

**Evaluierung eines neuen Biomarkers und eines
neuen neuroprotektiven Wirkstoffes für ischämi-
schen Schlaganfall in Ratten mit
Positronen-Emissions-Tomographie und
Magnetresonanztomographie**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Kristin Julia Schelling
aus Ulm

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	05.12.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Kristina Herfert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Zusammenfassung

Deutschlandweit erleiden jährlich mehr als eine Viertelmillionen Menschen einen Schlaganfall mit teilweise schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen. Überleben die Patienten den Hirninfarkt, müssen viele von ihnen mit zum Teil lebensveränderten Einschränkungen leben, was wiederum die wirtschaftliche Belastung des Gesundheitssystems erhöht. Eine wirksame Behandlung sowie eine schnelle und zuverlässige Diagnose des Schlaganfalls sind daher für die Betroffenen als auch für das Gesundheitssystem von größter Bedeutung. Denn je schneller ein Schlaganfall erkannt und behandelt wird, desto besser sind die Aussichten auf Genesung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde *in vivo* die spezifische Bindung des radioaktiven Tracers [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO an die Erythropoietinrezeptoren (EPOR) an Ratten als neuer Ansatz zur Diagnose von Schlaganfällen untersucht. Im weiteren Verlauf wurde dann untersucht, ob mittels Ambroxolhydrochlorid (Ambroxol) ein Schlaganfall an Ratten therapiert werden kann. Zur Evaluierung der Hypothese wurden zwei bildgebende Verfahren angewendet: Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie die Magnetresonanztomographie (MRT). Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Ambroxolgabe in schlaganfallinduzierten Ratten anhand verschiedener Verhaltensexperimente analysiert.

EPOR sind nach einem Schlaganfall sowohl in humanem als auch murinem Schlaganfallgewebe überexprimiert, wobei eine spezifische Bindung in vorangegangenen Versuchen bisher nur *ex vivo* nachgewiesen werden konnte. Um zu überprüfen, ob sich radioaktiv markiertes Erythropoietin (EPO) als Bildgebungsmarker zur Schlaganfalldetektion eignet, wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, ob der Tracer [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO spezifisch an den EPOR bindet. Dafür wurde in Ratten artifiziell ein Schlaganfall mittels Verschluss der mittleren zerebralen Arterie (engl.: „*middle cerebral artery occlusion*, MCAO“) induziert und mit Hilfe von [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO im PET untersucht. Um die spezifische Bindung des Tracers nachzuweisen, wurden außerdem Blockierungsexperimente durchgeführt, indem ein Teil der Tiere nicht-radioaktives EPO appliziert bekamen, damit dieses mit dem radioaktive EPO um dieselben Bindungsstellen konkurrieren konnte. Die Tiere wurden infolgedessen zu mehreren Zeitpunkten im MRT und PET gemessen. Die Bindung des Tracers im Gehirn war sehr gering (0,004 - 0,046% ID/cm³) und es konnte zu keinem Zeitpunkt, weder *in vivo* noch *ex vivo*, eine Blockierung der Bindung erreicht werden. Gründe dafür könnten die geringe spezifische Aktivität (3,33 MBq/μg), eine potenziell schlechte Affinität des Tracers gegenüber der EPOR sowie eine ungeeignete Wahl der Messzeitpunkte sein. Eine Loslösung des radioaktiven Isotops ⁸⁹Zr vom Tracer-Komplex konnten hingegen durch einen Serumstabilitätstest weitestgehend ausgeschlossen werden, da der Tracer eine Woche lang stabil im Serum verblieb.

Zusammenfassend konnte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine spezifische Bindung [^{89}Zr]Zr-DFO-EPO nachgewiesen werden.

In künftigen Studien sollte die spezifische Aktivität des Tracers verbessert werden, sowie anderer Messzeitpunkte gewählt werden, um eine spezifische Bindung des Tracers *in vivo* zu ermitteln.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurden neue Therapieansätze für Schlaganfallgewebe mittels moderner Bildgebungsmethoden untersucht.

Der Verschluss einer Hirnarterie während eines Schlaganfalls führt durch den Sauerstoff- und Glukosemangel im vaskularisierten Hirngewebe in den betroffenen Regionen innerhalb kürzester Zeit zum Zelltod. Durch den Energiemangel können energieabhängige Prozesse innerhalb der Neuronen nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Folge sind erhöhte Ionenkonzentrationen von Na^+ und Ca^{2+} , die wiederum zu einer erhöhten Wasseraufnahme, Depolarisation, Exzitotoxizität und schlussendlich zu intrazellulären Kaskaden führen, die wiederum in Nekrose und Apoptose resultieren. Außerdem werden Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid produziert, die durch die Aktivierung von bestimmten Enzymen zu einer größer werdenden Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und ebenfalls zur Apoptose führen. Eine medizinische Intervention im Rahmen einer schnellen Reperfusion kann zwar nachweislich das Schlaganfallvolumen reduzieren, birgt aber auch das Risiko weiterer Gewebsverletzungen und hat zudem nur ein sehr geringes Anwendungszeitfenster. Neuroprotektive Therapien stellen daher eine vielversprechende Möglichkeit dar, gefährdetes Gewebe zu retten. Der Wirkstoff Ambroxol, der bisher zur Schleimlösung bei Atemwegserkrankungen eingesetzt wird, könnte ein potenzielles Therapeutikum sein, da frühere Studien gezeigt haben, dass Ambroxol sowohl Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ionenkanäle blockiert und darüber hinaus die Produktion von Sauerstoffradikalen reduziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Injektion von Ambroxol direkt nach der Reperfusion der Blutgefäße untersucht, ob Ambroxol positive bildgebungs- und verhaltensbezogene Merkmale aufweist. Mit Hilfe von T2- und diffusionsgewichteter, sowie funktionaler MRT (fMRT)-Bildgebung wurden die Infarktgröße und Infarktstärke berechnet sowie die strukturelle und funktionelle Konnektivität vor und in der Zeit nach Ambroxolgabe gemessen. Darüber hinaus wurden Veränderungen im Verhalten mittels sensitiver Verhaltenstests bewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass das Schlaganfallvolumen in Ambroxol-behandelten Tieren in der subakuten Phase (24 h bis 72 h nach Schlaganfallbeginn) und in der frühen chronischen Phase (1 Woche nach Schlaganfallbeginn) im *Striatum* signifikant kleiner war als das Volumen in der Kontrollgruppe. Die Tiere aus der Ambroxolgruppe schnitten im Vergleich zur Kontrollgruppe zudem in zwei der vier durchgeführten Verhaltenstest besser ab. Darüber hinaus konnte mittels MRT und

immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass nach einem Monat Tiere aus der Ambroxolgruppe weniger nekrotisches Schlaganfallgewebe aufwiesen als Tiere aus der Kontrollgruppe. Die strukturelle Konnektivität, die anhand der fraktionellen Anisotropie (FA) des *Corpus callosum* bewertet wurde, zeigte ebenfalls, dass die Tiere aus der Ambroxolgruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe ihre Integrität der Axone beibehalten hatten. Konsequenterweise zeigten die fMRT-Messungen in der subakuten Phase eine deutlich reduzierte funktionelle Konnektivität in der Ambroxolgruppe im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe. In Übereinstimmung mit der ursprünglichen Hypothese wurde eine vorherrschende Verringerung der globalen funktionellen Konnektivität in beiden Hemisphären der Ambroxol-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine deutliche Wirkung von Ambroxol auf die Gehirnfunktion und das Schlaganfallvolumen. Obwohl der genaue Mechanismus nicht eindeutig geklärt werden konnte, deuten die Daten darauf hin, dass die Wirkung von Ambroxol die folgenreichen Kaskaden eines Schlaganfalls, die zu Apoptose und Nekrose führen, unterbrochen und abgemildert haben könnte.

Summary

Every year, more than a quarter of a million people in Germany suffer a stroke, some of them with serious health consequences. If the patients survive the cerebral infarction, many of them must live with life altering limitations, which in turn increases the economic burden on the health system. Effective treatment, as well as rapid and reliable diagnosis of stroke are therefore of the utmost importance for those affected, as well as for the healthcare system. The faster a stroke is detected and treated, the better the prospects for recovery. In this dissertation, the specific binding of the radioactive tracer $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ to erythropoietin receptors (EPOR) was investigated in vivo in rats as a new approach to diagnose stroke. Subsequently, we investigated whether ambroxol hydrochloride (Ambroxol) could be used to treat stroke in rats. Two imaging techniques were used to evaluate the hypothesis: Positron Emission Tomography (PET) and Magnetic Resonance Imaging (MRI). Furthermore, the effects of Ambroxol administration on stroke-induced rats were analyzed using various behavioral experiments.

EPOR are overexpressed after stroke in both human and murine stroke tissue, although specific binding has only been demonstrated ex vivo in previous experiments. To test whether radiolabeled erythropoietin (EPO) is suitable as an imaging marker for stroke detection, the first part of this work investigated whether the tracer $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ binds specifically to EPOR. For this purpose, a stroke was artificially induced in rats by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) and examined by PET using $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$. In order to demonstrate the specific binding of the tracer, blocking experiments were also performed by applying non-radioactive EPO to some of the animals for competition with the radioactive EPO to the same binding sites. Hence, animals were measured at several time points by MRI and PET. Binding of the tracer in the brain was very low ($0.004\text{--}0.046\%$ ID/cm³) and no blocking of the binding could be achieved at any time point, neither in vivo nor ex vivo. Reasons for this could have been the low specific activity ($3.33\text{ MBq}/\mu\text{g}$), a potentially poor affinity of the tracer towards the EPOR, and inadequate time point selection. In contrast, a detachment of the radioactive isotope ^{89}Zr from the tracer complex could be largely excluded by a serum stability test since the tracer remained stable in the serum for one week. In summary, no specific binding of $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ could be detected in the experiments of the present work.

