



Franziska Stöber, Master of Science

Dynamisches $^{201}\text{TIDDC-SPECT}$
zur Erfassung der zeitlichen und
räumlichen Ausbreitung eines
ischämischen Schadens in der
Akutphase des experimentellen
Schlaganfalls

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR RERUM NATURALIUM (DR. RER. NAT.)

„Dynamisches ²⁰¹TIDDC-SPECT zur Erfassung der zeitlichen und
räumlichen Ausbreitung eines ischämischen Schadens in der
Akutphase des experimentellen Schlaganfalls“

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 Master of Science, Franziska Stöber
geb. am 18. September 1986 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr., Klaus Reymann
PD Dr., Heike Endepols

Eingereicht am: 21. Juni 2016
Verteidigt am: 21. Oktober 2016

Franziska Stöber, Master of Science

Leibniz-Institut für Neurobiologie

Projektgruppe Neuropharmakologie

Brenneckestraße 6

39118 Magdeburg

Tel.: +49-391-6263-95431

Mail: franziska.stoeber@lin-magdeburg.de

„Wenn jemand an einer Sache in der Natur zerrt, wird er feststellen,
dass diese mit dem Rest der Welt, verbunden ist.“

„When one tugs at a single thing in nature, he finds it attached to the rest of the world.“

John Muir

Zusammenfassung

Fokale zerebrale Ischämien werden von erheblichen Veränderungen im zerebralen Kalium- (K^+) Stoffwechsel begleitet. Die zelluläre K^+ -Aufnahme und Aufrechterhaltung der intra- zu extrazellulären K^+ -Gradienten hängen entscheidend von der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität ab. Eine Sauerstoff- und Glukosedeprievation führt innerhalb weniger Minuten zur Verminderung und schließlich zum Zusammenbruch der K^+ -Gradienten. Der Verlust von intrazellulärem K^+ ist eines der frühesten Zeichen der ischämischen Gewebsschädigung. Die *in-vivo* Bildgebung des K^+ -Metabolismus bei der fokalen zerebralen Ischämie ist daher von ähnlich hohem Interesse, wie die Bildgebung von Sauerstoff- oder Glukose-Metabolismus.

In der vorliegenden Dissertation wurde der zerebrale K^+ -Metabolismus in Nagetiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie mithilfe des neuen Ansatzes der Kleintier ^{201}Tl -Diethyldithiocarbamat Single-Photon-Emissions-Computertomographie (^{201}Tl -DIDDC-SPECT) untersucht. ^{201}Tl -DIDDC ist ein lipophiler Chelat-Komplex, aus dem nach Passage durch die Blut-Hirn-Schranke das K^+ -Analogon $^{201}Tl^+$ freigesetzt wird. Nagetieren wurde vor oder nach experimenteller Okklusion der mittleren Zerebralarterie (MCAO) ^{201}Tl -DIDDC intravenös injiziert. Zur gleichzeitigen Ermittlung der Minderperfusion nach MCAO wurde der Blutfluss-Tracer ^{99m}Tc -HMPAO injiziert. Mit dynamischen SPECT-Messungen wurde *in-vivo* das räumlich-zeitliche Muster des Verlustes von $^{201}Tl^+$ aus dem Infarktareal bzw. dem Areal verminderter Perfusion visualisiert.

Früh nach MCAO bestand ein Mismatch zwischen deutlich verminderter Perfusion aber noch hohem $^{201}Tl^+$ -Gehalt im Schadensareal. Über einen Verlauf von Stunden gab es einen kontinuierlichen Verlust von $^{201}Tl^+$ aus dem geschädigten Areal, der in einer Kernregion begann und sich in Randbereiche ausbreitete. 24 h nach MCAO war der $^{201}Tl^+$ -Gehalt im Infarktareal massiv reduziert. Unter Therapie mit MK-801 änderte sich die $^{201}Tl^+$ -Verlustkinetik.

Die Daten zeigen an, dass mit dem ^{201}Tl -DIDDC-SPECT die Dynamik der Schadensausbreitung bei der fokalen zerebralen Ischämie *in-vivo* verfolgt werden kann. Die $^{201}Tl^+$ -Verlustkinetik unterscheidet sich in unterschiedlich betroffenen Arealen und kann therapeutische Effekte erfassen. Es erscheint prinzipiell möglich, über den Mismatch von $^{201}Tl^+$ -Gehalt und Perfusion ein quantitatives Maß für noch rettbares Gewebe zu erhalten. Mit der vorliegenden Dissertation ist damit das ^{201}Tl -DIDDC-Kleintier-SPECT als neues Werkzeug der präklinischen Bildgebung zu einer relativ einfachen *in-vivo* Ermittlung von Schlüsselparametern der Schadens-Charakterisierung bei der fokalen zerebralen Ischämie entwickelt worden. Der Ansatz ist prinzipiell auf die SPECT-Bildgebung am Menschen übertragbar.

Summary

Focal cerebral ischemia is accompanied by severe alterations in cerebral K⁺-metabolism. Cellular K⁺-uptake and maintenance of intra- to extracellular K⁺-gradients crucially depend on Na⁺/K⁺-ATPase activity. Oxygen- and glucose-deprivation results, within minutes, in reduction and finally break down of K⁺-gradients. The loss of intracellular K⁺ is one of the earliest markers of ischemic damage. Imaging, *in vivo*, K⁺-metabolism in focal cerebral ischemia is, therefore, of similarly high interest as imaging oxygen- or glucose-metabolism.

In the present thesis cerebral K⁺-metabolism is studied in rodent models of focal cerebral ischemia using the novel approach of small-animal ²⁰¹thallium-diethyldithiocarbamate single-photon emission computed tomography (²⁰¹TIDDC-SPECT). ²⁰¹TIDDC is a lipophilic chelate complex that, after crossing the blood-brain barrier, releases the K⁺-analogue ²⁰¹Tl⁺. Rodents were intravenously injected with ²⁰¹TIDDC either before or after middle cerebral artery occlusion (MCAO). In order to simultaneously image the reduction in perfusion after MCAO, animals were also injected with the blood-flow tracer ^{99m}TcHMPAO.

Dynamic SPECT-imaging was used for *in vivo* imaging of the spatio-temporal patterns of ²⁰¹Tl⁺-loss from the infarcted area or the area of reduced perfusion, respectively.

Early after MCAO a mismatch was found between reduced perfusion but still high ²⁰¹Tl⁺-content in the damaged area. There was a continuous loss over hours of ²⁰¹Tl⁺ from the damaged area beginning in a core region and extending into border zones. 24 h after MCAO ²⁰¹Tl⁺-content in the infarcted area was massively reduced. Treatment with MK-801 altered the kinetics of ²⁰¹Tl⁺-loss.

The data show that ²⁰¹TIDDC-SPECT can be used to monitor *in vivo* the dynamics of infarct growth in focal cerebral ischemia. The kinetics of ²⁰¹Tl⁺-loss differs in differently affected areas and is sensitive to therapeutic effects. It seems possible to derive, from the mismatch of ²⁰¹Tl⁺-content and perfusion, a quantitative measure of salvageable tissue. Thus, in the present thesis small-animal ²⁰¹TIDDC-SPECT has been developed as a novel tool in preclinical imaging that can be used for determining in a relatively simple way *in vivo* key parameters characterizing tissue damage in focal cerebral ischemia. In principle, the approach can be translated to SPECT-imaging in humans.

Schlagworte:

Schlaganfall

Kalium-Stoffwechsel

Thallium

Diethyldithiocarbamat

SPECT

Keywords:

Stroke

Potassium metabolism

Thallium

Diethyldithiocarbamate

SPECT

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Pathophysiologische Grundlagen einer fokalen zerebralen Ischämie.....	4
2.1 Die postischämische Kaskade.....	4
2.2 Das Core-Penumbra Konzept.....	7
3 Bekannte Methoden zur Schadensvisualisierung.....	10
3.1 Nachweis von zellulären Schäden <i>ex-vivo</i>	10
3.2 Nicht-invasive Bildgebungsverfahren <i>in-vivo</i>	11
3.2.1 Die Positronen-Emissions-Tomographie.....	11
3.2.2 Die Magnetresonanztomographie.....	15
3.2.3 Die Computertomographie.....	17
3.2.4 Die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie.....	19
4 Thallium-Diethyldithiocarbamat - neuartiger Tracer zur Schadensvisualisierung.....	23
5 Ziele der Arbeit.....	29
6 Vorbetrachtung zur tierexperimentellen Versuchsdurchführung.....	31
6.1 Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie.....	31
6.1.1 Das intraluminale Faden-Modell.....	33
6.1.2 Die intrazerebrale Endothelin-1 Injektion.....	33
6.2 Wirkungsweise von MK-801.....	35
7 Verwendete Materialien und Methoden.....	36
7.1 Beschreibung der Versuchstiere.....	37
7.2 ²⁰¹ TIDDC.....	38
7.2.1 Tracer-Präparation.....	38
7.2.2 Tracerinjektion in Mäusen.....	38
7.2.3 Tracerinjektion in Ratten.....	39
7.3 Durchführung der SPECT/CT-Messungen.....	43
7.4 Operative Eingriffe zum Verschluss der MCA.....	48

7.4.1	Intraluminales Faden-Modell in Mäusen	48
7.4.2	Intrazerebrale Endothelin-1 Injektion in Ratten	50
7.5	^{99m} TcHMPAO	52
7.5.1	Tracerpräparation	52
7.5.2	Tracerinjektion in Mäusen.....	53
7.5.3	Tracerinjektion in Ratten.....	54
7.6	Applikation von MK-801 in Mäusen.....	55
7.7	Verbleib der Tiere nach der letzten SPECT/CT-Messung	55
7.7.1	Magnetresonanztomographie an Ratten.....	56
7.7.2	Organentnahme und Histologie	57
7.8	Vorverarbeitung der SPECT/CT-Daten.....	58
7.9	Vorgehensweise zur Datenauswertung	59
7.9.1	Bestimmung des Areal vermindelter Perfusion	59
7.9.2	Vergleich der späten ²⁰¹ TIDDC-SPECT mit etablierten Markern	60
7.9.3	Bestimmung einer voxelweisen ²⁰¹ Tl ⁺ -Verlustkinetik aus dem Schadensareal.....	61
7.9.4	Einfluss von MK-801 auf die ²⁰¹ Tl ⁺ -Verlustkinetik und das finale Infarktvolumen	64
8	Ergebnisse.....	65
8.1	20-22 h nach MCAO ist der ²⁰¹ Tl ⁺ -Gehalt im Stromgebiet der MCA deutlich reduziert	65
8.2	Das Areal reduzierten ²⁰¹ Tl ⁺ -Gehalts 20-22 h nach MCAO korrespondiert mit dem definitiven Schaden	67
8.3	Es gibt einen Mismatch zwischen dem Areal vermindelter Perfusion und den frühen Arealen reduzierten ²⁰¹ Tl ⁺ -Gehalts.....	70
8.4	Dynamik des ²⁰¹ Tl ⁺ -Verlustes aus dem Areal vermindelter Perfusion	73
8.5	Die ²⁰¹ Tl ⁺ -Verlustkinetik unterscheidet sich im Infarktkern und seinen Randbereichen.....	79
8.6	MK-801 vermindert den ²⁰¹ Tl ⁺ -Verlust aus dem Schadensareal und verändert die -Verlustkinetik	82
8.7	Signalintensitäten im dynamischen ²⁰¹ TIDDC-SPECT schwanken nach MCAO stärker als in Kontrollen	89
8.8	²⁰¹ Tl ⁺ -Verlustkinetiken können auch bestimmt werden, wenn ²⁰¹ TIDDC nach Durchführung der MCAO injiziert wird.....	91
9	Diskussion	93
9.1	Validierung der ²⁰¹ TIDDC-SPECT im Vergleich mit etablierten Verfahren	94
9.2	Die Kinetik des ²⁰¹ Tl ⁺ -Verlusts aus dem Schadensareal	96
9.3	Möglicher Stellenwert der ²⁰¹ TIDDC-SPECT in der präklinischen in vivo Bildgebung der akuten fokalen zerebralen Ischämie.....	99
9.4	Ausblick auf eine mögliche Anwendung von ²⁰¹ TIDDC-SPECT für die Diagnostik der akuten fokalen zerebralen Ischämie im Menschen.....	100
9.5	Fazit.....	101

Literaturverzeichnis	102
Abbildungsverzeichnis.....	122
Tabellenverzeichnis.....	125
Anhang.....	126
Selbstständigkeitserklärung.....	127
Curriculum vitae	129

Abkürzungsverzeichnis

^{18}F	$^{18}\text{Fluor}$
^{18}F -2FDG	$^{18}\text{Fluor}$ -Deoxyglukose
$^{201}\text{Tl}^+$	$^{201}\text{Thalliumion}$
$^{201}\text{TlCl}$	$^{201}\text{Thalliumchlorid}$
$^{201}\text{TlDDC}$	$^{201}\text{Thallium}$ -Diethyldithiocarbamat
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$^{99\text{m}}\text{Technetium}$
$^{99\text{m}}\text{TcECD}$	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Etylcysteinat-Dimer
$^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Hexamethylpropylenaminoxim
ACA	A. cerebri anterior
ADC	apparent diffusion coefficient
AMG	Autometallographie
Apt.	Apertur
AS	Aminosäure
BHS	Bluthirnschranke
Ca^{2+}	Kalziumion
CaW	Circulus arteriosus willisii
CBV	cerebral blood volume
CCA	A. carotis communis
Cl^-	Chloridion
CMRO_2	cerebral metabolic rate of oxygen utilization
CT	Computertomographie
DDC^-	Diethyldithiocarbamat-Ion
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DICOM	Digital Imaging and Communications Medicine
DWI	diffusion weighted imaging
DZNE	Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen
ECA	A. carotis externa
ET-1	Endothelin-1
Et-OH	Ethanol
EZR	Extrazellulärraum
FMISO	Fluoromisonidazol
FMZ	Flumazenil
H ₂ ¹⁵ O	¹⁵ O markiertes Wasser

H ₂ O	Wasser
HMPAO	Exametazim
HWZ	Halbwertszeit
I	Intensität
i.c.	intrazerebral
ICA	A. carotis interna
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JV	vena jugularis externa, äußere Drosselvene
K ⁺	Kalium-Ion
SD	Streudepolarisation
LIN	Leibniz-Institut für Neurobiologie
MCA	A. cerebri media
MCAO	Okklusion der A. cerebri media
MRT	Magnetresonanztomographie
Ms	Muskelgewebe
MTT	Mean transit time
MW	Mittelwert
N ₂	Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffmonoxid, Lachgas
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaDDC	Natrium-Diethyldithiocarbamat
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
O ₂	Sauerstoff
OEF	oxygen extraction fraction
OGD	oxygen glucose deprivation
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	A. cerebri posterior
PCT	Perfusionscomputertomographie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PID	Periinfarktdepolarisation
PM	Photomultiplier
PPA	A. pterygopalatina
PWI	perfusion weighted imaging

RARE	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
rCBF	regional cerebral blood flow
Rep.	Reperfusion
SD	Streudepolarisation
Sn ²⁺	Zinn ²⁺ -Ion
SnCl ₂	Zinn(II)-chlorid
SPECT	Single photon emission computed tomography
STABW	Standardabweichung
Std	Standard
T ₂ w-MRT	T ₂ -gewichtete MRT
TE	Echo Time
TIA	transitorische ischämische Attacke
Tl ⁺	Thallium-Ion
TIDDC	Thallium-Diethyldithiocarbamat
TR	Time of repetition
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TTP	Time-to-peak
VOI	Volume of interest
VOI-1	mittleres Areal verminderter Perfusion
VOI-2	gespiegeltes mittleres Areal verminderter Perfusion
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Kapitel 1

Einleitung

Der Schlaganfall stellt aktuellen Erhebungen der Weltgesundheitsorganisation WHO zufolge weltweit nach Herzinfarkt und Krebserkrankungen die dritthäufigste Ursache für menschliche Todesfälle dar. Darüber hinaus zählt er zu den häufigsten Erkrankungen, in deren Folge lebenslange Behinderungen im Erwachsenenalter drohen [1].

Aus medizinischer Sicht beschreibt der Begriff Schlaganfall einen Komplex von Symptomen, die im Ergebnis einer akut („schlagartig“) auftretenden Durchblutungsstörung des Gehirns in Erscheinung treten, und die je nach Stärke und Dauer mit vorübergehenden oder langfristigen Funktionsausfällen der betroffenen Hirnregionen und dem Untergang von Nervenzellen einhergeht. Bei ca. 80 % aller Fälle liegt dem klinischen Bild eines Schlaganfalls eine regional verminderte Blutversorgung des Gehirns zugrunde. Diese Form des Schlaganfalls wird als fokale zerebrale Ischämie oder ischämischer Hirninfarkt bezeichnet. Akute fokale Minderdurchblutungen werden in der Regel durch einen Verschluss von hirnversorgenden Arterien hervorgerufen, welcher durch die lokale Bildung eines Thrombus oder häufiger durch die Anschwemmung eines Thrombus mit dem Blutstrom (Thrombembolie) ausgelöst werden kann. Davon zu unterscheiden ist der hämorrhagische Schlaganfall (ca. 20 % aller Fälle), welchem eine intrazerebrale Blutung aufgrund einer rupturierten Hirnarterie zugrunde liegt.

Schätzungen zufolge lässt sich die Anzahl der Menschen, die weltweit jährlich einen erstmaligen Schlaganfall erleiden, auf ca. 15 Millionen beziffern. Allein in Deutschland werden gemäß den derzeit verfügbaren epidemiologischen Daten pro Jahr ca. 196.000 Neuerkrankungen verzeichnet [2].

Statistisch gesehen versterben rund 30 % der betroffenen Patienten innerhalb des ersten Monats an den Leiden ihrer Erkrankung. Die Letalität innerhalb der nahen Folgemonate beträgt noch ca. 9 %. Von den Patienten, die einen Schlaganfall überleben, kann nur etwa die Hälfte im Ergebnis eines als mild einzustufenden Schweregrades sowie einer entsprechenden Früherkennung der Symptomatik des Schlaganfalls soweit rehabilitiert werden, dass eine Rückkehr in ein eigenständiges soziales, wie auch berufliches Leben möglich ist.

Die übrigen Patienten (ca. 30 % der Betroffenen) erleiden in Folge des Schlaganfalls oftmals schwerste Behinderungen, was wiederum dazu führt, dass diese Menschen zeitlebens auf intensive Langzeitpflege und ärztliche Betreuung angewiesen sind [3].

Aufgrund der Tatsache, dass mit zunehmenden Alter von einem deutlichen Anstieg des Erkrankungsrisikos auszugehen ist, wird vor dem Hintergrund des fortschreitenden demographischen Wandels in industrialisierten Ländern mit einem weiteren Anstieg der Inzidenz des Schlaganfalls und den damit verbundenen volkswirtschaftlichen Kosten gerechnet. Einer Kalkulation der Bevölkerungsstudie 'Erlanger Schlaganfall Register' (erstellt innerhalb des Kompetenznetzes Schlaganfall der Charité Berlin) zufolge, beliefen sich die direkten medizinischen Kosten für die ambulante und stationäre Behandlung, die Rehabilitation sowie für die (Langzeit-) Krankenpflege in Deutschland bereits im Jahr 2004 auf ca. 7,1 Mrd. Euro.

Nicht berücksichtigt blieben in dieser Erhebung die indirekten Kosten, die u. a. durch frühzeitige Erwerbslosigkeit und unentgeltliche Pflege durch Angehörige und Bekannte entstanden. Weiterführende Schätzungen gehen davon aus, dass bei 3,5 Millionen zu erwartenden Schlaganfallerkrankungen im Zeitraum zwischen dem Jahr 2006, als Basisjahr der Prognose, und dem Jahr 2025 kumulierte Kosten in Höhe von 108,6 Mrd. Euro für die direkte medizinische Versorgung anfallen werden [4]. Eine Studie der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG [5] kalkuliert, dass bereits zum gegenwärtigen Stand der Anteil des Krankheitsbildes Schlaganfall an den kumulierten Gesundheitskosten zwischen 2 und 5 % liegt. Vor diesem Hintergrund muss der Schlaganfall, als eine der teuersten Erkrankungen der Industrienationen, auch aus ökonomischer Sicht als äußerst bedeutend eingestuft werden.

Das maßgebliche Bestreben der Therapie nach Auftreten einer fokalen zerebralen Ischämie liegt in einer Wiederherstellung der Durchblutung innerhalb einer möglichst kurzen Zeitspanne nach Insult, um funktionell gestörtes aber morphologisch intaktes Gewebe zu retten und so das Infarktvolume und infolgedessen die Beeinträchtigungen für den Patienten zu minimieren. Obwohl in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte in Bezug auf die Vorbeugung und Behandlung von ischämischen Schlaganfällen verzeichnet werden konnten, sind die aktuellen Therapiemöglichkeiten nach wie vor nur sehr begrenzt wirksam und in Summe als unbefriedigend einzustufen.

Die derzeit einzige als hilfreich angesehene und klinisch eingesetzte Therapiemöglichkeit in der Akutphase des ischämischen Schlaganfalls stellt die Thrombolyse-Therapie mit rekombinanten gewebspezifischen Plasminogenaktivatoren (rt-PA) dar [6]. Aufgrund einer erhöhten Blutungsgefahr bei einem Großteil der Patienten und dem sehr engen therapeutischen Zeitfenster einer möglichen Behandlung von weniger als 4,5 Stunden [7], kann jedoch nur ein Bruchteil der Patienten (ca. 5 – 15 %) dieser Akuttherapie zugeführt werden [8]. Auch die aktuell gängigen Sekundärpräventionsstrategien, wie z. B. die Verabreichung von Acetylsalicylsäure - Aspirin®, unterliegen ähnlich strengen Limitierungen und sind für eine umfassende Therapie der Erkrankung nur bedingt geeignet. Vor dem Hintergrund der beleuchteten sozio-ökonomischen Relevanz dieser Erkrankung sowie der gegenwärtig nur begrenzt vorhandenen Therapie- und Präventionsmöglichkeiten werden dringend neue Therapieansätze benötigt (vgl. [9]).

Als Grundvoraussetzung für die Einleitung und Etablierung neuer Therapieansätze gilt es jedoch zunächst, durch die Verbesserung vorhandener Verfahren sowie die Entwicklung neuartiger Methoden ein tieferes Verständnis über die Infarktdynamik und die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge zu erlangen und eine zuverlässige Identifikation von irreversibel geschädigtem Gewebe und einer damit einhergehenden Abgrenzung von beeinträchtigt aber rettbarem Gewebe zu ermöglichen.

In diesem Zusammenhang thematisiert die vorliegende Dissertation die Validierung eines neuartigen Tracers, Thallium-Diethyldithiocarbamat (TIDDC bzw. $^{201}\text{TIDDC}$), der die Visualisierung des zerebralen Kalium (K^+)-Stoffwechsels nach intravenöser Injektion sowohl *in-vivo* mit Hilfe der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl. Single photon emission computed tomography, SPECT) als auch histochemisch mit Einzelzell-Auflösung im Hirnschnitt ermöglicht.

Die Grundlage dieses Ansatzes bilden Veränderungen im zerebralen K^+ -Stoffwechsel, die eine ebenso fundamentale Rolle im ischämischen Schlaganfall spielen wie Veränderungen im Sauerstoff- und Glukosestoffwechsel. Vereinfacht ausgedrückt lässt sich in diesem Kontext festhalten, dass gesunde Nervenzellen durch einen intra-zu-extrazellulären K^+ -Gradienten gekennzeichnet sind, der bei Sauerstoff- und Glukosemangel (als eine unmittelbare Folge des ischämischen Schlaganfalls) innerhalb weniger Minuten zusammenbricht, wodurch die betroffenen Zellen nicht mehr in der Lage sind, K^+ zu akkumulieren. Können die K^+ -Gradienten nicht in einem bestimmten Zeitfenster wieder stabilisiert werden, kommt es unweigerlich zum Untergang des betroffenen Gewebes.

Vor diesem Hintergrund besteht das primäre Ziel dieser Dissertation darin, zu untersuchen, welchen Nutzen die *in-vivo* SPECT-Bildgebung des zerebralen K^+ -Stoffwechsels für das Verständnis der Dynamik des pathologischen Geschehens und für die Diagnostik und Differenzierung verschiedener Grade der Gewebsschädigung haben könnte.

Dazu sollen in Nagetiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie sowohl die Ausbreitung eines ischämischen Schadens anhand des fortschreitenden K^+ -Verlustes aus den betroffenen Arealen, als auch die Eignung des Verfahrens bezüglich der Diagnostik von irreversibel und reversibel geschädigtem Gewebe untersucht werden. Dabei soll auch der Einfluss eines im Nagetiermodell etablierten Therapeutikums betrachtet werden.

Bevor eine detaillierte Darstellung der verwendeten Materialien und Methoden sowie der dabei gewonnenen Ergebnisse erfolgt, werden zunächst die Pathophysiologie des Schlaganfalls und die derzeit zur Verfügung stehenden Bildgebungsmodalitäten erläutert.

Kapitel 2

Pathophysiologische Grundlagen einer fokalen zerebralen Ischämie

Das Gehirn muss als Hauptenergieverbraucher kontinuierlich mit Sauerstoff und Glukose versorgt werden, um seine lebensnotwendige Funktion als Hauptintegrationsort für die komplexen, vom Organismus zu verarbeitenden Informationen ausführen zu können. Obwohl seine Masse nur etwa zwei Prozent des Körpergewichts ausmacht, beansprucht das Gehirn etwa ein Fünftel des gesamten, vom Organismus aufgenommenen Sauerstoffs und ca. die Hälfte der täglich mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate [10].

Aufgrund der Tatsache, dass das Gehirn nur über geringfügige Energiespeichermechanismen verfügt, führt eine plötzliche Reduktion der Durchblutung (Ischämie) unmittelbar zu einer Mangelversorgung mit Sauerstoff und Glukose und somit zu einem sofortigen Erliegen des Energiestoffwechsels. Sinkt der Blutfluss im betroffenen Areal unter einen kritischen Wert bzw. kommt ganz zum Erliegen, wird eine komplexe Schadenskaskade in Gange gesetzt, die zu einer räumlichen und zeitlichen Ausbreitung einer Gewebsschädigung führt. Die dabei involvierten pathophysiologischen Prozesse sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

2.1 Die postischämische Kaskade

Die komplexe Reihe pathophysiologischer Prozesse, die in ihrer Gesamtheit als „postischämische Kaskade“ bezeichnet wird, und die für den Prozess der Infarktausbreitung in Folge eines ischämischen Schlaganfalls verantwortlich ist, lässt sich im Wesentlichen in 3 Phasen unterteilen: eine **akute Phase**, in der es innerhalb weniger Minuten nach Gefäßverschluss zum Absterben von Zellen - vorrangig bedingt durch eine *Glutamat- und Kalzium induzierte Exzitotoxizität* - kommt, eine **subakute Phase**, in der es über einen Zeitraum von Stunden (in der Regel 6 Stunden) zur Ausbreitung des Schadens - maßgeblich bedingt durch *Periinfarktdepolarisationen* - kommt und eine **späte Phase**, welche sich über Tage und sogar Wochen hinziehen kann und die primär durch *inflammatorische und apoptotische Prozesse* bestimmt wird. Die nachstehende Abb. 1 fasst diese postischämisch ablaufenden Prozesse in einer schematischen Darstellung zusammen.

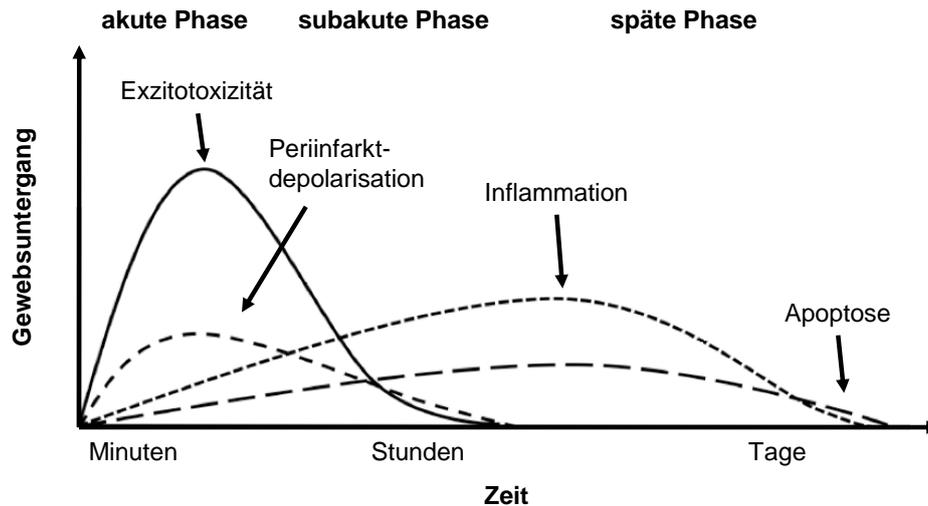


Abb. 1: Einfluss pathologischer Vorgänge bei einer fokalen zerebralen Ischämie auf den Gewebsuntergang (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse) (nach [11]).

Während das Gehirn unter normalen Umständen seinen Energiebedarf fast ausschließlich über den oxidativen Abbau von Glukose deckt, kommt es in der akuten Phase des Infarktes im Ergebnis der ischämiebedingten Reduktion der Sauerstoff- und Glukosezufuhr bereits binnen weniger Minuten zu einer verminderten Produktion energiereicher Phosphate, wie dem Adenosintriphosphat (ATP), und im Ergebnis einer verstärkt anaeroben Glykolyse zu einem erhöhten Laktatspiegel [12, 13]. Aufgrund des reduzierten Blutflusses kann der Überschuss an Laktat nicht oder nur unzureichend abtransportiert werden, was zu einem Absinken des pH-Wertes (Azidose) führt. Im Ergebnis dieser Ereignisse kommt es schlussendlich zu einem Zelluntergang vorrangig durch nekrotische Prozesse.

Ferner führt der Mangel an ATP dazu, dass energieabhängige Prozesse, wie z. B. die Aufrechterhaltung zellspezifischer Ionengradienten durch die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase), komplett zum Erliegen kommen. Dabei bewirkt der Verlust von intrazellulären Kaliumionen (K^+) bei gleichzeitigem Einströmen von extrazellulären Natrium- (Na^+) und Chloridionen (Cl^-) ein Kollabieren des Ruhemembranpotenzials und schließlich den Zusammenbruch sämtlicher Signalweiterleitungsmechanismen [14]. Weiterhin führt die Verschiebung der Ionenkonzentrationen dazu, dass Wasser osmotisch in die Zellen einströmt, woraufhin es zu einem Anschwellen der Zellen und zur Bildung eines zytotoxischen Ödems kommt [11]. Dieses wiederum bewirkt eine Volumenverkleinerung der Extrazellulärräume (EZR), was sich zusätzlich nachteilig auf die Perfusion der Randgebiete auswirkt.

Der Na^+ -Einstrom in die Zellen führt indes zu einer Depolarisation und damit zu einer Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle an der präsynaptischen Membran, was wiederum in einer Freisetzung von exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern in den synaptischen Spalt resultiert. Die größte Bedeutung bei der Exzitotoxizität hat nach heutigem Kenntnisstand der erregende Neurotransmitter Glutamat [15].

Da aufgrund des Energiemangels die energieabhängigen Wiederaufnahmemechanismen gestört sind, kommt es im EZR zu einem drastischen Anstieg sowohl von Glutamat als auch anderen exzitatorischen Neurotransmittern. Ionotrope (AMPA-, NMDA- & Kainat-Rezeptoren) und metabotrope Glutamatrezeptoren werden in einem pathologischen Maße stimuliert. AMPA-Rezeptoren sind Kationen-Kanal assoziierte ionotrope Glutamatrezeptoren, die den Einstrom von Na⁺- und K⁺-Ionen in die Postsynapse ermöglichen, was wiederum ebenfalls zur Depolarisation der postsynaptischen Membran führt. Infolge der Depolarisation öffnen sich zusätzlich spannungsabhängige NMDA-Rezeptoren, die darüber hinaus auch für Kalziumionen (Ca²⁺) durchlässig sind. Die Bindung von Glutamat an metabotrope Glutamatrezeptoren führt durch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege (z. B. Phospholipase C, Inositol-(1,4,5)Triphosphat) zur Ausschüttung von Ca²⁺ aus verschiedenen intrazellulären Speichern, wie z. B. dem endoplasmatischen Retikulum. Der Überschuss an intrazellulären Ca²⁺-Ionen setzt eine Reihe zytoplasmatischer und nuklearer Prozesse in Gang, welche eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung eines Gewebsschadens spielen [16, 17].

Eine besonders große Bedeutung bei der Ausbreitung des ischämischen Schadens wird den Perinfarktdepolarisationen (PIDs) zugeschrieben, die sich ähnlich, wie kortikale Streudepolarisationen (engl. cortical spreading depression, SD) bei der Migräne, von einem Kerngebiet ausgehend konzentrisch über angrenzende Gebiete erstrecken [18]. PIDs treten prinzipiell spontan am Übergang vom Gebiet irreversibler Schädigung zum Perinfarktbereich von fokalen ischämischen Läsionen auf und werden durch den erhöhten extrazellulären K⁺- und Glutamatgehalt im Infarktkern eingeleitet [19]. Ihre Ausbreitung über die gesamte ipsilaterale Hemisphäre erfolgt wellenförmig mit einer Geschwindigkeit von etwa 2 – 6 mm/min und wiederholt sich im Abstand von ca. 10 min (Zwischenphase Refraktärphase) [20–24].

Weiterhin erzeugen PIDs einen erhöhten Energiebedarf im betroffenen Gebiet, wobei die Energie insbesondere für die Wiederherstellung der Ionengradienten und die Repolarisation der Zellen benötigt wird [25]. Während in normal durchbluteten Hirnregionen die Substratversorgung durch einen Anstieg des Blutflusses ohne Einschränkungen gewährleistet werden kann (z. B. im Falle einer Migräne), ist der erhöhte Substratbedarf im Perinfarktbereich nicht zu kompensieren, da hämodynamische Reaktionen nicht mehr ablaufen können [20, 21].

Verschiedene Publikationen konnten in diesem Kontext eine Korrelation zwischen der Depolarisationsdauer und der Blutflussreduktion nachweisen, wonach die Depolarisationsdauer im Laufe aufeinanderfolgender PIDs stetig zunahm [25–27]. Das Ungleichgewicht zwischen erhöhtem Energieaufwand und verringerter Substratzufuhr führt gemäß Back et al. [26] zu vorübergehenden hypoxischen Episoden und zu einem Anstieg der Laktatkonzentration durch den anaeroben Glukoseabbau.

Kann der Energiebedarf nicht mehr gedeckt werden, kommt es auch im Perrinfarktbereich zu einer terminalen, also irreversiblen, Depolarisation und im Endeffekt zu einer Ausbreitung des Infarktes in die Perinfarktgebiete hinein [27]. Günter Mies und Kollegen zeigten in ihrer tierexperimentellen Arbeit von 1993 [28] einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl von PIDs und der Infarktgröße, wobei jede Depolarisation im Perinfarktgebiet das Infarktvolumen um > 20 % vergrößerte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten, wie MK-801, durch die Blockierung von PIDs das Infarktvolumen minimieren [29, 30].

Im weiteren Fortgang der Infarktausbreitung führt die andauernde Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu einer Anregung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme, die für die Ausbildung sekundärer Strukturschäden über Stunden und Tage nach dem Insult (späte Phase) verantwortlich sind [31]. Dazu gehören die Aktivierung von Proteasen, welche Strukturproteine spalten, Phospholipasen, welche Zellmembranen angreifen und Endonukleasen, die DNA-Stränge abbauen [31, 32]. Diese Enzyme bewirken ihrerseits eine erhöhte Freisetzung von freien Radikalen, deren Konzentration aufgrund von Überlastungen der Abwehrmechanismen unter ischämischen Bedingungen drastisch ansteigt [33]. Freie Radikale führen generell zu einer direkten Schädigung von Proteinen, Nucleinsäuren, Kohlenhydraten, DNA und zur Lipidperoxidation, was in einer Anregung von Entzündungsreaktionen (Inflammation) bzw. als Ergebnis nekrotischer und apoptotischer Prozesse im Zelltod resultieren kann.

2.2 Das Core-Penumbra Konzept

Die Auswirkungen einer fokalen zerebralen Ischämie auf die Struktur und Funktion der betroffenen Hirnareale hängt direkt vom Grad der Minderperfusion und von der Dauer der Blutflussreduktion ab [34–36]. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der Verschluss eines gehirnersorgenden Blutgefäßes zu einer inhomogenen Blutflussreduktion im Infarktareal führt, und dass die zuvor beschriebenen postischämischen Prozesse schwellenwertabhängig ablaufen (siehe Abb. 2).

Dabei lassen sich zwei kritische Ischämieschwellenwerte der Hirndurchblutung definieren:

(1) Schwelle für die Aufrechterhaltung des Funktionsstoffwechsels

Fällt der regionale zerebrale Blutfluss unter einen Wert von 18-20 ml / 100 g Hirngewebe / min (Reduktion gegenüber normal um $\geq 75-80\%$), so führt dies zur Ausbildung von Störungen der neuronalen Funktion, die in Abhängigkeit der Zeit durch Wiederansteigen der Durchblutung reversibel auftreten.

(2) Schwelle für die strukturelle Integrität

Ist der Blutfluss noch stärker reduziert und liegt unterhalb der zweiten Schwelle für den Erhalt der neuronalen Integrität bei einem Wert von 10-12 ml / 100 g Hirngewebe / min (Reduktion gegenüber normal um $\geq 90\%$), so kommt es zur Entwicklung irreversibler morphologischer Schäden [14, 22].

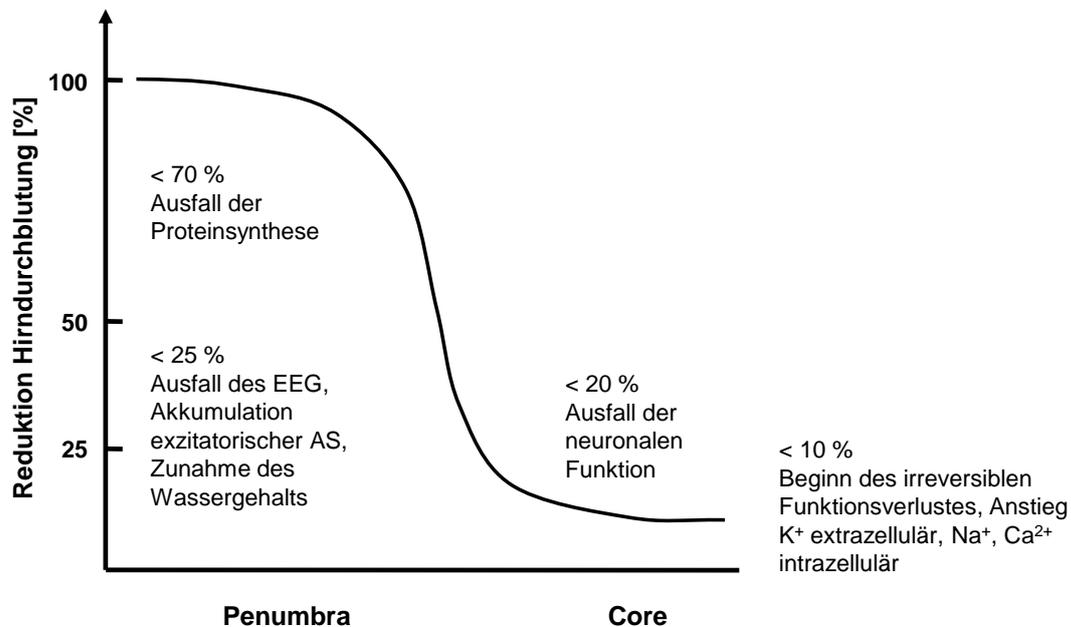


Abb. 2: Auswirkungen einer graduellen Reduktion des zerebralen Blutflusses auf die neuronale Funktion (nach [22]).

Die vorstehend angegebenen Durchblutungsschwellenwerte wurden in entsprechenden tierexperimentellen Untersuchungen durch die graduelle Reduktion des Blutflusses ermittelt, wobei eine große Variabilität zwischen betroffenen Neuronen auf eine selektive Vulnerabilität hinweist [37, 38]. Im Kernbereich des Infarktareals (dem sogenannten Core) wurde in verschiedenen Untersuchungen eine Blutflussreduktion unterhalb des zweiten Schwellenwertes festgestellt, was innerhalb von Sekunden zu einem Stillstand der neuronalen elektrischen Aktivität und innerhalb weniger Minuten zu einem Einbruch des Ionengleichgewichts gefolgt von einer terminalen Depolarisation und schlussendlich dem Zelltod führt [39–41].

Den an die Coreregion angrenzenden Perifarktbereich bezeichnet man nach Astrup et al. [34] als ischämische Penumbra. Bildlich gesprochen liegt dieser im Halbschatten (lat. Penumbra) des Infarktkerns. Definiert werden kann die Penumbra als ein Gewebe, dessen Durchblutung oberhalb der Schwelle für die morphologische Integrität und unterhalb der Schwelle für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion liegt. Damit bildet sie die Übergangszone zwischen Infarktkern und gesundem Hirngewebe.

Die Residualdurchblutung in der Penumbra ist sowohl vom Versorgungsmaße durch kollaterale Blutgefäße als auch vom lokalen Perfusionsdruck abhängig.

Weiterhin kommt es in diesem Bereich zu einer Reduktion des pH-Wertes, dem Ausfall der elektrischen Aktivität (engl. electrical silencing), einer erhöhten Konzentration von Glutamat im EZR sowie einer Ödembildung.

Von entscheidender Bedeutung für die weiteren Betrachtungen innerhalb der vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, dass die extrazelluläre K^+ -Konzentration in der Penumbra unverändert bleibt bzw. nur leicht erhöht ist, während es im Core zu einem raschen Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration kommt [34].

Dieses Gewebe, welches im Englischen auch als 'tissue at risk' bezeichnet wird, kann in einem engen Zeitfenster (meist 3-6 h, in manchen Fällen auch > 24 h [42–44]) durch Wiederherstellung der Perfusion oder durch neuroprotektive Maßnahmen vor dem Zelluntergang bewahrt werden [45, 46]. Gelingt dies nicht, kann es, wie in Abb. 3 ersichtlich, aufgrund der andauernden pathologischen Prozesse im Laufe weniger Stunden zu einem sukzessiven Absterben der Nervenzellen und zu einer Ausbreitung der Infarktzone in die Randbereiche hinein kommen.

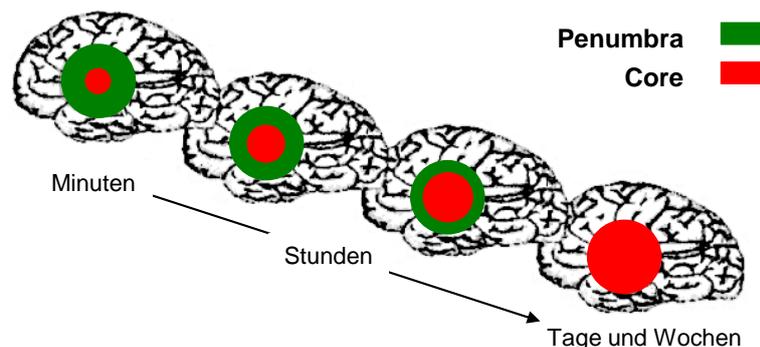


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung zur räumlichen und zeitlichen Ausbreitung einer irreversiblen Schädigung (rot) in das Gebiet der Penumbra (grün) (nach [11]).

Im Core entwickelt sich die irreversible Schädigung rasch, in der Penumbra, in Abhängigkeit der Residualdurchblutung langsamer. Der Infarkt breitet sich vom Zentrum in die Peripherie aus, durch Einbruch der Kollateralversorgung und durch von der Ischämie ausgelöste biochemische und molekulare Prozesse.

Da im Vergleich zum Infarktkern die neurodegenerativen Prozesse in der Penumbra verzögert ablaufen und sich die Ausbreitung der irreversibel geschädigten Infarktzone über mehrere Stunden erstreckt, ist die Penumbra von enormer therapeutischer Relevanz. In diesem Kontext sind ein detailliertes Verständnis der Schadensdynamik nach einer fokalen zerebralen Ischämie sowie eine möglichst frühzeitige Unterscheidung von Core und Penumbra für die gerichtete Schlaganfalltherapie von fundamentaler Bedeutung. Die derzeit am häufigsten genutzten Verfahren zur Darstellung pathologischer Veränderungen nach einem Schlaganfall, sollen hinsichtlich ihres Potentials der frühen Schadensvisualisierung bzw. der Unterscheidung von Core und Penumbra im folgenden Kapitel 3 näher beleuchtet werden.

Kapitel 3

Bekannte Methoden zur Schadensvisualisierung

Die Determinierung von irreversibel geschädigtem, von beeinträchtigt aber lebensfähigem, und von nicht betroffenem Gewebe früh nach Beginn bzw. nach kurzen Episoden einer fokalen zerebralen Ischämie stellt nach wie vor sowohl in der präklinischen und klinischen *in-vivo* Bildgebung als auch *ex-vivo* auf mikroskopischer Ebene eine große Herausforderung dar. Nachfolgend werden die in diesem Kontext zum gegenwärtigen Zeitpunkt gängigsten Methoden einer Schadensvisualisierung kurz beleuchtet.

3.1 Nachweis von zellulären Schäden *ex-vivo*

Die sichersten Nachweismethoden ergeben sich aus post-mortem Untersuchungen, welche jedoch in der Regel der tierexperimentellen Forschung vorbehalten sind. Dabei werden im Wesentlichen histologische und histochemische Färbemethoden eingesetzt, da sie ubiquitär, kostengünstig und relativ einfach anwendbar sind. Zu den gängigsten histologischen Färbemethoden gehören die Färbungen mit Nissl, Hämatoxylin und Eosin, Vanadium Säurefuchsin oder die Silberfärbung [47–51]. Ein gut etabliertes histochemisches Verfahren zur Abgrenzung des Infarktareals vom umliegenden Gewebe beschreibt die Färbung von Hirschnitten mit dem Redox-Farbstoff 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). TTC dient dabei dem Nachweis intakter Mitochondrien, welche das TTC enzymatisch zu einem lipophilen roten Farbstoff, dem Formazan reduzieren. Sind die Mitochondrien geschädigt, kommt es nicht zur Reduktion des sonst farblosen Farbstoffes und das Areal bleibt ungefärbt [52, 53].

Eine weitere Methode stellt die Injektion von Propidiumiodid (PI) in das lebende Tier dar. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Lage ist, die im Gegensatz zu den intakten Membranen lebendiger Zellen, perforierten Zellmembranen toter Zellen zu durchdringen. Nach Passieren der zerstörten Zellmembran interkaliert PI in die DNA von toten Zellen. Dadurch erhöht sich die Fluoreszenz um das 20-30 fache, weshalb die so markierten Zellen anhand einer histologischen Auswertung des Gewebes mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können [54].

Ziel all dieser Methoden ist eine zuverlässige Bestimmung des Infarktolumens und eine Detektion spezifischer pathophysiologischer Veränderungen auf Einzelzellebene.

Der Nachteil vieler dieser Methoden besteht jedoch darin, dass sie unabhängig von Schwere und Dauer des Infarcts eine Abgrenzung des finalen Schadenareals erst Stunden (i. d. R. 2-3 h) nach Infarktbeginn ermöglichen. Der Grund dafür ist, dass histologische oder histochemische Färbemethoden morphologische Veränderungen von Organellen, Zellen oder Geweben widerspiegeln, deren Ausbildung sich im Gegensatz zu metabolischen Veränderungen über Stunden ausbilden und manifestieren.

Die Darstellung vereinzelter betroffener Bereiche im Infarktgewebe früh nach Infarktbeginn stellt sich ebenfalls als sehr schwierig heraus. Eine Unterscheidung von betroffenem aber noch lebendigem Gewebe von irreversibel geschädigten Gewebe scheint indes bislang gänzlich unmöglich [55].

3.2 Nicht-invasive Bildgebungsverfahren *in-vivo*

Nicht-invasive Bildgebungsverfahren ermöglichen über die Darstellung morphologischer Schädigungen hinaus, durch den Einsatz spezifischer Marker auch die Visualisierung metabolischer Beeinträchtigungen. Darüber hinaus können nicht-invasive Bildgebungsverfahren an ein und demselben Individuum wiederholt über einen bestimmten Zeitraum im Rahmen von longitudinalen Studien eingesetzt werden, um Aufschluss über die zeitliche Entwicklung der fortlaufenden pathologischen Prozesse zu geben und die Auswirkungen verschiedener Therapien besser verfolgen zu können.

Für die Entwicklung neuer Bildgebungsverfahren und -marker macht man sich in der Schlaganfallforschung das bereits vorhandene Wissen über die Beziehung von zerebralen Blutflussveränderungen und den Veränderungen metabolischer Prozesse, die unmittelbar nach Reduktion des Blutflusses auftreten, gezielt zu Nutze. In den vergangenen Jahren haben die Entwicklung neuer bildgebender Verfahren und die Weiterentwicklung bestehender Verfahren maßgeblich zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie eines ischämischen Schlaganfalls beigetragen und neue diagnostische und therapeutische Ansätze aufgezeigt.

3.2.1 Die Positronen-Emissions-Tomographie

Eines der bedeutendsten nicht-invasiven Bildgebungsverfahren zur Visualisierung früher metabolischer Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie bildet die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit ^{15}O markiertem Wasser (H_2^{15}O). Allgemein verbirgt sich hinter der PET eine nuklearmedizinische Technologie, bei der die Biodistribution positronen-emittierender Radionuklide (β^+ -Strahler) mit sehr hoher Sensitivität gemessen werden kann. Werden diese Radionuklide an geeignete Tracer gekoppelt, können Stoffwechselaktivitäten sowie die Verteilung und Dichte interessierender Moleküle (z. B. Rezeptoren oder Ablagerungen wie Amyloid-Beta) dargestellt und quantitativ erfasst werden.

Beim Zerfall eines Positronenstrahlers werden Positronen (e^+) emittiert (Abb. 4 (1)). Trifft ein Positron auf ein Elektron (e^-) kommt es zur Annihilation (Abb. 4 (2)), d. h. Positron und Elektron vernichten sich unter Aussendung zweier hochenergetischer Gammastrahlungsphotonen, die mit einer Energie von je 511 keV in annähernd entgegengesetzter Richtung von ihrem Entstehungsort emittiert werden (Abb. 4 (3)) [56]. Im PET-Scanner treffen die Gammastrahlen auf ein Detektorsystem, welches in verschiedene ringförmig angeordnete Detektorelemente untergliedert ist.

Um eine räumliche Information über den Ort der Annihilation und somit auf die Tracerverteilung im Organismus zu erhalten, werden lediglich die Ereignisse gezählt, bei denen 2 Gammaphotonen nahezu gleichzeitig (Zeitfenster 10 bis 20 ns) auf entgegengesetzt angeordnete Detektoren treffen (Prinzip der Koinzidenzdetektion) (siehe Abb. 4 (4)).

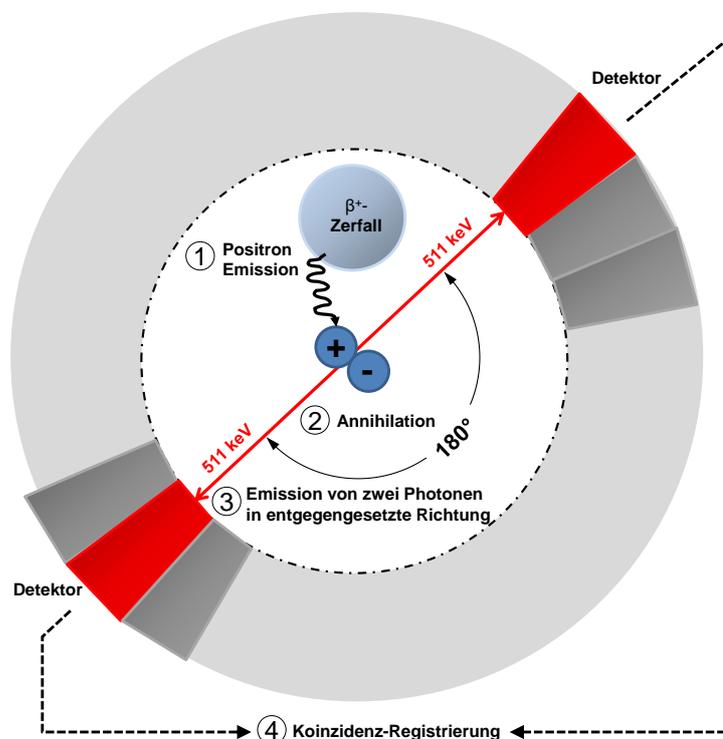


Abb. 4: Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie (nach [57]).

Die Ortsauflösung in der PET-Bildgebung wird u. a. durch die Positronen-Reichweite (engl. positron range), das heißt den mittleren Abstand zwischen dem Ort der Positronenemission und dem Ort der Positron-Elektron-Annihilation, limitiert. Die Reichweite der Positronen unterscheidet sich je nach Isotop abhängig von der Energie, mit der sie emittiert wurden, und abhängig von der Wahrscheinlichkeit, auf ein Elektron zu treffen, d. h. von der Elektronendichte des Gewebes, in dem sich der Positronenemitter befindet.

