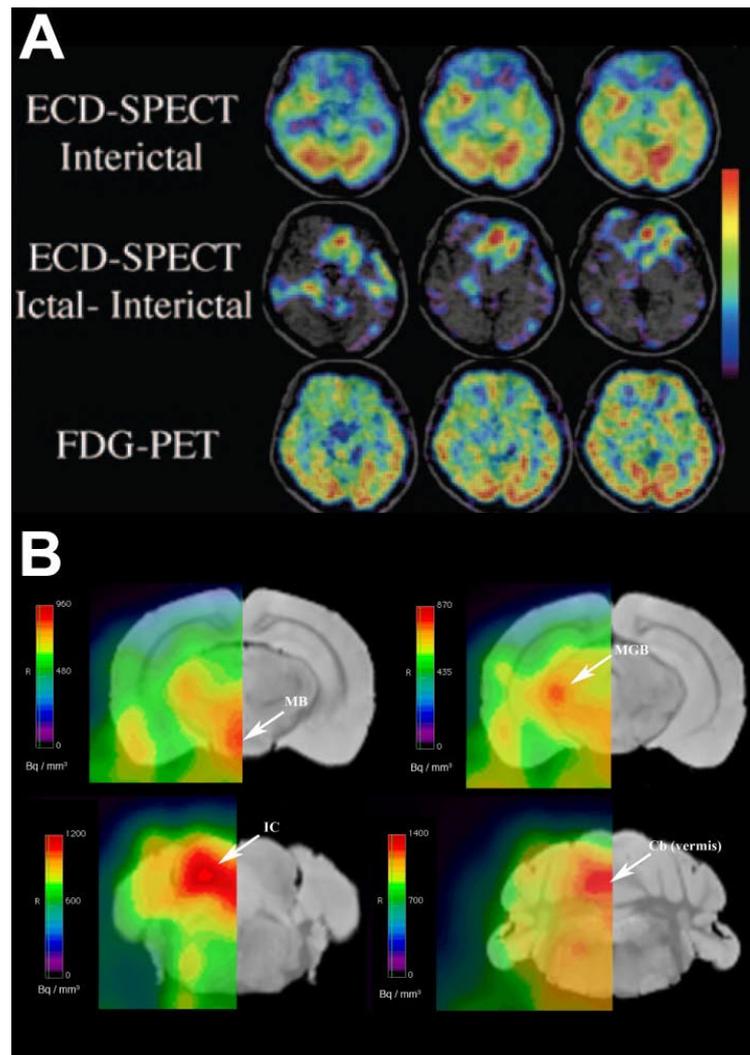


Abb. 1.4: Cerebrale Blutflussmessungen mittels Human- (A) und Kleintier- (B) SPECT. (A) Identifikation des epileptischen Fokus in einer Patientin mit Frontallappenepilepsie durch Überlagerung von ^{99m}Tc -SPECT- und MRI-Aufnahmen (oben, Mitte). Unten: Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomografie (FDG-PET) Aufnahmen zum Vergleich. Entnommen aus Wintermark u. a. (2005). (B) $^{99m}\text{TcHMPAO}$ Aufnahmen von einer wachen, sich verhaltenden Maus. Gezeigt sind MRI-Aufnahmen (jeweils rechts) und fusionierte SPECT/MRI-Aufnahmen (jeweils links) auf vier verschiedenen rostrokaudalen Ebenen. Man

beachte die erhöhte Traceraufnahme in anatomisch deutlich abgrenzbaren subcortikalen Kernstrukturen (Pfeile), wie dem Mamillarkörper (MB), dem medialen Geniculate (MGB), dem inferioren Colliculus (IC) und dem cerebellären (Cb) vermis. Entnommen aus Neubert u. a. (2011).

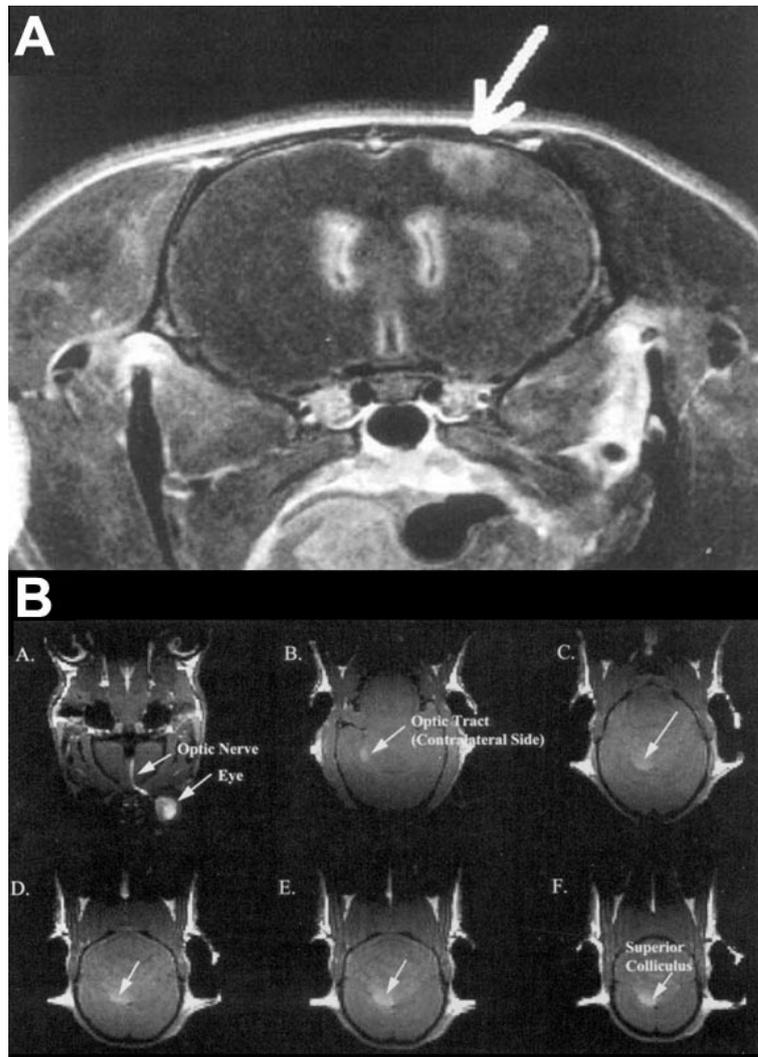
1.2.2 MRI

Die Magnetresonanztomografie (MRI: *Magnetic Resonance Imaging*) ist ein strukturell bildgebendes Verfahren, welches in der Lage ist Gewebe und Organe relativ hochauflösend abzubilden. Hierbei stützt man sich auf das unterschiedliche Relaxationsverhalten, das Wasserstoffprotonen verschiedener Gewebe zeigen, wenn sie innerhalb eines statischen Magnetfeldes mit senkrecht zum statischen Feld ausgerichteten Radiofrequenzpulsen angeregt werden (Lauterbur, 1973). Die Relaxationszeiten T1 und T2 beschreiben dabei die exponentiellen Verläufe der Wiederherstellung der ursprünglich innerhalb des statischen Magnetfeldes vorherrschenden Längsmagnetisierung (T1), bzw. des Abfalls der induzierten Quermagnetisierung der Wasserstoffprotonen (T2). Paramagnetische Metalle, d.h. solche welche die Eigenschaft besitzen sich innerhalb eines externen Magnetfeldes zu magnetisieren, wirken sich, wenn sie in Gewebe eingebracht werden, auf die lokale Feldstärke und somit auf die davon abhängigen Relaxationszeiten des entsprechenden Gewebes aus. Dergestalt sind einige paramagnetische Metallionen, wie z. B. Mn^{2+} , Chrom (Cr^{+}) oder Gadolinium (Gd^{+}) seit geraumer Zeit als signalintensitätsverstärkende MRI-Kontrastmittel bekannt (Mendonça-Dias u. a., 1983).

Neben ihrer Eigenschaft den T1-Kontrast positiv zu beeinflussen, besitzen divalente Manganionen die oben beschriebenen Qualitäten als Calciumanaloga (siehe Abschnitt 1.1.4), eine Kombination, die man sich bei der Mangan-verstärkten Magnetresonanztomografie (MEMRI: *Manganese-enhanced magnetic resonance imaging*) zunutze macht (Silva u. a., 2004; Silva, 2012). Die aktivitätsabhängige neuronale Aufnahme von Mn^{2+} führt demzufolge zu einer proportional höheren Verstärkung des T1-Kontrastes in Hirnregionen, die während der Manganexposition besonders aktiv waren, wie Lin und Ko-

retsky (1997) mittels elektrischer und pharmakologischer Stimulation von Rattenhirnen in der Lage waren zu zeigen (Abb. 1.5A). Seitdem hat eine Vielzahl unterschiedlicher Arbeitsgruppen MEMRI zur Untersuchung neuronaler Aktivitätsmuster am Nagermodell etabliert, wobei verschiedene pharmakologische und sensorische Stimulationsparadigmen berücksichtigt wurden (Duong u. a., 2000; Brozoski u. a., 2007; Lu u. a., 2007; Weng u. a., 2007; Eschenko u. a., 2010; Fa u. a., 2010). Aufgrund der Tatsache das Mn^{2+} nach der Aufnahme in Nervenzellen anterograd entlang axonaler Trakte transportiert wird (Sloot und Gramsbergen, 1994; Takeda u. a., 1998), stellt MEMRI auch ein attraktives Verfahren für das Tracen neuronaler Verbindungen *in vivo* dar (Abb. 1.5B) (Pautler u. a., 1998; Leergaard u. a., 2003; Murayama u. a., 2006; Chuang u. a., 2009; Tucciarone u. a., 2009). Die räumliche Auflösung dieser Methode erreicht, je nach Leistungsfähigkeit des MRI-Scanners und der Messzeit, unter 100 μm (Silva u. a., 2004) und liegt damit im Bereich dessen was standardmäßig bei der 2-Desoxyglucose (2-DG)-Autoradiografie erreicht wird (Sokoloff u. a., 1977). Die Nachteile der MEMRI liegen allerdings in der schlechten Bluthirnschrankengängigkeit des Mangans (Murphy u. a., 1991), was eine invasive Öffnung der BHS bedingt (Lin und Koretsky, 1997) oder lange Stimulationszeiten von bis zu 24 h (Yu u. a., 2005) und eine durch hohe Applikationsdosen bedingte Toxizität nach sich zieht (Wolf und Baum, 1983; Crossgrove und Zheng, 2004).

Abb. 1.5: Detektion stimulationsinduzierter neuronaler Aktivität (A) und Markierung neuronaler Trakte (B) mittels MEMRI. (A) T1-gewichtetes MRI-Signal nach Applikation von Manganchlorid ($MnCl_2$) unter elektrischer Stimulation der linken Vorderpfote einer Ratte. Der Pfeil indiziert die Signalverstärkung im kontralateralen somatosensorischen Cortex. Entnommen aus Lin und Koretsky (1997). (B) Sequenz mehrerer T1-gewichteter MRI-Bilder in der Horizontalebene 24 h nach unilateraler Injektion von $MnCl_2$ in ein Auge einer Maus. Man beachte den erhöhten Kontrast im Auge und im optischen Nerv auf der Seite der Applikation (oben links), sowie im superioren Colliculus kontralateral zur Injektion (unten). Entnommen aus Pautler u. a. (1998).



1.2.3 Elementanalyse

Mit physikalischen Messverfahren wie der massenspektrometrischen Analyse (LAMMA: *Laser microprobe mass analysis*), der Partikel-induzierten Röntgenemission (PIXE: *Particle-induced X-ray emission*) oder der Synchrotron-Röntgenfluoreszenz (SXRF: *Synchrotron X-ray fluorescence*) lässt sich auf direktem Wege der Gehalt verschiedener Metallionen in biologischen Proben bestimmen. Bei der LAMMA wird die Probe, z. B. ein entsprechend präparierter Hirngewebsschnitt, in eine Vakuumkammer überführt, wo sie mittels eines Hochleistungslaserpulses verdampft, ionisiert und anschließend massenspektrometrisch aufgetrennt wird (Abb. 1.6A) (Verbueken u. a., 1985). Die Detektion mittels PIXE und SXRF basiert darauf, dass die Probe durch einen hochenergetischen

Ionenstrahl bzw. hochenergetische Röntgenstrahlung angeregt wird, was ein jeweils elementspezifisches Röntgenemissions- bzw. Röntgenfluoreszenzspektrum zur Folge hat, welches die Zuordnung der im Präparat befindlichen Atome erlaubt (Ortega u. a., 2009b). Sämtliche Verfahren zeichnen sich durch extrem hohe räumliche Auflösung ($< 1 \mu\text{m}$) und Sensitivität aus (Ortega u. a., 2009b), wobei die Detektionsgrenze für Teilchenmengen bei der LAMMA im parts per million Bereich liegt (Verbueken u. a., 1985). PIXE und SXRF haben den Vorteil, dass es sich bei beiden um nicht-destruktive Verfahren handelt, wobei jedoch nur die verhältnismäßig große Penetrationstiefe der hochenergetischen Röntgenstrahlung beim SXRF-Verfahren es erlaubt, 3D-Rekonstruktionen von *in vitro*- und *in vivo*-Präparaten zu erstellen (Carmona u. a., 2008; Korbas u. a., 2008).

Die elementanalytische Bildgebung ist seit geraumer Zeit ein wichtiges Werkzeug im biowissenschaftlichen Kontext und wird vor allem zur Charakterisierung der intrazellulären Distribution und der Quantifizierung physiologischer Kationen (Orsulakova u. a., 1982; Schröder und Fain, 1984; Moretto u. a., 1993), von Schwermetallen (Schmidt u. a., 1985; Nakazato u. a., 2008; Ortega u. a., 2009a), sowie von Nanopartikeln (Bussy u. a., 2008; Thurn u. a., 2009) eingesetzt, was unter anderem bei der Erprobung von Zytostatika (Larsen u. a., 2000), sowie in der Ätiologieforschung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer (Rajendran u. a., 2009) und Parkinson (Abb. 1.6B) von Bedeutung ist. Unter Einsatz des Synchrotron-Röntgenfluoreszenzverfahrens gelang es Korbas und Kollegen (2008), die Verteilung von Quecksilber (Hg) in Methylquecksilber exponierten Zebrafischlarven mit $10 \mu\text{m}$ Auflösung zu bestimmen (Abb. 1.6C).

Da elementanalytische Nachweisverfahren jedoch einen zum Teil nicht unerheblichen apparativen Aufwand implizieren, sind der routinemäßigen Applikation im Labor momentan noch gewisse Praktikabilitätsgrenzen gesetzt.

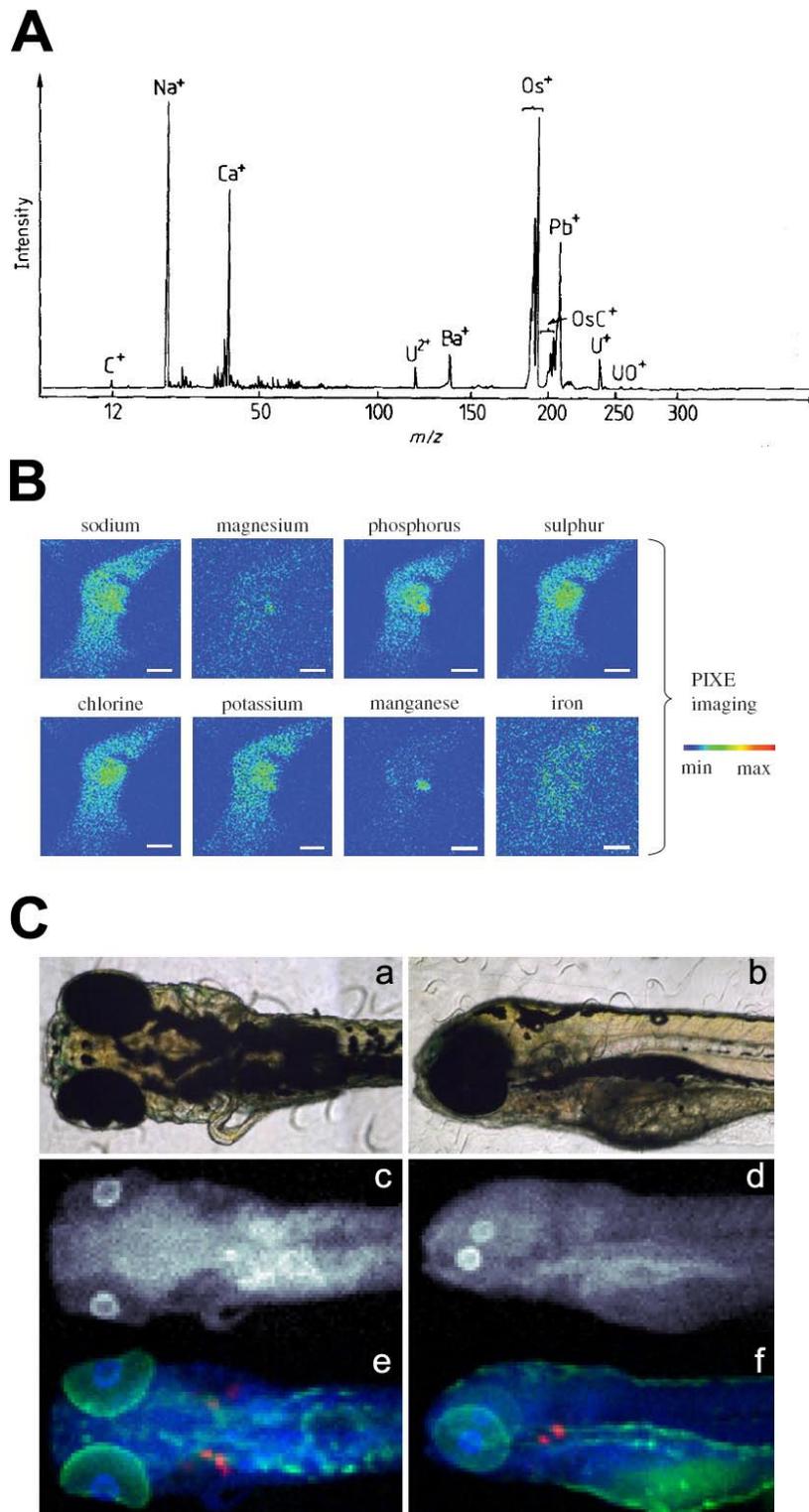


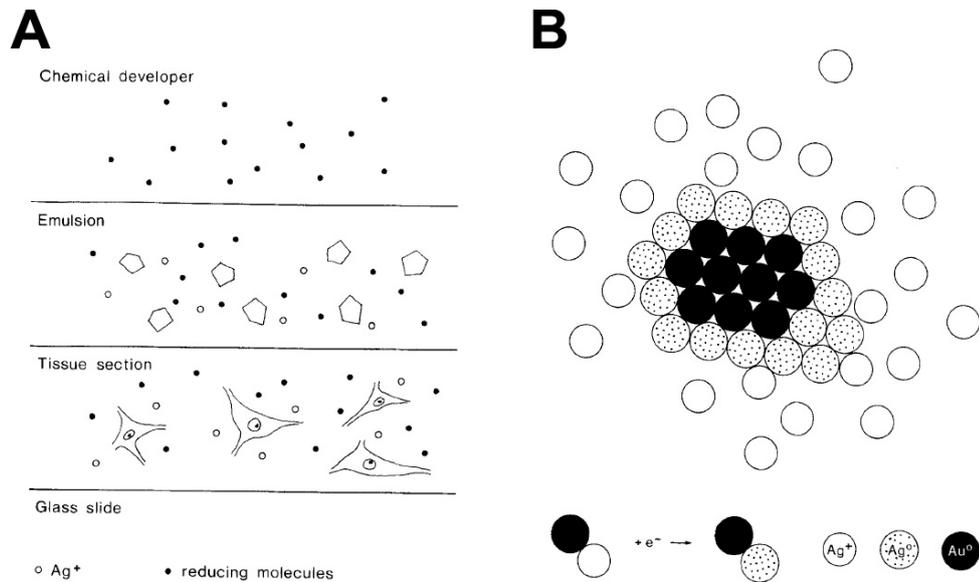
Abb. 1.6: Beispiele für die Detektion von Metallionen mit elementanalytischen Verfahren. (A) LAMMA-Massenspektrum eines für Elektronenmikroskopie aufbereiteten Dünnschnittes der Retina einer Kuh. Entnommen aus Verbueken u. a. (1985). (B) PIXE-Aufnahmen einer einzelnen PC12 Zelle nach $MnCl_2$ -Exposition. Man sieht dass Mangan innerhalb perinuklearer Regionen akkumuliert und mit Magnesium kolokalisiert ist. Verändert nach Ortega u. a. (2009b). (C) Röntgenfluoreszenzaufnahmen einer lebenden Zebrafischlarve nach 24-stündiger Behandlung mit Methylquecksilber. Zu sehen sind dorsale (a, c, e) und

laterale (b, d, f) Ansichten fotografischer Aufnahmen der Larve (a, b), sowie von 10 µm-Röntgenfluoreszenzaufnahmen von Hg allein (c, d) bzw. von Hg (blau) in Kolokalisation mit Zink (grün) und Ca (rot) (e, f). Verändert nach Korbas u. a. (2008).

1.2.4 Histochemie

Eine Standardtechnik für den histochemischen Nachweis von Metallionen stellt das von Friedrich Timm in Göttingen entwickelte Sulfid-Silberverfahren dar. Dabei werden Metallionen in wässriger Lösung mit Sulfid-Anionen (S^{2-}) ausgefällt und anschließend die Orte der dabei entstehenden wasserunlöslichen Metall-Sulfid Kristalle über eine Nachversilberung, ähnlich der physikalischen Entwicklung in der Fotografie, lichtmikroskopisch visualisiert (Timm, 1958). Diese Methode wurde später von Gorm Danscher weiterentwickelt (Danscher, 1981) und seitdem unter anderem zum Nachweis toxischer exogener Metalle, endogenen Zinks, sowie zur Visualisierung metallischer Marker von Proteinkomplexen und Enzymen verwendet (Danscher, 1991). Danscher prägte den Begriff *Autometallografie* (AMG) für diesen Prozess, da es sich im Kern um eine autokatalytische Reaktion handelt, bei der bereits vorhandene Metalle oder Metallkomplexe als Keim für die Reduktion von Silberionen (Ag^+) zu elementarem Silber fungieren (Abb. 1.7).

Abb. 1.7: Grundprinzip der Autometallografie (AMG). (A) Der auf einem Objektträger befindliche Gewebsschnitt wird von einer Silberbromid- bzw. Silbernitrat-haltigen Emulsionsschicht bedeckt. Die chemische Entwicklerlösung, welche ein Schutzkolloid in Kombination mit einem Reduktionsmittel enthält, dringt langsam durch die Emulsionsschicht ins Gewebe vor, wobei Silberionen (Ag^+) mit in die Gewebeprobe gelangen. Befinden sich im Gewebe bereits Metalle oder Metallkomplexe, so wirken diese als Katalysator für die in B veranschaulichte Silberverstärkung. (B) Schematische Darstellung der Silberverstärkung elementaren Goldes (Au^0). Einige wenige Goldatome wirken im Beisein eines Elektronendonators als Reduktionskeim für die Umwandlung von Ag^+ zu elementarem Silber (Ag^0). Ist das Gold im Zuge dieser Reaktion schließlich von einer Silberhülle umgeben, so wirkt dieses wiederum als Reduktionskeim für die Umwandlung von Ag^+ zu Ag^0 . Entnommen aus Danscher (1984).



Jürgen Goldschmidt u. a. haben dann 2004 die autometallografische Methode dergestalt angepasst, dass sie in der Lage waren über den selektiven Nachweis von Thalliumsulfid (Tl₂S)-Kristallen neuronale Aktivitätsmuster hochauflösend abzubilden. Sie applizierten mongolischen Wüstenrennmäusen gelöstes Thallium(I)acetat (TlAc), während die Tiere akustisch stimuliert wurden. Aufgrund seines bereits beschriebenen kaliumanalogen Verhaltens wird Tl⁺ gemäß der in Abschnitt 1.1.3 ausgeführten Mechanismen von aktiven Nervenzellen vermehrt aufgenommen und kann anschließend über eine transkardiale Perfusion mit Schwefelwasserstoff (H₂S) *in situ* fixiert werden. Um das dabei entstehende Tl₂S spezifisch nachweisen zu können bedurfte es eines Weges, das ebenfalls - in Form von Zinksulfid (ZnS) - präzipitierte endogene Zink (Zn) auszuwaschen. Hierzu machten sich Goldschmidt und Kollegen ein Verfahren zu Nutze, das bereits von Sir William Crookes (1862) bei der erstmaligen Isolation von Thallium angewandt wurde und auf folgendem Prinzip basiert: Nach dem Pearsonschen Konzept der harten und weichen Säuren und Basen (HSAB: *Hard and Soft Acids and Bases*), sind Verbindungen aus relativ weichen Säuren (Tl⁺) und Basen (S²⁻) unlöslicher, als Verbindungen aus vergleichsweise härteren Säuren (Zn²⁺) und weichen Basen, wobei sich die Begriffe „hart“ und „weich“ jeweils auf das Verhältnis von Ladung zu Teilchenradius bzw.

die Polarisierbarkeit der Verbindungen beziehen (Pearson, 1963, 2005). Wie folgt lassen sich ZnS-Kristalle durch Inkubation der Hirnschnitte in Salzsäure lösen (siehe dazu auch Stoltenberg und Danscher (2000)), während Tl_2S -Kristalle erhalten bleiben, wodurch es Goldschmidt u. a. gelang stimulationsinduzierte tonotopie Banden im auditorischen Cortex autometallografisch nachzuweisen (Abb. 1.8).

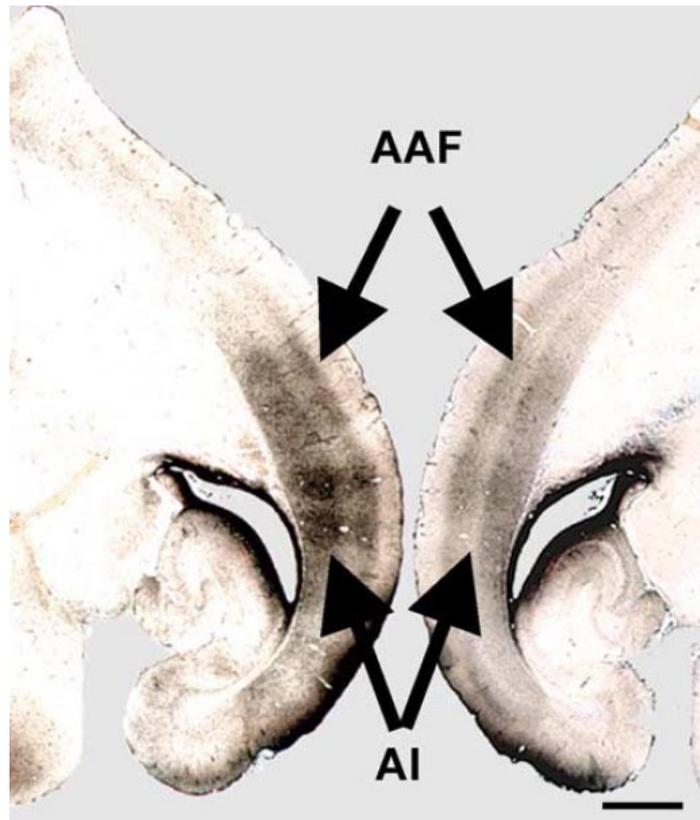


Abb. 1.8: Detektion stimulationsinduzierter räumlicher Muster im Hörcortex von mongolischen Wüstenrennmäusen mit dem Tl^+ -autometallografischen Verfahren. Links ein Horizontalschnitt eines Tieres welches 15 min lang mit alternierenden Reintönen (1 und 8 kHz) stimuliert wurde, rechts ein entsprechender Schnitt eines unstimulierten Kontrolltieres. Deutlich zu sehen sind zwei scharf abgrenzbare tonotopie Banden im primären Hörcortex (AI) des stimulierten Tieres. Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2004).

Charakterisierung neuronaler Aktivitätsmuster mit der Thallium-Autometallografie

Eine Stärke der Thalliumautometallografie (TIAMG) liegt in der zellulären Auflösung der Methode, denn die anatomische Komplexität des Neocortex (Abb. 1.9A), mit im Schnitt

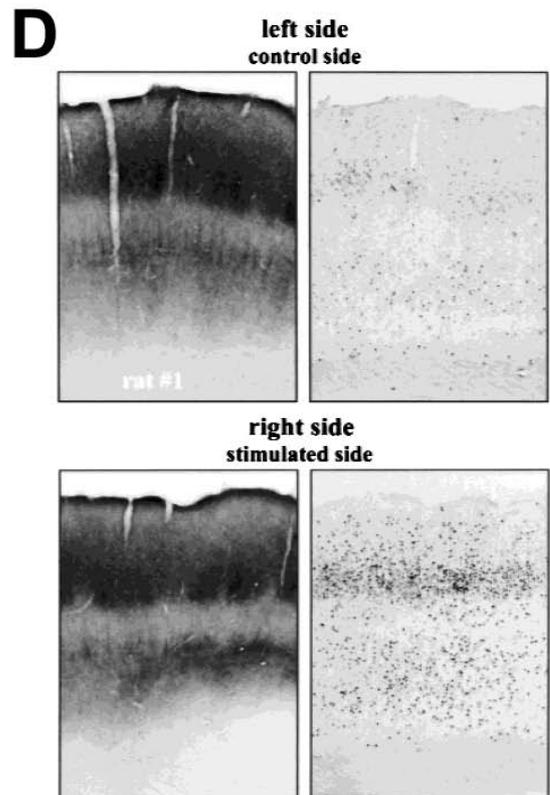
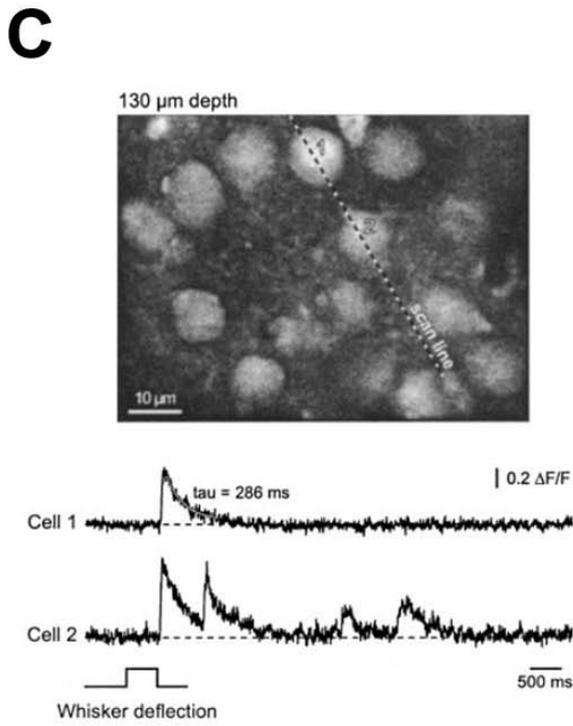
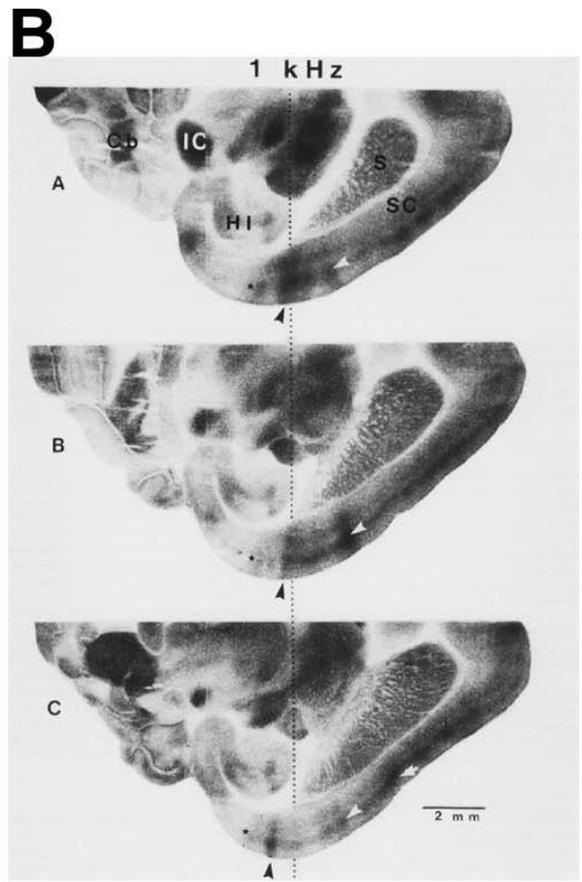
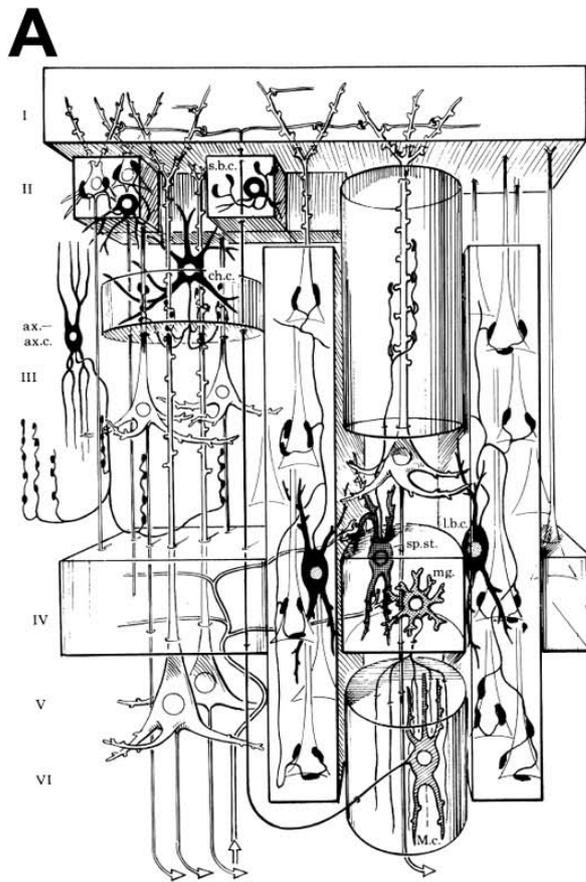
40000 Neuronen, über 3 Kilometern an Axonen und 8×10^8 Synapsen in einem Kubikmillimeter Gewebe (Abeles, 1991), gebietet es, eine möglichst hohe räumliche Auflösung bei neuronalen Bildgebungsverfahren anzustreben. Die von Louis Sokoloff entwickelte [^{14}C]-2-Desoxyglucose (2-DG) Technik z. B., welche seit Jahrzehnten zur Visualisierung cerebraler Aktivitätsmuster eingesetzt wird (Abb. 1.9B), erlaubt eine quantitativ präzise Bestimmung der globalen und arealspezifischen Glucose Verstoffwechslung im Gehirn (Sokoloff u. a., 1977), allerdings ist es standardmäßig nicht möglich, metabolische Aktivität auf Einzelzellebene nachzuvollziehen, was hauptsächlich der Diffusibilität des Tracers geschuldet ist (Duncan und Stumpf, 1991).

Optische Methoden vermögen zwar vermittels des Einsatzes calciumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe in Kombination mit 2-Photonen Mikroskopie, zelluläre Aktivierungsmuster zeitlich präzise abzubilden (Abb. 1.9C) (Göbel und Helmchen, 2007), jedoch sind dieser Methode sowohl in Bezug auf die Anzahl der markierbaren Neurone, als auch in der Penetrationstiefe Grenzen gesetzt, welche es nicht erlauben systematisch neuronale Aktivitätsmuster über alle Schichten des Neocortex hinweg auszuwerten. Zudem ist diese Art der Bildgebung extrem empfindlich gegenüber Bewegungsartefakten was die Anwendbarkeit bei sich verhaltenden Tieren zumindest erheblich erschwert (Helmchen u. a., 2001).

Die Expressionsmuster von *Immediate early genes* (IEGs), wie c-Fos oder zif 268, bieten die Möglichkeit, indirekt neuronale Aktivität mit Einzellaufklärung auf der Ebene großer Neuronenpopulationen zu visualisieren (Abb. 1.9D), noch dazu in frei beweglichen Tieren (Sagar u. a., 1988; Kaczmarek u. a., 1999). Gleichwohl werden IEGs überhaupt nur in bestimmten Subpopulationen von Nervenzellen exprimiert, was zudem zusätzlich durch andere Faktoren als dem Aktivitätsniveau der Nervenzellen konfundiert wird. So ist die Induktion dieser Transkripte und Proteine zum einen vom Nervenzelltyp abhängig und zum anderen nur bedingt geeignet um chronisch aktive Zellen zu markie-

ren (Kovács, 2008). Hinzu kommt, dass die Messung gradueller Unterschiede in der Aktivierung mit IEGs problematisch ist.

Vor diesem Hintergrund ist mit der TIAMG erstmals eine Methode vorhanden, welche es ermöglicht neuronale Aktivierungsmuster im ganzen Gehirn mit zellulärer Auflösung zu visualisieren (Abb. 1.9E und F). Jedoch barg auch diese Technik in der Form des von Goldschmidt u. a. 2004 veröffentlichten Protokolls einige Nachteile. Zum einen stellte die intraperitoneale (i.p.) Injektion des Tracers einen erheblichen Stör- bzw. Stressfaktor für die Tiere dar, welcher besonders bei Verhaltensversuchen oder bei Messungen des metabolischen Grundzustandes beachtet werden musste (Lison, 2006). Dieser Umstand konnte von mir im Zuge meiner Diplomarbeit durch Etablierung eines intravenösen (i.v.) Applikationsprotokolls behoben werden (Wanger, 2007). Ein weiteres schwerwiegendes Problem im Protokoll von Goldschmidt und Kollegen stellte sich in Form der schlechten Bluthirnschrankengängigkeit gelöster Thalliumionen, wodurch man entweder höhere Applikationsdosen oder längere Stimulationszeiten (15 min) in Kauf nehmen musste. Zudem traten Diffusionsgradienten dort auf, wo die Bluthirnschranke (BHS) durchlässiger ist bzw. in Form der Blut-Liquor Schranke (BLS) um den *Plexus choroideus* herum existiert. Dieses Problem, ein entsprechender Lösungsansatz, sowie die damit einhergehenden offenen Fragen sollen nun Thema des nächsten und letzten Abschnittes der Einleitung sein.