In future studies, the specific activity of the tracer should be improved and other measurement time points should be chosen to determine specific binding of the tracer in vivo.

In the second part of this dissertation, new therapeutic approaches for stroke tissue were investigated using modern imaging methods.

The occlusion of a cerebral artery during stroke leads to cell death within a very short time period due to the lack of oxygen and glucose in the vascularized brain tissue in the affected regions. Due to the lack of energy, energy-dependent processes within the neurons can no longer be maintained. The result is increased ion concentrations of Na^+ and Ca^{2+} , which in turn lead to increased water uptake, depolarization, excitotoxicity and finally to intracellular cascades resulting in necrosis and apoptosis. In addition, oxygen radicals and nitric oxide are produced, which, through the activation of certain enzymes, lead to increased permeability of the blood-brain barrier and to apoptosis. Although medical intervention in the context of rapid reperfusion has been shown to reduce stroke volume, it also carries the risk of further tissue injury and has a very narrow window of application. Neuroprotective therapies therefore represent a promising opportunity to save tissue at risk. The active ingredient Ambroxol, which has been used to clear mucus in respiratory diseases, could be a potential therapeutic agent, as previous studies have shown that Ambroxol blocks both Na^+ and Ca^{2+} ion channels and reduces the production of oxygen radicals.

In this work, by injecting Ambroxol directly after vessel reperfusion it was determined if Ambroxol presented positive neuroimaging and behavioral features. T2- and diffusion-weighted, as well as functional MRI (fMRI) imaging were used to calculate infarct size and infarct severity, as well as to provide measures of structural and functional connectivity before and longitudinally after Ambroxol administration. Moreover, changes in behavior were assessed by using sensitive behavioral tests. The results show that the stroke volume in Ambroxol-treated animals in the subacute phase (24 h to 72 h after stroke onset) and in the early chronic phase (1 week after stroke onset) was significantly smaller in the striatum than the stroke volume in the control group. The animals from the Ambroxol group also performed better in two of the four behavioral tests in comparison to the control group. In addition, MRI and immunohistochemical staining showed that after one month, animals from the Ambroxol group had less necrotic stroke tissue than animals from the control group. Structural connectivity evaluated with Fractional anisotropy (FA) of the corpus callosum also showed that animals from the Ambroxol group had maintained axon integrity in contrast to control. Consistently fMRI measurements showed significantly reduced functional connectivity in the subacute phase of the Ambroxol group compared to animals from the control group. Consistent with the original hypothesis, there was a predominant reduction of global functional connectivity in both hemispheres of Ambroxol animals in to control counterparts. In summary, the results of this work showed a clear effect of Ambroxol in brain function and in stroke volume. Although the exact mechanism is not concretely explored, the data suggest that the effect

of Ambroxol may have interrupted and attenuated the consequential cascades of stroke leading to apoptosis and necrosis.

Inhalt

Zusammenfassung	I
Summary	IV
Inhalt	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Der Schlaganfall	2
1.1.1 Allgemeines zum Schlaganfall	2
1.1.2 Diagnose von Schlaganfällen	6
1.1.2.1 Erythropoietin (EPO) und Erythropoietinrezeptor (EPOR)	7
1.1.3 Therapiemöglichkeiten beim Schlaganfall	7
1.1.3.1 Ambroxol	9
1.1.4 Schlaganfall im Tiermodell	10
1.2 Bildgebende Verfahren.....	12
1.2.1 Die Magnetresonanztomographie (MRT).....	12
1.2.1.1 Allgemeine Physik	13
1.2.1.2 T1: Longitudinale Relaxation	16
1.2.1.3 T2/T2*: Transversale Relaxation	17
1.2.1.4 Gradienten	19
1.2.1.5 MRT-Sequenzen	21
1.2.1.6 Diffusionsgewichtete Bilder	22
1.2.1.7 Funktionelle MRT (fMRT)	25
1.2.2 Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	26
1.2.2.1 Radioaktiver β^+ -Zerfall und Positronenemission	27
1.2.2.2 Der PET-Scanner	28
1.2.2.3 PET- Messung, Korrekturen und Bildrekonstruktion	29
1.2.2.4 PET-Tracer.....	31
2 Ziel der Arbeit und Fragestellung	34
3 Material und Methoden	36
3.1 EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfall	36
3.1.1 Versuchstiere	36
3.1.2 Experimenteller Aufbau	36
3.1.3 Operativer Eingriff	37
3.1.4 MRT-Messungen.....	41
3.1.4.1 MRT-Bildauswertung	42
3.1.5 PET-Messung	42
3.1.5.1 [^{89}Zr]Zr-DFO-EPO Radiomarkierung.....	42
3.1.5.2 Tracer Injektion	43

3.1.5.3	Erhebung der PET-Daten	44
3.1.5.4	PET-Bildauswertung.....	45
3.1.6	Biodistribution.....	46
3.1.7	Autoradiographie	46
3.1.8	Statistische Analyse	46
3.1.9	Ausschluss von Daten	47
3.1.10	Stabilitätstest von [⁸⁹ Zr]Zr-DFO-EPO im Serum.....	47
3.2	Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle.....	49
3.2.1	Versuchstiere	49
3.2.2	Experimenteller Aufbau	49
3.2.3	Operativer Eingriff	50
3.2.4	MRT-Messungen.....	51
3.2.4.1	MRT-Bildanalyse	53
3.2.4.2	Nachbereitung der fMRT-Daten.....	55
3.2.4.3	Datenanalyse fMRT	55
3.2.5	Verhaltensversuche.....	58
3.2.5.1	Beam Walk Test.....	59
3.2.5.2	Open Field Test.....	60
3.2.5.3	Sticky Label Test.....	61
3.2.5.4	Grip Test	62
3.2.6	Ambroxol- und Kontrollbehandlung.....	63
3.2.7	Statistische Analyse	63
3.2.8	Histologie	64
3.2.9	Ausschluss von Daten	65
4	Ergebnisse.....	70
4.1	EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfällen	70
4.1.1	<i>In vivo</i> Blockierungsversuche	70
4.1.2	Stabilitätstest von [⁸⁹ Zr]Zr-DFO-EPO in murinem Serum	73
4.1.3	Statistik	74
4.2	Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle.....	76
4.2.1	Kontrollgruppen	76
4.2.2	Schlaganfallvolumen	76
4.2.2.1	Quantifizierung der Volumina	77
4.2.2.2	Histologische Validierung	79
4.2.2.3	Schlaganfallreduktion	80
4.2.2.4	Prozentuale Verteilung des Schlaganfalls	81
4.2.3	Schlaganfallintensität	83
4.2.3.1	Signalintensität der T2-Werte	83
4.2.3.2	Signalintensität der ADC-Werte.....	86
4.2.4	Verhaltenstests	89
4.2.5	Fraktionelle Anisotropie – Integrität der Weißen Substanz	93
4.2.5.1	Fraktionelle Anisotropie – t-Test-Karten	97
4.2.6	Funktionelle Konnektivität mit fMRT	98
4.2.6.1	Korrelationen zwischen den Gruppen.....	99

4.2.6.2	Korrelationen zwischen den Zeitpunkten	101
4.2.7	Statistik	105
5	Diskussion	109
5.1	EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfällen	109
5.1.1	Fazit und Ausblick von EPO zur Detektion von Schlaganfällen.....	113
5.2	Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle.....	114
5.2.1	Die akute Phase des Schlaganfalls	114
5.2.2	Die subakute Phase des Schlaganfalls.....	116
5.2.3	Die chronische Phase des Schlaganfalls.....	123
5.2.4	Fazit und Ausblick von Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle	131
	Literaturverzeichnis	CXXXVII
	Danksagung.....	CLIV
	Erklärung	CLVI
	Beiträge zu dieser Arbeit	CLVI
	Publikationen.....	CLVIII
	Wissenschaftliche Journals	CLVIII
	Fertiges Manuskript.....	CLVIII
	Posterpräsentationen	CLIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der zwei häufigsten Schlaganfalltypen.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Penumbra in einem Rattengehirn.	6
Abbildung 3: Strukturformel von Ambroxolhydrochlorid (Ambroxol).	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Spins der Wasserstoffatome.	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der longitudinalen Relaxation.	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der T1-Kontraste bei unterschiedlichen Repetitionszeiten (TR).	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung der transversalen Relaxation.	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der T2-Kontraste bei unterschiedlichen Echozeiten (TE).	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Gradienten.	20
Abbildung 10: Schematische Darstellung der fraktionellen Anisotropie (FA).	25
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Annihilationsprozesses.	28
Abbildung 12: Schematische Darstellung unterschiedlicher Koinzidenzen.	29
Abbildung 13: Schematische Darstellung des <i>in vivo</i> Blockierungsversuchsablauf.	37
Abbildung 14: Aufbau des Operationsfeldes.	38
Abbildung 15: Schematische Darstellung des MCAO-Schlaganfallmodells.	40
Abbildung 16: Fotografie der PET-Scanner im Labor.	45
Abbildung 17: Stabilitätstest von [⁸⁹ Zr]Zr-DFO-EPO in murinem Serum.	48
Abbildung 18: Experimenteller Ablauf des Ambroxol-Therapieversuchs.	50
Abbildung 19: Fotografie des MRT-Scanners.	51
Abbildung 20: „Volume of Interest“ (VOI) im <i>Corpus callosum</i>	54
Abbildung 21: Schematische Darstellung der fMRT-Ergebnisse.	58
Abbildung 22: Beam Walk Test.	59
Abbildung 23: Open Field Test.	61
Abbildung 24: Sticky Label Test.	62