Je höher die Energie des Positrons (keV), desto größer ist auch seine Reichweite. Die geringste Positronenreichweite aller gängigen Isotope und eine damit realisierbare Visualisierung mit maximaler räumlicher Auflösung bietet das Isotop ^{18}F (^{18}F), dessen theoretisch berechnete

Auflösungsgrenze laut Rodríguez-Villafuerte et al. [58] im Bereich von ca. 500 μm in Weichteilgeweben liegt.

Neben einer Darstellung der räumlichen Tracerverteilung, erlaubt die PET-Technik zusätzlich eine Quantifizierung der Tracerkonzentration und darauf aufbauend die absolute Quantifizierung einer Stoffwechselgröße. Für die absolute Quantifizierung der Radionuklidkonzentration ist es erforderlich, die Schwächungskoeffizienten des Gewebes für Gamma-Strahlung zu kennen. Diese werden in der Regel aus einem Röntgen-Computertomogramm ermittelt. Für die Absolutquantifizierung von Stoffwechselaktivitäten oder Bindungskapazitäten ist es darüber hinaus notwendig den zeitlichen Verlauf der Konzentration des Tracers im arteriellen Blut (arterial input function) zu bestimmen, weil für diese Art der Quantifizierung das Verhältnis der Menge des gebundenen oder verstoffwechselten Tracers in einem Gewebekompartiment zur Menge des Tracers im arteriellen Plasma entscheidend ist.

Durch den Einsatz der H_2^{15}O - bzw. $^{15}\text{O}_2$ -PET können der regionale zerebrale Blutfluss (engl. regional cerebral blood flow, rCBF), das zerebrale Blutvolumen (engl. cerebral blood volume, CBV), die metabolische Rate für Sauerstoff (engl. cerebral metabolic rate of oxygen utilization, CMRO_2) sowie die Sauerstoffextraktionsrate (engl. oxygen extraction fraction, OEF) ermittelt werden.

Im Ergebnis einer quantitativen Erhebung dieser Parameter gelingt es, verschiedene Zonen mit unterschiedlichem Gefährdungspotential im Stromgebiet der betroffenen Arterie und deren Umgebung abzubilden und so deren räumliche und zeitliche Entwicklung zu untersuchen [59–62]. Dabei deutet eine erhöhte Sauerstoffextraktionsrate innerhalb des Areals verminderter Perfusion, auf das Vorhandensein noch vitalen Penumbrawebes hin, während ein Absinken der Sauerstoffextraktionsrate und des Sauerstoffverbrauchs im Areal reduzierten Blutflusses, das Eintreten einer irreversiblen Schädigung anzeigt [38, 63]. Die H_2^{15}O -PET gilt nach wie vor als Goldstandard für die quantitative Bestimmung der Hirndurchblutung und stellt eine der bedeutendsten Methoden für die Unterscheidung von ischämisch irreversibel geschädigtem Core-Gewebe und dem kritisch hypoperfundierten Penumbra-Gewebe dar ([64, 65], siehe vgl. Abb. 5).

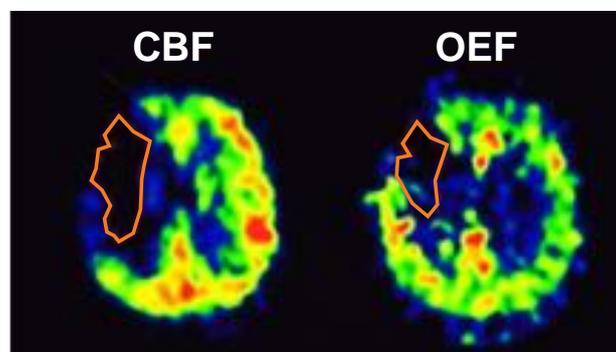


Abb. 5: Koregristierte H_2^{15}O -PET Aufnahmen zeigen regionalen zerebralen Blutfluss (CBF) und Sauerstoffextraktionsrate (OEF) (nach [66]).

Aufnahmen wurden 12 h nach Ausbruch einer linksseitigen Hemiparese von einem 52-jährigen männlichen Patienten erstellt.

Allerdings stellt sich der routinemäßige Einsatz in der Klinik aber auch in vielen Forschungseinrichtungen aufgrund der kurzen Halbwertszeit (HWZ) von ^{15}O (lediglich 2 min) als problematisch dar. So muss ^{15}O direkt vor Ort produziert und unmittelbar im Anschluss verbraucht werden, was wiederum eine teure und komplexe Logistik erfordert. Laut Angaben des Helmholtz Zentrums existieren in Deutschland derzeit nur 31 Zyklotrons zur Radionuklidherstellung (Stand Februar 2014, [67]).

Darüber hinaus ist eine akkurate Quantifizierung des CBF- & der CMRO_2 schwierig, weil die benötigte arterielle Blutentnahme in den meisten Fällen zu gefährlich und der Aufwand im Akutfall zu hoch ist. Aus diesem Grund wurden verschiedene Richtwerte für die Unterscheidung von Core und Penumbra erhoben, die allerdings nur eine relative Beurteilung ermöglichen [39, 40, 40, 68].

Für eine exaktere Bewertung der Vitalität von ischämisch betroffenem Gewebe können in PET-Multi-Tracer-Untersuchungen die Erhebung weiterer physiologischer Parameter herangezogen werden. ^{18}F -Fluoromisonidazol (FMISO) und ^{11}C -Flumazenil (FMZ) gelten in diesem Kontext als gut etablierte Tracer für die Differenzierung von Penumbra und Core [69, 70]. FMISO ist ein Hypoxie-Marker, welcher sich in noch vitalen Zellen unter hypoxischen Zuständen anreichert [71]. FMZ hingegen ist ein Benzodiazepin-Rezeptor Antagonist, welcher mit hoher Affinität an die Benzodiazepin-Rezeptoren (GABA_A -Rezeptoren) von Zellen mit intakter Zellmembran bindet [72, 73]. Beide Tracer gelten als Marker zur Darstellung der neuronalen Integrität, die sich bevorzugt in penumbralem Gewebe, nicht aber im Coregewebe anreichern.

Die ^{18}F -Fluor-Deoxyglukose (^{18}F -2FDG) ist sowohl für die PET-Bildgebung in der Präklinik als auch im klinischen Alltag das mit Abstand am häufigste verwendete Radiopharmakon [74, 75]. Mit einer HWZ von 109,8 min ist ^{18}F noch relativ kurzlebig, kann aber trotzdem über gewisse Distanzen transportiert werden. Es wird für die Messung des regionalen Glukosestoffwechsels in der Onkologie, Kardiologie und Neurologie eingesetzt. ^{18}F -2FDG ist ein Analogon der Glukose, beim dem die Hydroxygruppe am C2-Atom durch ^{18}F ersetzt wurde. ^{18}F -2FDG wird, wie Glukose, über Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen und dort zu FDG-6-phosphat phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung kann FDG-6-phosphat aber nicht weiter verstoffwechselt werden, weshalb es zu einer Anreicherung von FDG-6-phosphat in metabolisch aktiveren Zellen (engl. metabolic trapping) kommt [76].

Präklinische Untersuchungen zu pathologischen Veränderungen des Glukosestoffwechsels in der Akutphase des ischämischen Schlaganfalls und vereinzelte klinische Studien [43, 77] haben gezeigt, dass ^{18}F -2FDG-PET in der Lage, ist Core und Penumbra durch Unterschiede in der Glukoseaufnahme zu visualisieren und vom umliegenden Gewebe zu differenzieren [74, 78–80].

Dennoch stellt sich ein klinischer Einsatz von ^{18}F -2FDG-PET für die Differenzierung von Core und Penumbra derzeit als sehr problematisch dar, da keine einheitlichen Schwellenwerte existieren.

Ungünstig für einen breiteren klinischen Einsatz in der Akut-Diagnostik ist auch die Tatsache, dass quantitative Aussagen über den Glukosestoffwechsel erst möglich werden, wenn der Anteil metabolisierter ^{18}F -2FDG – also ^{18}F -2FDG-6-phosphat – den Anteil nicht metabolisierter deutlich übersteigt, was erst nach ca. 30 Minuten der Fall ist.

Aufgrund des hohen logistischen, finanziellen und zeitlichen Aufwands spielt die PET-Bildgebung trotz der aufgezeigten Vielfältigkeit der mit Hilfe der PET zu erfassenden Parameter in der klinischen Routine bei der Beurteilung eines Schlaganfalls eine eher untergeordnete Rolle und ist vorrangig wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten [81]. Allerdings ist die PET-Bildgebung auch in der tierexperimentellen Schlaganfall-Forschung aufgrund der oben angeführten Gründe und der physikalischen Grenzen in der räumlichen Auflösung (Positronen-Reichweite von ^{15}O ca. 2 mm) in ihrer Anwendung limitiert und gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie z. B. der Magnetresonanztomographie oder der SPECT benachteiligt.

3.2.2 Die Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein in der Bildgebung der fokalen zerebralen Ischämie etabliertes Verfahren. Im Gegensatz zu den nuklearmedizinischen bildgebenden Verfahren und Röntgentechniken ist sie nicht auf den Einsatz ionisierender Strahlen angewiesen. Gegenüber der PET-Bildgebung zeichnet sie sich insbesondere durch eine bessere Verfügbarkeit, i. d. R. schnellere Messungen und geringere Kosten aus. Gemäß internationaler Richtlinien wird die MRT als Verfahren erster Wahl in der Akutdiagnostik des ischämischen Schlaganfalls empfohlen [64].

Generell beruht die MRT auf dem Prinzip der Kernspinresonanz, d. h. dass bestimmte Atomkerne, vorrangig Protonen, im zu untersuchenden Gewebe durch eine Kombination von statischen und hochfrequenten magnetischen Feldern gezielt phasensynchron angeregt und ausgelenkt werden. Dabei bewirkt das Anlegen eines starken statischen Magnetfeldes zunächst die Ausrichtung der Atomkerne parallel oder antiparallel zum Magnetfeld, wobei die Atomkerne eine Kreisbewegung um die Feldlinien des Magnetfeldes vollführen (Präzessionsbewegung). Die Frequenz dieser Bewegung wird als Larmorfrequenz bezeichnet. Das kurzzeitige Anlegen eines zusätzlichen hochfrequenten Wechselfeldes (HF-Puls) senkrecht zur Richtung des statischen Magnetfeldes mit einer Frequenz, die der Larmorfrequenz der Atomkerne entspricht, verursacht ein Auslenken der Atomkerne und eine kurzzeitige Synchronisierung der Kreisbewegung der Atomkerne. Unmittelbar nach der Anregung der Atomkerne durch den HF-Puls kehren die Atomkerne wieder in ihre ursprüngliche Auslenkung zurück. Diesen Vorgang bezeichnet man als Relaxation.

Dabei kommt es innerhalb weniger Sekunden zur Aufhebung der Quermagnetisierung (auch Querrelaxation oder T_2 -Relaxation genannt), d. h. die Atomkerne dephasieren, und zum Wiederaufbau der Längsmagnetisierung (auch Längsrelaxation oder T_1 -Relaxation genannt), d. h. die Atomkerne richten sich wieder parallel oder antiparallel zum statischen Magnetfeld aus.

Die Zeitkonstanten T_1 und T_2 sind gewebsabhängig und tragen neben der Protonendichte im Gewebe zum Kontrast im Bild bei [82, 83]. Im MRT-Bild unterscheidet man hyperintens bzw. signalreich, gleichbedeutend mit hohen Helligkeiten, und hypointens bzw. signalarm, also geringe Helligkeiten. Je nach Signalwichtung können auf diese Weise verschiedene Gewebearten kontrastreich voneinander abgegrenzt werden.

Auf der Grundlage dieser physikalischen Eigenschaften können mit Hilfe der MRT wertvolle Informationen über die strukturelle Integrität, den Diffusions- und Perfusionsstatus des gesamten Gehirns sowie über den Zustand des Gefäßsystems nach fokaler zerebraler Ischämie gewonnen werden.

Neben der sicheren Darstellung intrazerebraler Blutungen [64, 84] hat sich im Rahmen der differentialdiagnostischen Abklärung von Core und Penumbra bei akuten ischämischen Hirninfarkten als Standardprozedere besonders die Kombination von diffusions- und perfusionsgewichteter MRT (engl. diffusion weighted imaging, DWI; perfusion weighted imaging, PWI) weitestgehend etabliert [85]. Die DWI gibt dabei Aufschluss über das Diffusionsverhalten von freien Wassermolekülen. Der Zusammenbruch energieabhängiger Ionengradienten im Core führt zu einem Wassereinstrom in die betroffenen Zellen und somit zu einer Ödem-Bildung, was wiederum eine Verkleinerung der Extrazellulärräume und schlussendlich eine Verringerung der Diffusionskapazität freier Wassermoleküle zur Folge hat. Dies verursacht bereits wenige Minuten nach Symptombeginn eine konsekutive Erhöhung des in der DWI gemessenen Diffusionskoeffizienten (engl. apparent diffusion coefficient, ADC). Im Gegensatz zur DWI erlaubt die PWI durch Messung der regionalen Hirnperfusion eine Darstellung minderperfundierter Hirnregionen und somit des gesamten potenziell von der Ischämie betroffenen Areal. Die Differenz beider Aufnahmen (auch Mismatchkonzept genannt) gilt anerkanntermaßen als prognostischer Surrogatmarker bei der Darstellung des rettbaren Penumbraigewebes ([37, 86, 87], siehe dazu Abb. 6).

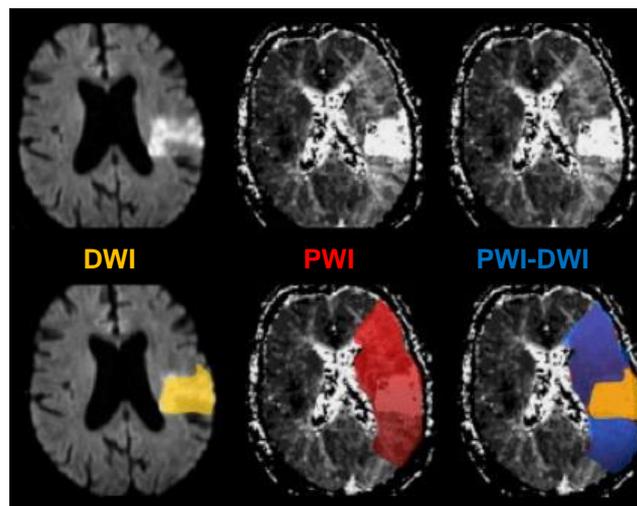


Abb. 6: Bildliche Verdeutlichung des DWI/PWI-Mismatch Konzeptes (nach [88]).

Zahlreiche Studien belegen jedoch, dass die Abgrenzung zwischen irreversibel geschädigtem Gewebe, potenziell gefährdetem aber dennoch rettbarem Gewebe und gesundem Gewebe aufgrund fehlender standardisierter Schwellenwerte nach wie vor problematisch bleibt. So können DWI-Läsionen auch Anteile von rettbarem Gewebe enthalten [89, 90] oder als in der PWI minderperfundierte detektierte Regionen oligämisches Gewebe beinhalten [90–92]. Zudem wurde insbesondere nach leichten Schlaganfällen (sogenannte transitorische ischämische Attacken, TIA) oft beobachtet, dass zunächst detektierte Erhöhungen im ADC-Signal später nicht mehr nachweisbar waren [93, 94]. Demzufolge bleibt die Optimierung der Mismatchdefinition unverändert eines der Hauptziele in der aktuellen Schlaganfall MRT Forschung.

Späte ischämische Läsionen lassen sich im T₂-gewichteten (T₂w) MRT Bild detektieren. Bei dieser Wichtung sind Areale mit einem hohen Anteil von Wassermolekülen, die sich innerhalb des „Gitters“ umgebender Moleküle relativ frei bewegen können (z.B. Wassermoleküle im Liquor im Vergleich zu solchen innerhalb der weißen Substanz) besonders signalintensiv. Wasseransammlungen (Ödeme) im Hirn und Strukturschäden, die mit erhöhtem Wassergehalt oder erhöhter Beweglichkeit von Wassermolekülen im obigen Sinn einhergehen, können sensitiv erfasst werden [55, 95].

3.2.3 Die Computertomographie

In der Computertomographie (CT) wird das zu untersuchende Gewebe, wie bei herkömmlichen Röntgenverfahren, mit einer Röntgenquelle durchleuchtet, wobei statt einer 2D Projektion, Absorptionsprofile des Objektes aus vielen verschiedenen Richtungen erstellt werden, was eine Gewinnung dreidimensionaler Bildinformation ermöglicht. Mit Hilfe einer computergestützten Bildrekonstruktion wird ein Absorptionskoeffizient für jeden Voxel im aufgenommenen 3D-Bild berechnet. Unter den für die Diagnostik der fokalen zerebralen Ischämie relevanten Bildgebungsverfahren ist die CT die am weitesten verbreitete und zeichnet sich gegenüber der MRT durch kostengünstigere und durchschnittlich kürzere Messungen aus. In der klinischen Anwendung ist sie die Standardmethode zum Ausschluss bzw. Nachweis von intrakraniellen Blutungen und subakuten bzw. älteren Infarkten. In der akuten Phase ist eine Infarktdemarkation mit der konventionellen nativen CT allerdings schwierig, was in vielen Fällen dazu führt, dass eine Entscheidung über die Anwendung oder Nicht-Anwendung einer Lyse-Therapie in der akuten Phase ohne eindeutigen Ischämienachweis getroffen wird.

Die Anwendung einer Perfusions-CT (PCT) bzw. die Kombination einer konventionellen CT mit einer PCT kann die Aussagekraft der gewonnenen Aufnahmen deutlich erhöhen [96, 97].

Mit der PCT kann nach Bolusinjektion eines jodhaltigen Kontrastmittels die Durchblutung des Gehirns bestimmt werden, indem Dichteänderungen im Hirngewebe detektiert werden [98].

Dabei werden mit Hilfe spezieller mathematischer Modelle wichtige Größen bestimmt. Zu diesen zählen der rCBF, das CBV, die Zeit bis zur maximalen Hyperdensität, d. h. die benötigte Zeit bis sich das Kontrastmittel in einem Gewebe maximal angereichert hat (engl. time-to-peak, TTP), die mittlere Verweildauer des Kontrastmittels im relevanten Gewebe, d. h. die benötigte Zeit, in der das Kontrastmittel aus einer zuführenden Arterie durch das betrachtete Gewebe in ein venöses Gefäß übergetreten ist (engl. mean transit time, MTT) und die Gewebe-Permeabilität. Die PCT ermöglicht durch die Erhebung dieser Kenngrößen einen positiven Nachweis einer Ischämie bereits in der akuten Phase und erlaubt zudem eine räumliche Abschätzung von Infarktkern und Penumbra [99], was exemplarisch in Abb. 7 dargestellt ist.

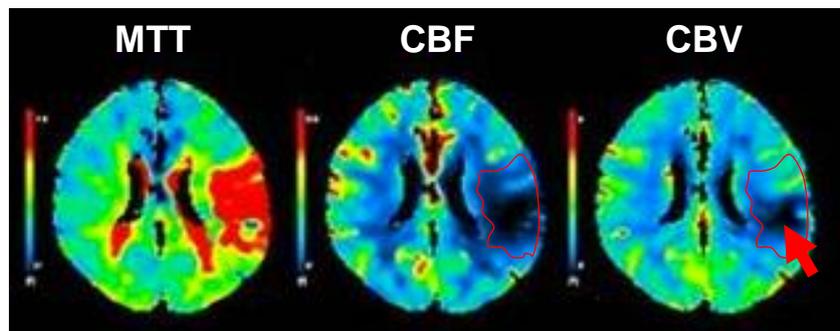


Abb. 7: Perfusions-CT erlaubt räumliche Abschätzung von Core und Penumbra (nach [100]).
Rot umrandet ist das Areal erhöhter MTT, verringertem CBF und unverändertem CBV (Penumbra). Der rote Pfeil rechts zeigt das Areal erhöhter MTT und verringertem CBF und CBV (Core).

Bedauerlicherweise können diese Parameter nur für einen eingeschränkten Bereich und nicht für das gesamte Hirngewebe gewonnen werden. Hinzu kommt eine äußerst schwierige Beurteilung von CT-Aufnahmen in knochennahen Regionen, da die Knochen aufgrund ihrer hohen Dichte oftmals störende Artefakte hervorrufen. Vor diesem Hintergrund gilt die PCT bei der Erfassung von lakunären Infarkten und Perfusionsdefiziten in der hinteren Schädelgrube als weniger sensitiv, als beispielsweise die DWI-MRT [101].

Ähnlich wie bei der DWI/PWI-MRT existieren auch für die PCT keine standardisierten Perfusions-schwellenwerte, die eine irreversible Infarktausdehnung definieren, bzw. die eine eindeutige Abgrenzung von unbetreffendem Gewebe erlauben [102]. Von Nachteil ist ferner die allen CT-Verfahren zugrunde liegende Verwendung ionisierender Strahlung.

Abschließend von entscheidender Bedeutung ist, dass sowohl mit der CT als auch mit der MRT keine wirklichen metabolischen Veränderungen (wie beispielsweise mit der PET oder SPECT), sondern vielmehr Veränderungen im Wasserhaushalt bzw. im Absorptionsverhalten von Kontrastmitteln gemessen werden.

3.2.4 Die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie

Die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl. single photon emission computed tomography, SPECT) ist, wie die PET, eine nuklearmedizinische Untersuchungsmethode und beruht ebenfalls auf der Detektion von Gamma- (γ) Strahlen. Jedoch ist die SPECT einfacher und kostengünstiger als die PET. Die Ursache begründet sich einerseits in der längeren HWZ der Radionuklide, die nicht in unmittelbarer Nähe des Scanners hergestellt werden müssen, und andererseits durch die einfachere Gerätetechnik. Aufgrund der Tatsache, dass die nachfolgend dargelegten Untersuchungen im Wesentlichen die SPECT betreffen, soll diese Technologie etwas detaillierter betrachtet werden.

Das Prinzip der SPECT unterscheidet sich generell deutlich von dem der PET. So werden dem Untersuchungsobjekt (d. h. Tier oder Mensch) bei der SPECT-Bildgebung Gammastrahlen emittierende Isotope injiziert, die wiederum mit einer entsprechenden Gammakamera detektiert werden können [103]. Die Hauptbestandteile einer solchen Gammakamera setzen sich in der bislang am weitesten verbreiteten Technologie aus einem Kollimator, einem Szintillationsdetektor (meist NaI(Tl)-Detektor) mit Photoelektronenvervielfachern (engl. photomultiplier, PM) sowie einer nachgeschalteten elektronischen Datenverarbeitung (EDV) bzw. deren Komponenten zusammen. Die Gesamtheit dieser Bestandteile ist in einem gemeinsamen Gehäuse, dem Kamerakopf, untergebracht. Moderne SPECT-Geräte verfügen über mehrere Kameraköpfe, um Messzeiten reduzieren zu können [103]. Durch eine schrittweise Rotation der an einer Gantry befestigten Kameraköpfe um das zu untersuchende Objekt, können planare Projektionen der Radionuklidverteilung aus verschiedenen Winkelpositionen erzeugt werden, aus denen anschließend die dreidimensionale Verteilung berechnet wird.

Die Funktionsweise herkömmlicher Detektoren in Gammakameras beruht auf dem Prinzip der Szintillation. Dabei werden beim Auftreffen der energiereichen Gammastrahlen Atome in speziellen Szintillationskristallen angeregt. Diese Anregungsenergie wird anschließend in Form von Lichtblitzen (Photonen sichtbaren Lichts) wieder abgegeben, wobei die abgegebene Lichtmenge proportional zur Energie der vom Kristall absorbierten Gammastrahlung ist. Ferner sind an diesen Szintillationsdetektor mehrere PMs angeschlossen, die sich durch eine besonders lichtempfindliche Schicht, die sogenannte Photokathode, auszeichnen. Treffen die freigesetzten Lichtblitze auf die Photokathode, so werden Elektronen emittiert, die in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und anschließend auf eine Sekundärelektrode (Dynode genannt) treffen, aus der wiederum neue Elektronen herausgeschlagen werden. Dieser Prozess wird durch das Hintereinanderschalten mehrerer Dynoden so lange fortgesetzt, bis genügend Elektronen vorhanden sind, um einen messbaren elektrischen Impuls zu erzeugen (siehe Abb. 8).

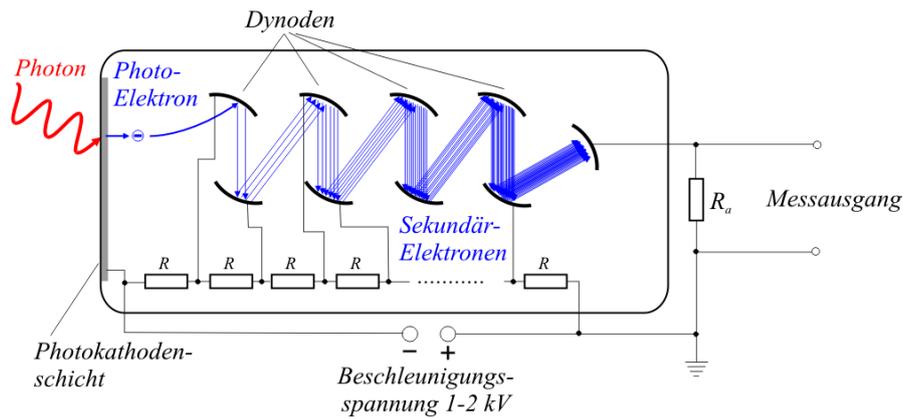


Abb. 8: Photoelektronenvervielfacher werden genutzt um schwache Lichtsignale durch Umwandlung in elektrische Signale und Verstärkung derer zu detektieren [104].

Entsprechend ist dabei wiederum die Anzahl der emittierten Elektronen proportional zur Lichtmenge, die der Kristall abgibt, wohingegen sich die Höhe des elektrischen Impulses proportional zur Energiemenge der vom Kristall detektierten Gammastrahlen verhält.

Um die Strahlenquelle räumlich lokalisieren zu können, werden vor die Detektoren sogenannte Kollimatoren gesetzt, die aus einem mit Löchern versehenen, strahlungsabsorbierenden Material (meist Blei oder Wolfram) bestehen und mit unterschiedlichen Geometrien, nur Gammastrahlen aus bestimmten Richtungen für die Bildgebung zulassen, andere aber ausblenden. Man unterscheidet Parallel-Loch- (siehe Abb. 9 Mitte) und Pinhole-Kollimatoren (siehe Abb. 9 rechts).

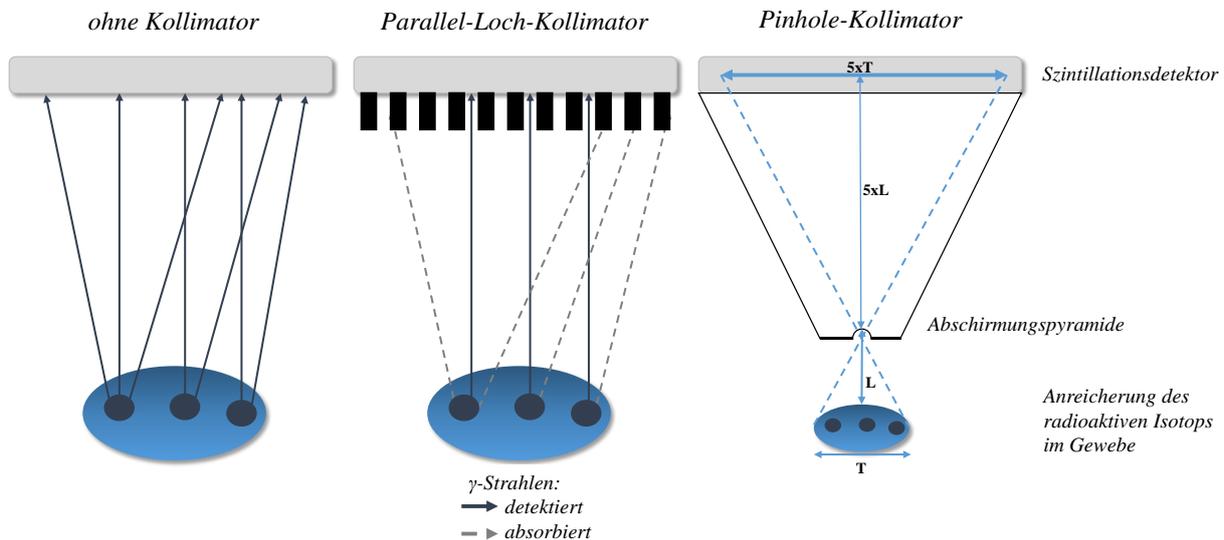


Abb. 9: Die Verwendung von Kollimatoren zur räumlichen Lokalisierung der Strahlungsquelle.

Parallelloch-Kollimatoren erzeugen eine Parallelprojektion des Untersuchungsobjekts. Die Messausbeute ist von der Entfernung zum Objekt fast unabhängig, die Ortsauflösung verschlechtert sich hingegen mit zunehmendem Abstand zum Detektor.

Die räumliche Auflösung wird von dem Verhältnis der Kollimatorlochlänge und des Kollimatorlochdurchmessers bestimmt. Vereinfacht ausgedrückt gilt dabei, dass je dicker die Kollimatorplatten und je kleiner die Bohrungsdurchmesser, desto besser die räumliche Auflösung. Gleichzeitig nimmt aber mit Verkleinerung der Bohrungen unweigerlich auch die Sensitivität ab. So treffen schlussendlich > 99,9 % der emittierten Strahlen nicht auf den Detektor [105]. Vor diesem Hintergrund muss ein Kompromiss zwischen guter räumlicher Auflösung und ausreichend hoher Sensitivität gefunden werden.

Durch den Einsatz von Pinhole-Kollimatoren lässt sich die räumliche Auflösung deutlich erhöhen. Wie in Abb. 9 (rechts) ersichtlich, führt die Anwendung von Pinhole-Kollimatoren zu einer vergrößerten Abbildung des Objekts auf der Detektoroberfläche. Damit kann die Auflösung einer Gammakamera deutlich erhöht werden, ohne dass die Auflösung des Detektors verbessert sein muss. Der Vergrößerungsmaßstab hängt vom Abstandsverhältnis zwischen Pinhole-Kollimator und Detektor und zwischen Pinhole-Kollimator und Untersuchungsobjekt ab. Dabei ist es wichtig, dass der Abstand zwischen dem Pinhole-Kollimator und Detektor größer ist, als der Abstand vom Pinhole-Kollimator zum Untersuchungsobjekt. Aus diesem Grund sind Pinhole-Kollimatoren auf einer Abschirmungspyramide angebracht. Dieses Prinzip ist besonders einfach zu realisieren, wenn der Pinhole-Kollimator möglichst nah an das zu untersuchende Objekt herangeführt werden kann, wodurch allerdings das Gesichtsfeld verkleinert wird. Bei größerem Abstand zwischen Pinhole-Kollimator und Objekt kann der gleiche geometrische Vergrößerungsfaktor nur erreicht werden, wenn auch der Detektor-Kollimator Abstand zunimmt. Damit steigen dann aber auch Größe und Kosten eines solchen Scanners. Die räumliche Auflösung und Sensitivität werden zusätzlich erneut jeweils in entgegengesetzte Richtungen vom Pinhole-Durchmesser beeinflusst, d. h. je kleiner die Pinhole-Bohrung, desto besser ist die räumliche Auflösung aber desto geringer ist auch die Sensitivität.

Parallel-Loch-Kollimatoren werden vorrangig in der Human-Bildgebung eingesetzt. Allerdings sind räumliche Auflösung und Sensitivität der SPECT mit Parallel-Loch-Kollimatoren zum gegenwärtigen Zeitpunkt deutlich geringer als die der PET. Pinhole-Kollimatoren wurden in der klinischen Bildgebung bislang nur relativ begrenzt eingesetzt, vorwiegend für Untersuchungen, bei denen nur ein kleines Gesichtsfeld benötigt wurde (z. B. Fingerknochen). Seit kurzem ist aber ein Pinhole-SPECT-Scanner auf dem Markt, dessen Gesichtsfeld ausreichend groß für humane Hirnbildgebung ist, und dessen Auflösung nach Herstellerangaben (Firma MILabs [106]) 3 mm isotrop beträgt. Diese Auflösung entspricht in etwa derjenigen klinischer PET-Scanner.

In der Kleintier-Bildgebung werden im Unterschied zur Human-Bildgebung Pinhole-Kollimatoren standardmäßig eingesetzt. Da im Gegensatz zur PET-Bildgebung keine absolute Auflösungsgrenze für die SPECT existiert, können momentan unter Verwendung der Pinhole-Technik räumliche Auflösungen *in-vivo* von 250 μm (*ex-vivo* noch deutlich darunter) erzielt werden [107, 108].

Traditionell galt die SPECT-Bildgebung generell, d. h. sowohl für die Human- wie auch die Kleintierbildgebung, als ein Verfahren, bei dem die Absolut-Quantifizierung der Mengen radioaktiver Tracer in einem Gewebekompartiment schwerer durchführbar ist als bei der PET, da die Anzahl gestreuter Photonen, die ja bei der SPECT-Bildgebung durch den Einsatz von Kollimatoren teilweise komplett ausgeblendet werden, schwerer zu ermitteln ist. Dabei ist häufig übersehen worden, dass in der Kleintierbildgebung, insbesondere in der Maus, der Anteil an Streustrahlung sehr gering ist (in der Größenordnung von 10% oder weniger), und wegen geringer inter-individueller Varianz durch Vergleichsmessungen an Standard-Mausphantomen Korrekturfaktoren einfach zu ermitteln sind.

Gleichzeitig verbessert sich aber auch die Möglichkeit der Quantifizierung in der Human-SPECT-Bildgebung beträchtlich. Durch die kombinierte Bildgebung mit CT, primär eingeführt um anatomische Referenz-Aufnahmen zu erhalten, ergibt sich die Möglichkeit, dreidimensionale Datensätze der Absorptionskoeffizienten zu erhalten und den Anteil gestreuter und absorbiertes Strahlung im gemessenen Individuum durch Modellrechnungen zu ermitteln.

In der klinischen Routine-Diagnostik des akuten Schlaganfalls spielt die SPECT-Bildgebung keine bedeutende Rolle. Dies liegt zum einen an der bereits erwähnten verhältnismäßig schlechten räumlichen Auflösung der Bildgebung mit Parallel-Loch-Kollimatoren, der relativ geringen Sensitivität und der relativ schlechten Quantifizierbarkeit, zum anderen aber auch am Fehlen interessanter Radiotracer.

Für die SPECT-Bildgebung der fokalen zerebralen Ischämie stehen zwei sehr gut etablierte Perfusionsmarker zur Verfügung, ^{99m}Tc -Hexamethylpropylenaminoxim ($^{99m}\text{TcHMPAO}$) und ^{99m}Tc -Ethylcysteinat-Dimer ($^{99m}\text{TcECD}$). Beide Marker sind lipophil und können ungehindert die Bluthirnschranke (BHS) passieren. Im Hirn entstehen aus diesen Tracern hydrophile ^{99m}Tc -Verbindungen, die die BHS nicht mehr passieren können und perfusionsabhängig regional angereichert werden. In der Akutphase eines Schlaganfalls können diese Tracer zum Nachweis einer Minderperfusion eingesetzt werden. Dies ist aber von nur begrenztem Nutzen, solange keine Abschätzung des noch rettbaren Gewebes möglich wird. Die Bedeutung der SPECT-Bildgebung für die Akut-Diagnostik der fokalen zerebralen Ischämie könnte erheblich steigen, wenn technologische Fortschritte der SPECT/CT-Bildgebung mit der Entwicklung neuer Tracer zusammenfallen.

Die Entwicklung neuer Tracer ist auch für die Kleintier-SPECT-Bildgebung von Interesse. Seit der Entwicklung kommerziell erhältlicher, dezidierter Kleintier-SPECT-Scanner in der vergangenen Dekade hat die Verbreitung der Technologie deutlich zugenommen. Die relativ hohe räumliche Auflösung macht das Verfahren nicht nur für den klassischen Einsatz der Kleintier-Radionuklid-Bildgebung, die Testung neuer Tracer für die Humanmedizin sondern auch für die Untersuchung von Physiologie und Pathophysiologie im Kleintier interessant.

Kapitel 4

Thallium-Diethyldithiocarbamat - neuartiger Tracer zur Schadensvisualisierung

Fokale zerebrale Ischämien sind stark an Veränderungen der neuronalen Aktivität bzw. an Veränderungen im K^+ -Stoffwechsel gekoppelt. Wie bereits in Kapitel 2.1 detailliert beschrieben, führt die Reduktion des zerebralen Blutflusses und der dadurch hervorgerufene Energiemangel binnen weniger Minuten zum Einbruch der zelltypischen Ionengradienten (mit einer hohen K^+ -Konzentration intrazellulär und einer ~ 30 mal geringeren K^+ -Konzentration extrazellulär) und infolgedessen zu einem erhöhten Ausstrom von K^+ aus der Zelle in den EZR [109].

Dieser Zusammenhang gilt als gut erforscht und konnte unter anderem *in-vitro* an Hippocampus Slice-Präparationen unter Sauerstoff- und Glukosedepriivation (engl. oxygen glucose deprivation, OGD) nachgewiesen werden [110]. Bereits eine Sauerstoff- und Glukosedepriivation von 12 min führte bei diesen Versuchen dazu, dass die betroffenen Zellen nicht mehr in der Lage waren, K^+ -Ionen wieder aufzunehmen und die Ionengradienten zu restabilisieren (siehe Abb. 10).

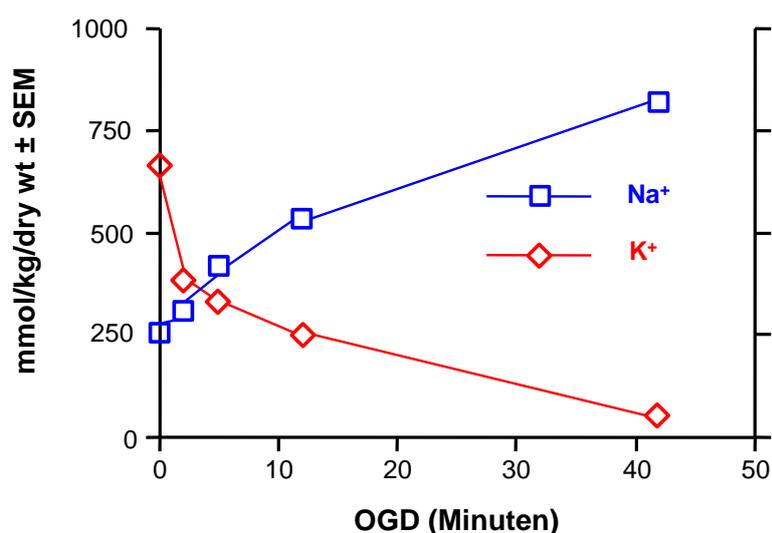


Abb. 10: In-vitro Sauerstoff- und Glukosedepriivation (OGD) Experimente (nach [110]).

OGD führt innerhalb von 2-3 min zu einem Anstieg der Na^+ - und zur Reduktion der K^+ -Konzentration im Zytoplasma von CA1 Neuronen in Hippocampus Schnitten.

Der Einbruch der K^+ -Gradienten bzw. der Verlust der intrazellulären K^+ -Ionen kann als einer der frühestmöglich messbaren Indikatoren innerhalb einer langen Kette pathologischer Vorgänge im Zuge einer zerebralen Ischämie gewertet werden. Es handelt sich dabei um einen Prozess, der darüber hinaus direkt an die neuronale Funktionalität gekoppelt ist. Es wurde gezeigt, dass der Einbruch der K^+ -Gradienten in direktem Maße vom Grad der Blutflussreduktion abhängig ist (siehe dazu Kapitel 2.2 und [34, 111]). Vor diesem Hintergrund ist es zu erwarten, dass der Verlust von K^+ aus dem Schadensareal nicht nur als früher Marker zur Detektion ischämischer Schädigungen, sondern auch als Vitalitätsmarker zur Unterscheidung von Core und Penumbra geeignet ist.

Thallium (Tl^+) wird bereits seit Jahrzehnten als K^+ -Äquivalent eingesetzt und hat sich sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Anwendung als K^+ -Analogon etabliert [112–116]. Bereits 1975 wurde das Gammastrahlen emittierende Thalliumisotop $^{201}Tl^+$ als SPECT-Tracer in die Myokardbildgebung zur Visualisierung der Myokardperfusion und K^+ -Anreicherung im Herzmuskel am Menschen eingeführt [117] und galt Jahrzehnte als Goldstandard zur Unterscheidung von unwiederbringlich geschädigtem und minderperfundiertem aber rettbarem Gewebe.

Im Jahre 2004 wurde Tl^+ als Marker der neuronalen Aktivität in die Neurobiologie eingeführt [118]. K^+ ist ein essentieller Träger elektrischer Ströme in allen Neuronen, wobei K^+ -Ströme bzw. K^+ -Umsatzraten durch neuronale Zellmembranen aktivitätsabhängig ansteigen. Goldschmidt et al. konnten zeigen, dass mit steigender neuronaler Aktivität auch die Tl^+ -Aufnahme ansteigt (schematisch in Abb. 11 verdeutlicht). Die neuronale K^+/Tl^+ -Aufnahme ist im Gegensatz zum Glukose-Metabolismus oder zu Blutflussveränderungen also direkt an die elektrische Aktivität gekoppelt.

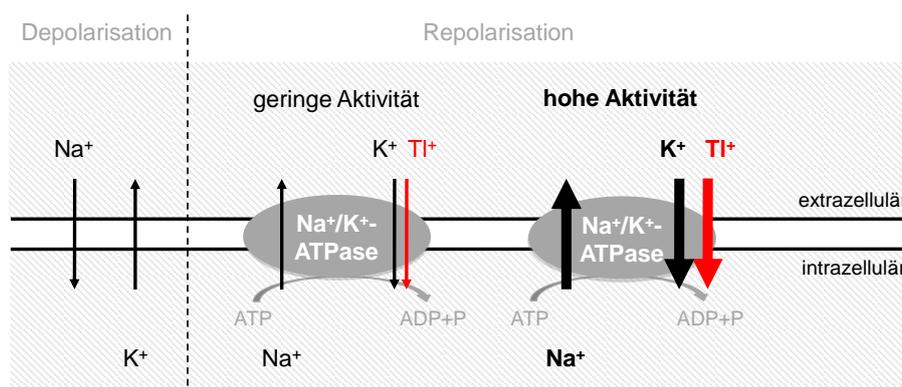


Abb. 11: Intrazelluläre Tl^+ -Aufnahmerate steigt mit steigender neuronaler Aktivität.

Dabei werden Tl^+ -Ionen über die gleichen Transportmechanismen wie K^+ -Ionen, d. h. vorrangig über die Na^+/K^+ -ATPase aktivitätsabhängig und unter Energieverbrauch, in die Zellen aufgenommen. Mit steigender Tl^+ -Aufnahme steigt auch der Tl^+ -Ausstrom, bis Tl^+ -Ein- und Ausstrom im Gleichgewicht sind. Dann entspricht die Tl^+ -Verteilung dem K^+ -Gleichgewichtspotential [119].

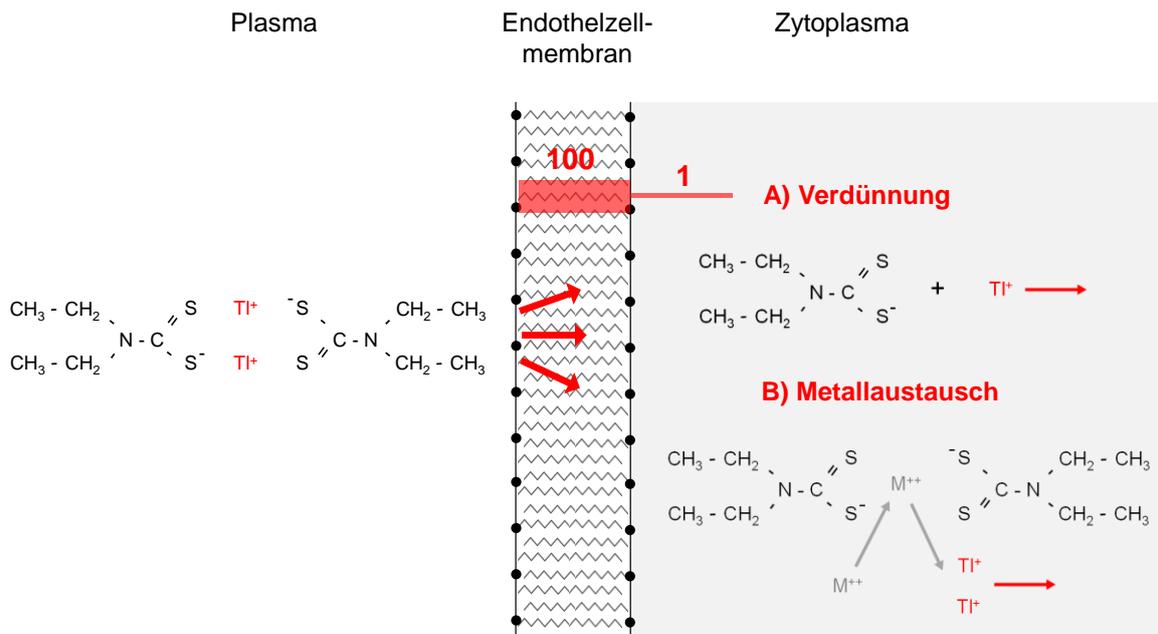


Abb. 13: Mögliche Szenarien für die Freisetzung von Tl^+ aus TIDDC nach Passieren der BHS.

Die zerebrale Tl^+ -Verteilung kann nach intravenöser TIDDC- bzw. $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion sowohl histochemisch auf Einzelzellebene mit der sogenannten Thallium-Autometallographie (Tl^+ -AMG) im Hirnschnitt [118, 120, 123, 124], als auch auf regionaler Ebene und *in-vivo* mit dem SPECT untersucht werden [125] (siehe Abb. 14).

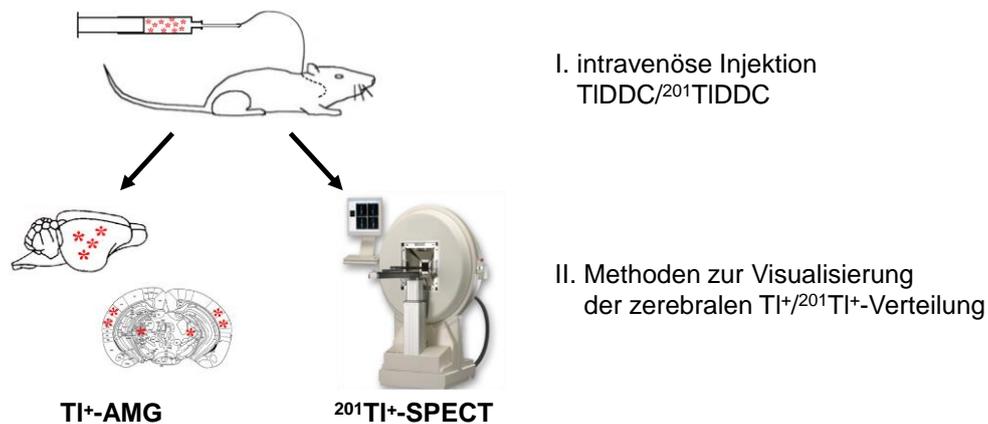


Abb. 14: Nachweismethoden zur Visualisierung der zerebralen Tl^+ - bzw. $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung nach intravenöser Injektion von TIDDC/ $^{201}\text{TIDDC}$.

Grundlage des histochemischen Tl^+ -Nachweises bildet die Präzipitation von Tl^+ -Ionen mit natriumsulfidhaltigen Lösungen (Na_2S), welche üblicherweise über eine transkardiale Perfusion in den Körper gebracht werden, wodurch sich wasserunlösliche Thalliumsulfid- (Tl_2S) Nanokristalle am Ort der Präzipitation bilden [118, 120].

Durch eine anschließende autokatalytische Silberverstärkung am Hirnschnitt können die Tl_2S -Nanokristalle sowohl elektronen- als auch lichtmikroskopisch detektiert werden [118, 120, 123, 124].

Im Rahmen umfangreicher weiterführender Forschungsaktivitäten konnte auf Basis dieser Herangehensweise der Einsatz von TIDDC zur Detektion veränderter Aktivitätsmuster sowohl unter Stimulus-Bedingungen als auch in neurodegenerativ erkranktem Gewebe untersucht und positiv evaluiert werden (vgl [119, 120, 126–128]).

In Nagetiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie konnten unter Anwendung der Tl^+ -AMG bereits unmittelbar nach Verschluss der A. cerebri media (MCA) sowie nach kurzen Episoden einer zerebralen Ischämie eine signifikant verringerte Tl^+ -Färbeintensität im Stromgebiet der betroffenen Arterie detektiert werden (siehe Abb. 15). Innerhalb großer Läsionen ließen sich darüber hinaus Zonen verschiedener Tl^+ -Färbeintensität bzw. -Aufnahme voneinander abgrenzen. Während im Zentrum der Läsion die neuronale und astrozytäre Tl^+ -Aufnahme unterhalb der Detektionsschwelle lag, war die Tl^+ Aufnahme im Randgebiet zwar reduziert aber noch detektierbar (siehe Abb. 15B).

Die Detektion von Zonen verschiedener Tl^+ -Färbeintensität legte die Vermutung nahe, dass mit Hilfe der Tl^+ -Histochemie Areale verschiedener Vulnerabilität bzw. irreversibel geschädigtes von noch rettbarem Gewebe unterschieden werden kann. 24 h nach Einsetzen des Infarktes entsprach der Bereich verminderter Tl^+ -Aufnahme dem durch etablierte Marker nachgewiesenem definitiven Schaden.

Auf Grundlage dieser Befunde konnte erstmalig belegt werden, dass die Visualisierung des K^+ -Stoffwechsels mit Hilfe des Tracers TIDDC für die frühzeitige Detektion und Abgrenzung geschädigten Hirngewebes im Zuge einer fokalen zerebralen Ischämie eingesetzt werden kann (vgl. [127]). Gleichzeitig legten diese Ergebnisse unmittelbar die Verwendung der ^{201}Tl -TIDDC-SPECT für die *in-vivo* Bildgebung von Veränderungen im K^+ -Stoffwechsel in Tiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie und möglicherweise beim Menschen nahe.

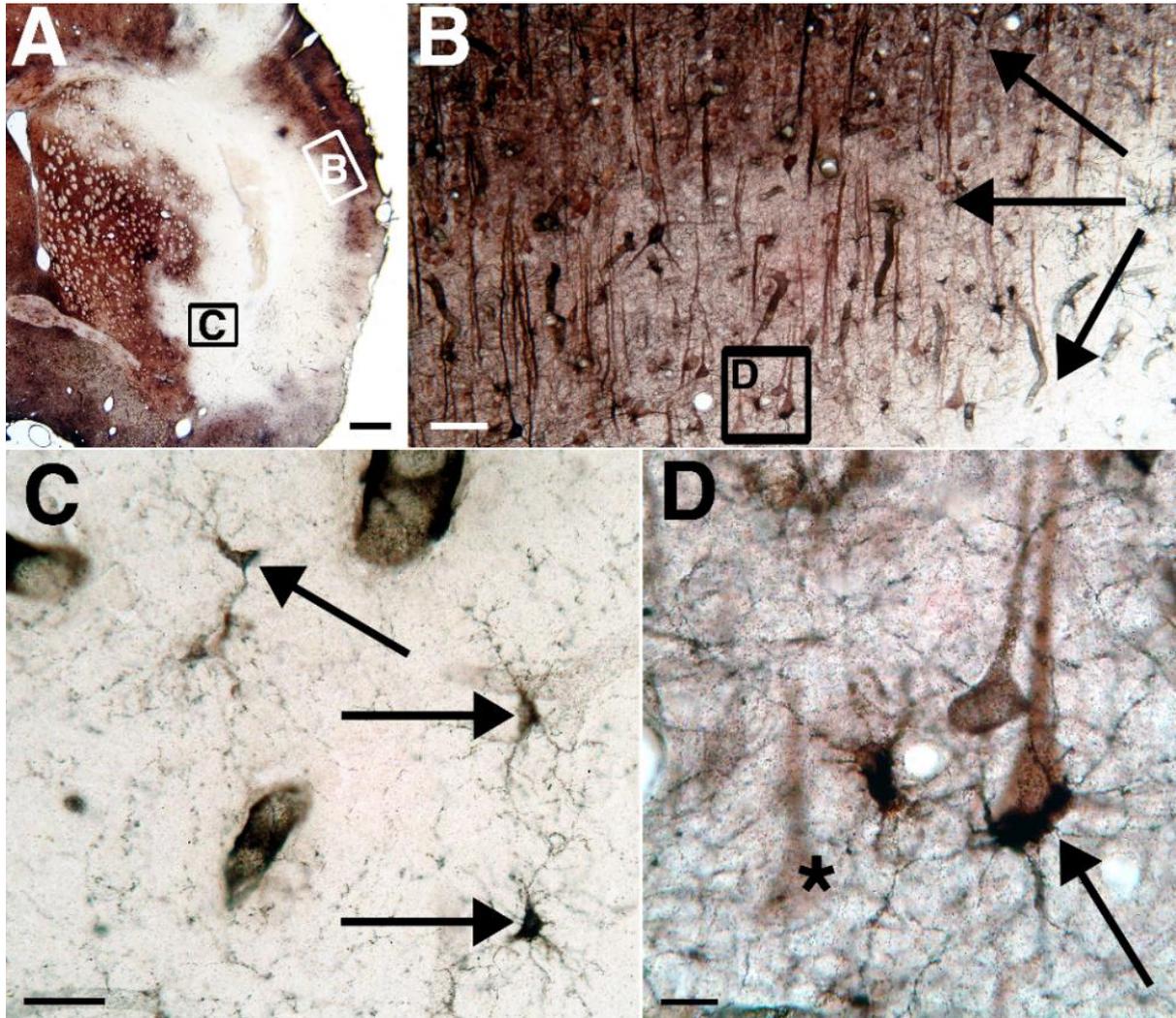


Abb. 15: Tl^+ -AMG Färbemuster im akuten Stadium einer fokalen zerebralen Ischämie.