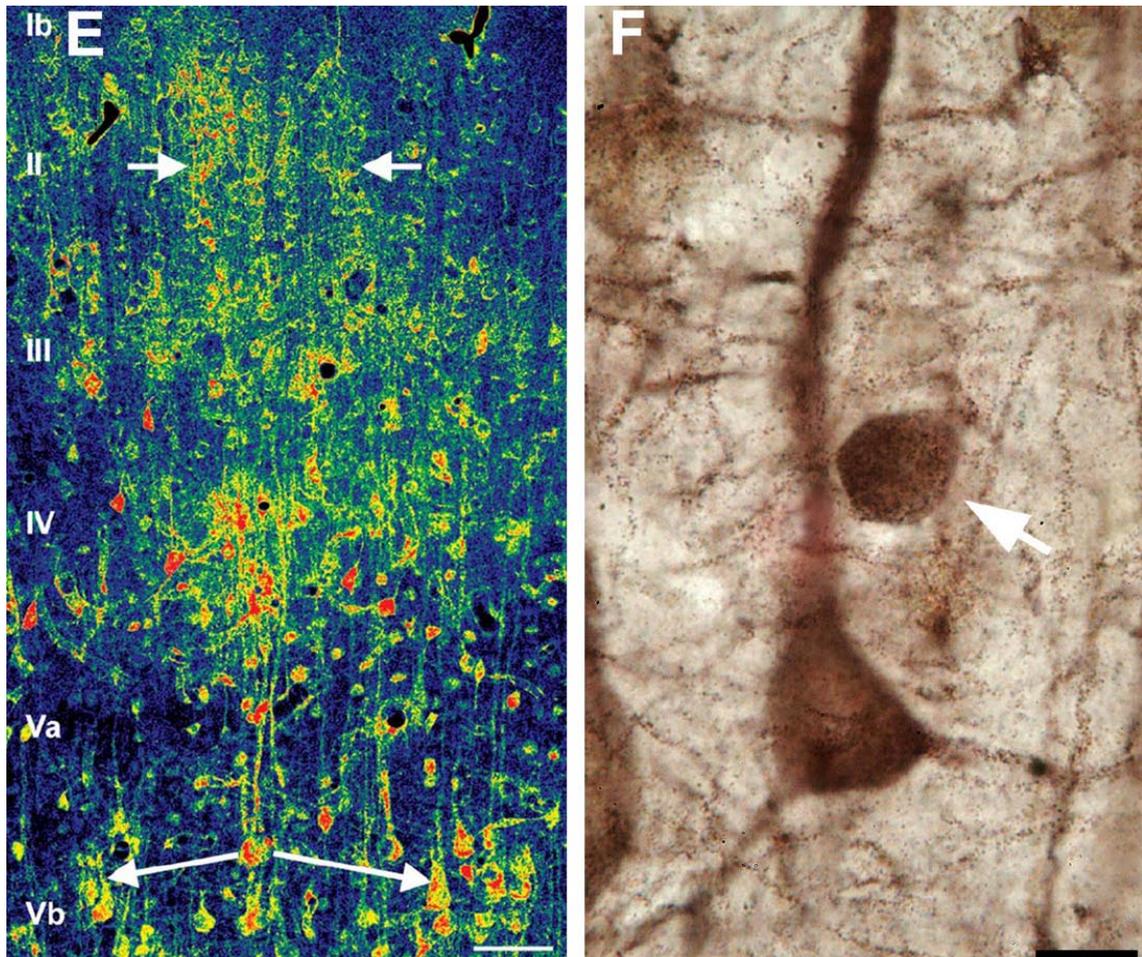


Abb. 1.9: Visualisierung neuronaler Aktivierungsmuster mit unterschiedlichen Methoden. (A) Schematische Darstellung eines funktionell-anatomischen, kolumnären Moduls des Neocortex. Man beachte die Komplexität der Verschaltungsmuster. Entnommen aus Szentágothai (1978). (B) 2-DG-Autoradiografien von Horizontalschnitten der rechten Hemisphäre des Hirns einer, mit frequenzmodulierten Tönen im 1 kHz Bereich stimulierten, mongolischen Wüstenrennmaus, auf drei unterschiedlichen dorso-ventralen Ebenen des primären auditorischen Cortex. Die Pfeile indizieren stimulationsinduzierte Bereiche erhöhter Glucoseverstoffwechslung. Entnommen aus Scheich u. a. (1993). (C) *In vivo*-Aufnahme von durch Tasthaarstimulation ausgelösten Calciumströmen in Neuronen des corticalen Tasthaarfeldes einer anästhesierten jungen Maus mittels 2-Photonenmikroskopie (unten). Oben: Detailaufnahme der mit dem Ca^{2+} -Indikatorfarbstoff beladenen Zellen aus den supragranulären Schichten des Tasthaarcortex. Verändert nach Stosiek u. a. (2003). (D) Expressionsmuster des c-Fos Proteins im Tasthaarcortex einer Ratte 2 h nach unilateraler Stimulation der Tasthaare (jeweils rechts). Links: Cytochrom-Oxidase Färbung zum Vergleich. Verändert nach Filipkowski u. a. (2000). (E) Falschfarbenbild der TI^+ -Aufnahme innerhalb eines kolumnären corticalen Moduls aus dem Hörcortex einer mongolischen Wüstenrennmaus nach 8 kHz Reintonstimulation. Skalierungsbalken 50 μm . Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2004). (F) Detailbild der TI^+ -Aufnahme eines

Schicht V Pyramidenneurons sowie eines mutmaßlichen Interneurons (Pfeil) aus dem primären Hörcortex einer schlafenden Ratte. Skalierungsbalken 10 µm. Verändert nach Wanger (2007).

1.3 Lipophile Metallkomplexe und Tracerkinetik

1.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts experimentierte der deutsche Bakteriologe Paul Ehrlich im Rahmen seiner Untersuchungen zur Sauerstoffsättigung verschiedener Gewebe mit i.v. Injektionen verschiedener Farbstoffe in den Blutkreislauf von Ratten. Dabei stellte er fest, dass sich alle Organe mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks in unterschiedlichem Ausmaß anfärben ließen (Ehrlich, 1885), was er fälschlicherweise dahingehend interpretierte, dass ZNS-Gewebe eine geringe Affinität in Bezug auf die verwendeten Farbstoffe haben. Edwin Ellen Goldmann, ein Schüler Ehrlich's, konnte diese These später mit Injektionen von Trypanblau in die Rückenmarksflüssigkeit von Kaninchen und Hunden widerlegen. So fand Goldmann nämlich das ZNS-Parenchym angefärbt, während andere Gewebe sämtlich ungefärbt blieben (Goldmann, 1913), was stattdessen die Existenz einer für die applizierten Farbstoffe nicht zu durchdringenden Barriere zwischen dem kardiovaskulären System und dem ZNS als Erklärung für die beobachteten Phänomene nahe legte.

Diese Barriere, für welche der Berliner Neurologe Max Heinrich Lewandowsky den Begriff *Blut-Hirn-Schranke* (BHS) prägte (Lewandowsky, 1900), stellte sich später als eine spezialisierte Struktur, bestehend aus außerordentlich dicht gepackten Endothelzellen heraus, welche über gesonderte Zellkontakte, die sogenannten *Tight Junctions*, verbunden sind (Reese und Karnovsky, 1967; Brightman und Reese, 1969) und auf diese Weise die meisten Substanzen an der freien Diffusion in das Hirngewebe hindern (Abb. 1.10).

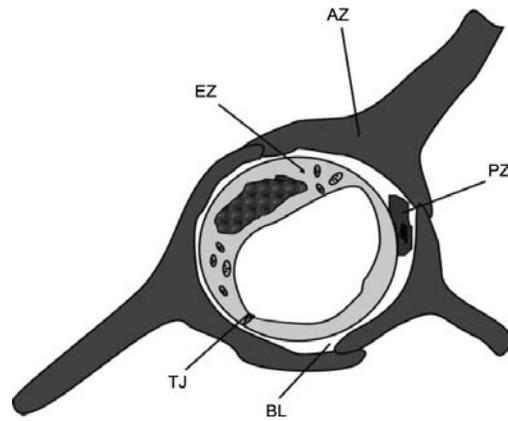


Abb. 1.10: Schematischer Querschnitt einer Hirnkapillare. Die Peripherie des kapillaren Lumens wird von einer einzelnen Endothelzelle (EZ) komplett umschlossen, deren angrenzende Membranen über Tight junctions (TJ) verbunden sind. Auf der abluminalen Oberfläche der EZ befinden sich Perizyten (PZ). Beide Zelltypen werden von der Basallamina (BL) umschlossen, an welche sich die Plasmamembran der astrozytären (AZ) Endfüßchen anschließt. Verändert nach Hawkins und Davis (2005).

Eine solcherart restriktive Schrankenfunktion der BHS ist unerlässlich für die homöostatische Integrität des neuronalen Milieus, welches anderenfalls beispielsweise durch Toxine, Blut-pH Schwankungen oder Störungen des Ionenhaushaltes bedroht wäre. Dergestalt stellt die BHS auch eine Diffusionsbarriere für wasserlösliche Stoffe und gelöste Ionen dar, welche nur sehr langsam bzw. über spezialisierte Transportmechanismen in das Hirnparenchym gelangen (Somjen, 2004). Eine Ausnahme bilden hierbei die zirkumventrikulären Organe, was unter anderem mit spezialisierten Funktionen der dort ansässigen Neuronenpopulationen zusammenhängt. Die osmorezeptiven Neurone des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) zum Beispiel, sind an der neuroendokrinen Antwort auf den effektiven osmotischen Druck im Plasma beteiligt (McKinley u. a., 2004).

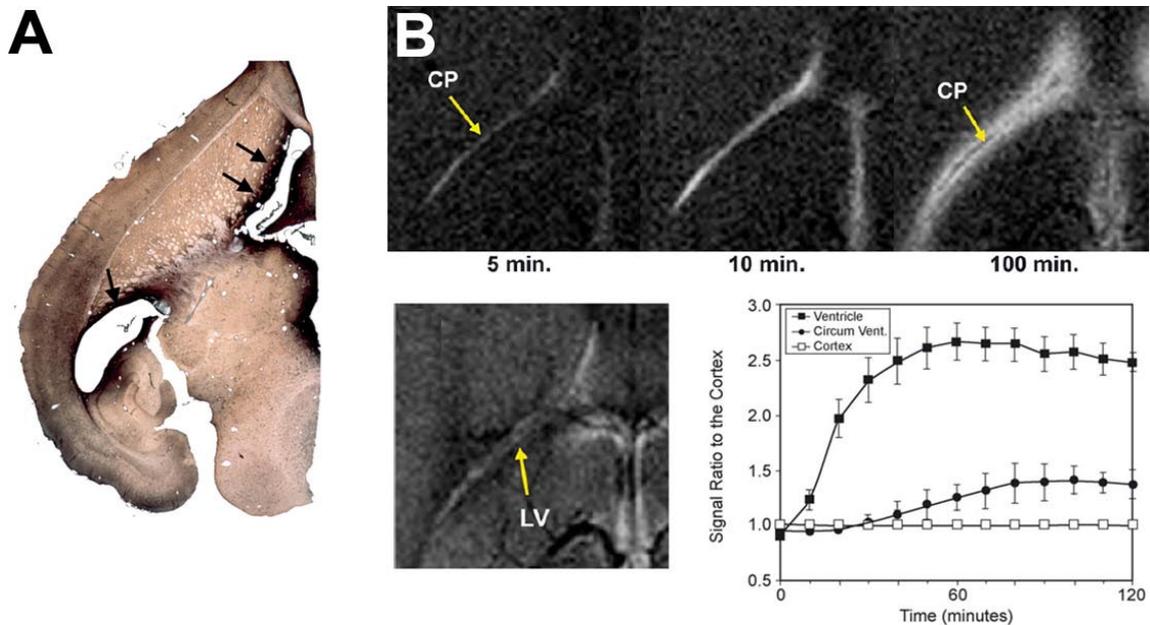
In Hinblick auf die oben beschriebenen bildgebenden Verfahren, bei denen Metallionen zum Einsatz kommen, impliziert die Restriktivität der BHS bezüglich ihrer Ionenpermeabilität zum einen die Notwendigkeit tendenziell höhere Plasmaspiegel bei *in vivo*-Versuchen anzustreben, was in Anbetracht der Toxizität vieler Tracer wie Tl^+ (Melnick u.

a., 1976; Lohmann u. a., 1989) oder Mn^{2+} (Aschner und Aschner, 1991; Crossgrove und Zheng, 2004) eher kontraindiziert im Sinne einer möglichst unkonfundierten Physiologie sein sollte. Zum anderen müssen, vor allem bei der MEMRI, oft unverhältnismäßig lange Stimulationszeiten von über 24 h in Kauf genommen werden (Yu u. a., 2005), was für die meisten funktionellen Paradigma problematisch ist. Bei der TIAMG lassen sich im ZNS detektierbare Mengen des Tracers ungleich schneller erreichen, wobei die 15 min Stimulationszeit des experimentellen Protokolls von Goldschmidt u. a. (2004) nach wie vor zu lang sind, um beispielsweise die funktionelle Neuroanatomie diskreter Schlafphasen in Nagern zu charakterisieren (Wetzel u. a., 2003).

Desweiteren existieren regionale Unterschiede in der Durchlässigkeit der BHS, welche die Interpretation aktivitätsabhängiger Aufnahmemuster potenziell beeinflussen können. So unterscheiden sich z. B. die Transferkoeffizienten für K^+ je nach Hirnregion zum Teil um einen Faktor von 4 bzw. differieren sogar um mehrere Größenordnungen zwischen BHS und BLS (Smith und Rapoport, 1986). Letzteres manifestiert sich in Form auffälliger Diffusionsgradienten in periventrikulären Regionen (Goldschmidt u. a., 2004; Lee u. a., 2005), was die Beschreibung neuronaler Aktivitätsmuster in diesen Regionen erheblich kompliziert (Abb. 1.11).

Abb. 1.11: Verteilungsgradienten von Tl^+ (A) und Mn^{2+} (B) im Nagerhirn nach systemischer Applikation der gelösten Ionen. (A) Visualisierung der Tl^+ -Aufnahme in einem autometallografisch behandelten Horizontalschnitt einer mongolischen Wüstenrennmaus. Auffällig sind massive Färbegradienten in unmittelbarer Nachbarschaft der Ventrikel (Pfeile). Goldschmidt u. a. (unveröffentlicht). (B) Oben: T1-gewichtete MRI-Aufnahmen einer Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten nach systemischer Injektion von $MnCl_2$. Zu sehen sind Details des linken Hirnventrikels. Man beachte, dass eine erhöhte Signalintensität zunächst stark lokalisiert im Bereich des *Plexus choroideus* (CP) des lateralen Ventrikels (LV) vorliegt (5 min). Nach 10 min findet man ein erhöhtes T1-Signal bereits im gesamten Liquorraum des Ventrikels, während zum Zeitpunkt von 100 min nach der Injektion, der Bereich erhöhter Signalintensität auch periventrikuläre Regionen einschließt. Unten links: T2-gewichtete MRI-Aufnahme vor der Injektion von $MnCl_2$ zur Veranschaulichung der Position des lateralen Ventrikels. Unten rechts: Zeitverläufe des normalisierten T1-Signals in den Ventrikeln

(schwarze Quadrate), in periventrikulären Regionen (schwarze Kreise) und im Cortex (weiße Quadrate), innerhalb der ersten 2 h nach $MnCl_2$ Applikation. Wie man sieht, ist die Signalintensität im Zeitraum von 50 min bis 120 min nach der Injektion in periventrikulären Regionen gegenüber dem Cortex erhöht. Verändert nach Aoki u. a. (2004).



1.3.2 Lipophile Metallkomplexe

Dementsprechend stellt die BHS ein zentrales Problem in der Bildgebung mit Metallionen dar. Eine Möglichkeit dieses Problem anzugehen, besteht in der i.v. Applikation einer hypertonen Mannitol-Lösung, welche einen osmotischen Schock induziert und solchermaßen ein Schrumpfen der Endothelzellen veranlasst, was wiederum die Permeabilität der BHS massiv erhöht (Ashani u. a., 1981; Norman u. a., 1991). Dieser Ansatz wird routinemäßig in der MEMRI verwendet (Lin und Koretsky, 1997; Duong u. a., 2000), birgt jedoch aufgrund seiner Invasivität einige Nachteile, wie z. B. die Risiken von Hirnödemen, Mikroinfarkten oder eventueller Inhomogenitäten bei der Öffnung der BHS (Mylius, 2007). Zudem wird die dafür notwendige Operation zur Implantation eines intraarteriellen Katheters in der Regel unilateral durchgeführt, weshalb Aussagen über die Verteilung des Tracers nur für eine Hirnhemisphäre getroffen werden können.

Eine wesentlich elegantere Art, die BHS zu umgehen liegt deshalb in der Applikation der Tracer in Form lipophiler Komplexe. Lipophile, fettlösliche Substanzen können relativ ungehindert durch die Lipiddoppelschicht der Endothelzellen diffundieren, weshalb unter anderem viele Anästhetika oder Ethanol die BHS problemlos passieren können (Somjen, 2004). Chelatbildner die sich für diese Zwecke eignen, lassen sich aus der funktionellen Gruppe der Dithiocarbamate rekrutieren. Natrium-Diethyldithiocarbamat (DDC) beispielsweise, bildet mit verschiedenen mono- und divalenten Kationen einen unpolaren lipophilen Komplex (Abb. 1.12), welcher unschwer vom Plasma ins Hirn gelangt und dann dort verbleibt (Gale u. a., 1983; Oskarsson, 1984; de Bruine u. a., 1985; Ballinger u. a., 1987; Allain und Krari, 1993). So wurde zum Beispiel die Verbindung ^{201}Tl -Diethyldithiocarbamat (TIDDC) Mitte der 1980er Jahre als cerebraler Blutflussmarker bei Human-SPECT Messungen eingesetzt, da sie bereits nach 90 s ihre maximale Konzentration im Hirn erreicht, welche anschließend für mindestens 2 h annähernd konstant bleibt (de Bruine u. a., 1985).

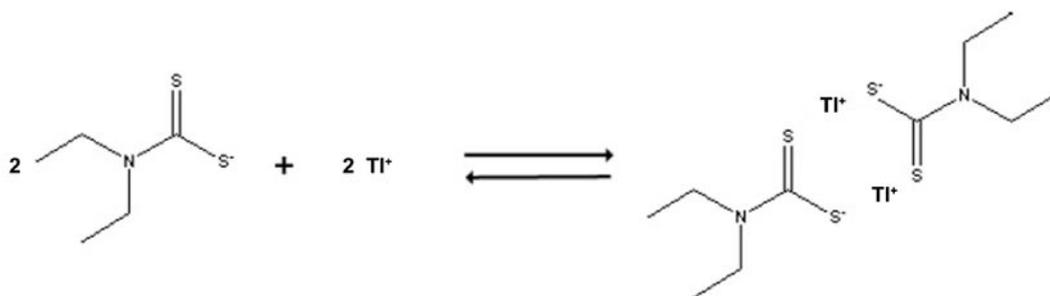


Abb. 1.12: Beispiel für einen lipophilen Metallkomplex aus DDC (links) und freien Tl^+ -Ionen. Die Partialladungen der Dithiocarbamate werden im Zuge der Komplexbildung abgeschirmt, es bildet sich ein unpolarer, lipophiler Komplex (TIDDC). Die reversible Reaktion erfolgt nach einer 1:1 Stöchiometrie. Verändert nach Lison (2006).

Die Akkumulation dieser Kation-DDC-Komplexe im Gehirn deutet darauf hin, dass sie während oder nach dem Passieren der BHS dissoziieren, da sie anderenfalls ungehindert aus dem Hirnparenchym heraus diffundieren würden. Für eine Methode mit zellulärer Auflösung wie der TIAMG, ist es jedoch äußerst kritisch dass der Komplex dissoziiert

bevor er von Neuronen oder Gliazellen aufgenommen wird, da nur freies, im Extrazellulärraum (EZR) befindliches Tl^+ entsprechend den oben beschriebenen Mechanismen aktivitätsabhängig aufgenommen werden kann. Verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Befunde weisen allerdings auf eine Dissoziation von TIDDC unmittelbar nach Passieren der BHS hin. *In vitro*-Versuche zeigten dass TIDDC einerseits einen hohen Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten hat (de Bruine u. a., 1985), andererseits jedoch in lipophilem Milieu extrem instabil ist (Ballinger u. a., 1987), was dafür spricht, dass der Komplex wahrscheinlich schon nach Durchqueren der luminalen Barriere der Endothelzellmembran zerfällt und anschließend freies Tl^+ über K^+ -Kanäle in der abluminalen Membran in den EZR gelangt. Diese Annahme wird gestützt durch *in vivo*-Experimente, wo im Rahmen von TIAMG-Studien zum metabolischen Grundzustand in wachen Mäusen (Lison, 2006), sowie in wachen und schlafenden Ratten (Wanger, 2007), exemplarisch gezeigt werden konnte, dass nach systemischer Applikation von TIDDC die Tl^+ -Aufnahme auf der zellulären Ebene ausgesprochen heterogen ist, mit zum Teil stark unterschiedlichen Färbemustern in unmittelbar benachbarten Neuronen, was schwerlich durch passive Diffusion des Komplexes in die Zellen erklärt werden kann.

Bisher wurden jedoch keine Experimente durchgeführt in denen systematisch die Eignung des lipophilen Komplexes TIDDC für die Visualisierung cerebraler Aktivierungen getestet wurde. Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurde deshalb zunächst die Tauglichkeit von TIDDC zur Detektion hochaufgelöster neuronaler Aktivitätsmuster mittels verschiedener Stimulationsparadigma getestet und das experimentelle Protokoll an Ratten und mongolischen Wüstenrennmäusen validiert, bevor die Verteilungskinetik des Tracers eingehender analysiert wurde.

1.3.3 Tracerkinetik

Eine oftmals unterschätzte Problematik bei Experimenten mit Metallionen liegt in der Umverteilung vieler Tracer als Funktion der Zeit. Da die Transmembranströme dieser

Ionen bidirektional sind, folgt auf den aktivitätsabhängigen Einstrom in die jeweiligen Neurone ein kontinuierlich anwachsender Ausstrom, solange bis Ein- und Ausstrom im Äquilibrium sind und das Gleichgewichtspotential des Ions entsprechend der vorherrschenden elektrochemischen Triebkräfte erreicht ist (Mullins und Moore, 1960). Zu diesem Zeitpunkt steht die Verteilung des Tracers dann allerdings in keinem direkten Bezug mehr zu aktivitätsassoziierten Membranströmen und -transporten, weshalb es unabdingbar ist, Einsicht in die Kinetik des jeweiligen Tracers zu haben und diese in die Planung der Versuche einzubeziehen.

Yu und Kollegen (2005) beispielsweise, interpretierten in einer an Mäusen durchgeführten MEMRI Studie, räumliche Muster im inferioren Colliculus (IC) nach auditorischer Langzeitstimulation von 24 h, als aktivitätsindizierende Signalverstärkung. In einer Folgestudie an mongolischen Wüstenrennmäusen, bei der neben der MEMRI auch die AMG zum Einsatz kam, konnte Mylius (2007) dagegen keine stimulationsinduzierten Aktivitätsmuster im IC feststellen, was die Frage aufwirft, inwiefern es sich bei den Befunden Yu's und anderen um Fehlinterpretationen nicht-stimulationsbezogener Mn^{2+} -Umverteilungen handelt. Mn^{2+} ist dafür bekannt nach der intrazellulären Aufnahme über spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle zu akkumulieren (Narita u. a., 1990; Pautler u. a., 1998) und anschließend axonal in die Synapsen transportiert zu werden, wo es im Zuge der Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt gelangt und nachfolgend postsynaptisch aufgenommen wird (Takeda u. a., 1998; Pautler u. a., 2003; Pautler, 2004). Diese Eigenschaften als axonaler und transsynaptischer Tracer lassen demnach viel Raum für alternative Interpretationen der Mn^{2+} -Distribution nach langen Stimulationszeiten (Mylius, 2007).

Dieses Beispiel illustriert exemplarisch die essentielle Rolle der Tracerkinetik für die Versuchsplanung, weshalb der zweite Teil dieser Doktorarbeit sich der Beschreibung der Tl^{+} -Verteilung im Nagerhirn, nach systemischer Applikation von TIAc und TIDDC als Funktion der Zeit widmet. Neben qualitativen und quantitativen empirischen Analysen,

wurden auch einfache mathematische Modelle zur Veranschaulichung der zugrundeliegenden biophysikalischen Prinzipien herangezogen.

2 Zielstellung

Wie bereits oben angedeutet verfolgt diese Arbeit primär zwei eigenständige Ziele:

(1) Die aus Voruntersuchungen bekannte mutmaßliche Eignung des lipophilen Komplexes TIDDC zur hochauflösenden Darstellung neuronaler Aktivität mittels der TIAMG, soll unter Einsatz verschiedener Stimulationsparadigmen systematisch am NagermodeLL getestet und validiert werden.

(2) Die Umverteilung von Tl^+ im Gehirn als Funktion der Zeit, sowie der Zeitverlauf der Äquilibrierung von Ein- und Ausstrom, sollen mittels der TIAMG am NagermodeLL systematisch analysiert und dokumentiert werden. Ferner soll die der Tl^+ -Kinetik zugrunde liegende Logik durch analytische Modellierung K^+ -analoger Ströme *in vitro*, sowie vermittels eines Kompartimentmodells *in vivo* veranschaulicht werden, was zugleich dazu dient, die empirischen Befunde in einen theoretischen Rahmen einzubetten.

In Hinblick auf das erste Ziel werden zunächst die regionalen und zellulären Muster der Tl^+ -Verteilung im Gehirn von unstimulierten, sich verhaltenden mongolischen Wüstenrennmäusen nach systemischer Applikation von TIDDC, mit den nach Applikation von Tl^+ als in wässriger Lösung gelöstes Ion zu beobachtenden Aufnahmemustern verglichen. Insofern als die in Abschnitt 1.3.2 geäußerte Hypothese zur Dissoziation des lipophilen Komplexes TIDDC an der BHS zutrifft, sollte in beiden Fällen freies Tl^+ in den cerebralen EZR gelangen, was zu gleichartigen zellulären Aufnahmemustern führen sollte, während auf der regionalen Ebene entsprechende BHS- und BLS-abhängige Unterschiede in der Tl^+ -Verteilung zu erwarten wären.

Anschließend werden sowohl etablierte akustische und elektrische, wie auch nozizeptive Stimulationsparadigmen eingesetzt, um zu testen ob sich nach systemischer Injektion von TIDDC in wachen mongolischen Wüstenrennmäusen und Ratten stimulationsindu-

zierte Aufnahmemuster in Form tonotoper Banden, respektive fokal erhöhter Tl^+ -Aufnahme, detektieren lassen. Weiterhin soll die Frage beantwortet werden, ob auch Einflussnahmen auf das cerebrale Aktivitätsniveau, welche inhibitorischer Natur sind, nach Gabe von TIDDC nachweisbar sind. Dazu wird in anästhesierten mongolischen Wüstenrennmäusen, die neuronale Aktivität einer corticalen Hemisphäre durch unilaterale topische Applikation des GABA(A)-Agonisten Muscimol lokal supprimiert.

Schließlich soll in Erfahrung gebracht werden, in welchem Maße subtilere Unterschiede in der Spontanaktivität zwischen global divergierenden Hirnzuständen thallium-autometallografisch detektiert werden können. Deshalb wird zum Abschluss des ersten Teils dieser Doktorarbeit, die schichtspezifische Tl^+ -Verteilung im primären Hörcortex von Ratten, welche das TIDDC entweder im Wachzustand oder während einer Non-REM-Schlafphase über eine i.v. Injektion erhielten, einer ausgiebigen statistischen Analyse in Hinblick auf eventuelle Unterschiede zwischen beiden Vigilanzstadien unterzogen.

Zur Analyse der Tl^+ -Kinetik wird, ebenfalls unter Verwendung des thallium-autometallografischen Ansatzes, die Tl^+ -Verteilung im Gehirn von Ratten jeweils 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 180 min oder 24 h nach i.v. Applikation des Tracers in Form von TIDDC beschrieben und miteinander verglichen. Zusätzlich wird die cerebrale Tl^+ -Aufnahme unter generischen BHS-Bedingungen in mongolischen Wüstenrennmäusen, jeweils 15 min, 180 min oder 24 h nach i.p. Applikation des Tl^+ in Form von TIAc charakterisiert, wobei die Wahl der mongolischen Wüstenrennmaus als Spezies daher rührt, dass im Vorfeld dieser Doktorarbeit bereits präliminarische Kinetikstudien an dieser Spezies in unserem Labor durchgeführt wurden, deren Ergebnisse im Kontext der gegenwärtigen Untersuchung Berücksichtigung finden sollen. Entsprechend der dem lipophilen Komplex zugrundeliegenden Logik, nach der freie Thallium-Ionen in den EZR gelangen, sollte unter beiden Bedingungen die Äquilibrierung von Ein- und Ausstrom

aus den Neuronen und die damit verbundene Umverteilung des TI^+ , einem ähnlichen zeitlichen Verlauf folgen, wie ihn die Kinetik K^+ -analoger Tracer *in vitro* aufzeigt.

Zum besseren Verständnis der empirischen Daten, sowie zur Illustration der zugrundeliegenden Prinzipien bei der Verwendung von K^+ -Analoge als Tracer für neuronale Aktivität, wird zusätzlich die Aufnahme und Umverteilung eines perfekten K^+ -Analogons unter Einbeziehung einiger vereinfachender Annahmen *in vitro* und *in vivo* beschrieben. Die mathematische Beschreibung der Tracerkinetik *in vitro* orientiert sich dabei an der Vorgehensweise, welche Keynes und Ritchie (1965) zur Berechnung der axonalen K^+ -Ströme unter Verwendung von ^{42}K als Tracer benutzten. Zur Modellierung der *in vivo*-Bedingung, wird ein Kompartimentmodell bestehend aus einem Plasma / Körper-Kompartiment, einem EZR-Kompartiment, sowie drei Modellneuronen mit jeweils unterschiedlichen intrazellulären K^+ -Konzentrationen, sowie unterschiedlichen K^+ -Aufnahmeraten, verwandt.

3 Material und Methoden

Insgesamt wurden im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Studien 50 adulte männliche Wistar-Ratten (280 – 400 g) und 36 adulte mongolische Wüstenrennmäuse (65 – 85 g) beiderlei Geschlechts verwendet. Die Versuche erfolgten dabei in allen Fällen in Übereinstimmung mit den Tierschutzbestimmungen des Landes Sachsen-Anhalt und der Bundesrepublik Deutschland.

3.1 Thalliumapplikation und Anästhesie

3.1.1 Intraperitoneale Injektion von Thallium(I)acetat

TIAC (Fluka, Deutschland) wurde in destilliertem Wasser gelöst und entsprechend der Zeitspanne zwischen Applikation und Perfusion in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Volumina als Bolus i.p. mongolischen Wüstenrennmäusen injiziert. Tiere, die 15 min nach der TIAC-Injektion perfundiert wurden, erhielten eine Dosis von 400 – 500 µl einer 1%igen TIAC-Lösung, Tiere, die 180 min nach der TIAC-Injektion perfundiert wurden, erhielten jeweils 500 µl einer 0.2%igen TIAC –Lösung und Tiere, die 24 h nach der TIAC-Injektion perfundiert wurden, erhielten jeweils 500 µl einer 0.1%igen TIAC-Lösung. Die abnehmende Konzentration mit zunehmendem Zeitintervall zwischen Injektion und Perfusion erklärt sich dadurch, dass aufgrund der geringen Durchlässigkeit der BHS für freie Thalliumionen, der Tl^+ -Spiegel im Gehirn bis zu 24 h nach systemischer Applikation von Tl^+ kontinuierlich ansteigt (Ríos u. a., 1989) und aus diesem Grund bei längeren Zeitintervallen eine geringere Ausgangsdosis vonnöten ist.

Nach Ablauf des jeweiligen Zeitintervalls wurden die Tiere durch i.p. Injektion einer Mischung aus Ketamin (100 mg / kg Körpergewicht, Ratiopharm, Deutschland) und Xylazin (40 mg / kg Körpergewicht, Rompun, Bayer Vital, Deutschland) anästhesiert.

3.1.2 Intraperitoneale Injektion von Thallium-Diethyldithiocarbamat

Die TIDDC-Lösung wurde durch Mischen äquivalenter Volumina einer wässrigen 0.2%igen TIAC- und einer wässrigen 0.2%igen Natrium-Diethyldithiocarbamat-Trihydrat-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland), jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Mongolischen Wüstenrennmäusen wurden jeweils 300 µl der 0.1%igen TIDDC-Lösung i.p. injiziert. Die Anästhesie erfolgte wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

3.1.3 Intravenöse Injektion von Thallium-Diethyldithiocarbamat

Im Vorfeld der Versuche wurden einigen mongolischen Wüstenrennmäusen und Ratten unter Pentobarbitalnarkose (Nembutal, 50 mg / kg Körpergewicht; Sigma-Aldrich, Deutschland), venöse Zugänge in die rechte äußere Drosselvene (*Vena jugularis externa*, Abb. 3.1) gelegt.

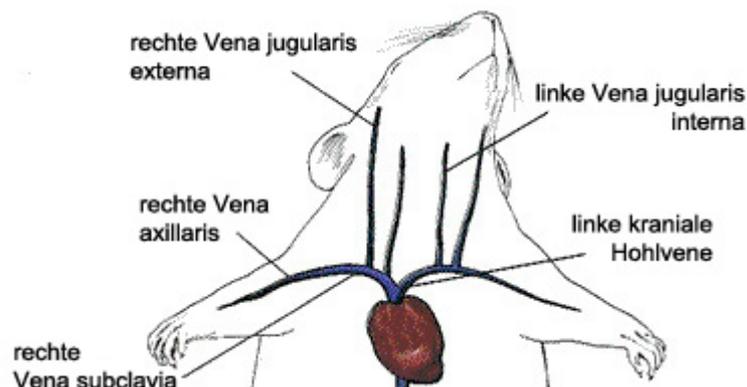


Abb. 3.1: Schema des venösen Systems im Halsbereich der Ratte. Quelle: Creative Commons.

Dazu wurde die rechte Seite des Halses rasiert und ein kleiner Einschnitt über dem Schlüsselbein vorgenommen. Das Gefäß wurde freigelegt und soweit mobilisiert, dass zwei Schlaufen eines chirurgischen Nähfadens (Stärke 4-0 oder 5-0) um das Gefäß gelegt werden konnten (Abb. 3.2A). Anschließend wurde die rostral gelegene Schlaufe geschlossen und die Vene mit einer Augenschere V-förmig angeschnitten, um den mit

isotonischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) gefüllten Katheter durch die entstandene Öffnung in das Gefäß einzuführen und hiernach entweder 1.5 cm (mongolische Wüstenrennmaus) oder 2.5 cm (Ratte) weit in Richtung des rechten Vorhofes zu schieben (Abb. 3.2B). Nach dem Prüfen der Gängigkeit des Schlauchs, wurde die kaudal gelegene Schlaufe geschlossen und der Katheter mittels eines leicht angespitzten Stahlrohres subkutan in Richtung Nacken getunnelt, so dass er zwischen den Schulterblättern des Tieres wieder austreten (Abb. 3.2C) und mit einem Feuerzeug versiegelt werden konnte (Abb. 3.2D). Abschließend wurde die Inzision über dem Schlüsselbein mit einer Klammer (9 mm Autoclips, BioMedical Instruments, Deutschland) verschlossen und die Wunde mit Wundpuder (Tyrosur, Deutschland) behandelt.

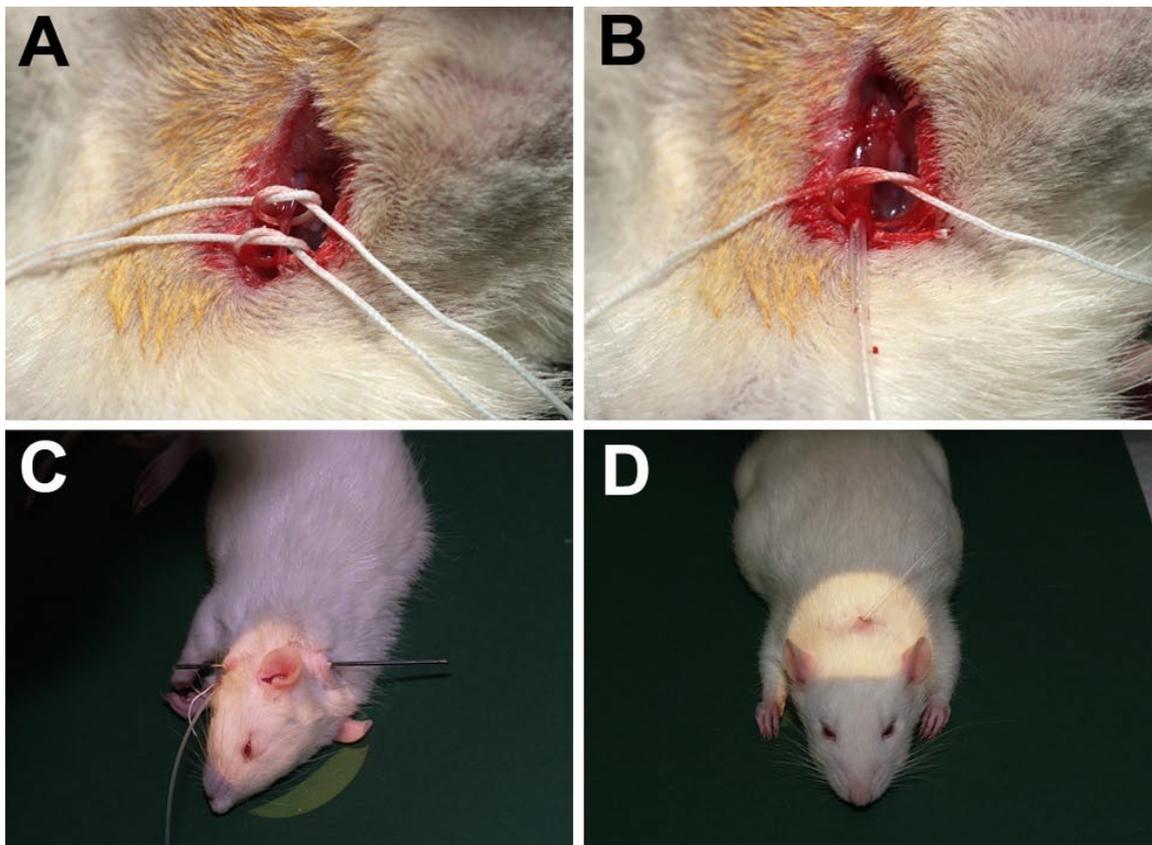


Abb. 3.2: (A) und (B): Katheterisierung der *Vena jugularis externa* einer Ratte. (C) und (D): Subkutane Tunnelung des Katheters. Für Details siehe Text.

Als Katheter wurden dabei für beide Spezies Polyethylenschläuche (PE-50, BioMedical Instruments) mit Silikonauflauf (Renasil SIL-037, BioMedical Instruments) verwendet. Für Ratten allerdings, die im Kontext der Vigilanzstudien das TIDDC während des Non-REM-Schlafes erhielten, kamen in einigen Fällen (9 von 14 Tieren) auch spezielle Ratten-Jugulariskatheter aus Silikon (Charles River, Deutschland) zum Einsatz.

Nach der Katheterimplantation erhielten die Tiere eine postoperative Erholungsphase von 2 bis 5 Tagen, bevor sie für weitere Experimente eingesetzt wurden.

TIDDC zur i.v. Applikation wurde durch Mischen äquivalenter Volumina einer wässrigen 0.1%igen TIAC- und einer in 1.8%igen NaCl gelösten 0.1%igen Natrium-DDC-Lösung, jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Von der resultierenden 0.05%igen isotonischen TIDDC-Lösung, erhielten mongolische Wüstenrennmäuse in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen 350 – 425 µl. Ratten, die im Zeitraum von 5 min bis 180 min nach der TIDDC-Injektion perfundiert wurden, erhielten eine Dosis von 1 ml der 0.05%igen TIDDC-Lösung, wohingegen Ratten, die 24 h nach der Injektion perfundiert wurden, jeweils 1.2 bis 1.5 ml der 0.05%igen TIDDC-Lösung erhielten. Die höhere Dosis mit zunehmendem Zeitintervall zwischen Injektion und Perfusion erklärt sich dadurch, dass, konträr zur systemischen Applikation von TIAC, der Tl^+ -Spiegel im Gehirn zum Zeitpunkt von 24 h nach i.v. Applikation von TIDDC, bereits deutlich niedriger ist als zu früheren Messzeitpunkten. Dies resultiert aus der Tatsache, dass bereits innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne nach TIDDC-Applikation der Tl^+ -Spiegel im ZNS höher ist als im Plasma und deshalb zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten Tl^+ über K^+ -Transporter und Kanäle in der Endothelzellmembran das ZNS in Richtung Plasma verlässt.