Abbildung 25: Ergebnisse für <i>in vivo</i> Blockierungsversuch.	71
Abbildung 26: Ergebnisse für <i>in vivo</i> Blockierungsversuch am Narbengewebe.	72
Abbildung 27: Ergebnisse der Biosdistribution des <i>in vivo</i> Blockierungsversuchs.	73
Abbildung 28: Serumstabilitätstest.	74
Abbildung 29: Schlaganfallvolumen aller Tiere über die Zeit.	77
Abbildung 30: Quantifizierung des Schlaganfallvolumens.	78
Abbildung 31: Histologische Färbungen.	80
Abbildung 32: Einzelner Verlauf und Reduktion der Volumina zwischen Okklusion und 1 Monat.	81
Abbildung 33: Prozentuale Verteilung des Schlaganfalls in den verschiedenen Regionen.	82
Abbildung 34: T2-Bilder aller Tiere über die Zeit.	84
Abbildung 35: T2 Signalintensität und Verhältnis zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre in den Schlaganfallregionen.	85
Abbildung 36: ADC-Karten aller Tiere über die Zeit.	86
Abbildung 37: ADC-Werte und Verhältnis zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphere in den Schlaganfallregionen.	88
Abbildung 38: Ergebnisse der Verhaltenstests.	92
Abbildung 39: Fraktionelle Anisotropie (FA)-Werte im <i>Corpus callosum</i>	94
Abbildung 40: Fraktionelle Anisotropie (FA) Werte der kontralateralen Hemisphäre.	96
Abbildung 41: Fraktionelle Anisotropie (FA) t-Test-Karten.	97
Abbildung 42: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Gruppen für das ganze Gehirn.	100
Abbildung 43: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Gruppen für die motorische Bahn.	101
Abbildung 44: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Zeitpunkten für das ganze Gehirn.	103
Abbildung 45: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Zeitpunkten für die motorische Bahn.	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der PET-Bildgebung häufig verwendete Isotope mit ihren Halbwertszeiten und maximalen kinetischen Energie.....	32
Tabelle 2: Anzahl der Tiere, die für den <i>in vivo</i> Blockierungsversuch an den jeweiligen Zeitpunkten ausgewertet wurden.....	47
Tabelle 3: Anzahl der Tiere, die zu den jeweiligen Zeitpunkten für die Histologie getötet wurden.	50
Tabelle 4: Alle Hirnregionen, die für die Analyse der fMRT-Daten verwendet wurden inklusive der dazugehörigen Volumina und Abkürzungen.....	56
Tabelle 5: Auflistung aller Tiere, die für den Ambroxol Versuchsteil nicht mit in die Analyse eingegangen sind.	65
Tabelle 6: Zusammenfassung aller ANOVA Ergebnisse für den EPO-Blockierungsversuch.	74
Tabelle 7: Gesamtanzahl aller Tiere für jeden Zeitpunkt und jede Gruppe, die für den Therapieversuch mit Ambroxol in die Analyse miteingingen.....	76
Tabelle 8: Gesamtanzahl aller Tiere, die pro Zeitpunkt und Gruppe für die unterschiedlichen Verhaltensversuche ausgewertet wurden.	89
Tabelle 9: Zusammenfassung aller ANOVA Ergebnisse für den Ambroxol-Versuch	105

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
% ID	Prozent injizierte Dosis
β^+	Positron
δ	Länge eines Impulses
ΔE	Energiedifferenz
Δt	Zeitdifferenz
μ	magnetisches Moment eines Protons
ω_0	Larmorfrequenz
γ_0	gyromagnetisches Verhältnis
AB	<i>Arteria basilaris</i>
ACA	<i>Arteria cerebri anterior</i>
ACC	<i>Arteria Carotis Communis</i>
ACE	<i>Arteria Carotis Externa</i>
ACI	<i>Arteria Carotis Interna</i>
ACM	<i>Arteria Cerebri Media</i>
ACP	<i>Arteria Cerebri Posterior</i>
ADC	scheinbarer Diffusionskoeffizient (engl.: „ <i>apparent diffusion coefficient</i> “)
AFNI	<i>Analysis of Functional NeuroImages</i>
Ambroxol	2-Amino-3,5-dibromo- <i>N</i> -methylbenzylamin Hydrochlorid
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: „ <i>analysis of variance</i> “)
AO	<i>Arteria Occipitalis</i>
ATS	<i>Arteria Thyroidea Superior</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	willkürliche Einheit (engl.: „ <i>arbitrary unit</i> “)
<i>b</i>	b-Faktor

B_0	Magnetfeld
BOLD	engl.: „ <i>blood-oxygen-level-dependent</i> “
BS	engl.: „ <i>blank scan</i> “
^{57}Co	Cobalt-57
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CBF	Blutfluss (engl.: „ <i>cerebral blood flow</i> “)
Cl^-	Chlorid-Ion
Da	Dalton
df	Freiheitsgrade (engl.: „ <i>degrees of freedom</i> “)
DFO	Deferoxamin
DFO-Bz-NCS	DFO- <i>p</i> -benzyl-isothiocyanat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: „ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
DTI	Diffusionstensor-Bildgebung (engl.: „ <i>diffusion tensor imaging</i> “)
DWI	diffusionsgewichtete Bildgebung (engl.: „ <i>diffusion-weighted imaging</i> “)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPI	Echoplanare Bildgebung (engl.: „ <i>echo planar imaging</i> “)
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinrezeptor
^{18}F	Fluor-18
FA	fraktionelle Anisotropie
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG	Fluor-2-desoxy-D-glucose
FDR-Korrektur	engl.: „ <i>false discovery rate correction</i> “
FeCl_3	Eisen(III)-chlorid
FLAIR	engl.: „ <i>fluid attenuated inversions recovery</i> “
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FOV	Sichtfeld (engl.: „ <i>field of view</i> “)
G	Amplitude eines Impulses

G_z, G_y, G_x	Gradient entlang der Z-Achse (Schichtkodierung), Y-Achse (Phasenkodierung) und X-Achse (Frequenzkodierung)
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GFAP	engl.: „ <i>glial fibrillary acidic protein</i> “
GRE	Gradientenecho
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde (engl.: „ <i>Society of Laboratory Animals</i> “)
^1H	Wasserstoff
H^+	Wasserstoff-Ion
H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF-Impuls	Hochfrequenz-Impuls
HPSEC	HochleistungsgröÙenausschluss-Flüssigchromatographie
I	ipsilateral
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin-1 β
i.p.	intraperitoneal
IR	engl.: „ <i>inversion-recovery</i> “
IS	ischämischer Schlaganfall
iTLC	engl.: „ <i>instant thin layer chromatography</i> “
K	kontralateral
K^+	Kalium-Ion
k_B	Boltzmann-Konstante
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KGW	Körpergewicht
LOR	Koinzidenzlinie (engl.: „ <i>line of response</i> “)
LSD	geringster signifikanter Unterschied (engl.: „ <i>least significant difference</i> “)

<i>M1 Cortex</i>	<i>Motor Cortex</i>
MCAO	Okklusion der <i>Arteria Cerebri Media</i> (engl.: „ <i>middle cerebral artery occlusion</i> “)
MRT	Magnetresonanztomographie
MHz	Megahertz
M_{XY}	transversale Magnetisierung
M_z	Längsmagnetisierung
N	Neutron
n	Anzahl der Werte des zeitlichen Verlaufs
Na^+	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
Na^+/K^+ -Pumpen	Natrium-Kalium-Pumpen
NaN	keine Zahl (engl.: „ <i>not a number</i> “)
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
OSEM	engl.: „ <i>ordered subset expectation maximization</i> “
P	Proton
p_a	antiparallele Ausrichtung der Spins
p_p	parallele Ausrichtung der Spins
PBS	engl.: „ <i>phosphate buffered saline</i> “
PEG 400	Polyethylenglykol 400
PET	Positronenemissionstomographie
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
rHuEPO- α	rekombinantes humanes Erythropoietin- <i>alpha</i>
RNS	reaktive Stickstoffverbindungen (engl.: „ <i>reactive nitrogen species</i> “)
ROI	engl.: „ <i>region of interest</i> “
ROS	reaktive Sauerstoffradikale (engl.: „ <i>reactive oxygen species</i> “)
RS	engl.: „ <i>resting state</i> “
<i>S1 Cortex</i>	<i>Somatosensorischer Cortex</i>
Score	Punktesystem für den Beam Walk

SE	Spinecho
SI	Signalintensität
SpD	engl.: „ <i>spreading depolarization</i> “
SPM12	<i>Statistical Parametric Mapping 12</i>
STAIR	<i>Stroke Treatment Academic Industry Roundtable</i>
tPA	gewebespezifischen Plasminogenaktivator (engl.: „ <i>tissue plasminogen activator</i> “)
T	Temperatur
T1	Zeitkonstante der longitudinalen Relaxation
T2	Zeitkonstante der transversalen Relaxation
TE	Echozeit (engl.: „ <i>time of echo</i> “)
TJ	engl.: „ <i>Tight Junctions</i> “
TR	Repetitionszeit (engl.: „ <i>time of repetition</i> “)
TS	engl.: „ <i>transmission scan</i> “
u_i, x_i	jeweils einzelne Werte des zeitlichen Verlaufs
\bar{u}, \bar{x}	arithmetischer Mittelwert der jeweiligen Werte des zeitlichen Verlaufs
ν_e	Neutrino
VOI	engl.: „ <i>volume of interest</i> “
VOI-24h	VOI aus der Summe aller Volumina vom 24 h Zeitpunkt
Voxel	Volumenelement
^{89}Zr	Zirkonium-89

1 Einleitung

Der Ursprung unseres ganzen Denkens und Handelns liegt in unserem Gehirn. Hier werden Gedanken geformt, Impressionen verarbeitet und Bewegungen gesteuert. Das Gehirn ist wohl das komplexeste und komplizierteste Organ im Körper und besteht aus circa 85 Milliarden Neuronen ¹. Das riesige Netzwerk aus Dendriten, Axonen und Synapsen bildet Verschaltungen, über die Reize weitergeleitet und verarbeitet werden können. Auf Grund der dynamischen Eigenschaften des Gehirns, immer neue Verschaltungen eingehen zu können, sind wir in der Lage, Bewegungen und Sprache(n) zu erlernen sowie Wissen anzueignen und zu behalten. All dies ist aber nur mit intakten und gesunden Neuronen möglich. Werden diese verletzt oder zerstört, entweder durch eine Krankheit oder durch andere Ereignisse, kann das fatale Auswirkungen für das Gehirn haben, die im schlimmsten Fall zum Tod führen.