Gezeigt sind Ausschnitte aus einem Frontalschnitt eines Rattenhirns. Das Tier wurde 15 min nach Verschluss der Arteria cerebri media durch Injektion von Endothelin-1 intraperitoneal mit TIDDC injiziert und weitere 15 min später transkardial perfundiert. A zeigt einen Frontalschnitt der vom Verschluss der MCA betroffenen Hemisphäre. Die Rechtecke in A zeigen die Positionen der Abbildungen B, C und D. In B sind Zonen verschiedener Tl^+ -Färbeintensität dargestellt. C zeigt vereinzelte Zellen normaler Tl^+ -Aufnahmerate innerhalb des Kerns der Läsion (schwarze Pfeile). In D markiert der Pfeil eine Zelle mit astrozytärer Struktur mit einer erhöhten Tl^+ -Färbeintensität in unmittelbarer Nähe zu einem schwächer gefärbten Neuron [127].

Kapitel 5

Ziele der Arbeit

Das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation besteht darin, zu untersuchen, welchen Nutzen die *in-vivo* Bildgebung des zerebralen K^+ -Stoffwechsels mittels ^{201}Tl DDC-SPECT für das Verständnis der Dynamik der Infarktausbreitung und für die Diagnostik und Differenzierung verschiedener Grade der Gewebsschädigung haben kann.

Dabei galt es den im Folgenden formulierten Fragestellungen nachzugehen:

1. Lässt sich der nach experimentell induziertem Verschluss der MCA zu erwartende Verlust von K^+ bzw. Tl^+ mit Hilfe der ^{201}Tl DDC-SPECT *in-vivo* visualisieren?
2. Inwiefern korreliert der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust aus dem Areal verminderter Perfusion mehrere Stunden nach Verschluss der MCA mit der definitiven Schadensgröße bzw. inwiefern entspricht die späte $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung dem mit Hilfe etablierter Marker abgrenzbaren finalen Schadensareal?
3. Kann der fortlaufende Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem potenziellen Schadensareal während dem Anwachsen der ischämischen Läsion auf Basis dynamischer ^{201}Tl DDC-SPECT-Messungen nachverfolgt werden?
4. Gibt es unterschiedliche Kinetiken des Verlusts von $^{201}\text{Tl}^+$ innerhalb des geschädigten Areals?
5. Ermöglicht die simultane Darstellung der zerebralen Perfusion und der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung in der Akutphase der Ischämie eine Unterscheidung von gefährdetem aber potenziell rettbarem und unwiederbringlich geschädigtem Gewebe?
6. Welchen Einfluss hat ein etabliertes Therapeutikum auf die Kinetik des Verlusts von $^{201}\text{Tl}^+$?

Um der Zielstellung grundlegend nachzugehen, wurde in einem ersten Schritt der Versuchsdurchführung die $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung 24 h nach Verschluss der MCA mit etablierten Markern für einen strukturellen Gewebsschaden verglichen. Dabei wurden als etablierte Verfahren zum einen die Nissl-Färbung und zum anderen die T_2w -MRT gewählt.

Für die Untersuchung der Dynamik des $^{201}\text{TI}^+$ -Verlusts aus dem Infarktareal wurden nach Injektion einer einzelnen $^{201}\text{TIDDC}$ -Dosis Serien von SPECT-Aufnahmen im Abstand von 10-15 Minuten über einen Zeitraum von mehreren Stunden angefertigt.

Dabei wurde $^{201}\text{TIDDC}$ in einer Versuchsgruppe bereits vor Auslösen des Infarkts injiziert, in einer anderen Versuchsgruppe nach Auslösen des Infarkts.

Die $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion vor Auslösung des Infarkts bietet den Vorteil, den $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust von einem normal hohen Level aus untersuchen zu können, da $^{201}\text{TI}^+$ im intakten Gewebe akkumulieren kann, bevor der Schaden einsetzt. Die $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion nach dem Infarkt entspricht dagegen mehr der Situation in der Humanbildgebung, bei der die Tracer nach Einlieferung eines Patienten in die Klinik injiziert werden.

Die simultane Darstellung der zerebralen Perfusion und der $^{201}\text{TI}^+$ -Verteilung erfolgte anhand einer Doppelisotopenstudie mit den Tracern $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ und $^{201}\text{TIDDC}$ in Mäusen zum Zeitpunkt der Okklusion und in Ratten während der graduellen Reperfusion.

Zur Untersuchung des Einflusses eines Therapeutikums auf die Kinetik des Verlusts von $^{201}\text{TI}^+$ wurde eine Versuchsgruppe mit dem für Nagetiermodelle etablierten Pharmakon MK 801 behandelt.

Kapitel 6

Vorbetrachtung zur tierexperimentellen Versuchsdurchführung

Bevor im nachstehenden Kapitel 7 auf die detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung und der damit einhergehend zur Anwendung gebrachten Materialien und Methoden eingegangen wird, scheint es an dieser Stelle zunächst sinnvoll, im Sinne einer knappen Vorbetrachtung die gewählten Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie sowie den Wirkmechanismus des eingesetzten Therapeutikum MK-801 etwas näher zu beleuchten.

6.1 Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie

Um die Pathogenese eines ischämischen Schlaganfalls wirklich verstehen und basierend auf diesem Verständnis wirkungsvolle Therapien entwickeln zu können, sind Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie unabdingbar. Um die hohe Variabilität der humanen Ischämien in Bezug auf Lokalisation, Ursache, Schweregrad und Reversibilität der entstandenen Schäden unter simultaner Berücksichtigung von Vorerkrankungen, wie Diabetes, Bluthochdruck oder Fettleibigkeit, möglichst gut abzudecken und gleichzeitig eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen gewährleisten zu können, wurden eine Vielzahl verschiedener Tiermodelle zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie entwickelt (u. a. [129, 130]). Dabei kann zwischen transient oder permanent induzierbaren Tiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie gewählt werden.

Am häufigsten ist beim Menschen das Gefäßgebiet der A. cerebri media (engl. middle cerebral artery, MCA) von einer plötzlich eintretenden Minderdurchblutung betroffen [131, 132], weshalb diese auch das Ziel der meisten Tiermodelle darstellt [133].

Das Versorgungsgebiet der MCA, dem größten hirnversorgenden Gefäß, umfasst, wie in Abb. 16 A ersichtlich, erhebliche Teile des Frontal-, Parietal und Temporallappens sowie wichtige Schaltzentren im Diencephalon (d. h. das Striatum, Teile des Pallidums und des angrenzenden Thalamus), gleichwohl aber auch einen Großteil der Capsula interna.

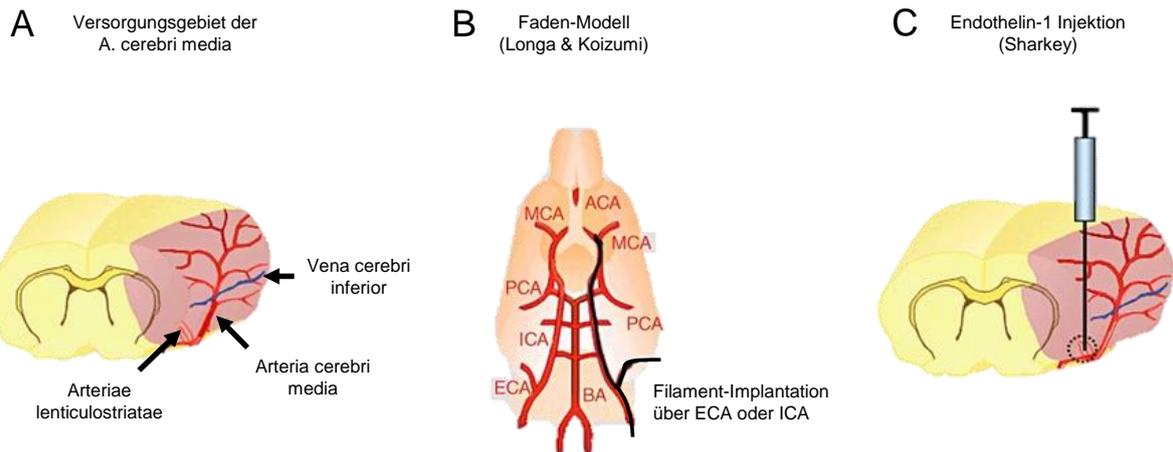


Abb. 16: Tiermodelle zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie (nach [133]).

In das Versorgungsgebiet inbegriffen sind zudem zahlreiche funktionelle Zentren, wie der motorische Kortex (Rumpf, obere Extremitäten und Kopf), ein Teil des prämotorischen Kortex, der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex, das motorische und sensorische Sprachzentrum, das frontale Blickzentrum sowie der Gyrus angularis, der die Kopplungsstelle zwischen visuellem und auditorischem System bildet.

Bei Verschluss der MCA kann es somit zur Ausprägung der nachfolgenden klinischen Symptome kommen, die entweder in ihrer Gesamtheit oder isoliert in Erscheinung treten [134]:

- halbseitig ausgeprägte Lähmung (meist kopf- und armbetont)
- somatosensible Empfindungslosigkeit der kontralateralen Körperhälfte
- Blickdeviation zur ipsilateralen Seite
- globale Aphasie
- Alexie und Agraphie

Auch im Tiermodell führt der Verschluss der MCA zu deutlich erkennbaren somatosensorischen Defiziten, die anhand verschiedener Verhaltenstests nach ihrem Schweregrad eingeordnet werden können [135, 136].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei gut etablierte Modelle der fokalen zerebralen Ischämie verwendet, bei denen die MCA transient verschlossen und später wieder reperfundiert wurde. Dabei handelt es sich zum einen um das intraluminale Faden-Modell, welches in Mäusen angewandt wurde, und zum anderen um die intrazerebrale Injektion von Endothelin-1, welche in Ratten durchgeführt wurde. Beide Modelle sollen nachfolgend kurz näher beleuchtet werden.

6.1.1 Das intraluminale Faden-Modell

Das intraluminale Fadenmodell ist eines der am meisten verwendeten Ischämie Modelle [137]. Es wurde erstmals von Kiozumi et al. [138] in Ratten beschrieben und wurde seitdem durch verschiedene Arbeitsgruppen modifiziert und für die Anwendung an Mäusen aufbereitet [139–141].

Bei diesem Modell wird ein flexibler und mit Silikon-beschichteter Nylonfaden in die A. carotis interna (engl. internal carotid artery, ICA) eingeführt und bis zum Eintritt der MCA in den Circulus arteriosus Willisii (CaW) vorgeschoben, um diese zu verschließen. Dadurch wird die Blutzufuhr der MCA durch die ICA, die A. cerebri posterior (engl. posterior cerebral artery, PCA), und die A. cerebri anterior (engl. anterior cerebral artery, ACA) unterbrochen und eine Ischämie im Medialstromgebiet ausgelöst (siehe Abb. 16 B).

Die Vorteile dieses Modells liegen in der leicht durchzuführenden Operation, der verhältnismäßig geringen Invasivität und der guten Reproduzierbarkeit der Infarkte mit deutlicher Penumbra unter Standardbedingungen (u. a. gleichbleibende Narkose, Tierstamm, Operationsmethode, Filamenten-größe und -design). Durch die Weiterentwicklung der Filamente hinsichtlich Beschichtung, Dicke und Form sowie durch die Anpassung der Filamentdurchmesser an das Körpergewicht der Versuchstiere, konnte die Reproduzierbarkeit der Infarkte zusätzlich erhöht werden [142].

Durch ein Zurückziehen des Fadens kann weiterhin problemlos eine kontrollierte Reperfusion eingeleitet und somit die Dauer des Verschlusses exakt variiert werden. Dies ermöglicht die Untersuchung und Erforschung verschiedener Schweregrade eines Schlaganfalls. Das umfasst im gleichen Maße sowohl eine TIA als auch einen großen Infarkt. Ein wesentlicher Nachteil der Methode besteht jedoch darin, dass je nach Beschaffenheit des Filamentes auch andere von der ICA abgehende, blutführende Gefäße, wie z. B. die A. hypothalamica blockiert werden können, was zu einer Infarzierung des Hypothalamus führen kann, was wiederum eine Störung in der Temperaturregulation zur Folge haben kann. Des Weiteren kommt es durch einseitiges Abbinden der A. carotis communis (engl. common carotid artery, CCA) und der A. carotis externa (engl. external carotid artery, ECA) zu einem dauerhaftem Verschluss derselben.

6.1.2 Die intrazerebrale Endothelin-1 Injektion

Ein weiteres Modell beschreibt die Applikation von Endothelin-1 (ET-1) in die Nähe eines blutführenden Gefäßes, was zu einer plötzlichen Verengung dieses Gefäßes führt und somit in Abhängigkeit von der injizierten Dosis eine vorübergehende Senkung des lokalen Blutflusses und die Entwicklung von Ischämien im Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes zur Folge hat [143–146].

Endothelin-1 ist ein Peptidhormon, welches von Endothelzellen produziert und freigesetzt wird. Es handelt sich bei ET-1 um einen hochpotenten Vasokonstriktor, der durch seine gefäßverengende und blutdrucksteigernde Wirkung maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist [145].

ET-1-Injektionen werden seit den frühen 90er Jahren genutzt, um Schlaganfälle gezielt, meist durch Verschlüsse der MCA, in Versuchstieren zu induzieren [147–150]. Zunächst wurde dabei das ET-1 nach erfolgter Kraniektomie direkt auf die freigelegte proximale MCA appliziert [144, 151]. Im Gegensatz dazu beruht das in dieser Arbeit verwendete Operationsprotokoll nach Sharkey und Butcher [150] auf der stereotaktischen Injektion von ET-1 in das direkt an die MCA anliegende Gewebe. Diese Methode gilt als weniger invasiv und schneller durchzuführen, da weder ein Freilegen der MCA noch eine Kraniektomie nötig sind. Stattdessen erfolgt der Hirnzugang über eine kleine Bohrung in der Schädeldecke oberhalb der MCA, durch die eine Injektionskanüle durch das Gehirn bis zur MCA eingeführt wird (siehe Abb. 16 C). Da es dabei entlang des Stichkanals zu direkten und mitunter schwerwiegenden Verletzungen des Hirns kommen kann, findet dieses Modell deutlich seltener Anwendung, als beispielsweise das Faden-Modell.

Nichtsdestotrotz hat dieses Modell den großen Vorteil, dass es die Vorgänge einer humanen Ischämie sehr viel realistischer widerspiegelt. Im Gegensatz zur plötzlich eintretenden Reperfusion des Faden-Modells, kommt es bei diesem Modell über einen Zeitraum von Stunden nach ET-1-Injektion zu einer graduellen Reperfusion des von der Ischämie betroffenen Gebietes [148, 149, 152–154]. Ein weiterer Vorteil dieses Modells besteht darin, dass es prinzipiell ermöglicht, den Blutfluss im Stromgebiet verschiedenster zerebraler Arterien gezielt zu senken und somit unterschiedliche Symptome zu induzieren (u. a. [155]). Durch die Wahl einer geeigneten Dosis kann zudem der Schweregrad der Ischämie bestimmt werden [156]. Zu beachten bleibt hierbei jedoch die hohe Variabilität der Infarktgrößen, welche durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Neben den gängigen Einflussfaktoren, wie Tierstamm, Alter und Körpertemperatur der Tiere oder der Art der verwendeten Narkose, wird die Infarktgröße durch die Genauigkeit der stereotaktischen Injektion sowie die Stabilität der ET-1 Probe bestimmt [149, 150].

Durch die präischämische Implantation von Führungskanülen ist sogar die Möglichkeit gegeben, ET-1-Injektionen am wachen und freibeweglichen Tier durchzuführen [149]. Dadurch können operative Traumata explizit von ischämiebedingten Schädigungen getrennt und beispielsweise der nachgewiesene Einfluss von Narkotika o. ä. auf die Infarktgröße bzw. die Wirkungsweise von Therapeutika ausgeschlossen werden [157–159]. Ferner ermöglicht eine derartige Modifikation des Modells eine direkte visuelle Wahrnehmung von schlaganfallbedingten Verhaltensänderungen und eine noch realistischere Darstellung einer humanen Ischämie.

6.2 Wirkungsweise von MK-801

MK-801 ([5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptan-5,10-imine, Dizocilpin) ist ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, dessen anti-exzitotoxische Wirkung darauf beruht, dass der Ca^{2+} -Einstrom in die Postsynapse und deren Depolarisation blockiert wird.

Die neuroprotektive Wirkung von MK-801 wurde bereits *in-vitro* unter Sauerstoff- und Glukosedepprivation sowie in einer Vielzahl von Tierexperimenten an Modellen der fokalen und globalen zerebralen Ischämie belegt (u. a. [30, 160–166]). Dabei wurde aufgezeigt, dass das Infarktvolume durch die Applikation von MK-801, insbesondere vor oder kurz nach (bis ca. 2 h) Okklusion der MCA (MCAO), drastisch reduziert werden kann (< 50 %) [46, 164]. In diesem Zusammenhang zeigte beispielsweise Nedergaard, dass MK-801 die Anzahl von Periinfarktdepolarisationen (PIDs) verringert und so das Infarktvolume maßgeblich reduziert [167]. Zudem wurde beschrieben, dass die Applikation von MK-801 eine Hypothermie hervorruft, welche ebenfalls als neuroprotektiver Mechanismus und effektiver SD-Blocker diskutiert wird [168–170].

Basierend auf der Publikation von Ma et al. [164] wurde für das im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Therapieexperiment eine als effektiv beschriebene MK-801 Dosis von 3 mg/kg gewählt. Der Zeitpunkt der Injektion, 30 min nach MCAO bzw. kurz nach Einleitung der Reperfusion, wurde ebenfalls in Analogie der in der Publikation als effizient angegebenen Handlungsanweisung nachempfunden.

Anzumerken bleibt jedoch, dass MK-801 in der Schlaganfalltherapie am Menschen keine Rolle spielt, da durch die Rezeptorblockade auch die physiologischen Glutamatfunktionen in erheblichem Maße gehemmt werden, was in klinischen Studien in Form von beschriebenen Nebenwirkungen, wie Halluzinationen, Agitation oder Somnolenz nachgewiesen wurde [171, 172].

Kapitel 7

Verwendete Materialien und Methoden

Im Sinne einer schematischen Übersichtsdarstellung zeigt die folgende Abb. 17 die verschiedenen Versuchsgruppen und die einzelnen Arbeitsabläufe, in der Reihenfolge ihrer Durchführung. Sowohl die Versuchsgruppen als auch die verschiedenen Arbeitsschritte werden in den nachstehenden Unterkapiteln näher erläutert. Der linke Pfad beschreibt den experimentellen Arbeitsablauf für die Versuchsgruppe Maus, wohingegen der rechte Pfad zweigeteilt dargestellt ist. Hierbei wiederum zeigt der schwarz hinterlegte Pfad Ratte (a) den Ablauf für den Versuch einer Injektion des zu untersuchenden Tracers $^{201}\text{TlDDC}$ vor Einleitung der MCAO; der grau hinterlegte Pfad Ratte (b) den Versuchsablauf einer Injektion des $^{201}\text{TlDDC}$ 90 min nach erfolgter MCAO.

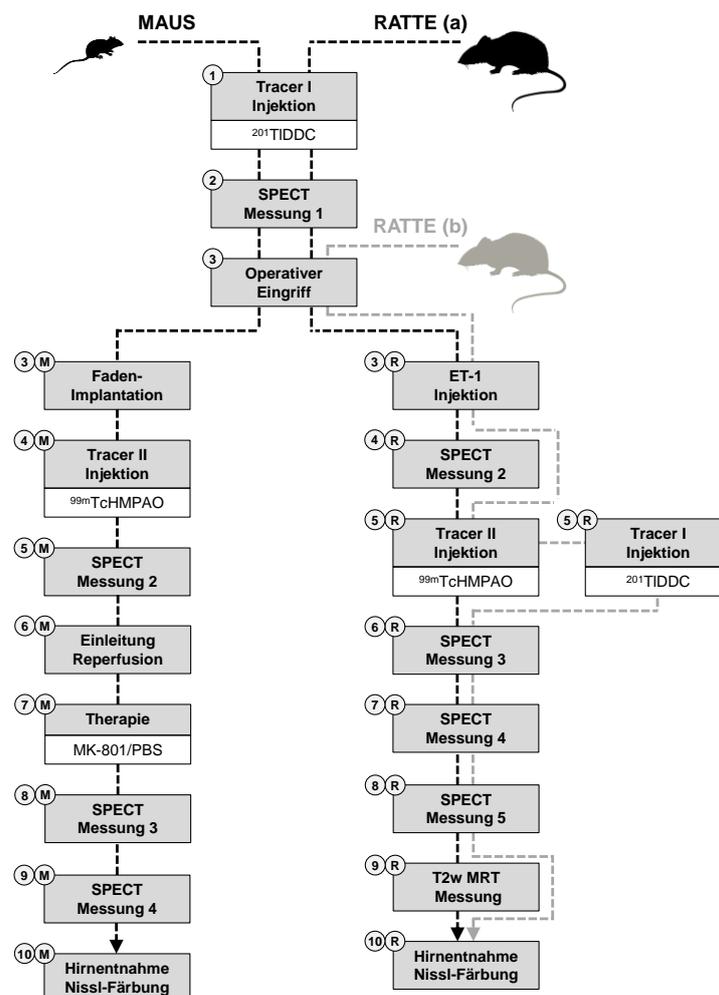


Abb. 17: Schematische Übersichtsdarstellung der experimentellen Versuchsabläufe.

Ferner erfolgt nachstehend eine knappe Beschreibung der für die Versuchsdurchführung verwendeten Materialien und Methoden. Detaillierte Protokolle zur Herstellung gängiger chemischer Lösungen sind darüber hinaus dem Anhang zu entnehmen.

7.1 Beschreibung der Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen der im Weiteren beschriebenen Studien erfolgten anhand von insgesamt 18 männlichen C57Bl6 Mäusen, welche ein Alter von 6-8 Wochen und ein Durchschnittsgewicht von 25 g (24-28 g) aufwiesen sowie anhand von 20 männlichen Sprague-Dawley Ratten im Alter von 8-10 Wochen und einem Durchschnittsgewicht von 284 g (178-408 g). Die nachstehenden Tab. 1 & Tab. 2 ermöglichen einen Überblick über die verschiedenen Teilexperimente und Gruppencharakteristika für die Versuchsgruppen Maus und Ratte.

Tab. 1: Charakteristik der Versuchsgruppe Maus

Gruppe	Interventionsschema	Anzahl	Ø - Gewicht
Maus-Kontrollgruppe	Sham-OP + PBS-Inj.	5	25,60 ± 1,67 g
Maus-MCAO-Gruppe A (ohne Therapie)	MCAO + PBS-Inj.	7	24,57 ± 1,51 g
Maus-MCAO-Gruppe B (mit Therapie)	MCAO + MK801-Inj.	6	25,00 ± 1,67 g

Tab. 2: Charakteristik der Versuchsgruppe Ratte

Gruppe	Interventionsschema	Anzahl	Ø - Gewicht
Ratten-Kontrollgruppe	(1) ²⁰¹ TIDDC-Inj. (i.v.) (2) NaCl-Inj. (i.c.)	5	254,80 ± 16,89 g
Ratten-MCAO-Gruppe A	(1) ²⁰¹ TIDDC-Inj. (i.v.) (2) ET-1-Inj. (i.c.)	10	268,10 ± 60,97 g
Ratten-MCAO-Gruppe B	(1) ET-1-Inj. (i.c.) (2) ²⁰¹ TIDDC-Inj. (i.v.)	5	347,20 ± 50,29 g

Die für die Versuchsdurchführung verwendeten Mäuse wurden in der Tierhaltung des Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in Magdeburg, Deutschland gezüchtet und zum Zwecke einer Habituation mindestens eine Woche vor Beginn der experimentellen Untersuchungen in die Tierhaltung des Leibniz-Institutes für Neurobiologie (LIN), Magdeburg, Deutschland, überführt.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen zu je 5 Tieren in Standardkäfigen (Sealsafe®Plus Maus ICV Green Line, GM500 Käfig, Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenber, Deutschland) mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser. Die untersuchten Ratten wurden über den Anbieter Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und ebenfalls mindestens 1 Woche vor Beginn der jeweiligen Versuchsdurchführung an das LIN überführt. Ihre Haltung in Gruppen zu je 3 Tieren erfolgte in analoger Weise in Standardkäfigen (Käfigtyp III nach ETS 123) mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser. Anzumerken ist, dass bereits im Rahmen erster, im Jahr 2011 durchgeführter Versuche 8 Ratten des Lieferanten Janvier Labs (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) getestet wurden, deren Versuchsergebnisse Einzug in die Versuchsauswertung fanden.

Weiterhin zu erwähnen ist, dass sämtliche gewählte Vorgehensweisen einschließlich der durchgeführten Versuche den Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes entsprachen und durch die Tierethikkommission des Landes Sachsen-Anhalts genehmigt wurden.

7.2 ²⁰¹TIDDC

7.2.1 Tracer-Präparation

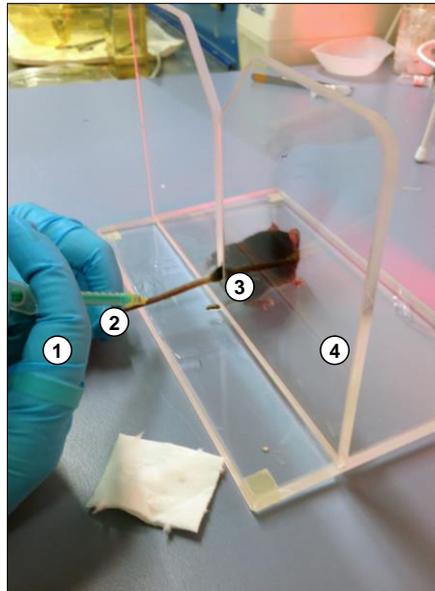
Die ²⁰¹TIDDC-Injektionslösung wurde jeweils unmittelbar vor jeder Tracerinjektion frisch hergestellt. Im Detail wurde dazu in einem ersten Schritt eine 4 %ige Natrium-Diethyldithiocarbamat- (NaDDC) Lösung durch 10 minütiges Lösen von 2 g NaDDC·3H₂O (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 50 ml einer 0,9 %igen Natriumchlorid- (NaCl) Lösung hergestellt. Parallel dazu wurden 500 µl der wässrigen ²⁰¹Thalliumchlorid- (²⁰¹TlCl) Lösung mit einer 1 ml Spritze (Injekt®-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgezogen. Die hierbei verwendeten ²⁰¹TlCl-Lösungen wurden aus kommerziellen Quellen (Mallinckrodt Medical B.V., Westerduinweg 3, 1755 LE Petten, Niederlande) bezogen.

Unmittelbar vor der Injektion wurde die ²⁰¹TlCl-Lösung in der Injektionsspritze mit der 4 %igen NaDDC-Lösung im Verhältnis 10:1 verdünnt. Beim Kontakt beider Lösungen in der Spritze entstand jeweils schlagartig der lipophile Thalliumkomplex ²⁰¹TIDDC, was durch eine leichte Trübung der Lösung sichtbar wurde. Die fertige Injektionslösung, welche eine DDC-Konzentration von 0,4 % aufwies, wurde nach einer Inkubationszeit von 5 min injiziert.

7.2.2 Tracerinjektion in Mäusen

Die Injektion des ²⁰¹TIDDC-Komplexes erfolgte bei Mäusen intravenös (i.v.) über die kollateralen Schwanzvenen ca. 1 h vor der Faden-Implantation im wachen Zustand. Um die Tracerinjektion zu erleichtern, wurden die Mäuse zunächst einer 15-minütigen Infrarotstrahlung ausgesetzt, wodurch eine Vasodilatation der Schwanzvenen erreicht wurde.

Zusätzlich wurden die Mäuse während der gesamten Injektionsdauer in einem Restraîner fixiert, wie Abb. 18 zu entnehmen ist. Die eigentliche Injektion erfolgte möglichst kontinuierlich über einen Zeitraum von 1-2 min unter Zuhilfenahme einer 30-Gauge Kanüle (Sterican® 30G x 1/2“, B. Braun Melsungen AG, Mesungen, Deutschland).



- ① Experimentator
- ② Injektionsspritze mit Tracer
- ③ Versuchsobjekt „Maus“
- ④ Restraîner

Abb. 18: ²⁰¹TIDDC-Injektion über die kollateralen Schwanzvenen an der wachen Maus.

Um die jeweilig ins Tier injizierte Traceraktivität bestimmen zu können, wurde nach jeder Tracerinjektion die verbliebene Aktivität in der Spritze und an ggf. verwendeten Tupfern mit Hilfe eines Activimeters (ISOMED 2010 Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden, Deutschland) ermittelt und von der ursprünglich Traceraktivität in der Injektionsspritze subtrahiert. Die so errechnete mittlere injizierte ²⁰¹TIDDC-Aktivitätsdosis betrug 38,89 MBq (STABW ± 9,04 MBq) in einem Volumen von 550 µl. Unmittelbar nach den Tracerapplikationen wurden die Mäuse in einem Gasgemisch bestehend aus Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) in Lachgas (Distickstoffmonoxid, N₂O) und Sauerstoff (O₂) (Linde AG, Pullach, Deutschland) narkotisiert und in den SPECT/CT Scanner überführt.

7.2.3 Tracerinjektion in Ratten

Die ²⁰¹TIDDC-Injektion an Ratten erfolgte über die rechte äußere Drosselvene (vena jugularis externa, JV) mit Hilfe eines selbst präparierten Jugularvenenkatheters auf Silikonbasis. Zur Herstellung dieses speziellen Katheters wurde ein Silikonschlauch (Gaudig Laborfachhandel GbR, Suelzetal-Osterweddingen, Deutschland, OD: 1,3 mm, ID: 0,5 mm, Artikelnr.: 2734600010) zunächst auf eine Länge von 12 cm zugeschnitten, wobei das vordere Ende des Silikonschlauchs leicht angeschrägt wurde.

Anschließend wurde mit Hilfe einer Kanüle (21-Gauge) ca. 0,5 cm von der Spitze entfernt (siehe Abb. 19 A) ein Loch in die eine Seite des Schlauches gestochen, um ein späteres Ansaugen des Katheters am Gefäß zu vermeiden. Etwa 3,3 cm von der Spitze aus entfernt (siehe Abb. 19 B) wurde der Katheter durch einen Silikonring (Silicone Rubber Compound, RS Components Ltd, Corby, UK) verdickt. Diese Verdickung diente in der Anwendung als Markierung, bis zu welchem Punkt der Katheter in die Vene einzuführen war, um seine korrekte Platzierung im rechten Vorhof der Ratte zu gewährleisten.

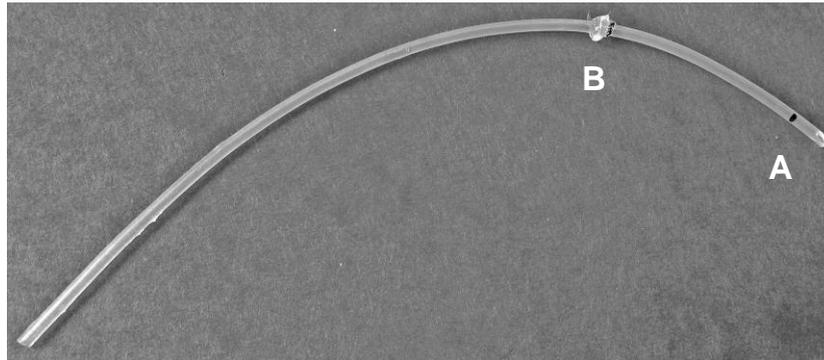


Abb. 19: Präparierter Rattenkatheter auf Silikonbasis.

A: Ausgleichloch um das Ansaugen des Katheters an der JV zu verhindern,
B: Silikonring als Positionierungsmarker.

Anschließend wurde der Silikonpfropf über Nacht getrocknet. Zum Abschluss wurden die fertigpräparierten Katheter in 70 %igem Ethanol (Et-OH) desinfiziert und bei 121 °C für 30 min autoklaviert (Varioklav, Dampfsterilisator, Typ 135 S, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland).

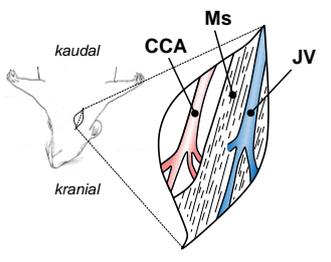
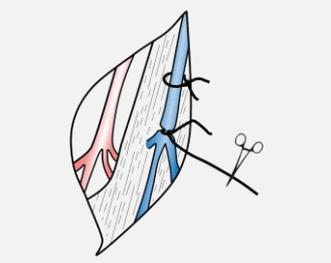
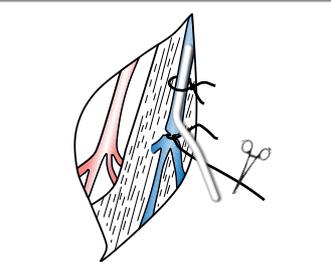
Zum eigentlichen Legen des Katheters wurden die Ratten zunächst mit 2-2,5 % Isofluran in einem Gemisch aus N₂O und O₂ (je 1 l/min) narkotisiert und rücklings mit dem Kopf zum Operateur auf einer Heizmatte platziert (siehe Tab. 3 a). Anschließend wurde die rechte Seite des Halses rasiert und nach erfolgter Desinfektion des entsprechenden Bereiches mit 70 %igem Et-OH ein etwa 1 cm langer Schnitt oberhalb des Schlüsselbeins und rechts der Trachea gesetzt. In einem nächsten Arbeitsschritt wurde die rechte äußere JV bis zu dem Punkt, an dem sie unter dem Musculus pectoralis major (großer Brustmuskel) verschwindet, vorsichtig freipräpariert.

Mit Hilfe einer gespreizten Pinzette wurde die Vene zusätzlich aufgespannt, zwei chirurgische 5-0 Fäden (Feuerstein Suprama, Berlin, Deutschland) bis zur Hälfte unter ihr hindurch geführt und beide Fäden zu Schlaufen um die Vene gelegt. Um die Vene abzubinden, wurde darauf folgend die kranial gelegene Schlaufe fest verschlossen (siehe Tab. 3 b).

Um die Vene für die Kathetereinführung schräg mit einer Mikroschere (Fine Science Tools, FST, Heidelberg, Deutschland, #15000-08) anschneiden zu können, wurde ferner mit Hilfe einer Klemme Zug an die Enden der Ligatur gelegt und so die Vene unter Spannung gesetzt.

Tab. 3: Operationsschritte zur Katheterisierung der Jugularvene in Ratten.

CCA: A. carotis communis, JV: vena jugularis, Ms: Muskelgewebe.

	Schematische Darstellung	Fotografische Darstellung	Arbeitsschritte
a)			<ul style="list-style-type: none"> - Hautschnitt oberhalb des Schlüsselbeins - Präparation der JV
b)			<ul style="list-style-type: none"> - Abbinden der JV (kranial gelegene Schlaufe)
c)			<ul style="list-style-type: none"> - Anschneiden der JV - Einführen des Katheters - Abbinden der JV (kaudal gelegene Schlaufe)
d)			<ul style="list-style-type: none"> - Subkutanes Tunneln des Katheters

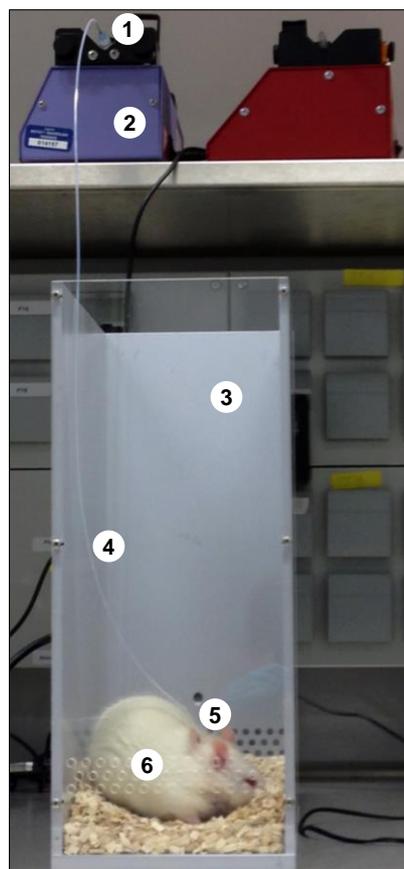
Durch die entstandene Öffnung in der Vene konnte schließlich der mit einer Heparin-Natriumchlorid-Lösung (Konzentration 3:10; Heparin 50 IU/ml : NaCl 0,9 %) gefüllte Katheter in das Gefäß eingeführt und 3,3 cm in Richtung des rechten Vorhofes vorgeschoben werden.

Nach Prüfung der Gängigkeit des Katheters, wurde die kaudal gelegene Schlaufe ebenfalls fest verschlossen (siehe Tab. 3 c).

Durch einen kleinen Schnitt im Nacken wurde der Katheter subkutan von ventral nach dorsal mittels einer langen 20-Gauge Kanüle (Sterican® 20G x 2¾“, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) getunnelt (siehe Tab. 3 d). Final wurde die Inzision über dem Schlüsselbein mit 3-4 chirurgischen Knoten geschlossen.

Um eine möglichst lange Gängigkeit des Katheters gewährleisten zu können, wurde der Katheter mit einem kleinen Volumen (ca. 30-50 µl) Catheter Lock Solution (SAI infusion technologies, Lake Villa, IL, USA) gefüllt und im Anschluss luftdicht mit einem Holzpfropf verschlossen. Sämtliche Tracerinjektionen und weitere experimentellen Eingriffe erfolgten in der Regel nach einer Regenerationsphase von einem Tag nach der Katheterimplantation.

Die $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion wurde, wie bereits erwähnt, in den verschiedenen Rattengruppen zu 2 unterschiedlichen Zeiten durchgeführt, d. h. in den Ratten der Kontrollgruppe und MCAO-Gruppe A ca. 1 h vor dem operativ induzierten Verschluss der MCA und in den Ratten der MCAO-Gruppe B zusammen mit der $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -Injektion ca. 90 min nach Verschluss der MCA (vgl. Tab. 2). Beide Injektionen erfolgten an wachen Ratten welche sich in einem hohen Käfig ohne Deckel in dem sie sich frei bewegen konnten aber aus dem sie nicht herausklettern konnten, befanden. Die Tracerinjektion wurde mit Hilfe von Infusionspumpen (Harvard Instruments, Holliston, MA, USA) durchgeführt. Dazu wurden die implantierten Katheter über einen 60 cm langen und mit $^{201}\text{TIDDC}$ -gefüllten Teflonschlauch (Tefzel-Schlauch, CS-Chromatographie Service GmbH, D-52379 Langerwehe, Deutschland, OD: 1/16 Zoll ID: 0,5 mm) mit der in einer Infusionspumpe eingespannten Tracerspritze verbunden (Abb. 20).



- ① Injektionsspritze mit Tracer
- ② Infusionspumpe
- ③ Injektionskäfig
- ④ Teflonschlauch
- ⑤ Jugularvenenkatheter
- ⑥ Versuchsobjekt „Ratte“

Abb. 20: $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion über einen Jugularvenenkatheter an der wachen Ratte.

Die Pumprate und die Injektionszeit variierten zwischen 50-100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 5,5-10 min in Abhängigkeit des Tracervolumens. Nach der Tracerinjektion wurde der Teflonschlauch entfernt und die Katheter noch einmal mit einem kleinen Volumen der NaCl-Heparin-Lösung gespült, um Tracerrückstände aus dem Katheter zu entfernen und mögliche Messartefakte zu reduzieren.

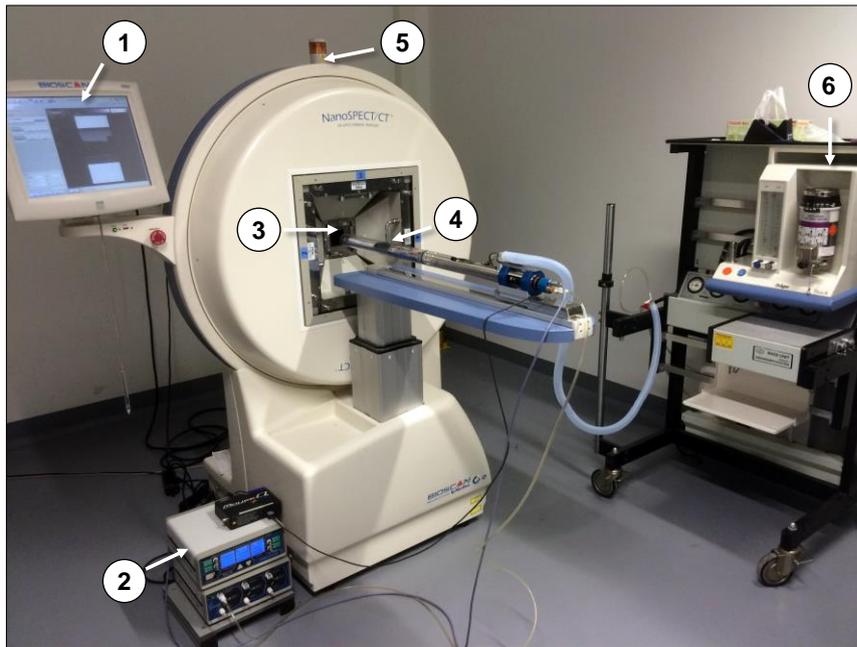
Die injizierte Aktivitätsdosis wurde wieder durch Ermittlung der Tracerrückstände sowohl in der Tracerspritze als auch im Teflonschlauch mit Hilfe des Activimeters bestimmt. Die mittlere injizierte ^{201}Tl DDC Aktivitätsdosis für alle Ratten betrug 109,70 MBq (STABW \pm 16,86 MBq) in einem Volumen von 1,2-2 ml. Im Anschluss an die Tracerinjektionen wurden die Ratten ebenfalls narkotisiert und direkt in den SPECT/CT Scanner überführt.

7.3 Durchführung der SPECT/CT-Messungen

Sämtliche SPECT/CT-Aufnahmen von Mäusen und Ratten wurden mit einem Vier-Kopf Hybrid-NanoSPECT/CT™ Scanner von Mediso Medical Imaging Systems (Budapest, Ungarn) durchgeführt (siehe Abb. 21), wobei die narkotisierten Tiere für die Durchführung der Messungen in speziell für diesen Scanner angefertigten geschlossenen Maus- bzw. Rattenliegen (Minerve Imaging Chamber, Bioscan Europe, France, Frankreich) fixiert wurden. Während des gesamten Messzeitraums befanden sich die Tiere in tiefer Inhalationsnarkose (Isofluran - bei Mäusen: Narkoseeinleitung 2,0 Vol%, Messung 0,8-1,0 Vol% bzw. bei Ratten: Einleitung 2,5 Vol%, Messung 1,2-1,5 Vol%, je in 550 ml/min N_2O und 750 ml/min O_2), welche ihnen über 2 Bohrungen am vorderen Ende der Liegen zugeführt wurde. Ein Absinken der Körpertemperatur während der Narkose wurde durch eine kontrollierte, auf 31 °C eingestellte, Warm-Luft Zufuhr (Multistation Temperature Control Unit, Minerve Equipement Veterinaire, Esternay, Frankreich) verhindert.

Über die gesamte Dauer des Messprozesses wurden die Vitalfunktionen (d. h. Puls, Herzrate, Sauerstoffsättigung und Atemfrequenz) der Tiere mittels eines Tierüberwachungssystems (MouseOxPlus Pulsoxymeter System, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) kontrolliert und die Augen der Tiere durch die Applikation von Bepanthensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt.

Vor Beginn der einzelnen SPECT/CT-Messungen wurde zunächst von jedem Tier ein planares Ganzkörper-Topogramm erstellt, auf Basis dessen das gewünschte Scanfenster für die jeweilige CT- und SPECT-Messung festgelegt wurde. Dabei wurde mit großer Sorgfalt darauf geachtet, dass das Scanfenster den gesamten Schädelumfang einschloss und zugleich dem axialen Sichtfenster der für die SPECT-Messung verwendeten Apertur entsprach. Durch diese Vorgehensweise sollten sowohl die Messzeiten als auch das aufzuzeichnende Datenvolumen so gering wie möglich gehalten werden.



- ① Kontrollmonitor
- ② Temperiereinheit/
Tierüberwachungssystem
- ③ SPECT Modul
- ④ Tierliege
- ⑤ CT-Modul
- ⑥ Narkoseeinheit

Abb. 21: NanoSPECT/CT™ Scanner von Mediso Medical Imaging Systems (Budapest, Ungarn).

Zur Erfassung der Schädelkonturen wurden vor und nach jeder SPECT-Einzel-Messung bzw. SPECT-Mehrfach-Messung CT-Scans durchgeführt. Die CTs dienen dabei insbesondere als anatomische Referenz, um die SPECT-Datensätze später einheitlich auszurichten. Als für die Aufnahmen geeignete CT-Parameter wurden eine Spannung von 45 kVp und eine Stromstärke von 177 μ A gewählt. Aufgenommen wurden insgesamt 180 Projektionen pro 360 °-Drehung der Gantry, wobei die Messdauer pro Projektion 500 ms betrug. Die gesamte Messdauer für die Durchführung eines CT Scans betrug bei Mäusen 90 s und bei Ratten 90 s bzw. 2 min 15 s. Die isotrope räumliche Auflösung der Voxel betrug 96 μ m.

Zur Messung der zerebralen Tracerverteilungen mittels SPECT wurden Pinhole-Kollimatoren (Scivis GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet, die für Mäuse mit Zehn-Loch-Aperturen (Apt.) mit einem Pinhole-Durchmesser von je 1,4 mm und einem axialen Sichtfenster von 23,9 mm (Apt. 1, Standard Ganzkörper Apt.) bestückt waren. Für die Untersuchung der Ratten wurden hingegen Neun-Loch-Aperturen verwendet. Diese wiederum waren für kurze Messungen mit einer Dauer von 10-30 min mit einem Pinhole-Durchmesser von 2,5 mm und einem entsprechenden axialen Sichtfenster von 35,9 mm (Apt. 2, Standard Ganzkörper Apt.) bestückt, wohingegen für lange Messungen von 2 h Aperturen mit einem Pinhole-Durchmesser von 1,5 mm und einem axialen Sichtfenster von 38,9 mm (Apt. 5, Ultra-High Resolution Ganzkörper Apt.) zur Anwendung kamen.

Die nominalen Auflösungen der verwendeten Aperturen betragen $\leq 1,0$ mm bei der Maus, $\leq 2,0$ mm für kurze Messungen bei der Ratte und $\leq 1,2$ mm für längere Messungen an der Ratte (entsprechend Herstellerangaben und Messungen mit Auflösungs-Phantomen am Scanner).

Die verwendeten Aperturen besitzen relativ hohe Sensitivitäten aber nur mittlere bis relativ niedrige Auflösungen gemessen an der System-Auflösung des Scanners (0,35 mm).

Für hohe Auflösungen bei gleichzeitig kurzer Messzeit wären höhere Tracer-Dosen erforderlich gewesen. Das kommerziell erhältliche $^{201}\text{Tl}^+$ wird mit relativ niedriger Aktivität pro Volumen geliefert. Theoretisch lässt es sich auf sehr hohe Konzentrationen aufkonzentrieren. Im Rahmen dieser Proof-of-Concept Studie wurde mit den oben genannten Aperturen der einfachste Ansatz gewählt.

Die Anzahl der Einzelprojektionen kann für jeden Scan auf 24 (d. h. 6 Projektionen pro Detektor à 15° und 9-10 Bilder pro Pinhole-Apertur) beziffert werden. Dabei wurde die Messdauer für jede Projektion der jeweils gewünschten Scandauer angepasst, so dass bei einer gewünschten Scandauer von z. B. 2 h und 24 Einzelprojektionen die Zeit pro Projektion 1200 sec betrug, während die Zeit pro Projektion bei einer gewünschten Scandauer von 10 min mit 100 sec angegeben werden kann. Die Energiefenster für die Messung von $^{201}\text{Tl}^+$ wurden gemäß der Standardeinstellungen des NanoSPECT/CTs gewählt, so dass sich für Fenster 1 eine Energieeinheit von $72 \text{ keV} \pm 20 \%$; für Fenster 2 von $167 \text{ keV} \pm 15 \%$ ergibt (Abb. 22 A). Für die simultane Messung von $^{201}\text{Tl}^+$ und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ wurden, um eine klare Trennung der verschiedenen Energiefenster zu erreichen, diese wie folgt eingestellt; Energiefenster für $^{99\text{m}}\text{Tc}$: $140 \text{ keV} \pm 10 \%$, Energiefenster 1 für $^{201}\text{Tl}^+$: $72 \text{ keV} \pm 10 \%$, Energiefenster 2 für $^{201}\text{Tl}^+$: $167 \text{ keV} \pm 5 \%$ (Abb. 22 B).

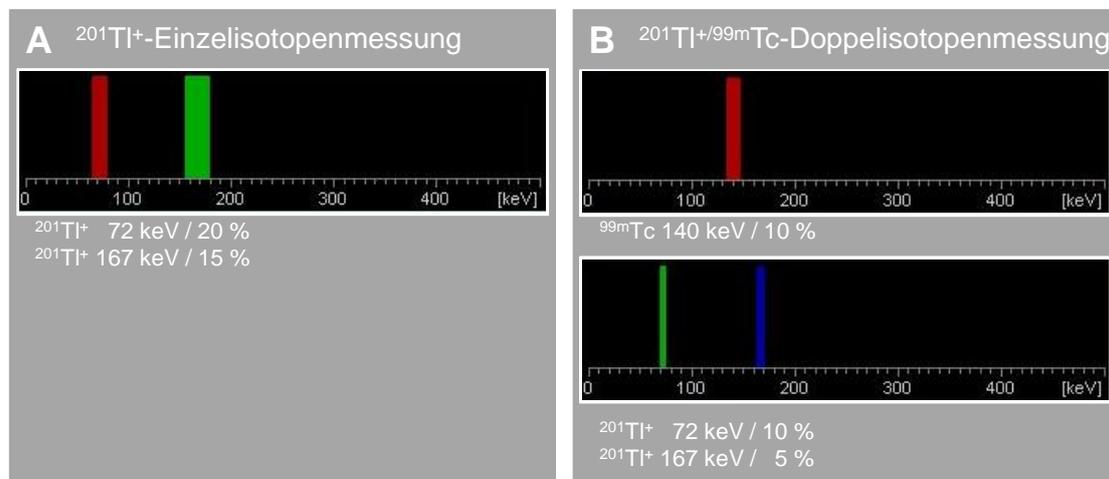


Abb. 22: Energiefenster für A - $^{201}\text{Tl}^+$ -Einzelisotopen- und B - $^{201}\text{Tl}^+ / ^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Doppelisotopenmessungen.

Die sowohl für Mäuse als auch für Ratten verwendeten SPECT-Scanprotokolle sollen im Folgenden näher erläutert werden. Wie Abb. 23 A zu entnehmen, wurden die Mäuse ca. 10 min nach erfolgter $^{201}\text{Tl}^+$ -Injektion einer 1 x 15 min Baseline-Messung zugeführt (Scan I, Apt. 1). Diese Messung diente einerseits der Kontrolle, ob sowohl die Injektion als auch die Präparation des $^{201}\text{Tl}^+$ fehlerfrei durchgeführt wurden und andererseits als Referenz für die Normalisierung aller nachfolgenden Messungen. Circa 1 h nach erfolgter Baseline-Messung wurde im direkten Anschluss an die Faden-Implantation $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ injiziert. Anschließend wurden die Mäuse zum Zwecke einer $^{201}\text{Tl}^+ / ^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Doppelisotopenmessung für 1 x 15 min (Scan II, Apt. 1) erneut in den Scanner überführt.