Am Tag des Experimentes wurden die Katheter über ein Verbindungsstück aus Silikon (Renasil SIL-065; BioMedical Instruments) mit einem 40 bis 90 cm langen Polyethylenschlauch (PE-50; BioMedical Instruments) verbunden, welcher isotonische Kochsalzlösung enthält. Dies geschah in den meisten Fällen unter kurzer (< 1min) 3.5%iger Iso-

flurannarkose. Nach Anschluss des Polyethylenschlauchs wurde mindestens 60 min mit dem Beginn der Versuche gewartet, um etwaigen Überhangeffekten der Gasnarkose vorzubeugen.

TIDDC wurde von außerhalb des Käfigs den frei beweglichen, sich verhaltenden Tieren injiziert. Eine Ausnahme bilden die Muscimol-Experimente, die an anästhesierten Tieren vorgenommen wurden (siehe Abschnitt 3.2.4). Die TIDDC-Lösung wurde in allen Fällen kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 min appliziert. 5 min nach Beginn der TIDDC-Applikation erhielten die Tiere eine i.v. Bolusinjektion Ketamin (Ratiopharm), wobei die Dosis für mongolische Wüstenrennmäuse 40 mg / kg Körpergewicht und für Ratten 25 mg / kg Körpergewicht betrug. Ratten, die im Zuge der Untersuchungen zur TI⁺-Kinetik zu späteren Messzeitpunkten perfundiert werden mussten, wurden, entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit, jeweils 15 min, 30 min, 60 min, 180 min oder 24 h nach Beginn der TIDDC-Applikation anästhesiert.

3.2 Stimulation, Muscimolapplikation und Vigilanzkontrollen

3.2.1 Nozizeptive Stimulation

Zur nozizeptiven Stimulation der Tiere wurde entsprechend dem Protokoll von Dubuisson und Dennis (1977) verfahren, welches im Kontext des Formalintests für analgetische Untersuchungen an Ratten und Katzen entwickelt wurde. Sechs Ratten, die im Vorfeld der Versuche Jugularis-Katheter erhielten, wurden unter kurzer Isoflurannarkose (3.5%) 50 µl einer, in 100 mM Phosphatpuffer verdünnten, 5%igen Formaldehydlösung subkutan in die plantare Seite jeweils einer Hinterpfote injiziert. Drei Tiere erhielten die Injektion in die rechte Hinterpfote, drei Tiere in die linke. 60 min nach der Formaldehydinjektion erfolgte die i.v. Applikation von TIDDC (0.05% in 1 ml 0.9% NaCl) wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

3.2.2 Akustische Stimulation

Zehn Mongolische Wüstenrennmäuse, die im Vorfeld der Versuche Jugularis-Katheter erhielten, wurden entweder mit alternierenden Reintönen (5 Tiere) oder amplitudenmoduliertem (10 Hz) weißen Rauschen stimuliert (5 Tiere). Als Reintöne dienten 500 ms lange Signalfolgen mit linearen Rampen von 10 ms Dauer, welche periodisch und ohne Pausenintervalle zwischen 1 und 2 kHz alternierten. Die akustischen Stimuli wurden mittels Cool Edit (Adobe Systems, Deutschland) erstellt und über einen Lautsprecher an der Decke der schalldichten Kammer, in der die Versuche stattfanden, mit einer Intensität von 75 ± 5 dB SPL in Bezug zum Boden der Kammer dargeboten. TIDDC (0.05% in 350 μ l 0.9% NaCl) wurde während des Experimentes über die angeschlossene Polyethylenschlauchverlängerung von außerhalb der Kammer verabreicht.

3.2.3 Intracortikale Mikrostimulation

Fünf mongolischen Wüstenrennmäusen wurden Teflon-isolierte Platin-Iridium Drähte (Durchmesser 75 μ m) in die Mitte des rechten primären Hörcortex (A1) implantiert. Die Elektrodenspitze befand sich auf Höhe der cortikalen Schicht IV. Die Referenzelektrode wurde im Bereich des lateralen Endes des linken Schläfenbeins implantiert.

Nach einer postoperativen Erholungsphase von mindestens 7 Tagen, wurden die Tiere nach i.p. Applikation von TIDDC (0.1% in 300 μ l Aqua dest) 5 min lang elektrisch stimuliert. Die elektrischen Stimuli wurden mittels eines programmierbaren 8-Kanal Stimulusgenerators (STG1008, Multi Channel Systems, Deutschland) erstellt und setzten sich aus 5 verschiedenen Stimulationssequenzen zusammen. Jede Sequenz enthielt 70 biphasische Pulse mit 200 μ s Phasendauer und 100 μ s Interphasendauer. Die einzelnen Pulse waren durch Pausenintervalle von 600 ms getrennt, was einer Gesamtdauer einer Stimulationssequenz von 42 s entspricht. Nach einem Pausenintervall von 18 s begann die nächste Sequenz. Die Stimulationsamplitude der ersten Sequenz betrug 240 μ A und wurde in den nachfolgenden Sequenzen jeweils in Schritten von 10 μ A ge-

senkt. Während der Stimulation zeigten die Tiere keine sichtbaren Verhaltensauffälligkeiten. 5 min nach Beginn der Stimulation wurden die Tiere wie oben beschrieben anästhesiert. Um das Poststimuluszeitintervall durch Abstecken einzelner Kabel nicht unnötig zu verlängern, wurde nach Einsetzen der Anästhesie der komplette Elektrodensockel samt Stimulations- und Referenzelektrode entfernt.

Die Experimente zur intracortikalen Mikrostimulation wurden in Kollaboration mit Achim Engelhorn (Leibniz-Institut für Neurobiologie und Klinik für Neurologie, Magdeburg) durchgeführt.

3.2.4 Epidurale Muscimolapplikation

Vier mongolischen Wüstenrennmäusen wurde initial ein Mix aus Ketamin (100 mg / kg Körpergewicht, Ratiopharm), Xylazin (10 mg / kg Körpergewicht, Rompun) und 0.9% NaCl subkutan verabreicht. Anschließend erhielten die Tiere alle 20 min supplementäre subkutane Dosen dieser Lösung zur Aufrechterhaltung der Anästhesie und Analgesie.

Nach Katheterisierung der *Vena jugularis externa*, wurde eine Kraniotomie (1 x 4 mm) über dem rechten auditorischen Cortex vorgenommen, wobei die Dura mater intakt blieb. Anhand des charakteristischen Gefäßmusters wurde A1 lokalisiert (Thomas u. a., 1993) und 40 µg des GABA(A)-Rezeptor Agonisten Muscimol (1 µg / µl, Sigma-Aldrich, Deutschland) wurden entsprechend dem Protokoll von Happel u. a. (2010) topisch appliziert. 90 min nach der Muscimolapplikation wurden die anästhesierten Tiere in eine schalldichte Kammer gebracht und mit alternierenden Reintönen von 1 und 2 kHz wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben stimuliert. TIDDC (0.05% in 0.9% NaCl) wurde während des Experimentes über die angeschlossene Polyethylenschlauchverlängerung von außerhalb der Kammer verabreicht. Ein Tier erhielt dabei dasselbe Volumen (350 µl), welches wachen mongolischen Wüstenrennmäusen unter akustischen Stimulationsbedingungen verabreicht wurde. Drei Tiere erhielten aufgrund des potenziell verringerten

cerebralen Blutflusses unter Anästhesiebedingungen (Franks, 2008) ein gegenüber der Wachbedingung erhöhtes Volumen von 425 µl TIDDC.

Die Experimente zur epiduralen Muscimolapplikation wurden in Kollaboration mit Max F. K. Happel (Leibniz-Institut für Neurobiologie) durchgeführt.

3.2.5 Differenzierung diskreter Schlafphasen mittels Elektrocortikografie und Elektromyografie

Vierzehn Ratten wurden Jugularis-Katheter implantiert wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Direkt im Anschluss daran und unter supplementärer i.p. Applikation von Pentobarbital, wurden den Tieren unter stereotaktischer Kontrolle Elektrocortikogramm- (ECoG) und Elektromyogramm- (EMG) Elektroden implantiert. Als ECoG-Elektroden dienten zwei kleine rostfreie Stahlschrauben (Kopfdurchmesser 3 mm, Gewindedurchmesser 1 mm, Länge 2 mm) mit angelötetem, rostfreien Stahldraht (0.5 mm Durchmesser) von denen jeweils eine 2 mm rechtslateral der Mittellinie und 2 mm kaudal von Bregma, sowie 2 mm rechtslateral der Mittellinie und 2 mm rostral von Lambda implantiert wurde. Als EMG-Elektroden dienten sechs zum Teil mit Silikon isolierte Drähte aus rostfreiem Edelstahl (Durchmesser 170 µm), welche jeweils um einen Muskelstrang der freigelegten Nackenmuskulatur gewickelt wurden.

Während der postoperativen Erholungsphase von mindestens 5 Tagen, wurden Probeaufzeichnungen des ECoG und EMG vorgenommen, sowie die Tiere an die schalldichte Ableitkammer gewöhnt. Zur Ableitung der elektrophysiologischen Signale wurde ein 18 Kanal-EEG Gerät (Model 4418G, Nihon Kohden Europe, Deutschland) in Verbindung mit einem EEG-Schreiber (Nihon Kohden Europe) benutzt. Zusätzlich wurden die bandpassgefilterten Signale (ECoG: 0.3 – 35 Hz; EMG: 160 – 1000 Hz) mittels einer Datenakquisitionskarte (National Instruments, Deutschland) digitalisiert und auf einem PC mittels eines eigens in MATLAB (Mathworks, USA) erstellten Programmes aufgezeichnet. Zur ECoG-Aufzeichnung wurden die ECoG-Elektroden wahlweise gegeneinander oder

gegen die EMG-Elektroden referenziert, zur EMG-Aufzeichnung wurden die EMG-Elektroden gegeneinander referenziert.

Am Tag des Experiments wurde die Polyethylenschlauchverlängerung wie oben beschrieben zusammen mit dem Ableitkabel angeschlossen und die Aufzeichnung gestartet. Die Einteilung der Vigilanzstadien erfolgte *ad hoc* nach Standardkriterien (Abb. 3.3).

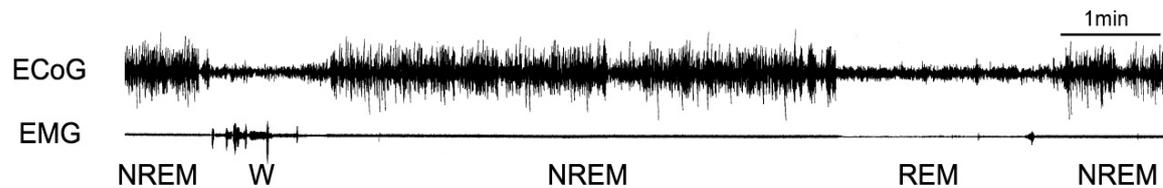


Abb. 3.3: Differenzierung unterschiedlicher Schlaf-Wachphasen mittels kombinierter ECoG- und EMG-Ableitung. Ein kleinamplitudiges ECoG in Kombination mit einer mittleren bis großen EMG Amplitude entspricht einer Wachphase (W), ein großamplitudiges ECoG in Kombination mit einer geringen EMG Amplitude entspricht einer Non-REM-Schlafphase (NREM) und ein kleinamplitudiges ECoG in Kombination mit einem flachem EMG entspricht einer REM-Schlafphase (REM). Verändert nach Wetzel u. a (2003).

Bei Auftreten einer längeren Non-REM-Schlafphase begann die i.v. Applikation von TIDDC (0.05% in 1 ml 0.9% NaCl) von außerhalb der Kammer mittels eines Mikroinjektors (CMA / 100 Microinjection Pump, Carnegie Medicine, USA) mit konstanter Flussrate (250 μ l / min). Der Zeitverlauf der TIDDC-Applikation sowie die Anästhesierung der Tiere stellten sich wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben dar.

Für die anschließende Auswertung der Tl^+ -Aufnahme im Non-REM-Schlaf, wurden nur Tiere verwandt, die während der 5 min zwischen Beginn der TIDDC-Applikation und der Anästhesierung mehr als 80% Non-REM-Schlaf in ihrem Ableitprofil aufwiesen und frei von groben technischen Artefakten waren ($n = 6$). Als Referenz zur Interpretation der Tl^+ -Aufnahme im Non-REM-Schlaf, wurde zusätzlich fünf Ratten das TIDDC während elektrophysiologisch verifizierter Wachphasen appliziert.

Die Experimente zur Differenzierung der Schlaf- und Wachzustände mittels ECoG und EMG wurden in Kollaboration mit Lydia Löw (Leibniz-Institut für Neurobiologie), Wolfram Wetzel (Leibniz-Institut für Neurobiologie) und Frank W. Ohl (Leibniz-Institut für Neurobiologie und Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) durchgeführt.

3.3 Transkardiale Perfusion und histochemische Aufarbeitung

3.3.1 Transkardiale Perfusion

Die Tiere wurden nach Einsetzen der Anästhesie so schnell wie möglich der transkardialen Perfusion zugeführt, um die poststimulative Umverteilung des TI^+ unter Einfluss des Anästhetikums möglichst gering zu halten. Ein- und Ausstrom des Tracers dauern nämlich an, solange nicht sämtliches TI^+ durch Sulfidionen präzipitiert wurde, weshalb das Signal-Rausch-Verhältnis der TIAMG mit zunehmendem Poststimulusintervall abnimmt. Die Perfusion fand aus diesem Grund möglichst nah an dem Ort der TI^+ -Applikation statt, so dass in den hier aufgeführten Versuchen das Poststimulationsintervall im Rahmen von 60 bis 90 s gehalten werden konnte.

Die Tiere wurden mit frisch angesetzten Sulfidlösungen perfundiert. Natriumsulfid (Na_2S) aus einer 6.5%igen, maximal 7 Tage alten Na_2S -Stocklösung wurde den Perfusionslösungen jeweils 5 bis 15 min vor Beginn der Perfusion hinzugegeben. Zum Ansetzen der Stocklösung wurden 20 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) in 70 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Es wurden zwei verschiedene Perfusionslösungen verwandt: Lösung A enthielt 0.325% Na_2S in 100 mM Phosphatpuffer, Lösung B enthielt 0.16% Na_2S in 100 mM Phosphatpuffer sowie 3% Glutaraldehyd. Zum Ansetzen von Lösung A wurden 3.12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 190 ml destilliertem Wasser gelöst und vor Beginn der Perfusion 10 ml der Na_2S -Stocklösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid (NaOH) auf 7.4

titriert. Zum Ansetzen von Lösung B wurden 6.24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 340 ml destilliertem Wasser gelöst und 50 ml 25%iges Glutardialdehyd (Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Vor Beginn der Perfusion wurden 10 ml der Na_2S -Stocklösung hinzugefügt und der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.4 eingestellt.

Die Menge an Sulfid welche dem Tier während der Perfusion mit Lösung A verabreicht wird, ist enorm kritisch für die Sensitivität der TIAMG sowie für die Gewebepräservtion. Zwar steigt die Sensitivität der Methode mit der verabreichten Menge an Sulfid, zu hohe Mengen jedoch können Gewebeschäden und unspezifische Färbemuster nach sich ziehen. In den hier aufgeführten Studien wurden beide Spezies mit 6 – 7 ml von Lösung A innerhalb der ersten 10 s perfundiert. Zur Perfusion wurde eine Schlauchpumpe (Ecoline, Ismatec, Deutschland) mit regulierbaren Flussraten verwandt. Der Schlauch hatte einen inneren Durchmesser von 2.79 mm, die Länge wurde entsprechend der Spezies den jeweilig optimalen Perfusionsvolumina von Lösung A angepasst (0.9 - 1 m für mongolische Wüstenrennmäuse, 1 – 1.2 m für Ratten).

Vor Beginn der Perfusion wurde der Perfusionsschlauch mit Lösung A gefüllt und unmittelbar vor der Eröffnung des Tieres in Lösung B überführt. Dergestalt konnte der Vorspülung mit Lösung A, welche auf Grund der Schlauchlänge exakt dem gewünschten Volumen entsprach, die Perfusion mit Lösung B ohne Unterbrechung des Flusses folgen. Die Perfusionsnadel befand sich in der linken Herzkammer, die Gesamtdauer der Perfusion betrug 10 min. Während der ersten 3 min wurden relativ hohe Flussraten benutzt (40 ml / min für mongolische Wüstenrennmäuse, 65 ml / min für Ratten), wohingegen während der restlichen 7 min die Flussraten um ca. 50% reduziert wurden (20 ml / min für mongolische Wüstenrennmäuse, 30 ml / min für Ratten).

3.3.2 Prozessierung des Gewebes und Färbung

Nach der Perfusion wurden die Gehirne herauspräpariert und vor dem Tiefrieren zum Zweck des Gefrierschutzes für 48 h in einer phosphatgepufferten (100 mM), 30%igen

Sucroselösung (pH 7.4) im Kühlschrank verwahrt. Auf den pH-Wert der Sucroselösung ist hierbei zu achten, da Tl_2S -Kristalle die Tendenz zeigen sich in saurem Milieu aufzulösen. Bei jenen Ratten, welche die Formaldehydinjektion in die Hinterpfote erhielten, wurden zusätzlich lumbale und sakrale Rückenmarkssegmente entnommen, gefriergeschützt und tiefgefroren. Als Einfriermedium wurde 2-Methylbutan (Isopentan) verwandt, welches für ca. 20 s in flüssigem Stickstoff auf $-70^{\circ}C$ bis $-80^{\circ}C$ heruntergekühlt wurde. Zur besseren Handhabbarkeit bei der späteren Herstellung der Kryostatschnitte, wurden die Hirne vor dem Einfrieren mit einer Rasierklinge frontal in 2 oder 3 Blöcke geteilt und diese mit Gewebekleber (Tissue-Tek, Sakura, Deutschland) auf zurechtgeschnittene Korkblöcke aufgeklebt. Aus demselben Grund wurden die Rückenmarkssegmente vor dem Einfrieren mit Gewebekleber (Tissue-Tek) überzogen.

Am Kryostaten (Leica, Deutschland) wurden $25\ \mu m$ dicke Frontalschnitte des Gehirns erstellt, in 100 mM Phosphatpuffer aufgefangen und aus einer phosphatgepufferten, alkoholhaltigen Gelantinelösung (siehe Anhang 1) auf Superfrost Plus Adhäsionsobjektträger (Thermo Scientific, Deutschland) aufgezogen. Die vom Rückenmark erstellten $25\ \mu m$ dicken Frontalschnitte wurden ohne Auffangen in Puffer direkt vom Objektisch auf Superfrost Plus Objektträger aufgenommen. Die Oberfläche der Superfrost Plus Objektträger ist permanent positiv geladen, wodurch die Gefrierschnitte über elektrostatische Anziehungskräfte an die Objektträger gebunden werden und ein späteres Abschwimmen verhindert wird.

Nach dem Aufziehen wurden die Schnitte für ca. 1 h an der Luft getrocknet. Da die Tl_2S -Kristalle oxidationsempfindlich sind und das Oxidationsprodukt Tl_2SO_4 nicht als Katalysator für die Silberverstärkung fungiert, sollte die Trockenzeit der Schnitte von Färbung zu Färbung ungefähr konstant gehalten werden und die Dauer von maximal 2 h nicht überschreiten.

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte entweder direkt der Salzsäure (HCl)-Behandlung zum Lösen der ZnS-Kristalle (siehe Abschnitt 1.2.4) zugeführt oder wahl-

weise 5 min bzw. 15 min in 0.1%iger Natrium-DDC-Lösung inkubiert. Das Behandeln der Schnitte mit DDC führt zum Auswaschen bzw. Maskieren der Tl_2S -Kristalle, was eine geringere Färbeintensität nach sich zieht und solcherart den Dynamikumfang der Methode vergrößert. Dies ist z. B. von Nutzen, wenn nur die „Spitze des Eisberges“ der Tl^+ -Aufnahme visualisiert werden soll. Nach 30 minütiger Inkubation in 0.1 N HCl wurden die Schnitte 3 x 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend an der Luft für ca. 30 min getrocknet.

Die Färbung der Schnitte erfolgte mit dem standardmäßig in der AMG als Entwickler eingesetztem Polysaccharid Gummi arabicum (Danscher, 1981). 1 kg Gummi arabicum wurde zu 2 l destilliertem Wasser gegeben, durch fünftägiges Rühren auf einem Magnetrührer gelöst und anschließend bei -20° Grad tiefgefroren gelagert. Vor dem Färbeprozess wurden jeweils 240 ml des Entwicklers auf Raumtemperatur aufgetaut und nacheinander die folgenden Komponenten der Entwicklerlösung beigegeben:

- 40 ml Citronensäure-Pufferlösung: 10 g Citronensäure-Monohydrat (Merck, Deutschland) in ca. 25 ml Aqua dest lösen, anschließend 9.7 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) hinzugeben + lösen, anschließend mit Aqua dest auf 40 ml auffüllen
- 60 ml Hydrochinonlösung: 3.4 g Hydrochinon (Fluka) in 60 ml Aqua dest lösen
- 60 ml Silbernitratlösung: 0.42 g Silbernitrat (Fluka) unter Vermeidung von Lichteinfall in 60 ml Aqua dest lösen

Vor der Zugabe der Silbernitratlösung zur Entwicklerlösung wurde diese, durch Umwickeln des Erlmeyerkolbens mit Silberfolie, vor Lichteinfall geschützt. Zur Vermeidung von Silberchloridbildung ist es entscheidend, dass sämtliche Gefäße und Magnetrührfische, die zum Ansetzen der Lösungen benutzt werden, frei von Verunreinigungen durch Leitungswasser sind.

Die Schnitte wurden für 150 min oder 180 min in lichtundurchlässigen Autoradiografie-Plastikküvetten (Roth, Deutschland) gefärbt, anschließend für 5 min bis 10 min unter

fließendem Leitungswasser gewaschen und über Nacht in destilliertem Wasser aufbewahrt. Abschließend durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung, der Alkohol wurde durch fünfminütige Inkubation in Xylol entfernt und die Schnitte wurden zur langfristigen Aufbewahrung mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

3.4 Fotografische Dokumentation und statistische Analyse

Für digitale Übersichtsaufnahmen der cerebralen Thalliumaufnahme wurden die eingedeckelten Schnitte mit einer Auflösung von 2000 dpi gescannt (Agfa Duoscan T2000 XL, Deutschland). Detailaufnahmen wurden mit einer auf ein Mikroskop (Leica DMR, Deutschland) montierten Digitalkamera (Fuji Finepix S2 Pro, Deutschland) angefertigt. Die Aufbereitung der gescannten und fotografierten Bilder erfolgte mit Photoshop CS3 (Adobe, Deutschland).

Zur statistischen Auswertung der TI^+ -Verteilung wurden die 24 Bit RGB Farbdateien mittels dem Photoshop-Kanalmixer in ungewichtete 8 Bit Grauwertdateien (256 Graustufen) umgewandelt. Dazu wurde jeder Farbkanal mit 33% gewichtet, eine Konstante von 1% hinzugefügt und der monochrome Modus verwandt. Die Grauwertdateien wurden anschließend mit der nicht-kommerziellen Software ImageJ (NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wie folgt analysiert:

Nozizeptive Stimulation

Ausgewertet wurden jeweils 20 aufeinanderfolgende Frontalschnitte des lumbalen Rückenmarks von sechs Tieren. Für jeden Schnitt wurden sowohl ipsi- als auch kontralateral zur Formalininjektion rechteckige (750 x 500 μm) *Regions of Interest* (ROIs) im Bereich des Hinterhorns (*Cornu posterius*) definiert und die mittleren Grauwerte innerhalb jeder ROI gemessen (siehe auch Abb. 4.5 zur Veranschaulichung der Größe und Position der ROIs). Die Grauwerte wurden dann in Form von Exceldateien aus ImageJ

exportiert und mittels t-Test auf Signifikanz der Mittelwertsdifferenz getestet. Der Standardfehler des Mittelwerts (SEM: *Standard Error of the Mean*) wurde ebenfalls in Excel berechnet.

Epidurale Muscimolapplikation

Ausgewertet wurden 25 aufeinanderfolgende Horizontalschnitte des primären auditorischen Cortex von vier Tieren. Für jeden Schnitt wurden sowohl ipsi- als auch kontralateral zur Muscimolapplikation rechteckige (1000 x 500 μm) ROIs im tieffrequenten Bereich von A1 definiert und die mittleren Grauwerte innerhalb jeder ROI gemessen. Die ROIs wurden dabei entlang einer imaginären Linie orthogonal zur kortikalen Laminierung ausgerichtet (siehe auch Abb. 4.5 zur Veranschaulichung der Größe und Position der ROIs). Die Grauwerte wurden dann in Form von Exceldateien aus ImageJ exportiert und mittels t-Test auf Signifikanz der Mittelwertsdifferenz getestet. Der SEM wurde ebenfalls in Excel berechnet.

Spontanaktivität im Wachzustand versus Non-REM-Schlaf

Ausgewertet wurden 10 Frontalschnitte unterschiedlicher rostrokaudaler Ebenen (Bregma -3.6 bis -4.8) des primären auditorischen Cortex von sechs Tieren, die TIDDC während einer Non-REM-Schlafphase erhielten, sowie von fünf Tieren die TIDDC während einer Wachphase erhielten. In den analysierten Schnitten wurde die Grauwertska-lierung invertiert, so dass Bereiche hoher Färbeintensität Pixeln hoher Grauwerte entsprechen und umgekehrt Bereiche geringer Färbeintensität Pixeln niedriger Grauwerte entsprechen.

In jedem Schnitt wurde eine ROI im Bereich von A1 definiert, entweder in der rechten Hemisphäre (5 Schnitte) oder der linken Hemisphäre (5 Schnitte). Als Referenz diente hierbei der Atlas von Paxinos und Watson (1998). Innerhalb jeder ROI wurde sowohl der

mittlere Grauwert als auch die Standardabweichung (SD: *Standard Deviation*) gemessen und mittels der Funktion „Threshold“ ein Schwellenwert von 2 SD über dem Mittelwert festgelegt. Von nun an wurden nur noch jene Pixel berücksichtigt deren Grauwerte gleich oder größer dem Schwellenwert waren. Das Festlegen des Schwellenwertes dient hierbei der Normalisierung der Färbeintensitäten, um interindividuelle Vergleiche zu ermöglichen. Dies war bei der Analyse der obigen Stimulationsparadigmen nicht erforderlich, da es sich dort jeweils um relative (ipsi- vs. kontralateral) Vergleiche der Grauwertintensitäten innerhalb eines Tieres handelte.

Nach Festlegen des Schwellenwertes wurden innerhalb von A1 nacheinander 3 ROIs parallel zur kortikalen Schichtung definiert: eine supragranuläre ROI im Bereich der kortikalen Schichten I, II und III, eine granuläre ROI im Bereich von Schicht IV, sowie eine infragranuläre ROI im Bereich der Schichten V und VI (siehe auch Abb. 4.6B zur Veranschaulichung der Größe und Position der ROIs). Als Referenz diente hierbei das Kapitel von Palomero-Gallagher und Zilles (2004), sowie benachbarte Nissl-Schnitte.

Anschließend wurden innerhalb jeder laminaren ROI mittels der Funktion „Analyze Particles“ jene Zellen gezählt, deren Grauwerte oberhalb der Schwelle lagen. Um den Einfluss unspezifisch angefärbter Strukturen, wie beispielsweise Blutgefäßen, auf die Statistik möglichst gering zu halten, wurden nur Elemente einer bestimmten Größe ($111 \mu\text{m}^2 - 1450 \mu\text{m}^2$, Skala: 0.454 Pixel / μm) und Form (circularity: 0.3 -1) statistisch erfasst (siehe Abb. 4.6B). Da die ROIs zum Teil eine unterschiedliche Größe aufwiesen, wurde zusätzlich die Fläche jeder ROI zum Zwecke der Normierung der Zellzahl pro Flächeneinheit gemessen. Die Daten wurden dann als Textdatei (TSV) exportiert und mittels Mathematica (Wolfram Research, USA) statistisch ausgewertet.

Bei der Auswertung der schichtspezifischen ROIs wurde jeweils die Zellzahl / Fläche einer ROI (z. B. der granulären ROI) in Verhältnis zur Zellzahl / Fläche in Gesamt-A1 (d.h. aller 3 ROIs) gesetzt, weshalb es sich bei den in Abb. 4.6C dargestellten Werten um prozentuale Angaben handelt. Die Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen zwischen

Tieren der Schlaf- und Tieren der Wachbedingung wurde für jede laminare ROI mittels t-Test geprüft.

Thalliumverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten nach TIDDC-Applikation

Ausgewertet wurden jeweils 5 aufeinanderfolgende Frontalschnitte des Striatums (CPu), der Capsula interna (ic), der Mamillarkörper (MM), sowie des inferioren Colliculus (IC), jeweils einer Hemisphäre von zehn Tieren, die entweder 5 min (5 Tiere) oder 24 h (5 Tiere) nach der TIDDC-Applikation perfundiert wurden. In jedem Schnitt wurde eine ROI im Bereich der entsprechenden Struktur definiert und der mittlere invertierte Grauwert innerhalb der ROI gemessen. Als Referenz diente hierbei der Atlas von Paxinos und Watson (1998). Zur späteren Normierung der Grauwerte wurden zusätzlich der mittlere invertierte Grauwert und die SD der ipsilateralen Hemisphäre gemessen. Die Daten wurden dann als Textdatei (TSV) exportiert und mittels Mathematica statistisch ausgewertet. Nach der Z-Wert Normierung $((X_{\text{ROI}} - \bar{X}_{\text{Hemisphäre}}) / SD_{\text{Hemisphäre}})$ wurde die Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen zwischen Tieren der 5 min- und Tieren der 24 h-Gruppe für jede Struktur mittels t-Test geprüft.

Zudem wurden jeweils 5 aufeinanderfolgende Frontalschnitte des Bulbus olfactorius (OB) und des IC jeweils einer Hemisphäre von zwanzig Tieren ausgewertet, die entweder 15 min (5 Tiere), 30 min (5 Tiere), 60 min (5 Tiere) oder 180 min (5 Tiere) nach TIDDC-Applikation perfundiert wurden. Die Auswertung des IC erfolgte wie oben beschrieben. Zur Auswertung schichtspezifischer Färbeunterschiede im OB wurden mittels der Funktion „Plot Profile“ orthogonal zur Laminierung verlaufende invertierte Grauwertprofile erstellt (siehe Abb. 4.9E zur Veranschaulichung). Die Profile wurden jeweils so skaliert, dass sie sowohl die Glomerulischicht (GL), die externe plexiforme Schicht (EPL) und die Granulärzellschicht (GCL) nach Paxinos und Watson (1998) umfassten. Die Messwerte wurden dann exportiert und Z-Wert normiert wie oben beschrieben.

3.5 Modellierung der Traceraufnahme *in vitro* und *in vivo*

Neurone wurden sowohl im *in vitro*-, als auch im *in vivo*-Modell als Zylinder eines bestimmten Durchmessers und einer bestimmten Länge mit jeweils unterschiedlichem intrazellulären K^+ -Gehalt und unterschiedlichen K^+ -Transmembranströmen modelliert (siehe Anhang 2 für detaillierte Angaben zu den Parametern). Die Modellierung der Traceraufnahme erfolgte in beiden Fällen unter *Steady-state*-Bedingungen, d.h. unter der Annahme konstanter Parameter in dem jeweils betrachteten Zeitraum. Die Analyse und Darstellung der Verlaufskurven erfolgte mit Mathematica.

3.5.1 *In vitro*

Für die *in vitro*-Bedingung wurde ein unendlich großer EZR mit einer bestimmten K^+ -Konzentration, sowie einer bestimmten Tracerkonzentration angenommen, in welchem sich die Modellneurone befanden. Der Modelltracer (T^+) wurde als perfektes K^+ -Analogon betrachtet. Der transmembrane K^+ -Strom (ΦK^+) wurde definiert als die Anzahl von K^+ -Ionen, die innerhalb einer Zeitspanne Δt durch eine bestimmte Membranfläche strömen. Die Anzahl der Tracerionen die durch eine bestimmte Membranfläche in die Zelle einströmen, ergibt sich dementsprechend aus dem Verhältnis von extrazellulärer Tracer- zu extrazellulärer Kaliumkonzentration (T^+_e / K^+_e). Stellt sich z. B. das Verhältnis von extrazellulärem T^+ zu extrazellulärem K^+ als 1:1000 dar, so strömen, bei einem angenommenen K^+ -Strom von 10000 K^+ pro $\mu m^2 \times s$, 10 T^+ in die Zelle ein. Die Absolutmenge an T^+ die pro Zeitintervall Δt in die Zelle einströmt, lässt sich durch Multiplikation dieser Zahl (10 T^+ in diesem Beispiel) mit der Gesamtmembranoberfläche A ermitteln, was sich formal als $\frac{[T^+]_e}{[K^+]_e} \Phi K^+ A \Delta t$ darstellt. Entsprechend lässt sich der Ausstrom des Tracers als $\frac{[T^+]_i}{[K^+]_i} \Phi K^+ A \Delta t$ darstellen, wobei K^+_i der intrazellulären Kaliumkonzentration und T^+_i der intrazellulären Tracerkonzentration entspricht. Die Änderung der Absolut-

menge intrazellulärer Tracerionen im Zeitintervall Δt ergibt sich dann aus der Differenz zwischen Tracereinstrom und Ausstrom:

$$(1) \quad \Delta[T^+]_i = \frac{[T^+]_e}{[K^+]_e} \Phi K^+ A \Delta t - \frac{[T^+]_i}{[K^+]_i} \Phi K^+ A \Delta t$$

Da die intrazelluläre Tracerkonzentration sich als Funktion der Zeit ändert, gilt die obige Formel nur für eine unendliche kurze Zeitspanne, was in der folgenden Differentialgleichung zum Ausdruck kommt:

$$(2) \quad d[T^+]_i/dt = \frac{[T^+]_e}{[K^+]_e} \Phi K^+ A - \frac{[T^+]_i}{[K^+]_i} \Phi K^+ A$$

Will man nun statt der Absolutmenge an Tracer die Konzentration des Tracers ermitteln, dividiert man durch das Zellvolumen:

$$(3) \quad d[T^+]_i/dt = \frac{[T^+]_e}{[K^+]_e} \Phi K^+ \frac{A}{V} - \frac{[T^+]_i}{[K^+]_i} \Phi K^+ \frac{A}{V}$$

Gleichung 3 entspricht einer gewöhnlichen, linearen und inhomogen ($a \neq 0$) Differentialgleichung des Typs $dy/dt = a - by$, wie nach folgender Umstellung ersichtlich ist:

$$(4) \quad d[T^+]_i/dt = \frac{[T^+]_e}{[K^+]_e} \Phi K^+ \frac{A}{V} - \frac{\Phi K^+ A}{[K^+]_i V} [T^+]_i$$

Ausgehend von der Initialbedingung $[T^+]_i = 0$ zum Zeitpunkt $t = 0$, lautet die Lösung dieser Art von Differentialgleichung $y = \frac{a}{b} (1 - e^{-bt})$ (siehe Anhang 3 für eine detaillierte Herleitung der Lösung), was sich in unserem Fall folgendermaßen darstellt:

$$(5) \quad [T^+]_i = \frac{[T^+]_e}{[K^+]_e} \Phi K^+ \frac{A}{V} \frac{[K^+]_i V}{\Phi K^+ A} [1 - e^{-t \frac{\Phi K^+ A}{[K^+]_i V}}]$$

Gleichung 5 lässt sich vereinfachen zu:

$$(6) \quad [T^+]_i = [T^+]_e \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} [1 - e^{-t \frac{\Phi K^+ A}{[K^+]_i V}}]$$

Diese Lösung ist analog zur Gleichung, welche die Ladung (Q) eines Kondensators als Funktion der Zeit in einem RC-Glied beschreibt -

$$(7) \quad Q = Q_f (1 - e^{-\frac{t}{RC}}) -$$

wobei Q_f der finalen Ladung des Kondensators entspricht.

3.5.2 *In vivo*

Für die *in vivo*-Bedingung wurden drei Modellneurone und der EZR als Zylinder einer bestimmten Länge und eines bestimmten Durchmessers modelliert. Der EZR-Zylinder stand dabei über eine bestimmte Austauschfläche mit einem großen fünften Kompartiment (Plasma/Körper-Kompartiment, im Folgenden als Plasmakompartiment bezeichnet) in Verbindung (Abb. 3.4). Die Parameter der Modellneurone waren dieselben wie in dem *in vitro*-Modell (siehe Anhang 2 für detaillierte Angaben zu den Modellierungsparametern). Das Volumen des EZR-Kompartimentes betrug 20% des Gesamtvolumens der drei Modellneurone, da der EZR bei höheren Säugern typischerweise einen Volumenanteil von 20% des Gehirns einnimmt (Syková und Nicholson, 2008). Die Austauschfläche zwischen EZR und Plasma wurde, ausgehend vom Wert der Studie Smith's und Rapoport's (1986) von $140 \text{ cm}^2 / \text{g}$ Hirngewebe, mit $0.014 \mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^3$ angenommen. Die Parameter des Plasmakompartiments, sowie die K^+ -Ströme zwischen Plasma und EZR wurden derart angepasst, dass die Modellkurven der neuronalen Traceraufnahme dem empirisch ermittelten Zeitverlauf der cerebralen Ti^+ -Aufnahme nach systemischer Applikation von Ti_2SO_4 entsprachen (Ríos u. a., 1989; siehe Anhang 4). Die Transferkoeffizienten zwischen den Kompartimenten (Anhang 2) wurden entsprechend der Zeitkonstante der Traceraufnahme aus Gleichung 6 ($\frac{\phi \text{K}^+ A}{[\text{K}^+]_i V}$) ermittelt.

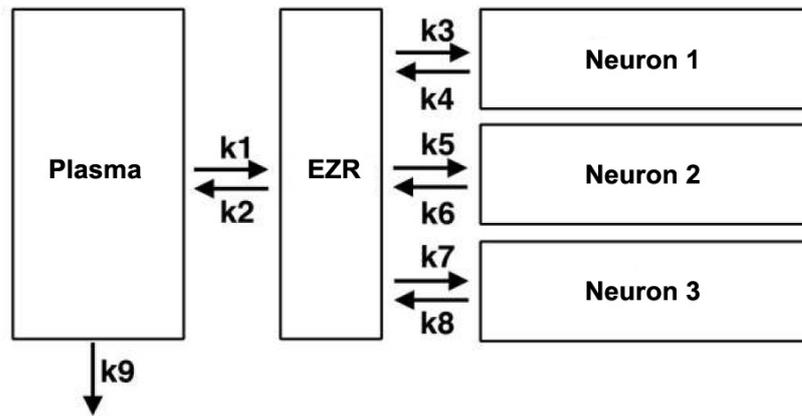


Abb. 3.4: Schema des zur Modellierung der Tl^+ -Aufnahme *in vivo* konstruierten Kompartimentmodells. Für Details siehe Text. Die numerischen Werte der Transferkoeffizienten ($k_1 - k_9$) sind im Anhang 2 aufgelistet. Verändert nach Wanger u. a. (2012).

Zur Erstellung und Lösung der Differentialgleichungssysteme wurde das nicht-kommerzielle, auf Mathematica basierende Funktionenpaket BIOKMOD (<http://web.usal.es/~guillermo/>) verwandt (Sanchez, 2007).