Zu den wohl bekanntesten neurodegenerativen Erkrankungen zählen die Alzheimer- und Parkinson-Krankheit. Während bei der Alzheimer-Krankheit die für die kognitiven Funktionen benötigten Neurone in der Hirnrinde zerstört werden, degenerieren bei der Parkinson-Krankheit die dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra* ^{1,2}. Neben neurodegenerativen Erkrankungen können Neurone aber auch durch ein plötzlich auftretendes Ereignis zerstört werden. Dazu zählt beispielsweise der Schlaganfall. Bei einem Schlaganfall wird der Blutfluss zu einer bestimmten Hirnregion beispielsweise durch einen Thrombus unterbrochen. Als Folge werden die Neuronen nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Blut versorgt und sterben ab. Durch die Beeinträchtigung und den Verlust der Neurone können Symptome wie Lähmungen, Verlust der Sprache sowie Sehstörungen auftreten ³. Um einen Schlaganfall aber sicher diagnostizieren zu können, kommen bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Computertomographie (CT) zum Einsatz, wobei die MRT einen Vorteil durch ihre Genauigkeit bietet ⁴. Mit ihr können Ärzte schnell Informationen über die Art, Lokalisierung, Größe und Alter des Schlaganfalls erlangen, anhand derer die entsprechenden therapeutischen Maßnahmen ergriffen werden können. Allerdings ist es nicht möglich, mittels der MRT die Vitalität von Gewebe darzustellen. Dafür kann die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) verwendet werden, da mit ihr hypoxisches (unter Sauerstoffmangel leidendes) Gewebe im Schlaganfall sichtbar gemacht werden kann ^{5,6}.

In den folgenden Abschnitten werden die molekularen Vorgänge während eines Schlaganfalls erklärt und es wird näher auf die Erforschung neuer Therapien im Tiermodell eingegangen. Dabei wird Erythropoietin (EPO) als potenzieller Schlaganfalltracer und Ambroxolhydrochlorid (Ambroxol) als potenzielle neuroprotektive Substanz genauer

beschrieben. Außerdem werden die Möglichkeiten der bildgebenden Verfahren, MRT und PET, im Zusammenhang mit der Schlaganfalldiagnostik genauer betrachtet.

1.1 Der Schlaganfall

1.1.1 Allgemeines zum Schlaganfall

Jährlich erleiden in Deutschland zwischen 260.000 und 270.000 Patienten einen Schlaganfall. Statistisch gesehen bedeutet dies, dass etwa alle zwei Minuten ein Mensch von einem Schlaganfall betroffen ist. Diese Zahlen basieren auf Hochrechnungen des Erlangerer Schlaganfallregisters, das seit 1994 verschiedene Daten zu Schlaganfällen erfasst⁷⁻⁹. Etwa 6,8% der Patienten versterben bereits innerhalb des ersten Monats nach einem Schlaganfall und nach 5 Jahren sind etwa 45% der Schlaganfallpatienten verstorben¹⁰. Überleben die Patienten den Infarkt, haben sie je nach Lokalisation des Schlaganfalls mit sprachlichen, motorischen und somatosensorischen Defiziten zu kämpfen^{3,11}. Tatsächlich ist der Schlaganfall einer der häufigsten Gründe für eine erworbene Behinderung in Deutschland¹²⁻¹⁴. Für die Erst- und Nachbehandlung von Schlaganfällen fallen für ganz Europa Kosten von 45 Milliarden Euro pro Jahr an¹². 2015 lagen diese Kosten in Deutschland für das Gesundheitssystem bei etwa 5 Milliarden Euro¹².

Der Schlaganfall lässt sich hauptsächlich in zwei Gruppen unterteilen: Ischämie und Hämorrhagie (Abbildung 1). Etwa 87% aller Schlaganfälle sind ischämisch, was bedeutet, dass eine Hirnarterie beispielsweise durch einen Thrombus verschlossen wird. Kommt es dagegen zu einer Blutung im Gehirn, spricht man von einem hämorrhagischen Schlaganfall¹⁵.

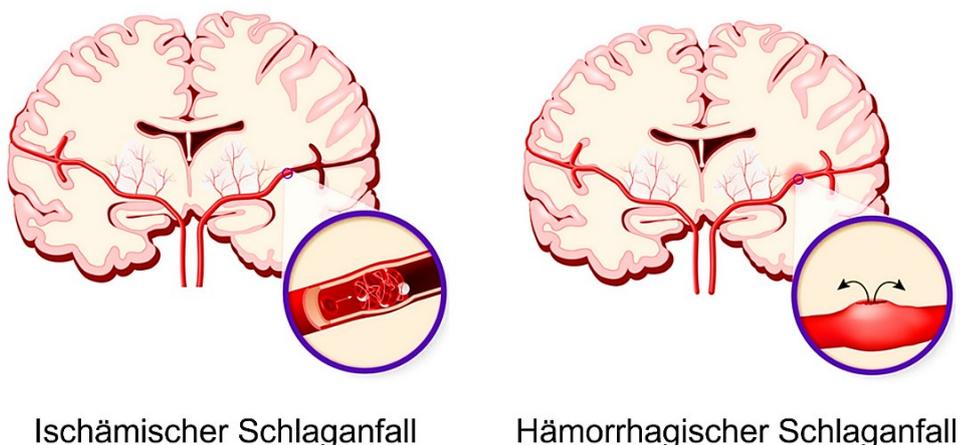


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zwei häufigsten Schlaganfalltypen. Links: Der ischämische Schlaganfall. Hier kommt es zu einem Verschluss der Arterie. Rechts: Der hämorrhagische Schlaganfall. Hier kommt es zu einer Ruptur der Arterie und als Folge zu einer Blutung im Gehirn. Abbildung übernommen von der Stiftung Deutsche Schlaganfall-Hilfe¹⁶.

Da die am häufigsten vorkommenden Schlaganfälle ischämisch sind, lag der Fokus in dieser Doktorarbeit auf dem ischämischen Schlaganfall. Im weiteren Verlauf ist daher unter dem Wort Schlaganfall die ischämische Form zu verstehen.

Bei einem Schlaganfall kommt es, wie bereits erwähnt, zu einem Verschluss einer Hirnarterie, wodurch nicht mehr genügend Blut in bestimmte Hirnareale gelangen kann. Fällt der Blutfluss auf unter 12 ml/100g/min, sterben die Zellen innerhalb von wenigen Minuten ab¹⁷. Der normale Blutfluss liegt im Schnitt bei etwa 50 ml/100g/min, wobei er sich im Gehirn zwischen der weißen Substanz mit etwa 20 ml/100g/min und der grauen Substanz mit etwa 80 ml/100g/min unterscheidet¹⁸. Die Namen der weißen und grauen Substanz leiten sich vom Aussehen der zwei unterschiedlichen Gewebetypen ab. Die graue Substanz besteht aus einer Ansammlung neuronaler Zellkörper und erscheint bei einem frisch präparierten Gehirn grau. Die weiße Substanz besteht hingegen aus Faserbahnen von Axonen und erscheint bei einem frisch präparierten Gehirn weiß¹⁹.

Obwohl das Gehirn nur etwa 2% der gesamten Körpermasse ausmacht, benötigt es im Ruhezustand rund 20% des kompletten Energiebedarfs²⁰. Als zelluläre Energiequelle ist Adenosintriphosphats (ATP) für die meisten chemischen Reaktionen in den Neuronen zuständig¹. Dafür werden etwa 92% des ATP direkt vor Ort in den Zellen durch den oxidativen Stoffwechsel von Glukose gewonnen¹⁸. Im Gehirn selbst kann so gut wie keine Energie gespeichert werden, wodurch eine konstante Sauerstoff- und Glukosezufuhr über das Blut essenziell ist^{18,21}. Sobald die Zellen nicht mehr mit frischem Blut versorgt werden können, ist der oxidative Zellmetabolismus unterbrochen und der Stoffwechsel bricht zusammen.

Damit Neurone überhaupt in der Lage sind Informationen in Form von Aktionspotentialen weitergeben zu können, ist ein Ionenkonzentrationsgradient notwendig. Auf Grund von ATP verbrauchenden Natrium-Kalium-Pumpen (Na^+/K^+ -Pumpen) sowie Ca^{2+} -Pumpen befindet sich eine erhöhte Konzentration von Calciumionen (Ca^{2+}) und Natriumionen (Na^+) außerhalb der Zelle und eine erhöhte Konzentration von Kaliumionen (K^+) innerhalb der Zelle^{22,23}. Durch den Zusammenbruch des Zellmetabolismus wird kein ATP mehr synthetisiert und die Funktion von ATP-abhängigen Ionenkanälen in den Nervenzellen, die für die Ionenhomöostase unverzichtbar sind, ist zerstört^{17,23}. Ohne ATP kann das Membranpotential der Zellen nicht mehr aufrechterhalten werden. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen sich und die Ionen diffundieren durch die Kanäle entlang ihres Konzentrationsgradienten, was bedeutet, dass Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle und K^+ -Ionen aus der Zelle fließen^{21,23,24}. In der Folge depolarisieren die Zellen. Durch den Verlust der Ionenhomöostase kommt es zu unterschiedlichen und teilweise gleichzeitig ablaufenden Ereignissen, die hier kurz umrissen werden und detaillierter bei Durukan *et al.*²¹, Jayaraj *et al.*²⁵ und Dirnagl *et al.*²⁶ nachgelesen werden können. Durch den