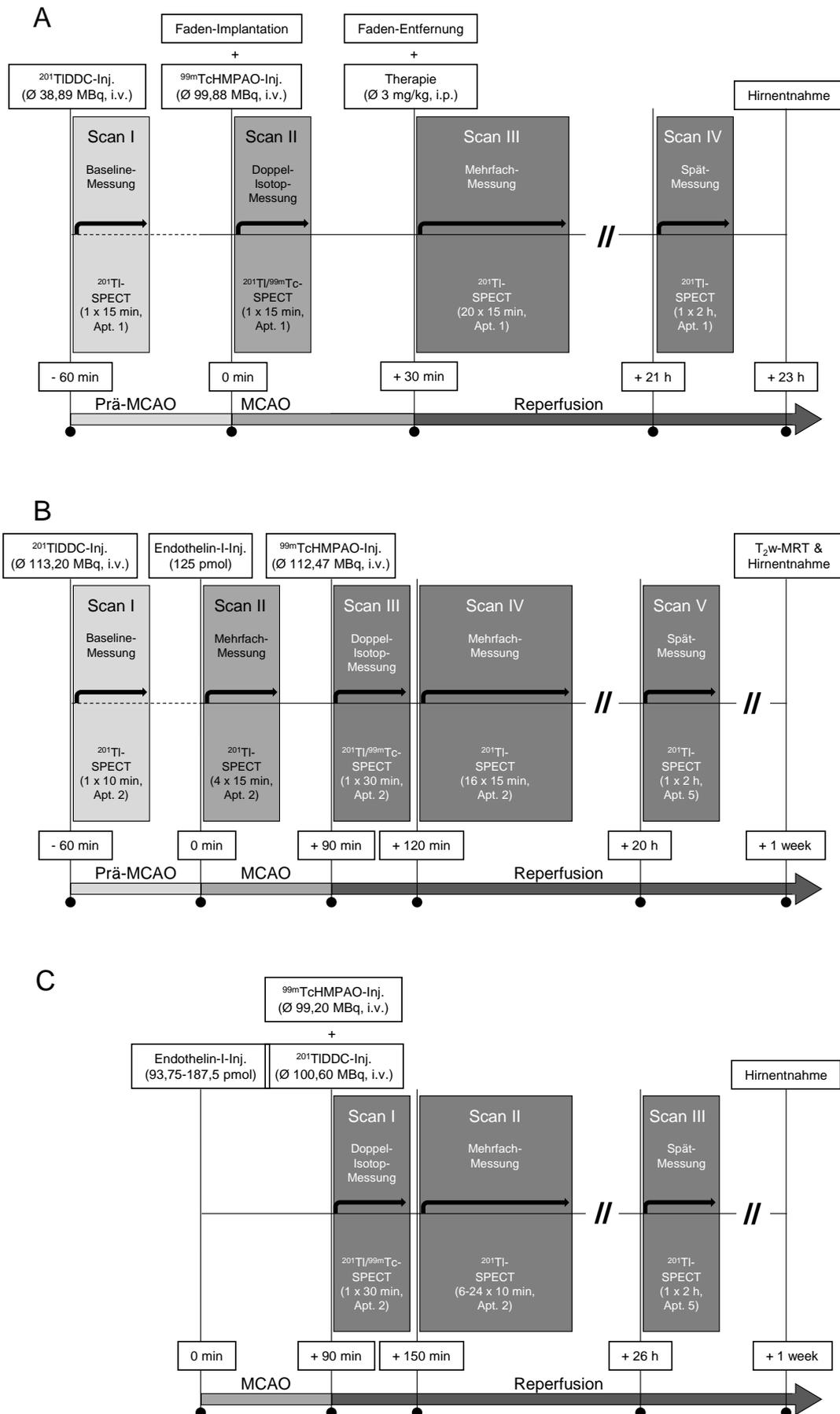


Abb. 23: Scan-Protokolle für Mäuse (A) und Ratten der MCAO-Gruppe A (B) und B (C).

30 min nach dem Verschluss der MCA wurde die Reperfusion durch Zurückziehen des Fadens eingeleitet und die Mäuse mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 0,1 M, pH 7,4, Protokoll siehe Anhang) oder MK-801 intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurden die Mäuse erneut für 20 x 15 min (Gesamtscandauer 5 h) (Scan III, Apt. 1) im SPECT/CT Scanner gemessen. Ca. 21 h nach der MCAO Induktion erfolgte eine abschließende Messung für 1 x 2 h (Scan IV, Apt. 1).

Die der Ratten-MCAO-Gruppe A zuzuordnenden Ratten und die zugehörigen Kontrolltiere (vgl. Abb. 23 B) wurden ebenfalls ca. 10 min nach erfolgter ^{201}Tl -Injektion für 1 x 10 min einer $^{201}\text{Tl}^+$ -Baseline Messung (Scan I, Apt. 2) zugeführt. Im Anschluss an die Baseline-Messung erfolgte der operative Eingriff, um die MCA vorübergehend durch die intrakranielle Injektion von ET-1 zu verschließen. Direkt nach erfolgter ET-1 Injektion und somit ca. 1 h nach der ^{201}Tl -Injektion, wurden die Ratten erneut im SPECT/CT Scanner für 4 x 15 min (Gesamtscandauer 1 h) (Scan II, Apt. 2) gemessen. 90 min nach der ET-1 Injektion wurde den Ratten schließlich das $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ injiziert und eine $^{201}\text{Tl}^+/\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Doppelisotopenmessung für 1 x 30 min (Scan III, Apt. 2,) durchgeführt. Wiederum im unmittelbaren Anschluss an diese Doppelisotopenmessung wurde eine dynamische $^{201}\text{Tl}^+$ -Messung für 16 x 15 min (Gesamtscandauer 4 h) (Scan IV, Apt. 2) gestartet. Eine weitere späte $^{201}\text{Tl}^+$ -Messung (1 x 2 h) wurde ca. 20 h nach erfolgter ET-1 Injektion durchgeführt (Scan V, Apt. 5).

Bei den der Ratten-MCAO-Gruppe B zuzuordnenden Ratten (vgl. Abb. 23 C) erfolgte die initiale SPECT-Messung erst 2,5 – 3 h nach der ET-1 Injektion bzw. ca. 1 h nach der sukzessiven Injektion von $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ und ^{201}Tl (Scan I, $^{201}\text{Tl}^+/\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Doppelisotopenmessung, 1 x 30 min, Apt. 2). Anschließend wurden die Ratten ebenfalls über einen längeren Zeitraum von bis zu 5 h (6-24 Messungen) mehrfach für je 10 min (Scan II, Apt. 2) gemessen. Auch in diesen Tieren erfolgte ca. 26 h nach der ET-1 Injektion eine späte $^{201}\text{Tl}^+$ -Messung für 1 x 2 h (Scan III, Apt. 5).

Um aus den während der SPECT-Messung gewonnen 2-dimensionalen Projektionen die tatsächliche dreidimensionale Tracerverteilung, bzw. eine möglichst exakte Näherung derselben berechnen zu können, wurde ein iterativer Algorithmus genutzt, der in der für die Rekonstruktion verwendeten HiSPECT™ Software (SCIVIS, Göttingen, Deutschland) integriert war. Für die Rekonstruktion der SPECT-Daten wurden die vordefinierten Einstellungen „Medium“ für mittlere Output-Voxelgrößen der Software verwendet. Die rekonstruierten Voxelgrößen betragen für die Ratten-SPECT-Daten 600 μm isotrop bei Verwendung der Apt. 2 und 500 μm isotrop für jene, die mit Apt. 5 aufgenommen wurden sowie für die Maus-SPECT-Daten 300 μm isotrop.

Die CT-Bilder wurden mit der Software InVivo Scope 1.43 (Mediso, Ungarn) bei isotropen Voxel-Größen von 200 μm für Ratten bzw. 100 μm für Mäuse rekonstruiert. Anschließend wurden die aufgenommenen CT und SPECT-Bilder softwarebasiert co-registriert und zur weiteren Analyse als DICOM-Daten (Abkürzung engl. für Digital Imaging and Communications in Medicine) exportiert.

7.4 Operative Eingriffe zum Verschluss der MCA

Im direkten Anschluss an die vorstehend beschriebenen SPECT/CT Baseline-Messungen wurden die Tiere ohne aus der Narkose zu erwachen zum nahegelegenen OP-Platz gebracht, wo ihnen, unter Anwendung von 2 verschiedenen MCAO-Modellen, eine transiente fokale zerebrale Ischämie zugefügt wurde.

7.4.1 Intraluminales Faden-Modell in Mäusen

In Mäusen wurde zur Realisierung eines vorübergehenden Verschlusses der MCA die Vorgehensweise des intraluminalen Faden-Modells gewählt, wobei die Mäuse zunächst mit einem Gasgemisch, bestehend aus 1-1.5 % Isofluran in N₂O und O₂ (je 1 l/min) narkotisiert wurden. Das Narkotikum wurde den Mäusen über eine Atemmaske zugeführt. Um das Absinken der Körpertemperatur der Mäuse während der Operation zu verhindern, wurden die Tiere rücklings auf einer Heizmatte positioniert.

Nach Einsetzen der Narkosewirkung erfolgten eine Rasur des Halsbereiches ausgehend vom Unterkiefer bis zum Sternum der Mäuse und eine sofortige Desinfektion des entsprechenden Bereiches mit 70 %igem Et-OH. Anschließend wurde links entlang der Aorta ein etwa 1 cm langer Hautschnitt gesetzt und jeweils die linke CCA sowie die ECA vorsichtig freipräpariert (siehe Tab. 4 a). Besonderes Augenmerk galt dabei der Trennung der CCA vom eng anliegenden Nervus vagus (X. Hirnnerv), ohne diesen zu verletzen. Nach erfolgter Präparation wurden sowohl die CCA als auch die ECA fest und dauerhaft mit Hilfe chirurgischer 5-0 Seidenfäden (Feuerstein Suprama, Berlin, Deutschland) verschlossen.

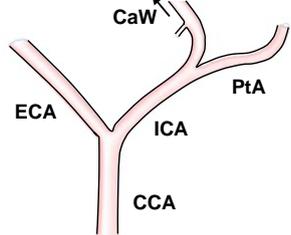
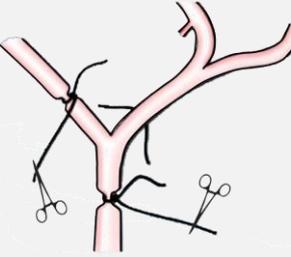
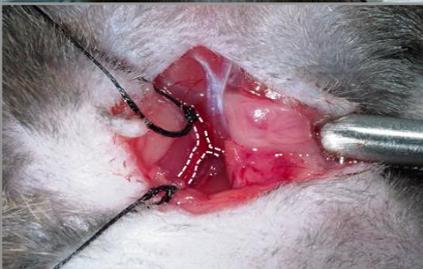
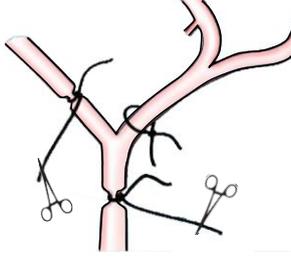
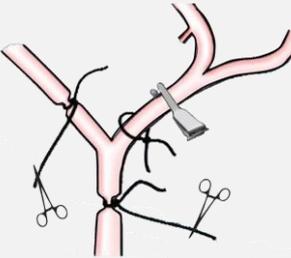
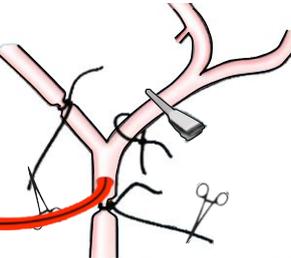
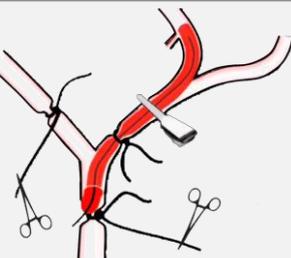
Zum Zwecke einer Vergrößerung des Sichtfeldes, wurden ferner beide Arterien durch das Anlegen von Zug an die Enden der Ligaturen mit Hilfe von Klemmen aufgespannt (siehe Tab. 4 b).

In einem nächsten Schritt wurde die ICA bis zur Abzweigung der A. pterygopalatina (PPA) freipräpariert und zunächst mit Hilfe einer Gefäßklemme (Fine Science Tools, FST, Heidelberg, Deutschland) temporär verschlossen, nachdem zuvor ebenfalls ein chirurgischer Faden zu einer lockeren Schlaufe um sie gelegt wurde (siehe Tab. 4 c, d).

Anschließend wurde in die CCA leicht proximal der Carotisbifurkation ein kleines Loch geschnitten und ein mit Silikon beschichtetes Monofilament (7-0 Superfine MCAO suture reusable PK5, Katalognummer: 7017PK5Re, Durchmesser Filamentbeschichtung $0,17 \pm 0,01$ mm, Gesamtlänge Filament 20 mm, Länge Filamentbeschichtung ≥ 5 mm, Docol Corporation, Redlands, Ca, USA) eingeführt.

Tab. 4: Operationsschritte des intraluminalen Faden-Modells in Mäusen.

CaW: Circulus arteriosus willisii, CCA: A. carotis communis, ECA: A. carotis externa, ICA: A. carotis interna.

	Schematische Darstellung	Fotografische Darstellung	Arbeitsschritte
a)			<ul style="list-style-type: none"> - Hautschnitt links der Aorta - Präparation der CCA, ECA und ICA
b)			<ul style="list-style-type: none"> - Abbinden der CCA und ECA
c)			<ul style="list-style-type: none"> - Legen einer lockeren Schlaufe um die ICA
d)			<ul style="list-style-type: none"> - Abklemmen der ICA
e)			<ul style="list-style-type: none"> - Anschneiden der CCA - Einführung des Filaments
f)			<ul style="list-style-type: none"> - Lockerung der Arterienklemme - Vorschub des Filaments zur MCA - Abbinden der ICA

Um das Filament bis in die ICA vorschieben zu können, musste in diesem Arbeitsschritt jedoch zunächst die Arterienklemme vorsichtig gelöst werden (siehe Tab. 4 e). Daraufhin wurde das Filament bis zu einem leicht spürbaren Widerstand ca. 9 mm tief, gemessen ab Carotisbifurkation, und bis zum Eintritt der MCA in den Circulus arteriosus willisii (CaW), in die ICA eingeführt, um so die MCA zu verschließen. Dabei galt es immer zu kontrollieren, ob das Filament richtig verläuft und nicht fälschlicherweise in die PPA gelenkt wurde. Um ein Herausrutschen des Filaments und damit einhergehende Nachblutungen zu vermeiden, wurde der zunächst locker um die ICA gelegte chirurgische Faden nun ebenfalls zu einer festen Ligatur verknotet (siehe Tab. 4 f).

Während in 5 Kontrolltieren das Filament sofort nach der Einführung wieder entfernt wurde, wurde Selbiges im Sinne der Versuchsplanung erst nach einer angestrebten Okklusionsdauer von 30 min, gleichwohl jedoch noch immer unter Narkose der Tiere, entfernt. Hierzu wurde die Ligatur um die ICA kurzzeitig gelockert und nach dem Herausziehen des Filamentes sofort wieder fest verschlossen.

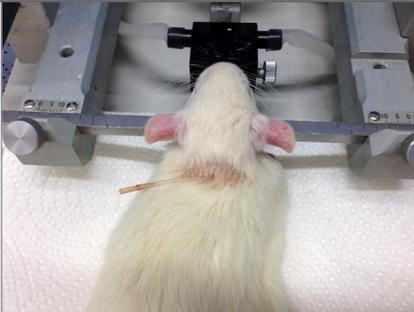
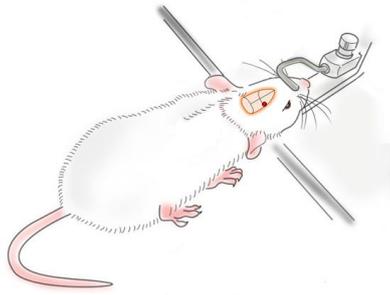
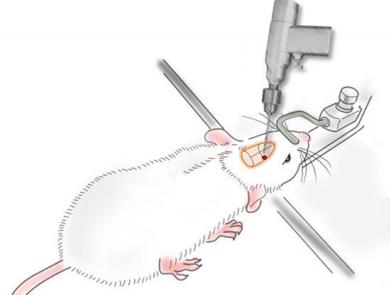
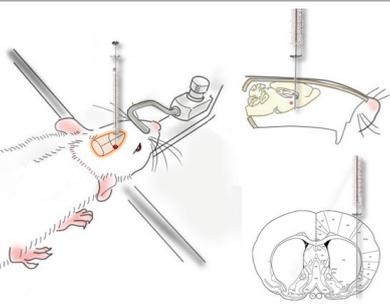
Abschließend wurde die Wundstelle mit Volcon A (Dermapharm AG, Grünwald, Deutschland) behandelt und final vernäht. Zum Zwecke eines Ausgleiches des Flüssigkeitsverlustes während und kurz nach der Operation, wurde den Tieren 500 µl physiologische Kochsalzlösung subkutan injiziert.

7.4.2 Intrazerebrale Endothelin-1 Injektion in Ratten

Der vorübergehende Verschluss der MCA in Ratten wurde durch die intrazerebrale Injektion des Vasokonstriktorpeptides ET-1 herbeigeführt. Die erforderliche Narkotisierung erfolgte durch ein Gasmisch, bestehend aus 2-2,5 % Isofluran in N₂O & O₂ (je 1 l/min). Zur Durchführung des operativen Eingriffes wurden die Ratten in einer speziellen Stereotaxie (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) eingespannt und über einen zugehörigen Beatmungsaufsatz (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) narkotisiert (siehe Tab. 5 a). Um ein Absinken der Körpertemperatur zu vermeiden, wurden die Tiere während der Operation auf einer Heizmatte platziert. Anschließend wurde die Haut der Ratten über der Schädeldecke rasiert, mit 70 %igem Et-OH desinfiziert und durch Anlegen eines ca. 1,5 cm langen Schnittes geöffnet.

Nach dem Auftrag von Wasserstoffperoxid (0,3 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden ferner sowohl die Hirnhäute entfernt als auch der Schädel mit Tupfern gesäubert (siehe Tab. 5 b). Anschließend wurde 0,9 mm anterior von Bregma und 4,8 mm lateral von der Sutura sagittalis (Scheitellaht) ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 1,1 mm in den Schädelknochen gebohrt (siehe Tab. 5 c), wobei die hierfür erforderlichen Bohrlochkoordinaten in zahlreichen Vorversuchen durch die Projektgruppe Neuropharmakologie des LIN ermittelt wurden.

Tab. 5: Operationsschritte zur intrazerebralen Injektion von ET-1 in Ratten.

	Schematische Darstellung	Fotografische Darstellung	Arbeitsschritte
a)			- Platzieren der Ratte in der Stereotaxie
b)			- Hautschnitt über dem Schädel - Säuberung des Schädels - Abmessen der Bohrloch-kordinaten
c)			- Durchführung der Bohrung oberhalb der MCA
d)			- Einführen der Injektionskanüle - ET-1-Injektion

Durch das Bohrloch wurde eine 29-Gauge-Kanüle einer 5 ml Hamiltonspritze (Hamilton Germany GmbH, Höchst-Forstel, Deutschland), die ihrerseits im Halter der Stereotaxie eingespannt war, 7,5 mm tief in das Hirn eingeführt (siehe Tab. 5 d). Schließlich wurde den Ratten nahe der MCA eine 125 pmol konzentrierte ET-1 Lösung (verdünnt in 3 μ l einer 0,9 %igen NaCl-Lösung) über einen Zeitraum von 5 min injiziert.

In den 5 Ratten der MCAO-Gruppe B wurden verschiedene ET-1 Konzentrationen, rangierend von 93,75 – 187,5 pmol, in analoger Vorgehensweise injiziert.

Kontrolltieren wurde hingegen das gleiche Volumen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (3 µl) ohne ET-1 injiziert. Nach weiteren 5 min wurde die Injektionskanüle wieder langsam aus dem Schädel entfernt, die Schädeloberfläche erneut gesäubert, vereinzelt auftretende Blutungen gestillt und die Wunde vernäht.

7.5 ^{99m}TcHMPAO

7.5.1 Tracerpräparation

Zur Herstellung der ^{99m}TcHMPAO-Injektionslösungen wurden HMPAO-Kits (Ceretek™, GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG, Gieselweg 1, Braunschweig, Deutschland) für klinische Anwendungen verwendet, welche 0,5 mg Exametazim (HMPAO), 7,6 µg Zinn(II)-chlorid-Dihydrat, 4,5 mg Natriumchlorid und Stickstoff enthielten. Die Kit-Bestandteile sind so dosiert, dass ^{99m}TcHMPAO in einer Dosis von 1 GBq sicher hergestellt werden kann. Eine übliche Dosis in der Humanmedizin ist 750 MBq. Theoretisch ist es damit möglich, aus einem Human-Kit, bei Dosierungen wie in der vorliegenden Studie, ca. 10 Portionen für Maus-Messungen herzustellen, nach unseren eigenen Erfahrungen auch noch deutlich höhere Zahlen. In der Praxis konnte diese hohe Zahl in der Kleintier-SPECT Bildgebung allerdings lange Zeit nicht genutzt werden, da die Portionen primär nicht lagerfähig sind. Nur bei sofortigem Gebrauch der Gesamtmenge, d. h. parallelen Injektionen von 10 Mäusen gleichzeitig, hätte die grosse Menge HMPAO im Kit wirklich verwendet werden können.

Am LIN ist ein Protokoll entwickelt worden, das den Gebrauch gelagerter (ca. 2 Monate bei -80 °C) Aliquots aus dem kommerziellen HMPAO-Human-Kit ermöglicht und dadurch die Kosten für das ^{99m}TcHMPAO in der Nagetierbildgebung um einen Faktor von ca. 10 gesenkt hat (vgl. [173]). Dieses Protokoll ist hier verwendet worden. Es beruht auf der Zugabe frischen Zinn(II)chlorids nach der Lagerung.

Für die Injektion von Mäusen wurde der Inhalt eines HMPAO-Kits in 2 ml NaCl (0,9 %) gelöst und in Aliquots von je 125 µl aufgeteilt, wohingegen für die Injektion der Ratten der Inhalt eines HMPAO-Kits in 4 ml NaCl (0,9 %) gelöst und in Aliquots von je 250 µl aufgeteilt wurde. Dabei konnte in verschiedenen Qualitätskontrollen nachgewiesen werden, dass beide HMPAO-Aliquots bis zu einer Aktivität von ca. 150 MBq ^{99m}Tc genutzt werden können.

Natrium[^{99m}Tc]pertechnetat wurde als frisches Eluat eines sterilen ⁹⁹Molybdän/^{99m}Tc-Generators durch die Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg bereitgestellt. Kurz vor der Injektion wurde die ^{99m}TcHMPAO-Lösung durch das Mischen von ca. 150 MBq Natrium[^{99m}Tc]pertechnetat (Volumen ca. 75-150 µl) mit einem HMPAO-Aliquot für die Maus (125 µl) bzw. für die Ratte (250 µl) hergestellt.

Für die Bildung des $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Komplexes, ist es erforderlich, dem Gemisch von HMPAO und ^{99m}Tc -Pertechnetat Zinn $^{2+}$ -Ionen (Sn^{2+}) zuzugeben. Diese fungieren als Reduktionsmittel für die Reduktion von Pertechnetat. Sie sind in der kommerziellen Kit-Lösung enthalten, werden aber beim Öffnen des Kits durch gelösten Sauerstoff in der zugegebenen NaCl-Lösung relativ rasch oxidiert. Die nachträgliche (erneute) Zugabe von Sn^{2+} macht es möglich, auch lange gelagerte Kit-Lösungen bzw. Aliquots von Kit-Lösungen zu verwenden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine 200 μM Zinn(II)-chlorid (SnCl_2) Lösung durch das Lösen von 50 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in einem Liter bidestilliertem Wasser (ddH_2O) für 30 s. hergestellt. Anschließend wurden 25 μl dieser Lösung dem Tracergemisch zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 min konnte das Tracergemisch schließlich injiziert werden.

7.5.2 Tracerinjektion in Mäusen

In Mäusen erfolgte die Injektion von $^{99m}\text{TcHMPAO}$ ca. 1-5 min nach Verschluss der MCA. in prinzipiell analoger Vorgehensweise, wie bei der $^{201}\text{TlDDC}$ -Injektion. Im Gegensatz zu der in 7.2.2 beschriebenen $^{201}\text{TlDDC}$ -Injektion erfolgte die Injektion des $^{99m}\text{TcHMPAO}$ jedoch am narkotisierten Tier, wobei die Mäuse direkt nach der Faden-Implantation bzw. Sham-OP seitlich auf der Operationsunterlage platziert und der Schwanz kurz mit einer Infrarotlampe zur Vorbereitung der Schwanzveneninjektion erwärmt wurde (siehe Abb. 24).

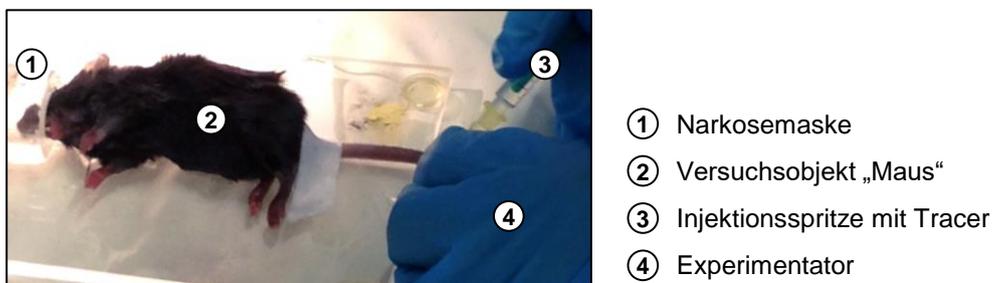


Abb. 24: $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektion über die kollateralen Schwanzvenen an der narkotisierten Maus.

Die im Anschluss an die Injektion ermittelte mittlere injizierte $^{99m}\text{TcHMPAO}$ Aktivitätsdosis betrug 99,88 MBq (STABW \pm 35,41 MBq) in einem Volumen von 200-275 μl .

Nach erfolgter Injektion wurden die Mäuse für eine 15-minütige $^{201}\text{Tl}+^{99m}\text{Tc}$ -Doppelisotopenmessung in den SPECT/CT Scanner überführt, bevor durch das Zurückziehen des Fadens die Reperfusion der MCA (30 min nach Fadenimplantation) eingeleitet wurde.

7.5.3 Tracerinjektion in Ratten

Die $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektion wurde in allen Ratten ca. 90 min nach der ET-1 Injektion analog zur $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion über den Jugularvenenkatheter durchgeführt. In den Ratten der MCAO-Gruppe A sowie der Kontrollgruppe, denen bereits $^{201}\text{TIDDC}$ vor dem Verschluss der MCA injiziert wurde, erfolgte die $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektion während der Narkosephase und direkt innerhalb des SPECT/CT-Scanners nach dem Herausfahren der im Scanner integrierten Rattenliege. Für die Injektion wurde der implantierte Katheter, über den bereits $^{201}\text{TIDDC}$ injiziert wurde, mit einem mit NaCl (0,9 %) gefüllten 40 cm langen Teflonschlauch verlängert (siehe Abb. 25).

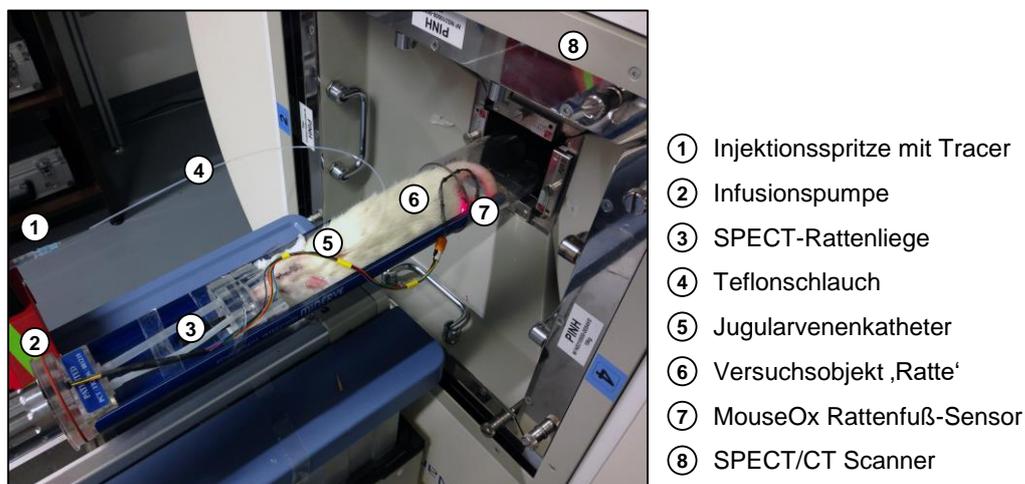


Abb. 25: $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektion über einen Jugularvenenkatheter an der narkotisierten Ratte.

In den übrigen Ratten der MCAO-Gruppe B wurden sowohl die $^{99m}\text{TcHMPAO}$ als auch die $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion kurz nacheinander im wachen Zustand 90 min nach der ET-1 Injektion durchgeführt. Die Ratten befanden sich dabei in einem hohen Käfig, in dem sie sich frei bewegen konnten. Zunächst erfolgte die $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektion über einen mit NaCl-gefüllten 60 cm langen Teflonschlauch der an den Jugularvenenkatheter angeschlossen war. Nach Abschluss der Injektion wurde der Teflonschlauch durch einen neuen ebenfalls mit NaCl-gefüllten 60 cm langen Teflonschlauch ersetzt und die $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion gestartet.

Sämtliche $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektionen in Ratten erfolgten innerhalb eines Zeitraumes von 5 min. Die Pumpraten variierten dabei in Abhängigkeit des Tracervolumens zwischen 50-100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die mittlere injizierte Aktivitätsdosis für $^{99m}\text{TcHMPAO}$ betrug im Schnitt 116,00 MBq (STABW \pm 13,69 MBq) in einem Volumen von 300-500 μl .

Nach jeder Tracerinjektion wurden die Katheter wieder mit einem kleinen Volumen an NaCl-Heparin-Lösung gespült, um Tracerrückstände aus dem Katheter zu entfernen. Direkt nach erfolgter Tracerinjektion wurden die Ratten in den SPECT/CT Scanner überführt, wo zunächst eine ebenfalls 30-minütige $^{201}\text{Tl}^{+}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Doppelisotopenmessung, gefolgt von einer mehrstündigen Mehrfachmessung und einer abschließenden 2-stündigen Messung am Folgetag durchgeführt wurden.

7.6 Applikation von MK-801 in Mäusen

Nach Einleiten der Reperfusion wurde den Mäusen der MCAO-Gruppe B der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 injiziert.

Zur Durchführung dieses Experimentes wurde (+)-MK-801hydrogen maleate (Nr.: M107-5MG, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) verwendet, welches als Trockensubstanz geliefert wurde. Von dieser Trockensubstanz (5 mg) wurden durch deren Lösen in 5 ml PBS (0,1 M, pH 7,4) Aliquots von je 150 μl hergestellt. Diese Aliquots wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Den Mäusen der MCAO-Gruppe B wurde direkt nach Einleiten der Reperfusion 3 mg/kg Körpergewicht MK-801 i.p. appliziert. Die übrigen Mäuse (d. h. der MCAO-Gruppe A und Kontrollgruppe) erhielten im Sinne einer Überprüfung das gleiche Volumen an PBS (0,1 M, pH 7,4).

Nach der Injektion wurden die Mäuse erneut in den Scanner für eine 5-stündige Mehrfachmessung überführt. Von den Mäusen der MCAO-Gruppe B wurde keine abschließende 2 h Messung am Folgetag durchgeführt.

7.7 Verbleib der Tiere nach der letzten SPECT/CT-Messung

Direkt nach der letzten SPECT/CT Messung wurden die Mäuse in tiefer Narkose getötet und deren Hirne entnommen, um diese für eine Nissl-Färbung zu prozessieren. In den Ratten erfolgte im Vorfeld deren Tötung sowie der nachgelagerten Hirnentnahme zur Nissl-Färbung eine T_2 -gewichtete MRT ($T_2\text{w-MRT}$) Messung. Anhand dieser $T_2\text{w-MRT}$ -Aufnahmen in Kombination mit den Nissl angefärbten Hirnschnitten konnte eine exakte Lokalisierung des Führungskanals der Kanüle, über welche ET-1 injiziert wurde, realisiert werden.

In Mäusen und Ratten war das Hauptziel der gewählten Vorgehensweise eine Volumenbestimmung des finalen Schadens als Referenz für die späte ^{201}Tl -SPECT Messung.

7.7.1 Magnetresonanztomographie an Ratten

Von einem Teil der Ratten (Kontrollgruppe $n = 3$, MCAO-Gruppe A $n = 8$) wurde ca. eine Woche (7 ± 2 Tage) nach der letzten SPECT/CT-Messung eine T_2w -MRT-Messung durchgeführt. Dabei ist anzumerken, dass die T_2w -MRT-Messungen aus strahlenschutzrechtlichen Gründen nicht unmittelbar nach der letzten SPECT/CT-Messung durchgeführt werden konnten, da sich das verwendete MRT außerhalb des Kontrollbereiches befand.

Die MRT Aufnahmen wurden mit Hilfe eines 4,7T Bruker Biospec 47/20 Scanners der Firma Bruker Biospin GmbH (Ettlingen, Deutschland) durch das Speziallabor „Nicht-invasive Bildgebung“ des LINs unter der Betreuung von Prof. Dr. Frank Angenstein durchgeführt.

Der Scanner verfügte über einen Bohrungsdurchmesser von 20 cm und war mit einem BGA 09 Gradientensystem (400 mT/m) ausgestattet. Für die Hochfrequenzanregung und den Signalempfang wurde ein 50-mm-Kleintier-Litzcage-Abbildungssystem des Herstellers DotyScientific Inc. (Columbus, SC, USA) verwendet.

Die T_2 -gewichteten MRT-Bilder, welche mit einer axialen (40 Schichten), einer koronaren (17 Schichten) sowie einer sagittalen (19 Schichten) Schichtorientierung aufgenommen wurden, entstanden unter Verwendung einer RARE (engl. für Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) Bildgebungssequenz [174] mit den nachstehenden Parametern: Wiederholzeit (TR, engl. für Time of repetition) 5000 ms für axiale Aufnahmen; 4000 ms für koronare und sagittale Aufnahmen, effektive Echozeit (TE, engl. für Echo Time) 60 ms, Schichtdicke 0,8 mm, Abstand zwischen den Schichten 0 mm, Sichtfeld 40×40 mm, Matrix 256×256 , (daraus ergibt sich eine nominale Auflösung in der Ebene von $156 \mu\text{m}$) RARE Faktor 8, Anzahl der Mittelungen 6, Gesamtzykluszeit 16 min.

Zur Durchführung der Messungen wurden die Ratten zunächst mit Isofluran (2 Vol% in je 1 l/min Stickstoff (N_2), und O_2) narkotisiert und im MRT-Scanner auf einer speziellen, sowohl mit Kopfhalterung als auch mit Beiss-Schiene für die Schneidezähne ausgestatteten Tierliege fixiert, um Bewegungsartefakte z. B. durch das Atmen der Tiere weitestgehend zu reduzieren. Die Narkose wurde über den gesamten Messvorgang aufrecht erhalten (Isofluran 1,0-1,5 Vol% in je 1 l/min N_2 , und O_2). Zusätzlich wurden sowohl die Atem- als auch die Herzfrequenz sowie die Sauerstoffsättigung der Ratten während der gesamten Versuchsdauer mit Hilfe eines MRT-kompatiblen Tierüberwachungssystems (Mouse Ox, Starr Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA), welches auch für die SPECT/CT-Messungen verwendet wurde, erfasst. Die Körpertemperatur der Ratten wurde durch die Wärmezufuhr über eine Temperiereinheit konstant bei $37,5 - 38^\circ\text{C}$ gehalten.

7.7.2 Organentnahme und Histologie

Im unmittelbaren Anschluss an die letzte SPECT/CT-Messung wurden die Mäuse in tiefer Isofluran-Narkose (4 Vol% in 550 ml/min N₂O und 750 ml/min O₂) euthanasiert. Die im Anschluss herauspräparierten Hirne wurden für die Dauer von zwei Tagen zunächst in eine 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA, Protokoll siehe Anhang) und im Folgenden für zwei weitere Tage in eine 30 %ige Succrose-Lösung (Protokoll siehe Anhang) überführt. Abschließend wurden die Hirne bei -50 °C in mit stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren und bis zu ihrer weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Hirnentnahme bei Ratten erfolgte im Anschluss an die MRT Messung ebenfalls nach vorheriger Euthanasierung in tiefer Isofluran-Narkose (4 Vol% in 550 ml/min N₂O und 750 ml/min O₂). Darin eingeschlossen waren auch die Ratten, von denen keine MRT Messung durchgeführt wurde.

Zwei Rattenhirne konnten aufgrund eines vorzeitigen Exitus der Tiere nicht gewonnen werden. Die entnommenen Hirne wurden in analoger Vorgehensweise zu den Mäusehirnen für zwei Tage in eine 4 %ige PFA sowie für die Dauer einer Woche in eine 30 %ige Succrose-Lösung überführt und im Anschluss bei -50 °C in einer mit stickstoffgekühlten Isopentanolösung eingefroren.

Von den gefrorenen Maus- und Rattenhirnen wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM3050S, Wetzlar, Deutschland) frontale Serienschritte mit einer Schnittdicke von 50 µm angefertigt. Von 10er Serien wurden jeweils die ersten 5 Nachbarschnitte auf Objektträger (Thermo Scientific Superfrost® Plus, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und mit Kresylviolett angefärbt. Die übrigen 5 Schnitte einer 10er Serie wurden zur Lagerung bei -20 °C in eine gepufferte Gefrierschutzlösung (Protokoll siehe Anhang) überführt.

Zur Durchführung der nach Standardprotokoll durchgeführten Nissl-Färbung mit Kresylviolett wurden die Schnitte in 0,05 M Acetatpuffer (pH 4,0-4,2) angesäuert (für 5 min), in 0,5 % Kresylechtviolett gefärbt (für 5 min) und in 0,05 M Acetatpuffer (pH 4,0-4,2) differenziert (für 3 min). Für den anschließend erforderlichen Arbeitsschritt des Entwässerns wurden die Schnitte für die Dauer von je 2 min durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) geführt. Abschließend wurden die Schnitte in einem 2:1 Gemisch aus Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Ethanol (96 %) zweimal für 5 min geklärt und dreimal für je 5 min in Roticlear (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entfettet bevor sie mit Enthellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt wurden.

Zur Herstellung des 0,05 M Acetatpuffers wurden 6,8 g Natriumacetat in 1 l destilliertem Wasser (dH₂O) gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 4,0-4,2 eingestellt. Die 0,5 %ige Kresylechtviolett-Färbelösung wurde durch das Lösen von 0,5 g Kresylviolettacetat (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1 l destilliertem Wasser (dH₂O) hergestellt.

7.8 Vorverarbeitung der SPECT/CT-Daten

Die rekonstruierten SPECT/CT-Datensätze wurden mit Hilfe des Multi Purpose Imaging Tools (MPI-Tool, Version 6.36, ATV, Advanced Tomo Vision, D-50169 Kerpen, Deutschland) so reorientiert, dass sowohl die Daten innerhalb einer Messreihe als auch der Einzeltiere untereinander möglichst deckungsgleich waren. Diese Reorientierung der SPECT/CT-Daten erfolgte durch die Anpassung der Schädelkonturen im CT an ein MRT-Template. Während für die Anpassung der Mausdaten das von Ma et al. [175] publizierte Standard-MRT (Std.-MRT) für C57Bl6 Mäuse genutzt werden konnte, erfolgte die Anpassung der Rattendaten mit Hilfe der eigens während der Versuchsdurchführung erhobenen Ratten-MRTs. Die korrekte Reorientierung der Ratten-Daten, für die kein eigener MRT-Datensatz zur Verfügung stand, wurde durch Angleichung der CT Konturen an bereits reorientierte CT-Datensätze erreicht. Abschließend wurden sowohl die reorientierten SPECT-Datensätze als auch die CT-Datensätze mit einer Schichtanzahl von 236 und einen Schichtabstand von 100 μm für Mausdatensätze bzw. 196 Schichten mit einem Abstand von 200 μm für Rattendatensätze abgespeichert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Hirn-SPECT-Daten mit Hilfe einer jeweils entsprechenden Maske für Maus und Ratte in der Osirix-Software™ (Antoine Rosset, Genf, Schweiz, 64-bit Version 5.7.1) vom extrakraniellen Anteil isoliert. Zum Ausschneiden der Maus-Hirn-Daten wurde ein vorgefertigtes Template für C57/Bl6 Mäuse genutzt, welches dem verwendeten Standard MR entsprach [175]. Für die SD-Ratten stand ein derartiges Standard-Template nicht zur Verfügung und musste von daher erst erstellt werden. Dazu wurden die MRT-Datensätze der scheinoperierten Kontrollratten im MPI Tool aufaddiert und der resultierende Datensatz in die Osirix-Software™ importiert. Dort wurde mit Hilfe der Segmentierungseinstellungen und der integrierten Funktion „Grow Region“ das Hirn vom extrakraniellen Bereich sowie vom Hintergrund segmentiert.

Der ausgewählte Bereich wurde als 3D-VOI (engl. volume of interest) abgespeichert und konnte so anschließend als Maske zum Ausschneiden der Einzeltier Ratten-Datensätze genutzt werden.

Zur Ermittlung von Gruppenunterschieden bzw. hemisphärischer Unterschiede im ^{201}Tl DDC-Gehalt als auch im $^{99\text{m}}\text{Tc}$ HMPAO-Gehalt wurden die SPECT-Daten abschließend im MPI Tool auf einen gleichen Mittelwert intensitätsnormalisiert. Dabei wurde zunächst ein klassischer Ansatz gewählt und alle Hirne auf einen gemeinsamen Mittelwert des Gesamthirns intensitätsnormalisiert. Um einen möglichen Einfluss der Schadensgröße auf den Mittelwert des Gesamthirns auszuschließen, wurden in einem zweiten Schritt alle Hirne auf den Mittelwert der gesunden Hemisphäre (auch kontralaterale Hemisphäre) intensitätsnormalisiert. In Auswertung beider Ansätze konnten keine Unterschiede in den Ergebnissen beobachtet werden, woraufhin der zweite Ansatz weiterverfolgt wurde.

In beiden Ansätzen wurde auf die mittlere Intensität 1000 anstatt wie üblich auf 1 normiert, um Probleme mit der Darstellung von Fließkomma-Werten, die bei dem DICOM-Viewer Osirix bestehen, zu vermeiden.

Um den zeitlichen Verlauf der Schadensausbreitung und des Verlustes von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Areal verminderter Perfusion zu analysieren wurden alle ausgeschnittenen ^{201}Tl -SPECT-Datensätze (d. h. Datensätze der Baseline-Messung, der repetitiven Mehrfachmessungen und der späten Messung) auf die kontralaterale Hemisphäre zum Zeitpunkt der Baseline-Messung intensitätsnormalisiert. Das bedeutet, dass alle Datensätze eines Einzeltiers mit ein und dem selben Faktor multipliziert wurden, der $1/1000$ des mittleren Grauwertes der kontralateralen Hemisphäre der Baseline-Messung des jeweiligen Einzeltiers entsprach, d. h. alle kontralateralen Hemisphären der Baseline-Messungen wurden auf 1000 normiert und die Veränderungen in der mittleren Farbintensität über die Zeit blieb im Einzeltier unverändert. Sich entsprechende normalisierte Messungen der Einzeltiere (z. B. alle Baseline-Messungen) einer bestimmten Gruppe (z. B. Sham) wurden für Gruppenanalysen im MPI Tool aufaddiert und durch die Anzahl der Einzeltiere dividiert.

7.9 Vorgehensweise zur Datenauswertung

7.9.1 Bestimmung des Areals verminderter Perfusion

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurde mangels fehlender arterial input function auf die Bestimmung eines echten Wertes für die Perfusion verzichtet. Um trotzdem ein sinnvolles Maß zu erhalten, um Areale verminderter Perfusion zwischen Individuen und Gruppen vergleichen zu können, erfolgte die Bestimmung des Areals verminderter Perfusion an den $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -SPECT-Datensätzen durch eine automatische Segmentierung anhand eines Grenzwertes, wie in der klinischen und präklinischen Auswertung üblich. Dieser Grenzwert wurde für die Auswertung der $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -SPECT von Mäusen, deren Blutflussmessung zum Zeitpunkt der Okklusion (d. h. zum Zeitpunkt der maximalen Blutflussreduktion) erfolgte auf den Mittelwert (MW) der kontralateralen Hemisphäre minus zweimal der Standardabweichung (STABW) derselben festgelegt. In Ratten, deren Blutfluss erst während der graduellen Reperfusion gemessen wurde, wurde dieser Grenzwert auf den $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -MW-Gehalt der kontralateralen Hemisphäre minus eine STABW festgelegt. Die Detektion der von der Minderperfusion betroffenen Bereiche wurde mit der in OsirixTM integrierten Funktion „Growing Region“ durchgeführt. Von diesen so ausgewählten Bereichen wurde unter Verwendung der Funktion „ROI-Volumen“ der mittlere $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -Gehalt und das Volumen ermittelt.

Die Bestimmung des mittleren Areals verminderter $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Anreicherung erfolgte in den aufaddierten und auf die Anzahl der Tiere normalisierten $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -SPECT-Datensätzen der jeweiligen Tiere der MCAO-Gruppen anhand derselben Grenzwerte. Der jeweils ausgewählte Bereich wurde anschließend als VOI-1 (mittleres Areal verminderter Perfusion) abgespeichert, um im Folgenden die Reduktion von $^{201}\text{Tl}^+$ in diesem Bereich ermitteln zu können.

Zur Herstellung einer gespiegelten VOI-1 (entspricht VOI-2), um hemisphärische Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ - und $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Gehalt zu ermitteln, wurden die aufaddierten Datensätze im MPITool horizontal gespiegelt und erneut der Bereich verminderten $^{99m}\text{TcHMAPO}$ -Gehalts dann auf der gespiegelten Hemisphäre detektiert und als VOI-2 abgespeichert (gespiegeltes mittleres Areal verminderter Perfusion). Statistische Unterschiede im $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Gehalt und $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt zwischen VOI-1 und VOI-2 wurden in Excel (Version 14.5.4) unter Zuhilfenahme eines T-Test ermittelt, wobei p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurden.

7.9.2 Vergleich der späten ^{201}Tl -SPECT mit etablierten Markern

Um das Ausmaß der $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion in VOI-1 in Bezug zu VOI-2 mit dem finalen Schaden zu vergleichen, wurde in Excel eine Pearson-Korrelationsanalyse zwischen dem Ausmaß des $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes 21-22 h nach der MCAO aus der VOI-1 im Vergleich zu VOI-2 mit den sowohl in Nissl- als auch in $T_2\text{w}$ -MRT-Aufnahmen ermittelten Infarktvolumina über alle Tiere der MCAO-Gruppen A durchgeführt.

Die Bestimmung des finalen Infarktvolumen in MRT-Hirnaufnahmen aller 3 Schnittebenen erfolgte ebenfalls in der OsirixTM-Software. Dort wurden aufgrund erhöhter Wasseransammlungen hyperintens (d. h. heller/ weißlich) erscheinende Bereiche mit dem ROI-Werkzeug geschlossenenes Polygon manuell umrandet und das Volumen der selektierten Bereiche mit der integrierten Funktion „ROI-Volume“ ermittelt.

Um den finalen Schaden in den mit Nissl-gefärbten Hirnschnitten zu bestimmen, wurden die angefertigten 5er Schnittserien mit einer Auflösung von 1600 dpi und 48 bit RGB mit einem Epson Perfection V750 Pro Scanner (Meerbusch, Deutschland) digitalisiert.

Die Detektion der geschädigten Areale, welche durch eine verminderte Nissl-Färbung charakterisiert waren, erfolgte auch in diesem Fall durch manuelles Umranden. Die dafür verwendete Software ImageJ 1.49b ist frei im Internet erhältlich [176]. Unter Verwendung der in ImageJ integrierten Funktionen wurde der Flächeninhalt des geschädigten Areals auf jedem 10ten Hirnschnitt bestimmt (Abstand der Hirnschnitte, $d = 0,5$ mm).

Das Volumen des gesamten geschädigten Areals wurde errechnet in dem die ermittelten Oberflächengehalte mit dem Schichtabstand multipliziert und aufsummiert wurden (siehe (Gl. 1)).

$$V_{\text{Infarkt}} = \sum_{i=1}^N (A_i * d) \quad (\text{Gl. 1})$$

mit:

V_{Infarkt} – Infarktvolumen [mm^3]

A – Oberflächeninhalt [mm^2]

d – Schichtabstand [mm]

Diese Vorgehensweise der Volumbestimmung ist bereits in [127] publiziert.

Die im T_2w -MRT und in der Nissl-Färbung ermittelten Schadensareale wurden als Grundlage genommen, um im späten ^{201}Tl -SPECT einen Wert für die Abgrenzung irreversibel geschädigten Gewebes zu definieren. Dies geschah anhand eines empirischen Annäherungsverfahrens. Die Detektion der entsprechenden Areale erfolgte erneut in Osirix™ unter Verwendung der „Growing Region“ Funktion. Die grafische Gegenüberstellung der mit Hilfe dieses Grenzwertes in den späten ^{201}Tl -SPECT-Aufnahmen ermittelten Volumina gegenüber der konventionell gemessenen Infarktvolumina erfolgt durch einen Box-Plot in Excel. Die Übereinstimmung der verschiedenen Messmethoden wurde ebenfalls in Excel durch einen Bland-Altman Test [177] überprüft.

Um die Areale verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung auch in den in der Akutphase erhobenen SPECT-Messungen bestimmen zu können, wurde der zuvor ermittelte Grenzwert verwendet. Signifikante Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt zwischen aufeinanderfolgenden Messungen wurden mit Hilfe eines T-Test (2-seitig, gepaart) in der MagnAn-Software (Version 2.4, BioCom GbR, 90180 Uttenreuth, Deutschland) erhoben. Dabei wurden, wie in früheren Studien der Kleintier-Radionuklid-Bildgebung nicht korrigierte p-Werte verwendet [178–181].

7.9.3 Bestimmung einer voxelweisen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetik aus dem Schadensareal

Um die Verlustkinetik von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Schadensareal für jeden Voxel mathematisch zu beschreiben, wurde zunächst die Gesamthirkinetik in Mäusen und Ratten in den einzelnen experimentellen Gruppen betrachtet.

Dazu wurde die Gesamthirnaktivität in allen SPECT-Messungen (d. h. Baseline-Messung, Datensätze der repetitiven Mehrfachmessungen ggf. der späten Messung) über die Zeit in Osirix™ bestimmt und in Excel nach der folgenden Formel zerfallskorrigiert (siehe (Gl. 2)).

$$A(t) = A_0 * e^{-\lambda t} \quad \text{(Gl. 2)}$$

mit:

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

$$A(t) = A_0 * e^{-\left(\frac{\ln 2}{T_{\frac{1}{2}}}\right) * t}$$

$$A(t) = A_0 * 2^{-\frac{t}{T_{\frac{1}{2}}}}$$

mit:

A_0 – Anfangsaktivität,

$A(t)$ – Aktivität zum Zeitpunkt t ,

λ – spez. Zerfallskonstante von $^{201}\text{Tl}^+$ ($2,637 * 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)

$T_{\frac{1}{2}}$ – Halbwertszeit von $^{201}\text{Tl}^+$ (72,9 h)

Unter der Annahme einer Kinetik erster Ordnung wurden die Daten der zerfallskorrigierten Gesamthirnaktivitäten mit einer Exponentialfunktion gefittet. Die Annahme einer Kinetik erster Ordnung impliziert den Verlust eines konstanten Prozentsatzes des $^{201}\text{Tl}^+$ pro Zeiteinheit und ist u. a. nicht gültig, wenn es zu einem Rückstrom von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Plasma kommt. Sie ist im Rahmen dieser Proof-of-Concept Studie als einfachstes kinetisches Modell gewählt worden.

Zur Bestimmung der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstante für jeden Hirnvoxel wurden alle nach der Baseline-Messung gewonnen, ausgeschnittenen und auf die kontralaterale Hemisphäre zum Zeitpunkt der Baseline-Messung intensitätsnormalisierten $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT-Datensätze (d. h. der Doppelisotopenmessung, der repetitiven Mehrfachmessungen und der späten Messung) eines Einzeltiers bzw. einer Gruppe mit Hilfe der ImageJ 1.49b-Software zu einem 4D-Datensatz in der richtigen zeitlichen Reihenfolge verkettet. Die 4D-Datensätze wurden als Raw-Dateien für die weitere Analyse in Octave 3.8.1 (Software zur numerischen Lösung mathematischer Probleme, frei im Internet erhältlich [182]) abgespeichert.