Um die modellierten Aufnahmekurven mit den empirisch ermittelten Daten abzugleichen, wurden exemplarisch die relativen Färbeintensitäten in der Glomerulischicht des Bulbus olfactorius und im inferioren Colliculus zu den Zeitpunkten 15 min, 30 min, 60 min und 180 min nach TIDDC-Injektion herangezogen (siehe dazu auch Abb. 4.9E). Eine monoexponentielle Funktion der Form

$$(8) \quad R = e^{-\frac{x}{\tau}},$$

wurde sowohl an die empirisch erhobenen, als auch an die im Kontext des *in vivo*-Modells ermittelten Messpunkte zwischen 15 min bis 180 min nach Tracerapplikation angepasst, wobei R der relativen Färbeintensität bzw. Tracerkonzentration, X der Zeitvariablen und τ der Zeitkonstante der Äquilibration entsprechen. Das Anpassen der Funktion erfolgte nach dem Kriterium der kleinsten Quadrate. Die Zeitkonstante τ wurde benutzt, um die resultierenden angepassten Kurven zu vergleichen.

4 Ergebnisse

An dieser Stelle sollen die Versilberungsmuster thallium-autometallografisch behandelte Schnittserien von mongolischen Wüstenrennmäusen und Ratten, die den in Abschnitt 3 beschriebenen Paradigmen unterzogen wurden, sowohl deskriptiv als auch quantitativ im Sinne der in Abschnitt 2 umrissenen Ziele ausgewertet und ausführlich beschrieben werden. Es sei noch einmal erwähnt, dass dunkle Bereiche auf den jeweiligen Hirnschnitten einer hohen Silberkorndichte entsprechen und demzufolge, nach dem etablierten Prinzip der TIAMG (Goldschmidt u. a., 2004), ein höheres Maß an *in vivo*-Akkumulation des Tracers Tl^+ im Vergleich zu helleren Bereichen des Hirnschnittes implizieren.

4.1 Thalliumverteilung im Nager-ZNS nach systemischer Applikation von TIDDC

4.1.1 Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC versus TIAc in unstimulierten Tieren

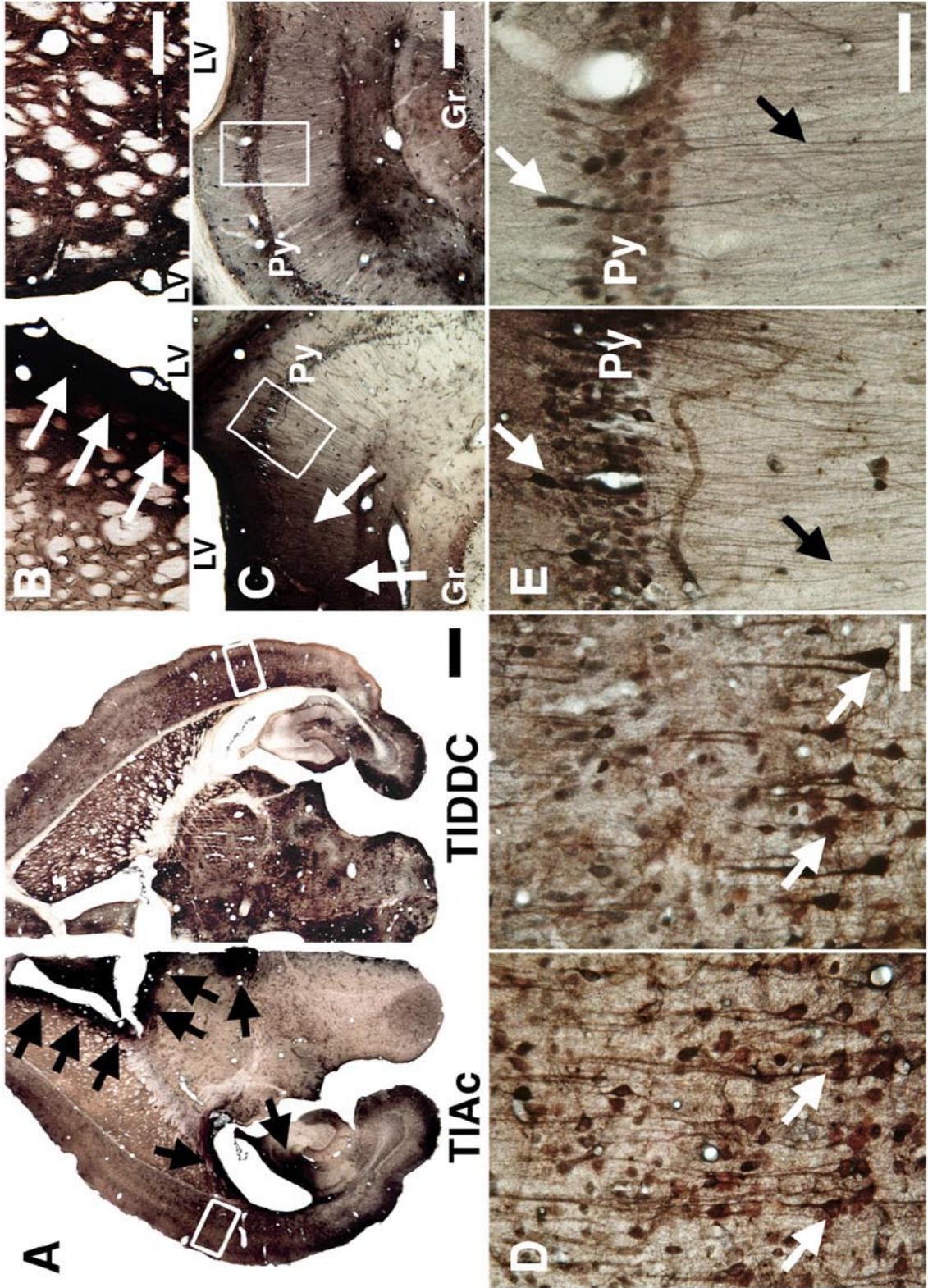
Die i.p. Applikation von TIAc führte zu einem charakteristischen Tl^+ -Verteilungsmuster in allen untersuchten Tieren, welches sich auf der regionalen Ebene markant in Form der bereits erwähnten Ventrikel-assoziierten Färbegradienten manifestierte. Wie in Abbildung 4.1A bis 4.1C ersichtlich, ist das Färbesbild in periventrikulären Strukturen wie dem Striatum, Teilen des Hippocampus und der medialen Habenula von dunklen, die Ventrikel umrahmenden Bändern geprägt. Zudem findet man, unabhängig von den periventrikulären Gradienten, typische regionale Unterschiede in Bezug auf die Verteilung des Tracers. So ist die Färbintensität im Cortex deutlich höher als beispielsweise im Thalamus oder im Striatum (Abb. 4.1A -C). Nach systemischer (i.p. und i.v.) Applikation von TIDDC hingegen, waren diese regionalen Unterschiede in der Tl^+ -Verteilung nicht mehr detektierbar (Abb. 4.1A - C). Ferner konnte die Thalliumdosis, welche zum Erreichen

der in Abbildung 4.1 gezeigten Färbeintensitäten benötigt wurde, durch Injektion von TIDDC gegenüber der Injektion von TIAC beträchtlich reduziert werden. So erhielten mongolische Wüstenrennmäuse denen Thallium im Rahmen des TIAC-Protokolls verabreicht wurde jeweils eine Dosis von 45 mg pro kg Körpergewicht, während bei Tieren, die Tl^+ in Form von TIDDC erhielten, lediglich eine Dosis von 2 mg pro kg Körpergewicht benötigt wurde.

Auf der zellulären Ebene hingegen konnten in keiner ZNS-Struktur, vom OB bis zum Hirnstamm, systematische Unterschiede in der Tl^+ -Verteilung nach systemischer Injektion von TIDDC gegenüber TIAC festgestellt werden (Abb. 4.1D - I). Die Färbemuster sind in beiden Fällen äußerst heterogen, sowohl in Hinblick auf sichtbare Unterschiede zwischen kortikalen (Abb. 4.1D) und hippocampalen (Abb. 4.1C und E) Schichten, sowie bezüglich typischer Kontraste zwischen Neuronen und mutmaßlichen Astrozyten in verschiedenen Thalamuskernen (Abb. 4.1F - I).

4.1.2 Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei nozizeptiver Stimulation

Nach unilateraler Formalininjektion in die Hinterpfoten von Ratten welche anschließend TIDDC erhielten, fanden sich Links-Rechts-Seitenunterschiede in der Färbeintensität im lumbalen Abschnitt des Rückenmarks. Das Hinterhorn auf der Seite ipsilateral zur Formalininjektion weist durchweg eine höhere Färbeintensität auf, als das Hinterhorn kontralateral zur Injektionsseite (Abb. 4.2), wobei die äußersten Schichten im Bereich der *Substantia gelatinosa* besonders intensiv gefärbt sind (Abb. 4.2C). Der Seitenunterschied in der Färbeintensität des lumbalen Hinterhorns erwies sich als statistisch signifikant (Abb. 4.5).



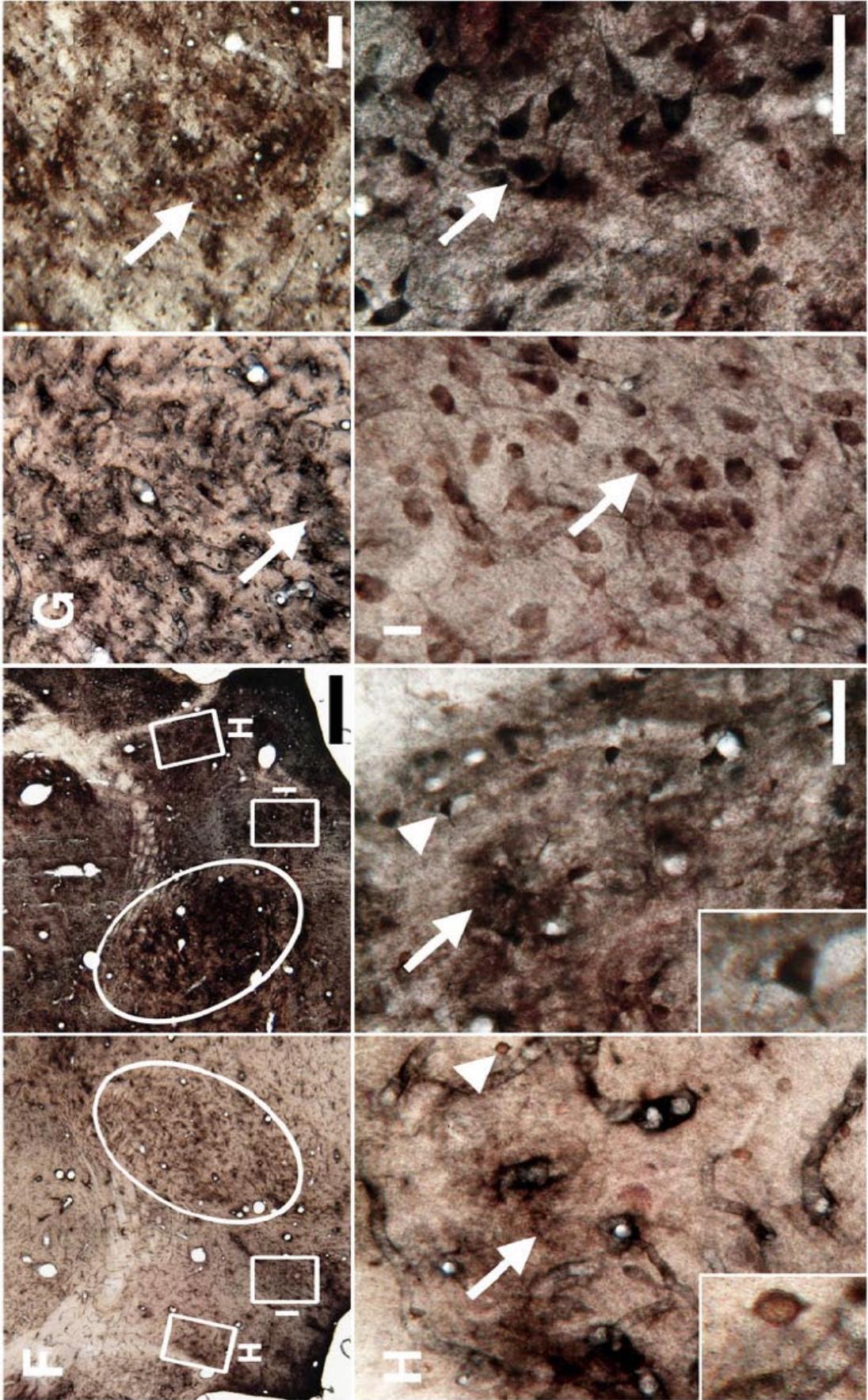


Abb. 4.1: Regionale und zelluläre Verteilungsmuster von TI^+ im Gehirn mongolischer Wüstenrennmäuse nach systemischer Applikation von TIAC vs. TIDDC. Links jeweils die TIAMG-Färbung nach Injektion von TIAC, rechts nach Injektion von TIDDC. (A) Übersichtsaufnahmen von Horizontalschnitten. Detailaufnahmen dieser Horizontalschnitte sind in B bis I gezeigt: (B) Striatum, (C) Hippocampus, (D) primärer auditorischer Cortex, (E) hippocampale CA1-Region, (F) Thalamus, (G) Nucleus pretectalis anterior, (H) dorsaler Nucleus des medialen Geniculatum, (I) medialer Nucleus des medialen Geniculatum. Weiße Rechtecke und Ellipsen indizieren jeweils die Position der Detailaufnahmen in den Übersichtsaufnahmen (D in A, E in C, und G - I in F). Wie die Übersichtsaufnahmen in A zeigen, unterscheiden sich die Färbemuster nach TIAC- und TIDDC-Applikation auf der regionalen Ebene. In dem Tier welches TIAC erhielt, ist die Färbeintensität im Cortex höher als im Striatum oder Thalamus, was in dem Tier welches TIDDC erhielt nicht der Fall ist. Darüber hinaus finden sich nur im Schnitt des TIAC-Tieres dunkle Bänder um die Ventrikel herum (schwarze Pfeile). Detailaufnahmen dieses Unterschiedes in der periventriculären Färbung sind für das Striatum (B) und den Hippocampus (C) gezeigt. Die weißen Pfeile indizieren Färbebänder um die lateralen Ventrikel (LV) herum im TIAC-Tier. Man beachte, dass sich, abgesehen von den periventriculären Bändern, die Färbemuster beider Tiere in B und C gleichen. In C beispielsweise, sind sowohl unter der TIAC- als auch unter der TIDDC-Bedingung, zeldichte Schichten wie die CA1-Pyramidenzellschicht (Py) und die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Gr) intensiver gefärbt als die Umgebung. Die Vergrößerung in E zeigt deutlich wie stark sich die CA1-Pyramidenzellschicht von den benachbarten Schichten abhebt. Man beachte auch die Ähnlichkeiten in der Färbung von Interneuronen (weiße Pfeile) und von Fortsätzen im Stratum radiatum (schwarze Pfeile). Komplexe zelluläre Verteilungsmuster finden sich auch im primären auditorischen Cortex (D), wo beispielsweise die großen Pyramidenzellen der corticalen Schicht V (weiße Pfeile) unter beiden Bedingungen intensiv gefärbt sind. In verschiedenen thalamischen Kernen unterscheiden sich die Färbemuster jeweils nach dem gleichen charakteristischen Muster unter beiden Bedingungen (F - I). In der Übersichtsaufnahme in F ist der Nucleus pretectalis anterior durch die weiße Ellipse abgegrenzt. Innerhalb dieses Kerns ist das Verteilungsmuster, sowohl im TIAC- als auch im TIDDC-Tier, durch eine besonders prominente Färbung des Neuropils (Pfeile in G) gekennzeichnet. Ein äquivalentes Färbemuster findet sich auch innerhalb des dorsalen Kerns des medialen Geniculatum (H). Man beachte auch intensiv gefärbte, mutmaßliche Astrozyten in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen (Pfeilspitzen und Vergrößerung) in H. Das Färbemuster innerhalb des medialen Kerns des medialen Geniculatum (I) hingegen, unterscheidet sich unter beiden Bedingungen drastisch von den in G und H dargestellten Färbemustern. Hier fallen in erster Linie Neurone durch eine besonders intensive Färbung auf (Pfeile). Die Skalierung entspricht 1 mm in A, 500 μ m in B und C, 250 μ m in F sowie 50 μ m in D, E, G, H und I. Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2010).

4.1.3 Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei akustischer Stimulation

Nach akustischer Stimulation mit alternierenden Reintönen (1 und 2 kHz) fanden sich tonotop organisierte Banden hoher Färbintensität im auditorischen Cortex von mongolischen Wüstenrennmäusen, welche vorher TIDDC erhielten. Diese tonotopen Banden treten besonders deutlich in A1 und im anterioren auditorischen Feld (AAF) hervor (Abb. 4.3A) und ähneln damit jenen räumlichen Aktivierungsmustern, die bereits unter Einsatz der 2-DG-Technik (Scheich u. a., 1993), sowie der auf Injektion von TIAc basierenden TIAMG (Goldschmidt u. a., 2004) beschrieben wurden. Nach Stimulation mit amplitudenmoduliertem weißem Rauschen hingegen, konnten keine tonotopen Banden detektiert werden. Stattdessen findet sich eine diffus erhöhte Färbintensität in auditorischen kortikalen Feldern (Abb. 4.3A). Auch auf der laminaren und der zellulären Ebene unterscheiden sich die Färbemuster von mit Reintönen stimulierten und mit weißem Rauschen stimulierten Tieren (Abb. 4.3B und C).

4.1.4 Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei elektrischer Stimulation

Nach intracortikaler Mikrostimulation in A1 von mongolischen Wüstenrennmäusen, welche vorher TIDDC erhielten, ließ sich ipsilateral zur Stimulation eine gegenüber der kontralateralen Seite erhöhte Färbintensität um den Elektrodenkanal herum detektieren (Abb. 4.4A und B), die sich in ventrodorsaler Richtung über weite Bereiche von A1 erstreckt, in rostrokaudaler Richtung jedoch auf einen Bereich von wenigen hundert Mikrometern begrenzt ist.

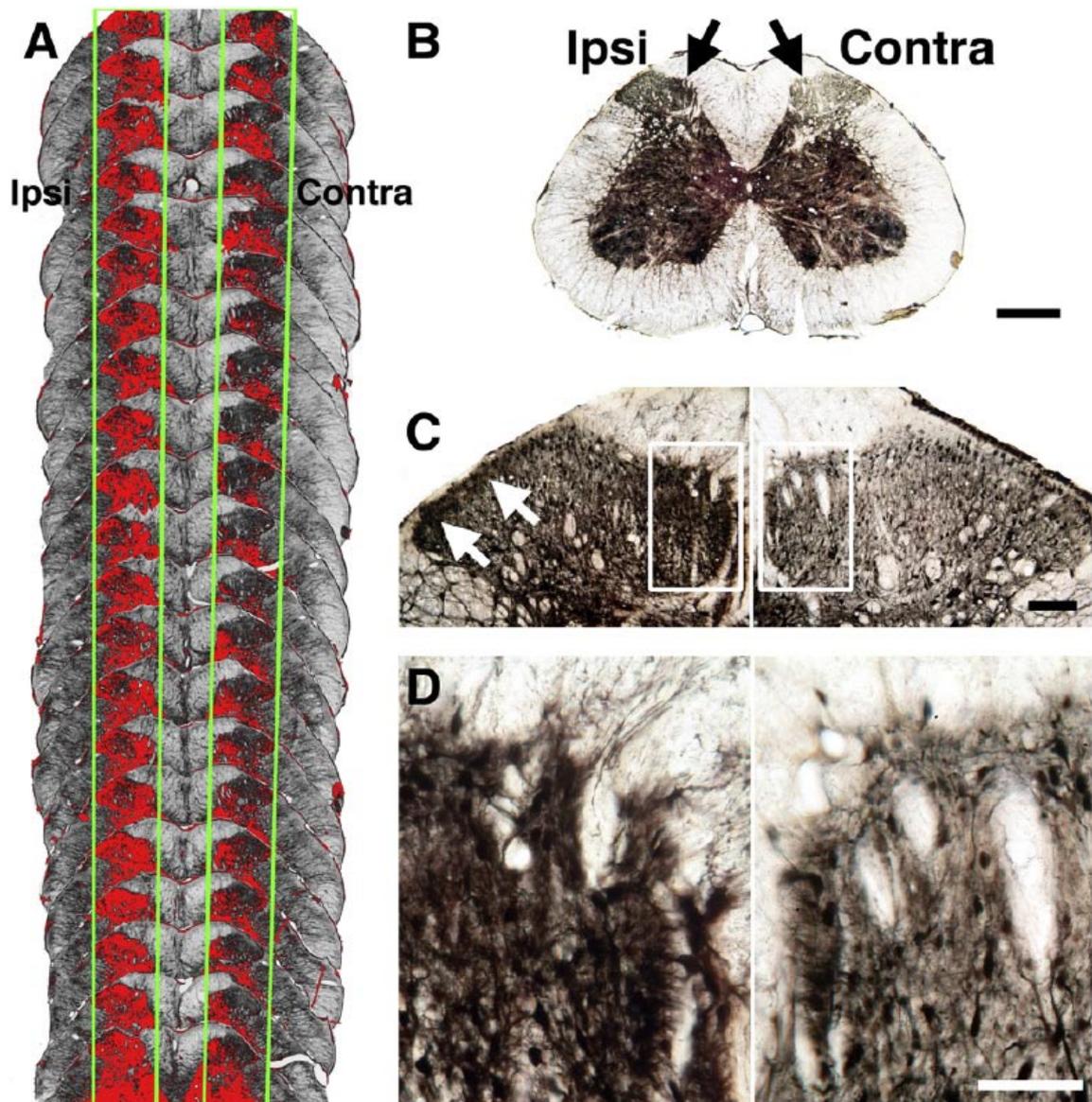


Abb. 4.2: TI^+ -Verteilung im Rückenmark einer Ratte nach systemischer Applikation von TIDDC nach unilateraler Formalininjektion in die Hinterpfote. (A) Aufeinanderfolgende Frontalschnittserie des dorsalen Abschnitts des lumbalen Rückenmarks einer Ratte von rostral (oben) nach kaudal (unten). Die Aufnahmen der jeweiligen Schnittebene wurden in 8 Bit Grauwertdateien (256 Graustufen) konvertiert und Pixel mit einem Grauwert von unter 26 sind rot unterlegt. Das Hinterhorn ist beidseitig durch grüne Linien abgegrenzt. Man beachte den höheren Anteil an Pixeln unterhalb der Schwelle (was einer höheren Färbeintensität entspricht) auf der Seite ipsilateral zur Formalininjektion. (B) Übersichtsaufnahme eines Schnittes der in A dargestellten Serie, sowie Detailaufnahmen (C und D). Man sieht, dass die in A gezeigten Seitenunterschiede sowohl in der äußersten Schicht (weiße Pfeile in C), als auch im medialen Teil des Hinterhorns (weißes Rechteck in C, Detail in D) kulminieren. Die Skalierung entspricht 500 μm in B, 100 μm in C und 50 μm in D. Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2010).

4.1.5 Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC bei epiduraler Muscimolapplikation

Nach topischer, epiduraler Muscimolapplikation auf A1 von anästhesierten mongolischen Wüstenrennmäusen, welche anschließend TIDDC erhielten, konnte auf der Seite ipsilateral zur Muscimolapplikation eine relativ zur kontralateralen Seite deutlich reduzierte Färbeintensität festgestellt werden (Abb. 4.4C und D). Dieser Seitenunterschied in der Färbeintensität von A1 erwies sich als statistisch signifikant (Abb. 4.5).

4.1.6 Verteilung von Thallium nach Injektion von TIDDC im Non-REM-Schlaf und während spontaner Wachphasen

Von Ratten, welche das TIDDC während des Non-REM-Schlafs und während spontaner Wachphasen erhielten, wurde exemplarisch die Tl^+ -Verteilung in A1 ausgewertet. Unter der Non-REM-Schlaf-Bedingung finden sich, relativ zur Gesamtzahl intensiv angefarbter Zellen in A1, signifikant weniger intensiv gefärbte Zellen in der granulären Schicht (IV) als unter der Wach-Bedingung, wohingegen man in den infragranulären Schichten (V und VI) eine signifikant höhere relative Anzahl intensiv gefärbter Zellen unter der Non-REM-Schlaf-Bedingung findet (Abb. 4.6). In den supragranulären Schichten (I, II und III) war kein signifikanter Unterschied in der relativen Anzahl intensiv gefärbter Zellen zwischen den beiden Versuchsbedingungen festzustellen (Abb. 4.6).

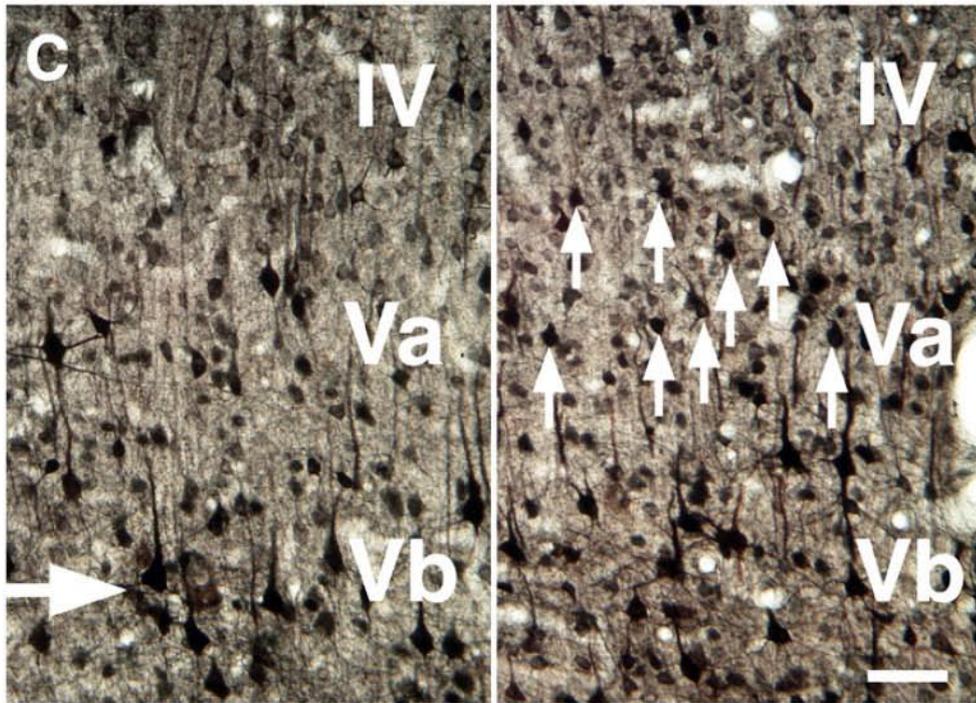
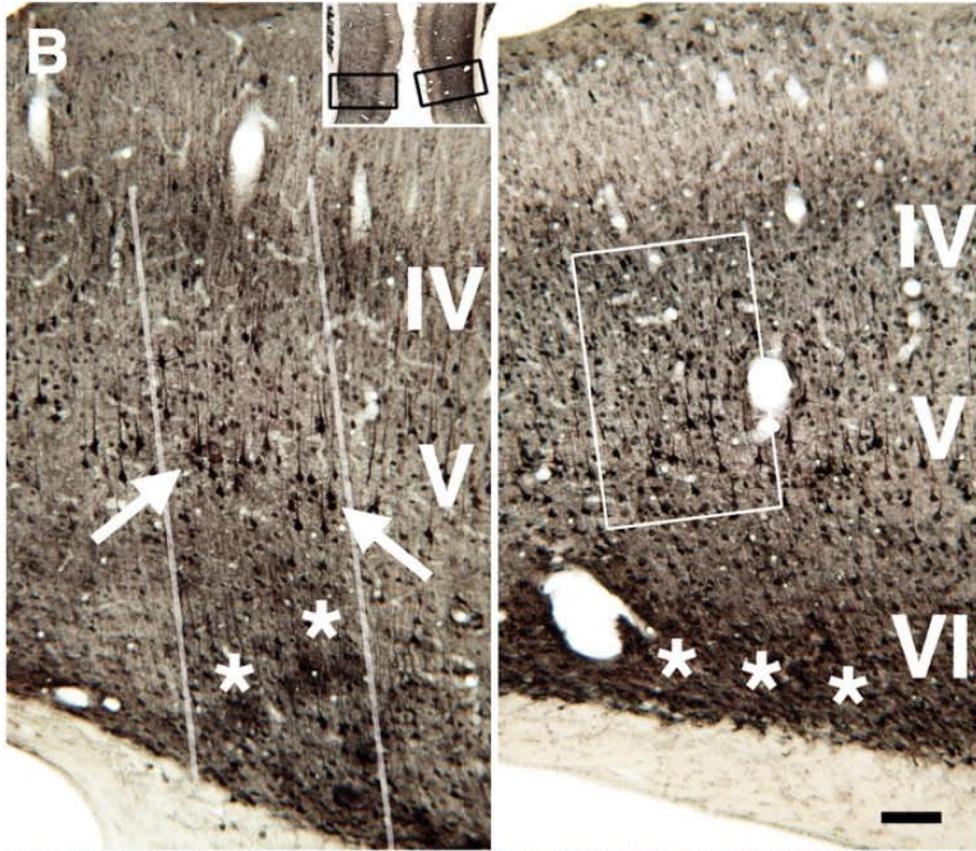
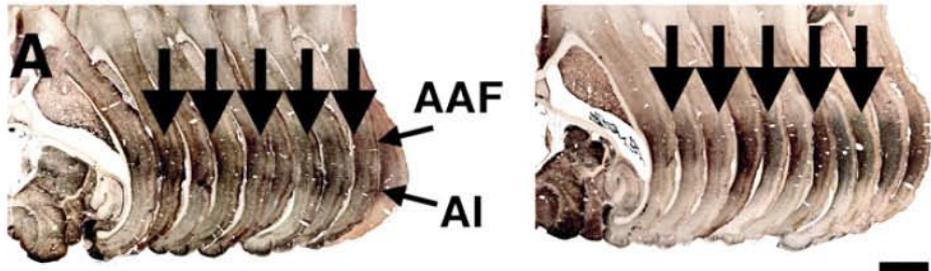


Abb. 4.3: Ti^+ -Verteilung im auditorischen Cortex mongolischer Wüstenrennmäuse nach systemischer Applikation von TIDDC unter akustischer Stimulation mit 1 und 2 kHz Reintönen (jeweils links) vs. amplitudenmoduliertes weißes Rauschen (rechts). (A) Aufeinanderfolgende Horizontalschnittserie von Übersichtsaufnahmen des auditorischen Cortex von dorsal (links) nach ventral (rechts). In beiden Tieren fällt die intensive Färbung im Bereich von A1 und AAF auf (dicke Pfeile). Nur unter der Reintonbedingung hingegen, lassen sich zwei separate Banden hoher Färbeintensität im kaudalen Bereich von A1, sowie im rostralen Bereich von AAF abgrenzen (dünne Pfeile), während die Stimulation mit weißem Rauschen in einer homogenen Färbung entlang des tonotopen Gradienten in A1 und AAF resultierte. (B) und (C): Detailaufnahmen der stimulusabhängigen Färbeunterschiede in A1. Die schwarzen Rechtecke in den Übersichtsaufnahmen in B indizieren die Orte der Detailaufnahmen in B. Man beachte das kolumnäre Färbemuster in dem Reintonstimulierten Tier (weiße Linien). Innerhalb der Kolumne finden sich sowohl in Schicht V (Pfeile in B und C), als auch in Schicht VI (Sterne) korrespondierende Foci hoher Färbeintensität, die in dem mit weißem Rauschen stimulierten Tier nicht auftreten. Stattdessen findet man dort eine lokal unspezifisch hohe Färbeintensität in Schicht VI (Sterne). Zudem scheint in dem Tier welches weißes Rauschen präsentiert bekam, eine vergleichsweise höhere Anzahl mutmaßlicher Interneurone in Schicht V angefärbt zu sein (Pfeile in C), als in dem Reinton-Tier. Die Skalierung entspricht 2 mm in A, 100 μm in B und 50 μm in C. Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2010).

Abb. 4.4: Ti^+ -Verteilung in A1 von mongolischen Wüstenrennmäusen nach systemischer Applikation von TIDDC unter intracortikaler Mikrostimulation (A und B), sowie epiduraler Muscimolapplikation (C und D). (A) Exemplarische Übersichtsaufnahme eines Horizontalschnittes auf Höhe der Stimulationselektrode (Pfeil). Man beachte die relativ zur kontralateralen Seite, lokal erhöhte Färbeintensität im Bereich der Elektrode. (B) Detailaufnahme des Färbemusters im Bereich der Elektrode (Pfeile). (C) Exemplarische Übersichtsaufnahme eines Horizontalschnittes auf Höhe von A1. Die Seite der Muscimolapplikation entspricht der linken Hemisphäre im Bild. Man beachte den deutlichen Färbeunterschied zwischen der Muscimol-behandelten und der unbehandelten Seite. Die schwarzen Rechtecke indizieren die Orte der Detailaufnahmen in D. Die Skalierung entspricht 2 mm in A und C, sowie 100 μm in B und D. Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2010).

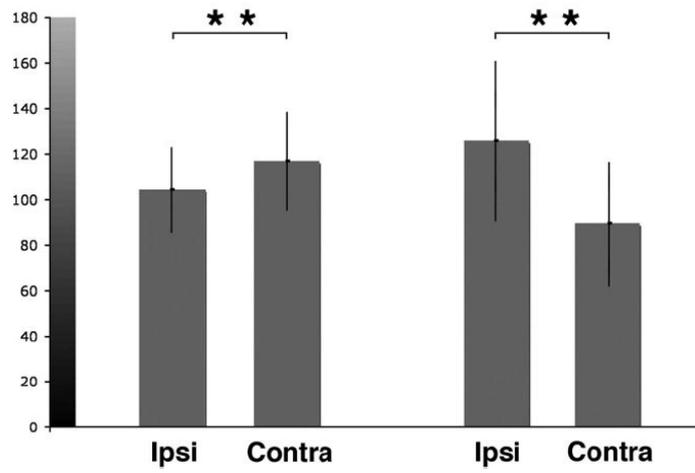
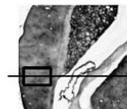
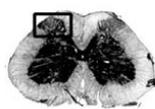
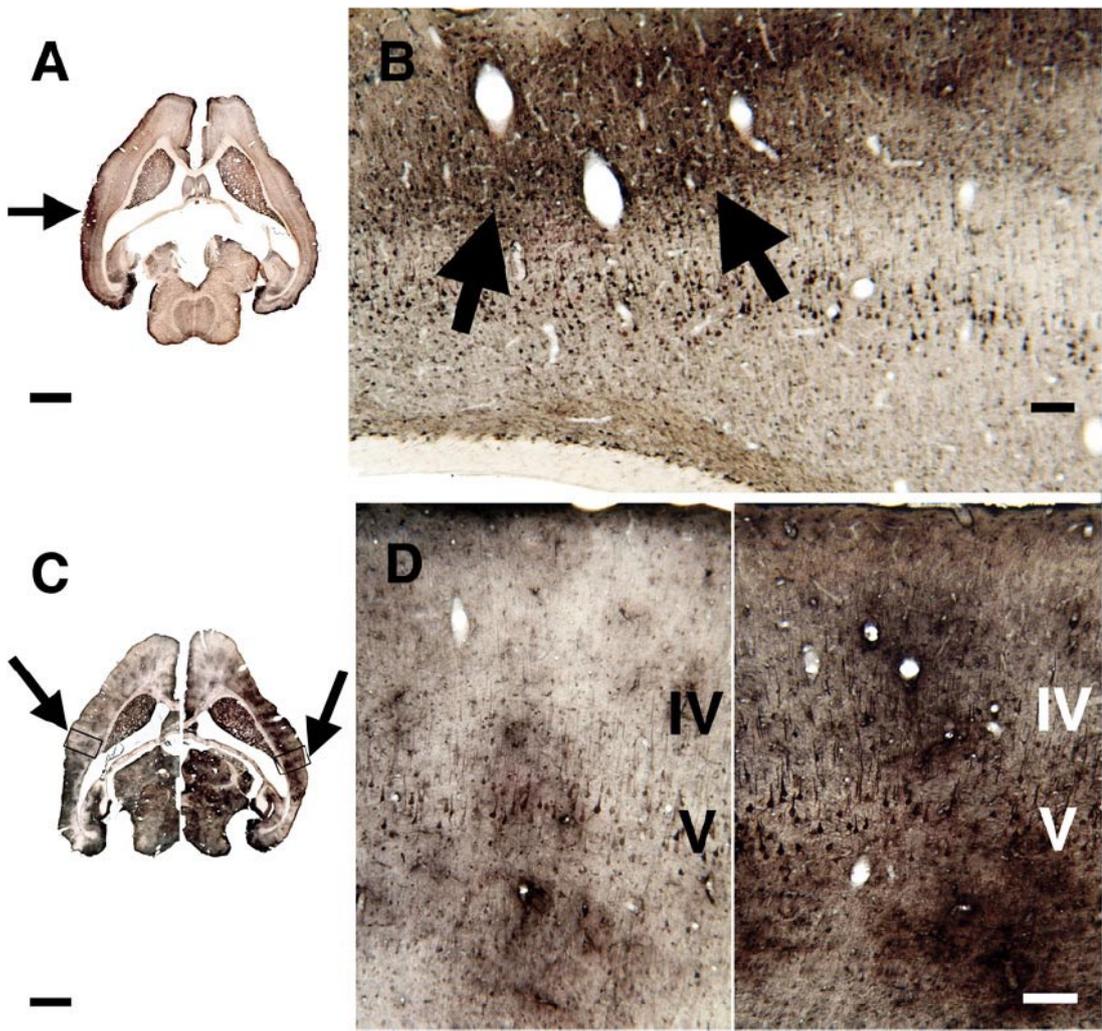
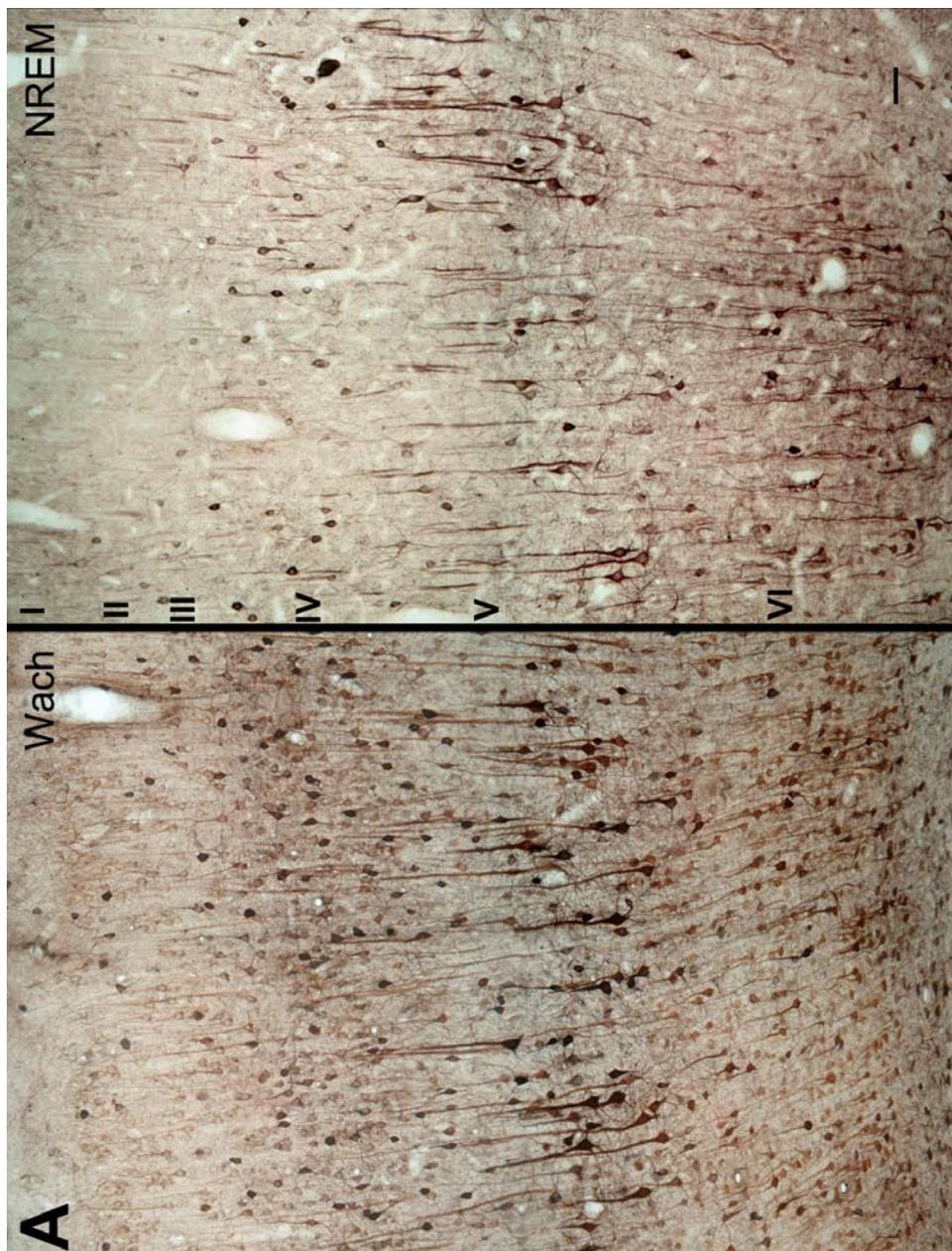


Abb. 4.5: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Seitenunterschiede in der TI^+ -Verteilung nach nozizeptiver Stimulation (links) und epiduraler Muscimolapplikation (rechts). Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Die schwarzen Rechtecke auf den Übersichtsbildern indizieren die Position der ROIs. Die Grauwertskala ist auf der Ordinate aufgetragen, wobei hohe Färbeintensitäten niedrigen Grauwerten entsprechen. Man beachte, dass die Färbeintensität im Hinterhorn des lumbalen Rückenmarks ipsilateral zur Formalininjektion gegenüber der kontralateralen Seite signifikant erhöht ist (t-Test, $p < 0.01$). Im Gegensatz dazu zeigt sich die Färbeintensität in A1 ipsilateral zur Muscimolapplikation gegenüber der kontralateralen Seite signifikant verringert ($p < 0.01$). Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM über die Tiere. Entnommen aus Goldschmidt u. a. (2010).