unkontrollierten Na^+ -Ioneneinstrom in die Zelle, kommt es durch die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts unweigerlich zu einem Wassereinstrom, wodurch die Zellen in der betroffenen Hirnregion anschwellen^{24,27}. Es entsteht ein sogenanntes Ödem²⁸. Das Ödem kann in zwei Untergruppen eingeteilt werden: 1.) das zytotoxische Ödem, welches die akute Phase des Schlaganfalls dominiert und auch als intrazelluläres Ödem bezeichnet wird und 2.) das vasogene Ödem, wodurch hauptsächlich die subakute Phase definiert ist und das auch als extrazelluläres Ödem bezeichnet wird²⁸. Theoretisch ist das zytotoxische Ödem allein nicht in der Lage eine Hirnschwellung zu verursachen, da die Verengung des extrazellulären Raums die Schwellung der Zellen zunächst kompensiert²⁸. Allerdings kommt es bei einem Schlaganfall unter anderem zu regulatorischen Änderungen der Ionentransportern in den Zellmembranen, die zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führen²⁸. Sie werden durch ischämische Faktoren stimuliert und sorgen im Gehirn durch den osmotischen Gradienten für eine Nettoaufnahme von weiteren Ionen aus dem Blut, wobei die Zellen durch den damit verbundenen Einstrom von Wasser weiter anschwellen^{28,29}. Unterschiedliche, durch den Schlaganfall induzierte Mechanismen, wie beispielsweise die Aktivierung von bestimmten Enzymen durch NO und NO_3^- ³⁰, sorgen für eine immer größer werdende Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und führen schlussendlich zu deren Zusammenbruch. Hauptsächlich durch den Blutdruck gelangen noch mehr Ionen und Wasser, aber auch Plasmaproteine ins Gehirn und resultieren in einem vasogenen Ödem^{29,31}. Neben der Ödembildung werden durch die Veränderung der Ionenkonzentrationen zusätzlich unkontrolliert inhibitorische und exzitatorische Neurotransmitter ausgeschüttet, die wiederum an ihre spezifischen Rezeptoren binden³². Einer dieser Neurotransmitter ist Glutamat, der durch eine hohe Konzentration von intrazellulärem Ca^{2+} -Ionen freigesetzt wird. Glutamat sorgt durch die Bindung an seine Rezeptoren für eine weitere Ca^{2+} -Ausschüttung, und induziert dadurch einen Kreislauf, der in einer Dauererregung der ionensteuernden Glutamatrezeptoren endet^{21,33,34}. So können noch mehr Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Ionen durch die Membran strömen, wodurch wiederum die Ödembildung gefördert wird^{25,34}. Außerdem schütten Organellen wie das Endoplasmatische Retikulum oder die Mitochondrien zusätzlich Ca^{2+} aus²¹. Allerdings ist eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration für die Neuronen problematisch, da Enzyme fälschlicherweise stimuliert werden, die wiederum die Zersetzung wichtiger Zellbestandteile wie Proteine und Nucleinsäuren in Gang setzten^{21,25,26}. Darüber hinaus ist Glutamat selbst in hohen Konzentrationen für die Zellen toxisch und führt zur Exzitotoxizität, eine durch den Neurotransmitter ausgelöste Nekrose bedingt durch eine Dauererregung der Zellen^{32,34}. Neben Neurotransmittern werden außerdem reaktive Sauerstoffradikale (engl.: „*reactive oxygen species*“, ROS) und entzündungsfördernde Faktoren wie Zytokine freigesetzt, die das

Gewebe zusätzlich schädigen können²⁵. Eine erhöhte Konzentration von ROS wird auch als oxidativer Stress bezeichnet, wobei das Gleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau von freien Radikalen gestört ist^{25,30}. ROS können verschiedene Signalwege regulieren, die zum Zelltod führen. Beispielsweise sind sie für passive Schäden in der Deoxyribonukleinsäure (engl.: „*deoxyribonucleic acid*“, DNA) verantwortlich oder phosphorylieren das Protein p53, welches wiederum intrazelluläre apoptotische Kaskaden in Gang setzt^{25,30}. Grundsätzlich können die Zellen bei einem Schlaganfall auf zwei Arten sterben: Nekrose und Apoptose³⁵. Dabei tritt Nekrose hauptsächlich in den stark betroffenen Zellen im Schlaganfallkern auf. Apoptose hingegen ist als programmierter Zelltod durch die Aktivierung von proteolytischen Enzymen vermehrt in Bereichen zu finden, die weiter vom Schlaganfallkern entfernt sind^{35,36}.

Erfreulicherweise ist das Gewebe bei einem Schlaganfall nicht überall gleich stark betroffen und kann in drei Bereiche unterteilt werden (Abbildung 2). Regionen, bei denen der Blutfluss komplett unterbrochen ist, bilden den Infarkt kern. Er ist dadurch definiert, dass sämtliches ATP nach kurzer Zeit aufgebraucht ist und die Zellen durch den fehlenden Nachschub innerhalb weniger Minuten sterben³⁷. Um diesen Infarkt kern legt sich ein Bereich, der als Penumbra bezeichnet wird. In dieser Region sind die Zellen zwar durch einen verringerten Blutfluss beeinträchtigt, aber nicht tot. In der Penumbra liegt der Blutfluss über 12 ml/100g/min, womit der Energiemetabolismus in diesem Bereich zumindest teilweise noch gegeben ist und ATP in den Zellen noch in lebenserhaltenden Konzentrationen vorhanden ist³⁸. In diesem Bereich kommt es zunächst zu keinen bleibenden Zellschäden, dennoch überleben die Zellen nicht unbegrenzt³⁹. Erhöht sich der Blutfluss im Bereich der Penumbra nicht innerhalb von 3 bis 4 Stunden, sterben die Zellen ebenfalls ab. Dies konnte in einer Studie gezeigt werden, in der sich das finale Schlaganfallvolumen nach dieser Zeit nicht mehr zwischen einer temporären oder permanenten Okklusion unterschied⁴⁰. Die Möglichkeit den Penumbrabereich vor dem Zelltod zu bewahren gibt der Medizin die Chance, durch ein therapeutisches Eingreifen die Schlaganfallregion so klein wie möglich zu halten. Dies kann entweder über eine frühzeitige Revaskularisierung oder durch die Gabe von Medikamenten erfolgen. In jedem Fall eröffnet es die Möglichkeit, den Schlaganfall zu therapieren. Der dritte und letzte Bereich wird als Oligämie bezeichnet. Zellen in diesem Bereich sind vom Schlaganfall nicht betroffen.

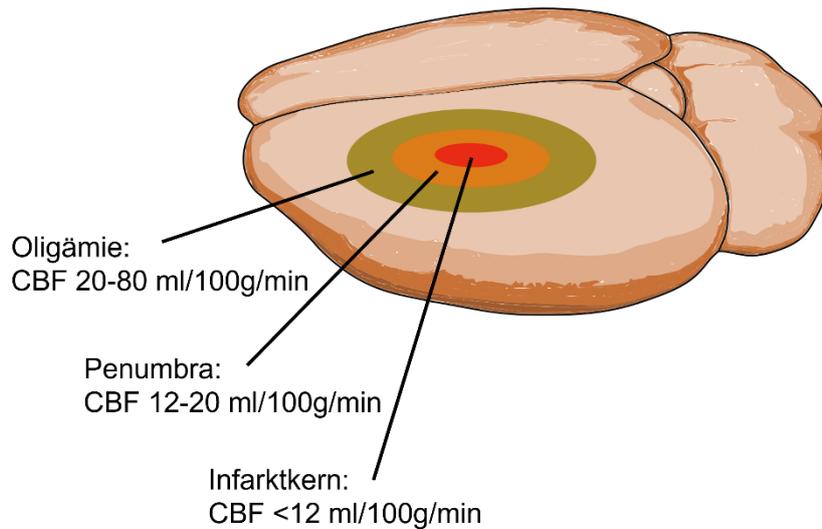


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Penumbra in einem Rattengehirn. Um den Schlaganfallkern mit einem Blutfluss (engl.: „cerebral blood flow“, CBF) von weniger als 12 ml/100g/min legt sich die Penumbra. Ihr CBF ist reduziert, doch die Zellen können noch überleben. Der Bereich, der nicht durch den Infarkt betroffen ist, wird als Oligämie bezeichnet. Abbildung bearbeitet in Anlehnung an Fiebach und Schellinger¹⁷, Vavilala *et al.*¹⁸ und Ishiyama & Brecht⁴¹.

1.1.2 Diagnose von Schlaganfällen

Wenn Patienten mit einem Verdacht auf einen Schlaganfall im Krankenhaus eingeliefert werden, kommen bildgebende Verfahren wie die CT oder MRT (siehe 1.2 Bildgebende Verfahren) zur Diagnose zum Einsatz. Mit der MRT ist es möglich, den Schlaganfall bereits 30 – 40 Minuten nach Schlaganfallbeginn darzustellen⁴²⁻⁴⁴. Auch wenn diese Methodik schon frühzeitig einen Einblick in die Lokalisation des Schlaganfalls geben kann, ist eine Suche nach verbesserten Verfahren dennoch wichtig. Vor allem die Frage nach der Vitalität der Zellen stellt einen zentralen Schlüssel zum Therapieerfolg dar. Je schneller und präziser der Schlaganfall diagnostiziert werden kann, desto größer sind im Falle einer Behandlung die Überlebenschancen und die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Genesung. Molekulare Veränderungen im Gewebe können dabei mittels PET gut dargestellt werden. Um diese Methodik auch in der Schlaganfalldiagnostik anwenden zu können, müssen Moleküle radioaktiv markiert werden, die an Rezeptoren im Schlaganfallgewebe binden. Dabei muss es sich um Rezeptoren handeln, die erst während oder nach einem Schlaganfall im betroffenen Gewebe exprimiert werden. Ein vielversprechendes Molekül für die Schlaganfalldiagnostik mit PET könnte Erythropoietin (EPO) und der Erythropoietinrezeptor (EPOR) sein.