In Octave wurden die SPECT-Daten ebenfalls unter Verwendung der bereits genannten (Gl. 2) zerfallskorrigiert. Unter Annahme eines monoexponentiellen Verlustes von $^{201}\text{Tl}^+$ aus einem entsprechenden Hirnvoxel wurde anschließend eine $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstante über verschiedene Zeitspannen (d. h. 0-1 h, 1-2 h, 2-3 h, 3-4 h, 4-5 h, 0-5 h und 0-21 bzw. 22 h nach der Reperfusion) für jeden Voxel unter Verwendung der folgenden Gleichung (siehe (Gl. 3)) bestimmt.

$$A(t)_{\text{kor}} = A_0 * e^{-k_{\text{Vox}}t} \quad (\text{Gl. 3})$$

$$\log(A(t)_{\text{kor}}) = \log(A_0) - k_{\text{Vox}}t$$

$$k_{\text{Vox}} = -\frac{\log(A(t)_{\text{kor}}) - \log(A_0)}{t}$$

mit:

A_0 – Anfangsaktivität,

$A(t)_{\text{kor}}$ – korrigierte Aktivität zum Zeitpunkt t

k_{Vox} – Voxelbasierte $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstante

t – Zeit

Die Eignung des zugrundeliegenden Modells eines exponentiellen Verlustes von $^{201}\text{Tl}^+$ aus einem Hirnvoxel über die Zeit zur Bestimmung einer voxelweisen Verlustkonstante wurde durch die Berechnung eines Gütemaßes nach der Methode der kleinsten Quadrate („Least Squares method“) für jeden Voxel überprüft (siehe (Gl. 4)).

$$r^2 = 1 - \frac{\text{SSE}}{\text{SSD}} = 1 - \frac{\sum_{j=1}^n (y_j - f(x_j))^2}{\sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2} \quad (\text{Gl. 4})$$

mit:

SSE – quadratische Abstände vom Messwert zur gefitteten Funktion
über alle Messwerte summiert

SSD – quadratische Abstände vom Messwert zum Mittelwert über alle
Messwerte summiert

Zur bildlichen Darstellung wurden alle in Octave ermittelten voxelweisen Variablen wieder entsprechend ihrer Voxelkoordinaten im Hirn in eine Farbkarte überführt, welche in Osirix™ visualisiert wurde.

7.9.4 Einfluss von MK-801 auf die $^{201}\text{TI}^+$ -Verlustkinetik und das finale Infarktverhalten

Um den Einfluss von MK-801 auf den Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ aus dem Stromgebiet der MCA zu analysieren wurde zum einen der Ansatz einer VOI-basierten Datenanalyse und zum anderen der Ansatz einer voxelweisen Datenanalyse gewählt.

Für beide Ansätze wurden die $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT-Datensätze, welche 6 h nach der MCAO Induktion (letzte Messung des SPECT-Scans III) von allen 3 Mausgruppen gewonnen wurden im MPITool intensitätsnormalisiert auf den MW der kontralateralen Hemisphäre ($\text{MW}_{\text{contra}} = 1000$).

Anschließend wurde für die VOI-basierte Analyse in jedem entsprechenden Einzeltier- $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT-Datensatz der 3 Mausgruppen die mittlere Intensität im zerebralen Kortex und Corpus striatum der ipsilateralen Hemisphäre in Osirix™ mit Hilfe der integrierten Funktion „ROI-Volumen“ bestimmt, entsprechende VOI-Masken standen zur Verfügung [175]. MW-Intensitäten und STABW der beiden VOIs für jede Gruppe, sowie statistische Unterschiede wurden in Excel berechnet. Zur Analyse voxelweiser Unterschiede wurden die normalisierten Datensätze gegeneinander mit einem ungepaarten, 2-seitigen T-Test in MagnAn gegeneinander getestet (p-Werte unkorrigiert).

Kapitel 8

Ergebnisse

8.1 20-22 h nach MCAO ist der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Stromgebiet der MCA deutlich reduziert

Mit Ausnahme zweier Versuchstiere (eine Maus und eine Ratte der MCAO-Gruppe A) konnte 20 - 22 h nach der MCAO in allen Fällen eine deutliche Verminderung des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts im Stromgebiet der MCA beobachtet werden (siehe Abb. 26). Die zwei Tiere ohne $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen, weil ebenfalls keine Perfusionsminderung vorlag und davon ausgegangen wurde, dass kein Infarkt induziert werden konnte.

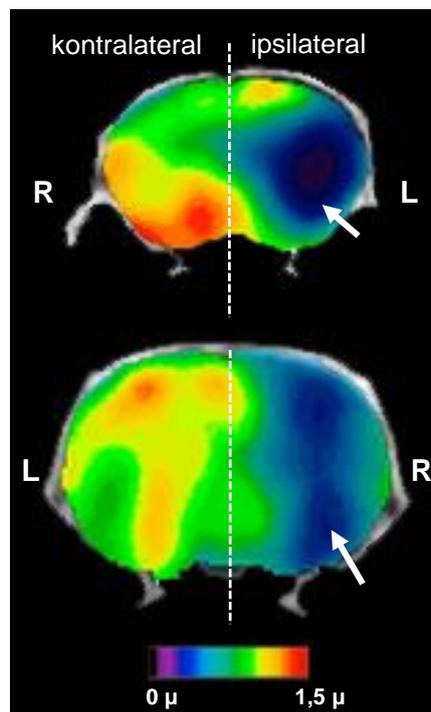


Abb. 26: Deutliche Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Stromgebiet der MCA 20-22 h nach MCAO. SPECT/CT-Aufnahmen von je einer Maus (oben) und einer Ratte (unten) 20-22 h nach MCAO (CT Grauskala, SPECT farbkodiert 0-1,5fache des MW des Gesamthirns). Pfeile kennzeichnen jeweils das Areal verminderten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts auf der ipsilateralen Hemisphäre.

Der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung war nicht homogen reduziert, vielmehr war die Reduktion in zentral gelegenen Regionen stärker (Reduktion um bis zu 75 % in Bezug zu einem vergleichbaren Areal auf der kontralateralen Hemisphäre) und im Randbereich schwächer (Reduktion um ca. 30 % in Bezug zu einem vergleichbaren Areal auf der kontralateralen Hemisphäre) ausgeprägt. Bereits anhand unprozessierter SPECT-Aufnahmen (ohne die hinterlegte anatomische Information eines CTs) war das Areal verminderten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts klar erkennbar und kontrastreich vom umliegenden Gewebe abgrenzbar (siehe Abb. 27).

Dabei sank der Radioaktivitätsgehalt in den Arealen verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung nahezu auf die niedrigsten, in einem Schädel Datensatz vorkommenden Radioaktivitätswerte. Um in einem schnellen Verfahren eine Maßzahl für den $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust im Schadensareal zu erhalten, wurde der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Schadensareal mit dem $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt innerhalb der Trachea bzw. des Processus mastoideus aufaddierter Datensätze verglichen. Dabei zeigte sich, dass der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Schadensareal nur ca. 10 % oberhalb des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehaltes zellarmer schleimhautausgekleideter luftgefüllter Kammern liegt.

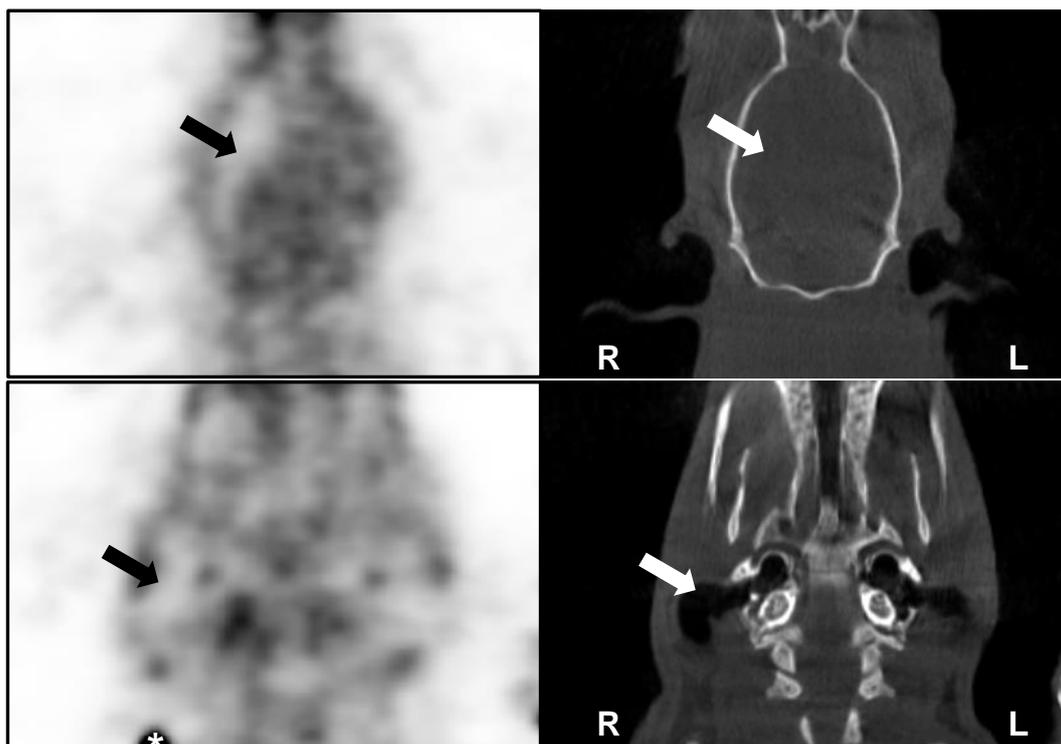


Abb. 27: 22 h nach MCAO entspricht der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im betroffenen Areal annähernd dem $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt in luftgefüllten Kammern.

Links sind jeweils $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT-Aufnahmen und rechts zur anatomischen Orientierung passende CT-Aufnahmen einer Ratte aus der horizontalen Ansicht dargestellt. Pfeile oben zeigen das kontrastreich abzugrenzende Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung und unten den $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Processus mastoideus. Das Sternchen im unteren linken Bild markiert einen Teil des JV-Katheters.

Die Größe und die Lage der betroffenen Areale ähneln den, unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen, mit der Tl^+ -Histochemie nachgewiesenen Schadensarealen (siehe [127]).

8.2 Das Areal reduzierten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts 20-22 h nach MCAO korrespondiert mit dem definitiven Schaden

Im direkten Vergleich mit Kresylviolett-gefärbten Hirnschnitten von Mäusen und Ratten und T_2w -MRT-Hirnaufnahmen der Ratte konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den definitiven Schadensarealen und den Arealen verminderten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts 20-22 h nach MCAO festgestellt werden. Dabei entsprach das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung annähernd dem Areal verminderter Nissl-Färbung und dem im T_2w -MRT hyperintens erscheinendem Areal (siehe Abb. 28).

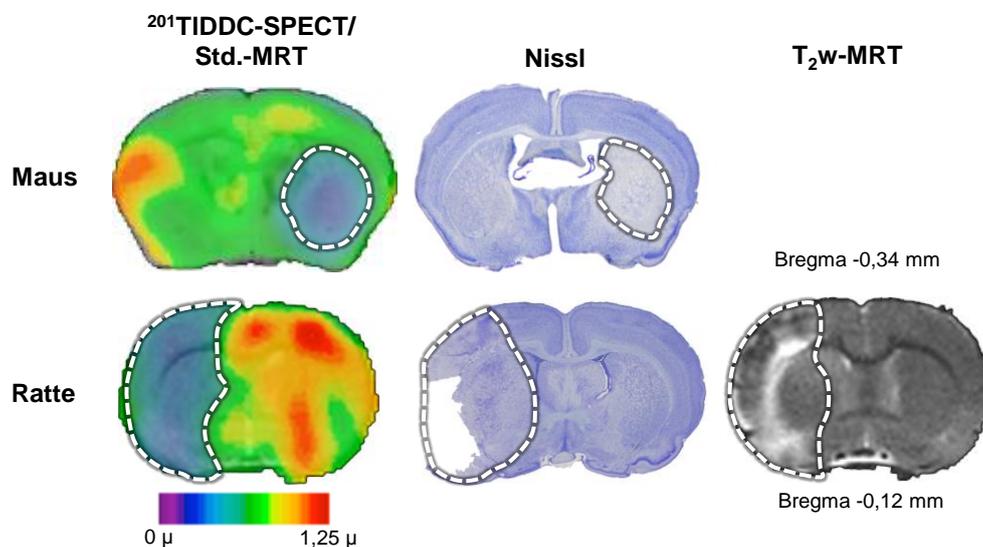


Abb. 28: 20-22 h nach MCAO stimmt das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung mit dem definitiven Schadensareal im Nissl-Schnitt und T_2w -MRT überein.

Die Abbildung zeigt exemplarisch an je einer Maus (oben) und einer Ratte (unten) der MCAO-Gruppe A die gute Übereinstimmung zwischen dem Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung (links) und den Arealen definitiven Schadens im Nissl-Schnitt (Mitte) und T_2w -MRT (rechts). Zur besseren anatomischen Orientierung sind die $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT Aufnahmen auf einem Std.-MRT überlagert dargestellt (SPECT farbkodiert 0-1,25fache des MW des Gesamthirns, MRT Grauskala). Die weißgestrichelten Linien zeigen jeweils das betroffene Areal.

Die im T_2w -MRT und in der Nissl-Färbung ermittelten Schadensareale wurden als Grundlage genommen, um im späten $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT einen Wert für die Abgrenzung irreversibel geschädigten Gewebes zu definieren, bei dem eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen dem lokalisierten Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung und dem zuvor konventionell bestimmten finalen Schadensareal (sowohl in Form als auch in Ausdehnung) erzielt werden konnte. Dieser Grenzwert wurde durch ein Annäherungsverfahren ermittelt und konnte bei einer Reduktion des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts auf der ipsilateralen Hemisphäre um 36,40 % gegenüber der kontralateralen Hemisphäre festgelegt werden. Dieser Grenzwert wurde im Nachgang als Grenzwert für eine irreversible Schädigung definiert.

Die nachstehende Abb. 29 zeigt in diesem Kontext eine Gegenüberstellung der mit Hilfe dieses Grenzwertes ermittelten Schadensregionen im $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT-Bild und der an denselben Versuchsträgern in Nissl-Schnitten sowie in T_2w -MRT-Analysen bestimmten Infarktvolumina. Dabei beschreiben die blau aufgetragenen Punkte die jeweils im Einzeltier gemessenen Infarktvolumina. Boxplotspezifisch sind weiterhin die unteren (25 %) und oberen (75 %) Quartile sowie die entsprechenden Mediane aufgetragen (schwarze horizontale Grenzlinien). Die rot markierten Sterne charakterisieren die Mittelwerte der ermittelten Infarktvolumina über alle Einzeltiere.

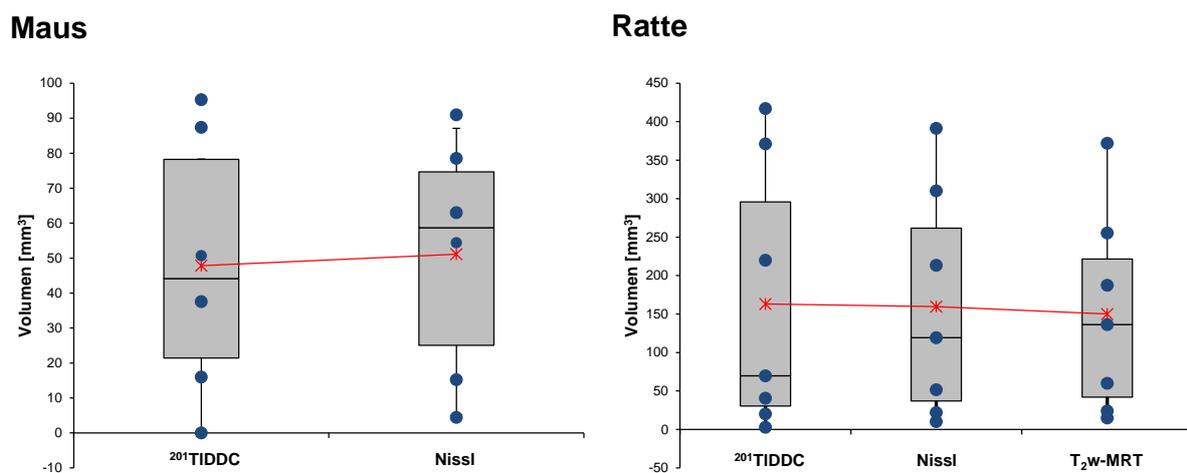


Abb. 29: Ermittelte Infarktvolumina im $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT und Nissl-gefärbten Schnittpräparaten bzw. T_2w -MRT 20-22 h nach MCAO in Mäusen und Ratten zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen den Methoden.

In Auswertung der aufgenommenen Werte ist festzuhalten, dass die mittleren Infarktvolumina \pm STABW in Mäusen für die verschiedenen Detektionsverfahren wie folgt angegeben werden können: $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT $47,83 \pm 38,03 \text{ mm}^3$; Nissl $51,11 \pm 34,52 \text{ mm}^3$.

In Ratten wurden diese mit: $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT $163,13 \pm 173,64 \text{ mm}^3$; Nissl $159,78 \pm 149,31 \text{ mm}^3$ und T_2w -MRT $150,10 \pm 131,74 \text{ mm}^3$ bestimmt.

Bei Betrachtung beider Boxplots fällt die gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Messmethoden auf, wobei kleinere Abweichungen bei größeren Infarkten zu finden waren.

In Summe konnte, unter Berücksichtigung der in Abb. 30 gezeigten Bland-Altman Diagramme schließlich die zuvor gezeigte Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Färbemethoden bestätigt werden, woraufhin die Messung der späten $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung als sehr gut geeignete Nachweismethode für die Detektion eines ischämischen Schadens eingestuft werden konnte.

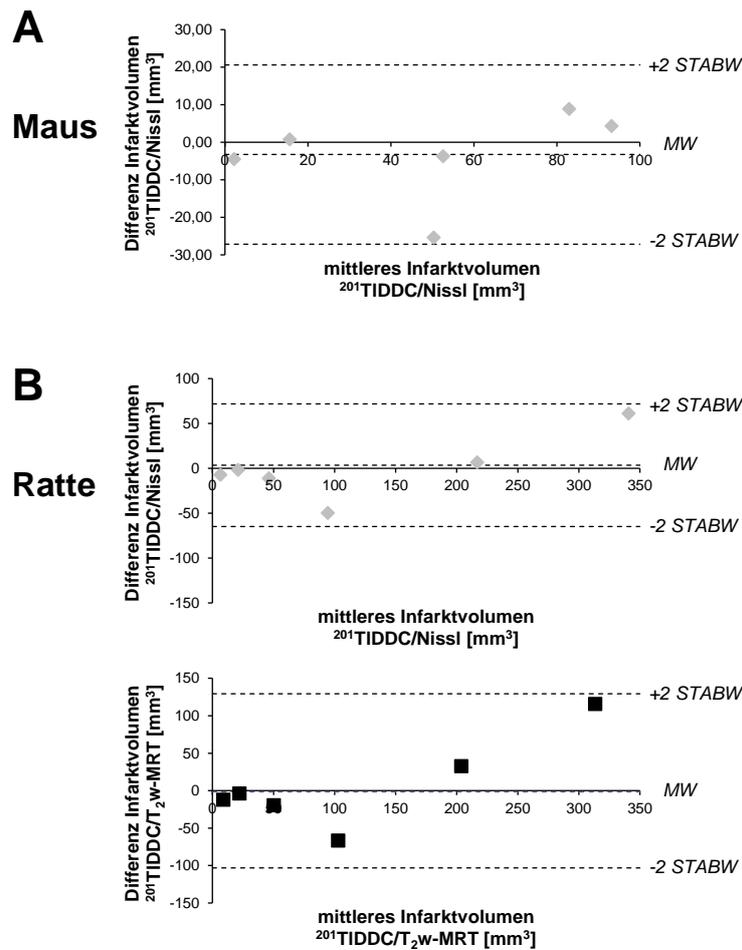


Abb. 30: Bland-Altman Diagramme bestätigen gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Messmethoden $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT, Nissl und $\text{T}_2\text{w-MRT}$ in Mäusen und Ratten.

Darüber hinaus konnte eine auffällige Korrelation zwischen der finalen Schadensgröße und dem Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ aus dem mittleren Areal verminderter Perfusion (VOI-1) in Bezug zum gespiegelten Areal verminderter Perfusion (VOI-2) festgestellt werden. Demnach war der detektierte finale Schaden umso größer, je stärker der gemessene Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ war.

Der Pearson Korrelationskoeffizient für den Vergleich zwischen $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust und Schadensgröße im Nissl-Schnitt betrug in Mäusen 0,988 und in Ratten 0,977. Im Vergleich zwischen dem $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust und der Schadensgröße im $\text{T}_2\text{w-MRT}$ in Ratten betrug dieser 0,924.

Im Sinne einer zusammenfassenden Übersicht veranschaulicht die folgende Abb. 31 die Beziehung zwischen dem Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ aus VOI-1 in Bezug zu VOI-2 und der finalen Schadensgröße sowohl für Mäuse als auch für Ratten.

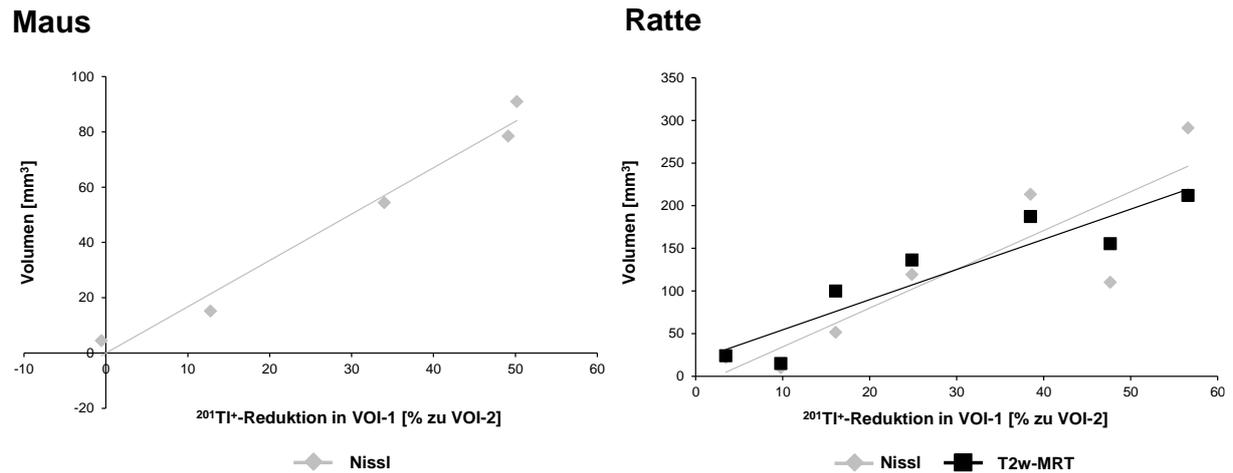


Abb. 31: Der späte $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust aus dem minderperfundierten Areal korreliert mit der finalen Schadensgröße.

Die Abbildung zeigt den Zusammenhang zwischen dem späten Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus VOI-1 (gegenüber VOI-2) und der finalen Schadensgröße für Mäuse (links) und Ratten (rechts).

In scheinoperierten Mäusen und Ratten der Kontrollgruppen konnte weder im Nissl-Schnitt noch im T₂w-MRT-Bild Auffälligkeiten beobachtet werden. Zudem wurde eine leichte Erhöhung des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehaltes in der VOI-1 gegenüber der VOI-2 gemessen (in Mäusen um $3,08 \pm 1,69$ % und in Ratten um $3,84 \pm 3,63$ %), welche in Mäusen statistisch signifikant war ($p = 4,16 \times 10^{-2}$).

8.3 Es gibt einen Mismatch zwischen dem Areal verminderter Perfusion und den frühen Arealen reduzierten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts

Die Messung des regionalen zerebralen Blutflusses mit $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -SPECT diente der Detektion der aufgrund der Minderperfusion potenziell vom ischämischen Schaden betroffenen Hirnregionen. Das von der Blutflussreduktion betroffene Areal erstreckte sich in allen Tieren erwartungsgemäß über das Stromgebiet der MCA, d. h. über das Corpus striatum, den Globus pallidus und weite Teile des zerebralen Kortex.

Die folgende Abb. 32 zeigt das mittlere (VOI-1, rote durchgezogene Linie) sowie das gespiegelte mittlere Areal verminderter Perfusion (VOI-2, rote gestrichelte Linie) in aufaddierten und intensitäts-normalisierten $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -SPECT-Aufnahmen von Mäusen (A) und Ratten (C).

Das mittlere Areal verminderter Perfusion konnte in Mäusen mit einer Gesamtgröße von $87,2 \text{ mm}^3$, was ca. 18,53 % des gesamten Hirnvolumens entspricht und in Ratten mit $216,5 \text{ mm}^3$, entsprechend 9,24 %, bestimmt werden. Dabei war der $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -Gehalt sowohl in Mäusen als auch in Ratten der MCAO-Gruppen zum Messzeitpunkt signifikant reduziert (siehe Abb. 32 B & D).

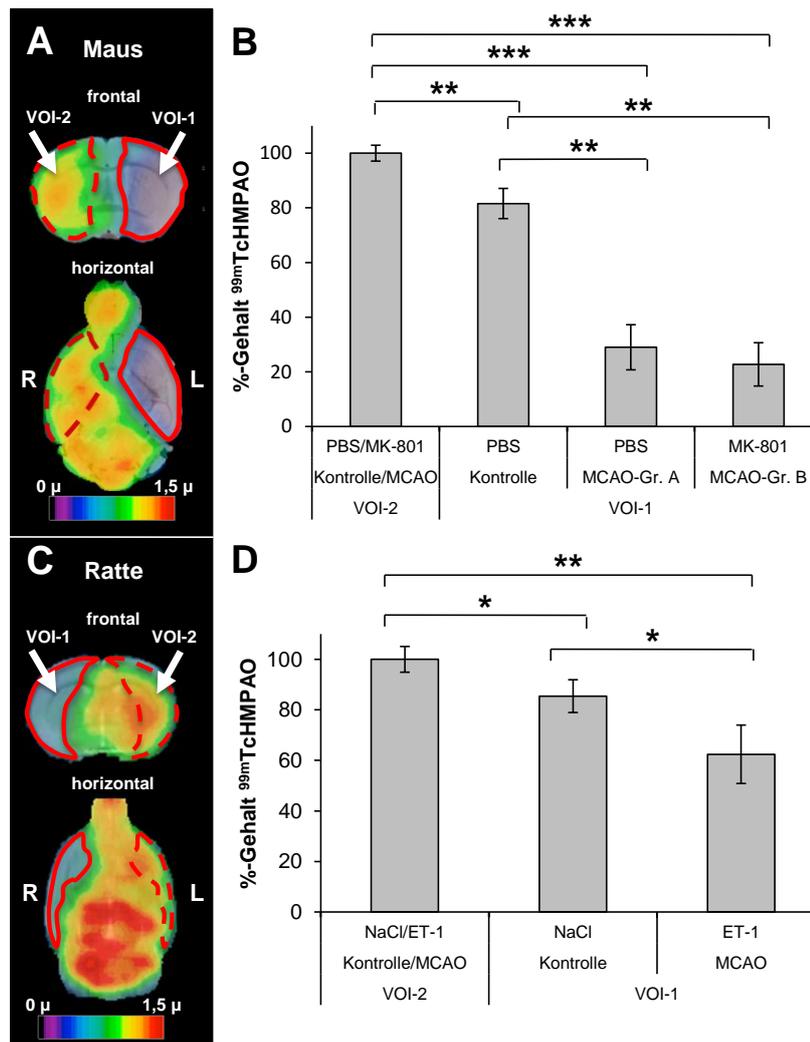


Abb. 32: Perfusionsminderung im $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -SPECT.

Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Perfusionsminderungen im $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -SPECT zum Zeitpunkt der Fadenimplantation in Mäusen (A-B) und zum Zeitpunkt der graduellen Reperfusion in Ratten (C-D). Intensitätsnormalisierte $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -SPECT Hirn-Datensätze einzelner Individuen ($n = 11$ Mäuse und 10 Ratten) wurden aufaddiert und auf ein Referenz-MRT überlagert (SPECT farbkodiert 0 - 1,5fache des Mittelwerts der kontralateralen Hemisphäre, MRT Grauskala (A & C)). Rot umrandet ist das mittlere Areal verminderter Perfusion (VOI-1) und rot gestrichelt das gespiegelte Areal verminderter Perfusion (VOI-2). Darstellungsebenen: frontal: Bregma 0,14 mm (Maus), Bregma -0,12 mm (Ratte), horizontal: Bregma -2,36 mm (Maus), Bregma -5,60 mm (Ratte). B & D zeigen vergleichend den relativen $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Gehalt in VOI-1 gegenüber VOI-2, normalisiert auf den mittleren $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Gehalt über alle experimentellen Gruppen in VOI-2 gleich 100 %. (* $p < 5 \cdot 10^{-3}$, ** $p < 5 \cdot 10^{-6}$, *** $p < 5 \cdot 10^{-18}$, Fehlerbalken zeigen STABW)

In Mäusen, deren Perfusion zum Zeitpunkt der Fadenimplantation bestimmt wurde (d. h. zum Zeitpunkt der maximalen Blutflussreduktion), war die $^{99m}\text{TcHMAPO}$ -Anreicherung in der VOI-1 um ca. 75 % gegenüber der VOI-2 reduziert (Maus-MCAO-Gruppe A VOI-1 vs. VOI-2: $p = 2,68 \cdot 10^{-18}$, Reduktion um $71,01 \pm 8,25$ % (MW \pm STABW); Maus-MCAO-Gruppe B VOI-1 vs. VOI-2: $p = 1,92 \cdot 10^{-18}$, Reduktion um $77,27 \pm 7,92$ %). Der Mittelwertunterschied zwischen diesen beiden Gruppen war dabei nicht signifikant.

In scheinoperierten Kontrollmäusen führte die kurzzeitige Implantation und die durch den operativen Eingriff hervorgerufenen Nebenerscheinungen ebenfalls zu einer signifikant verringerten Anreicherung von $^{99m}\text{TcHMPAO}$ in der VOI-1 in Bezug zur VOI-2, welche jedoch geringer ausgeprägt war, als in den Mäusen der MCAO-Gruppen (Kontrollgruppe VOI-1 vs. VOI-2 Verringerung um $18,41 \pm 5,52 \%$, $p = 5,82 \times 10^{-9}$).

In Ratten wurde das Ausmaß der Minderperfusion erst zum Zeitpunkt der graduell einsetzenden Perfusion gemessen. Aus diesem Grund, gleichzeitig aber auch, weil die gewählte ET-1 Konzentration während der Okklusion eine höhere Residualperfusion des betroffenen Gebietes ermöglichte, als bei Anwendung des Faden-Modells, war die verringerte Anreicherung von $^{99m}\text{TcHMPAO}$ in der entsprechenden VOI-1 zum Messzeitpunkt nicht so stark ausgeprägt, wie bei den zuvor betrachteten Maus-MCAO-Gruppen. Dennoch konnte auch hier eine signifikante Reduzierung des $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Gehaltes um $37,58 \pm 11,56 \%$ ($p = 1,86 \times 10^{-8}$) in der VOI-1 der MCAO-Gruppe A gegenüber der VOI-2 auf der kontralateralen Hemisphäre festgestellt werden.

Weiterhin konnte auch in scheinoperierten Kontrollratten eine signifikante Reduktion des $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Gehalts in der VOI-1 in Bezug zur VOI-2 beobachtet werden, welche jedoch weniger stark, als in den Ratten der MCAO-Gruppe A ausgeprägt war (Kontrollgruppe VOI-1 vs. VOI-2 Verringerung um $14,55 \pm 6,48 \%$, $p = 1,67 \times 10^{-4}$).

Vergleicht man das Areal verminderter $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Anreicherung (siehe Abb. 33 links) mit dem Areal reduzierten $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalts ca. 1 h nach der Reperfusion in Mäusen bzw. Ratten (siehe Abb. 33 Mitte) fällt auf, dass das Areal verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung deutlich kleiner ist, als der minderperfundierte Bereich. In Mäusen der MCAO-Gruppe A entsprach das Areal verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung im Mittel $29,34 \%$ ($\%^{201}\text{TI}^+$ -Reduktion in VOI-1 gegenüber VOI-2 betrug $1,72 \%$, $p = 0,45$) des Areals verminderter Perfusion und in Ratten der MCAO-Gruppe A lediglich im Mittel $12,58 \%$ ($\%^{201}\text{TI}^+$ -Reduktion in VOI-1 gegenüber VOI-2 betrug $1,17 \%$, $p = 0,66$). 22 h nach der Reperfusion hingegen hatte sich sowohl in Mäusen als auch in Ratten das Areal verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung vergrößert (siehe Abb. 33 rechts), war aber immer noch kleiner, als das zuvor gemessene Areal verminderter Perfusion und entsprach in Mäusen $44,86 \%$ ($\%^{201}\text{TI}^+$ -Reduktion in VOI-1 gegenüber VOI-2 betrug $28,68 \%$, $p = 0,015^*$) und in Ratten $68,76 \%$ ($\%^{201}\text{TI}^+$ -Reduktion in VOI-1 gegenüber VOI-2 betrug $26,00 \%$, $p = 0,007^*$) des minderperfundierte Bereiches. Neben einer Vergrößerung des Areals verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung konnte ebenfalls ein erhöhter $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust aus dem minderperfundierte Areal zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden.

Damit war das final gemessene Schadensareal sowohl nach Anwendung des Faden-Modells als auch nach ET-1 Injektion kleiner, als das Areal verminderter $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Anreicherung zum Zeitpunkt der Okklusion (in Mäusen) bzw. zum Zeitpunkt der graduellen Reperfusion (in Ratten).

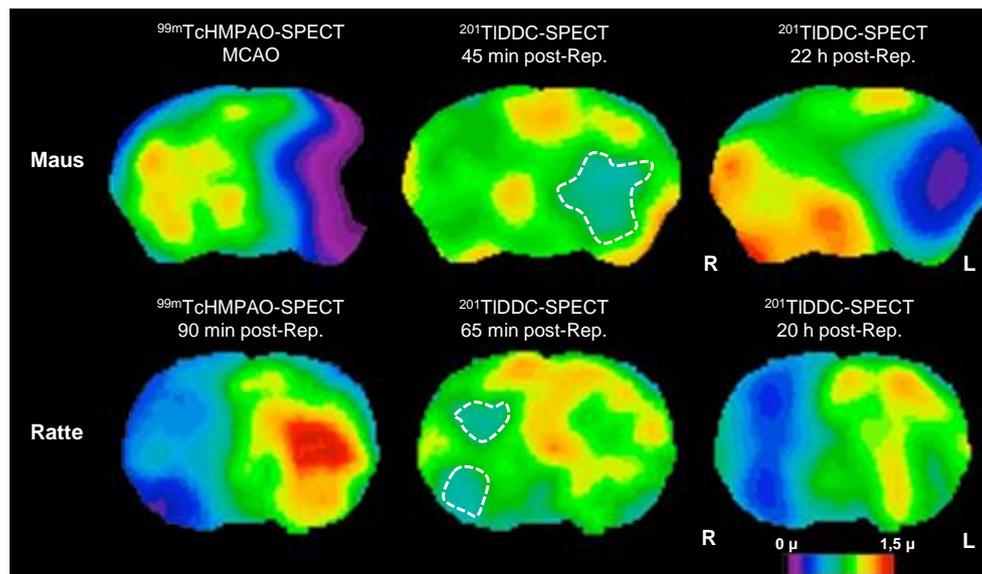


Abb. 33: Mismatch zwischen dem Areal verminderter Perfusion und dem frühen Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung.

Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen der $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ - und einer frühen und der späten $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT Messung exemplarisch in einer Maus und einer Ratte. In Mäusen wurde das $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -SPECT zum Zeitpunkt der Fadenimplantation durchgeführt und in Ratten 90 min nach der Reperfusion. Die dargestellte frühe $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT Messung wurden ca. 1 h und die späte 20 bzw. 22 h nach der Reperfusion aufgenommen. Areale verminderten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts sind im frühen $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT aus Kontrastgründen eingerahmt.

8.4 Dynamik des $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes aus dem Areal verminderter Perfusion

Um den fortschreitenden Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem minderperfundierten Areal während der Akut- bzw. Subakutphase der Ischämie zu visualisieren und nachzuverfolgen, wurden im Anschluss an eine einmalige $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion und die MCAO kontinuierlich über einen Zeitraum von bis zu 5 h nach Einsetzen der Reperfusion dynamische $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT-Messungen von 10-15 minütiger Dauer durchgeführt (im Detail: in Mäusen 20 Messungen à 15 min im Anschluss an die Reperfusion, in Ratten 4 Messungen à 10-15 min während der Okklusion und 16 Messungen à 10-15 min nach der $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -Injektion).

Dabei konnte sowohl in Mäusen als auch in Ratten der MCAO-Gruppen ein kontinuierlich ansteigender $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust aus dem Areal verminderter Perfusion und eine komplexe Ausbreitungsdynamik der betroffenen Bereiche beobachtet werden.

Die nachstehenden Abbildungen zeigen sämtliche SPECT-Aufnahmen, entsprechend der Reihenfolge, in der sie erstellt wurden. Angegeben sind die jeweils zugehörigen Aufnahmezeitpunkte in Bezug zur MCAO bzw. zur Reperfusion (Rep.) exemplarisch für eine Maus (siehe Abb. 34) und eine Ratte (siehe Abb. 35) der MCAO-Gruppen A.

Bereits während der Okklusion und kurz nach der Reperfusion der MCA kam es zu einer leichten Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt innerhalb des Areals verminderter Perfusion, welche jedoch in Bezug zur kontralateralen Hemisphäre nicht signifikant war. Die unmittelbar von der $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion betroffenen Bereiche waren, wie bereits im Kapitel 8.3 beschrieben, deutlich kleiner als das von der Minderperfusion betroffene Areal und erstreckten sich zunächst ausschließlich über Teile des Corpus striatum. Im Fortgang der weiteren Messungen breitete sich das Areal bis in Teile des zerebralen Kortex aus (ab ca. 60 min nach der Reperfusion).

Während der Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus den betroffenen Arealen leicht aber kontinuierlich anstieg, unterlagen die betroffenen Areale Volumenschwankungen, wobei es entgegen den Erwartungen nicht zu einer kontinuierlichen Ausdehnung der Areale kam, sondern oftmals auch zu deren Verkleinerung, was wiederum mit einem Wiederanstieg des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts in zuvor reduzierten Bereichen einherging. Diese Anstiege im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt ließen sich ausschließlich im Randbereich der Areale verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung beobachten.

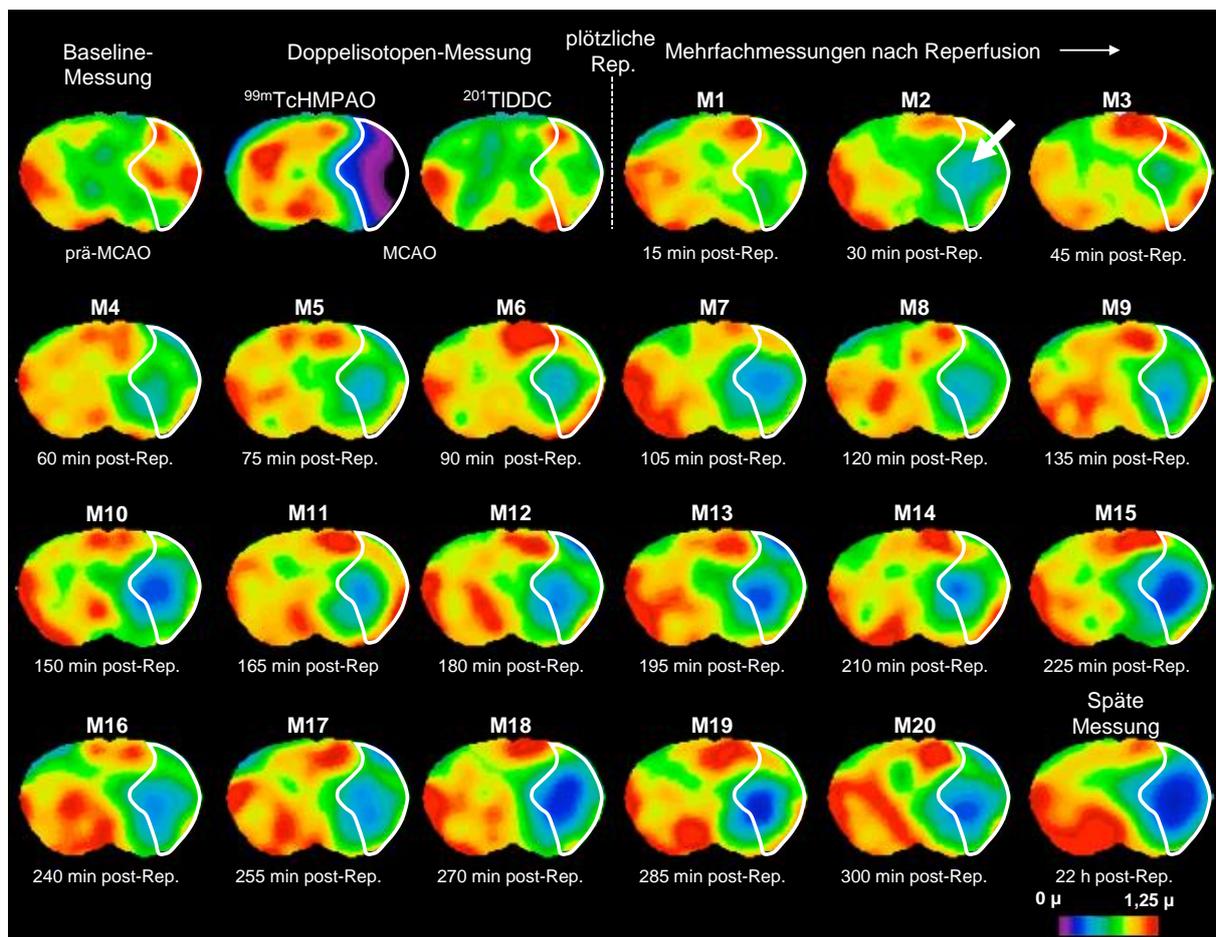


Abb. 34: Kontinuierlicher $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust und komplexe Dynamik während der Schadensausbreitung in der Maus.

Die Abbildung zeigt sämtliche $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT-Messungen einer Maus der MCAO-Gruppe A aus der frontalen Ansicht (Farbskala 0-1,25 fache der Mittelwertintensität des Gesamthirns, Bregma 0,14 mm). Weiß umrandet ist jeweils das Areal verminderter Perfusion, gemessen während der Fadenimplantation. Der Pfeil zeigt exemplarisch das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung. M: Messung, Rep.: Reperfusion.

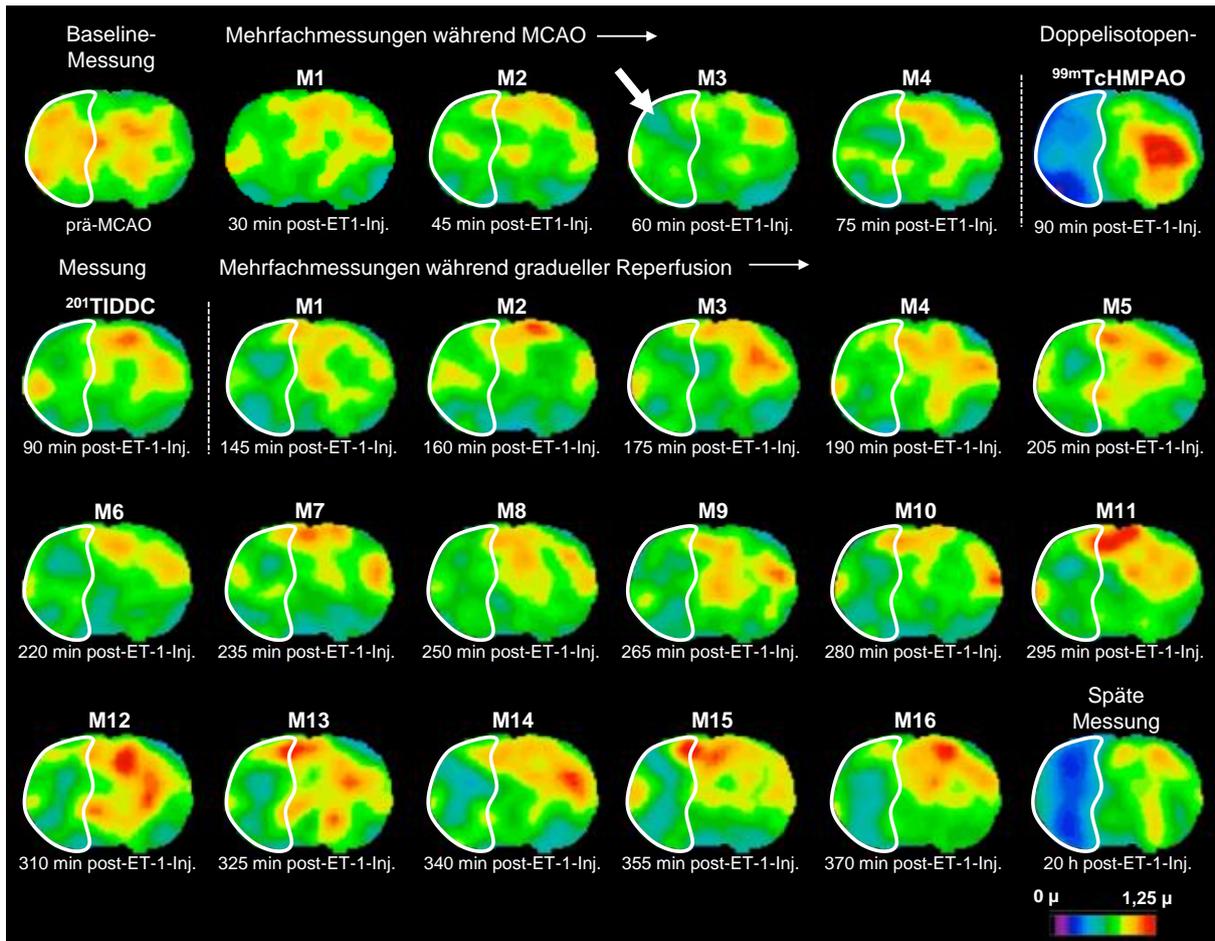


Abb. 35: Kontinuierlicher $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust und komplexe Dynamik während der Schadensausbreitung in der Ratte.

Die Abbildung zeigt sämtliche $^{201}\text{TlDDC}$ SPECT-Messungen einer Ratte der MCAO-Gruppe A aus der frontalen Ansicht (Farbskala 0-1,5 fache der Mittelwertintensität des Gesamthirns, Bregma - 0,12 mm). Weiß umrandet ist jeweils das Areal verminderter Perfusion, gemessen 90 min nach ET-1 Injektion. Der Pfeil zeigt exemplarisch das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung. M: Messung, Rep.: Reperfusion.

In analoger Weise lassen sich die zuvor beschriebenen Resultate auch in über die Population gemittelten SPECT Messungen der Maus MCAO-Gruppe A reproduzieren (siehe Abb. 36).

Auch anhand dieser Daten lässt sich ein kontinuierlicher Verlust des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts im Areal verminderter Perfusion und eine durch Schwankungen im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Randbereich charakterisierte Ausbreitung des betroffenen Bereiches vom Striatum in den Kortex beobachten.

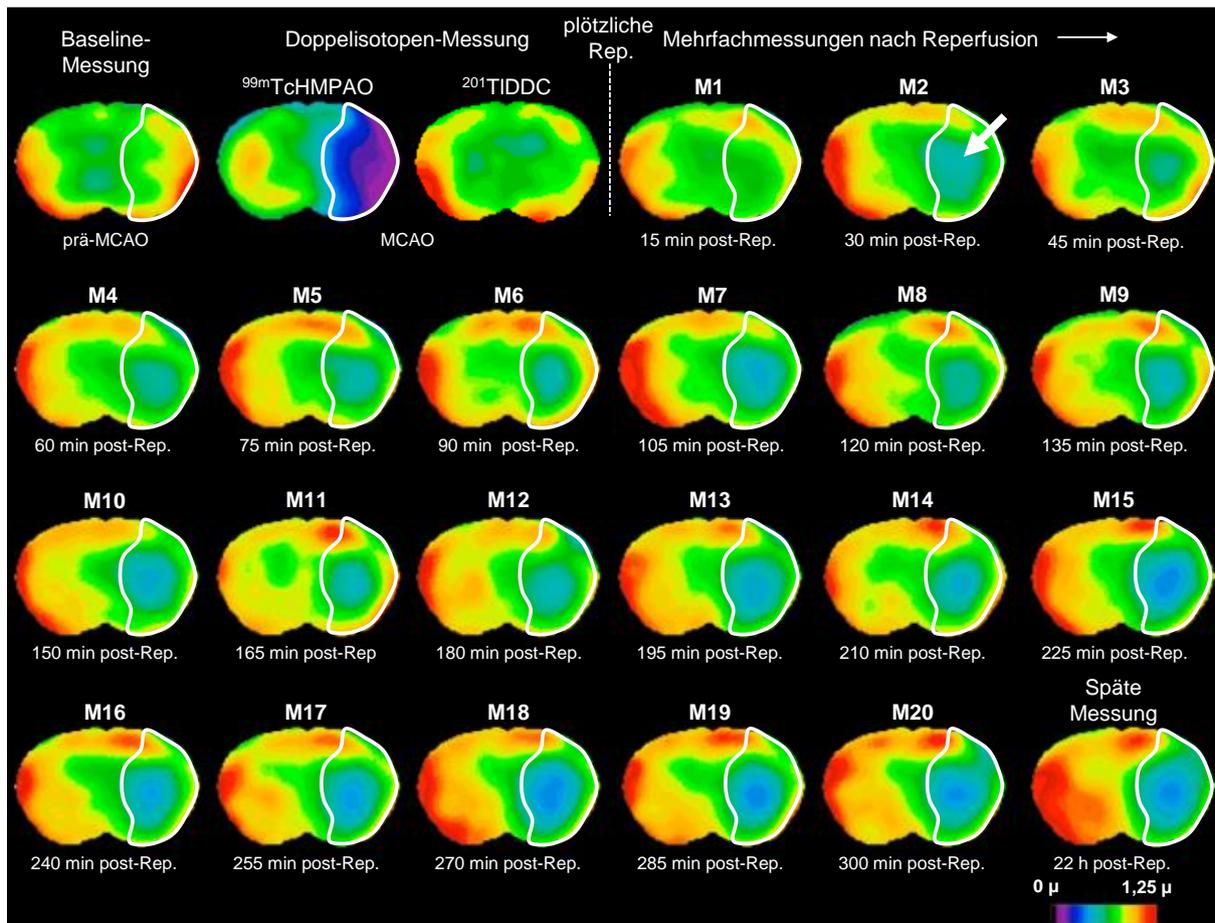


Abb. 36: Kontinuierlicher $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust und komplexe Dynamik während der Schadensausbreitung in über die Population gemittelten SPECT Messungen der Maus MCAO-Gruppe A.

Die Abbildung zeigt über 6 Tiere gemittelte farbkodierte SPECT-Aufnahmen (Skalierung: 0-1,25 fache der MW-Intensität des Gesamthirns) von Mäusen der MCAO-Gruppe A aus der frontalen Ansicht (Bregma 0,14 mm). Weiß umrandet ist jeweils das Areal verminderter Perfusion, gemessen während der Fadenimplantation. Der Pfeil zeigt exemplarisch das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung. M: Messung, Rep.: Reperfusion.

Unter Anwendung des zuvor bestimmten Grenzwertes für eine irreversible Gewebsschädigung (vgl. Kapitel 8.2) wurde das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung und der jeweilige $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt in diesem Areal in jeder Einzelmessung der über die Population gemittelten SPECT Messungen bestimmt. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden zur Veranschaulichung in Abb. 37 zusammengefasst. Dabei zeigen die dargestellten Diagramme zum einen die prozentuale Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Schadensareal im Bezug zur kontralateralen Hemisphäre (A) und zum anderen die Schwankungen im Volumen dieser Areale über die Zeit (B+C).

Während (B) die absoluten Volumenänderungen entnommen werden können, sind diese in (C) in Bezug zur Vormessung dargestellt.

Neben der kontinuierlich ansteigenden $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion im Schadensareal lassen sich ebenfalls wellenartige Schwankungen im Volumen der Schadensareale über den gesamten Messzeitraum beobachten, wobei diese Schwankungen kurz nach der Reperfusion besonders stark auftraten.

Zusätzlich lässt sich durch die Bestimmung der Areale verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung konstatieren, dass das Wachstum des von der $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion betroffenen Bereiches 5 h nach der Reperfusion ganz oder nahezu abgeschlossen war. Im Zeitraum von 5 bis 22 h nach der Reperfusion ist (im Mittel über alle Mäuse der MCAO-Gruppe A) ein Anwachsen des betroffenen Bereiches um lediglich $3,00 \text{ mm}^3$ festzustellen. Das finale Schadensareal hat zu diesem Zeitpunkt im Mittel eine Größe von $41,90 \text{ mm}^3$.