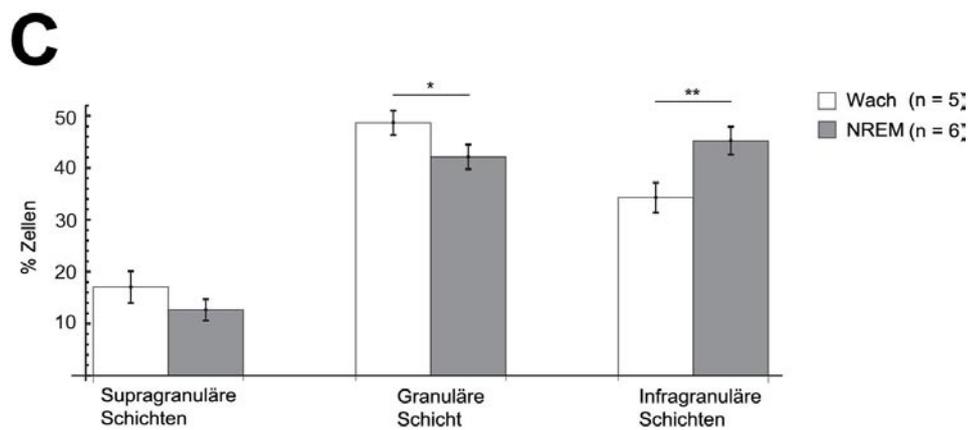
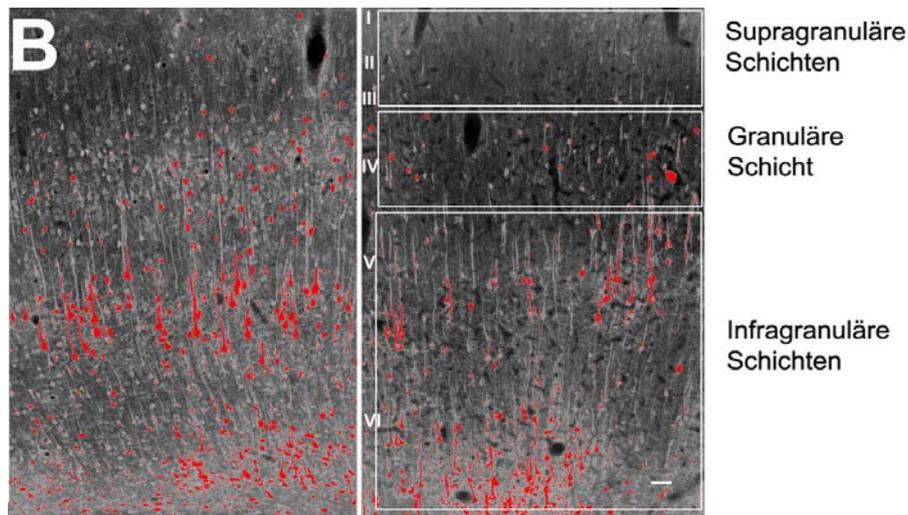


Abb. 4.6: TI^+ -Verteilung in A1 von Ratten nach systemischer Applikation von TIDDC während des Wachzustandes (links) und des Non-REM-Schlafs (rechts). (A) Exemplarische Detailaufnahmen von A1. Unter beiden Bedingungen findet man in den infragranulären Schichten V und VI eine höhere Anzahl intensiv gefärbter Zellen als in den supragranulären Schichten I, II und III. Man beachte außerdem die verringerte Zahl mutmaßlicher Neurone in der granulären Schicht IV des Non-REM-Tieres im Vergleich zur Wach-Bedingung. (B) Invertierte Grauwertbilder der in A gezeigten Detailaufnahmen. Hohe Grauwerte entsprechen einer hohen Färbeintensität. Pixel deren Grauwert mindestens 2 SD über dem mittleren Grauwert von A1 liegt sind rot unterlegt. Die weißen Rechtecke indizieren die ROIs für die statistische Auswertung. (C) Ergebnisse der statistischen Auswertung der in B indizierten ROIs. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Die granuläre Schicht weist unter der Non-REM-Bedingung eine, im Vergleich zur Wach-Bedingung, signifikant verringerte relative Anzahl von Zellkörpern mit einer Färbeintensität oberhalb des Schwellenwertes auf (t-Test, $p < 0.05$). In den infragranulären Schichten hingegen, findet sich im Non-REM-Schlaf eine gegenüber dem Wachzustand signifikant erhöhte Zahl von Zellen oberhalb der Schwelle ($p < 0.01$). Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM über die Tiere. Die Skalierung entspricht 50 μm in A. Wanger u. a. (unveröffentlicht).

4.2 Umverteilung von Thallium im Nager-ZNS nach systemischer Applikation von TIDDC und TIAC

4.2.1 Verteilung von Thallium 5 min versus 24 h nach intravenöser Injektion von TIDDC

Zum Zeitpunkt von 5 min nach systemischer Applikation von TIDDC ist die Tl^{+} -Verteilung im Gehirn von Ratten durch eine relativ geringe Färbeintensität in den Fasertrakten der weißen Substanz, sowie durch hoch differenzierte Muster unterschiedlicher Färbeintensität in Nuclei, Schichten und Zellen der grauen Substanz verschiedener Hirnregionen gekennzeichnet (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). So weisen beispielsweise die Glomerulischicht des Bulbus olfactorius (Abb. 4.7A und Abb. 4.8A), die Neurone in Schicht II, III und V des cingulären Cortex (Abb. 4.7C und Abb. 4.8D), die laterale Habenula (Abb. 4.7C und Abb. 4.8F), die Mamillarkörper (Abb. 4.7D und Abb. 4.8G), der zentrale Kern des inferioren Colliculus (Abb. 4.7E und Abb. 4.8I) und viele Kerne des Hirnstammes, wie der Cochlearis-Kern oder der obere Olivenkern (Abb. 4.7F und Abb. 4.8J), eine relativ hohe Färbeintensität auf. Weiterhin zeigen sich viele mutmaßliche Interneurone in der corticalen Schicht IV, sowie Pyramidenneurone der Schicht V relativ intensiv gefärbt, besonders in primär sensorischen Feldern (Abb. 4.7C und D, Abb. 4.8C). Die Färbeintensität im Hippocampus ist vergleichsweise gering, mit Ausnahme einiger intensiv gefärbter mutmaßlicher Interneurone im Stratum moleculare der CA-1 Region (Abb. 4.7C und D, Abb. 4.8E).

Die Tl^{+} -Verteilung zum Zeitpunkt von 24 h nach Applikation von TIDDC zeigt sich gegenüber der 5 min Verteilung deutlich verändert. Das Gros der Fasertrakte der weißen Substanz ist jetzt relativ intensiv gefärbt (Abb. 4.7C und D, Abb. 4.8B, D und H), wobei das mamillothalamische Faserbündel eine Ausnahme bildet (Abb. 4.8G). Im Gegensatz zur 5 min Verteilung weisen beispielsweise die Körnerzellschicht des Bulbus olfactorius (Abb. 4.7A und Abb. 4.8A), das Striatum (Abb. 4.7B und Abb. 4.8B) und der Hippocampus (Abb. 4.7C und D, Abb. 4.8E) eine relativ hohe Färbeintensität auf. Komplementär

dazu sind viele Hirnregionen die nach 5 min eine relativ hohe Färbeintensität aufwiesen, nach 24 h relativ gering angefärbt, darunter z. B. die Glomerulischicht des Bulbus olfactorius (Abb. 4.7A und Abb. 4.8A), die Mamillarkörper (Abb. 4.7D und Abb. 4.8G), der obere Olivenkern (Abb. 4.7F und Abb. 4.8J) und der zentrale Kern des inferioren Colliculus (Abb. 4.7E und Abb. 4.8I).

Die Unterschiede in der Färbeintensität zwischen den Zeitpunkten 5 min und 24 h wurden exemplarisch für einige Hirnregionen statistisch ausgewertet und erwiesen sich als hochsignifikant (Abb. 4.7G).

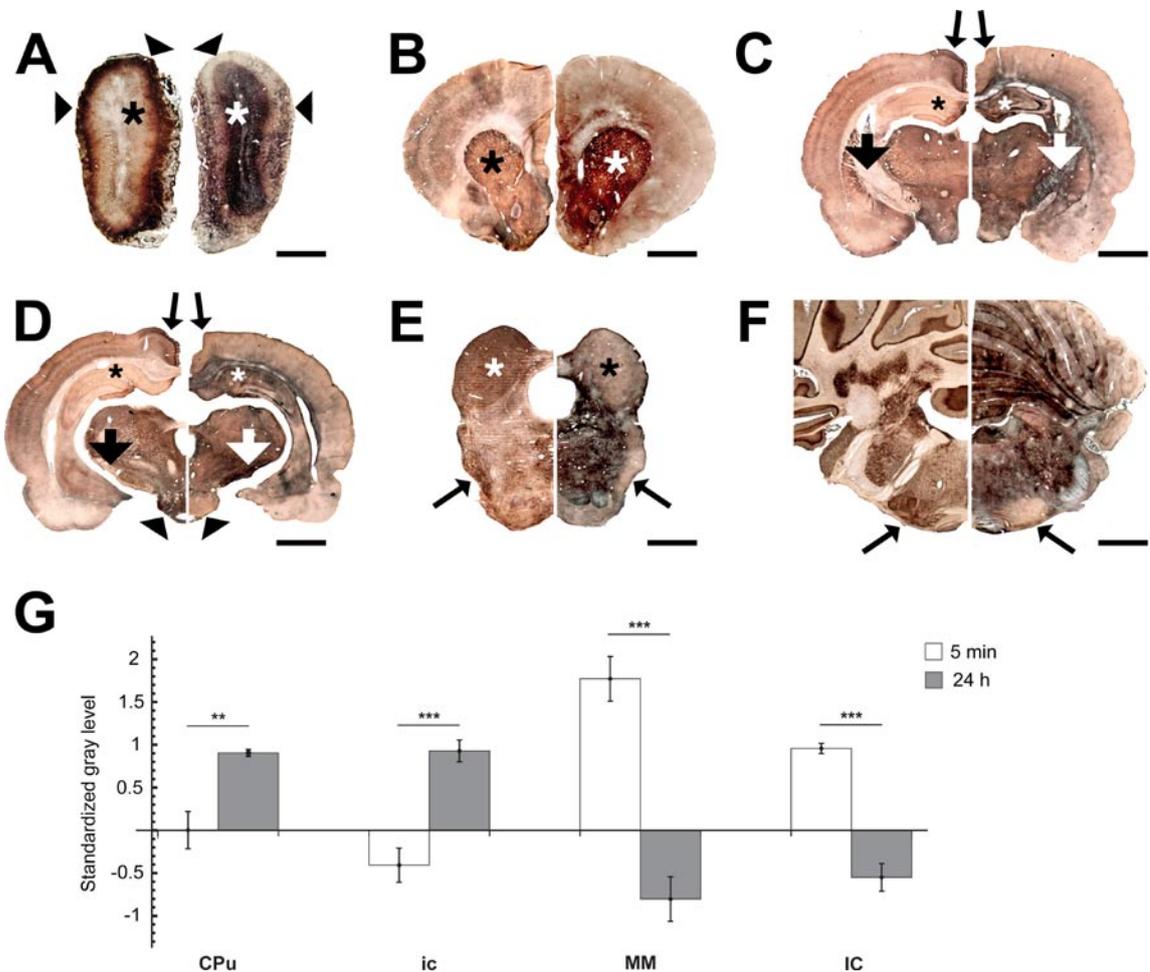
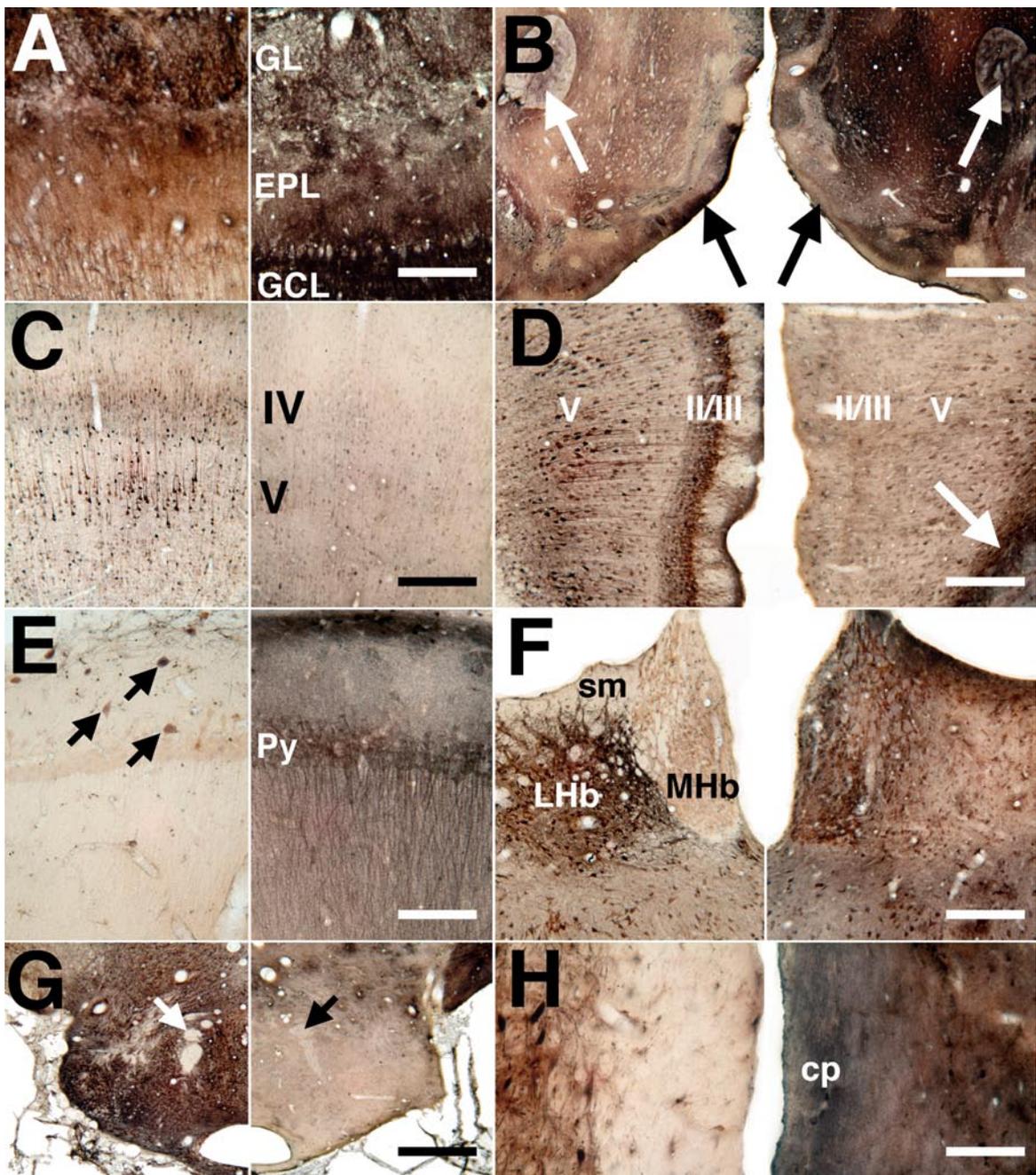


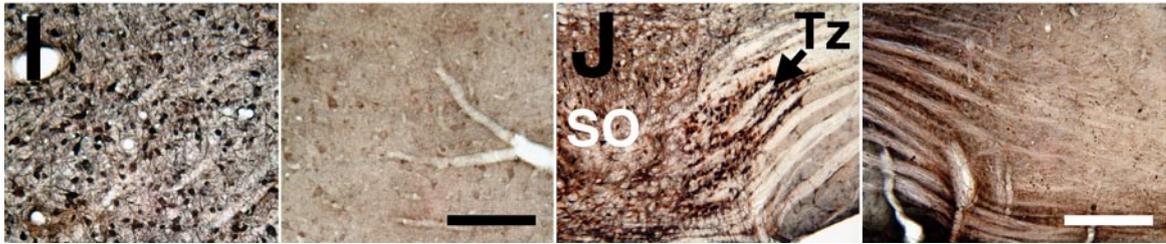
Abb. 4.7: T1⁺-Verteilung im Rattenhirn zum Zeitpunkt von 5 min versus 24 h nach systemischer Applikation von TIDDC. (A) bis (F): Übersichtsaufnahmen von exemplarischen Frontalschnitten einer Hemisphäre auf verschiedenen rostrokaudalen Ebenen, vom Bulbus olfactorius (A) bis zum Hirnstamm bzw. Kleinhirn (F). Die Schnitte sind jeweils spiegelbildlich angeordnet, wobei der 5 min-Schnitt links und der 24 h-Schnitt

rechts zu sehen ist. Man beachte, dass die TI^+ -Verteilung der beiden Zeitpunkte sich zum Teil drastisch unterscheidet. Nach 5 min ist die Glomerulischicht des Bulbus olfactorius relativ intensiv gefärbt (Pfeilspitzen in A), die Körnerzellschicht hingegen relativ gering gefärbt (Sterne), während nach 24 h das umgekehrte Färbemuster zu beobachten ist. Im Cortex differieren die Färbemuster zum Zeitpunkt 5 min je nach Region und cortikaler Schicht, wobei cinguläre und retrospleniale Areale relativ intensiv gefärbt sind (dünne Pfeile in C und D). Insgesamt ist die Färbeintensität nach 5 min im Cortex höher als im Hippocampus. Nach 24 h hingegen ist die Färbeintensität im Cortex niedriger als im Hippocampus (Sterne in C und D) oder im Striatum (Stern in B) und die Unterschiede zwischen corticalen Regionen und Schichten sind nicht mehr vorhanden. In vielen subcortikalen Regionen, wie den Mamillarkörpern (Pfeilspitzen in D), dem inferioren Colliculus (Sterne in E), dem lateralen lemniscalen Kern (Pfeile in E) oder dem oberen Olivenkern (Pfeile in F), ist die Färbeintensität nach 5 min relativ hoch, nach 24 h hingegen relativ gering. Im Gegensatz dazu ist die Färbeintensität in den Fasertrakten der weißen Substanz nach 5 min relativ gering, nach 24 h jedoch in vielen Fällen relativ hoch, so z. B. in der Capsula interna (dicke Pfeile in C) oder dem Pedunculus cerebri (dicke Pfeile in D). (G) Statistische Auswertung der Färbeunterschiede zwischen den Zeitpunkten 5 min und 24 h für das Striatum (CPu), die Capsula interna (ic), die Mamillarkörper (MM) und den inferioren Colliculus (IC). Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Die Ordinate indiziert die über die Tiere gemittelten, Z-normalisierten und invertierten Grauwerte der entsprechenden ROIs. Alle Unterschiede sind statistisch signifikant (t-Test, $**p < 0.005$, $***p < 0.001$). Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM über die Tiere. Die Skalierung entspricht 500 μm in A, sowie 1 mm in B bis F. Entnommen aus Wanger u. a. (2012).

Abb. 4.8: Detailaufnahmen der TI^+ -Verteilung im Rattenhirn zum Zeitpunkt von 5 min (links) versus 24 h (rechts) nach systemischer Applikation von TIDDC. Die Aufnahmen stammen von den in Abb. 4.7 gezeigten Frontalschnitten. Zu sehen sind der Bulbus olfactorius (A), das Striatum und das Tuberculum olfactorium (B), der somatosensorische und der retrospleniale Cortex (C und D), der Hippocampus (E), die Habenula (F), die Mamillarkörper (G), der Pedunculus cerebri (H), der zentrale Kern des inferioren Colliculus (I), sowie der obere Olivenkern und der Trapezkörper (J). In der Glomerulischicht des Bulbus olfactorius (GL in A), der lateralen Habenula (LHb in F), den Mamillarkörpern (G), dem zentralen Kern des inferioren Colliculus (I) und dem oberen Olivenkern (SO in J) ist die Färbeintensität nach 5 min relativ hoch und nach 24 h relativ gering. In der Körnerzellschicht des Bulbus olfactorius (GCL in A), der medialen Habenula (MHb in F), dem Hippocampus (E) und in vielen Fasertrakten der weißen Substanz wie der anterioren Kommissur (weißer Pfeil in B), der Stria medullaris (sm in F) oder dem Pedunculus cerebri (cp in H), ist die Färbeintensität hingegen nach 5 min relativ gering und nach 24 h relativ hoch. Man beachte, dass manche Faserzüge wie der mamillothalamische Trakt (Pfeile in G), sowohl nach 5 min wie auch nach 24 h eine relativ geringe Fär-

beintensität aufweisen. Im Cortex findet man nach 5 min noch deutliche Färbeunterschiede zwischen corticalen Schichten, die indes nach 24 h nicht mehr auszumachen sind (C und D). In der hippocampalen CA1-Region ist die Färbeintensität nach 5 min relativ gering (E), jedoch sind einige mutmaßliche Interneurone relativ stark angefärbt (Pfeile in E). Nach 24 h ist die gesamte CA1-Region relativ intensiv angefärbt, insbesondere die Pyramidenschicht (Py in E). Die Färbemuster ändern sich auch auf sehr kleinen räumlichen Skalen mit zum Teil scharf umrissenen anatomischen Grenzen. Man vergleiche beispielsweise die relativ intensive Färbung der oberen Schicht des Tuberculum olfactorium nach 5 min, mit der relativ geringen Färbeintensität nach 24 h (schwarze Pfeile in B). Die Skalierung entspricht 100 μm in A, 200 μm in B, C, D, F und J, 100 μm in E und I, 400 μm in G, sowie 50 μm in H. Entnommen aus Wanger u. a. (2012).



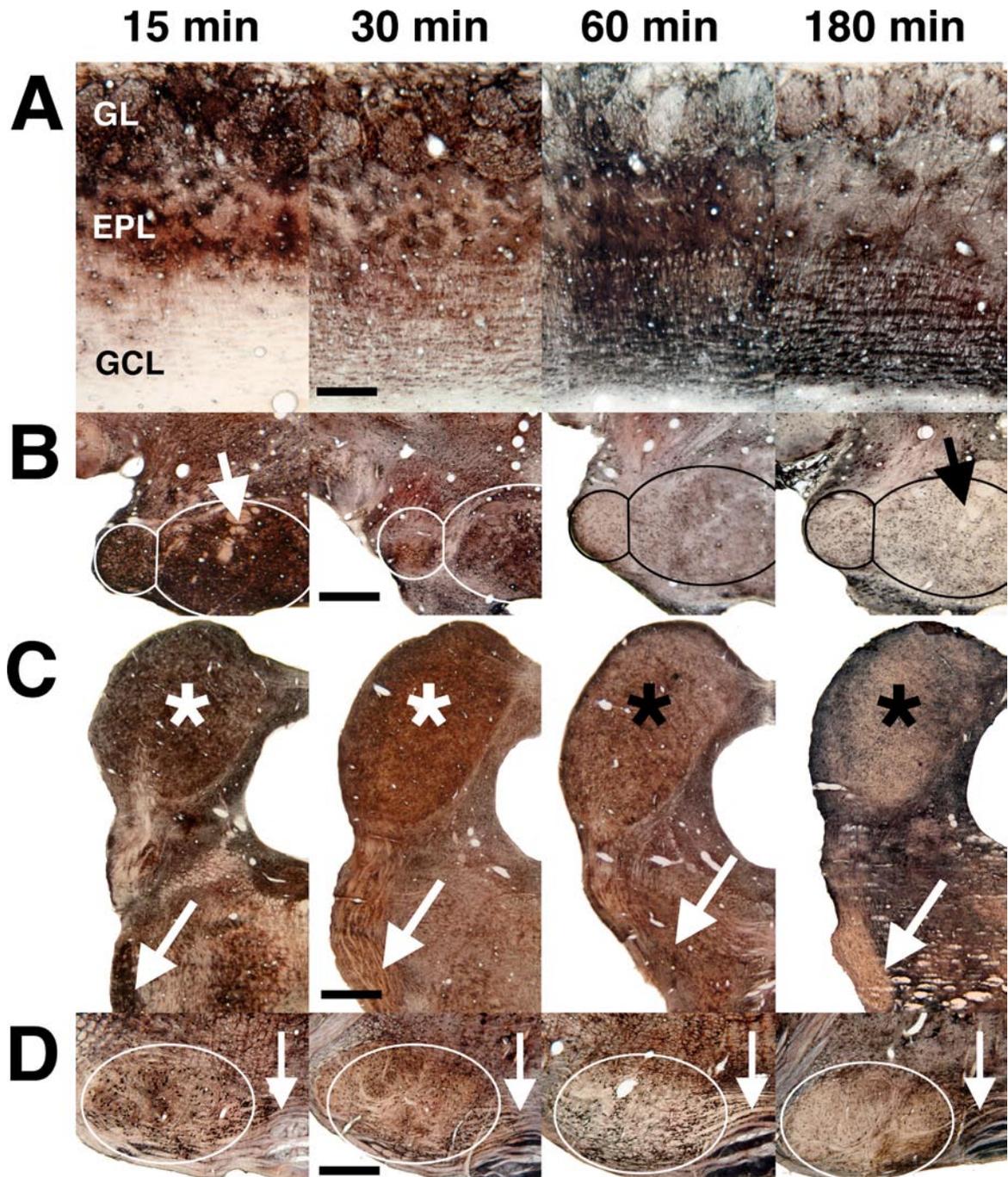


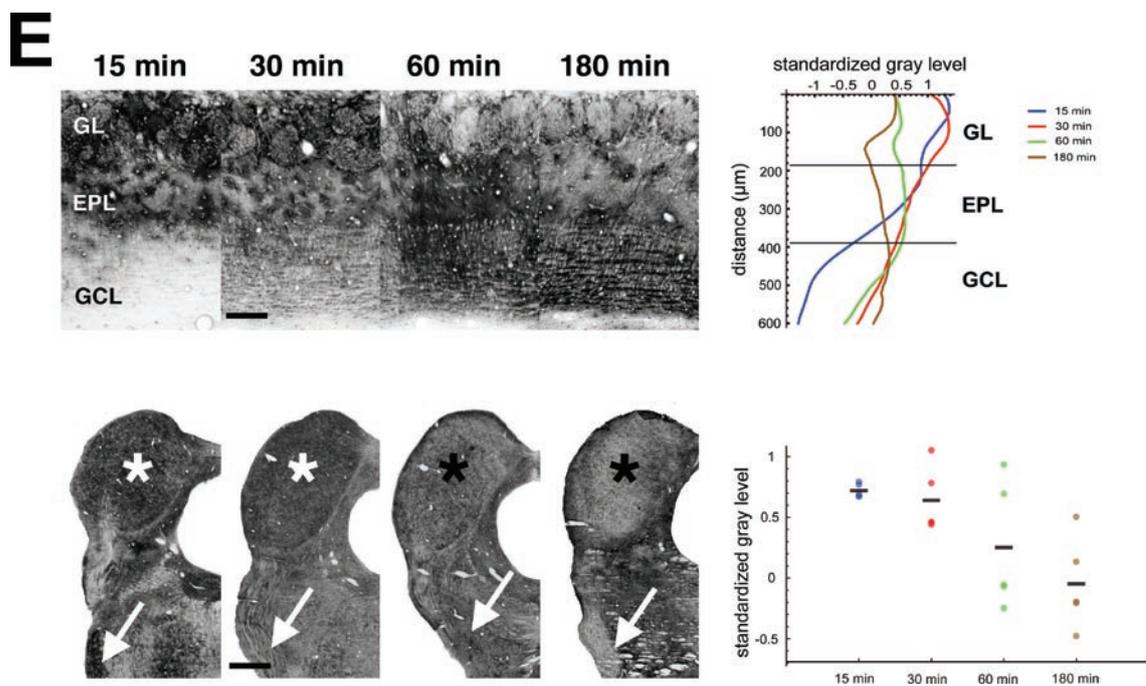
4.2.2 Verteilung von Thallium 15 min, 30 min, 60 min und 180 min nach intravenöser Injektion von TIDDC

Während die Tl^+ -Verteilung im Rattenhirn zum Zeitpunkt von 15 min nach systemischer Applikation von TIDDC der 5 min-Verteilung ähnelt, stellen die Tl^+ -Verteilungen nach 30 min und 60 min graduelle Übergänge zwischen der 15 min-Verteilung und der 180 min-Verteilung dar (Abb. 4.9A - D). Diese graduellen Übergänge zwischen den Zeitpunkten wurden exemplarisch für den Bulbus olfactorius und den inferioren Colliculus quantifiziert (Abb. 4.9E).

Abb. 4.9: Tl^+ -Verteilung im Rattenhirn zu verschiedenen Zeitpunkten nach systemischer Applikation von TIDDC. (A) bis (D): Repräsentative Frontalschnitte des Bulbus olfactorius (A), der lateralen und medialen Mamillarkörper (kleine und große Ellipsen in B), des inferioren Colliculus (Sterne in C), des lateralen lemniscalen Kerns (Pfeile in C), sowie des oberen Olivenkerns (Ellipse in D). Man beachte, dass die relativen Färbeintensitäten zum Zeitpunkt 15 min, den relativen Färbeintensitäten zum Zeitpunkt 5 min ähneln, während die relativen Färbeintensitäten zum Zeitpunkt 180 min, eher dem Färbemuster nach 24 h entsprechen (siehe Abb. 4.7 und Abb. 4.8 zum Vergleich). Die Färbemuster ändern sich graduell mit zunehmendem Zeitintervall zwischen TIDDC-Applikation und Perfusion. In der Pyramidenbahn beispielsweise nimmt die relative Färbeintensität mit der Zeit zu (Pfeile in D), während die relative Färbeintensität im mamillothalamischen Faserbündel über das gesamte Zeitintervall betrachtet relativ niedrig bleibt (Pfeile in B). (E) Quantifizierung der graduellen Änderungen der Tl^+ -Verteilungsmuster im Bulbus olfactorius (oben) und im inferioren Colliculus (unten). Die Quantifizierung erfolgte wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Links sind jeweils invertierte Grauwertbilder der in A und C gezeigten Frontalschnitte dargestellt. Rechts daneben die Z-normalisierten und über die Tiere gemittelten ($n = 5$ für jeden Zeitpunkt), relativen Färbeintensitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Graphen im oberen Diagramm beschreiben jeweils die relativen Färbeintensitäten zu den

verschiedenen Zeitpunkten als Funktion der Distanz über die Schichten des Bulbus olfactorius. Die untere Graphik beschreibt den graduellen Abfall der relativen Färbintensität im inferioren Colliculus mit zunehmender Zeitdauer. Die Farbcodierung der Zeitpunkte in der unteren Grafik entspricht der des oberen Diagramms. Die Kreise indizieren die Mittelwerte individueller Tiere, die schwarzen Balken indizieren den Mittelwert über die Tiere. Man beachte, dass sowohl im Falle des Bulbus olfactorius, als auch im Falle des inferioren Colliculus, die über die Tiere gemittelten Werte den in A und C dargestellten Trend quantitativ untermauern. Die Skalierung entspricht 100 μm in A, sowie 400 μm in B, C und D. Verändert nach Wanger u. a. (2012).





4.2.3 Verteilung von Thallium zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von TIAC

Zum Zeitpunkt von 15 min nach systemischer Applikation von TIAC spiegelt die regionale TI^+ -Verteilung im Gehirn von mongolischen Wüstenrennmäusen die oben beschriebenen Unterschiede in der BHS- bzw. BLS-Durchlässigkeit wieder (Abb. 4.10), wobei auf der zellulären Ebene keine Unterschiede zu der TI^+ -Verteilung zum Zeitpunkt von 5 min nach TIDDC-Applikation festzustellen sind (siehe Abb. 4.1). 24 h nach TIAC-Applikation entsprechen sowohl die regionale als auch die zelluläre TI^+ -Verteilung, der 24 h-Verteilung nach Injektion von TIDDC (Abb. 4.10).

Zum Zeitpunkt von 180 min nach der Injektion von TIAC hingegen entspricht die von periventrikulären Färbegradienten geprägte regionale TI^+ -Verteilung der 15 min-Verteilung, während die zelluläre TI^+ -Verteilung der 24 h-Verteilung ähnelt (Abb. 4.11).

Abb. 4.10: TI^+ -Verteilung im Gehirn mongolischer Wüstenrennmäuse zum Zeitpunkt von 15 min versus 24 h nach systemischer Applikation von TIAC. (A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Horizontalschnitt-

ten. (B) bis (E): Detailaufnahmen vom Bulbus olfactorius (B), inferioren Colliculus (C), Cortex (D) und Hippocampus (E). Die Schnitte sind jeweils spiegelbildlich angeordnet, wobei der 15 min-Schnitt links und der 24 h-Schnitt rechts zu sehen ist. Nach 15 min sind die typischen dunklen Bänder um die Ventrikel herum zu erkennen (Pfeile in A). Man beachte, dass die laminare und zelluläre TI^+ -Verteilung zu beiden Zeitpunkten jeweils der Verteilung zu frühen (5 min) bzw. späten (24 h) Zeitpunkten nach Injektion von TIDDC entspricht (vergleiche mit Abb. 4.7 und 4.8). So findet man beispielsweise in der Glomerulischicht bzw. der Körnerzellschicht des Bulbus olfactorius (GL und GCL in B), im inferioren Colliculus (C) und in der hippocampalen CA1-Region (E) nach 24 h ein, im Vergleich zum 15 min Zeitpunkt, invertiertes Färbemuster. Im Cortex dagegen, sind die laminaren Unterschiede der 15 min-Verteilung nach 24 h kaum noch vorhanden (D). Die Skalierung entspricht 2 mm in A, 100 μ m in B, D und E, sowie 400 μ m in C. Entnommen aus Wanger u. a. (2012).

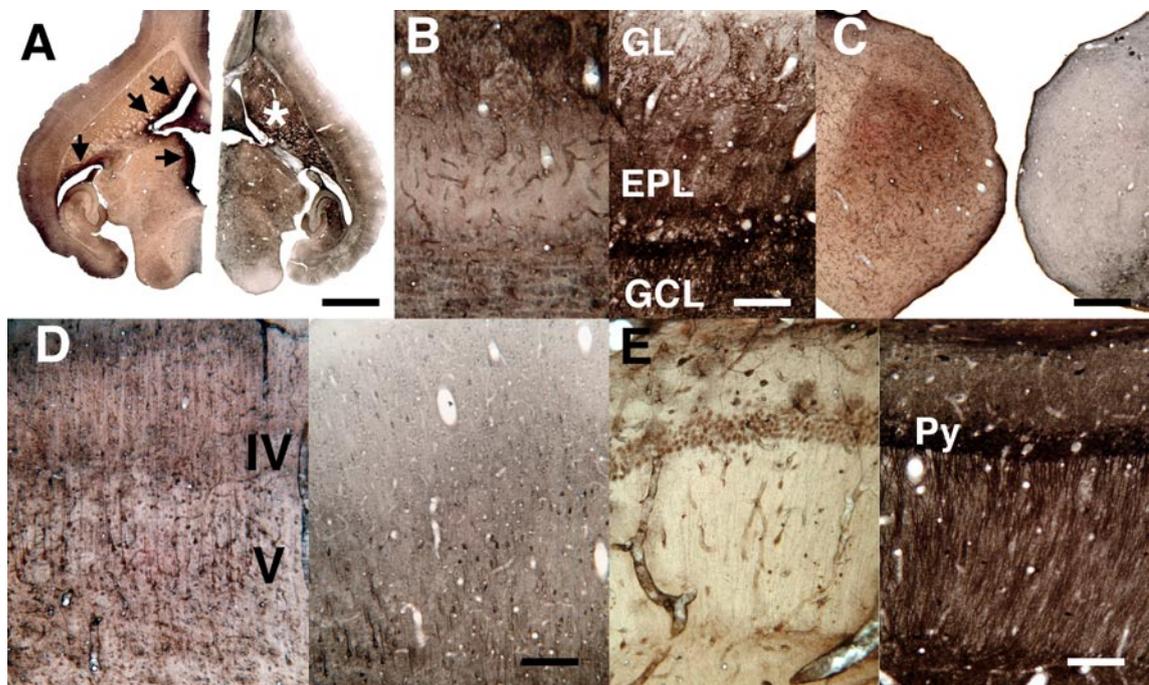
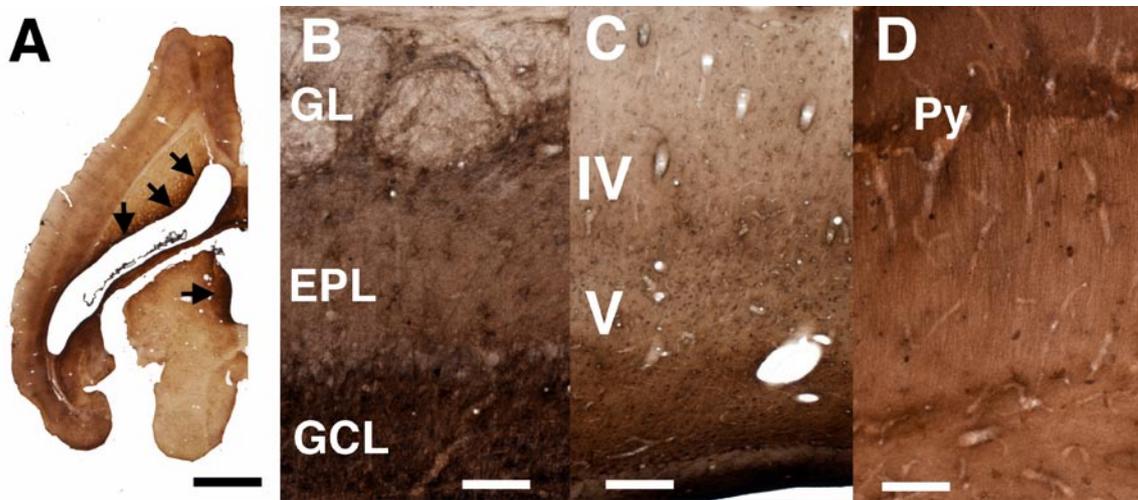


Abb. 4.11: TI^+ -Verteilung im Gehirn einer mongolischen Wüstenrennmaus 180 min nach systemischer Applikation von TIAC. (A) Repräsentative Übersichtsaufnahme eines Horizontalschnittes. (B) bis (D): Detailaufnahmen vom Bulbus olfactorius (B), Cortex (C) und Hippocampus (D). Man beachte, dass die regionale TI^+ -Verteilung nach 180 min der frühen, durch unterschiedliche BHS-Durchlässigkeiten geprägten, 15 min Verteilung entspricht. Zum einen sind die typischen dunklen Bänder um die Ventrikel herum noch deutlich zu erkennen (Pfeile in A), zum anderen weisen beispielsweise große Teile des Cortex eine höhere relative Färbeintensität auf als der überwiegende Teil des Striatums (vergleiche Abb. 4.1 und Abb. 4.10). Auf der laminaren und zellulären Ebene hingegen, ähnelt die 180 min-Verteilung der 24 h Verteilung. So zeigen z.