1.1.2.1 Erythropoietin (EPO) und Erythropoietinrezeptor (EPOR)

EPO ist ein Glycoprotein, welches in erster Linie als Wachstumsfaktor zur Bildung neuer Erythrozyten führt. Es handelt sich dabei um ein Polypeptid bestehend aus 165 Aminosäuren und einer Molekülmasse von etwa 30 kDa⁴⁵. Durch die Bindung von EPO an Oberflächenrezeptoren, werden unter anderem Kaskaden für die Bildung neuer Blutkörperchen aktiviert (Erythropoese). Die Genexpression ist sauerstoffabhängig, was bedeutet, dass ein geschlossener Kreislauf die Expression von EPO reguliert⁴⁵. Ist die Anzahl der Erythrozyten zu gering, wird die Genexpression von EPO aktiviert. Dies hat zur Folge, dass die erhöhte EPO-Konzentration die Erythropoese stimuliert. Es werden neue Erythrozyten gebildet, mit deren Hilfe die Sauerstoffzufuhr wieder erhöht werden kann. Als Folge unterdrückt die angestiegene Erythrozytenzahl dann wiederum die Genexpression von EPO⁴⁵.

EPOR konnten bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, darunter in Astrozyten und Neuronen, aber auch in Tumorzellen und in der Niere⁴⁵⁻⁴⁸. EPO und die Expression von EPOR sind eng mit hypoxischem Gewebe verbunden^{49,50} und wurden sogar im Zusammenhang mit geschädigter Skelettmuskulatur nachgewiesen^{51,52}. Eine erhöhte EPOR-Expression und damit eine erhöhte Sensibilität gegenüber EPO konnte ebenfalls nach einem Schlaganfall in den betroffenen Hirnregionen gezeigt werden^{50,53}. Daher stellt radioaktiv markiertes EPO ein vielversprechendes Molekül dar, um als Biomarker zur Detektion von Schlaganfall genauer untersucht zu werden. Als Tracer würde EPO an die dort exprimierten Rezeptoren binden und so hypoxisches Gewebe auf den PET-Bildern sichtbar machen.

1.1.3 Therapiemöglichkeiten beim Schlaganfall

Allgemein lassen sich die Therapiemöglichkeiten von Schlaganfällen in zwei große Gruppen einteilen: Revaskularisierung und Neuroprotektion.

Die Revaskularisierung hat das Ziel, den Thrombus, welcher für den Verschluss der Arterie(n) verantwortlich ist, zu entfernen. Sie ist die zurzeit einzige Therapieoption, die nachgewiesen den Schaden eines Schlaganfalls reduzieren kann⁵⁴. Der Thrombus kann entweder mithilfe eines intravenösen gewebespezifischen Plasminogenaktivators („tissue plasminogen activator“, tPA) wie Alteplase lysiert, oder mittels eines Stent-Retrievers mechanisch entfernt werden^{55,56}.

Bei der Lyse mit Alteplase wandelt das Enzym das inaktive Plasminogen in Plasmin um. Plasmin spaltet wiederum Fibrin, ein Protein, das bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle spielt, wodurch der Thrombus auflöst wird⁵⁴. Ein großer Nachteil dieser Therapieoption ist das enge Zeitfenster, da sie nur 3 bis 4,5 Stunden nach der Okklusion

angewendet werden kann⁵⁷. Des Weiteren birgt sie das Risiko intrazerebraler Blutungen⁵⁵. Wird die Therapie nach 4,5 Stunden verwendet, kann sie sogar schädlich sein und die Sterberate der Patienten erhöhen^{54,58}. Erschwerend kommt hinzu, dass bei über 50% der Patienten kein genauer Schlaganfallstartzeitpunkt bekannt ist, da ein Schlaganfall beispielsweise auch im Schlaf eintreten kann. Nur etwa 30% der Patienten werden rechtzeitig für eine tPA-Therapie in ein Krankenhaus eingeliefert⁵⁹.

Neben der Lyse bietet die Verwendung eines Stent-Retrievers eine weitere Möglichkeit, den Thrombus aus der Arterie zu entfernen. Dabei wird ein dünner Führungsdraht mit einem Mikrokatheter meist über die Leistenarterie bis in das Gehirn und hinter den Thrombus geschoben. Über den Mikrokatheter wird der Stent-Retriever eingeführt. Sobald sich der Stent-Retriever an der richtigen Stelle befindet, wird der Katheter entfernt, damit sich der Stent-Retriever wie ein Netz entfalten kann. Danach wird der Stent-Retriever mitsamt dem Thrombus mechanisch aus der Arterie entfernt⁶⁰. Neben einem deutlich längerem Therapiezeitfensters von 7,3 Stunden erhöht sich die Sterblichkeitsrate durch diese Methode nicht⁶¹. Oft wird sie als zusätzliche Therapie verwendet, sollte sich der Thrombus mit dem tPA nicht aufgelöst haben^{54,56}.

Eine frühe Wiederherstellung des Blutflusses hat einen positiven Effekt auf das Schlaganfallvolumen. Wartet man mit der Therapie aber zu lange kann es paradoxerweise das Gegenteil bewirken und das Schlaganfallvolumen sogar vergrößern. Zusätzlich stellt die Reperfusion der ischämischen Bereiche selbst ein Problem dar. Zum einen ist sie zwar essenziell für das Überleben von betroffenem aber noch vitalem Gewebe, zum anderen kann sie aber für zusätzliche Gewebeschädigungen verantwortlich sein⁶². Durch den plötzlichen Sauerstoffanstieg kommt es zur Produktion von hochreaktiven Stickstoffverbindungen (RNS, engl.: „*reactive nitrogen species*“) und weiteren ROS. Dies hat zur Folge, dass Kaskaden ausgelöst werden, die zum Zelltod führen und so noch größeren Schaden verursachen^{26,30}. Dabei spielen zum einen vornehmlich Hyperoxidationen, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid als ROS und zum anderen Stickstoffmonoxid und Peroxinitrit als RNS eine wichtige Rolle³⁰. Sie können den Zelltod durch die Schädigung der DNA, durch Lipidperoxidation (oxidative Degradation von Lipiden), Entzündungen, Veränderungen von Proteinstrukturen sowie Veränderungen von Proteinfunktion verursachen und damit das Schlaganfallvolumen vergrößern³⁰. Generell sollte daher der Effekt von reperfusionsbedingter Schädigung am Hirngewebe nicht unterschätzt werden.

Neuroprotektive Therapien dienen dazu, dieser Problematik entgegenzuwirken. Sie sollen durch unterschiedliche mechanistische Wirkungsweisen, die von Therapeutikainjektionen bis hin zur Hypothermie reichen, das Gewebe vor dem Absterben bewahren. Beim hypothermischen Therapieansatz wird die Körpertemperatur um 1° - 3°C

heruntergekühlt, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen⁶³. Damit soll erreicht werden, dass sich der Zellmetabolismus verlangsamt und sich der Energiebedarf in Form von ATP reduziert. Im Idealfall würde der neuropathologische Schaden, der durch den Schlaganfall verursacht wird, verringert werden^{64,65}. Oft werden aber auch typische Signalwege für die Neuroprotektion ins Auge gefasst, die das Sterben von Neuronen verhindern sollen^{66,67}. Beispielsweise verursachen vom Schlaganfall hervorgerufene Entzündungsreaktionen weiteren Gehirnverletzungen⁶⁶. Das Ziel neuroprotektiver Therapien ist es daher, die Entzündungsreaktionen so gering wie möglich zu halten, indem die biochemischen und molekularen Vorgänge im Schlaganfall unterbrochen, umgekehrt oder zumindest verlangsamt werden⁶⁸.

Eine erfolgreiche Neuroprotektion kann aber nicht allein durch ein reduziertes Schlaganfallvolumen definiert werden. Wie bereits erwähnt, ist der Schlaganfall einer der Hauptgründe für eine erworbene Behinderungen^{12,13}. Daher ist es ebenfalls wichtig darauf zu achten, ob es neben einer Volumenreduktion auch zu einer Verbesserung der körperlichen Beschwerden kommt⁶⁸. Übertragen auf ein Tiermodell würde dies eine Validierung des Verhaltens anhand unterschiedlicher Verhaltenstests bedeuten. Trotz einiger vielversprechender Ansätze, zeigen leider die meisten neuroprotektiven Therapien bisher nur in Tieren den gewünschten Erfolg⁶⁹. Darüber hinaus ist aufgrund des demographischen Wandels außerdem nicht mit einem Rückgang der Schlaganfallereignissen zu rechnen, obwohl die Sterblichkeitsrate bei Schlaganfällen seit Jahren fällt^{9,10}. Es ist daher von großer Bedeutung immer neue Therapiemöglichkeiten zu evaluieren, die für die steigende Anzahl an Patienten einen Mehrwert darstellen können.

1.1.3.1 Ambroxol

Ambroxol ($C_{13}H_{18}Br_2N_2O$ HCl; 2-Amino-3,5-dibromo-N-methylbenzylamin Hydrochlorid, Abbildung 3) ist als Hustenschleimlöser unter den Namen MUCOSOLVAN[®] oder Ambroxol-ratiopharm[®] bekannt und in Apotheken erhältlich.