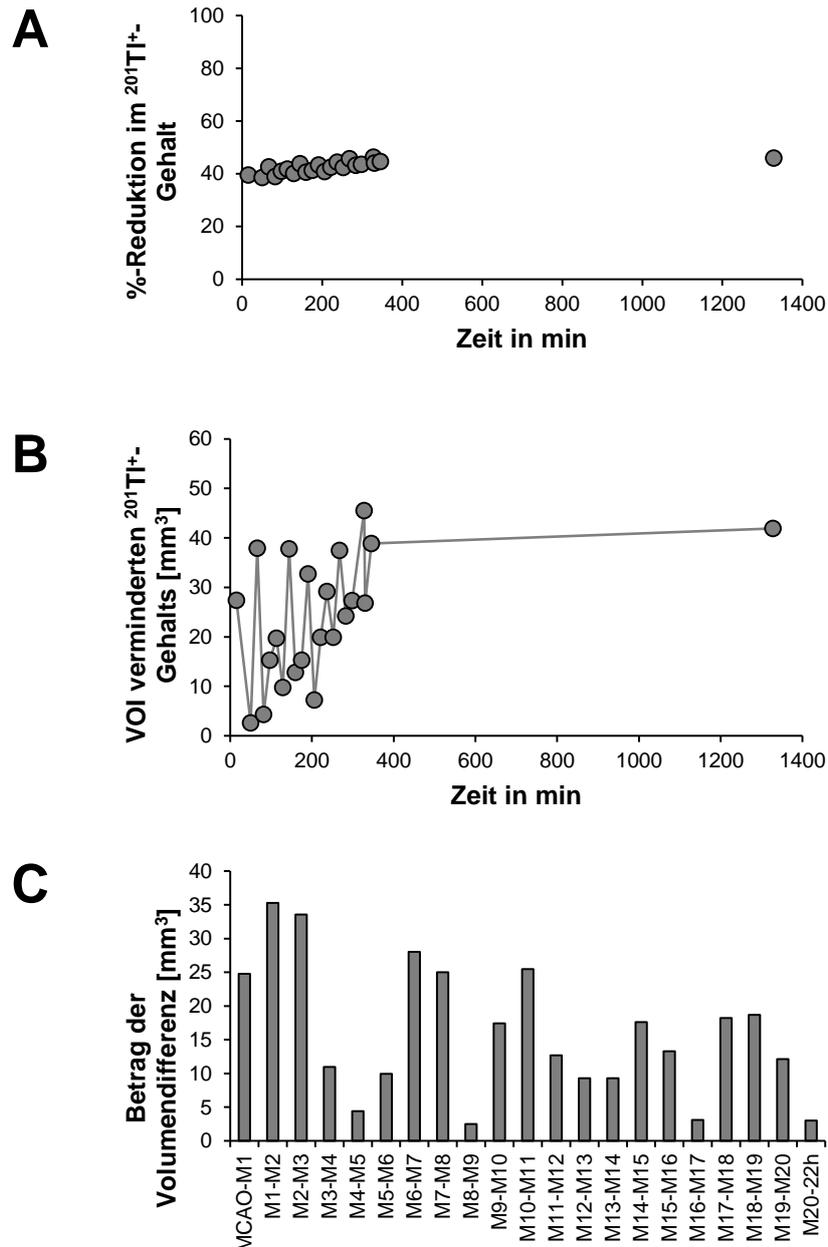


Abb. 37: Kinetik des mittleren $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlusts aus dem Schadensareal.

(A) zeigt die %-Reduktion des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts im von der $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion betroffenem Areal gegenüber der kontralateralen Hemisphäre zum jeweiligen Messzeitpunkt, gemessen ab dem Zeitpunkt der MCAO. (B) zeigt die gemessenen Volumina der betroffenen Areale und (C) die Beträge der Volumendifferenzen dieser Areale zwischen aufeinanderfolgenden Messungen.

In scheinoperierten Kontrolltieren (siehe Abb. 38) kommt es ebenfalls bereits zum Zeitpunkt der Okklusion zu einer Verringerung des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehaltes im Stromgebiet der MCA, wobei diese Reduktion zum Zeitpunkt der Messung 2 (M2, 30 min post-Rep.) besonders deutlich ausgeprägt ist ($^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion in VOI-1 gegenüber VOI-2 betrug 4,97 %, $p = 0,41$).

Damit ist die Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Areal verminderter Perfusion (bestimmt in MCAO-Tieren) früh nach der Okklusion in Kontrolltieren und MCAO-Tieren vergleichbar. Über den Messverlauf ist jedoch sichtbar, dass die Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt in Kontrolltieren reversibel ist und nicht weiter ansteigt. 22 h nach der Reperfusion lässt sich sogar ein Anstieg im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im vermeintlichen Areal verminderter Perfusion (weiß umrandet) um $3,08 \pm 1,69$ % im Vergleich zur Gegenseite beobachten ($p = 4,16 \times 10^{-2*}$). Die bei MCAO-Tieren beschriebenen Schwankungen des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehaltes lassen sich ebenfalls beobachten, sind aber schwächer ausgeprägt und lassen sich vermutlich auf normale Umverteilungskinetiken zurückführen (siehe dazu [119]).

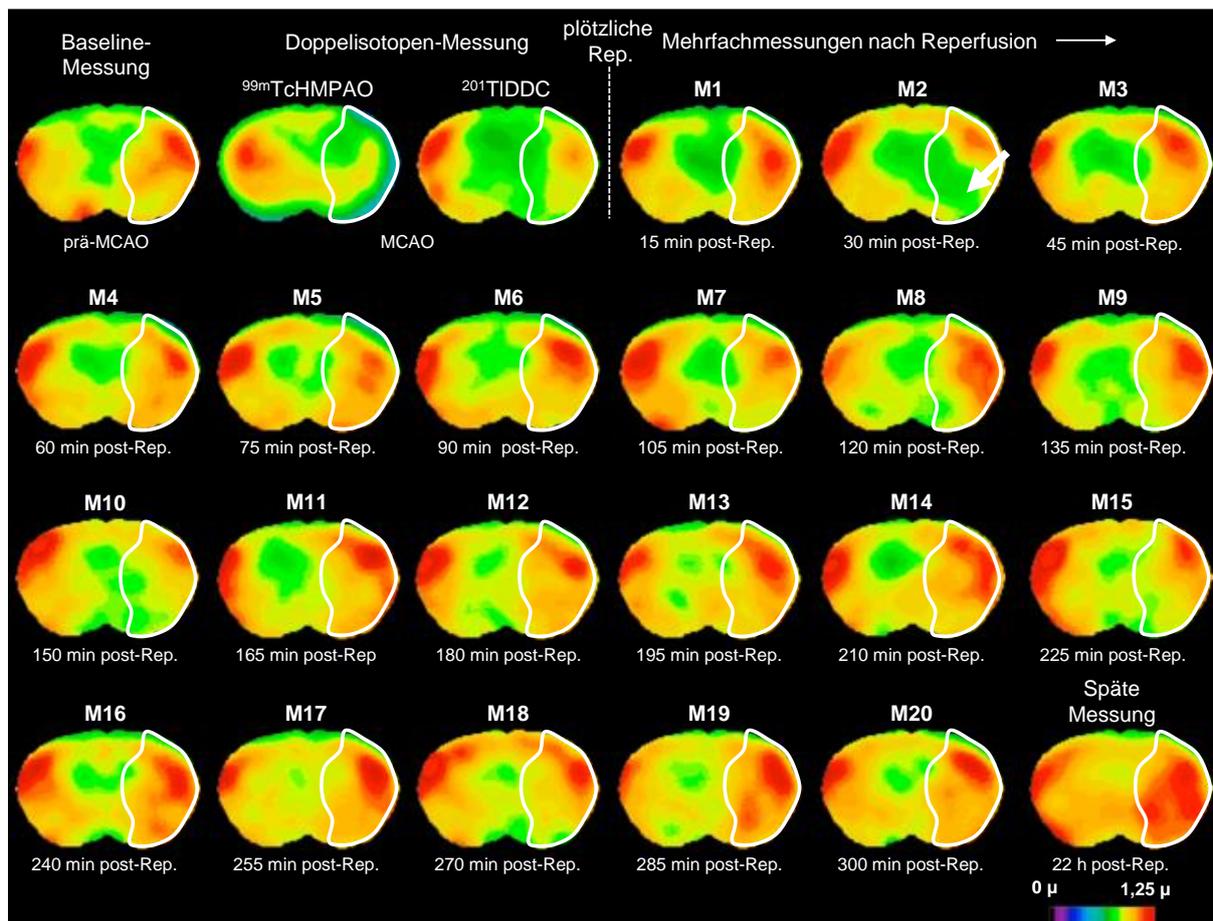


Abb. 38: Anfänglicher $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust im Areal verminderter Perfusion ist reversibel in Kontrollmäusen. Die Abbildung zeigt über 5 Tiere gemittelte farbkodierte $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT-Aufnahmen (Skalierung: 0-1,25 fache der MW-Intensität des Gesamthirns) von Mäusen der Kontrollgruppe aus der frontalen Ansicht (Bregma 0,14 mm). Weiß umrandet ist jeweils das vermeintliche Areal verminderter Perfusion, gemessen während der Fadenimplantation in Mäusen der MCAO-Gruppen. Der Pfeil zeigt die Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt zum Zeitpunkt der Messung 2. M: Messung, Rep.: Reperfusion.

8.5 Die $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetik unterscheidet sich im Infarktkern und seinen Randbereichen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob sich der Infarktkern und die Penumbra in ihrer $^{201}\text{Tl}^+$ -Kinetik unterscheiden, bzw. um zu prüfen, ob anhand der $^{201}\text{Tl}^+$ -Kinetik Infarktkern und Penumbra unterschieden werden können, wurde der Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ voxelweise bestimmt. Im Bestreben, eine geeignete Funktion abzuleiten, die eine Anpassung der zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalte ermöglicht, wurde zunächst die $^{201}\text{Tl}^+$ -Gesamthirnkinetik in allen Versuchsgruppen analysiert.

In diesem Zusammenhang zeigt die folgende Abb. 39 die Veränderung der $^{201}\text{Tl}^+$ -Mittelwertintensitäten über die gesamte Messdauer für das Hirn als Ganzes, in den verschiedenen experimentellen Gruppen für die Versuchsgruppe Maus (A) und Ratte (B). Die aufgetragenen Daten wurden hierbei allesamt auf die MW-Intensität des Gesamthirns der prä-ischämischen Messung (MW=1000) normalisiert, wobei der dafür benötigte Normalisierungsfaktor auf alle Zeitschritte angewandt wurde. Weiterhin ist anzumerken, dass die Intensitätswerte gemäß (Gl. 2) zerfallskorrigiert wurden.

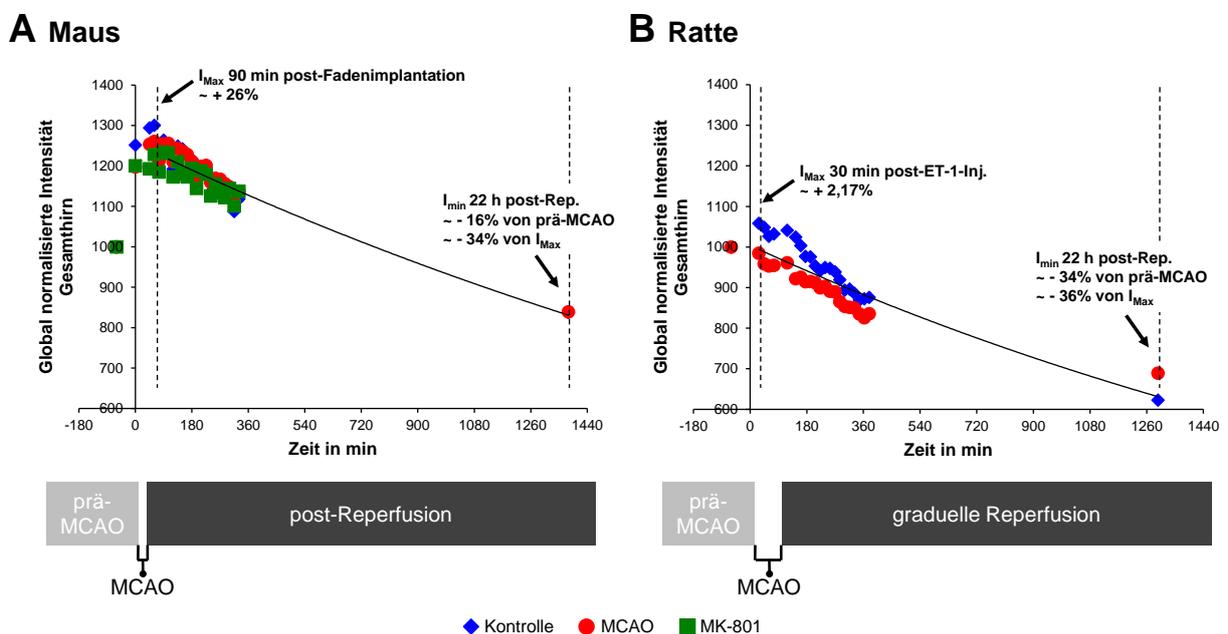


Abb. 39: $^{201}\text{Tl}^+$ -Aktivitätskurven nach einmaliger $^{201}\text{Tl}^+$ -Injektion für die einzelnen experimentellen Gruppen getrennt für die Versuchsgruppen Maus (A) und Ratte (B).

Die aufgetragenen Datenpunkte zeigen auf die Baseline-Messung normalisierte Ganzhirnintensitäten in Abhängigkeit der Zeit nach Injektion. SPECT-Daten sind zerfallskorrigiert. 0 min entspricht Start der MCAO. In schwarz ist die mittlere $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkurve als Exponentialfunktion über alle experimentellen Gruppen dargestellt. Die gestrichelte Linie links zeigt den Zeitpunkt der Maximalintensität (I_{Max}) und die gestrichelte Linie rechts den Zeitpunkt der Minimalintensität (I_{Min}).

In Auswertung der Datenpunkte unterscheiden sich die $^{201}\text{TI}^+$ -Gesamthirn-Aktivitätskurven zwischen den verschiedenen Maus- und Rattenuntergruppen nur marginal.

Deutlich erkennbar ist hingegen, dass nach der Injektion zunächst ein Anstieg der Gesamthirnaktivität beobachtet werden kann, der in den Tieren der Mausgruppen stärker ausgeprägt ist (Anstieg um ca. 26 % zur initialen Gesamthirnaktivität) und auch länger andauert (bis ca. 150 min nach der $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion, bzw. ca. 90 min nach der Faden-Implantation), als in Ratten (Anstieg um ca. 2,17 % zur initialen Gesamthirnaktivität, Anstiegsdauer bis 90 min nach der $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion, bzw. ca. 30 min nach der ET-1-Injektion).

Dies könnte auf die höhere DDC-Konzentration pro Körpergewicht, welche den Mäusen durch die $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion verabreicht wurde, zurückzuführen sein. Eine erhöhte DDC-Konzentration im Blutpool könnte einen Transport von $^{201}\text{TI}^+$ -Ionen in das Hirn über einen längeren Zeitraum ermöglichen. Quantifizieren lässt sich die initiale $^{201}\text{TI}^+$ -Hirnaufnahmerate in Mäusen im Mittel mit $1,24 \pm 0,26$ % und in Ratten mit $1,99 \pm 0,49$ % der injizierten $^{201}\text{TI}^+$ -Dosis (\pm STABW).

Nach dem Erreichen der maximalen Gesamthirnaktivität (I_{MAX}) konnte in beiden Versuchsgruppen eine kontinuierliche Reduktion des $^{201}\text{TI}^+$ -Gesamthirngehalts nachgewiesen werden, wobei der detektierte kontinuierliche Abfall des $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalts einer Kinetik 1ter Ordnung ähnelt (siehe mittlere $^{201}\text{TI}^+$ -Verlusthirnkurve in schwarz über alle Gruppen für die Maus $R^2 = 0,96$ und für die Ratte $R^2 = 0,94$).

Durch die entsprechende Überlagerung einer mittleren Exponentialfunktion über die ab dem Zeitpunkt I_{MAX} gemessenen Intensitäten des Gesamthirns konnte die Verringerung der Intensität pro Zeiteinheit in Mäusen und Ratten durch eine ähnliche Verlustkonstante charakterisiert werden, nach der sich die Intensität in Mäusen um $k_{\text{Maus}} = 0,0003/\text{min}$ bzw. in Ratten um $k_{\text{Ratte}} = 0,0004/\text{min}$ verringerte.

In einer weiterführenden Betrachtung beträgt die Reduktion des $^{201}\text{TI}^+$ -Gesamthirngehalts nach 20 – 22 h in Mäusen 16 % gegenüber der Baseline-Messung und 34 % in Bezug zu I_{MAX} .

In Ratten lässt sie sich mit 34 % gegenüber der Baseline-Messung bzw. 36 % in Bezug zu I_{MAX} beziffern (Daten sind zerfallskorrigiert).

In logischer Konsequenz dieser Ergebnisse wurde für die weitere Modellentwicklung in einer einfachen ersten Näherung angenommen, dass auch der $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust in einem einzelnen Hirnvoxel - unabhängig von der jeweiligen Lage des Voxels im Hirn bzgl. regionaler Unterschiede und schadensdynamischer Unterschiede - einer zeitlich konstanten Verlustrate folgend durch eine Kinetik 1ter Ordnung beschrieben werden kann.

Dieser Annahme folgend, wurden die Einzelvoxelintensitäten über den zeitlichen Verlauf an eine Exponentialfunktion angepasst. Im Sinne einer besseren Visualisierung und leicht verständlichen Darstellung wurden die so ermittelten voxelweisen Verlustkonstanten farbkodiert und entsprechend ihrer 3D-Koordinaten in einer Hirnkarte (siehe Abb. 40) dargestellt.

Dunkle Voxel markieren dabei einen stärkeren $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust über die Zeit; helle und rote Voxel zeigen hingegen einen geringeren zeitlichen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust.

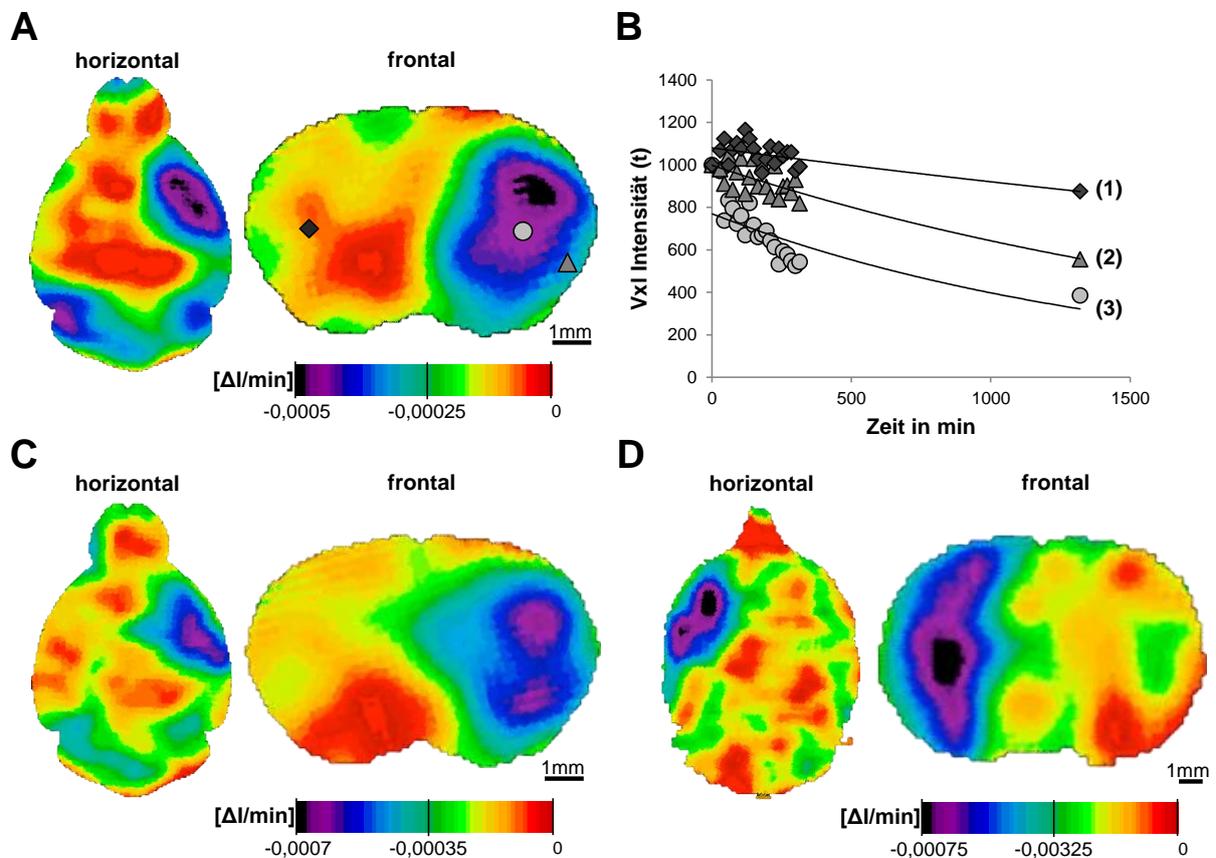


Abb. 40: $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetik unterscheidet sich innerhalb des Schadensareals und in Bezug zur kontralateralen Hemisphäre.

Die Abbildung zeigt den $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust für jeden Voxel, gemessen ab dem Zeitpunkt der MCAO bis 22 h nach der Reperfusion [Änderung der Intensität (ΔI) pro Zeiteinheit (min)] in über die Population gemittelten Daten der Maus MCAO-Gruppe A (A) und je einem Einzeltier der Maus (C) und Ratten MCAO-Gruppe A (D). Die verwendeten Farbskalen wurden für die einzelnen Darstellungen so gewählt, dass Unterschiede bzgl. der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstanten innerhalb der jeweiligen Schadensareale deutlich werden. Sie unterscheiden sich daher ein wenig von Fall zu Fall. Die Messbalken entsprechen jeweils 1 mm. Als Darstellungsebene wurde für frontale Aufnahmen von Mäusen Bregma 0,14 mm und Ratten Bregma -0,12 mm; sowie für horizontale Aufnahmen von Mäusen Bregma -2,36 mm und Ratten Bregma -5,60 mm gewählt. (B) zeigt exemplarisch den $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust über die Zeit für 3 ausgewählte Voxel, die in (A) gekennzeichnet sind (1 - kontralaterale Hemisphäre, 2 - Randgebiet des Schadensareals, 3 - Zentrum des Schadensareals).

Bei näherer Betrachtung der in den Kinetikkarten visualisierten $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustraten innerhalb der MCAO-Gruppe A ist sowohl in den Gruppenanalysen (Abb. 40 A) als auch in Einzeltieranalysen für Maus (Abb. 40 C) und Ratte (Abb. 40 D) ein stark erhöhter Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ auf der ipsilateralen Hemisphäre gegenüber der kontralateralen Hemisphäre (Verlust um das 2-3fache erhöht) zu bemerken.

Auch bei einer separaten Betrachtung des Schadensareals zeigt sich ein heterogenes Bild der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstanten.

Dabei ist das Schadensareal durch dunkel erscheinende, also höheren $^{201}\text{TI}^+$ -Verlusten entsprechende zentrale Areale charakterisiert, die wiederum durch hellere und somit geringeren Verlusten entsprechende Voxel umrandet werden.

In aufaddierten Datensätzen hat das Areal im Zentrum (siehe Abb. 40 A schwarze und violette Bereiche) ca. eine Breite von links nach rechts von 2 mm und der Randbereich (siehe Abb. 40 A hellblaue Bereiche) eine Breite von links nach rechts von 0,5-0,75 mm.

Im Detail beträgt der relative Intensitätsverlust pro Minute beispielsweise in einem, die kontralaterale Hemisphäre beschreibenden Voxel (1) $-1,6588 \cdot 10^{-4}/\text{min}$, in einem, dem Randgebiet des Schadensareals zugeordneten Voxel (2) $-3,5757 \cdot 10^{-4}/\text{min}$ und in einem, das Zentrum des Schadensareals charakterisierenden Voxel (3) $-4,6308 \cdot 10^{-4}/\text{min}$.

8.6 MK-801 vermindert den $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust aus dem Schadensareal und verändert die -Verlustkinetik

Im Ergebnis der MK-801 Therapie konnte in den Mäusen der MCAO-Gruppe B ein reduzierter $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust und eine Verkleinerung des von der $^{201}\text{TI}^+$ -Reduktion betroffenen Bereiches gegenüber den Mäusen der MCAO-Gruppe A beobachtet werden. In diesem Zusammenhang zeigt die folgende Abb. 41 alle über die Population ($n = 6$) gemittelten Einzelmessungen der Maus-MCAO-Gruppe B.

Dabei ist anzumerken, dass alle Mäuse, die einer MCAO-OP unterzogen wurden und zusätzlich mit MK-801 behandelt worden sind, 8-9 h nach Durchführung der MK-801 Injektion (mittlerer Dosisbereich [164]) verstarben. Aus diesem Grund konnte keine späte Messung der $^{201}\text{TI}^+$ -Verteilung am Folgetag durchgeführt werden. Die Ursache für diese unerwartete Wirkung von MK-801 wurde im Rahmen dieser Studie nicht systematisch untersucht und bleibt ungeklärt. Aufgrund der Tatsache, dass das Infarktwachstum in den Mäusen der MCAO-Gruppe A 5 h nach Induktion der Reperfusion weitestgehend abgeschlossen war, wurden alle Messungen bis 5 h nach Reperfusion in die Auswertung einbezogen und die Messung 20 dann als Vergleichszeitpunkt für den finalen Schaden zwischen mit MK-801 therapierten, nicht therapierten und Kontrollmäusen gewählt.

Im direkten Vergleich der gesamten Messreihe mit der von den Mäusen der MCAO-Gruppe A (vgl. Abb. 36) wird ersichtlich, dass sich auch in den therapierten Mäusen unmittelbar nach der Okklusion ein Areal verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung in der ipsilateralen Hemisphäre bildet. Ebenfalls ersichtlich wird, dass sich der Schadensverlauf nach Anwendung der Therapie (d. h. nach der Reperfusion) trotz vergleichbarem Maß und Ausbreitung der Minderperfusion (jeweils weiß umrandet) in beiden Mausgruppen jedoch deutlich unterscheidet.

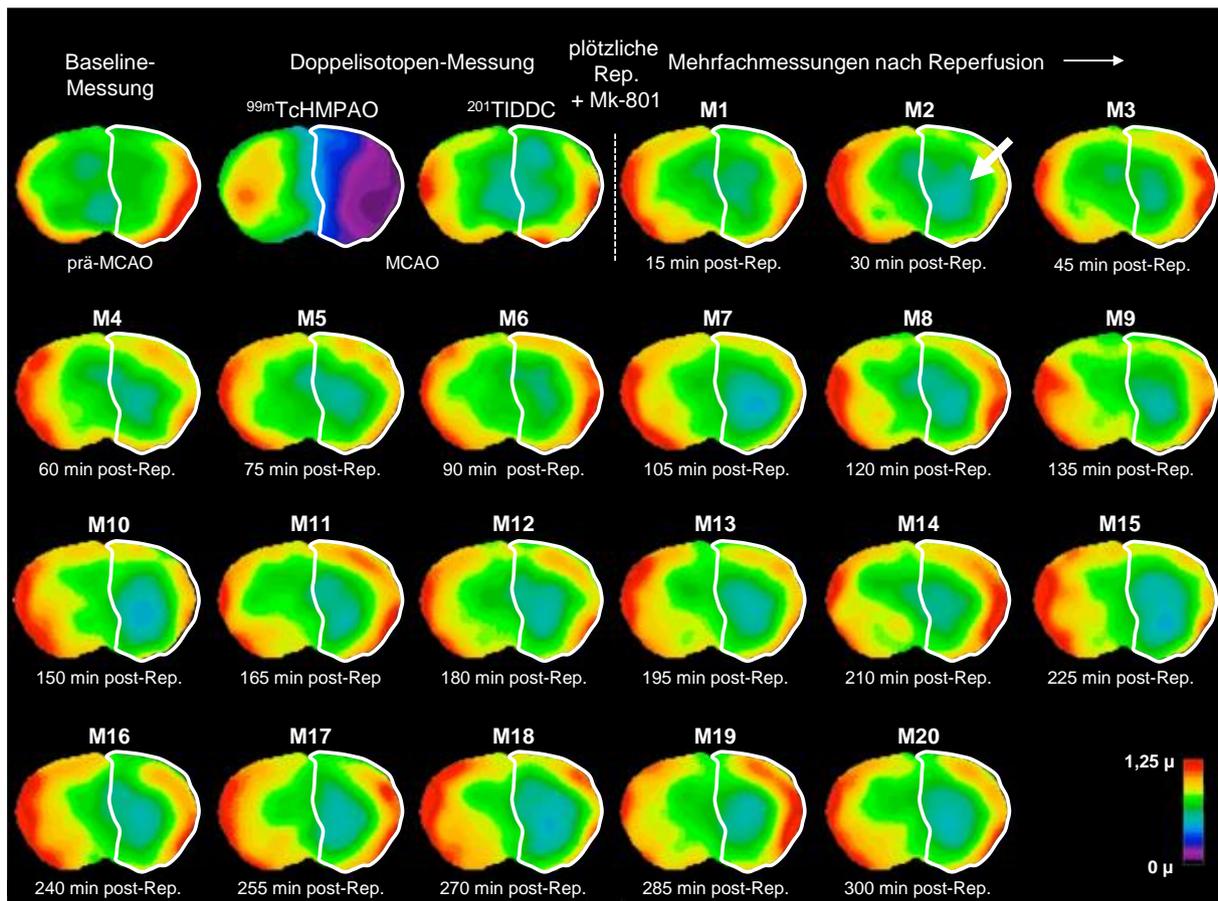


Abb. 41: Die Ausbreitung des Areals verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung ist in mit MK-801 therapierten Mäusen geringer als in nicht therapierten Mäusen.

Die Abbildung zeigt über 6 Tiere gemittelte farbkodierte SPECT-Aufnahmen (Skalierung: 0-1,25 fache der MW-Intensität des Gesamthirns) von Mäusen der MCAO-Gruppe B aus der frontalen Ansicht (Bregma 0,14 mm). Weiß umrandet ist jeweils das Areal verminderter Perfusion, gemessen während der Fadenimplantation. Der Pfeil zeigt exemplarisch die Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt. M: Messung, Rep.: Reperfusion.

Während sich das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung in den nicht-therapierten Mäusen der MCAO-Gruppe A bereits 60 min nach der Reperfusion vom Corpus Striatum in den zerebralen Kortex ausgebreitet hatte, beschränkte sich selbiges in den therapierten Mäusen der MCAO-Gruppe B bis zur letzten Messung (d. h. 5 h nach der Reperfusion) auf das Corpus striatum. Bestimmt man das Volumen des Areals verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung mit Hilfe des im Kapitel 8.2 ermittelten Grenzwertes für eine irreversible Schädigung, so beträgt das Volumen 5 h nach der Reperfusion in den mit MK-801 therapierten Mäusen $13,4 \text{ mm}^3$ und ist damit deutlich kleiner, als in den nicht-therapierten Mäusen, wo das Volumen des Schadenareals zum gleichen Zeitpunkt $38,9 \text{ mm}^3$ betrug (Volumenverkleinerung um $25,5 \text{ mm}^3$ bzw. 65,55 %). In Bezug zum minderperfundierten Areal entspricht dieses Volumen einem Anteil von 8,39 %.

Vergleicht man die Reduktion des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts 5 h nach der Reperfusion zwischen den experimentellen Maus-Gruppen mittels eines VOI-basierten T-Tests (2-seitig, ungepaart), der sich auf die von einer MCAO betroffenen Kernregionen, d. h. den Neokortex und das Corpus striatum

beschränkt, so wird deutlich, dass in Bezug zu unbehandelten scheinoperierten Mäusen (Kontrolle) sowohl in den mit MK-801 behandelten als auch in den unbehandelten Mäusen eine signifikante Reduktion des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehaltes im Striatum nachweisbar ist ($p < 0,0005^{***}$).

Zusätzlich lässt sich eine signifikante Reduktion des $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts im Kortex der unbehandelten, aber nicht der behandelten Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen ($p < 0,05^*$) feststellen. Innerhalb der MCAO Gruppen sind hingegen sowohl im Striatum als auch im Kortex keine signifikanten Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt zu finden. Jedoch deutet sich eine leichte Tendenz an, nach der der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt in den unbehandelten MCAO Tieren im Kortex und im Striatum um jeweils ca. 10 % geringer ist, als in den mit MK-801 behandelten MCAO Tiere (siehe Abb. 42).

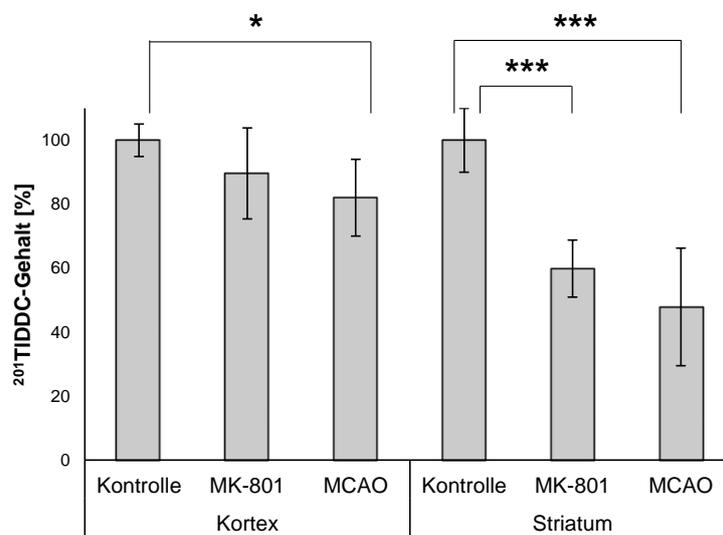


Abb. 42: Signifikante Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Kortex von nicht-therapierten MCAO-Tieren gegenüber Kontrolltieren.

Die Abbildung zeigt VOI-basierte Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Kortex (links) und im Corpus striatum (rechts) zwischen (jeweils von links) scheinoperierten Kontrolltieren, mit MK-801 behandelten MCAO-Tieren und unbehandelten MCAO-Tieren. Sternchen zeigen signifikante Gruppenunterschiede mit * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ (ungepaarter, 2-seitiger T-Test).

Ein voxelweiser T-Test (2-seitig, ungepaart) zeigte zusätzlich signifikante Unterschiede (Signifikanzlevel $p \leq 0,05$) zwischen behandelten und unbehandelten Tieren in Teilen des Kortex, nicht aber im Striatum (siehe Abb. 43).

In den signifikanten Bereichen im Kortex unterscheiden sich die unbehandelten MCAO- und die MK-801 Tiere in ihrem $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt um 26,71 %. Der Unterschied zwischen unbehandelten MCAO- und Kontrolltieren im selben Bereich lag bei 33,40 %, wohingegen er zwischen den mit MK-801 behandelten und Kontrolltieren mit 6,69 % bestimmt werden konnte.

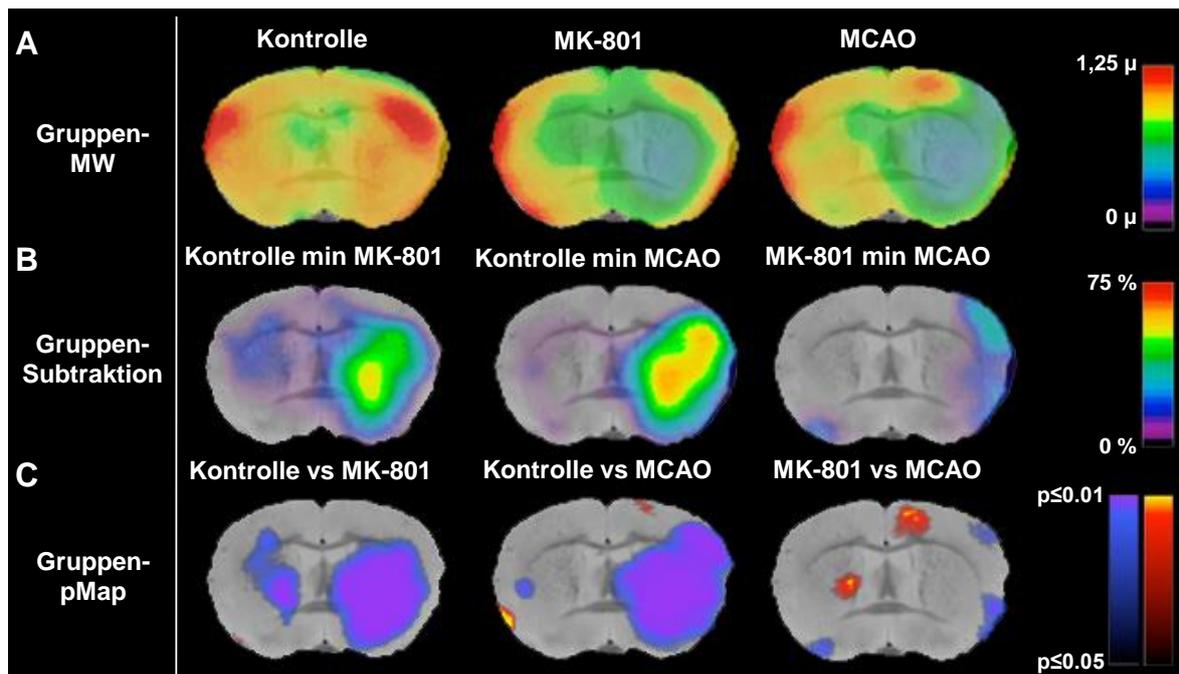


Abb. 43: Signifikante Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Kortex von nicht-therapierten MCAO-Tieren gegenüber Kontrolltieren und mit MK-801 therapierten Tieren.

Die Abbildung zeigt voxelweise Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt von Mäusen der Kontrollgruppe, sowie therapierten und nicht therapierten Mäusen. (A) zeigt SPECT-Aufnahmen der jeweiligen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung 5 h nach der Reperfusion (SPECT farbkodiert 0-1,25fache des MW der Gesamthirntintensität). (B) zeigt Differenzbilder der unter (A) gezeigten SPECT-Aufnahmen (in gelb-rot hohe Differenzen in blau-schwarz geringe Differenzen). (C) zeigt signifikante Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen (Signifikanzlevel $p \leq 0,05$ unkorrigiert, in rot signifikante Anstiege, in blau signifikante Abfälle). Alle Aufnahmen sind aus der frontalen Aufsicht (Bregma 0,14 mm) überlagert auf ein Std.-MRT dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass unter gleichen experimentellen Bedingungen durch die Gabe von MK-801 das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung in den Mäusen der MCAO-Gruppe B 5 h nach der Reperfusion deutlich verringert (um einen Faktor von 2,9), bzw. die Ausbreitung in den zerebralen Kortex verhindert werden konnte.

Auch der späte Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Areal verminderter Perfusion war 5 h nach der Reperfusion deutlich geringer, als in nicht therapierten Mäusen. Demnach betrug die $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion in VOI-1 gegenüber VOI-2 in nicht therapierten Mäusen 12,75 % ($p = 0,27$) und in therapierten Mäusen 23,42 % ($p = 0,03^*$).

In einem der nächsten Schritte wurde darüber hinaus der zeitliche und räumliche Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen. Dabei fiel auf, dass 5 h nach Einleitung der Reperfusion sich nicht nur in den nicht-therapierten Mäusen der MCAO-Gruppe A, sondern auch in den mit MK-801 therapierten Mäusen (MCAO-Gruppe B) auf der ipsilateralen Hemisphäre ein sich deutlich von den übrigen Hirnvoxeln abgrenzendes Areal verstärkten $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes lokalisieren lässt, wohingegen in Mäusen der Kontrollgruppe der stärkste $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust pro Zeiteinheit im Cerebellum vorzufinden war, was durch die in der Literatur beschriebene erhöhte $^{201}\text{Tl}^+$ -Auswaschkinetik des Cerebellums erklärt werden kann [183] (siehe Abb. 44).

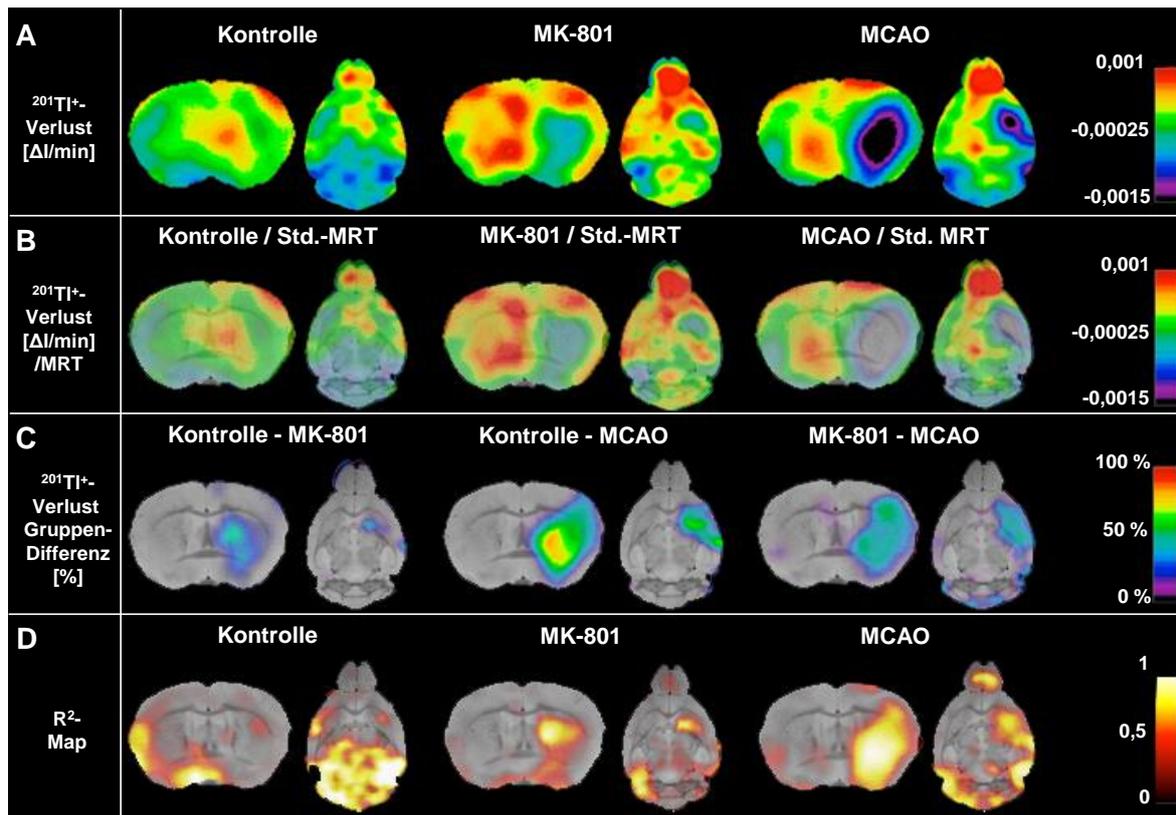


Abb. 44: Vergleich der voxelweisen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstanten in Mäusen der Kontrollgruppe (links), der MK-801-Gruppe (mittig) und der MCAO-Gruppe (rechts) über einen betrachteten Zeitraum von bis 5 h nach Einleitung der Reperfusion.

(A) zeigt den relativen voxelweisen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust in $\Delta I/\text{min}$. (B) zeigt den relativen voxelweisen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust zur besseren anatomischen Orientierung auf ein Std.-MRT überlagert. Die prozentuale Differenz der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstanten zwischen den einzelnen Gruppen ist in (C) ebenfalls überlagert auf ein Std.-MRT dargestellt. Die R^2 -Map in (D) zeigt wie gut die errechnete $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkurve (e-Funktion 1ter Ordnung) den tatsächlichen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust über die Zeit beschreibt, mit $R^2=0$ keine Übereinstimmung und $R^2=1$ perfekte Übereinstimmung. Als Darstellungsebene wurde für die frontale Ansicht Bregma 0,14 mm und für die horizontale Ansicht -2,36 mm gewählt.

Ferner wird deutlich, dass der Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Schadensareal in den Tieren der MCAO-Gruppe A (in der Abb. 44 MCAO-Gruppe) im Mittel am stärksten ausgeprägt ist. Es folgen die Mäuse der MCAO-Gruppe B (in der Abb. 44 MK-801-Gruppe) sowie der Kontrollgruppe. Explizit weisen die Mäuse der MCAO-Gruppe A einen in den zentralen Gebieten im Mittel um bis zu 80 %; in den Randgebieten um bis zu 40 % erhöhten Verlust gegenüber der Kontrollgruppe auf. Gegenüber der Therapiegruppe erhöht sich der Verlust im Mittel um 40-50 %. In den MK-801 Tieren selbst erhöht sich der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust gegenüber der Kontrollgruppe um 20-30 % (siehe Gruppendifferenzen Abb. 44 C).

Ebenfalls als auffällig anzumerken ist, dass das Areal verstärkten Verlustes in den nicht therapierten Mäusen deutlich größer ausgeprägt ist, als in den therapierten Mäusen und sich sowohl auf das Corpus striatum als auch den zerebralen Kortex ausdehnt, wohingegen sich dieses Areal in therapierten Mäusen ausschließlich auf das Corpus striatum beschränkt.

Die in Abb. 44 D dargestellte Güte-Karte (siehe R^2 -Map) zeigt, wie gut die angenommene Exponentialfunktion und der tatsächliche (voxelweise) Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ übereinstimmen bzw. inwiefern der Verlust durch eine Kinetik 1ter Ordnung beschrieben werden kann.

In Auswertung dieser Darstellung ist deutlich erkennbar, dass diejenigen Voxel, die einen hohen Verlust des $^{201}\text{TI}^+$ aufweisen (in der Regel betrifft dies Voxel im Schadensareal oder im Cerebellum) sehr gut durch eine Kinetik 1ter Ordnung beschrieben werden ($R^2 > 0,5$).

Die $^{201}\text{TI}^+$ -Verlustbeschreibung der anderen Voxel ist entsprechend schlechter ($R^2 < 0,5$), was darauf zurückzuführen sein könnte, dass der geringere, rein physiologische Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ (der innerhalb der ersten Stunde nach Injektion verschwindend gering ist) durch die mit fortschreitenden Anstiegen des $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalts einhergehenden Umverteilungskinetiken innerhalb einzelner Voxel teilweise überlagert wird.

Um den voxelweisen zeitlichen Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ entsprechend besser beschreiben und somit exakter prognostizieren zu können, wurde in einer zweiten Näherung die Annahme getroffen, dass sich der $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust durch mehrere, ebenfalls je einer Exponentialfunktion folgende, sich jedoch stündlich ändernde Verlustkonstanten, charakterisieren lässt.

Mit Hilfe dieser Annahme war es nunmehr möglich, nicht nur die Areale erhöhten $^{201}\text{TI}^+$ -Verlustes zu detektieren bzw. zu lokalisieren, sondern vielmehr den Verlust zusätzlich auch zeitlich exakt einzuordnen.

In diesem Kontext fällt mit Verweis auf die nachstehende Abb. 45 auf, dass in den nicht-therapierten Mäusen der MCAO-Gruppe A die meisten der dem finalen Schadenareal zuzuordnenden Voxel ihren stärksten Verlust bereits innerhalb der ersten Stunde aufweisen ($k_{\text{Vox}1}$).

Auch in den therapierten Mäusen zeigen einige Voxel innerhalb des späten Schadensareals in diesem Zeitraum bereits einen erhöhten Verlust an $^{201}\text{TI}^+$; jedoch erreichen die meisten Voxel ihren maximalen Verlust hier erst zwischen der ersten und zweiten Stunde. Das bedeutet, dass der Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ in MK-801 Tieren im Schadensareal nicht nur geringer ausgeprägt ist, sondern auch zeitverzögert einsetzt, bzw. zeitlich verzögert sein Maximum erreicht.

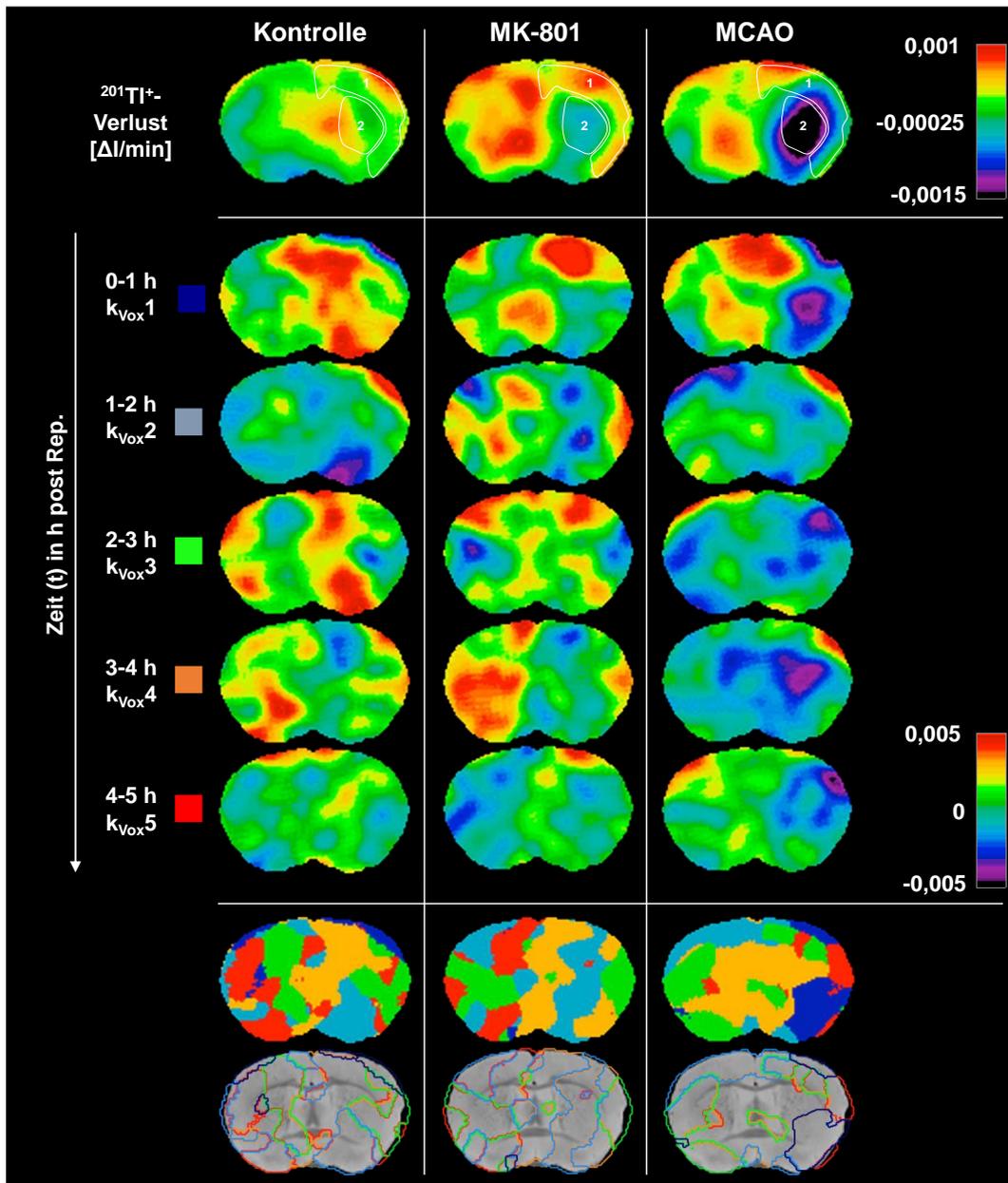


Abb. 45: Voxelweiser $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust betrachtet über verschiedene Zeitintervalle von je einer Stunde. (A) zeigt den voxelweisen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust über den gesamten Messverlauf bis 5 h nach der Reperfusion. (B) zeigt die stundenweise Veränderung im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt. (Jeweils farbkodiert: $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust in lila-schwarz, $^{201}\text{Tl}^+$ -Anstieg in gelb-rot, konstanter $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt in grün). (C) zeigt für jeden Voxel den Zeitpunkt des maximalen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes an (farbkodiert in dunkelblau 0-1 h, hellblau 1-2 h, grün 2-3 h, orange 3-4 h und rot 4-5 h). Zur besseren anatomischen Orientierung wurden die entsprechenden Areale zusätzlich auf ein Std.-MRT überlagert. Alle Hirnaufnahmen sind aus der frontalen Ansicht (Bregma 0,14 mm) abgebildet.

8.7 Signalintensitäten im dynamischen ^{201}Tl -SPECT schwanken nach MCAO stärker als in Kontrollen

Sowohl in nicht-therapierten als auch in therapierten Mäusen konnten während der Infarktausbreitung Schwankungen im ^{201}Tl -Gehalt, beobachtet werden. Diese Schwankungen waren durch Zu- und Abnahmen im ^{201}Tl -Gehalt im Randgebiet der betroffenen Bereiche gekennzeichnet. Sie waren sowohl in Datensätzen von Einzeltieren als auch in aufaddierten Datensätzen einer Gruppe nachzuweisen und traten über die gesamte Messdauer, vermehrt jedoch kurz nach der Reperfusion auf.

Um die von den Intensitätsschwankungen hauptsächlich betroffenen Bereiche lokalisieren zu können, wurden aufeinanderfolgende Messungen unter Zuhilfenahme eines T-Tests (gepaart, 2-seitig) miteinander verglichen.