B. die Glomerulischicht des Bulbus olfactorius (GL in B) und die cortikale Schicht IV (C) eine relativ geringe Färbeintensität, die Körnerzellschicht des Bulbus olfactorius (GCL in B) und die hippocampale CA1-Region (D) hingegen eine relative hohe Färbeintensität. Die Skalierung entspricht 2 mm in A, sowie 100 μm in B, C und D. Entnommen aus Wanger u. a. (2012).

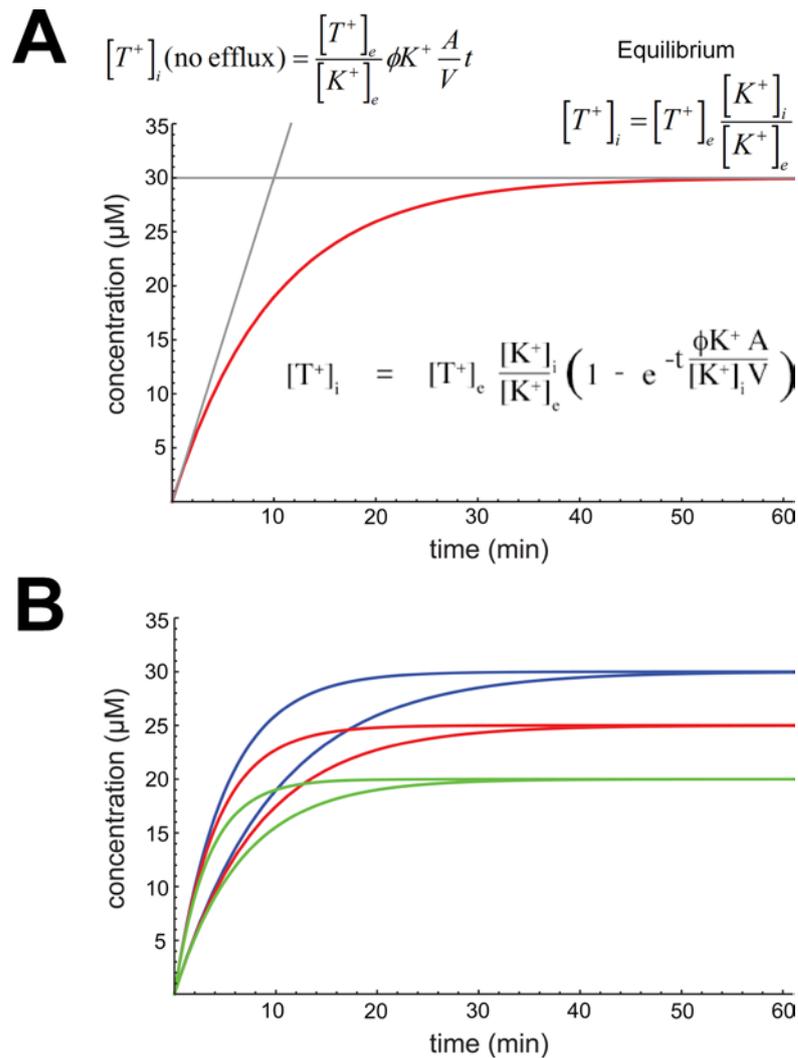


4.2.4 Modellierung der Thalliumaufnahme *in vitro*

Unter den Bedingungen des *in vitro*-Modells, steigt die intrazelluläre Tracerkonzentration in frühen Phasen, wo der Ausstrom des Tracers aus dem Modellneuron vernachlässigbar klein ist, annähernd linear als Funktion der Zeit an (Abb. 4.12A). Sobald Ein- und Ausstrom des Tracers im Gleichgewicht sind (Äquilibrium), entspricht das Verhältnis von intra- zu extrazellulärer Tracerkonzentration dem Verhältnis von intra- zu extrazellulärer K^+ -Konzentration (Abb. 4.12A). Folglich entsprechen die intrazellulären Tracerkonzentrationen innerhalb einer heterogenen Neuronenpopulation, im Äquilibrium den jeweiligen intrazellulären K^+ -Konzentrationen (Abb. 4.12B). Unterschiede in den transmembranen K^+ -Strömen der verschiedenen Neurone lassen sich dagegen nur in der Anfangsphase nach der Tracerapplikation detektieren (Abb. 4.12B).

Abb. 4.12: Aufnahme eines idealen K^+ -Analogons in Modellneurone *in vitro*. (A) Unter konstanten Bedingungen (Steady-state) *in vitro* steigt die intrazelluläre Tracerkonzentration in frühen Phasen nach der Tracerapplikation annähernd linear an, da der Ausstrom des Tracers vernachlässigbar klein ist. Sind Ein- und

Ausstrom des Tracers jedoch im Äquilibrium, dann entspricht das Verhältnis von intra- zu extrazellulärer Tracerkonzentration dem Verhältnis von intra- zu extrazellulärer K^+ -Konzentration. (B) Traceraufnahmekurven dreier Modellneurone die sich in ihrer intrazellulären K^+ -Konzentration unterscheiden (blau: 120 mM, rot: 100 mM, grün: 80 mM). Für jedes Neuron sind die Aufnahmekurven für zwei verschiedene K^+ -Ströme dargestellt (5 und 10 $\text{pmol} / \text{cm}^2 \times \text{s}$). Man beachte, dass zu frühen Zeitpunkten Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration die Unterschiede in den K^+ -Strömen widerspiegeln, während zu späteren Zeitpunkten (Äquilibrium) Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration die Unterschiede in der intrazellulären K^+ -Konzentration reflektieren. Entnommen aus Wanger u. a. (2012).



4.2.5 Modellierung der Thalliumaufnahme *in vivo*

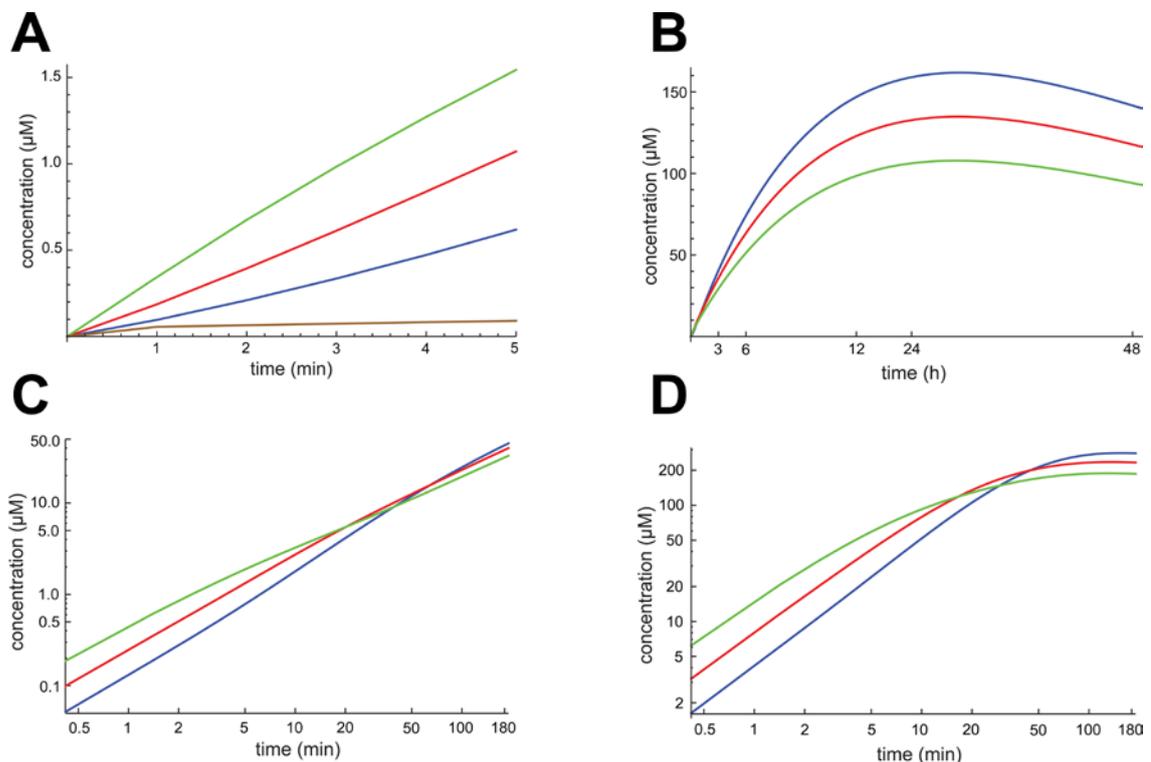
Die Traceraufnahme im *in vivo*-Modell unterliegt grundsätzlich denselben Prinzipien wie *in vitro*. Während der initialen Aufnahmephase des Tracers spiegeln unterschiedliche

intrazelluläre Tracerkonzentrationen verschiedener Neurone die Unterschiede in den transmembranen K^+ -Strömen wieder (Abb. 4.13A und C). In späteren Phasen, eingeschlossen die gesamte Auswaschperiode des Tracers aus dem Hirn, reflektieren Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration jeweils die Unterschiede in der intrazellulären K^+ -Konzentration der Neurone (Abb. 4.13 B und C). Wird die Traceraufnahme im Modell-ZNS zu frühen Zeitpunkten noch durch Unterschiede in der BHS-Permeabilität beeinflusst, ist die Verteilung des Tracers zu späteren Zeitpunkten dagegen unabhängig von der BHS (Abb. 4.14A). Erhöht man die BHS-Permeabilität substantiell um die experimentelle Situation bei Applikation von TIDDC zu simulieren, dann entsprechen die wesentlichen Aspekte der Aufnahmekurve einzelner Modellneurone nach wie vor denen des *in vitro*-Modells (4.13D). Förderhin wirken sich potenzielle Unterschiede in der extrazellulären K^+ -Konzentration nur marginal auf die Traceraufnahmekurven der Neurone aus (Abb. 4.14B).

Der Abgleich der modellierten Aufnahmekurven mit den empirischen Werten erfolgte über das Anpassen einer monoexponentiellen Funktion wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben. Die Zeitkonstanten τ der empirischen Daten betragen 31 min für die Glomeruli-schicht, sowie 55 min für den inferioren Colliculus. Für ein Modellneuron mit einer intrazellulären K^+ -Konzentration von 100 mM ergab sich ein Wert von 28 min.

Abb. 4.13: Aufnahme eines idealen K^+ -Analogons *in vivo*. Gezeigt sind die Aufnahmekurven für drei Modellneurone, welche sich in ihrer intrazellulären K^+ -Konzentration (blau: 120 mM, rot: 100 mM, grün: 80 mM), sowie in ihren K^+ -Strömen (blau: 2.5 pmol / $cm^2 \times s$, rot: 5 pmol / $cm^2 \times s$, grün: 10 pmol / $cm^2 \times s$) unterscheiden. Die Traceraufnahme wurde entsprechend des in Abb. 3.4 schematisierten Kompartimentmodells modelliert. Für Details zu den Transferkoeffizienten und Modellparametern siehe Abschnitt 3.5.2 und Anhang 2. (A) Aufnahmekurven der drei Modellneurone und des EZR (braun) für die ersten 5 min nach Applikation des Tracers. Während die Traceraufnahme im EZR bereits nach 1 min äquilibriert, spiegeln die Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration die jeweiligen Unterschiede in den K^+ -Strömen wieder. (B) Aufnahmekurven der drei Modellneurone für den Zeitraum von 48 h nach Applikation des Tracers. Die intrazelluläre Tracerkonzentration steigt über mehrere Stunden an und erreicht nach etwa 24 h

das Äquilibrium. Man beachte, dass die jeweiligen Äquilibriumsverteilungen des Tracers, die Unterschiede in der intrazellulären K^+ -Konzentration der Neurone reflektieren. (C) Aufnahmekurven der drei Modellneurone für den Zeitraum von 180 min nach Applikation des Tracers. Man beachte die doppelt-logarithmische Skalierung. Während der initialen Aufnahmephase des Tracers spiegeln Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration die Unterschiede in den K^+ -Strömen wieder. Mit fortschreitender Zeitdauer werden die Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration zunehmend durch die Unterschiede in der intrazellulären K^+ -Konzentration beeinflusst, obwohl die intrazelluläre Tracerkonzentration innerhalb des betrachteten Zeitraumes in allen Neuronen kontinuierlich ansteigt. (D) Aufnahmekurven der drei Modellneurone für den Zeitraum von 180 min nach Applikation des Tracers, unter Bedingungen substanziiell erhöhter BHS-Permeabilität. Man beachte die doppelt-logarithmische Skalierung. Die K^+ -Permeabilität der BHS wurde um einen Faktor 60 erhöht, was dem Unterschied in der Thalliumdosis in Experimenten mit TIDDC vs. TIAc entspricht. Wie in bereits in C dargestellt, spiegeln auch hier Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration zu frühen Zeitpunkten die Unterschiede in den neuronalen K^+ -Strömen wieder, während Unterschiede in der intrazellulären Tracerkonzentration zu späteren Zeitpunkten zunehmend durch die Unterschiede in der intrazellulären K^+ -Konzentration beeinflusst werden. Man beachte, dass in C und D die Abszisse bei $t > 0$ beginnt. Verändert nach Wanger u. a. (2012).



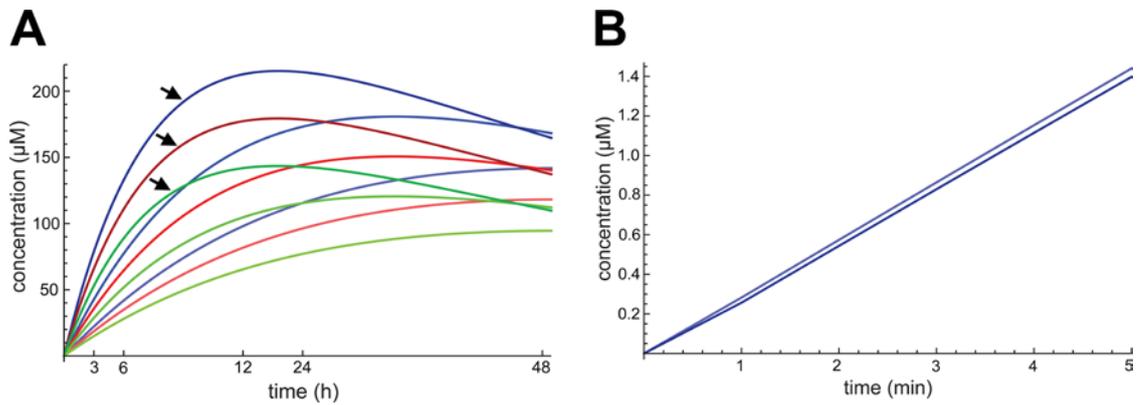


Abb. 4.14: Aufnahme eines idealen K^+ -Analogons *in vivo*. (A) Effekt unterschiedlicher BHS-Leitfähigkeiten. Gezeigt sind die Aufnahmekurven für drei Modellneurone die sich in ihrer intrazellulären K^+ -Konzentration (blau: 120 mM, rot: 100 mM, grün: 80 mM), sowie in den Leitfähigkeiten der dazugehörigen BHS (abgestufte Farben) unterscheiden. Für jedes Modellneuron sind Aufnahmekurven für drei unterschiedliche BHS-Leitfähigkeiten dargestellt. Der K^+ -Strom in den Neuronen beträgt in allen Fällen $10 \text{ pmol} / \text{cm}^2 \times \text{s}$. Bei hohen BHS-Leitfähigkeiten (Pfeile) werden die Gipfelpunkte der jeweiligen intrazellulären Tracerkonzentrationen eher erreicht, als bei vergleichbar niedrigeren BHS-Leitfähigkeiten. Ferner sind die jeweiligen intrazellulären Tracerkonzentrationen am Gipfelpunkt höher als bei vergleichbar niedrigeren BHS-Leitfähigkeiten. Trotz der beträchtlichen Unterschiede in den BHS-Leitfähigkeiten, reflektieren die Unterschiede in den intrazellulären Tracerkonzentrationen nach 24 h die Unterschiede in den intrazellulären K^+ -Konzentrationen, was auch für die gesamte Auswaschphase des Tracers gilt. Dies zeigt, dass regionale Unterschiede in der BHS-Leitfähigkeit die intrazellulären Tracerkonzentrationen nur während der Aufnahme phase, nicht jedoch während der Auswaschphase des Tracers beeinflussen. (B) Effekt unterschiedlicher extrazellulärer K^+ -Konzentrationen. Gezeigt sind die Aufnahmekurven eines Modellneurons (intrazelluläre K^+ -Konzentration: 120 mM, K^+ -Strom: $10 \text{ pmol} / \text{cm}^2 \times \text{s}$) für zwei unterschiedliche extrazelluläre K^+ -Konzentrationen (hellblau: 3 mM, dunkelblau: 10 mM). Man beachte, dass bei einer hohen extrazellulären K^+ -Konzentration von 10 mM die intrazelluläre Tracerkonzentration des Neurons nach 5 min nur minimal (< 3 %) niedriger ist, als unter Bedingungen normaler, physiologischer extrazellulärer K^+ -Konzentration von 3 mM. Verändert nach Wanger u. a. (2012).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zum einen die Eignung des lipophilen Metallchelatkomplexes Thallium-Diethyldithiocarbamat (TIDDC) als neuronaler Aktivitätsmarker mit zellulärer Auflösung am Modell der Ratte und der mongolischen Wüstenrennmaus mittels verschiedener experimenteller Ansätze empirisch überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass sämtliche BHS-assoziierten Probleme, die bei Applikation des Tracers Tl^+ in wässriger Lösung auftreten, durch Applikation von Tl^+ in Form von TIDDC umgangen werden können. Regionale Unterschiede in der cerebralen Tl^+ -Verteilung, die durch regional unterschiedliche BHS-Permeabilitäten verursacht werden, sowie periventrikuläre Verteilungsgradienten, treten bei systemischer Applikation von TIDDC nicht mehr auf, was indiziert, dass der Metallkomplex die BHS passiert. Darüber hinaus konnte die Thalliumdosis, welche für eine optimale autometallografische Färbung nötig ist, substantiell reduziert werden.

Auf der zellulären Ebene hingegen finden sich jeweils die gleichen typischen Tl^+ -Verteilungsmuster, unabhängig davon ob der Tracer als gelöstes Ion oder in Form von TIDDC appliziert wurde. Nach sensorischer und elektrischer Stimulation ist die relative Tl^+ -Aufnahme in den entsprechenden Hirnregionen nach Injektion von TIDDC erhöht, nach pharmakologischer Inhibition durch Muscimol dagegen verringert. Zudem treten vigilanzspezifische Unterschiede im laminaren Tl^+ -Verteilungsmuster des sensorischen Neocortex nach TIDDC-Injektion auf. Diese Ergebnisse lassen sich nur dadurch erklären, dass der Metallkomplex unmittelbar nach Passage der BHS dissoziiert und freies Tl^+ in den cerebralen EZR gelangt, welches anschließend aktivitätsabhängig von Neuronen und Gliazellen aufgenommen wird.

Desweiteren wurde die cerebrale Tl^+ -Verteilung im Nagerhirn zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation des Tracers charakterisiert, sowie die Logik der Umverteilung des selbigen *in vitro* und *in vivo* mittels mathematischer Modelle veranschaulicht.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Tl^+ -Verteilung zu frühen Zeitpunkten (5 min) nach Injektion von TIDDC oder TIAc, welche funktionelle Unterschiede in der K^+ -Aufnahme widerspiegelt, drastisch von der Tl^+ -Verteilung zu späten Zeitpunkten (24 h) nach Injektion von TIDDC oder TIAc, welche von der K^+ -Gleichgewichtsverteilung geprägt ist, unterscheidet. Der Zeitverlauf dieser Umverteilung, die im Wesentlichen innerhalb der ersten 3 h nach Applikation des Tracers stattfindet, ist dabei unabhängig davon, ob Tl^+ als gelöstes Ion oder in Form von TIDDC appliziert wurde und wird demzufolge nicht von der Durchlässigkeit der BHS beeinflusst. Wie unten ausführlicher erläutert, entspricht damit der Zeitverlauf der Äquilibration transmembraner Tl^+ -Ströme im ZNS *in vivo* prinzipiell dem des *in vitro*-Modells.

Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Tl^+ -Gleichgewichtsverteilung auf der zellulären und subzellulären Ebene als hochgradig differenziert erweist, was impliziert, dass auch die zelluläre und subzelluläre K^+ -Gleichgewichtsverteilung im Nagerhirn äußerst heterogen ist.

Zusammengefasst dokumentieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der lipophile Komplex TIDDC ein geeigneter Tracer ist, um sowohl neuronale Aktivitätsmuster in freibeweglichen, sich verhaltenden Nagetieren, als auch die K^+ -Gleichgewichtsverteilung hochauflösend darzustellen. Im Weiteren liefert die an dieser Stelle erfolgte experimentelle und mathematische Beschreibung der Tl^+ -Kinetik einen theoretischen Rahmen für die Verwendung K^+ -analoger Tracer in der neuronalen Bildgebung im Allgemeinen.

5.1 Hochauflösende Darstellung neuronaler Aktivität mittels TIDDC

Wie schon anfangs erwähnt wurde, werden monovalente Thalliumionen seit Jahrzehnten als Kaliumanaloga in verschiedenen biologischen und humanmedizinischen Anwen-

dungsfeldern eingesetzt (z. B. Douglas u. a., 1990; Patel und Beller, 2006). Mitte der 1980er Jahre wurde dann das häufig für myokardiale SPECT-Untersuchungen verwendete Isotop ^{201}Tl durch Kopplung mit dem Chelatbildner DDC als lipophiler cerebraler Blutflussmarker in die humanmedizinische Diagnostik eingeführt (de Bruine u. a., 1985; van Royen u. a., 1987), jedoch bald darauf, trotz des erfolgreichen Einsatzes als Diagnosewerkzeug in der cerebralen Ischämiebildung (de Bruine u. a., 1990; Limburg u. a., 1990), durch den aufgrund seiner kürzeren Halbwertszeit und seiner höheren Gammastrahlungsenergie für Humanmessungen besser geeigneten Komplex $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ ersetzt (Neirinckx u. a., 1987). Die Tatsache, dass die maximale Konzentration von ^{201}Tl im Gehirn nach i.v. Injektion von $^{201}\text{TlDDC}$ bereits nach 90 s erreicht wurde (de Bruine u. a., 1985; van Royen u. a., 1987), sowie der Fakt, dass 1 h nach der Applikation 4.3% der Gesamtmenge des applizierten ^{201}Tl im Gehirn nachgewiesen werden konnten (gegenüber 0.9% nach i.v. Applikation von ^{201}Tl -Chlorid) (van Royen u. a., 1987), ließen jedoch einen potenziellen Nutzen von TIDDC, als lipophiler Transporter Tl^+ durch die BHS schleusen zu können, vermuten.

5.1.1 Systemische Applikation von TIDDC versus TIAC

Beim Vergleich der thallium-autometallografischen Färbemuster nach Injektion von TIDDC mit denen nach Injektion von wasserlöslichem TIAC, sind folgende Unterschiede festzustellen:

(1) Die Thalliumdosis, welche zum Erreichen vergleichbarer autometallografischer Färbintensitäten appliziert werden musste, konnte durch die Verwendung von TIDDC im Vergleich zu TIAC deutlich reduziert werden. Unter Verwendung von TIDDC wurde den Tieren jeweils eine Dosis von 5 – 10 $\mu\text{mol TI}^+$ / kg Körpergewicht injiziert, was einer Dosisreduktion um einen Faktor von 60 gegenüber der, für den gleichen Stimulationszeitraum von 5 min benötigten, Thalliumdosis unter Verwendung von TIAC entspricht.

(2) Periventrikuläre Verteilungsgradienten, wie sie nach Injektion von TIAC zu beobachten sind, treten nach Injektion von TIDDC nicht mehr auf. Die hohe periventrikuläre TI^+ -Aufnahme nach Injektion von TIAC ist eine Folge der relativ hohen K^+ -Permeabilität des *Plexus choroideus* im Vergleich zu den Endothelzellen der BHS. Wie bereits anfangs erwähnt, differieren die K^+ -Transferkoeffizienten zwischen der BHS und der den *Plexus choroideus* umgebenden BLS um mehrere Größenordnungen (Smith und Rapoport, 1986), was bei systemischer Applikation von K^+ oder K^+ -analoger Ionen zu auffälligen Diffusionsgradienten in unmittelbarer Nachbarschaft der Hirnventrikel führt. Dieses typische Verteilungsmuster ist auch nach systemischer Applikation von Na^+ und Cl^- (Smith und Rapoport, 1986), sowie Ca^{2+} (Tai u. a., 1986) und Mn^{2+} (Lee u. a., 2005) zu beobachten.

(3) Regionale Unterschiede in der TI^+ -Verteilung, die auf regional unterschiedliche BHS-Permeabilitäten zurückzuführen sind (Smith und Rapoport, 1986), wie beispielsweise eine im Vergleich zu subcortikalen Strukturen relativ hohe cortikale TI^+ -Aufnahme, treten nach Injektion von TIDDC nicht mehr auf.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die cerebrale TI^+ -Verteilung bei systemischer Gabe von TIDDC, nicht durch die BHS beeinflusst wird.

Die zelluläre TI^+ -Verteilung hingegen, die ebenfalls in wachen, sich verhaltenden Tieren untersucht wurde, zeigt dieselben typischen Muster, unabhängig davon ob TIDDC oder TIAC injiziert wurde. In beiden Fällen unterscheiden sich die relativen Färbintensitäten sowohl der laminaren Muster, als auch verschiedener Zelltypen deutlich und systematisch, je nachdem welche Hirnregion betrachtet wird. So sind z. B. die laminaren Verteilungsmuster im Bulbus olfactorius, im Neocortex, im Hippocampus und im Kleinhirn nach Injektion von TIDDC, respektive TIAC, jeweils identisch. Weiterhin sind cortikale Schicht V Pyramidenzellen im Vergleich zu Schicht II Pyramidenzellen durchweg relativ intensiv gefärbt und mutmaßliche hippocampale CA1 Interneurone gleicher Morphologie

zeigen, unabhängig von der Applikationsart des Tl^+ , dieselbe relativ intensive Färbung. In manchen Hirnregionen sind vorwiegend die somatodendritischen Zellkompartimente intensiv gefärbt, in anderen, wie z. B. dem Nucleus pretectalis anterior, entfällt das Gros der intensiven Färbung auf neuropile Strukturen. Auch unterscheiden sich die Färbereaktionen von Neuronen und mutmaßlichen Astrozyten spezifisch und systematisch je nach Hirnregion.

Diese hochdifferenzierten Färbemuster sind nicht durch passive Diffusion des lipophilen Komplexes TIDDC in die jeweiligen Hirnstrukturen zu erklären, sondern sprechen dafür, dass der Komplex nach Passage der BHS dissoziiert und freies Tl^+ in den cerebralen EZR entlässt, welches anschließend von Neuronen und Gliazellen aufgenommen wird.

5.1.2 Charakterisierung neuronaler Aktivitätsmuster mittels TIDDC

Die Ergebnisse der Stimulations- und Inhibitionsexperimente, sowie der vigilanzspezifischen Spontanaktivitätsstudie, untermauern die obige Schlussfolgerung, dass der lipophile Komplex nach dem Passieren der BHS dissoziiert. Eine Stimulation der neuronalen Aktivität durch nozizeptive, akustische und elektrische Reize zog jeweils eine erhöhte relative Färbeintensität in den entsprechenden sensorisch relevanten Regionen nach sich, während nach pharmakologischer Inhibition der Aktivität durch den GABA(A)-Agonisten Muscimol eine verringerte relative Färbeintensität festzustellen war. Die Präsentation von zwei verschiedenen akustischen Reizen, nämlich Reintönen und amplitudenmoduliertem weißen Rauschen, führte zu jeweils unterschiedlichen Färbemustern im primären Hörcortex, sowohl auf der kolumnären, als auch auf der zellulären Ebene. Ähnliches gilt für die Gegenüberstellung des spontanen Wachzustandes und des Non-REM-Schlafes, wo signifikante Veränderungen der schichtspezifischen zellulären Färbemuster in primär sensorischen Rindenfeldern festzustellen sind.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass TIDDC zur hochauflösenden Darstellung neuronaler Aktivität eingesetzt werden kann. Weiterhin sprechen sie dafür, dass der

lipophile Komplex, gemäß obiger Hypothese, vor der Aufnahme von Tl^+ in Neuronen und Gliazellen dissoziiert, was im Sinne des Ockhamschen Sparsamkeitsprinzips, die ökonomischste Erklärung der Befunde darstellt. Die Alternativerklärung, dass entweder der lipophile Komplex selbst oder ein aus dem Komplex resultierendes Reaktionsprodukt, welches von Tl^+ verschieden sich in der beobachteten Weise verhält, entbehrt dabei jeder biophysikalischen und biochemischen Grundlage. Dies impliziert nicht notwendigerweise, dass der Gesamtanteil an TIDDC innerhalb der ersten Minuten nach Applikation dissoziiert. So besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass ein gewisser Restanteil von TIDDC im lipophilen Milieu der luminalen Endothelzellmembran verbleibt und entweder während der transkardialen Perfusion ausgewaschen wird oder aufgrund seiner mangelnden Präzipitationspotenz autometallografisch nicht detektiert werden kann, was jedoch nicht von Relevanz für die Funktionalität der hier diskutierten Methode ist. Dergestalt bleibt festzuhalten, dass die Verwendung von TIDDC hochauflösende Aktivitätsmessungen mit Tl^+ als Tracer erheblich erleichtert.

5.1.3 Potenzielle Mechanismen der Thalliumfreisetzung aus TIDDC

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.3.2), entsteht TIDDC beim Mischen wässriger Lösungen von Tl^+ und DDC^- im Zuge einer reversiblen Reaktion, d. h. bei entsprechender Verdünnung der TIDDC-haltigen Lösung dissoziiert der Komplex wieder in seine Bestandteile. Demzufolge könnte ein möglicher Mechanismus der Freisetzung von Tl^+ die Verdünnung von TIDDC nach Passage der luminalen Endothelzellmembran sein. Gemäß seiner Lipophilie akkumuliert der Komplex sehr wahrscheinlich im lipophilen Milieu der luminalen Endothelzellmembran (de Bruine u. a., 1985), von dem aus geringe Mengen von TIDDC in das wässrige Milieu der Endothelzelle wechseln, wo der Komplex infolge der Verdünnung in Tl^+ und DDC^- zerfällt (Abb. 5.1). Zusätzlich bindet DDC^- im Austausch gegen Tl^+ auch an andere endogene Metalle wie z. B. Zink, Kupfer oder Mangan, was einen alternativen Mechanismus der Tl^+ -Freisetzung darstellt (Abb. 5.1).

Diese Mechanismen lassen sich prinzipiell auf alle Schwermetall-Dithiocarbamat-Komplexe anwenden. DDC oder verwandte Verbindungen sind deshalb von allgemeinem Interesse, wenn es darum geht, Metallionen in den cerebralen EZR zu transportieren. So ließe sich ohne großen Aufwand ein Aufgebot verschiedener Metallkomplexe zur tierexperimentellen und humanen Anwendung herstellen, mit dem es möglich wäre unterschiedliche Facetten neuronaler Aktivität oder physiologischer und pathologischer Prozesse des cerebralen Ionenstoffwechsels zu untersuchen. Divalente Blei- (Pb^{2+}) und Kobaltionen (Co^{2+}) beispielsweise, fungieren zu einem gewissen Grade als Calciumanaloga (Nagy u. a., 1994; Mazzolini u. a., 2001), weshalb Dithiocarbamatkomplexe des Gammastrahlers ^{203}Pb und des Positronenstrahlers ^{55}Co für funktionelle SPECT- und PET-Messungen verwandt werden könnten. Mangan-DDC-Komplexe hingegen, könnten sich im Kontext der MEMRI als potenziell dienlich erweisen (Mylus, 2007).

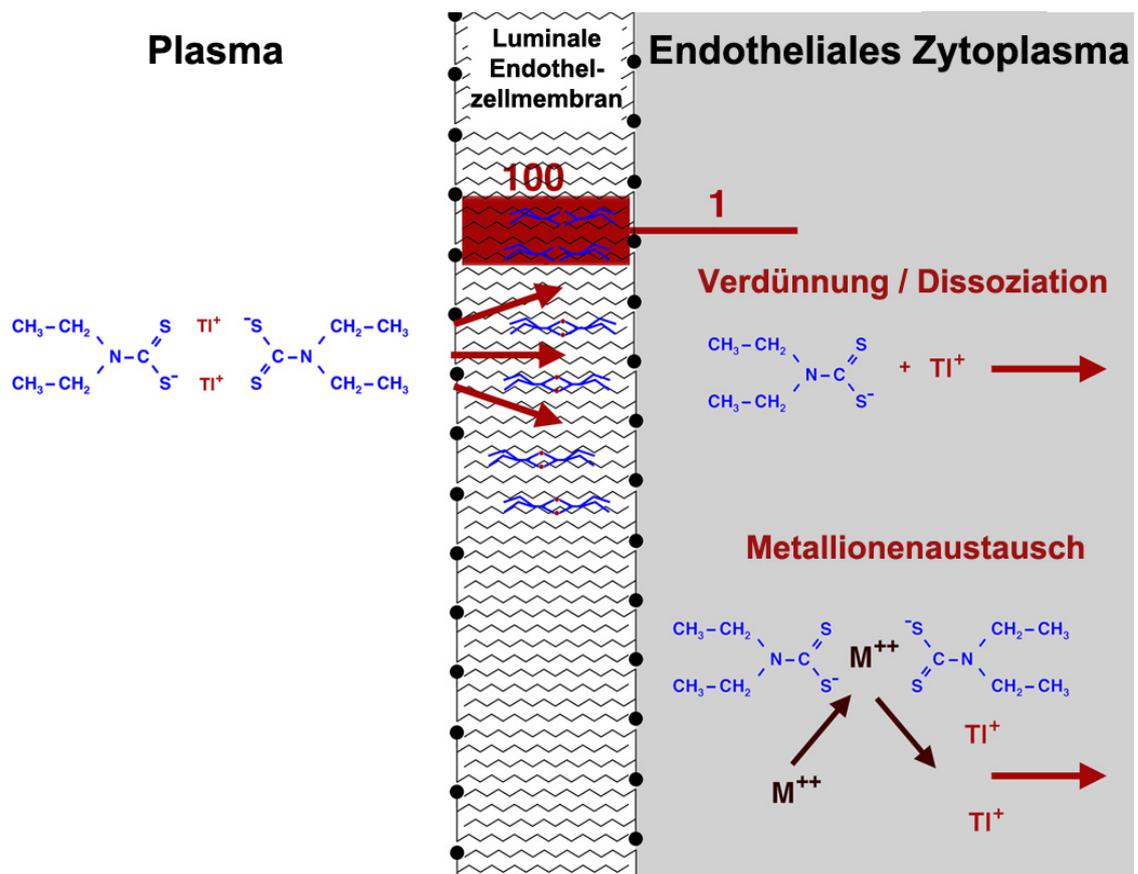


Abb. 5.1: Schema zu den potenziellen Mechanismen der Freisetzung von Tl^+ aus TIDDC. Das im Plasma befindliche TIDDC akkumuliert in der luminalen Endothelzellmembran der BHS. Entsprechend seines Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten (de Bruine u. a., 1985), wechselt ein geringer Prozentsatz des Komplexes in das wässrige Milieu des endothelialen Zytoplasmas, wo er aufgrund der Verdünnung zerfällt oder im Zuge eines Metallionenaustausches Tl^+ gegen andere endogene Metalle ausgetauscht wird. Verändert nach Goldschmidt (unveröffentlicht).

5.1.4 Toxizitätserwägungen

Im Kontext der hier vorgestellten Versuche wurde Ratten jeweils i.v. eine Dosis von 6 μmol TIDDC / kg Körpergewicht injiziert, was einer Menge von 1.2 mg Tl^+ und 0.9 mg DDC^- / kg Körpergewicht entspricht. Die applizierte Tracerdosis liegt damit im Bereich dessen, was bei der 2-DG-Autoradiografie standardmäßig appliziert wird (Sokoloff u. a., 1977) bzw. Größenordnungen unterhalb der standardmäßig in der MEMRI verwandten Mangandosis von 400 μmol / kg Körpergewicht (Bissig und Berkowitz, 2009). Die applizierte Thalliumdosis von 1.2 mg Tl^+ / kg Körpergewicht liegt deutlich unterhalb der LD_{50} für Ratten (32 mg / kg Körpergewicht; Montes u. a., 2007). Lohmann u. a. (1989) konnten beim Umspülen hippocampaler Schnitte mit einer Tl^+ -haltigen (0.1 - 1.2 mM), artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit keine Beeinträchtigungen der physiologischen Eigenschaften von CA1-Pyramidenzellen feststellen. Hinzu kommt die Tatsache, dass die toxischen Effekte des Thalliums erst mit einer Verzögerung von mehreren Stunden bis Tagen eintreten (Ríos u. a., 1989), also im Rahmen der für funktionelle Messungen verwandten kurzen Stimulationszeiträume keine Rolle spielen. Ähnlich verhält es sich mit der Toxizität von DDC^- bzw. der DDC^- -Vorstufe Disulfiram, welche zu DDC^- verstoffwechselt wird. Toxische Nebenwirkungen nach systemischer Applikation von Disulfiram wurden nur bei um Größenordnungen höheren Applikationsdosen und Expositionszeiten (50 mg / kg Körpergewicht / Tag x 5 Tage; Karamanakos u. a., 2001) beobachtet.