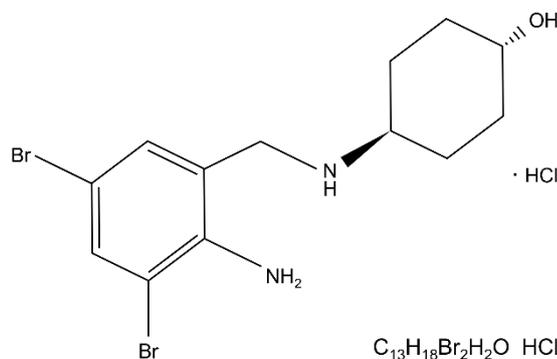


Abbildung 3: Strukturformel von Ambroxolhydrochlorid (Ambroxol). Abbildung angepasst nach Malerba *et al.*⁷⁰

Bereits 1977 konnte ein analgetischer Effekt von Ambroxol im Auge nachgewiesen werden, der aber nicht weiter verfolgt wurde, da vereinzelt Personen über Juckreiz klagten⁷¹. Erst 2002 wurde Ambroxol als wirksames Medikament gegen Halsschmerzen wiederentdeckt^{71,72}. Wie bei allen Reizweiterleitungen spielt das Aktionspotential auch bei der Schmerzreizweiterleitung eine essenzielle Rolle. Findet keine Erregung statt, befinden sich die Zellen im Ruhezustand und ein Ruhepotential stellt sich ein, wobei unter anderem Ca^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Ionen sowie ihr Ionenkonzentrationsgradient die Grundlage bilden. Während die Konzentration von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen außerhalb der Zelle deutlich höher sind, ist die Konzentration von K^+ -Ionen innerhalb der Zelle deutlich höher²². Kommt es zu einem Aktionspotential, öffnen sich spannungsgesteuerte Ionenkanäle und ermöglichen einen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen ins Zellinnere. Nach einem Aktionspotential wird das Ruhepotential mithilfe der Na^+/K^+ -Pumpen und Ca^+ -Pumpen wieder hergestellt^{22,73}. Werden die Na^+ -Kanäle nun von einer pharmakologischen Substanz blockiert (wie zum Beispiel von Ambroxol), tritt ein analgetischer Effekt auf, da die Schmerzreizweiterleitung unterbrochen ist⁷¹. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Ambroxol die spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle in sensorischen Neuronen blockieren kann⁷⁴. Außerdem führt die Gabe von Ambroxol zu einer Inhibition der Ca^{2+} -Kanäle⁷¹. Es konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien belegen, dass dadurch ein sauerstoffradikalreduzierender und entzündungshemmender Effekt hervorgerufen wurde⁷⁵⁻⁷⁹.

Daher stellte sich im Zusammenhang mit dieser Arbeit die Frage, ob es mittels Ambroxol gelingen würde, die Auswirkungen eines Schlaganfalls zu verringern. Durch die Blockierung der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle könnte ein unkontrollierter Einstrom von Wasser in die Zellen und die damit verbundene Bildung des Ödems, Nekrose sowie Exzitotoxizität verhindert und weitere durch Ca^{2+} induzierte Prozesse unterbunden werden, die ebenfalls zu einem Absterben der Neurone führen würden. Sekundäre Verletzungen durch ROS, RNS und Entzündungen könnten so eventuell verhindert oder abgemildert werden. Eine Aufnahme von Ambroxol konnte im Rattengehirn bereits nachgewiesen werden, wobei eine maximale Ambroxolkonzentration im Striatum nach 60 Minuten erreicht war⁸⁰. Gelingt es, mit Ambroxol die Schlaganfallauswirkungen zu reduzieren, wäre es mit seinen Eigenschaften ein vielversprechender Kandidat, um als neuroprotektives Therapeutikum bei einem Schlaganfall eingesetzt zu werden und ein Meilenstein in der künftigen Behandlung von Schlaganfallpatienten. Soweit bisher bekannt ist, wurden keine Daten im Zusammenhang mit Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfall veröffentlicht.

1.1.4 Schlaganfall im Tiermodell

Die Schlaganfallforschung an Tiermodellen ist eine geeignete Methode, um neue Therapieansätze zu untersuchen. Ratten sind dabei die am häufigsten eingesetzten Tiere,

da ihre Gefäßsysteme und die Physiologie im Gehirn dem Menschen sehr ähnlich sind⁸¹. Allerdings bringen Tiermodelle beim direkten Vergleich auch einige Probleme mit sich, da ein Schlaganfall beim Menschen eine heterogene Erkrankung mit einer komplexen pathologischen Physiologie darstellt⁸². Hingegen werden bei Tiermodellen hauptsächlich junge, gesunde und genetisch ähnliche Tiere für die Versuche verwendet. In der Realität erkranken aber hauptsächlich ältere Menschen mit diversen Vorerkrankungen, die sich als Risikofaktoren erweisen. Zu den Risikofaktoren zählen unter anderem Diabetes, Bluthochdruck, Herzerkrankungen und Alter, wobei letzteres das größte Risiko darstellt und in präklinischen Studien oft vernachlässigt wird^{82,83}. Daher ist es umso wichtiger, das passende Tiermodell für das jeweilige Versuchsziel auszuwählen. Im Folgenden werden vier häufig verwendete Schlaganfallmodelle kurz vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile erläutert.

Das mittelzerebrale Arterienokklusionsmodell (engl.: „*middle cerebral artery occlusion*“, MCAO): Dieses Modell ist für die Forschung besonders interessant, da die mittlere zerebrale Arterie bei humanen Schlaganfällen am häufigsten betroffen ist^{82,84}. Sie versorgt wichtige Strukturen, die für die Motorik, die Somatosensorik, das Sehen und das Sprechen benötigt werden⁸⁵. Das MCAO-Modell ist das in der Forschung am häufigsten verwendete Schlaganfallmodell^{82,86}, wobei ein Filament über die *Arteria Carotis Communis* bis zur *Arteria Cerebri Media* (ACM) eingeführt wird und letztere dadurch verschlossen wird. Bei dieser Methode ist es möglich, zwischen einer permanenten und einer temporären Okklusion zu unterscheiden und somit die Dauer des Gefäßverschlusses zu variieren. Das Modell ahmt außerdem den humanen Schlaganfall sehr gut nach, ist reproduzierbar und hat einen therapierbaren Penumbrobereich⁸². Der operative Eingriff ist zudem nicht sonderlich zeitaufwändig. Allerdings ist die Wahl der richtigen Größe des Filaments von großer Bedeutung, da es andernfalls entweder zur Ruptur des Blutgefäßes kommen kann (zu groß), oder die ACM nicht richtig verschlossen wird (zu klein)⁸².

Das Photothrombose-Modell: Bei diesem Schlaganfallmodell wird eine ischämische Läsion hauptsächlich im *Cortex*-Bereich durch intravaskuläre Photooxidation hervorgerufen. Den Tieren wird ein lichtsensitiver Farbstoff injiziert, durch den Sauerstoffradikale entstehen, sobald einen Lichtstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge darauf trifft^{82,87,88}. Diese Sauerstoffradikale führen dann zu einer Endothelzerstörung und zur Bildung von Plättchen, die sich dann in den Blutgefäßen ansammeln^{82,89,90}. Dieses Modell führt zu einem schnellen ischämischen Zelltod⁸². Der Vorteil ist, dass die Methode kaum invasiv ist, die Lokalisierung des Schlaganfalls genau geplant werden kann und es dadurch eine sehr hohe Reproduzierbarkeit aufweist^{87,88}. Allerdings ist der Schlaganfall nicht mit der Situation im Menschen vergleichbar. Durch den schnellen Zelltod ist das Modell außerdem zur Untersuchung therapeutischer Ansätze ungeeignet⁸².

Endothelin-1 Modell: Endothelin-1 ist ein starker Vasokonstriktor, welcher nach Injektion die Mikrogefäße verengt und so bei den Tieren ohne operativen Eingriff ein Schlaganfall induziert.⁸³ Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringen Sterblichkeitsrate und der Möglichkeit, zwischen kortikalen und subkortikalen Schlaganfallläsionen zu wählen. Allerdings ist die Länge der Okklusion nicht kontrollierbar, was einen großen Nachteil bei diesem Modell darstellt⁸².

Embolisches Modell: Bei diesem Modell wird der Schlaganfall durch einen Embolus auszulösen. Dafür werden entweder Fremdkörper in die Arterien eingeführt, oder körpereigenes Blut, zum Beispiel über Thrombin, zum verklumpen gebracht^{82,83,91}. Der größte Vorteil dieser Methode ist, dass die Pathogenese dieses Modells dem humanen Schlaganfall am ähnlichsten ist. Allerdings unterschieden sich die Größen der Läsionen untereinander sehr stark, was eine schlechte Reproduzierbarkeit der Infarkte zur Folge hat. Außerdem kann es zur plötzlichen und unerwünschten Auflösung des Thrombus und damit zu einer unerwünschten Wiederherstellung des Blutflusses kommen⁸².

In der vorliegenden Arbeit wurde das MCAO-Modell verwendet, da die Okklusion der ACM der am häufigsten auftretende Schlaganfall beim Menschen ist. Darüber hinaus war es wichtig ein Modell zu verwenden, welches einen therapierbaren Penumbra-Bereich aufweist. Des Weiteren sollte ebenfalls eine gewisse Reproduzierbarkeit gegeben sein, um die therapierten und nicht-therapierten Schlaganfallvolumina besser vergleichen zu können.

1.2 Bildgebende Verfahren

Schon seit geraumer Zeit helfen bildgebende Verfahren in der Medizin dabei, schnell und ohne lange Vorbereitung einen Einblick in das Innere der Menschen zu gewinnen. Neben den gängigen Methoden, die in vielen Praxen in Form von Röntgen- oder Ultraschallgeräten zur Verfügung stehen, gibt es auch deutlich komplexere Verfahren, wie die MRT oder die PET. Diese Verfahren bieten neben den strukturellen und anatomischen Informationen auch die Möglichkeit, molekulare und funktionelle Veränderungen einer Erkrankung zu untersuchen. Nachteile dagegen sind die höheren Kosten in der Anschaffung und im Unterhalt sowie die begrenzte Verfügbarkeit von Radiotraceren.