Somit konnten Voxel, deren Änderungen im ^{201}Tl -Gehalt signifikant waren, detektiert werden. Diese Voxel sind für die Mäuse der Kontrollgruppe sowie für therapierte und nicht-therapierte Mäuse in Abb. 46 vergleichend aufgetragen. Dabei sind Voxel mit signifikanten Anstiegen im ^{201}Tl -Gehalt gegenüber der Vormessung in rot bzw. mit Abfällen in blau visualisiert. Die Schwankungen wurden, wie in Abb. 46 ersichtlich, vom Zeitpunkt der Reperfusion bis 120 min nach der Reperfusion näher betrachtet.

Dabei fällt auf, dass Schwankungen im ^{201}Tl -Gehalt in allen Versuchsgruppen zu beobachten sind, und dass diese auch bilateral auftreten. Im Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen wird ersichtlich, dass die Schwankungen in den Mäusen der MCAO-Gruppen jedoch vermehrt auftauchen und dass diese vorrangig im Kortexbereich zu lokalisieren sind. Zusätzlich wird deutlich, dass im Gegensatz zu den nicht-therapierten Mäusen, die von den Schwankungen im ^{201}Tl -Gehalt betroffenen Bereiche therapeutierter Mäuse vorrangig außerhalb des final gemessenen Schadenareals (siehe weiß gestrichelte Linien) lagen.

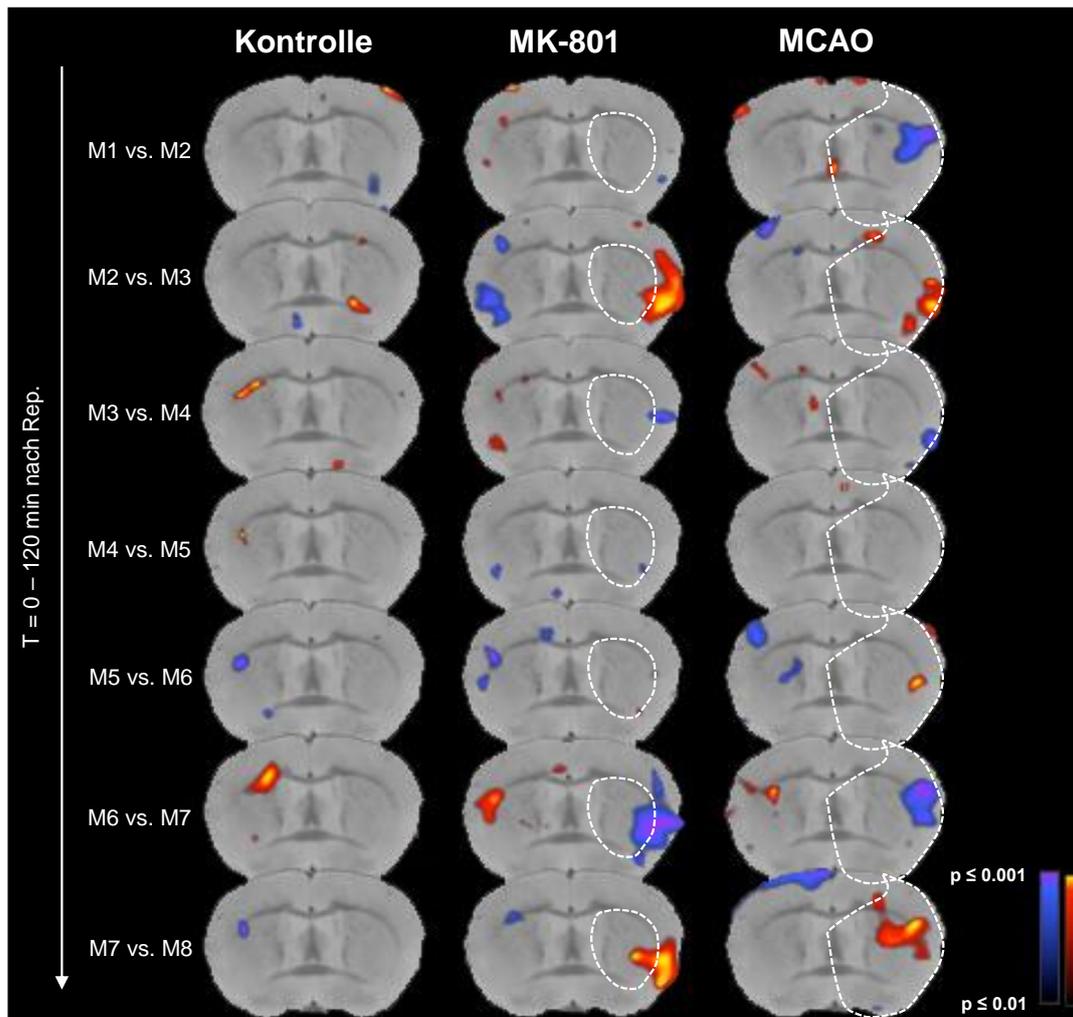


Abb. 46: Schwankungen im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt treten vermehrt in Mäusen der MCAO-Gruppen auf.

Die Abbildung zeigt signifikante Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt zwischen aufeinanderfolgenden Messungen von Mäusen der Kontrollgruppe (links) sowie von therapierten (Mitte) und nicht-therapierten Mäusen der MCAO-Gruppen (rechts) über den Zeitraum ab der Reperfusion bis 120 min nach der Reperfusion. Signifikante Unterschiede wurden durch einen T-Test (2-seitig, gepaart, Signifikanzlevel $p \leq 0,01$, unkorrigiert) ermittelt. Anstiege im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt gegenüber der Vormessung sind in rot und Abfälle in blau überlagert auf ein Std.-MRT dargestellt. Die Darstellungsebene ist Bregma 0,14 mm. Die weißgestrichelten Linien umrandet jeweils das Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung 5 h nach der Reperfusion.

Um ein Maß für den Grad der Schwankungen im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt zu erhalten, wurde die Anzahl der signifikanten Voxel im Gesamthirn über den betrachteten Zeitraum bestimmt und ins Verhältnis zur Gesamtvoxelzahl im Hirn gesetzt (siehe Abb. 47). Dabei betrug der prozentuale Anteil der signifikanten Voxel in Kontrolltieren 13,00 %, in mit MK-801 therapierten Mäusen 23,43 % und in nicht-therapierten Mäusen 36,34 %.

Die Anzahl der signifikanten Voxel war in therapierten und nicht-therapierten Mäusen signifikant erhöht gegenüber der Voxelanzahl in Kontrolltieren (Kontrolle vs. MK-801: $p = 0,038^*$ bzw. Kontrolle vs. MCAO $p = 0,046^*$). Die Unterschiede in der Anzahl der signifikanten Voxel zwischen therapierten und nicht-therapierten Tieren war nicht signifikant ($p = 0,261$).

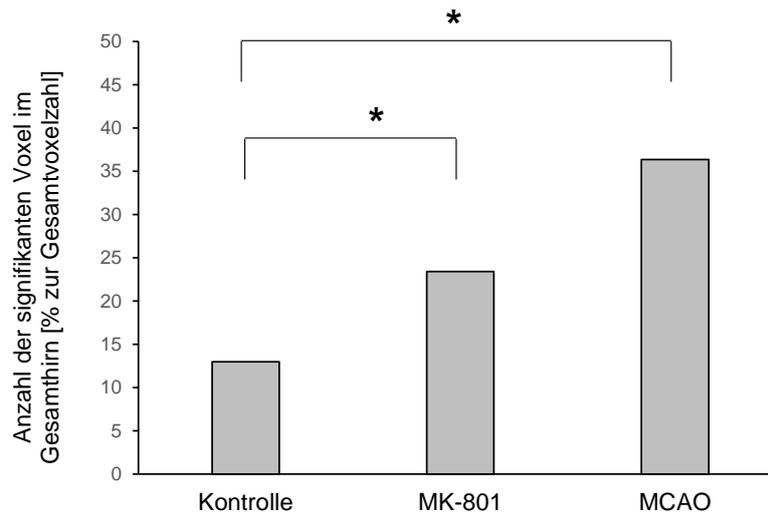


Abb. 47: Die Anzahl der signifikanten Voxel ist in therapierten und nicht-therapierten Mäusen signifikant erhöht gegenüber Kontrollmäusen.

Die Abbildung zeigt die Anzahl der signifikanten Voxel, welche signifikante Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt aufeinanderfolgender Messungen beschreiben, im Verhältnis zur Gesamtvoxelzahl im Hirn in Kontrollmäusen (links) und therapierten (Mitte) und nicht-therapierten Mäusen (rechts). * $p \leq 0,05$.

8.8 $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetiken können auch bestimmt werden, wenn $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC nach Durchführung der MCAO injiziert wird

Im Hinblick auf eine potenzielle klinische Applikation des Schadensmarkers $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC zur (Human-) Diagnostik der Gewebsvitalität nach fokaler zerebraler Ischämie, wurde die zuvor beschriebene Verlustkinetik von $^{201}\text{Tl}^+$ auch in Ratten, denen $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC erst nach MCAO injiziert wurde, untersucht. Dazu wurden die Tracer $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ und $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC sukzessive 90 min nach ET-1-Gabe, d. h. zum Zeitpunkt der graduellen Reperfusion, injiziert. Anhand der $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ -SPECT-Aufnahmen war deutlich sichtbar, dass zum Zeitpunkt der Tracerinjektionen in allen Tieren eine Minderperfusion im Stromgebiet der MCA vorlag.

Bereits zum Zeitpunkt der ersten erhobenen $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC-SPECT-Messung (ca. 2,5-3 h nach der ET-1-Injektion bzw. 1 h nach der sukzessiven Injektion von $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ und $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC) konnte in jedem Einzeltier eine verminderte $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung im minderperfundierten Areal beobachtet werden. Die $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion betrug in Bezug zum gespiegelten Areal verminderter Perfusion $10,83 \pm 7,86 \%$ und war nicht signifikant ($p = 0,40$). Zum Zeitpunkt der späten $^{201}\text{Tl}^+$ TIDDC-SPECT-Messung, welche ca. 26 h (22-32 h) nach der ET-1-Injektion durchgeführt wurde, betrug die $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion im mittleren Areal verminderter Perfusion $25,90 \pm 19,58 \%$ und war mit $p = 0,019^*$ signifikant.

Das zeigt, dass es über die Zeit zu einem Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem minderperfundierten Bereich kam. In zwei Versuchstieren konnte allerdings kein Anstieg im zeitlichen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust in Bezug zum gespiegelten Areal verminderter Perfusion beobachtet werden. Diesen Tieren wurde im Vorfeld die geringste ET-1 Konzentration (93,75 pmol) injiziert, was im Vergleich zu den anderen Versuchsratten zu einer geringen Blutflussreduktion (im Mittel um 16,73 %, im Vergleich zu den verbleibenden Tieren war die Blutflussreduktion ca. um einen Faktor 2 geringer) und einer geringeren Ausbreitung des von der $^{201}\text{Tl}^+$ -Reduktion betroffenen Areals geführt hat (Volumen des Areals verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung 26 h nach ET-1-Injektion 7,00 mm³, im Vergleich mittleres Areal verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung in verbleibenden Ratten 195,73 mm³).

Der fortschreitende Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Areal verminderter Perfusion wurde, wie in den Tieren der Versuchsgruppen, mit Injektion von $^{201}\text{Tl}^+$ DIDC vor der MCAO mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung gefittet. Abb. 48 zeigt in diesem Kontext exemplarisch den zeitlichen Verlauf des $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes, einschließlich einer Darstellung der voxelweisen Verlustkinetik anhand vereinzelter Messungen über den gesamten Messzeitraum in einem Einzeltier der MCAO-Gruppe B.

Die voxelweise Kinetikanalyse ermöglicht, wie in den anderen Versuchsgruppen, eine Abgrenzung des Areals erhöhten $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes über die Zeit im Areal verminderter Perfusion von der kontralateralen Hemisphäre und verdeutlicht innerhalb dieses Areals unterschiedliche Verlustzonen.

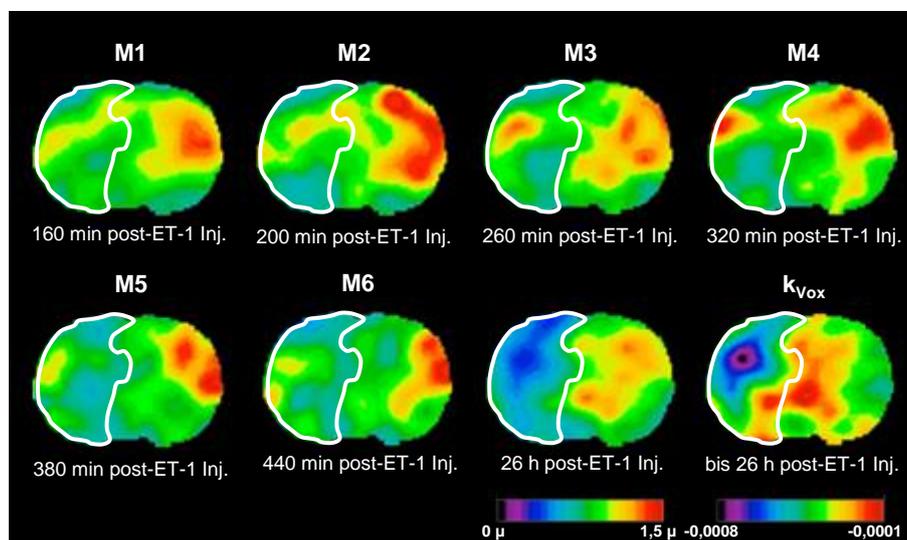


Abb. 48: Erhöhter $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust aus dem Areal verminderter Perfusion kann auch bei Injektion von $^{201}\text{Tl}^+$ DIDC nach MCAO beobachtet werden.

Die Abbildung zeigt einzelne $^{201}\text{Tl}^+$ DIDC-SPECT-Messungen (M: Messung) einer Ratte der MCAO-Gruppe B (SPECT farbkodiert 0-1,5fache des MW der Gesamthirntintensität) aus der frontalen Ansicht. Die Abbildung rechts unten (k_{vox}) zeigt den $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust für jeden Voxel, über einen Zeitabschnitt von 2,5 – 26 h nach der ET-1-Injektion [Änderung der Intensität (ΔI) pro Zeiteinheit (min)]. Weiß umrandet ist jeweils das Areal verminderter $^{99\text{m}}\text{TcHMAPO}$ -Anreicherung. Als Darstellungsebene wurde Bregma -0,12 mm gewählt.

Kapitel 9

Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde erstmals das $^{201}\text{TIDDC}$ -Kleintier SPECT eingesetzt, um den zerebralen K^+ -Stoffwechsel in MCAO-Nagetiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie *in-vivo* zu untersuchen. Dazu wurde die MCA in Mäusen mit Hilfe des intraluminalen Faden-Modells und in Ratten durch die intrakranielle Injektion des Vasokonstriktorpeptids ET-1 transient verschlossen. Beide Modelle sind gut etablierte Modelle der fokalen zerebralen Ischämie. Im Fadenmodell kann die Dauer der Ischämie durch Herausziehen des Fadens genau kontrolliert werden. Dabei kommt es aber zu einer plötzlichen Reperfusion des minderperfundierten Bereiches. Bei der intrakraniellen Injektion von ET-1 kann die Okklusionsdauer in Abhängigkeit der ET-1 Konzentration nicht so gut kontrolliert werden, da diese auch von der Genauigkeit der stereotaktischen Injektion beeinflusst wird. Ein Vorteil dieses Modells besteht jedoch in der graduellen Reperfusion des minderperfundierten Bereiches nach der Okklusion, was eine humane Ischämie viel realistischer widerspiegelt. Aus diesen Gründen war die Anwendung beider Modelle der fokalen zerebralen Ischämie von großem Interesse für die Untersuchungen in dieser Arbeit. $^{201}\text{TIDDC}$ wurde in verschiedenen Versuchsgruppen vor und nach Auslösung der MCAO intravenös injiziert.

Grundlegend für den Einsatz von $^{201}\text{TIDDC}$ zur SPECT-Bildgebung des zerebralen K^+ -Stoffwechsels sind dabei die bereits in der Einleitung beschriebenen Befunde aus früheren Arbeiten [120], die zeigen, dass aus dem lipophilen Chelat-Komplex TIDDC nach der Passage durch die Blut-Hirnschranke das K^+ -Analogon Tl^+ freigesetzt und anschließend von Neuronen und Astrozyten aufgenommen wird.

Ausgehend von der Tatsache, dass bei ischämischer Schädigung die intra-zu-extrazellulären K^+ -Gradienten zusammenbrechen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der K^+ -Verlust aus dem Infarktareal einen Verlust bzw. eine verminderte Aufnahme von $^{201}\text{Tl}^+$ im Schadensgebiet zur Folge hat, was mit der SPECT-Technik visualisiert werden kann. Dabei war zu erwarten, dass der Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ nach Abschluss der Schadensausbreitung maximal sein würde und sich das Areal reduzierten $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalts mit dem durch etablierte Marker gemessenen, definitivem Schaden decken würde. Diese Hypothesen wurden bestätigt.

Von besonderem Interesse war die Frage, inwieweit sich aus der Kinetik des Verlusts von $^{201}\text{TI}^+$ aus dem Infarktareal Schlüsse ziehen lassen auf die Schadens-Charakterisierung, wie z. B. die Core-Penumbra Unterteilung.

Die bzgl. dieser Fragestellungen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen erhobenen Befunde werden im Folgenden detailliert diskutiert. Darüber hinaus soll die Eignung der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT in der präklinischen Bildgebung der fokalen zerebralen Ischämie bewertet und die Vor- und Nachteile gegenüber etablierten Verfahren beleuchtet werden sowie Schlüsse für einen eventuellen Einsatz in der Humanmedizin abgeleitet werden.

9.1 Validierung der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT im Vergleich mit etablierten Verfahren

Bereits in früheren Experimenten konnten nach intravenöser Injektion von TIDDC mit Hilfe der histochemischen Nachweismethode (TI^+ -AMG) Areale mit einem reduzierten intrazellulären TI^+/K^+ -Gehalt nach MCAO visualisiert werden und, im Abgleich mit etablierten Verfahren zum Nachweis einer strukturellen Gewebsschädigung, eine generelle Eignung von TIDDC als Marker für irreversible Zellschädigungen erbracht werden [127].

Mit der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT konnten ebenfalls 20-22 h nach MCAO Areale verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung im ipsilateralen Stromgebiet der MCA deutlich und kontrastreich abgegrenzt werden. Damit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass der K^+ -Verlust aus dem Infarktareal einen Verlust oder eine verminderte Aufnahme von $^{201}\text{TI}^+$ im Schadensgebiet zur Folge hat und dass dies mit Hilfe der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT visualisiert werden kann.

Um die Eignung der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT zur Darstellung ischämisch bedingter Veränderungen im K^+ -Stoffwechsel im gleichen Maße wie mit der TI^+ -Histochemie zu validieren, wurde die mehrere Stunden nach MCAO gemessene $^{201}\text{TI}^+$ -Verteilung mit Nissl-Schnittpräparaten und T_2w -MRT Aufnahmen der selben Versuchstiere verglichen. Sowohl bei der Nissl-Färbung als auch bei der T_2w -MRT handelt es sich um etablierte Verfahren, die routinemäßig zur Abgrenzung einer strukturellen Gewebsschädigung bzw. Bestimmung des Infarktvolumens genutzt werden (u. a. [55, 95]).

Als Vergleichszeitpunkt der Methoden wurde 20-22 h nach MCAO festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt eine sensitive Darstellung einer Strukturschädigung durch die gewählten etablierten Methoden sichergestellt war [55, 95] und darüber hinaus dieser Zeitpunkt im Rahmen der üblicherweise für die Darstellung einer definitiven Schädigung gewählten Zeiträume liegt. Es wird davon ausgegangen, dass ca. 24 h nach MCAO das Infarktwachstum nach Anwendung der hier zum Einsatz gekommenen Nagetiermodelle ganz oder nahezu abgeschlossen ist [184, 185].

Im direkten Vergleich der verschiedenen Methoden konnte anhand routinemäßig genutzter mathematischer Verfahren (d. h. Korrelationsanalyse und Bland-Altman-Methode) eine hervorragende Übereinstimmung zwischen den Arealen verminderten $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalts und reduzierter Nissl-Färbung sowie den im $T_2\text{w-MRT}$ hyperintens erscheinenden Regionen bestätigt werden [177, 186].

Kleinere Abweichungen im Volumen der detektierten Areale zwischen den verschiedenen Verfahren waren lediglich bei Ratten mit größeren Infarkten zu finden, was maßgeblich darauf zurückgeführt werden kann, dass aufgrund der Gewebsbeeinträchtigung der Hirne, diese bei der Aufbereitung für die Nissl-Färbung leicht beschädigt worden sind, was die Bestimmung des Infarktvolumens beeinflusste. Dies betraf vorrangig Hirne von Ratten mit kortikalen Infarkten.

Zusätzlich lassen sich Abweichungen im Infarktvolumen zwischen den verschiedenen Auswertemethoden auch auf die, durch Strahlenschutzgründe bedingte, Wartezeit zwischen der Anwendung der verschiedenen Methoden zurückführen. Da sich das Kleintier-MRT außerhalb des Überwachungsbereiches befand, konnten die $T_2\text{w-MRT}$ -Messungen und die Nissl-Färbungen erst ca. 1 Woche nach den $^{201}\text{TIDDC-SPECT}$ -Messungen durchgeführt werden. In dieser Zeit kann es bereits zu Vernarbungen des betroffenen Gewebes und zur Infiltration inflammatorischer Zellen in das infarzierte Gewebe gekommen sein, was einen verändernden Einfluss sowohl auf das MRT- als auch das Nissl-Bild zur Folge gehabt haben könnte. Zusätzlich kann es im Ergebnis eines möglichen Gewebsverlusts zur Ausdehnung des ipsilateralen Seitenventrikels kommen, der ebenfalls hyperintens im $T_2\text{w-MRT}$ erscheint und das Infarktsignal teilweise überlagern kann.

Auf Grundlage der ermittelten Schadensareale im $T_2\text{w-MRT}$ und in der Nissl-Färbung, wurde ein beobachterunabhängiger Intensitätsschwellenwert für die Abgrenzung irreversibel geschädigten Gewebes im späten $^{201}\text{TIDDC-SPECT}$ definiert. Dieser Grenzwert konnte im Bezug zur kontralateralen Hemisphäre bei einem $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust von $\geq 36,40\%$ festgelegt werden. Momentan kann dieser experimentell bestimmte Grenzwert im $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust nicht in einen direkten Wert für den K^+ -Gehalt umgerechnet werden; dies erscheint aber prinzipiell möglich, z. B. durch weitergehende Untersuchungen, in denen das K^+/TI^+ -Verhältnis im Infarktareal *ex-vivo* gemessen wird.

Interessanterweise konnte mit Hilfe einer Absorptionsspektroskopie eine ähnliche Reduktion im K^+ -Gehalt 24 h nach Infarkt gegenüber dem normalen Gehalt durch Young et al beobachtet werden. Demnach war der K^+ -Gehalt im Schadensareal um 34 % reduziert [187]. Ebenso war der zerebrale $\text{K}^+/\text{Rubidium}$ -Gesamtgehalt (Rubidium ein weiteres K^+ -Analogon) im ischämischen Kortex ca. 6 h nach MCAO um 30 % gegenüber dem kontralateralen Kortex reduziert (erhoben mit dem $^{87}\text{Rubidium-MRT}$) [188].

Im finalen Schadensareal sank der $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt nahezu auf die in einem Schädelatensatz vorkommenden niedrigsten Radioaktivitätswerte und lag nur ca. 10 % oberhalb des $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalts zellarmer schleimhautausgekleideter luftgefüllter Kammern. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass trotz eines kompletten Zusammenbruchs der Gradienten, was die

Voraussetzung für die Ausbildung einer irreversiblen Gewebsschädigung ist, gemäß dem Gibbs-Donnan-Equilibrium noch $K^+/^{201}Tl^+$ im Schadensareal zurückgeblieben sein muss.

Die erhobenen $^{201}Tl^+$ -Messwerte lassen aber keine Aussage zu, ob sich das $K^+/^{201}Tl^+$ intra- und/oder extrazellulär befindet. Ohne eine exaktere Quantifizierung, z. B. auf Basis einer $^{201}Tl^+$ -Autoradiographie oder anhand der Tl^+ -Histochemie, kann hierzu momentan keine endgültige Aussage getroffen werden.

Zusammenfassend kann anhand der erhobenen Ergebnisse die theoretische Annahme, dass sich irreversibel geschädigtes Gewebe durch eine reduzierte $^{201}Tl^+$ -Anreicherung auszeichnet, bestätigt und die Ergebnisse der Tl^+ -Histologie vorangegangener Studien erfolgreich reproduziert werden. Schlussfolgernd kann das neuartige Verfahren „ ^{201}Tl DDC-SPECT“ als eine sehr gut geeignete Nachweismethode für die Detektion eines finalen ischämischen Schadens eingestuft werden.

9.2 Die Kinetik des $^{201}Tl^+$ -Verlusts aus dem Schadensareal

Zur Untersuchung der Kinetik des $^{201}Tl^+$ -Verlusts wurden nach einmaliger ^{201}Tl DDC-Injektion kontinuierlich SPECT-Messungen im Abstand von 10 – 15 Minuten über einen Gesamtzeitraum von 5 h nach der Reperfusion durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene experimentelle Protokolle verwendet, zum einen die Gabe von ^{201}Tl DDC vor Infarkt-Induktion und zum anderen die Gabe von ^{201}Tl DDC im Anschluss an die Infarkt-Induktion. Das erste Protokoll ist aus wissenschaftlicher Perspektive interessanter, da es Einblicke in den Verlust von $^{201}Tl^+$ ausgehend von normal hohen Konzentrationen im gesunden Gewebe ermöglicht, eine zusätzliche Injektion nach Infarktauslösung erspart, und den $^{201}Tl^+$ -Verlust untersuchen lässt, ohne eine theoretisch mögliche Beeinflussung durch verminderte Zufuhr von ^{201}Tl DDC bei verminderter Perfusion. Das zweite Protokoll kommt hingegen der klinischen Situation näher, da Patienten der Tracer erst nach Einlieferung in eine Klinik injiziert werden kann.

Um den Verlust von $^{201}Tl^+$ in Beziehung zur Reduktion der Perfusion analysieren zu können, wurde den Versuchstieren der Blutfluss-Tracer ^{99m}Tc HMPAO injiziert. Bei der SPECT-Bildgebung sind simultane Doppel- oder Mehrfach-Isotopenmessungen möglich, sofern die Energien der emittierten Gammastrahlung weit genug auseinanderliegen. Für ^{99m}Tc mit einem Peak bei 140 keV und $^{201}Tl^+$ mit einem dominanten Peak bei 70 keV ist das problemlos möglich und etabliert [189].

Es ist allerdings mit der SPECT-Technik nicht so einfach, wie mit dem Blutfluss-PET unter Verwendung des sehr kurzlebigen Tracers $H_2^{15}O$, den Blutfluss sequentiell mehrfach zu messen. Theoretisch könnte man nach Mehrfachinjektionen von ^{99m}Tc HMPAO den differentiellen Anstieg des zerebralen ^{99m}Tc -Gehalts ermitteln. Es lag aber außerhalb des Schwerpunkts dieser Arbeit, ein Protokoll für solche Messungen zu entwickeln und zu validieren. Somit musste für die Bestimmung der verminderten Perfusion ein Zeitpunkt festgelegt werden. Im Falle der mit dem Fadenmodell

induzierten MCAO bei Mäusen lag es nahe, die Blutflussreduktion vor Entfernung des Fadens zu bestimmen, um damit ein Maß für Minderperfusion während der Okklusion der MCA zu erhalten.

Die dynamische SPECT-Messung des $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlusts ergab folgende Hauptergebnisse: Es gab einen kontinuierlichen Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Areal verminderter Perfusion über einen Zeitraum mehrerer Stunden. Bereits in der frühesten Messung nach Induktion der MCAO war der $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt im Infarktareal im Vergleich zur vorherigen Baseline-Messung reduziert. Der Verlust von $^{201}\text{Tl}^+$ begann im Kernbereich des Infarkts und breitete sich zu den Randzonen aus.

Dieser Verlauf entspricht der typischen Ausbreitungscharakteristik des Schadens bei der fokalen zerebralen Ischämie [11]. Er legt unmittelbar nahe, dass mit dem dynamischen $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT der fortschreitende Verlust von K^+ und damit aber auch die fortschreitende Zellschädigung abgebildet werden.

Mit dem $^{201}\text{Tl}^+$ -SPECT wird im Unterschied zum histochemischen Nachweis des Thalliums das gesamte Thallium in einem Voxel und somit intrazelluläres und extrazelluläres $^{201}\text{Tl}^+$ nachgewiesen. Theoretisch ist es möglich, dass sich der Gesamtgehalt eines Voxels an $^{201}\text{Tl}^+$ nicht ändert, obwohl intrazellulär $^{201}\text{Tl}^+$ verloren geht. Aufgrund der schlechten Leitfähigkeit der BHS für K^+ steigt nach intrazellulärem Verlust die extrazelluläre K^+ -Konzentration an [109, 190–193].

Eine einfache Abschätzung ergibt, dass bei totalem Übertritt von intrazellulärem K^+ in den Extrazellulärraum, der ca. 20 % des ZNS-Volumens ausmacht, die extrazellulären K^+ -Konzentrationen ca. fünffach höher sein müssten, als die intrazellulären, was wiederum Werten entspräche, die weit oberhalb tatsächlich gemessener Werte liegen. Gleichzeitig ist bekannt, dass die K^+ -Leitfähigkeit der BHS zwar relativ niedrig ist, aber in der Größenordnung von Zellmembranen aber nicht Lipiddoppelschichten liegt [194], und dass es Kalium-Kanäle in zerebralen Endothelzellen gibt [195]. Bei einem passiven Transport durch K^+ -Kanäle in Endothelzellen muss es bei stark ansteigender K^+ -Konzentration im Extrazellulärraum und damit einem hohen Gradienten zum Plasma-Kalium nahezu zwangsläufig zu einem verstärktem K^+ -Ausstrom aus dem ZNS kommen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine OGD zu einem erhöhten Ausstrom von K^+ aus dem Hirn ins Blut bzw. in den Liquor cerebrospinalis führt [109, 196] und dass sich die Durchlässigkeit der BHS unter ischämischen Bedingungen für K^+ verändert [197].

Die Tatsache, dass der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust in striatalen Arealen beginnt, in denen bekanntermaßen die frühesten Schäden zu beobachten sind, belegt indirekt den Zusammenhang zwischen K^+/Tl^+ -Ausstrom und Zellschädigung. Unklar bleibt im Moment allerdings, wo die Schwellenwerte liegen, nach denen aus einem $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust in einem Voxel auf einen partiellen oder totalen Zusammenbruch der K^+ -Gradienten geschlossen werden kann. Der Versuch einer Ermittlung dieser Werte lag außerhalb der Fragestellung der vorliegenden Proof-of-Concept Studie. Prinzipiell erscheint dies durch Entnahme des Hirns zu bestimmten Zeitpunkten direkt nach der SPECT-Messung, während der Schadensausbreitung und anschließender histochemischer sowie autoradiographischer Bestimmung des Tl^+ -Gehalts einzelner Zellen, möglich.

Als wichtigstes Resultat gilt aber festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit mit der dynamischen ^{201}Tl -SPECT-Bildgebung eine neuartige Methodik gefunden wurde, um die Dynamik der Schadensausbreitung bei der fokalen zerebralen Ischämie *in-vivo* zu untersuchen. Einen Ansatz mit ähnlicher zugrundeliegender Logik haben Yushmanov und Kollegen [188] mit der MR-Bildgebung verfolgt. Sie untersuchten den Verlust des Kalium-Analogons Rubidium (^{87}Rb) aus einem zerebralen Infarkt in der Ratte. Allerdings konnte selbst bei millimolaren Konzentrationen von ^{87}Rb die Verteilung dieses Ions nur mit Auflösungen von $3,8\text{ mm}^3$ Voxelgröße gemessen werden. Da im Gegensatz zum $^{201}\text{Tl}^+$ auch keine Möglichkeit bestand, die BHS zu überwinden, musste den Versuchstieren 14 Tage lang Rubidium verabreicht werden, um die nötigen ZNS-Konzentrationen zu erreichen. Dieser Ansatz ist daher der ^{201}Tl -SPECT-Bildgebung unterlegen und auch nicht auf die Human-Bildgebung übertragbar.

Um die Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust in verschiedenen Voxeln quantitativ zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit für jeden Voxel eine Exponentialfunktion erster Ordnung ermittelt, die den Verlust am besten beschreibt. Dabei wurde eine Kinetik erster Ordnung unterstellt, nach der pro Zeiteinheit ein konstanter Prozentsatz des $^{201}\text{Tl}^+$ aus einem Voxel verloren geht. Diese Annahme ist nur zutreffend, wenn u. a. kein Rückstrom von $^{201}\text{Tl}^+$ aus dem Plasma oder kein Zustrom aus anderen Voxeln in die betreffenden Voxel stattfindet. Sie ist daher eine vereinfachende Annahme, welche vor allem aus der praktischen Erwägung getroffen wurde, mit möglichst einfachen Analysen zu beginnen.

Durch diese Analyse können die qualitativ in den Zeitreihen zu sehenden Unterschiede im $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust einzelner Voxel quantitativ in einer Karte zusammengefasst werden. Diese Karten zeigen deutliche Unterschiede in der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetik in verschiedenen Bereichen im Infarktreal, insbesondere im Infarktkern versus umgebende Randbereiche. Bemerkenswert ist dabei, dass trotz der Einfachheit des Ansatzes, die ermittelten Konstanten über die verschiedenen Gruppen der Versuchstiere hinweg ähnliche Werte aufweisen. Es erscheint damit möglich, unabhängig von der Lösung des Problems, der Bestimmung von Schwellenwerten des $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustes, für unterschiedliche Grade der Schädigung, Unterschiede in der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetik zwischen Individuen oder unterschiedlichen Versuchsgruppen quantitativ auszudrücken.

Einen ersten Beleg für diese Annahme liefern die Daten der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkinetik bei Versuchstieren, die mit MK-801 behandelt wurden. Diese Kinetik unterscheidet sich von der der unbehandelten Tiere, hinsichtlich der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstanten im Infarktkern und im umliegenden Gewebe, wobei der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust über die Zeit im gesamten Infarktreal gegenüber unbehandelten Tieren reduziert ist. Am stärksten ist der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust aber ebenfalls im Infarktkern ausgeprägt. Die Areale erhöhter $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustrate beschränkten sich auf das Corpus striatum.

Die Tatsache, dass der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust unter Einwirkung eines etablierten Therapeutikums geringer wird, ist gleichzeitig auch ein einfacher experimenteller Beleg dafür, dass dieser Verlust die fortschreitende Gewebsschädigung widerspiegelt.

Anhand der simultanen Darstellung der zerebralen Perfusion und der $^{201}\text{Tl}^+$ -Verteilung mit den Tracern $^{99\text{m}}\text{TcHMPAO}$ und $^{201}\text{Tl}^+\text{DIDC}$ konnte darüber hinaus ein Mismatch zwischen dem Areal verminderter Perfusion und den frühen Arealen verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung gefunden werden. Die Detektion einer Diskrepanz beider Areale und die darauffolgende fortschreitende Ausbreitung des Areals verminderter $^{201}\text{Tl}^+$ -Anreicherung legen unmittelbar die Annahme nahe, dass es sich bei dem Gewebe, welches zwar von der Minderperfusion, nicht aber von einer Reduktion im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt betroffen ist, um rettbares Penumbrawebe handelt. Um diese Annahme zu stützen, wurde geprüft, ob durch Applikation von MK-801, Teile des rettbaren Gewebes erhalten werden können. Dabei führte die Injektion von MK-801 30 min nach der MCAO zu einer Reduktion des Infarkt volumens um mehr als 50%. Eine Infarktreduktion von mehr als 50 % nach Mk-801 Gabe wurde für ähnliche experimentelle Bedingungen bereits beschrieben [164]. Dabei konnte eine Ausbreitung der Schadensregion in kortikale Bereiche verhindert werden und so das anfänglich als rettbar definierte Gewebe zu größeren Teilen, als in unbehandelten Tieren, erhalten werden.

Neben diesen Therapie-Effekten von MK-801 verdient noch ein weiterer Befund Erwähnung. Insbesondere in den Randbereichen des Infarkts schwankten in allen Individuen, aber auch in den über die Populationen einer Gruppe gemittelten Daten, die $^{201}\text{Tl}^+$ -Signale. Diese Schwankungen verringerten sich und änderten ihre Vorzugslokalisation unter Therapie mit MK-801. Es erscheint damit als möglich, dass sie der Ausdruck von Perinfarktdepolarisationen sind, oder präziser gesagt, von Schwankungen im K^+ -Gehalt, die ihrerseits in Zusammenhang mit Perinfarktdepolarisationen stehen. Die Datenlage erscheint aber im Moment zu unklar, um definitive Schlussfolgerungen zuzulassen. Es ist fraglich, ob die als schnelles Analyse-Instrument eingesetzten voxelweisen T-Tests der beste Weg sind, um Signal-Schwankungen von der Art der Perinfarktdepolarisationen robust zu detektieren. Letztlich müsste aber auch bei Bestätigung durch angemessenere Analyseverfahren der Beweis experimentell durch parallel mit der $^{201}\text{Tl}^+\text{DIDC}$ -SPECT eingesetzte elektrophysiologische Techniken erbracht werden.

9.3 Möglicher Stellenwert der $^{201}\text{Tl}^+\text{DIDC}$ -SPECT in der präklinischen *in-vivo* Bildgebung der akuten fokalen zerebralen Ischämie

Wie in der Einleitung ausgeführt, besteht der „Goldstandard“ in der *in-vivo* Diagnostik der akuten fokalen zerebralen Ischämie in der quantitativen Messung von zerebralem Blutfluss und Sauerstoffextraktion mittels PET. Dieses Verfahren ist tierexperimentell wegen der komplexen Logistik nur sehr begrenzt verfügbar. Aufgrund der Verwendung von ^{15}O , einem Radionuklid mit einer Positronen-Reichweite im Bereich von 1,9 mm [198] ist selbst bei Entwicklung neuer

Kleintier-PET-Scanner die räumliche Auflösung limitiert, was insbesondere die Messungen in der Maus beeinträchtigt.

Die derzeit bedeutendste Bildgebungsmodalität in der präklinischen *in-vivo* Bildgebung - worunter an dieser Stelle die Bildgebung des gesamten Hirns verstanden werden soll - der akuten fokalen zerebralen Ischämie, ist die Magnetresonanztomographie. Analog der Human-Bildgebung können perfusions- und diffusionsgewichtete Bilder angefertigt werden. Im Wesentlichen werden mit den verschiedenen gängigsten MRT-Sequenzen Veränderungen im Verhalten von Wassermolekülen abgebildet, während die Sensitivität der MRT für die Bildgebung von Stoffwechselprozessen im Vergleich zur PET-Bildgebung und der Radionuklid-Bildgebung allgemein in der Regel gering ist. Die Daten der vorliegenden Studie legen nahe, dass die ^{201}Tl -SPECT-Bildgebung mit ihrer relativ einfachen Logistik für Fragestellungen eingesetzt werden kann, die bisher nur mit der MRT bearbeitet wurden. Die Detektion des finalen Schadens mit ^{201}Tl -SPECT erscheint relativ einfach, und die Dynamik der Schadensausbreitung kann bei Einsatz hoher ^{201}Tl -Dosen möglicherweise mit höherer räumlich-zeitlicher Auflösung erfasst werden als mit der MRT. Einen besonderen Stellenwert könnte das ^{201}Tl -SPECT erlangen, wenn eine Quantifizierung rettbarer Gewebes möglich würde.

9.4 Ausblick auf eine mögliche Anwendung von ^{201}Tl -SPECT für die Diagnostik der akuten fokalen zerebralen Ischämie im Menschen

Der Fokus der vorliegenden Studie liegt auf der präklinischen Bildgebung und auf der Proof-of-Concept-Frage, ob die Visualisierung des zerebralen K^+ -Stoffwechsels mit ^{201}Tl -SPECT für die Diagnostik der akuten fokalen zerebralen Ischämie nützlich sein kann. Die Frage eines möglichen Einsatzes von ^{201}Tl -SPECT in der Humanmedizin ist aber natürlich von hoher Relevanz.

Dabei stellt sich grundsätzlich die Frage nach dem Verhältnis des Nutzens einer Diagnostik mit ^{201}Tl -SPECT gegenüber einem potentiellen Schaden durch die Strahlenexposition. Für die Praxis bedeutet dies, dass von vornherein ein Einsatz nur dann sinnvoll erscheint, wenn über die bloße Detektion des Schadens hinaus, die auch mit anderen Verfahren möglich ist, ein deutlicher zusätzlicher Nutzen besteht. Das könnte bei einer sicheren Diagnose rettbarer Gewebes der Fall sein.

Die Ergebnisse an Ratten, denen ^{201}Tl analog einem Einsatz in der Humanmedizin, nach Auslösung des Infarkts injiziert wurde, zeigen eindeutig, dass prinzipiell die gleiche ^{201}Tl -Verlustkinetik beobachtet werden kann, wie bei der Injektion von ^{201}Tl vor dem Infarkt.

Zwar fanden sich in zwei Tieren keine nennenswerten Verluste von $^{201}\text{TI}^+$ im Vergleich zur gesunden Hemisphäre, aber in diesen Tieren war die Endothelin-Dosis am geringsten und der finale Schaden erheblich kleiner, als in den Tieren mit höherer Endothelin-Dosis (7 mm^3 vs. 196 mm^3). Diese Ergebnisse bestätigen eher den möglichen Nutzen eines Einsatzes von $^{201}\text{TIDDC}$, als dass sie ihn widerlegen, da es sehr plausibel ist, dass bei diesen sehr kleinen Schäden die Infarktausbreitung zum Zeitpunkt der $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion schon abgeschlossen war. Sie zeigen, dass, wie bei der Injektion vor dem Infarkt, der $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt im Infarktbereich in Zusammenhang mit der Menge vitalen Gewebes steht

In gewisser Hinsicht ähnelt die Logik der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT der Messung der Sauerstoffextraktion mit PET. So wie mit PET in vitalem Gewebe im minderperfundierten Areal eine Extraktion von Sauerstoff gemessen wird, könnte theoretisch auch eine „Extraktion“ bzw. eine Retention von $^{201}\text{TI}^+$ im minderperfundierten Areal mit SPECT gemessen werden. Wie sich aus diesem Ansatz ein leicht praktikables Protokoll zur quantitativen Erfassung rettbarer Gewebes entwickeln lässt, bleibt aber noch näher zu untersuchen.

Deutlich einfacher als eine Quantifizierung rettbarer Gewebes könnte die posthoc Quantifizierung geretteten Gewebes in Therapieversuchen sein. Es erscheint möglich vor Einleiten der Therapie $^{201}\text{TIDDC}$ zu injizieren, die zerebrale Aufnahme zu messen, und den Verlust von $^{201}\text{TI}^+$ nach 24 h in therapierten vs. nicht-therapierten Patienten zu vergleichen.

9.5 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation gelang es die prinzipielle Eignung des neuartigen Verfahrens $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT für die *in-vivo* Kleintier-Bildgebung des zerebralen K^+ -Stoffwechsels bei fokaler zerebraler Ischämie zu bestätigen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass mit dem $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT die Dynamik der Schadensausbreitung bei der fokalen zerebralen Ischämie *in-vivo* verfolgt werden kann und dass die $^{201}\text{TI}^+$ -Verlustkinetik sich in unterschiedlich betroffenen Arealen unterscheidet. Durch die Darstellung eines Mismatch zwischen der zerebralen Perfusion und der $^{201}\text{TI}^+$ -Verteilung scheint es prinzipiell möglich, rettbares Gewebe von irreversibel geschädigtem Gewebe abzugrenzen.

Die Befunde legen unmittelbar die Verwendung der $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT für die *in-vivo* Bildgebung von zeitlich-räumlichen K^+ -Aktivitätsmustern auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen nahe. In diesem Zusammenhang konnten in verschiedenen Nagetiermodellen der Demenz bereits Unterschiede in der $^{201}\text{TI}^+$ -Aufnahme und Umverteilung beobachtet werden. Derzeit ist auf Basis dieser Befunde eine klinische Studie mit $^{201}\text{TIDDC}$ -SPECT in gesunden Probanden und in Patienten mit der Alzheimer Krankheit geplant.

Literaturverzeichnis

- [1] Lewis, I.: 16 Death from stroke 04 05 28, http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf?ua=1 (28.05.2016).
- [2] Heuschmann, P. U., Busse, O., Wagner, M., Endres, M., Villringer, A., Röther, J., Kolominsky-Rabas, P. L., Berger, K.: Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland, *Akt Neurol*, 2010, Jahrgang: 37, Seite 333–340.
- [3] Murray, C. J., Lopez, A. D.: Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study, *Lancet* (London, England), 1997, Jahrgang: 349 (9064), Seite 1498–1504.
- [4] Kolominsky-Rabas, P. L., Heuschmann, P. U., Marschall, D., Emmert, M., Baltzer, N., Neundorfer, B., Schoffski, O., Krobot, K. J.: Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2006, Jahrgang: 37 (5), Seite 1179–1183.
- [5] Boehringer Ingelheim: Gesundheitspolitik Schlaganfallprävention, https://www.boehringer-ingelheim.de/content/dam/internet/opu/de_DE/document/pdf/service/gesundheitspolitik/Gesundheitspolitik_Schlaganfallpraevention.pdf (28.05.2016).
- [6] Manning, N. W., Campbell, B. C. V., Oxley, T. J., Chapot, R.: Acute ischemic stroke: time, penumbra, and reperfusion, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2014, Jahrgang: 45 (2), Seite 640–644.
- [7] Jauch, E. C., Saver, J. L., Adams, H. P., JR, Bruno, A., Connors, J. J. B., Demaerschalk, B. M., Khatri, P., McMullan, P. W., JR, Qureshi, A. I., Rosenfield, K., Scott, P. A., Summers, D. R., Wang, D. Z., Wintermark, M., Yonas, H.: Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2013, Jahrgang: 44 (3), Seite 870–947.
- [8] Grefkes, C., Ward, N. S.: Cortical reorganization after stroke: how much and how functional?, *The Neuroscientist a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 2014, Jahrgang: 20 (1), Seite 56–70.
- [9] Rothwell, P. M., Algra, A., Amarenco, P.: Medical treatment in acute and long-term secondary prevention after transient ischaemic attack and ischaemic stroke, *The Lancet*, 2011, Jahrgang: 377 (9778), Seite 1681–1692.

-
- [10] Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen, 9. Aufl. (Hg.: Siegenthaler, W., Amann-Vesti, B. R.), Thieme, Stuttgart, 2006.
- [11] Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A.: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends in neurosciences*, 1999, Jahrgang: 22 (9), Seite 391–397.
- [12] Siesjo, B. K., Ekholm, A., Katsura, K., Theander, S.: Acid-base changes during complete brain ischemia, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1990, Jahrgang: 21 (11 Suppl), Seite 9.
- [13] Sokoloff, L.: Energetics of functional activation in neural tissues, *Neurochemical research*, 1999, Jahrgang: 24 (2), Seite 321–329.
- [14] Astrup, J., Symon, L., Branston, N. M., Lassen, N. A.: Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1977, Jahrgang: 8 (1), Seite 51–57.
- [15] Choi, D. W., Rothman, S. M.: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death, *Annual review of neuroscience*, 1990, Jahrgang: 13, Seite 171–182.
- [16] Chan, P. H.: Role of oxidants in ischemic brain damage, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1996, Jahrgang: 27 (6), Seite 1124–1129.
- [17] Samdani, A. F., Dawson, T. M., Dawson, V. L.: Nitric oxide synthase in models of focal ischemia, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1997, Jahrgang: 28 (6), Seite 1283–1288.
- [18] Nedergaard, M., Astrup, J.: Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and ¹⁴C-2-deoxyglucose phosphorylation, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1986, Jahrgang: 6 (5), Seite 607–615.
- [19] Hossmann, K. A.: Periarct depolarizations, *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*, 1996, Jahrgang: 8 (3), Seite 195–208.
- [20] Nakamura, H., Strong, A. J., Dohmen, C., Sakowitz, O. W., Vollmar, S., Sue, M., Kracht, L., Hashemi, P., Bhatia, R., Yoshimine, T., Dreier, J. P., Dunn, A. K., Graf, R.: Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions, *Brain a journal of neurology*, 2010, Jahrgang: 133 (Pt 7), Seite 1994–2006.
- [21] Heiss, W.-D.: The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011, *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 2011, Jahrgang: 32 (4), Seite 307–320.
- [22] Cerebral ischemia: Molecular and cellular pathophysiology, *Contemporary neuroscience* (Hg.: Walz, W.), Humana Press, Totowa, NJ, 1999.

-
- [23] Dreier, J. P.: The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease, *Nature medicine*, 2011, Jahrgang: 17 (4), Seite 439–447.
- [24] Lauritzen, M., Dreier, J. P., Fabricius, M., Hartings, J. A., Graf, R., Strong, A. J.: Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2011, Jahrgang: 31 (1), Seite 17–35.
- [25] Somjen, G. G.: Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization, *Physiological reviews*, 2001, Jahrgang: 81 (3), Seite 1065–1096.
- [26] Back, T., Kohno, K., Hossmann, K. A.: Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1994, Jahrgang: 14 (1), Seite 12–19.
- [27] Graf, R.: XVII international Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism. Cologne, Germany, 2-6 July 1995. Abstracts, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1995, Jahrgang: 15 Suppl 1, Seite S15.
- [28] Mies, G., Iijima, T., Hossmann, K. A.: Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat, *Neuroreport*, 1993, Jahrgang: 4 (6), Seite 709–711.
- [29] Gill, R., Andine, P., Hillered, L., Persson, L., Hagberg, H.: The effect of MK-801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischaemia in the rat, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1992, Jahrgang: 12 (3), Seite 371–379.
- [30] Iijima, T., Mies, G., Hossmann, K. A.: Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1992, Jahrgang: 12 (5), Seite 727–733.
- [31] Siesjo, B. K., Siesjo, P.: Mechanisms of secondary brain injury, *European journal of anaesthesiology*, 1996, Jahrgang: 13 (3), Seite 247–268.
-

-
- [32] Sims, N. R.: Calcium, energy metabolism and the development of selective neuronal loss following short-term cerebral ischemia, *Metabolic brain disease*, 1995, Jahrgang: 10 (3), Seite 191–217.
- [33] Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., Dirnagl, U.: Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1998, Jahrgang: 18 (2), Seite 196–205.
- [34] Astrup, J., Siesjo, B. K., Symon, L.: Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1981, Jahrgang: 12 (6), Seite 723–725.
- [35] Heiss, W. D., Rosner, G.: Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia, *Annals of neurology*, 1983, Jahrgang: 14 (3), Seite 294–301.
- [36] Heiss, W. D.: Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1992, Jahrgang: 23 (11), Seite 1668–1672.
- [37] del Zoppo, G. J., Sharp, F. R., Heiss, W.-D., Albers, G. W.: Heterogeneity in the penumbra, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2011, Jahrgang: 31 (9), Seite 1836–1851.
- [38] Heiss, W. D.: Kritische Mangelperfusion als wichtigster pathophysiologischer Faktor für die Behandlung des ischämischen Insults, *J. Neurol. Neurochir. Psychiatr*, 2002.
- [39] Baron, J. C., Rougemont, D., Soussaline, F., Bustany, P., Cruzel, C., Bousser, M. G., Comar, D.: Local interrelationships of cerebral oxygen consumption and glucose utilization in normal subjects and in ischemic stroke patients: a positron tomography study, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1984, Jahrgang: 4 (2), Seite 140–149.
- [40] Powers, W. J., Grubb, R. L., JR, Darriet, D., Raichle, M. E.: Cerebral blood flow and cerebral metabolic rate of oxygen requirements for cerebral function and viability in humans, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1985, Jahrgang: 5 (4), Seite 600–608.
- [41] Hossmann, K. A.: Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia, *Annals of neurology*, 1994, Jahrgang: 36 (4), Seite 557–565.