In Anbetracht der niedrigen Dosen und kurzen Expositionszeiten ist es folglich äußerst unwahrscheinlich, dass die nach systemischer TIDDC-Injektion thallium-

autometallografisch detektierten neuronalen Aktivitätsmuster, durch entweder TI^+ - oder DDC^- -induzierte toxische Nebeneffekte konfundiert sind.

5.1.5 Intravenöse versus intraperitoneale TIDDC-Applikation

Ein Vorteil der i.v. Applikationsvariante von TIDDC liegt in der im Vergleich zur i.p. Injektion geringeren Dosis, die für vergleichbare thallium-autometallografische Färbeintensitäten benötigt wird. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass infolge der i.p. Injektion ein gewisser Anteil des Komplexes im Peritonealraum verbleibt, was z. B. bei Ratten eine um Faktor 10 höhere TIDDC-Dosis gegenüber der i.v. Injektion erfordert.

Ein noch größerer Vorteil des i.v. Applikationsweges allerdings, liegt in der deutlich reduzierten Interferenz mit dem Verhalten des Tieres während und nach der Applikation. Durch das Verwenden einer hinreichend langen Katheterverlängerung lässt sich der Tracer problemlos von außerhalb des Käfigs verabreichen, was sowohl die kurzfristige Immobilisation des Tieres, als auch den aversiven somatosensorischen Reiz, den die i.p. Injektion darstellt, obsolet macht. Die minimale Invasivität der i.v. TIDDC-Injektion zeigt sich in ihrer anschaulichsten Form im Ausbleiben der Wachreaktion bei schlafenden Tieren. Insofern jedoch die invasiven Effekte der i.p. Injektion für das experimentelle Paradigma irrelevant sind, beispielsweise bei der Untersuchung chronisch-pathologischer Veränderungen des cerebralen K^+ -Metabolismus, kann natürlich die mit einem geringeren experimentellen Aufwand verbundene i.p. TIDDC-Applikation angewandt werden.

5.2 Umverteilung von Thallium im ZNS: Kinetik und Äquilibrium

5.2.1 Cerebrale Thalliumverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von TIDDC

Beim Vergleich der thallium-autometallografischen Färbemuster zu frühen und späten Zeitpunkten nach i.v. TIDDC-Injektion fällt folgendes auf: Zu frühen Zeitpunkten im Bereich von 5 min bis 15 min nach der Applikation, ähnelt die Tl^+ -Verteilung den jeweiligen funktionellen Mustern der 2-DG-Autoradiografie (Sokoloff u. a., 1977), der Cytochrom-Oxidase-Aktivität (Hevner u. a., 1995), sowie der Na/K-ATPase-Verteilung (Spyropoulos und Rainbow, 1984). Hohe Tl^+ -Konzentrationen findet man z. B. im zentralen Kern des inferioren Colliculus, in den Mamillarkörpern, in vielen Kernen des Hirnstammes wie dem okulomotorischen Kern, dem Nucleus facialis, dem Olivenkern und dem Cochlearis-Kern, sowie in primär sensorischen und cingulären cortikalen Rindenfeldern und der Glomerulischicht des Bulbus olfactorius. Relativ niedrige Tl^+ -Konzentrationen findet man z. B. im Hippocampus und in den Fasertrakten der weißen Substanz.

24 h nach der Injektion von TIDDC dagegen ist ein komplett anderes Verteilungsmuster zu beobachten. Das Gros der Fasertrakte der weißen Substanz weist jetzt eine relativ hohe Tl^+ -Konzentration auf, während viele Hirnregionen, die zu frühen Zeitpunkten nach der TIDDC-Applikation eine hohe Tl^+ -Konzentration aufzeigten, wie der inferiore Colliculus oder die Glomerulischicht des Bulbus olfactorius, nun eine geringe Färbeintensität zeigen. Demnach weist die Tl^+ -Verteilung nach 24 h auch keinerlei Ähnlichkeiten mehr mit den funktionellen Mustern des Glucoseverbrauchs oder der Cytochrom-Oxidase-Aktivität auf, sondern erscheint in vielerlei Hinsicht wie ein Negativbild der frühen Tl^+ -Verteilung. Die Tl^+ -Verteilungen 30 min bis 60 min nach der Injektion stellen einen graduellen Übergang zwischen den frühen und den späten Verteilungsmustern dar, die Tl^+ -Verteilung nach 180 min ähnelt bereits stark der 24 h-Verteilung.

Diese Ergebnisse dokumentieren eindeutig die Umverteilung von Tl^+ nach TIDDC-Injektion. Nach einer frühen Phase mit relativ hohen Tl^+ -Aufnahmeraten in Hirnregionen die der Literatur nach einen relativ hohen Grundmetabolismus aufweisen, findet eine dramatische Umverteilung des Tracers statt, deren resultierendes Verteilungsmuster anschließend über einen langen Zeitraum vergleichsweise stabil erscheint. Im Einklang mit den oben diskutierten Ergebnissen, welche eine aktivitätsabhängige Tl^+ -Aufnahme innerhalb der ersten 5 min nach TIDDC-Applikation nahelegen, lässt sich die Tl^+ -Verteilung zu frühen Zeitpunkten folglich als Abbild transmembraner K^+ -Ströme interpretieren, die infolge der vorherrschenden K^+ -Leitfähigkeiten bzw. der Na/K-ATPase-Aktivität auftreten.

Angesichts der Tatsache, dass die späte Tl^+ -Verteilung in vielerlei Hinsicht ein Negativabbild der frühen Verteilung darstellt, stünde zu vermuten, dass die späte Verteilung aus aktivitätsabhängigen Unterschieden im Tl^+ -Ausstrom resultiert bzw. regionale Unterschiede in der Auswaschkinetik des Tracers widerspiegelt. Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse jener Experimente, bei denen TIAc i.p. appliziert wurde. Nach systemischer Applikation von wasserlöslichen Thalliumsalzen steigt der Tl^+ -Spiegel im Gehirn nämlich innerhalb der ersten 24 h kontinuierlich an (Ríos u. a., 1989). Trotz dieses kontinuierlichen Anstieges der cerebralen Tl^+ -Konzentration, entspricht die zelluläre Tl^+ -Verteilung 3 h nach i.p. Injektion von TIAc bereits der zellulären Tl^+ -Verteilung wie sie 3 h bzw. 24 h nach i.v. TIDDC-Applikation zu beobachten ist. Dies zeigt, dass die Tl^+ -Verteilung zu späten Zeitpunkten keinesfalls unterschiedliche Tl^+ -Ausstromraten reflektiert, sondern vielmehr als Tl^+ -Gleichgewichtsverteilung zu interpretieren ist, welche sich einstellt, sobald kein bzw. nur noch ein marginaler Nettotransport des Tracers in die Zellen oder aus den Zellen heraus mehr stattfindet.

Diese Interpretation deckt sich mit den Ergebnissen der simulierten Tl^+ -Ströme des *in vivo*-Modells, aus denen eindeutig hervorgeht, dass die Äquilibration der Ströme innerhalb des ZNS, d. h. zwischen dem EZR und den Neuronen, wesentlich schneller als

die Äquilibration der Ströme zwischen dem Plasma und dem cerebralen EZR vonstatteht und somit unabhängig von der TI^+ -Leitfähigkeit der BHS ist. Allgemeiner gefasst bedeutet das, dass, sobald Kaliumanaloga erst einmal in den EZR des ZNS gelangt sind, die Einstellung des Gleichgewichtszustandes von Ein- und Ausstrom des Tracers in Neurone und Astrozyten *in vivo* demselben zeitlichen Verlauf folgt wie auch *in vitro*. Tatsächlich entspricht der hier beobachtete Zeitverlauf der Äquilibration der TI^+ -Ströme *in vivo* in etwa dem, der für K^+ bzw. Kaliumanaloga *in vitro* beschrieben wurde. So erreichte die Aufnahme von ^{86}Rb in Neurone aus dem Spinalganglion von Hühnern innerhalb der ersten 120 min nach Beginn der Inkubation ein Plateau (Sendtner u. a., 1988), während die Aufnahme von ^{201}Tl in humane Tumorzellen nach etwa 60 min in Sättigung ging (Brismar u. a., 1989). Für die Aufnahme von ^{42}K in cortikale Hirnschnitte wurde ein Maximum nach 20 min beobachtet (Phillis u. a., 1982). Eine ausführliche Diskussion der Kaliumkinetik findet im nachfolgenden Abschnitt statt.

5.2.2 Einfluss der Kaliumkinetik auf die Thalliumverteilung *in vitro* und *in vivo*

Radioaktive Isotope des Kaliums oder kaliumanaloger Ionen wurden bereits in einer Vielzahl von *in vitro*-Präparationen als Tracer zur Untersuchung der K^+ -Aufnahme eingesetzt (Keynes, 1951b; Hodgkin und Keynes, 1955; Keynes und Ritchie, 1965; Landowne, 1975; Sendtner u. a., 1988; Brismar u. a., 1989; Schielke u. a., 1990; Foley und Rhoads, 1994; Pellerin und Magistretti, 1997; Nanitsos u. a., 2004; Rose u. a., 2009). Anhand der typischen *in vitro*-Aufnahmekurve eines kaliumanalogen Tracers, wie sie in Abb. 4.12A dargestellt ist, lässt sich Folgendes ableiten: Werden somatischen Zellen Kaliumanaloga in einem Inkubationsmedium dargeboten, so steigt die intrazelluläre Konzentration des Kaliumanalogons zunächst linear als Funktion der Zeit an. Während dieser Phase dominiert der Einstrom des Tracers in die Zelle, wohingegen der Ausstrom vernachlässigbar klein ist. Mit zunehmender Zeitdauer gewinnt der Ausstrom progressiv

an Gewicht, bis schließlich Ein- und Ausstrom im Gleichgewicht sind und keine Nettoaufnahme des Tracers mehr erfolgt.

Im Gleichgewichtszustand entspricht die Tracerverteilung der K^+ -Verteilung, d. h. das Verhältnis von intra- zu extrazellulärer Tracerkonzentration entspricht dem Verhältnis von intra- zu extrazellulärem K^+ . Unter der Annahme nämlich, dass die Grundgesamtheit des intra- und extrazellulären K^+ austauschbar ist, ist davon auszugehen, dass die Verteilung eines perfekten Kaliumanalogons zu einem Zeitpunkt da alle Nettoströme, transmembrane wie auch intrazelluläre, zum Erliegen gekommen sind, sich *per definitionem* in jeder Hinsicht mit der K^+ -Verteilung deckt. Dies bezieht nicht nur die intra- und extrazellulären Gradienten mit ein, sondern beispielsweise auch Unterschiede im mitochondrialen vs. zytoplasmatischen K^+ -Spiegel. Es ist an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich hervorzuheben, dass im Gleichgewichtszustand lokale Unterschiede in der Tracerkonzentration ausschließlich Unterschiede in der K^+ -Konzentration bzw. transmembrane K^+ -Gradienten widerspiegeln können. Unterschiede in der K^+ -Aufnahmerate können hingegen nur detektiert werden, solange ein Nettoeinstrom des Kaliumanalogons vorliegt. Dies gilt gleichermaßen auch unter den etwas komplexeren *in vivo*-Bedingungen.

Nach systemischer Bolusapplikation von ^{42}K oder Tl^+ steigen die jeweiligen ZNS-Konzentrationen der Tracer zunächst für einen Zeitraum von mehreren Stunden an, was einen langanhaltenden Nettoeinstrom vom Plasma ins ZNS indiziert (Gehring und Hammond, 1967; Ríos u. a., 1989). Im Prinzip sollte dieser Umstand einen gegenüber den *in vitro*-Verhältnissen ebenfalls länger währenden Nettoeinstrom des Tracers in Neurone und Astrozyten begünstigen. Wie jedoch durch die oben beschriebenen i.p. Versuche mit TIAC gezeigt und anhand des Kompartimentmodells verdeutlicht wurde, sind die BHS-Ströme ausgesprochen klein im Vergleich zu jenen Strömen, welche zwischen Zellen und EZR fließen, weshalb sie keinen signifikanten Einfluss auf den Zeitverlauf der Äquilibration der zellulären Transmembranströme haben. Dergestalt bleibt

festzuhalten, dass die Zeiträume während derer aktivitätsabhängige Unterschiede in den K^+ -Aufnahmeraten *in vivo* detektiert werden können, im wesentlichen denen unter *in vitro*-Bedingungen entsprechen, unabhängig davon ob die BHS geöffnet oder umgangen wird.

Deshalb ist es auch beim Einsatz von Kaliumanaloga als Tracer *in vivo* geboten, K^+ -Aufnahmeraten während der frühen Aufnahmephase des Tracers zu bestimmen, solange der Ausstrom aus den Zellen noch vernachlässigbar klein ist. Auf diesem Grundprinzip fußt auch die Auswahl der kurzen Stimulationszeiträume von 5 min bei den oben beschriebenen Experimenten zur Eignung von TIDDC als hochauflösender neuronaler Aktivitätsmarker. Ist die räumliche Auflösung geringer, wie beispielsweise beim Messen der ^{201}Tl -Verteilung mittels Kleintier-SPECT (Goldschmidt u. a., 2009; Neubert u. a., 2011), sind prinzipiell längere Messzeiträume möglich, da die Umverteilung des Tracers zunächst ausschließlich auf der lokalen Ebene stattfindet, z. B. von der Glomerulischicht des Bulbus olfactorius in die Körnerzellschicht des selbigen, und aus diesem Grund keinen maßgeblichen Einfluss auf die Messung haben sollte, zumindest solange die räumliche Auflösung einen Bereich von mehreren 100 μm nicht unterschreitet. Die Gleichgewichtsverteilung des entsprechenden Kaliumanalogons hingegen, kann in allen Fällen 24 h nach der Applikation des Tracers bzw. während der gesamten Auswaschphase gemessen werden.

5.2.3 Weitere Einflussfaktoren auf die Thalliumverteilung

Unter den *in vitro*-Bedingungen hängt die intrazelluläre Tracerkonzentration eines Kaliumanalogons zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Zugabe des Tracers zum Inkubationsmedium, von den intra- und extrazellulären K^+ -Konzentrationen, vom Oberflächen-Volumen (A/V)-Verhältnis der Zelle, sowie von der Größe der transmembranen K^+ -Ströme ab. Bei Kenntnis der intra- und extrazellulären K^+ -Konzentrationen und des A/V-Verhältnisses der Zelle, lassen sich die K^+ -Ströme berechnen, wenn eine bekannte Tra-

cerkonzentration im EZR vorliegt. Auf diese Art haben Keynes und Kollegen, unter Verwendung von ^{42}K , die K^+ -Ströme am Vagusnerv von Kaninchen berechnet (Keynes und Ritchie, 1965). Aus Gleichung 6 (siehe Abschnitt 3.5.1), welche die intrazelluläre Tracerkonzentration zum Zeitpunkt t beschreibt, -

$$(6) \quad [T^+]_i = [T^+]_e \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} \left[1 - e^{-t \frac{\Phi K^+ A}{[K^+]_i V}} \right] -$$

lassen sich folgende Aspekte intuitiv ableiten: Erstens, Kaliumanaloga im EZR konkurrieren mit extrazellulärem K^+ um den Einstrom in die Zelle. Zweitens, Zellen mit einem höheren A/V-Verhältnis akkumulieren den Tracer schneller als Zellen mit einem vergleichsweise niedrigeren A/V-Verhältnis. Drittens, ist der Tracer einmal in die Zelle aufgenommen worden, konkurriert er mit intrazellulärem K^+ um den Ausstrom.

Wie oben erwähnt, ist der Einfluss der intrazellulären K^+ -Konzentration vernachlässigbar, solange die intrazelluläre Tracerkonzentration zu frühen Zeitpunkten nach der Applikation bestimmt wird, wo der Ausstrom des Tracers aus der Zelle noch unerheblich klein ist. Die Abhängigkeit vom A/V-Verhältnis ist dagegen ein inhärentes Charakteristikum des zellulären Metabolismus und nicht spezifisch für kaliumanaloge Tracer. Von zwei Zellen mit äquivalenten Ionenströmen pro Membranfläche, weist diejenige Zelle mit dem kleineren Volumen einen höheren ATP-Verbrauch pro Volumeneinheit auf. Der Einfluss der extrazellulären K^+ -Konzentration ist *in vitro* von geringer praktischer Relevanz, da sie sowohl leicht zu bestimmen als auch konstant zu halten ist. *In vivo* dagegen kann die extrazelluläre K^+ -Konzentration variieren (Somjen, 1979), was jedoch gemäß des obigen Kompartimentmodells nur einen marginalen Einfluss auf die neuronale und astrozytäre Aufnahme des Tracers hat (Abb. 4.14B). Der Grund hierfür liegt in dem hohen A/V-Verhältnis des EZR, verbunden mit relativ großen K^+ -Strömen und einer niedrigen K^+ -Konzentration. Diese Bedingungen begünstigen eine rasche Äquilibration von Tracer Ein- und Ausstrom, weshalb die extrazelluläre Tracerkonzentration in der Lage ist potenziellen Schwankungen in der extrazellulären K^+ -Konzentration ohne große zeitliche Verzögerung zu folgen. Sogar bei relativ hohen physiologischen Konzentrationen

von 10 mM extrazellulärem K^+ (Somjen, 1979), ist der extrazelluläre K^+ -Spiegel immer noch um einen Faktor 10 geringer als die intrazelluläre K^+ -Konzentration in Neuronen. Zieht man jetzt den Volumenanteil von 20%, welchen der EZR am Gesamtvolumen des ZNS einnimmt (Syková und Nicholson, 2008), hinzu, lässt sich folgern, dass die Gesamtmenge an K^+ im EZR um einen Faktor 50 geringer ist als im Rest des ZNS. Nimmt man nun an, dass der EZR von jeweils zwei gegenüberliegenden Zellmembranen gebildet wird, dann impliziert dies, dass sowohl die transmembranen K^+ -Ströme als auch die Oberfläche des EZR um einen Faktor 2 größer sind als bei den zellulären Elementen des ZNS. Bezogen auf Gleichung 6 bedeutet das, dass der EZR ungefähr um einen Faktor 200 schneller äquilibriert als ein Neuron, was auch in etwa den Prognosen des Kompartimentmodells nach Öffnen der BHS entspricht (Abb. 4.13A und D).

Dementsprechend lässt sich schlussfolgern, dass, die gleiche arterielle Input-Funktion und gleiche A/V-Verhältnisse vorausgesetzt, die intrazelluläre Tracerkonzentration verschiedener Zellen linear oder zumindest annähernd linear von den transmembranen Ionenströmen abhängt, sofern die Messungen zu frühen Zeitpunkten nach Applikation des Tracers erfolgen. Unterscheiden sich die A/V-Verhältnisse der untersuchten Zellen hingegen, dann sind Korrekturen geboten. Das A/V-Verhältnis somatodendritischer Kompartimente kortikaler Schicht II Pyramidenzellen beispielsweise, ist ca. 20% größer als das kortikaler Schicht V Pyramidenzellen (Larkman, 1991). Weist nun eine Schicht V Pyramidenzelle einen vierfach höheren Tl^+ -Gehalt auf als eine Schicht II Pyramidenzelle des entsprechenden Hirnschnittes, so bedeutet dies, dass die durchschnittlichen Tl^+ -Ströme pro Membranfläche des Schicht V Neurons *fünffmal* höher sind als die des Schicht II Neurons.

5.2.4 Validität des *in vivo*-Modells

Trotz der Tatsache, dass die hier beschriebene Modellierung der Aufnahme und Umverteilung eines kaliumanalogen Tracers in erster Linie zum besseren Verständnis der em-

pirischen Daten beitragen soll bzw. zur Illustration der zugrundeliegenden kinetischen Prinzipien dient, stellt sich die Frage, inwieweit die simulierten Aufnahmekurven den beobachteten Ergebnissen entsprechen. Hierzu wurden die Zeitkonstanten der Äquilibration zweier Hirnregionen und eines Modellneurons bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.5). Der Vergleich der Zeitkonstanten - 31 min für die Glomerulischicht des Bulbus olfactorius, 55 min für den inferioren Colliculus vs. 28 min für das Modellneuron - zeigt, dass die Zeitverläufe der Äquilibration von Ein- und Ausstrom des Tracers im *in vivo*-Modell, im wesentlichen denen der empirisch bestimmten Tl^+ -Ströme entsprechen. Jedoch besitzen diese Zahlen nur einen begrenzten Aussagewert, da es sich um einen Vergleich absoluter intrazellulärer Tracerkonzentrationen (Modellneuron) mit den relativen Färbintensitäten bestimmter Hirnregionen (Bulbus olfactorius und inferiorer Colliculus) handelt. Für einen adäquaten Vergleich der Zeitkonstanten bzw. um die *in vivo*-Tracerkinetik dezidiert zu modellieren, wäre es nötig die Absolutwerte der Tl^+ -Konzentration in definierten und eindeutig identifizierten Neuronentypen zu messen. Dies ist allerdings methodisch nicht trivial und lag außerhalb des Anspruches dieser Doktorarbeit.

5.2.5 Die Thallium-Gleichgewichtsverteilung

Entsprechend obiger Argumentationsführung ist davon auszugehen, dass ein perfektes Kaliumanalogon sich im Äquilibrium, wenn sämtliche Netto-Transmembranströme zum Erliegen gekommen sind, gemäß der intrazellulären und transmembranen K^+ -Gradienten verteilt, vorausgesetzt, dass die Grundgesamtheit des intra- und extrazellulären K^+ austauschbar ist. Nun kann Tl^+ nicht als perfektes Kaliumanalogon betrachtet werden, aber eine Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Studien legt im Mindesten ein hohes Maß an analogem Verhalten in biologischen Systemen nahe (siehe Abschnitt 1.1.3), weshalb aus der Tl^+ -Gleichgewichtsverteilung in jedem Falle Informationen über die K^+ -Verteilung abzuleiten sind, wenn auch keine numerisch präzisen.

Zur cerebralen K^+ -Verteilung ist wenig bekannt. In einer MRI-Studie wurde unter Verwendung von ^{39}K die K^+ -Verteilung im Rattenhirn mit äußerst geringer Auflösung gemessen (Augath u. a., 2009), eine hochauflösende Beschreibung der cerebralen K^+ -Verteilung jedoch ist meines Wissens nach bislang nicht erfolgt. Eine detaillierte, numerisch-statistische Beschreibung der TI^+ -Gleichgewichtsverteilung im Nagerhirn liegt außerhalb dessen, was im Kontext dieser Doktorarbeit beantwortet und aufgezeigt werden soll, weshalb im Folgenden lediglich einige regelmäßige Beobachtungen, die bei der Auswertung der TI^+ -Gleichgewichtsverteilung gemacht werden konnten, aufgeführt werden.

Zunächst einmal bleibt festzuhalten, dass die TI^+ -Gleichgewichtsverteilung im Nager-ZNS keinesfalls homogen ist. So ist z. B. der TI^+ -Gehalt im Striatum im Vergleich zum Rest des ZNS relativ hoch (Abb. 4.7), was nahelegt, dass die intrazelluläre K^+ -Konzentration dortiger Neurone höher ist, als bei Neuronen anderer Strukturen. Dementsprechend sollte auch das K^+ -Gleichgewichtspotential im Einklang mit dem Membranpotential striataler Neurone negativer ausfallen, als in Neuronen aus anderen Teilen des ZNS. Tatsächlich ist das Membranpotential neostriataler Neurone adulter Ratten mit ca. -80 mV (Nisenbaum u. a., 1996), deutlich negativer als das von Neuronen aus dem inferioren Colliculus von Mäusen (ca. -63 mV) (Basta und Vater, 2003), wobei jedoch die Unterschiede in den Spezies und den jeweiligen *in vitro*-Bedingungen zu beachten sind. Auch innerhalb anatomisch definierter Strukturen ist die TI^+ -Gleichgewichtsverteilung inhomogen. So finden sich sowohl im sensorischen Neocortex als auch im Hippocampus benachbarte Zellgruppen mit unterschiedlichem TI^+ -Gehalt (Abb. 5.2). Ferner ist auch die subzelluläre TI^+ -Verteilung als heterogen zu bewerten. In manchen Zelltypen scheint der TI^+ -Gehalt im Zellkern höher zu sein als im Zytoplasma, in anderen *vice versa*. Zudem scheint der TI^+ -Gehalt in myelinisierten Axonen höher zu sein als in vielen Somata, wie beispielsweise ein Vergleich des Corpus callosum mit dem Neocortex zeigt (Abb. 4.7).

Die Tl^{+} -Gleichgewichtsverteilung könnte u. a. im Zusammenhang mit Pathologien, wie beispielsweise der cerebralen Ischämie von Interesse sein, wenn es darum geht, die Abnahme im K^{+} -Gehalt betroffener Hirnregionen zu charakterisieren. Inwieweit die TIAMG oder die ^{201}Tl -SPECT in der Lage sind, plastische Veränderungen des cerebralen K^{+} -Stoffwechsels zu visualisieren, bleibt abzuwarten.

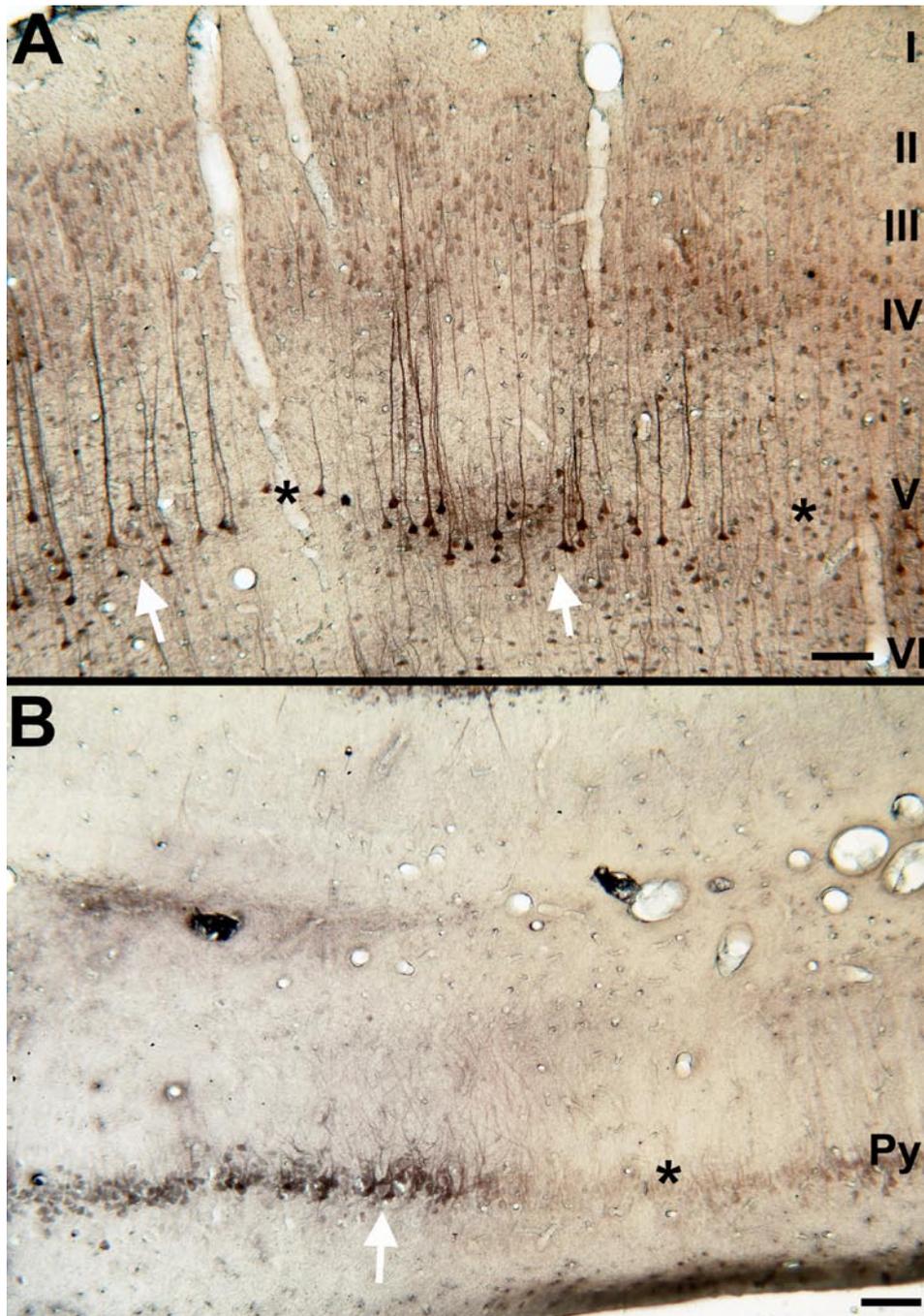


Abb. 5.2: Tl^+ -Verteilung im Rattenhirn 24 h nach systemischer Applikation von TIDDC. Zu sehen sind Detailaufnahmen des visuellen Cortex (A) und der hippocampalen CA1-Region (B). In der kortikalen Schicht V, sowie in der CA1 Pyramidenzellschicht (Py) findet man Zellgruppen mit relativ hohem Tl^+ -Gehalt (weiße Pfeile) in Nachbarschaft zu Zellgruppen mit vergleichsweise niedrigem Tl^+ -Gehalt (schwarze Sterne). Die Skalierung entspricht 50 μm in A und B. Wanger u. a. (unveröffentlicht).

5.2.6 Implikationen für die Bildgebung mit Metallionen im Allgemeinen

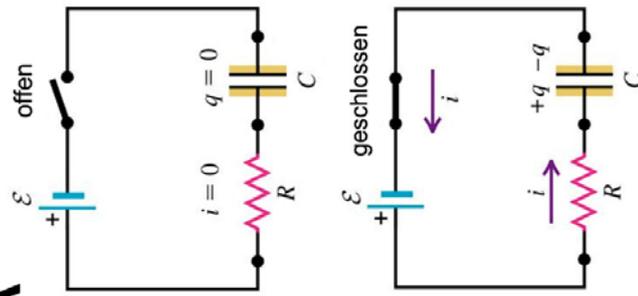
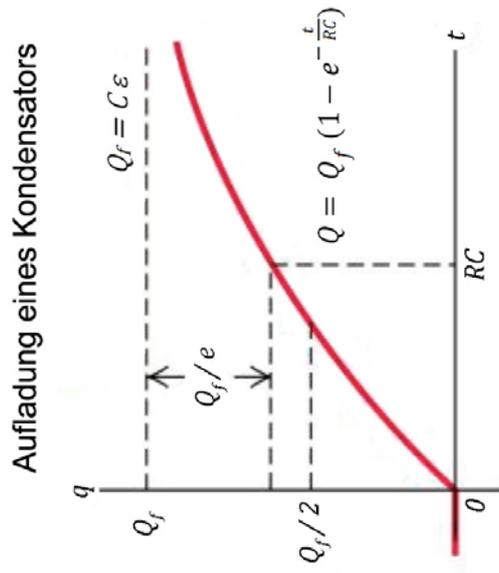
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Tl^+ -Ströme über neuronale Zellmembranen im Nager-ZNS, trotz bzw. unabhängig von einem lang anhaltenden Tl^+ -Einstrom über die BHS ins ZNS, äquilibrieren. In allgemeinerer Hinsicht bedeutet dies, dass der kontinuierliche Anstieg der Konzentration eines Metallions im ZNS nicht notwendigerweise impliziert, dass Neurone unterschiedlicher Aktivitätsniveaus den Tracer in korrespondierend unterschiedlichem Maße aufnehmen. Zugleich impliziert eine inhomogene Verteilung des Metalls im ZNS nicht notwendigerweise, dass die Inhomogenitäten Unterschiede in neuronalen Aktivitätsniveaus reflektieren. Vielmehr lässt sich das aus der Elektrotechnik stammende Prinzip der RC-Schaltung auf die Bildgebung mit Metallionen wie folgt anwenden: Zu frühen Messzeitpunkten ist die Verteilung des Tracers „widerstandsgewichtet“, d. h. sie reflektiert in erster Linie die aktivitätsabhängigen K^+ -Leitfähigkeiten der einzelnen Neurone, während die Verteilung zu späten Messzeitpunkten hingegen „kapazitätsgewichtet“ ist und nun vielmehr die Eigenschaft der Neurone widerspiegelt den entsprechenden Tracer intrazellulär zu akkumulieren (Abb. 5.3).

Werden Tracer verwendet, die eine hohe Proteinbindungsaffinität aufweisen, wie beispielsweise Mn^{2+} (Nong u. a., 2009), dann ist der Ausstrom aus den Zellen im Vergleich zur Verwendung von Tl^+ wahrscheinlich signifikant reduziert, was potenziell längere Stimulationszeiträume erlaubt. Jedoch ist in diesem Fall eine mögliche Umverteilung des Tracers durch aktiven und passiven Proteintransport, vorrangig durch anterograden axonalen Transport (Takeda u. a., 1998), zu berücksichtigen. Hinzu kommt, dass mögli-

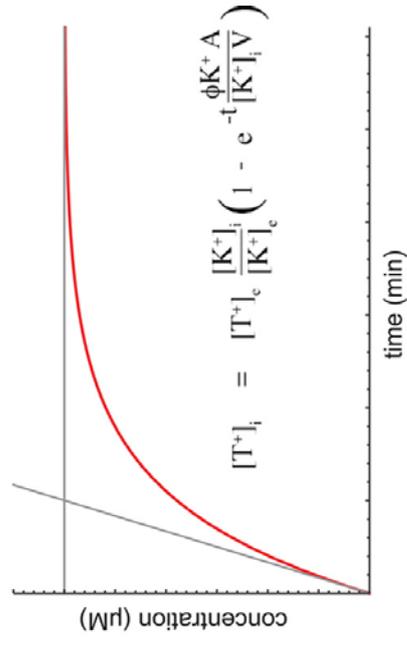
cherweise trotz der hohen Bindungsaffinität ein substanzieller Anteil des Tracers in ungebundener Form vorliegt. So konnte Mylius (2007) zeigen, dass bis zu 24 h nach systemischer Applikation von MnCl_2 , freies Mn^{2+} im ZNS von mongolischen Wüstenrennmäusen autometallografisch nachweisbar ist. In jedem Falle ist die Interpretation lokaler Inhomogenitäten der Mn^{2+} -Verteilung im Sinne aktivitätsbezogener Muster, nach langen Stimulationszeiträumen von 24 h, wie sie mitunter in der MEMRI verwandt werden (Yu u. a., 2005), im Mindesten kompliziert.

Der geradlinigste Ansatz in der funktionellen Bildgebung mit Metallionen besteht deshalb darin, die BHS zu öffnen oder zu umgehen und kurze Stimulationszeiträume zu verwenden. Dies kann auf nicht-invasive Art durch das Verwenden geeigneter lipophiler Metallkomplexe oder alternativ durch das Einbringen ionenselektiver Kronenether (Gokel u. a., 2004) in die Endothelzellmembran bewerkstelligt werden.

Abb. 5.3: Analogie der intrazellulären Traceraufnahme *in vitro* zur Aufladung eines Kondensators in einem RC-Schaltkreis. (A) Schema einer RC-Reihenschaltung mit einer anliegenden Spannung ε . Ist der Schaltkreis geöffnet, so fließt kein Strom (i) über den Widerstand (R) und der Kondensator (C) trägt keine Ladung (q). Bei geschlossenem Schaltkreis fließt ein widerstandsabhängiger Strom i , welcher den Kondensator entsprechend dem in B dargestellten Zeitverlauf auflädt. (B) Aufladung des Kondensators als Funktion der Zeit. Während die Ladung q des Kondensators zum Zeitpunkt t anfangs stark von der Größe des Widerstands R abhängt, ist die finale Ladungsmenge des Kondensators Q_f unabhängig von R und wird ausschließlich von der Kapazität C und der anliegenden Spannung ε bestimmt. Das Produkt RC entspricht dabei der Zeitkonstante des Kondensators. Verändert nach Grzywacz (2007): <http://www.studyblue.com/notes/note/n/university-physics-chapter-26-part-2/file/494815>. (C) Intrazelluläre Aufnahme eines idealen K^+ -Analogons *in vitro* als Funktion der Zeit (Vergleiche Abschnitt 3.5.1 sowie Abb. 4.12). In Analogie zu B wird die intrazelluläre Tracerkonzentration nach Badapplikation des Tracers zunächst stark durch die Größe des Membranstroms Φ_{K^+A} beeinflusst, zu späteren Zeitpunkten dominiert dagegen der Einfluss der intrazellulären K^+ -Konzentration. Das Produkt $[\text{K}^+]_i V$ entspricht der dabei der Kapazität der Zelle den Tracer zu akkumulieren. Der Quotient $\frac{\Phi_{\text{K}^+A}}{[\text{K}^+]_i V}$ entspricht der Zeitkonstante der Traceraufnahme. Verändert nach Abb. 4.12A.

A**B****C**

Aufnahme eines K^+ -Analogons *in vitro*



5.3 Resümee und Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass es unter Verwendung von TIDDC als Tracer möglich ist, neuronale Aktivitätsmuster im Nager-ZNS hochauflösend und nach relativ kurzen Stimulationszeiten von 5 min mittels der TIAMG zu visualisieren. Begleitend zu den in dieser Arbeit beschriebenen Studien, wurde dieses experimentelle Protokoll unter meiner Mitwirkung bereits erfolgreich zur Untersuchung neuronaler Reorganisationsprozesse im visuellen System der Ratte eingesetzt (Macharadze u. a., 2009, 2011). Die minimal-invasive Applikation des Tracers über einen i.v. Katheter ermöglicht dabei auch die Erfassung sensibler Verhaltenszustände, wie sie beispielsweise während distinkter Schlafphasen vorliegen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es zu einer Umverteilung von Tl^+ nach i.v. Injektion von TIDDC kommt. Die Kinetik der Umverteilung auf der zellulären Ebene im ZNS *in vivo* entspricht dabei der Äquilibrierungskinetik kaliumanaloger Tracer *in vitro*. Nach der Umverteilung des Tracers manifestiert sich eine relativ stabile Tl^+ -Gleichgewichtsverteilung, welche Rückschlüsse auf die regionale, die zelluläre, sowie die subzelluläre K^+ -Verteilung zulässt. In Kombination offenbaren diese Ergebnisse, dass TIDDC ein geeigneter Tracer ist, um sowohl neuronale Aktivität als auch unterschiedliche Aspekte des Kaliumstoffwechsels im ZNS hochauflösend darzustellen.

In Hinblick auf die Kombination der Methode mit immunhistochemischen Färbungen, stellt die Verwendung von Glutaraldehyd als Fixans einen limitierenden Faktor bei der TIDDC-AMG bzw. der TIAMG im Allgemeinen dar. Zwar garantiert die Fixierung mit Glutaraldehyd den Erhalt der Gewebestruktur, zugleich werden dadurch jedoch die Epitope der meisten Antigene maskiert, weshalb die Kolokalisation von Tl^+ und zelltypspezifischen Antigenen nicht möglich ist. Da eine Fixierung mit Formaldehyd, welche bezüglich einer möglichen Kombination mit immunhistochemischen Färbungen permissiver wäre, aufgrund einer nicht vollständig verstandenen Reaktion des Formaldehyds mit Schwefelwasserstoff für autometallografische Fixierungen nicht geeignet ist (Danscher

und Stoltenberg, 2006; Goldschmidt u. a., 2010), bietet sich als Alternative die Perfusion mit einer sulfidhaltigen Lösung ohne zusätzliches Fixans an. Diese Perfusionsvariante – ausführlich beschrieben in Goldschmidt u. a. (2010) - geht zwangsläufig mit einer Beeinträchtigung der Morphologie einher, könnte sich jedoch zumindest für manche Fragestellungen als brauchbar für Kollokalisationsstudien erweisen.

Wie eingangs erwähnt, ist die TIAMG nicht das einzige Nachweisverfahren um Tl^+ in biologischen Proben zu detektieren. Da mittlerweile auf relativ hochauflösende, kombinierte Kleintier-SPECT/CT Systeme zurückgegriffen werden kann (Franc u. a., 2008), stellt ^{201}Tl einen attraktiven Tracer für die Charakterisierung neuronaler Aktivitätsmuster und des cerebralen K^+ -Metabolismus bei Nagern *in vivo* dar (Goldschmidt u. a., 2009; Neubert u. a., 2011). Zudem ermöglichen elementanalytische Verfahren wie PIXE oder SXRF die Detektion und Absolutquantifizierung sehr geringer Mengen von Tl^+ in entsprechend präparierten Gewebeproben. Dabei eignet sich Thallium aufgrund seines Atomaufbaus besonders für den Nachweis durch diese Verfahren. Thallium, als eines der letzten stabilen Elemente im Periodensystem, besitzt einen Atomkern mit einer relativ großen Anzahl an Protonen, weshalb die Elektronen in den inneren Schalen des Thalliumatoms eine, im Vergleich zu anderen Elementen, relativ hohe Bindungsenergie aufweisen. Werden nun durch hochenergetische Strahlung Elektronen aus diesen inneren Elektronenschalen herausgeschlagen, so ist die beim Auffüllen der entstandenen Lücke durch Elektronen der äußeren Schalen freiwerdende Emissionsenergie ebenfalls relativ hochenergetisch (im keV-Bereich) und durchdringend. Dies minimiert den störenden Einfluss der Selbstabsorption der emittierten Strahlung in der untersuchten Probe und bietet die Grundlage, beispielsweise unter Einsatz eines Synchrotronstrahls hoher Kohärenz und Fokussierung, hochauflösende und vollquantitative 3D-Rekonstruktionen der Tl^+ -Verteilung in größeren Proben zu erhalten (Scheckel u. a., 2007).

In Kombination mit der Bestimmung der arteriellen Input-Funktion von TIDDC, eröffnet dies perspektivisch die Möglichkeit, die TI^+ -Verteilung im gesamten Nager-ZNS vollquantitativ und mit subzellulärer Auflösung zu messen.

Literaturverzeichnis

Abeles M. Anatomy of the cerebral cortex. In: *Corticomics: Neural Circuits of the Cerebral Cortex*. Cambridge University Press, 1991, p. 1 – 64.

Adrian RH, Slayman CL. Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 184: 970–1014, 1966.

Adrian RH. THE RUBIDIUM AND POTASSIUM PERMEABILITY OF FROG MUSCLE MEMBRANE. *J. Physiol. (Lond.)* 175: 134–159, 1964.

Allain P, Krari N. Diethyldithiocarbamate and brain copper. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 80: 105–112, 1993.

Aoki I, Wu Y-JL, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 22: 1046–1059, 2004.

Aschner M, Aschner JL. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 15: 333–340, 1991.

Ashani Y, Catravas GN, Alter WA 3rd. An irreversible anticholinesterase probe for studying increased permeability of the rat blood-brain barrier. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2585–2592, 1981.

Augath M, Heiler P, Kirsch S, Schad LR. In vivo (^{39}K) , (^{23}Na) and (^1H) MR imaging using a triple resonant RF coil setup. *J. Magn. Reson.* 200: 134–136, 2009.

Ballinger JR, Gerson B, Gulenchyn KY. Technetium-99m diethyldithiocarbamate (DDC): comparison with thallium-201 DDC as an agent for brain imaging. *Int J Rad Appl Instrum A* 38: 665–668, 1987.

Basta D, Vater M. Membrane-based gating mechanism for auditory information in the mouse inferior colliculus. *Brain Res.* 968: 171–178, 2003.

Beekman F, van der Have F. The pinhole: gateway to ultra-high-resolution three-dimensional radionuclide imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34: 151–161, 2007.

Beller GA. Myocardial perfusion imaging with thallium-201. *J. Nucl. Med.* 35: 674–680, 1994.

Bissig D, Berkowitz BA. Manganese-enhanced MRI of layer-specific activity in the visual cortex from awake and free-moving rats. *Neuroimage* 44: 627–635, 2009.

Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40: 648–677, 1969.

Brismar T, Collins VP, Kesselberg M. Thallium-201 uptake relates to membrane potential and potassium permeability in human glioma cells. *Brain Res.* 500: 30–36, 1989.

Britten JS, Blank M. Thallium activation of the (Na⁺--K⁺)-activated ATPase of rabbit kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 159: 160–166, 1968.

Brozski TJ, Ciobanu L, Bauer CA. Central neural activity in rats with tinnitus evaluated with manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Hear. Res.* 228: 168–179, 2007.

de Bruïne JF, Limburg M, van Royen EA, Hijdra A, Hill TC, van der Schoot JB. SPET brain imaging with 201 diethyldithiocarbamate in acute ischaemic stroke. *Eur J Nucl Med* 17: 248–251, 1990.

de Bruine JF, van Royen EA, Vyth A, de Jong JM, van der Schoot JB. Thallium-201 diethyldithiocarbamate: an alternative to iodine-123 N-isopropyl-p-iodoamphetamine. *J. Nucl. Med.* 26: 925–930, 1985.

Bussy C, Cambedouzou J, Lanone S, Leccia E, Heresanu V, Pinault M, Mayne-L'hermite M, Brun N, Mory C, Cotte M, Doucet J, Boczkowski J, Launois P. Carbon nanotubes in macrophages: imaging and chemical analysis by X-ray fluorescence microscopy. *Nano Lett.* 8: 2659–2663, 2008.

Buzsaki G. Windows on the brain. In: *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, USA, 2006, p. 80 – 110.

Carmona A, Cloetens P, Devès G, Bohic S, Ortega R. Nano-imaging of trace metals by synchrotron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23: 1083, 2008.

Chuang K-H, Lee JH, Silva AC, Belluscio L, Koretsky AP. Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. *Neuroimage* 44: 363–372, 2009.

Contreras D, Destexhe A, Steriade M. Intracellular and computational characterization of the intracortical inhibitory control of synchronized thalamic inputs in vivo. *J. Neurophysiol.* 78: 335–350, 1997.

Crookes W. Vorläufige Untersuchungen über das Thallium. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 124: 203–215, 1862.

Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 17: 544–553, 2004.

Danscher G, Stoltenberg M. Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Prog Histochem Cytochem* 41: 57–139, 2006.

Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* 71: 1–16, 1981.

Danscher G. Autometallography. *Histochemistry and Cell Biology* 81: 331–335, 1984.

Danscher G. Histochemical tracing of zinc, mercury, silver and gold. *Prog Histochem Cytochem* 23: 273–285, 1991.

Douglas KT, Bunni MA, Baindur SR. Thallium in biochemistry. *Int. J. Biochem.* 22: 429–438, 1990.

Drapeau P, Nachshen DA. Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol. (Lond.)* 348: 493–510, 1984.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161–174, 1977.

Duncan GE, Stumpf WE. Brain activity patterns: assessment by high resolution autoradiographic imaging of radiolabeled 2-deoxyglucose and glucose uptake. *Prog. Neurobiol.* 37: 365–382, 1991.

Duong TQ, Silva AC, Lee SP, Kim SG. Functional MRI of calcium-dependent synaptic activity: cross correlation with CBF and BOLD measurements. *Magn Reson Med* 43: 383–392, 2000.

Ehrlich P. *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie.* A. Hirschwald, 1885.

Eschenko O, Canals S, Simanova I, Beyerlein M, Murayama Y, Logothetis NK. Mapping of functional brain activity in freely behaving rats during voluntary running using manganese-enhanced MRI: implication for longitudinal studies. *Neuroimage* 49: 2544–2555, 2010.

Fa Z, Zhang P, Huang F, Li P, Zhang R, Xu R, Wen Z, Jiang X. Activity-induced manganese-dependent functional MRI of the rat visual cortex following intranasal manganese chloride administration. *Neurosci. Lett.* 481: 110–114, 2010.

Filipkowski RK, Rydz M, Berdel B, Morys J, Kaczmarek L. Tactile experience induces c-fos expression in rat barrel cortex. *Learn. Mem.* 7: 116–122, 2000.

Foley TD, Rhoads DE. Stimulation of synaptosomal Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase by ethanol: possible involvement of an isozyme-specific inhibitor of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *Brain Res.* 653: 167–172, 1994.

Franc BL, Acton PD, Mari C, Hasegawa BH. Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. *J. Nucl. Med.* 49: 1651–1663, 2008.

Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 370–386, 2008.

Freyschmidt J, Galanski M. *Handbuch diagnostische Radiologie. Thorax.* 1. Aufl. Springer, Berlin, 2003.

- Gale GR, Atkins LM, Walker EM Jr, Smith AB, Jones MM.** Mechanism of diethyldithiocarbamate, dihydroxyethyldithiocarbamate, and dicarboxymethyldithiocarbamate action of distribution and excretion of cadmium. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 13: 474–481, 1983.
- Gehring PJ, Hammond PB.** The interrelationship between thallium and potassium in animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 155: 187–201, 1967.
- Gill ML, Strobel SA, Loria JP.** ²⁰⁵Tl NMR methods for the characterization of monovalent cation binding to nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 16723–16732, 2005.
- Gilmore JL, Yi X, Quan L, Kabanov AV.** Novel Nanomaterials for Clinical Neuroscience. *J Neuroimmune Pharmacol* 3: 83–94, 2008.
- Göbel W, Helmchen F.** In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology (Bethesda)* 22: 358–365, 2007.
- Gokel GW, Leevy WM, Weber ME.** Crown ethers: sensors for ions and molecular scaffolds for materials and biological models. *Chem. Rev.* 104: 2723–2750, 2004.
- Goldmann EE.** *Vitalfärbung am Zentralnervensystem; Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus chorioideus und der Hirnhäute.* K. Akademie der Wissenschaften, 1913.
- Goldschmidt J, Grosser O, Amthauer H, Reymann K, Scheich H, Schröder U.** Monitoring of tissue viability and lesion growth in focal cerebral ischemia in rats using ²⁰¹TlDIDC small-animal SPECT. 2009 World Molecular Imaging Congress. 2009.
- Goldschmidt J, Wanger T, Engelhorn A, Friedrich H, Happel M, Ilango A, Engelmann M, Stuermer IW, Ohl FW, Scheich H.** High-resolution mapping of neuronal activity using the lipophilic thallium chelate complex TIDDC: protocol and validation of the method. *Neuroimage* 49: 303–315, 2010.
- Goldschmidt J, Zuschratter W, Scheich H.** High-resolution mapping of neuronal activity by thallium autometallography. *Neuroimage* 23: 638–647, 2004.
- Happel MFK, Jeschke M, Ohl FW.** Spectral integration in primary auditory cortex attributable to temporally precise convergence of thalamocortical and intracortical input. *J. Neurosci.* 30: 11114–11127, 2010.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57: 173–185, 2005.

Helmchen F, Fee MS, Tank DW, Denk W. A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in freely moving animals. *Neuron* 31: 903–912, 2001.

Hevner RF, Liu S, Wong-Riley MT. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. *Neuroscience* 65: 313–342, 1995.

Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2. Aufl. Sinauer Associates, 1992.

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117: 500–544, 1952.

Hodgkin AL, Keynes RD. Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. *J. Physiol. (Lond.)* 128: 28–60, 1955.

Hodgkin AL, Keynes RD. Experiments on the injection of substances into squid giant axons by means of a microsyringe. *J. Physiol. (Lond.)* 131: 592–616, 1956.

Hunter DR, Komai H, Haworth RA, Jackson MD, Berkoff HA. Comparison of Ca²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺ fluxes in mitochondria of the perfused rat heart. *Circ. Res.* 47: 721–727, 1980.

Jakobsen LO, Malmendal A, Nielsen NC, Esmann M. Cation binding in Na,K-ATPase, investigated by ²⁰⁵Tl solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* 45: 10768–10776, 2006.

Kaczmarek L, Robertson HA. *Immediate Early Genes and Inducible Transcription Factors in Mapping of the Central Nervous System Function and Dysfunction, Volume 19*. 1. Aufl. Elsevier Science, 2002.

Kaczmarek L, Zangenehpour S, Chaudhuri A. Sensory regulation of immediate-early genes c-fos and zif268 in monkey visual cortex at birth and throughout the critical period. *Cereb. Cortex* 9: 179–187, 1999.

- Kandel E, Schwartz J, Jessell T.** Cell and Molecular Biology of the Neuron. In: *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Medical, 2000, p. 67 – 170.
- Karamanakos PN, Pappas P, Stephanou P, Marselos M.** Differentiation of disulfiram effects on central catecholamines and hepatic ethanol metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 88: 106–110, 2001.
- Keynes RD, Lewis PR.** The resting exchange of radioactive potassium in crab nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 113: 73–98, 1951.
- Keynes RD, Ritchie JM.** The movements of labelled ions in mammalian non-myelinated nerve fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 179: 333–367, 1965.
- Keynes RD.** The ionic movements during nervous activity. *J. Physiol. (Lond.)* 114: 119–150, 1951a.
- Keynes RD.** The leakage of radioactive potassium from stimulated nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 113: 99–114, 1951b.
- Kita H, Narita K, Van der Kloot W.** Tetanic stimulation increases the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction in Mn^{2+} -, CO_2^{+-} , and Ni^{2+} -saline solutions. *Brain Res.* 205: 111–121, 1981.
- Korbas M, Blechinger SR, Krone PH, Pickering IJ, George GN.** Localizing organomercury uptake and accumulation in zebrafish larvae at the tissue and cellular level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 12108–12112, 2008.
- Kovács KJ.** Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J. Neuroendocrinol.* 20: 665–672, 2008.
- Landowne D.** A comparison of radioactive thallium and potassium fluxes in the giant axon of the squid. *J. Physiol. (Lond.)* 252: 79–96, 1975.
- Larkman AU.** Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: I. Branching patterns. *J. Comp. Neurol.* 306: 307–319, 1991.
- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A.** Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol. Ther.* 85: 217–229, 2000.

Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* : 190–91, 1973.

Lee JH, Silva AC, Merkle H, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mouse brain after systemic administration of MnCl₂: dose-dependent and temporal evolution of T1 contrast. *Magn Reson Med* 53: 640–648, 2005.

Leergaard TB, Bjaalie JG, Devor A, Wald LL, Dale AM. In vivo tracing of major rat brain pathways using manganese-enhanced magnetic resonance imaging and three-dimensional digital atlasing. *Neuroimage* 20: 1591–1600, 2003.

Lewandowsky MH. Zur Lehre von der Cerebrospinal Flüssigkeit. *Z Klin Med* 40: 480–494, 1900.

Limburg M, van Royen EA, Hijdra A, de Bruïne JF, Verbeeten BW Jr. Single-photon emission computed tomography and early death in acute ischemic stroke. *Stroke* 21: 1150–1155, 1990.

Lin YJ, Koretsky AP. Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med* 38: 378–388, 1997.

Lison H. Erstellung hochaufgelöster Karten des cerebralen Metabolismus mit Hilfe der Thallium-Autometallographie. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. 2006.

Lohmann H, Csicsaky M, Wiegand H. The action of thallium on the excitability of CA1 pyramidal cells in hippocampal slices. *Neurotoxicol Teratol* 11: 545–549, 1989.

Lu H, Xi Z-X, Gitajn L, Rea W, Yang Y, Stein EA. Cocaine-induced brain activation detected by dynamic manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 2489–2494, 2007.

Lubin M, Schneider PB. The exchange of potassium for caesium and rubidium in frog muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 138: 140–155, 1957.

Macharadze T, Goldschmidt J, Marunde M, Wanger T, Scheich H, Zuschratter W, Gundelfinger ED, Kreutz MR. Interretinal transduction of injury signals after unilateral optic nerve crush. *Neuroreport* 20: 301–305, 2009.

- Macharadze T, Pielot R, Wanger T, Scheich H, Gundelfinger ED, Budinger E, Goldschmidt J, Kreutz MR.** Altered Neuronal Activity Patterns in the Visual Cortex of the Adult Rat after Partial Optic Nerve Crush--A Single-Cell Resolution Metabolic Mapping Study. *Cereb. Cortex* (September 21, 2011). doi: 10.1093/cercor/bhr256.
- Mazzolini M, Traverso S, Marchetti C.** Multiple pathways of Pb(2+) permeation in rat cerebellar granule neurones. *J. Neurochem.* 79: 407–416, 2001.
- McKinley MJ, Mathai ML, McAllen RM, McClear RC, Miselis RR, Pennington GL, Vivas L, Wade JD, Oldfield BJ.** Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J. Neuroendocrinol.* 16: 340–347, 2004.
- Meiri U, Rahamimoff R.** Neuromuscular transmission: inhibition by manganese ions. *Science* 176: 308–309, 1972.
- Melnick RL, Monti LG, Motzkin SM.** Uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation by thallium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 68–73, 1976.
- Mendonça-Dias MH, Gaggelli E, Lauterbur PC.** Paramagnetic contrast agents in nuclear magnetic resonance medical imaging. *Semin Nucl Med* 13: 364–376, 1983.
- Montes S, Soriano L, Ríos C, Monroy-Noyola A.** Endogenous thiols enhance thallium toxicity. *Arch. Toxicol.* 81: 683–687, 2007.
- Moretto P, Llabador Y, Ortega R, Simonoff M, Razafindrabe L.** PIXE microanalysis in human cells: physiology and pharmacology. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 75: 511–517, 1993.
- Mullins L.** The penetration of some cations into muscle. *J. Gen. Physiol.* 42: 817–829, 1959.
- Mullins LJ, Moore RD.** The movement of thallium ions in muscle. *J. Gen. Physiol.* 43: 759–773, 1960.
- Murayama Y, Weber B, Saleem KS, Augath M, Logothetis NK.** Tracing neural circuits in vivo with Mn-enhanced MRI. *Magn Reson Imaging* 24: 349–358, 2006.

- Murphy VA, Wadhvani KC, Smith QR, Rapoport SI.** Saturable transport of manganese(II) across the rat blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 57: 948–954, 1991.
- Mylius J.** Tauglichkeit von Mangan als Tracer zur funktionellen Bildgebung im Gehirn - Eine Studie am Colliculus inferior und auditorischen Cortex der Mongolischen Wüstenrennmaus. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. 2007.
- Nagy I, Woolf CJ, Dray A, Urbán L.** Cobalt accumulation in neurons expressing ionotropic excitatory amino acid receptors in young rat spinal cord: morphology and distribution. *J. Comp. Neurol.* 344: 321–335, 1994.
- Nakazato K, Nagamine T, Suzuki K, Kusakabe T, Moon HD, Oikawa M, Sakai T, Arakawa K.** Subcellular changes of essential metal shown by in-air micro-PIXE in oral cadmium-exposed mice. *Biometals* 21: 83–91, 2008.
- Nanitsos EK, Acosta GB, Saihara Y, Stanton D, Liao LP, Shin JW, Rae C, Balcar VJ.** Effects of glutamate transport substrates and glutamate receptor ligands on the activity of Na-/K(+)-ATPase in brain tissue in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31: 762–769, 2004.
- Narita K, Kawasaki F, Kita H.** Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. *Brain Res.* 510: 289–295, 1990.
- Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik DP, Pickett RD, Holmes RA, Volkert WA, Forster AM, Weisner PS, Marriott JA.** Technetium-99m d,l-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. *J. Nucl. Med.* 28: 191–202, 1987.
- Neubert J, Kolodziej A, Zappe M, Georgi J, Budinger E, Ilango A, Woldeit M, Angenstein F, Ohi FW, Scheich H, Goldschmidt J.** In vivo SPECT-imaging of spatial patterns of neuronal activity in rodent brain using 99mTcHMPAO and 201TlIDDC as tracers. 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. 23. – 27. März 2011, Göttingen, Germany: 2011.
- Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, Fuchs PA.** Transmitter Release. In: *From Neuron to Brain: A Cellular and Molecular Approach to the Function of the Nervous System, Fourth Edition.* Sinauer Associates, 2001.

Nikai T, Basbaum AI, Ahn AH. Profound reduction of somatic and visceral pain in mice by intrathecal administration of the anti-migraine drug, sumatriptan. *Pain* 139: 533–540, 2008.

Nisenbaum ES, Wilson CJ, Foehring RC, Surmeier DJ. Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 76: 1180–1194, 1996.

Nong A, Taylor MD, Clewell HJ 3rd, Dorman DC, Andersen ME. Manganese tissue dosimetry in rats and monkeys: accounting for dietary and inhaled Mn with physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol. Sci.* 108: 22–34, 2009.

Norman AB, Bertram KJ, Thomas SR, Pratt RG, Samaratinga RC, Sanberg PR. Magnetic resonance imaging of rat brain following in vivo disruption of the cerebral vasculature. *Brain Res. Bull.* 26: 593–597, 1991.

Nunez PL, Srinivasan R. *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG, 2nd Edition.* 2. Aufl. Oxford University Press, USA, 2005.

Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 9868–9872, 1990.

Orsulakova A, Morgenstern C, Kaufmann R, D'Haese M. The laser microprobe mass analysis technique in the studies of the inner ear. *Scan Electron Microsc* : 1763–1766, 1982.

Ortega R, Bresson C, Fraysse A, Sandre C, Devès G, Gombert C, Tabarant M, Bleuet P, Seznec H, Simionovici A, Moretto P, Moulin C. Cobalt distribution in keratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis. *Toxicol. Lett.* 188: 26–32, 2009a.

Ortega R, Devès G, Carmona A. Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J R Soc Interface* 6 Suppl 5: S649–658, 2009b.

Oskarsson A. Dithiocarbamate-induced redistribution and increased brain uptake of lead in rats. *Neurotoxicology* 5: 283–293, 1984.

- Van Paesschen W, Dupont P, Sunaert S, Goffin K, Van Laere K.** The use of SPECT and PET in routine clinical practice in epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* 20: 194–202, 2007.
- Pagnanelli RA, Basso DA.** Myocardial perfusion imaging with ²⁰¹Tl. *J Nucl Med Technol* 38: 1–3, 2010.
- Palomero-Gallagher, Zilles.** Isocortex. In: *The Rat Nervous System, Third Edition*, edited by Paxinos G. Academic Press, 2004, p. 729 – 757.
- Pardridge WM.** The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRx* 2: 3–14, 2005.
- Patel RAG, Beller GA.** Prognostic role of single-photon emission computed tomography (SPECT) imaging in myocardial viability. *Curr. Opin. Cardiol.* 21: 457–463, 2006.
- Pautler RG, Mongeau R, Jacobs RE.** In vivo trans-synaptic tract tracing from the murine striatum and amygdala utilizing manganese enhanced MRI (MEMRI). *Magn Reson Med* 50: 33–39, 2003.
- Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP.** In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 40: 740–748, 1998.
- Pautler RG.** In vivo, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 17: 595–601, 2004.
- Paxinos G, Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: The New Coronal Set.* 4th Revised edition. Academic Press Inc, 1998.
- Pearson R.** Chemical hardness and density functional theory. *Journal of Chemical Sciences* 117: 369–377, 2005.
- Pearson RG.** Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 3533–3539, 1963.
- Pellerin L, Magistretti PJ.** Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J. Neurochem.* 69: 2132–2137, 1997.

Phillis JW, Wu PH, Thierry DL. The effect of alpha-, beta adrenergic receptor agonists and antagonists on the efflux of ²²Na and uptake of ⁴²K by rat brain cortical slices. *Brain Res.* 236: 133–142, 1982.

Rajendran R, Minqin R, Ynsa MD, Casadesus G, Smith MA, Perry G, Halliwell B, Watt F. A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits--insights into the pathology of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382: 91–95, 2009.

Rang HP, Ritchie JM. On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations. *J. Physiol. (Lond.)* 196: 183–221, 1968.

Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34: 207–217, 1967.

Relman AS, Lambie AT, Burrows BA, Roy AM. Cation accumulation by muscle tissue: the displacement of potassium by rubidium and cesium in the living animal. *J. Clin. Invest.* 36: 1249–1256, 1957.

Ríos C, Galván-Arzate S, Tapia R. Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Ti₂SO₄. *Arch. Toxicol.* 63: 34–37, 1989.

Rose EM, Koo JCP, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* 29: 8143–8155, 2009.

van Royen EA, de Bruïne JF, Hill TC, Vyth A, Limburg M, Byse BL, O'Leary DH, de Jong JM, Hijdra A, van der Schoot JB. Cerebral blood flow imaging with thallium-201 diethyldithiocarbamate SPECT. *J. Nucl. Med.* 28: 178–183, 1987.

Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328–1331, 1988.

Sanchez G. Fitting bioassay data and performing uncertainty analysis with BLOKMOD. *Health Phys* 92: 64–72, 2007.

Sandow A, Mandel H. Effects of potassium and rubidium on the resting potential of muscle. *J. Cell. Physiol.* 38: 271–291, 1951.

Scheckel KG, Hamon R, Jassogne L, Rivers M, Lombi E. Synchrotron X-ray absorption-edge computed microtomography imaging of thallium compartmentalization in *Iberis intermedia*. *Plant and Soil* 290: 51–60, 2007.

Scheich H, Heil P, Langner G. Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. Tonotopic 2-deoxyglucose. *Eur. J. Neurosci.* 5: 898–914, 1993.

Schielke GP, Moises HC, Betz AL. Potassium activation of the Na,K-pump in isolated brain microvessels and synaptosomes. *Brain Res.* 524: 291–296, 1990.

Schmidt PF, Lehmann RR, Ilsemann K, Wilhelm AH. Distribution patterns of lead in the aortic wall determined by lamina. *Artery* 12: 277–285, 1985.

Schröder WH, Fain GL. Light-dependent calcium release from photoreceptors measured by laser micro-mass analysis. *Nature* 309: 268–270, 1984.

Sendtner M, Gnahn H, Wakade A, Thoenen H. Is activation of the Na⁺K⁺ pump necessary for NGF-mediated neuronal survival? *J. Neurosci.* 8: 458–462, 1988.

Shibuya I, Douglas WW. Indications from Mn-quenching of Fura-2 fluorescence in melanotrophs that dopamine and baclofen close Ca channels that are spontaneously open but not those opened by high [K⁺]_o; and that Cd preferentially blocks the latter. *Cell Calcium* 14: 33–44, 1993.

Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 17: 532–543, 2004.

Silva AC. Using manganese-enhanced MRI to understand BOLD. *NeuroImage* (January 8, 2012). doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.01.008.

Sjodin RA. Rubidium and cesium fluxes in muscle as related to the membrane potential. *J. Gen. Physiol.* 42: 983–1003, 1959.

Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394–401, 1957.

Skou JC. ENZYMATIC BASIS FOR ACTIVE TRANSPORT OF NA⁺ AND K⁺ ACROSS CELL MEMBRANE. *Physiol. Rev.* 45: 596–617, 1965.

Sloot WN, Gramsbergen JB. Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Res.* 657: 124–132, 1994.

Smith QR, Rapoport SI. Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. *J. Neurochem.* 46: 1732–1742, 1986.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28: 897–916, 1977.

Somjen GG. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 41: 159–177, 1979.

Somjen GG. The Blood-Brain Barrier. In: *Ions in the Brain: Normal Function, Seizures, and Stroke.* Oxford University Press, USA, 2004, p. 3 – 12.

Spyropoulos AC, Rainbow TC. Quantitative autoradiography of [³H]ouabain binding sites in rat brain. *Brain Res.* 322: 189–193, 1984.

Stoltenberg M, Danscher G. Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections. *Histochem. J.* 32: 645–652, 2000.

Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A. In Vivo Two-Photon Calcium Imaging of Neuronal Networks. *PNAS* 100: 7319–7324, 2003.

Sundin A, Garske U, Orlefors H. Nuclear imaging of neuroendocrine tumours. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21: 69–85, 2007.

Syková E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol. Rev.* 88: 1277–1340, 2008.

Szentágothai J. The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 201: 219–248, 1978.

Tai CY, Smith QR, Rapoport SI. Calcium influxes into brain and cerebrospinal fluid are linearly related to plasma ionized calcium concentration. *Brain Res.* 385: 227–236, 1986.

Takeda A, Kodama Y, Ishiwatari S, Okada S. Manganese transport in the neural circuit of rat CNS. *Brain Res. Bull.* 45: 149–152, 1998.

Thomas H, Tillein J, Heil P, Scheich H. Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Electrophysiological mapping of frequency representation and distinction of fields. *Eur. J. Neurosci.* 5: 882–897, 1993.

Thurn KT, Paunesku T, Wu A, Brown EMB, Lai B, Vogt S, Maser J, Aslam M, Dravid V, Bergan R, Woloschak GE. Labeling TiO₂ nanoparticles with dyes for optical fluorescence microscopy and determination of TiO₂-DNA nanoconjugate stability. *Small* 5: 1318–1325, 2009.

Timm F. Zur Histochemie der Schwermetalle Das Sulfid-Silberverfahren. *International Journal of Legal Medicine* 46: 706–711, 1958.

Tucciarone J, Chuang K-H, Dodd SJ, Silva A, Pelled G, Koretsky AP. Layer specific tracing of corticocortical and thalamocortical connectivity in the rodent using manganese enhanced MRI. *Neuroimage* 44: 923–931, 2009.

Verbueken AH, Bruynseels FJ, Van Grieken RE. Laser microprobe mass analysis: a review of applications in the life sciences. *Biomed. Mass Spectrom.* 12: 438–463, 1985.

Wanger T, Scheich H, Ohl FW, Goldschmidt J. The use of thallium diethyldithiocarbamate for mapping CNS potassium metabolism and neuronal activity: Tl(+) - redistribution, Tl(+) -kinetics and Tl(+) -equilibrium distribution. *Journal of Neurochemistry* (April 14, 2012). doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07757.x.

Wanger T. Charakterisierung neuronaler Aktivitätsmuster im NonREM-Schlaf der Ratte mittels der Thallium-Autometallographie. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. 2007.

Weng J-C, Chen J-H, Yang P-F, Tseng W-YI. Functional mapping of rat barrel activation following whisker stimulation using activity-induced manganese-dependent contrast. *Neuroimage* 36: 1179–1188, 2007.

- Wenning GK, Donnemiller E, Granata R, Riccabona G, Poewe W.** 123I-beta-CIT and 123I-IBZM-SPECT scanning in levodopa-naive Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 13: 438–445, 1998.
- Wetzel W, Wagner T, Balschun D.** REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. *Eur. J. Neurosci.* 18: 2611–2617, 2003.
- Wintermark M, Sesay M, Barbier E, Borbély K, Dillon WP, Eastwood JD, Glenn TC, Grandin CB, Pedraza S, Soustiel JF, Nariai T, Zaharchuk G, Caillé JM, Dousset V, Yonas H.** Comparative overview of brain perfusion imaging techniques. *J Neuroradiol* 32: 294–314, 2005.
- Wolf GL, Baum L.** Cardiovascular toxicity and tissue proton T1 response to manganese injection in the dog and rabbit. *AJR Am J Roentgenol* 141: 193–197, 1983.
- Yu X, Wadghiri YZ, Sanes DH, Turnbull DH.** In vivo auditory brain mapping in mice with Mn-enhanced MRI. *Nat. Neurosci.* 8: 961–968, 2005.
- Yuste R, Konnerth A.** *Imaging in Neuroscience and Development: A Laboratory Manual.* 1st Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
- Yuste R, Tank DW.** Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* 16: 701–716, 1996.

Anhang

1. Aufziehlösung

Herstellung von 1000 ml Aufziehlösung

- 800 ml Aqua dest + 1 g Gelatine
- die Gelatine unter rühren in Aqua dest bei milder Hitze (ca. 40°C) lösen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- danach 100 ml 0.12 M PBS (oder 0.1 M) + 100 ml absoluten Alkohol hinzufügen und gut mischen
- anschließend filtrieren

Die Lösung hält sich über Wochen im Kühlschrank.

2. Modellierungsparameter

Modellneurone als Zylinder

Radius: 0.5 μm (alle)

Länge: 10 μm (alle)

Austauschfläche mit EZR-Kompartiment: 31.41592654 μm^2 (alle)

Volumen: 7.85398 μm^3 (alle)

K^+ -Konzentration: 120 mM (Neuron 1)

100 mM (Neuron 2),

80 mM (Neuron 3)

transmembrane K^+ -Ströme: 2.5 pmol / $\text{cm}^2 \times \text{s}$ (Neuron 1)

5 pmol / $\text{cm}^2 \times \text{s}$ (Neuron 2)

10 pmol / $\text{cm}^2 \times \text{s}$ (Neuron 3)

Extrazellulärraum-Kompartiment

Austauschfläche mit Plasma-Kompartiment: 0.347721 μm^2

Volumen: 4.71239 μm^3

K^+ -Konzentration: 3 mM

K^+ -Strom Plasma – EZR: 10 pmol / $\text{cm}^2 \times \text{s}$

Kombiniertes Plasma / Körper-Kompartiment

Austauschfläche mit EZR-Kompartiment: 0.347721 μm^2

Volumen: 49472.5 μm^3

K^+ -Konzentration: 4 mM

K⁺-Strom Plasma – EZR: 10 pmol / cm² x s

Transferkoeffizienten

k1 = 1.05 x 10⁻⁵, k2 = 0.147, k3 = 3.33, k4 = 0.049, k5 = 6.66, k6 = 0.119, k7 = 13.32,

k8 = 0.299, k9 = 3.50 x 10⁻⁴

3. Lösung einer gewöhnlichen, linearen und inhomogen Differentialgleichung

Die Ausgangsgleichung hat die Form: $\frac{dy}{dt} = a - by$ (I)

Nach Trennung der Variablen erhält man: $\frac{dy}{a-by} = dt$ (II)

Es gelte $v = a - by$, (III)

dessen Ableitung nach y sich wie folgt darstellt: $\frac{dv}{dy} = -b$ (IV)

Nach Umformung erhält man $dy = -\frac{dv}{b}$, (V)

wodurch man nach Einsetzen in (II) folgenden Term erhält: $-\frac{1}{b} \frac{dv}{v} = dt$ (VI)

Nach einer geringfügigen Umformung bildet man das Integral und erhält:

$$\int \frac{dv}{v} = -b \int dt \quad (\text{VII})$$

Die entsprechenden Stammfunktionen lauten:

$$\ln v(t) = -bt + k \quad (\text{VIII})$$

Nach Einsetzen von (III) in (VIII) und Potenzieren zur Basis e erhält man:

$$a - by(t) = e^{-bt+k} \quad (\text{IX})$$

Für die Integrationskonstante k gelte: $k = e^k$, (X)

Entsprechend folgt: $a - by(t) = ke^{-bt}$ (XI)

Ausgehend von den Anfangsbedingungen $y = 0$ zum Zeitpunkt $t = t_0 = 0$, lässt sich

k wie folgt bestimmen: $k = \frac{a - by(t_0)}{e^{-bt_0}}$ (XII)

Gleichung (XII) lässt sich vereinfachen zu: $k = \frac{a}{e^{-bt_0}}$ (XIII)

Durch Einsetzen von (XIII) in (XI) erhält man $a - by(t) = \frac{a}{e^{-bt_0}} e^{-bt}$, (XIV)

Woraus nach geringfügiger Umformung folgt: $by(t) = a - ae^{-b(t-t_0)}$ (XV)

Nach Einsetzen von $t_0 = 0$ und einer finalen Umstellung erhält man schließlich die Lösung: $y(t) = \frac{a}{b} (1 - e^{-bt})$

4. Zeitverlauf der Tl^+ -Aufnahme in verschiedenen Hirnregionen *in vivo* nach systemischer Applikation von wasserlöslichen Thalliumsalzen

Ríos C et al. (1989)
Arch. Toxicol.
63:34-37

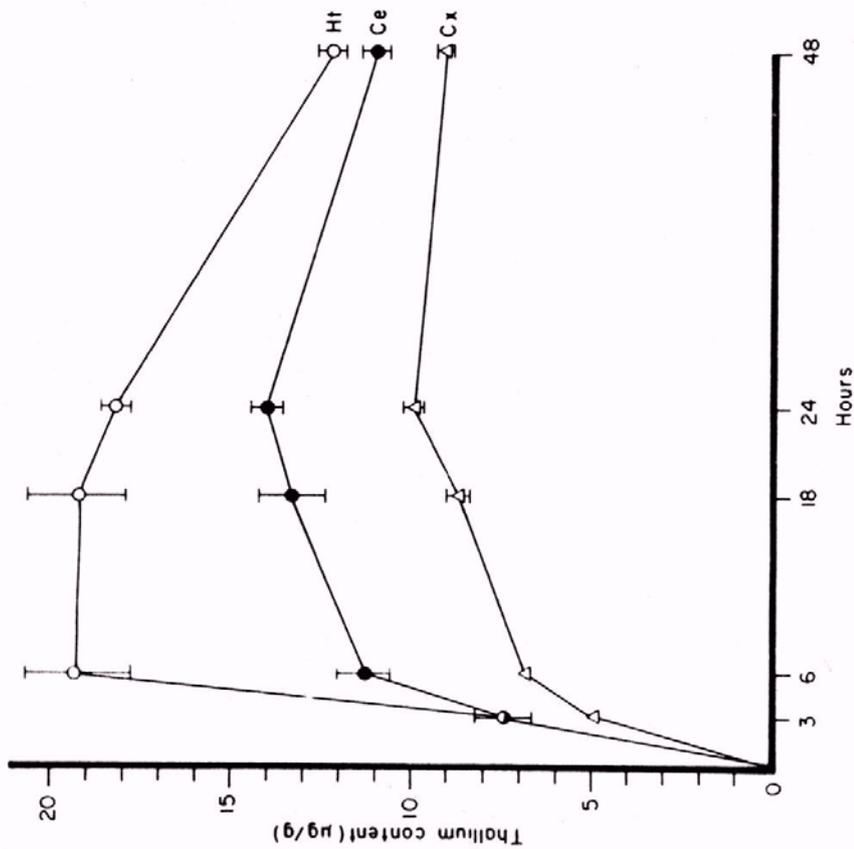


Fig. 4. Time course of thallium accumulation in brain regions. Rats were injected i. p. with 32 mg/kg Tl_2SO_4 and sacrificed at the times indicated. Results are expressed as means \pm 1 SEM of 3-5 independent experiments. *Ht* = hypothalamus, *Ce* = cerebellum, *Cx* = brain cortex

Danksagung

Mein Dank gilt all jenen Menschen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben bzw. mich während meiner Doktorandenzeit am LIN unterstützt, inspiriert, sowie mir mit Rat und aufmunternden Worten zur Seite gestanden haben. Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die kreativen und materiellen Beiträge meiner Betreuer Jürgen Goldschmidt und Frank Ohl, sowie die tatkräftige Hilfe von Katrin Gruß, Katrin Ohl und Lydia Löw. Danken möchte ich auch meinen Kollegen und Freunden Michael Lippert und Kenta Takagaki für den praktischen und moralischen Support, wie auch für das angenehme und stimulierende Arbeitsumfeld. Mein besonderer Dank gebührt Jenni Neubert für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung, sowie nicht zuletzt auch meiner Familie für die rückhaltlose Unterstützung während der Doktorarbeit, wie auch zu allen Zeiten davor.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel **Thallium-Diethyldithiocarbamat als Tracer für neuronale Aktivität und cerebralen Kalium-metabolismus** selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt und nicht bereits als Dissertation verwendet zu haben. Ferner erkläre ich, weder dieses noch andere Schriftstücke bisher zur Erlangung des akademischen Grades **doctor rerum naturalium** an der Otto-von-Guericke Universität oder anderen Institutionen eingereicht zu haben.

Tim Wanger

Wilhelm-Külz-Straße 7

30108 Magdeburg

Magdeburg, den 25.06.2012