-
- [42] Furlan, M., Marchal, G., Viader, F., Derlon, J. M., Baron, J. C.: Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra, *Annals of neurology*, 1996, Jahrgang: 40 (2), Seite 216–226.
- [43] Heiss, W. D., Huber, M., Fink, G. R., Herholz, K., Pietrzyk, U., Wagner, R., Wienhard, K.: Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1992, Jahrgang: 12 (2), Seite 193–203.
- [44] Heiss, W. D., Graf, R.: The ischemic penumbra, *Current opinion in neurology*, 1994, Jahrgang: 7 (1), Seite 11–19.
- [45] Hakim, A. M.: The cerebral ischemic penumbra, *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 1987, Jahrgang: 14 (4), Seite 557–559.
- [46] Hossmann, K. A.: Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised, *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 1994, Jahrgang: 4 (1), Seite 23–36.
- [47] Sun, L., Kuroiwa, T., Ishibashi, S., Miki, K., Li, S., Xu, H., Endo, S., Mizusawa, H.: Two region-dependent pathways of eosinophilic neuronal death after transient cerebral ischemia, *Neuropathology official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 2009, Jahrgang: 29 (1), Seite 45–54.
- [48] Hossmann, K.-A.: Cerebral ischemia: models, methods and outcomes, *Neuropharmacology*, 2008, Jahrgang: 55 (3), Seite 257–270.
- [49] Olmos, J. S. de, Beltramino, C. A., de Olmos de Lorenzo, S: Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma, *Neurotoxicology and teratology*, 1994, Jahrgang: 16 (6), Seite 545–561.
- [50] Vogel, J., Mobius, C., Kuschinsky, W.: Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1999, Jahrgang: 30 (5), Seite 1134–1141.
- [51] Victorov, I. V., Prass, K., Dirnagl, U.: Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin, *Brain research. Brain research protocols*, 2000, Jahrgang: 5 (2), Seite 135–139.
- [52] Liszczak, T. M., Hedley-Whyte, E. T., Adams, J. F., Han, D. H., Kolluri, V. S., Vacanti, F. X., Heros, R. C., Zervas, N. T.: Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain, *Acta neuropathologica*, 1984, Jahrgang: 65 (2), Seite 150–157.
- [53] Popp, A., Jaenisch, N., Witte, O. W., Frahm, C.: Identification of ischemic regions in a rat model of stroke, *PloS one*, 2009, Jahrgang: 4 (3), Seite e4764.
-

-
- [54] Unal Cevik, I., Dalkara, T.: Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury, *Cell death and differentiation*, 2003, Jahrgang: 10 (8), Seite 928–929.
- [55] Zille, M., Farr, T. D., Przesdzing, I., Muller, J., Sommer, C., Dirnagl, U., Wunder, A.: Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2012, Jahrgang: 32 (2), Seite 213–231.
- [56] *Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung ; mit 161 Tabellen*, 4. Aufl. (Hg.: Kramme, R.), Springer, Berlin, 2011.
- [57] Herzog, H., Rösch, F.: PET- und SPECT-Technik, *Pharmazie in unserer Zeit*, 2005, Jahrgang: 34 (6), Seite 468–473.
- [58] Rodriguez-Villafuerte, M., Yang, Y., Cherry, S. R.: A Monte Carlo investigation of the spatial resolution performance of a small-animal PET scanner designed for mouse brain imaging studies, *Physica medica PM an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 2014, Jahrgang: 30 (1), Seite 76–85.
- [59] Heiss, W. D., Graf, R., Wienhard, K., Lottgen, J., Saito, R., Fujita, T., Rosner, G., Wagner, R.: Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1994, Jahrgang: 14 (6), Seite 892–902.
- [60] Giffard, C., Young, A. R., Kerrouche, N., Derlon, J.-M., Baron, J.-C.: Outcome of acutely ischemic brain tissue in prolonged middle cerebral artery occlusion: a serial positron emission tomography investigation in the baboon, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2004, Jahrgang: 24 (5), Seite 495–508.
- [61] Frykholm, P., Andersson, J. L., Valtysson, J., Silander, H. C., Hillered, L., Persson, L., Olsson, Y., Yu, W. R., Westerberg, G., Watanabe, Y., Langstrom, B., Enblad, P.: A metabolic threshold of irreversible ischemia demonstrated by PET in a middle cerebral artery occlusion-reperfusion primate model, *Acta neurologica Scandinavica*, 2000, Jahrgang: 102 (1), Seite 18–26.
- [62] Sakoh, M., Ostergaard, L., Rohl, L., Smith, D. F., Simonsen, C. Z., Sorensen, J. C., Poulsen, P. V., Gyldensted, C., Sakaki, S., Gjedde, A.: Relationship between residual cerebral blood flow and oxygen metabolism as predictive of ischemic tissue viability: sequential multitracer positron emission tomography scanning of middle cerebral

- artery occlusion during the critical first 6 hours after stroke in pigs, *Journal of neurosurgery*, 2000, Jahrgang: 93 (4), Seite 647–657.
- [63] Fisher, M., Bastan, B.: Identifying and utilizing the ischemic penumbra, *Neurology*, 2012, Jahrgang: 79 (13 Suppl 1), Seite 85.
- [64] Masdeu, J. C., Irimia, P., Asenbaum, S., Bogousslavsky, J., Brainin, M., Chabriat, H., Herholz, K., Markus, H. S., Martinez-Vila, E., Niederkorn, K., Schellinger, P. D., Seitz, R. J.: EFNS guideline on neuroimaging in acute stroke. Report of an EFNS task force, *European journal of neurology*, 2006, Jahrgang: 13 (12), Seite 1271–1283.
- [65] Heiss, W.-D., Sorensen, A. G.: Advances in imaging, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2009, Jahrgang: 40 (5), Seite e313-4.
- [66] Heiss, W. D., Grond, M., Thiel, A., Ghaemi, M., Sobesky, J., Rudolf, J., Bauer, B., Wienhard, K.: Permanent cortical damage detected by flumazenil positron emission tomography in acute stroke, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1998, Jahrgang: 29 (2), Seite 454–461.
- [67] Helmholtz Zentrum Dresden Rossendorf: Zyklotrons zur Radionuklidherstellung in Deutschland - Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, HZDR, <https://www.hzdr.de/db/Cms?pOid=12849&pNid=786> (28.05.2016).
- [68] Baron, J. C.: Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment, *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 1999, Jahrgang: 9 (4), Seite 193–201.
- [69] Heiss, W. D., Kracht, L. W., Thiel, A., Grond, M., Pawlik, G.: Penumbral probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischaemia, *Brain a journal of neurology*, 2001, Jahrgang: 124 (Pt 1), Seite 20–29.
- [70] Read, S. J., Hirano, T., Abbott, D. F., Markus, R., Sachinidis, J. I., Tochon-Danguy, H. J., Chan, J. G., Egan, G. F., Scott, A. M., Bladin, C. F., McKay, W. J., Donnan, G. A.: The fate of hypoxic tissue on 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography after ischemic stroke, *Annals of neurology*, 2000, Jahrgang: 48 (2), Seite 228–235.
- [71] Read, S. J., Hirano, T., Abbott, D. F., Sachinidis, J. I., Tochon-Danguy, H. J., Chan, J. G., Egan, G. F., Scott, A. M., Bladin, C. F., McKay, W. J., Donnan, G. A.: Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and 18F-fluoromisonidazole, *Neurology*, 1998, Jahrgang: 51 (6), Seite 1617–1621.
- [72] Heiss, W. D., Kracht, L., Grond, M., Rudolf, J., Bauer, B., Wienhard, K., Pawlik, G.: Early (11)CFlumazenil/H(2)O positron emission tomography predicts irreversible ischemic cortical damage in stroke patients receiving acute thrombolytic therapy, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2000, Jahrgang: 31 (2), Seite 366–369.

- [73] Heiss, W.-D., Sobesky, J., Smekal, U. v., Kracht, L. W., Lehnhardt, F.-G., Thiel, A., Jacobs, A. H., Lackner, K.: Probability of cortical infarction predicted by flumazenil binding and diffusion-weighted imaging signal intensity: a comparative positron emission tomography/magnetic resonance imaging study in early ischemic stroke, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2004, Jahrgang: 35 (8), Seite 1892–1898.
- [74] Sobrado, M., Delgado, M., Fernandez-Valle, E., Garcia-Garcia, L., Torres, M., Sanchez-Prieto, J., Vivancos, J., Manzanares, R., Moro, M. A., Pozo, M. A., Lizasoain, I.: Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats, *NeuroImage*, 2011, Jahrgang: 57 (1), Seite 45–54.
- [75] Hoh, C. K.: Clinical use of FDG PET, *Nuclear medicine and biology*, 2007, Jahrgang: 34 (7), Seite 737–742.
- [76] Pimlott, S. L., Sutherland, A.: Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease, *Chemical Society reviews*, 2011, Jahrgang: 40 (1), Seite 149–162.
- [77] Nasu, S., Hata, T., Nakajima, T., Suzuki, Y.: Evaluation of 18F-FDG PET in acute ischemic stroke: assessment of hyper accumulation around the lesion, *Kaku igaku. The Japanese journal of nuclear medicine*, 2002, Jahrgang: 39 (2), Seite 103–110.
- [78] Martin, A., Rojas, S., Pareto, D., Santalucia, T., Millan, O., Abasolo, I., Gomez, V., Llop, J., Gispert, J. D., Falcon, C., Bargallo, N., Planas, A. M.: Depressed glucose consumption at reperfusion following brain ischemia does not correlate with mitochondrial dysfunction and development of infarction: an in vivo positron emission tomography study, *Current neurovascular research*, 2009, Jahrgang: 6 (2), Seite 82–88.
- [79] Bunevicius, A., Yuan, H., Lin, W.: The potential roles of 18F-FDG-PET in management of acute stroke patients, *BioMed research international*, 2013, Jahrgang: 2013, Seite 634598.
- [80] Walberer, M., Backes, H., Rueger, M. A., Neumaier, B., Endepols, H., Hoehn, M., Fink, G. R., Schroeter, M., Graf, R.: Potential of early (18)F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography for identifying hypoperfusion and predicting fate of tissue in a rat embolic stroke model, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2012, Jahrgang: 43 (1), Seite 193–198.
- [81] Heiss, W.-D., Sobesky, J.: Comparison of PET and DW/PW-MRI in acute ischemic stroke, *The Keio journal of medicine*, 2008, Jahrgang: 57 (3), Seite 125–131.
- [82] Weishaupt, D., Koechli, V. D., Marincek, B.: *Wie funktioniert MRI?: Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanztomographie ; mit 9 Tabellen*, 6. Aufl., Springer, Heidelberg, 2009.

- [83] Siemens AG: Magnete, Spins und Resonanzen, Eine Einführung in die Grundlagen der Magnetresonanztomographie, Siemens Medical Solutions Magnetresonanztomographie Erlangen, 2003 - Google-Suche, <https://www.google.de/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=Magnete%2C+Spins+und+Resonanzen%2C+Eine+Einf%C3%BChrung+in+die+Grundlagen+der+Magnetresonanztomographie%2C+Siemens+Medical+Solutions+Magnetresonanztomographie+Erlangen%2C+2003> (13.06.2016).
- [84] Muir, K. W., Buchan, A., Kummer, R. von, Rother, J., Baron, J.-C.: Imaging of acute stroke, *The Lancet. Neurology*, 2006, Jahrgang: 5 (9), Seite 755–768.
- [85] Warach, S., Gaa, J., Siewert, B., Wielopolski, P., Edelman, R. R.: Acute human stroke studied by whole brain echo planar diffusion-weighted magnetic resonance imaging, *Annals of neurology*, 1995, Jahrgang: 37 (2), Seite 231–241.
- [86] Heiss, W.-D., Sobesky, J., Hesselmann, V.: Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2004, Jahrgang: 35 (11 Suppl 1), Seite 2671–2674.
- [87] Donnan, G. A., Baron, J.-C., Ma, H., Davis, S. M.: Penumbral selection of patients for trials of acute stroke therapy, *The Lancet Neurology*, 2009, Jahrgang: 8 (3), Seite 261–269.
- [88] Web generated by WebSnadno.cz service, for content is responsible external user.: 7.30-Magnetická rezonance | Diagnostický a terapeutický manuál cévních onemocnění mozku, <http://cmp-manual.wbs.cz/730-Magneticka-rezonance.html> (01.06.2016).
- [89] Grandin, C. B., Duprez, T. P., Smith, A. M., Oppenheim, C., Peeters, A., Robert, A. R., Cosnard, G.: Which MR-derived perfusion parameters are the best predictors of infarct growth in hyperacute stroke? Comparative study between relative and quantitative measurements, *Radiology*, 2002, Jahrgang: 223 (2), Seite 361–370.
- [90] Kidwell, C. S., Alger, J. R., Saver, J. L.: Beyond mismatch: evolving paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2003, Jahrgang: 34 (11), Seite 2729–2735.
- [91] Davis, S. M., Donnan, G. A., Parsons, M. W., Levi, C., Butcher, K. S., Peeters, A., Barber, P. A., Bladin, C., Silva, D. A. de, Byrnes, G., Chalk, J. B., Fink, J. N., Kimber, T. E., Schultz, D., Hand, P. J., Frayne, J., Hankey, G., Muir, K., Gerraty, R., Tress, B. M., Desmond, P. M.: Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET), *The Lancet Neurology*, 2008, Jahrgang: 7 (4), Seite 299–309.
- [92] Thomalla, G., Schwark, C., Sobesky, J., Bluhmki, E., Fiebich, J. B., Fiehler, J., Zaro Weber, O., Kucinski, T., Juettler, E., Ringleb, P. A., Zeumer, H., Weiller, C., Hacke,

- W., Schellinger, P. D., Rother, J.: Outcome and symptomatic bleeding complications of intravenous thrombolysis within 6 hours in MRI-selected stroke patients: comparison of a German multicenter study with the pooled data of ATLANTIS, ECASS, and NINDS tPA trials, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2006, Jahrgang: 37 (3), Seite 852–858.
- [93] Schulz, U. G. R., Briley, D., Meagher, T., Molyneux, A., Rothwell, P. M.: Abnormalities on diffusion weighted magnetic resonance imaging performed several weeks after a minor stroke or transient ischaemic attack, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2003, Jahrgang: 74 (6), Seite 734–738.
- [94] Leithner, C., Fuchtemeier, M., Jorks, D., Mueller, S., Dirnagl, U., Rojl, G.: Infarct Volume Prediction by Early Magnetic Resonance Imaging in a Murine Stroke Model Depends on Ischemia Duration and Time of Imaging, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2015, Jahrgang: 46 (11), Seite 3249–3259.
- [95] Farr, T. D., Wegener, S.: Use of magnetic resonance imaging to predict outcome after stroke: a review of experimental and clinical evidence, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2010, Jahrgang: 30 (4), Seite 703–717.
- [96] Wintermark, M.: Brain perfusion-CT in acute stroke patients, *European radiology*, 2005, Jahrgang: 15 Suppl 4, Seite 31.
- [97] Agarwal, S., Jones, P. S., Alawneh, J. A., Antoun, N. M., Barry, P. J., Carrera, E., Cotter, P. E., O'Brien, E. W., Salih, I., Scoffings, D. J., Baron, J.-C., Warburton, E. A.: Does perfusion computed tomography facilitate clinical decision making for thrombolysis in unselected acute patients with suspected ischaemic stroke?, *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 2011, Jahrgang: 32 (3), Seite 227–233.
- [98] Hoeffner, E. G., Case, I., Jain, R., Gujar, S. K., Shah, G. V., Deveikis, J. P., Carlos, R. C., Thompson, B. G., Harrigan, M. R., Mukherji, S. K.: Cerebral perfusion CT: technique and clinical applications, *Radiology*, 2004, Jahrgang: 231 (3), Seite 632–644.
- [99] Parsons, M. W., Pepper, E. M., Bateman, G. A., Wang, Y., Levi, C. R.: Identification of the penumbra and infarct core on hyperacute noncontrast and perfusion CT, *Neurology*, 2007, Jahrgang: 68 (10), Seite 730–736.
- [100] Marien-Hospital Euskirchen: Marien-Hospital Euskirchen: Radiologie: Computertomographie, <http://www.marien-hospital.com/klinik/informationen-fuer-fachkreise/radiologie-nuklearmedizin/diagnostik-und-therapie/computertomographie/> (28.05.2016).

- [101] Biesbroek, J. M., Niesten, J. M., Dankbaar, J. W., Biessels, G. J., Velthuis, B. K., Reitsma, J. B., van der Schaaf, I C: Diagnostic accuracy of CT perfusion imaging for detecting acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis, *Cerebrovascular diseases* (Basel, Switzerland), 2013, Jahrgang: 35 (6), Seite 493–501.
- [102] Dani, K. A., Thomas, R. G. R., Chappell, F. M., Shuler, K., Muir, K. W., Wardlaw, J. M.: Systematic review of perfusion imaging with computed tomography and magnetic resonance in acute ischemic stroke: heterogeneity of acquisition and postprocessing parameters: a translational medicine research collaboration multicentre acute stroke imaging study, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2012, Jahrgang: 43 (2), Seite 563–566.
- [103] Ritt, P., Hornegger, J., Kuwert, T.: Technik und physikalische Aspekte der SPECT/CT, *Nuklearmediziner*, 2011, Jahrgang: 34 (01), Seite 9–20.
- [104] Wikipedia: Photomultiplier schema de - Photomultiplier, <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=152861579> (28.05.2016).
- [105] Lackas, C.: Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging: Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System, *Schriften des Forschungszentrums Jülich - Reihe Lebenswissenschaften/Life sciences*, Aufl.30, Forschungszentrum Jülich, Jülich, 2006.
- [106] MILabs: Clinical Imaging Systems | MILabs, http://www.milabs.com/imaging-solutions/clinical_imaging_systems/ (28.05.2016).
- [107] van der Have, F., Vastenhouw, B., Ramakers, R. M., Branderhorst, W., Krah, J. O., Ji, C., Staelens, S. G., Beekman, F. J.: U-SPECT-II: An Ultra-High-Resolution Device for Molecular Small-Animal Imaging, *Journal of nuclear medicine official publication, Society of Nuclear Medicine*, 2009, Jahrgang: 50 (4), Seite 599–605.
- [108] Beekman, F., van der Have, F.: The pinhole: gateway to ultra-high-resolution three-dimensional radionuclide imaging, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2007, Jahrgang: 34 (2), Seite 151–161.
- [109] Hossmann, K. A., Sakaki, S., Zimmerman, V.: Cation activities in reversible ischemia of the cat brain, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1977, Jahrgang: 8 (1), Seite 77–81.
- [110] Taylor, C. P., Weber, M. L., Gaughan, C. L., Lehning, E. J., LoPachin, R. M.: Oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices: altered intraneuronal elemental composition predicts structural and functional damage, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 1999, Jahrgang: 19 (2), Seite 619–629.

- [111] Mies, G., Kloiber, O., Drewes, L. R., Hossmann, K. A.: Cerebral blood flow and regional potassium distribution during focal ischemia of gerbil brain, *Annals of neurology*, 1984, Jahrgang: 16 (2), Seite 232–237.
- [112] HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D.: The potassium permeability of a giant nerve fibre, *The Journal of physiology*, 1955, Jahrgang: 128 (1), Seite 61–88.
- [113] Gehring, P. J., Hammond, P. B.: The interrelationship between thallium and potassium in animals, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1967, Jahrgang: 155 (1), Seite 187–201.
- [114] Landowne, D.: A comparison of radioactive thallium and potassium fluxes in the giant axon of the squid, *The Journal of physiology*, 1975, Jahrgang: 252 (1), Seite 79–96.
- [115] Weaver, C. D., Harden, D., Dworetzky, S. I., Robertson, B., Knox, R. J.: A thallium-sensitive, fluorescence-based assay for detecting and characterizing potassium channel modulators in mammalian cells, *Journal of biomolecular screening*, 2004, Jahrgang: 9 (8), Seite 671–677.
- [116] Li, Q., Rottlander, M., Xu, M., Christoffersen, C. T., Frederiksen, K., Wang, M.-W., Jensen, H. S.: Identification of novel KCNQ4 openers by a high-throughput fluorescence-based thallium flux assay, *Analytical biochemistry*, 2011, Jahrgang: 418 (1), Seite 66–72.
- [117] Lebowitz, E., Greene, M. W., Fairchild, R., Bradley-Moore, P. R., Atkins, H. L., Ansari, A. N., Richards, P., Belgrave, E.: Thallium-201 for medical use. I, *Journal of nuclear medicine official publication, Society of Nuclear Medicine*, 1975, Jahrgang: 16 (2), Seite 151–155.
- [118] Goldschmidt, J., Zuschratter, W., Scheich, H.: High-resolution mapping of neuronal activity by thallium autometallography, *NeuroImage*, 2004, Jahrgang: 23 (2), Seite 638–647.
- [119] Wanger, T., Scheich, H., Ohl, F. W., 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*, 2012, Jahrgang: 122 (1), Seite 106–114.
- [120] Goldschmidt, J., Wanger, T., Engelhorn, A., Friedrich, H., Happel, M., Ilango, A., Engelmann, M., Stuermer, I. W., Ohl, F. W., Scheich, H.: High-resolution mapping of neuronal activity using the lipophilic thallium chelate complex TIDDC: protocol and validation of the method, *NeuroImage*, 2010, Jahrgang: 49 (1), Seite 303–315.
- [121] Bruine, J. F. de, van Royen, E. A., Vyth, A., Jong, J. M. de, van der Schoot, J B: Thallium-201 diethyldithiocarbamate: an alternative to iodine-123 N-isopropyl-p-iodoamphetamine, *Journal of nuclear medicine official publication, Society of Nuclear Medicine*, 1985, Jahrgang: 26 (8), Seite 925–930.

- [122] Ballinger, J. R., Gerson, B., Gulenchyn, K. Y.: Technetium-99m diethyldithiocarbamate (DDC): comparison with thallium-201 DDC as an agent for brain imaging, *International journal of radiation applications and instrumentation. Part A, Applied radiation and isotopes*, 1987, Jahrgang: 38 (8), Seite 665–668.
- [123] Danscher, G.: Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy, *Histochemistry*, 1981, Jahrgang: 71 (1), Seite 1–16.
- [124] 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, *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 2006, Jahrgang: 41 (2), Seite 57–139.
- [125] Schreiber, S., Bueche, C. Z., Garz, C., Kropf, S., Angenstein, F., Goldschmidt, J., Neumann, J., Heinze, H. J., Goertler, M., Reymann, K. G., Braun, H.: The pathologic cascade of cerebrovascular lesions in SHRSP: is erythrocyte accumulation an early phase?, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2012, Jahrgang: 32 (2), Seite 278–290.
- [126] Lison, H., Happel, M. F. K., Schneider, F., Baldauf, K., Kerbstat, S., Seelbinder, B., Schneeberg, J., Zappe, M., Goldschmidt, J., Budinger, E., Schroder, U. H., Ohl, F. W., Schilling, S., Demuth, H.-U., Scheich, H., Reymann, K. G., Ronicke, R.: Disrupted cross-laminar cortical processing in beta amyloid pathology precedes cell death, *Neurobiology of disease*, 2014, Jahrgang: 63, Seite 62–73.
- [127] Stober, F., Baldauf, K., Ziabreva, I., Harhausen, D., Zille, M., Neubert, J., Reymann, K. G., Scheich, H., Dirnagl, U., Schroder, U. H., Wunder, A., Goldschmidt, J.: Single-cell resolution mapping of neuronal damage in acute focal cerebral ischemia using thallium autometallography, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2014, Jahrgang: 34 (1), Seite 144–152.
- [128] Macharadze, T., Pielot, R., Wanger, T., Scheich, H., Gundelfinger, E. D., Budinger, E., Goldschmidt, J., Kreutz, M. R.: Altered neuronal activity patterns in the visual cortex of the adult rat after partial optic nerve crush--a single-cell resolution metabolic mapping study, *Cerebral cortex (New York, N.Y. 1991)*, 2012, Jahrgang: 22 (8), Seite 1824–1833.
- [129] Ginsberg, M. D., Busto, R.: Rodent models of cerebral ischemia, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1989, Jahrgang: 20 (12), Seite 1627–1642.

-
- [130] Traystman, R. J.: Animal models of focal and global cerebral ischemia, ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, 2003, Jahrgang: 44 (2), Seite 85–95.
- [131] Karpiak, S. E., Tagliavia, A., Wakade, C. G.: Animal models for the study of drugs in ischemic stroke, Annual review of pharmacology and toxicology, 1989, Jahrgang: 29, Seite 403–414.
- [132] Stroke: Pathophysiology, diagnosis, and management (Hg.: Barnett, H. J. M.), Churchill Livingstone, New York, 1986.
- [133] Macrae, I. M.: Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia, British journal of pharmacology, 2011, Jahrgang: 164 (4), Seite 1062–1078.
- [134] Trepel, M.: Neuroanatomie: Struktur und Funktion ; [Online-Zugang + interaktive Extras], 4. Aufl., StudentConsult, Elsevier, Urban & Fischer, München, Jena, 2008.
- [135] Balkaya, M., Krober, J. M., Rex, A., Endres, M.: Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia, Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2013, Jahrgang: 33 (3), Seite 330–338.
- [136] Schaar, K. L., Brenneman, M. M., Savitz, S. I.: Functional assessments in the rodent stroke model, Experimental & translational stroke medicine, 2010, Jahrgang: 2 (1), Seite 13.
- [137] Bardutzky, J., Shen, Q., Henninger, N., Bouley, J., Duong, T. Q., Fisher, M.: Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging, Stroke; a journal of cerebral circulation, 2005, Jahrgang: 36 (9), Seite 2000–2005.
- [138] Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., Ooneda, G.: Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area., Jpn J Stroke, 1986, Jahrgang: 8, Seite 1–8.
- [139] Hara, H., Huang, P. L., Panahian, N., Fishman, M. C., Moskowitz, M. A.: Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion, Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1996, Jahrgang: 16 (4), Seite 605–611.
- [140] Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., Cummins, R.: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, Stroke; a journal of cerebral circulation, 1989, Jahrgang: 20 (1), Seite 84–91.

-
- [141] Takano, K., Tatlisumak, T., Bergmann, A. G., Gibson, D. G. 3., Fisher, M.: Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats, *Journal of the neurological sciences*, 1997, Jahrgang: 153 (1), Seite 8–11.
- [142] Durukan, A., Tatlisumak, T.: Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2007, Jahrgang: 87 (1), Seite 179–197.
- [143] Asano, T., Ikegaki, I., Suzuki, Y., Satoh, S., Shibuya, M.: Endothelin and the production of cerebral vasospasm in dogs, *Biochemical and biophysical research communications*, 1989, Jahrgang: 159 (3), Seite 1345–1351.
- [144] Robinson, M. J., McCulloch, J.: Contractile responses to endothelin in feline cortical vessels in situ, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1990, Jahrgang: 10 (2), Seite 285–289.
- [145] Reid, J. L., Dawson, D., Macrae, I. M.: Endothelin, cerebral ischaemia and infarction, *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. 1993)*, 1995, Jahrgang: 17 (1-2), Seite 399–407.
- [146] Endepols, H., Mertgens, H., Backes, H., Himmelreich, U., Neumaier, B., Graf, R., Mies, G.: Longitudinal assessment of infarct progression, brain metabolism and behavior following anterior cerebral artery occlusion in rats, *Journal of neuroscience methods*, 2015, Jahrgang: 253, Seite 279–291.
- [147] Agnati, L. F., Zoli, M., Kurosawa, M., Benfenati, F., Biagini, G., Zini, I., Hallstrom, A., Ungerstedt, U., Toffano, G., Fuxe, K.: A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1, *Italian journal of neurological sciences*, 1991, Jahrgang: 12 (3 Suppl 11), Seite 49–53.
- [148] Macrae, I. M., Robinson, M. J., Graham, D. I., Reid, J. L., McCulloch, J.: Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1993, Jahrgang: 13 (2), Seite 276–284.
- [149] Sharkey, J., Ritchie, I. M., Kelly, P. A.: Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1993, Jahrgang: 13 (5), Seite 865–871.
- [150] Sharkey, J., Butcher, S. P.: Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle
-

- cerebral artery, *Journal of neuroscience methods*, 1995, Jahrgang: 60 (1-2), Seite 125–131.
- [151] Robinson, M. J., Macrae, I. M., Todd, M., Reid, J. L., McCulloch, J.: Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat, *Neuroscience letters*, 1990, Jahrgang: 118 (2), Seite 269–272.
- [152] Biernaskie, J., Corbett, D., Peeling, J., Wells, J., Lei, H.: A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats, *Magnetic resonance in medicine*, 2001, Jahrgang: 46 (4), Seite 827–830.
- [153] O'Neill, M. J., Clemens, J. A.: Rodent models of focal cerebral ischemia, *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, 2001, Jahrgang: Chapter 9, Seite Unit9.6.
- [154] Mecca, A. P., O'Connor, T. E., Katovich, M. J., Sumners, C.: Candesartan pretreatment is cerebroprotective in a rat model of endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion, *Experimental physiology*, 2009, Jahrgang: 94 (8), Seite 937–946.
- [155] Ward, N. M., Sharkey, J., Marston, H. M., Brown, V. J.: Simple and choice reaction-time performance following occlusion of the anterior cerebral arteries in the rat, *Experimental brain research*, 1998, Jahrgang: 123 (3), Seite 269–281.
- [156] Nikolova, S., Moyanova, S., Hughes, S., Bellyou-Camilleri, M., Lee, T.-Y., Bartha, R.: Endothelin-1 induced MCAO: dose dependency of cerebral blood flow, *Journal of neuroscience methods*, 2009, Jahrgang: 179 (1), Seite 22–28.
- [157] Hossmann, K. A.: Treatment of experimental cerebral ischemia, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1982, Jahrgang: 2 (3), Seite 275–297.
- [158] Graham, D. I.: The pathology of brain ischaemia and possibilities for therapeutic intervention, *British journal of anaesthesia*, 1985, Jahrgang: 57 (1), Seite 3–17.
- [159] Roussel, S., Pinard, E., Seylaz, J.: Effect of MK-801 on focal brain infarction in normotensive and hypertensive rats, *Hypertension*, 1992, Jahrgang: 19 (1), Seite 40–46.
- [160] Park, C. K., Nehls, D. G., Graham, D. I., Teasdale, G. M., McCulloch, J.: The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat, *Annals of neurology*, 1988, Jahrgang: 24 (4), Seite 543–551.
- [161] Dirnagl, U., Tanabe, J., Pulsinelli, W.: Pre- and post-treatment with MK-801 but not pretreatment alone reduces neocortical damage after focal cerebral ischemia in the rat, *Brain research*, 1990, Jahrgang: 527 (1), Seite 62–68.

- [162] Buchan, A. M., Slivka, A., Xue, D.: The effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on cerebral blood flow and infarct volume in experimental focal stroke, *Brain research*, 1992, Jahrgang: 574 (1-2), Seite 171–177.
- [163] Hatfield, R. H., Gill, R., Brazell, C.: The dose-response relationship and therapeutic window for dizocilpine (MK-801) in a rat focal ischaemia model, *European journal of pharmacology*, 1992, Jahrgang: 216 (1), Seite 1–7.
- [164] Ma, J., Endres, M., Moskowitz, M. A.: Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischaemia in mice, *British journal of pharmacology*, 1998, Jahrgang: 124 (4), Seite 756–762.
- [165] Dalkara, T., Tan, E., Erdemli, G., Onur, R., Zileli, T.: Electrophysiological evidence for activation of NMDA receptors and its antagonism by MK-801 in cerebral ischemia, *Brain research*, 1990, Jahrgang: 532 (1-2), Seite 101–106.
- [166] Domenici, M. R., Longo, R., Carolis, A. S. de, Frank, C., Sagratella, S.: Protective actions of 21-aminosteroids and MK-801 on hypoxia-induced electrophysiological changes in rat hippocampal slices, *European journal of pharmacology*, 1993, Jahrgang: 233 (2-3), Seite 291–293.
- [167] Nedergaard, M.: Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage, *Advances in neurology*, 1996, Jahrgang: 71, Seite 75.
- [168] Buchan, A., Pulsinelli, W. A.: Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 1990, Jahrgang: 10 (1), Seite 311–316.
- [169] Corbett, D., Evans, S., Thomas, C., Wang, D., Jonas, R. A.: MK-801 reduced cerebral ischemic injury by inducing hypothermia, *Brain research*, 1990, Jahrgang: 514 (2), Seite 300–304.
- [170] Chen, Q., Chopp, M., Bodzin, G., Chen, H.: Temperature modulation of cerebral depolarization during focal cerebral ischemia in rats: correlation with ischemic injury, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1993, Jahrgang: 13 (3), Seite 389–394.
- [171] Giroux, C., Scatton, B.: Ischemic stroke: treatment on the horizon, *European neurology*, 1996, Jahrgang: 36 (2), Seite 61–64.
- [172] Muir, K. W., Lees, K. R.: Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1995, Jahrgang: 26 (3), Seite 503–513.
- [173] Kolodziej, A., Lippert, M., Angenstein, F., Neubert, J., Pethe, A., Grosser, O. S., Amthauer, H., Schroeder, U. H., Reymann, K. G., Scheich, H., Ohi, F. W., Goldschmidt, J.: SPECT-imaging of activity-dependent changes in regional cerebral

- blood flow induced by electrical and optogenetic self-stimulation in mice, *NeuroImage*, 2014, Jahrgang: 103, Seite 171–180.
- [174] Hennig, J., Nauerth, A., Friedburg, H.: RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR, *Magnetic resonance in medicine*, 1986, Jahrgang: 3 (6), Seite 823–833.
- [175] Ma, Y., Hof, P. R., Grant, S. C., Blackband, S. J., Bennett, R., Slatest, L., McGuigan, M. D., Benveniste, H.: A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy, *Neuroscience*, 2005, Jahrgang: 135 (4), Seite 1203–1215.
- [176] ImageJ: ImageJ: Image Processing and Analysis in Java, <https://imagej.nih.gov/ij/> (29.05.2016).
- [177] Bland, J. M., Altman, D. G.: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet (London, England)*, 1986, Jahrgang: 1 (8476), Seite 307–310.
- [178] Endepols, H., Sommer, S., Backes, H., Wiedermann, D., Graf, R., Hauber, W.: Effort-based decision making in the rat: an 18Ffluorodeoxyglucose micro positron emission tomography study, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 2010, Jahrgang: 30 (29), Seite 9708–9714.
- [179] Marx, C., Lex, B., Calaminus, C., Hauber, W., Backes, H., Neumaier, B., Mies, G., Graf, R., Endepols, H.: Conflict Processing in the Rat Brain: Behavioral Analysis and Functional muPET Imaging Using FFluorodeoxyglucose, *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2012, Jahrgang: 6, Seite 4.
- [180] Thanos, P. K., Robison, L., Nestler, E. J., Kim, R., Michaelides, M., Lobo, M.-K., Volkow, N. D.: Mapping brain metabolic connectivity in awake rats with muPET and optogenetic stimulation, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 2013, Jahrgang: 33 (15), Seite 6343–6349.
- [181] Wyckhuys, T., Staelens, S., van Nieuwenhuysse, B., Deleye, S., Hallez, H., Vonck, K., Raedt, R., Wadman, W., Boon, P.: Hippocampal deep brain stimulation induces decreased rCBF in the hippocampal formation of the rat, *NeuroImage*, 2010, Jahrgang: 52 (1), Seite 55–61.
- [182] GNU Octave: GNU Octave, <https://www.gnu.org/software/octave/> (29.05.2016).
- [183] Rios, C., Galvan-Arzate, S., Tapia, R.: Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with TI₂SO₄, *Archives of toxicology*, 1989, Jahrgang: 63 (1), Seite 34–37.
- [184] Liu, F., Schafer, D. P., McCullough, L. D.: TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion, *Journal of neuroscience methods*, 2009, Jahrgang: 179 (1), Seite 1–8.

- [185] Liu, J.-R., Jensen-Kondering, U. R., Zhou, J.-J., Sun, F., Feng, X.-Y., Shen, X.-L., Deuschl, G., Jansen, O., Herdegen, T., Meyne, J., Zhao, Y., Eschenfelder, C.: Transient filament occlusion of the middle cerebral artery in rats: does the reperfusion method matter 24 hours after perfusion?, *BMC neuroscience*, 2012, Jahrgang: 13, Seite 154.
- [186] Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A., Lange, S.: Vergleich von Messmethoden, *Dtsch Med Wochenschr*, 2007.
- [187] Young, W., Rappaport, Z. H., Chalif, D. J., Flamm, E. S.: Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1987, Jahrgang: 18 (4), Seite 751–759.
- [188] Yushmanov, V. E., Kharlamov, A., Ibrahim, T. S., Zhao, T., Boada, F. E., Jones, S. C.: K(+) dynamics in ischemic rat brain in vivo by $(8)(7)\text{Rb}$ MRI at 7 T, *NMR IN BIOMEDICINE*, 2011, Jahrgang: 24 (7), Seite 778–783.
- [189] Pohost, G. M., Alpert, N. M., Ingwall, J. S., Strauss, H. W.: Thallium redistribution: mechanisms and clinical utility, *Seminars in nuclear medicine*, 1980, Jahrgang: 10 (1), Seite 70–93.
- [190] Betz, A. L., Keep, R. F., Beer, M. E., Ren, X. D.: Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1994, Jahrgang: 14 (1), Seite 29–37.
- [191] Ito, U., Ohno, K., Nakamura, R., Suganuma, F., Inaba, Y.: Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1979, Jahrgang: 10 (5), Seite 542–547.
- [192] Schuier, F. J., Hossmann, K. A.: Experimental brain infarcts in cats. II. Ischemic brain edema, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1980, Jahrgang: 11 (6), Seite 593–601.
- [193] Shibata, S., Hodge, C. P., Pappius, H. M.: Effect of experimental ischemia on cerebral water and electrolytes, *Journal of neurosurgery*, 1974, Jahrgang: 41 (2), Seite 146–159.
- [194] Smith, Q. R., Rapoport, S. I.: Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride., *J Neurochem*, 1986, Jahrgang: 46 (6), Seite 1732–1742.
- [195] Keep, R. F., Xianq, J., Betz, A. L.: Potassium transport at the blood-brain and blood-CSF barriers., *Adv Exp Med Biol*, 1993, Jahrgang: 331, Seite 43–54.
- [196] DIXON, K. C.: Action of potassium ions on brain metabolism, *The Journal of physiology*, 1949, Jahrgang: 110 (1-2), Seite 87–97.

-
- [197] Ilzecka, J.: The structure and function of blood-brain barrier in ischaemic brain stroke process, *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina*, 1996, Jahrgang: 51, Seite 123–127.
- [198] Sánchez-Crespo, A., Andreo, P., Larsson, S. A.: Positron flight in human tissues and its influence on PET spatial resolution., *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, Jahrgang: 31 (1).

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einfluss pathologischer Vorgänge bei einer fokalen zerebralen Ischämie auf den Gewebsuntergang (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse) (nach [11]).....	5
Abb. 2: Auswirkungen einer graduellen Reduktion des zerebralen Blutflusses auf die neuronale Funktion (nach [22]).	8
Abb. 3: Vereinfachte Darstellung zur räumlichen und zeitlichen Ausbreitung einer irreversiblen Schädigung (rot) in das Gebiet der Penumbra (grün) (nach [11]).....	9
Abb. 4: Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie (nach [57]).	12
Abb. 5: Koregistrierte $H_2^{15}O$ -PET Aufnahmen zeigen regionalen zerebralen Blutfluss (CBF) und Sauerstoffextraktionsrate (OEF) (nach [66]).....	13
Abb. 6: Bildliche Verdeutlichung des DWI/PWI-Mismatch Konzeptes (nach [88]).....	16
Abb. 7: Perfusions-CT erlaubt räumliche Abschätzung von Core und Penumbra (nach [100]).	18
Abb. 8: Photoelektronenvervielfacher werden genutzt um schwache Lichtsignale durch Umwandlung in elektrische Signale und Verstärkung derer zu detektieren [104]. ...	20
Abb. 9: Die Verwendung von Kollimatoren zur räumlichen Lokalisierung der Strahlungsquelle.	20
Abb. 10: In-vitro Sauerstoff- und Glukosedepriuation (OGD) Experimente (nach [110]).	23
Abb. 11: Intrazelluläre Tl^+ -Aufnahmerate steigt mit steigender neuronaler Aktivität.....	24
Abb. 12: Lipophiler TIDDC Chelat-Komplex für die Visualisierung des K^+ -Stoffwechsels.	25
Abb. 13: Mögliche Szenarien für die Freisetzung von Tl^+ aus TIDDC nach Passieren der BHS.	26
Abb. 14: Nachweismethoden zur Visualisierung der zerebralen Tl^+ - bzw. $^{201}Tl^+$ -Verteilung nach intravenöser Injektion von TIDDC/ $^{201}TIDDC$	26
Abb. 15: Tl^+ -AMG Färbemuster im akuten Stadium einer fokalen zerebralen Ischämie.....	28
Abb. 16: Tiermodelle zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie (nach [133]).	32
Abb. 17: Schematische Übersichtsdarstellung der experimentellen Versuchsabläufe.	36
Abb. 18: $^{201}TIDDC$ -Injektion über die kollateralen Schwanzvenen an der wachen Maus.	39
Abb. 19: Präparierter Rattenkatheter auf Silikonbasis.	40
Abb. 20: $^{201}TIDDC$ -Injektion über einen Jugularvenenkatheter an der wachen Ratte.....	42
Abb. 21: NanoSPECT/CT TM Scanner von Mediso Medical Imaging Systems (Budapest, Ungarn).	44
Abb. 22: Energiefenster für A - $^{201}Tl^+$ -Einzelisotopen- und B - $^{201}Tl^+ / ^{99m}Tc$ -Doppelisotopenmessungen... ..	45
Abb. 23: Scan-Protokolle für Mäuse (A) und Ratten der MCAO-Gruppe A (B) und B (C).	46
Abb. 24: ^{99m}Tc HMPAO-Injektion über die kollateralen Schwanzvenen an der narkotisierten Maus.....	53

Abb. 25: $^{99m}\text{TcHMPAO}$ -Injektion über einen Jugularvenenkatheter an der narkotisierten Ratte..	54
Abb. 26: Deutliche Reduktion im $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt im Stromgebiet der MCA 20-22 h nach MCAO...	65
Abb. 27: 22 h nach MCAO entspricht der $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt im betroffenen Areal annähernd dem $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt in luftgefüllten Kammern.....	66
Abb. 28: 20-22 h nach MCAO stimmt das Areal verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung mit dem definitiven Schadensareal im Nissl-Schnitt und $\text{T}_2\text{w-MRT}$ überein.	67
Abb. 29: Ermittelte Infarkt volumina im $^{201}\text{TIDDC-SPECT}$ und Nissl-gefärbten Schnittpräparaten bzw. $\text{T}_2\text{w-MRT}$ 20-22 h nach MCAO in Mäusen und Ratten zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen den Methoden.	68
Abb. 30: Bland-Altman Diagramme bestätigen gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Messmethoden $^{201}\text{TIDDC-SPECT}$, Nissl und $\text{T}_2\text{w-MRT}$ in Mäusen und Ratten.	69
Abb. 31: Der späte $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust aus dem minderperfundierten Areal korreliert mit der finalen Schadensgröße.	70
Abb. 32: Perfusionsminderung im $^{99m}\text{TcHMPAO-SPECT}$	71
Abb. 33: Mismatch zwischen dem Areal verminderter Perfusion und dem frühen Areal verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung.	73
Abb. 34: Kontinuierlicher $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust und komplexe Dynamik während der Schadensausbreitung in der Maus.	74
Abb. 35: Kontinuierlicher $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust und komplexe Dynamik während der Schadensausbreitung in der Ratte.	75
Abb. 36: Kontinuierlicher $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust und komplexe Dynamik während der Schadensausbreitung in über die Population gemittelten SPECT Messungen der Maus MCAO-Gruppe A.	76
Abb. 37: Kinetik des mittleren $^{201}\text{TI}^+$ -Verlusts aus dem Schadensareal.....	77
Abb. 38: Anfänglicher $^{201}\text{TI}^+$ -Verlust im Areal verminderter Perfusion ist reversibel in Kontrollmäusen.	78
Abb. 39: $^{201}\text{TI}^+$ -Aktivitätskurven nach einmaliger $^{201}\text{TIDDC}$ -Injektion für die einzelnen experimentellen Gruppen getrennt für die Versuchsgruppen Maus (A) und Ratte (B).	79
Abb. 40: $^{201}\text{TI}^+$ -Verlustkinetik unterscheidet sich innerhalb des Schadensareal und in Bezug zur kontralateralen Hemisphäre.....	81
Abb. 41: Die Ausbreitung des Areals verminderter $^{201}\text{TI}^+$ -Anreicherung ist in mit MK-801 therapierten Mäusen geringer als in nicht therapierten Mäusen.	83
Abb. 42: Signifikante Reduktion im $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt im Kortex von nicht-therapierten MCAO-Tieren gegenüber Kontrolltieren.....	84
Abb. 43: Signifikante Reduktion im $^{201}\text{TI}^+$ -Gehalt im Kortex von nicht-therapierten MCAO-Tieren gegenüber Kontrolltieren und mit MK-801 therapierten Tieren.....	85

Abb. 44: Vergleich der voxelweisen $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlustkonstanten in Mäusen der Kontrollgruppe (links), der MK-801-Gruppe (mittig) und der MCAO-Gruppe (rechts) über einen betrachteten Zeitraum von bis 5 h nach Einleitung der Reperfusion.....	86
Abb. 45: Voxelweiser $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust betrachtet über verschiedene Zeitintervalle von je einer Stunde.	88
Abb. 46: Schwankungen im $^{201}\text{Tl}^+$ -Gehalt treten vermehrt in Mäusen der MCAO-Gruppen auf.....	90
Abb. 47: Die Anzahl der signifikanten Voxel ist in therapierten und nicht-therapierten Mäusen signifikant erhöht gegenüber Kontrollmäusen.	91
Abb. 48: Erhöhter $^{201}\text{Tl}^+$ -Verlust aus dem Areal verminderter Perfusion kann auch bei Injektion von $^{201}\text{Tl}^+\text{DIDC}$ nach MCAO beobachtet werden.	92

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Charakteristik der Versuchsgruppe Maus	37
Tab. 2:	Charakteristik der Versuchsgruppe Ratte	37
Tab. 3:	Operationsschritte zur Katheterisierung der Jugularvene in Ratten.	41
Tab. 4:	Operationsschritte des intraluminalen Faden-Modells in Mäusen.	49
Tab. 5:	Operationsschritte zur intrazerebralen Injektion von ET-1 in Ratten.	51

Anhang

Protokolle zur Herstellung gängiger chemischer Lösungen:

A. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 0,1 M, pH 7,4)

Herstellung der PBS-Stammlösung (1 M):

- 2 g/l Kaliumchlorid (KCl, Merck, Deutschland)
- 2 g/l Kaliumhydrogenphosphat (K_2PO_4 , Merck, Deutschland)
- 80 g/l Natriumchlorid (NaCl, Roth)
- 12,7 g/l Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Roth, Deutschland)

Chemikalien in dH_2O lösen und anschließend filtrieren.

Zur Herstellung der PBS-Gebrauchslösung PBS-Stammlösung 1:10 mit dH_2O verdünnen.
Anschließend pH-Wert einstellen.

B. Paraformaldehyd (PFA, 4 %, pH 7,4)

- 40g/l Paraformaldehyd (Roth, Deutschland) in dH_2O unter Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH, Roth, Deutschland) lösen
- 15,6g/l Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Roth, Deutschland)

Nach dem Lösen pH Wert einstellen und kurz vor dem Gebrauch filtrieren.

C. Succrose-Lösung (30 %, pH 7,4)

- 10 ml PBS (Stammlösung, 1 M)
- 30 ml dH_2O
- 30 g Saccharose (Roth, Deutschland)

Nach dem lösen der Substanzen, Lösung im Messzylinder auf 100 ml mit dH_2O auffüllen und pH-Wert einstellen.

D. Gefrierschutzlösung

- 150 ml Glycerol (100 %, Roth, Deutschland)
- 150 ml Ethylenglycol (Roth, Deutschland)
- 200 ml PBS (Gebrauchslösung, 0,1 M, pH 7,4)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

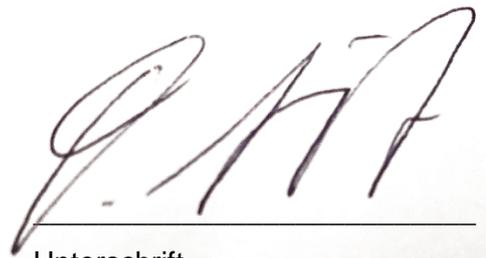
„Dynamisches ²⁰¹TIDDC-SPECT zur Erfassung der zeitlichen und räumlichen Ausbreitung eines ischämischen Schadens in der Akutphase des experimentellen Schlaganfalls“

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Mageburg, 07.11.2016

Ort, Datum

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. A. A.', written over a horizontal line.

Unterschrift

Curriculum vitae

Franziska Stöber



KONTAKT

(geschäftlich) Leibniz-Institut für Neurobiologie
Projektgruppe Neuropharmakologie
Brenneckestraße 6
39118 Magdeburg, Deutschland

Telefon +49 (0)391 6263 95431
Fax +49 (0)391 6263 95489
E-Mail franziska.stoeber@lin-magdeburg.de

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum 18. September 1986
Geburtsort Magdeburg, Deutschland
Staatsangehörigkeit Deutsch
Familienstand ledig
Akademischer Grad Master of Science

AUSBILDUNG

09/2011 – heute **Promotionsstudium**
Leibniz-Institut für Neurobiology, Magdeburg
Projektgruppe Neuropharmakologie
Betreuer: Prof. Dr. Klaus G. Reymann; Dr. Jürgen Goldschmidt
Angestrebte Qualifikation: Dr. rer. nat.

10/2008 – 02/2011 **Master of Science in Integrative Neuroscience**
Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg

10/2006 – 09/2008 **Vordiplom in Biologie**
Martin-Luther-Universität, Halle (Saale)

08/1999 – 07/2006 **Abitur**
Hegel-Gymnasium, Magdeburg

BERUFLICHER WERDEGANG

04/2014 – heute **Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R., Otto-von-Guericke-Universität,
Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin, Magdeburg**
Position: Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projektleitung & -bearbeitung

- 04/2014 – heute **Leibniz-Institut für Neurobiologie, Projektgruppe Neuropharmakologie, Magdeburg**
Position: Gastwissenschaftlerin, Projektbearbeitung
- 01/2014 – 03/2014 **Leibniz-Institut für Neurobiologie, Projektgruppe Neuropharmakologie, Magdeburg**
Position: Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projektbearbeitung
- 04/2011 – 12/2014 **Charité-Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Neurologie, Experimentelle Neurologie, Centrum für Schlaganfallforschung, Berlin**
Position: Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projektbearbeitung

BERUFSRELEVANTE ERFAHRUNGEN

- 09/2015 – 12/2015 **University of California, Helen Wills Neuroscience Institute, Berkeley, USA**
Verantwortlichkeiten: Untersuchung neuronaler Netzwerke in PET-Humandaten
- 02/2010 – 03/2011 **Leibniz-Institut für Neurobiologie, Forschungsabteilung Akustik, Lernen, Sprache, Magdeburg**
Verantwortlichkeiten: Intrakranielle Tracerapplikationen an der Ratte, Untersuchung dopaminergere Projektionen zum auditorischen Kortex
- 05/2010 – 07/2010 **University of Eastern Finland, Institute of Clinical Medicine, Department of Neurology, Kuopio, Finland**
Verantwortlichkeiten: Hirngewebeaufbereitung für TEM
- 02/2009 – 11/2009 **Otto-von-Guericke-Universität, Institut für Biologie, Abteilung Zoologie/Entwicklungsbiologie Magdeburg**
Verantwortlichkeiten: Statistische Auswertung von 2FDG-Autoradiografie-Hinschnitten der Ratte

PUBLIKATIONEN

- 2016 Bhattacharya S, Herrera-Molina R, Sabanov V, Ahmed T, Iscru E, **Stöber F**, Richter K, Fischer KD, Angenstein F, Goldschmidt J, Beesley PW, Balschun D, Smalla KH, Gundelfinger ED, Montag D: Genetically induced retrograde amnesia of associative memories after neuroplastin ablation. *Biol. Psychiatry* 2016 Apr; dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.2107
- 2014 **Stöber F**, Baldauf K, Ziabreva I, Harhausen D, Zille M, Neubert J, Reymann KG, Scheich H, Dirnagl U, Schröder UH, Wunder A, Goldschmidt J: Single-cell resolution mapping of neuronal damage in acute focal cerebral ischemia using thallium autometallography. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014 Jan; 34 (1):144-152.
- 2013 Riedel A, **Stöber F**, Richter K, Fischer KD, Miettinen R, Budinger E: VGLUT3-immunoreactive afferents of the lateral septum: ultrastructural evidence for a modulatory role of glutamate. *Brain Struct Funct.* 2013 Jan; 218 (1):295-301.

KONFERENZVORTRÄGE

- 2015 **53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin**
Hannover, Deutschland, April 2015
- 10th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging –**
ESMI; European Molecular Imaging Meeting
Tübingen, Deutschland, März 2015
- 2014 **World Molecular Imaging Congress; WMIC**
Seoul, Süd Korea, September 2014
- 9th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging –**
ESMI; European Molecular Imaging Meeting
Antwerpen, Belgien, Juni 2014
- 8th International Symposium on Neuroprotection Neurorepair**
Magdeburg, Deutschland, April 2014

AUSZEICHNUNGEN

- 2015 **EMIM 2015 Poster Award** vergeben durch die European Society for
Molecular Imaging, Köln, Deutschland
- 2014 **Stipendium zur Vortragsreise** vergeben durch den Deutschen
Akademischen Austauschdienst (DAAD), Bonn, Deutschland
- 2013 **Paper of the year 2013** (Stöber et al., JCBFM 2014, 34:144-152)
ausgezeichnet vom Center of behavioral brain sciences (CBBS), Magdeburg,
Deutschland
- 2013 **Paper of the month 10/2013** (Stöber et al., JCBFM 2014, 34:144-152)
ausgezeichnet vom Centrum für Schlaganfallforschung (CSB), Charité-
Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland
- 2012 **Stipendium zur Vortragsreise** vergeben durch den Deutschen
Akademischen Austauschdienst (DAAD), Bonn, Deutschland

Franziska Stöber, Master of Science
geboren am 18.09.1986 in Magdeburg

E-Mail: franziska.stoeber@lin-magdeburg.de