1.2.1 Die Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT ermöglicht die anatomische Darstellung von Organen und Geweben mit hohem Weichteilkontrast, sowie die Messung von funktionellen Prozessen. Dabei bietet sie anhand der zugrundeliegenden Technologie eine relativ hohe Ortskodierung, wodurch sie in der Schlaganfalldiagnostik eine große Rolle spielt. Zudem ermöglicht sie, einen Infarkt mittels Diffusionsbildgebung zuverlässig und früh darzustellen sowie räumlich

einzugrenzen^{42,44}. Damit es zu aussagekräftigen MRT-Bildern kommen kann, ist jedoch ein komplexes Zusammenspiel von hochfrequenten Radioimpulsen und zusätzlichen Gradienten (zeitlich und räumlich variierende Magnetfelder) erforderlich.

Lange Zeit galt die CT als klinischer Goldstandard, da mit ihr innerhalb kürzester Zeit ein Schlaganfall diagnostiziert werden konnte. Allerdings gibt es mittlerweile immer mehr Indizien, dass die MRT deutliche Vorteile für die Diagnostik von Schlaganfällen mit sich bringt, die den geringfügigen zeitlichen Mehraufwand rechtfertigen^{4,92,93}. So punktet die MRT zum Beispiel durch ihre höhere Empfindlichkeit und Genauigkeit⁹³. Mittels spezifischer Sequenzen kann darüber hinaus die Unterschiede zwischen einem ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall besser dargestellt werden⁴ und die Patienten sind keiner belastenden Strahlung ausgesetzt.

Im Folgenden wird die Funktionsweise der MRT genauer erläutert. Für eine ausführliche und detailliertere Beschreibung werden die Bücher von Robert Brown *et al.*⁹⁴, Scott Huettel *et al.*⁹⁵ und Dominik Weishaupt *et al.* empfohlen⁹⁶.

1.2.1.1 Allgemeine Physik

Die Anfänge der MRT gehen fast 100 Jahre zurück, denn bereits in den 1920ern entdeckte Wolfgang Pauli Anomalien in elektromagnetischen Spektren, die von angeregten Atomen emittiert wurden⁹⁵. In den 1930ern verfolgte Isidor Rabi den Spin eines Photons und dessen Interaktionen mit einem Magnetfeld und war der Erste, der den nuklearen Magnetresonanzeffekt nachweisen konnte und wurde dafür 1944 mit dem Nobel Preis ausgezeichnet^{94,95}. Seither wurde seine Entdeckung immer weiter entwickelt, bis es Paul Lauterbur durch die Einführung von Gradienten gelang, 1973 das erste zweidimensionale MRT-Bild zu veröffentlichen^{95,97}. Dennoch sollte es fast weitere 15 Jahre dauern, bis die MRT 1985 von der FDA (*Food and Drug Administration*) für den klinischen Gebrauch in Amerika zugelassen wurde⁹⁵.

Das Prinzip der MRT basiert auf der Tatsache, dass Atomkerne durch ein starkes Magnetfeld einheitlich ausgerichtet und mit einem Puls angeregt werden. Dadurch emittieren die Kerne ein Signal, das durch sogenannte Empfangsspulen aufgenommen und durch eine komplexe Software in aussagekräftige Schichtbilder umgewandelt werden kann. Grundsätzlich können verschiedene Atome gemessen werden, solange sie die wichtige Eigenschaft einer ungeraden Anzahl von Protonen mitbringen. Atomkerne, die in der MRT-Bildgebung eine Rolle spielen sind Wasserstoff (¹H), Kohlenstoff (¹³C), Natrium (²³Na) und Phosphat (³¹P)^{98,99}. Aufgrund der Tatsache, dass der menschliche Körper aus ca. 60% Wasser besteht, stellt das ¹H-Atom mit nur einem positiv geladenen Proton ein optimales Atom für die MRT-Bildgebung dar.

Alle Elementarteilchen, wie auch das ^1H -Atom, haben die quantenmechanische Grundeigenschaft eines Eigendrehmoments, dem sogenannten *Spin* (engl. spin = Dreh/Drall). Wird der ^1H -Atomkern einem äußeren Magnetfeld B_0 ausgesetzt, richten sich die ^1H -Spins entlang des Magnetfeldes entweder parallel oder antiparallel aus (Abbildung 4) ¹⁰⁰.

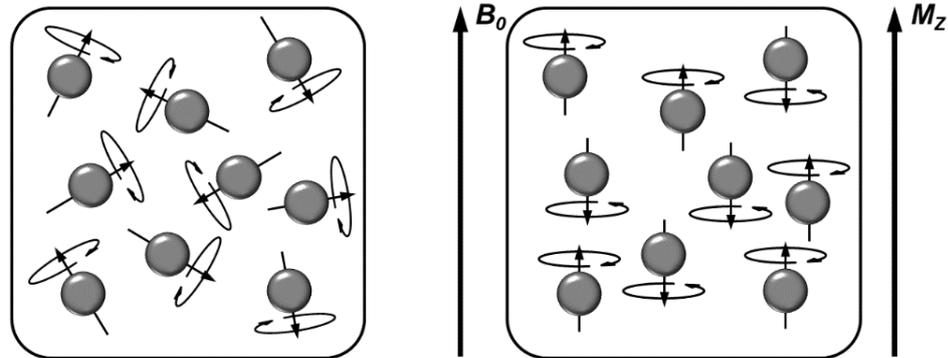


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Spins der Wasserstoffatome. Links: Spins, die sich in einem Gewebe ohne äußeren Einfluss in alle Richtungen orientieren. Rechts: Wird ein Magnetfeld B_0 angelegt, orientieren sich die Spins entweder parallel oder antiparallel zu diesem Magnetfeld. Da sich aus energetischen Gründen mehr Spins parallel ausrichten, entsteht ein messbarer Unterschied in der Längsmagnetisierung M_z . Abbildung bearbeitet und angepasst nach Weishaupt *et al.* ¹⁰⁰.

Da die Rotationsachse der Spins nicht genau der Achse des Magnetfeld B_0 entspricht, sondern leicht geneigt ist, kommt es zu einer sogenannten Präzessionsbewegung der Spins. Die Größe des Winkels, den die Rotationsachse des Spins zum Magnetfeld B_0 hat, ist vom Eigendrehmoment des jeweiligen Protons abhängig ⁹⁵. Bei der Präzessionsbewegung handelt es sich um eine kreisende Bewegung der rotierenden Achse (Spin) um eine feste Achse (Magnetfeld B_0), die einer bestimmten Frequenz folgt ⁹⁴. Diese Frequenz wird als Larmorfrequenz (ω_0) bezeichnet und lässt sich über die Lamorgleichung (Gleichung [1]) berechnen, da sie sich als Produkt aus dem gyromagnetischen Verhältnis γ_0 und der Stärke des Magnetfeldes B_0 zusammensetzt. Die Lamorfrequenz ist somit proportional zur Stärke des Magnetfeldes B_0 ¹⁰⁰.

$$\omega_0 = \gamma_0 * B_0 \quad [1]$$

Das gyromagnetische Verhältnis γ_0 ist eine für jedes Atom spezifische Konstante und beträgt für ^1H -Atome 42,58 Megahertz (MHz) pro Tesla, also 298,06 MHz für ein MRT mit 7 Tesla ⁹⁴.

Wie bereits erwähnt, richten sich die Spins entweder parallel oder antiparallel entlang des angelegten Magnetfelds B_0 aus, wobei sich einige wenige Spins eher parallel als antiparallel orientieren. Durch diesen kleinen Energieunterschied (ΔE) zwischen den beiden Orientierungen ergibt sich eine messbare Längsmagnetisierung M_z . Die parallele Ausrichtung (p_p) hat dabei einen niedrigeren, aber für die Spins energetisch günstigeren Zustand als die antiparallele Ausrichtung (p_a). Dadurch erhöht sich die Präferenz der Spins zur parallelen Ausrichtung. Das Verhältnis zwischen p_p und p_a kann im thermischen Gleichgewicht mit der Boltzmann-Statistik berechnet werden (Gleichung [2]) und ist von der Stärke des Magnetfeldes B_0 und der Temperatur (T) abhängig ⁹⁵.

$$p_p/p_a = e^{\Delta E/k_B T} \quad [2]$$

Dabei stellt k_B die Boltzmann-Konstante dar.

Die Energiedifferenz ΔE kann auch in Form der magnetischen Feldstärke ausgedrückt werden (Gleichung [3]),

$$\Delta E = 2\mu B_0 \quad [3]$$

wobei μ für das magnetische Moment des jeweiligen Protons steht ⁹⁵. Ist das Magnetfeld B_0 größer, gibt es einen größeren Unterschied zwischen den Orientierungen und damit ein größeres zu detektierendes Signal.

Das alleinige Ausrichten der Spins in ein stabiles Spinsystem selbst ergibt allerdings noch kein Signal. Dafür ist ein elektro-magnetischer Impuls aus einer Sendespule nötig. Dieser sogenannte Hochfrequenz (HF)-Impuls entspricht der Larmorfrequenz und lenkt die Spins um einen definierten Winkel, der als Flipwinkel bezeichnet wird, aus. Unter Voraussetzung der richtigen Dauer und Leistung können die Spins zum Beispiel um 90° ausgelenkt werden. Die Magnetisierung M_z befindet sich dann nicht mehr in einer parallelen Richtung Z , sondern wird um 90° in die XY -Ebene, also M_{XY} , geklappt. Sie befindet sich nun in einem höheren Energielevel. Auf dieser Ebene rotiert der Summenvektor als transversale Magnetisierung M_{XY} , und induziert so in der Empfangsspule eine Wechselspannung, ebenfalls der Larmorfrequenz entsprechend, die das MR-Signal darstellt ¹⁰⁰. Damit die Spins wieder in ihre Ausgangsposition M_z zurück gelangen, geben sie ihre Energie durch zwei unabhängige aber gleichzeitig ablaufende Vorgänge ab. Dadurch

nimmt sowohl die transversale Magnetisierung M_{XY} als auch das MR-Signal ab. Um erneut ein Signal zu generieren, ist ein weiterer HF-Impuls nötig ¹⁰¹.

1.2.1.2 T1: Longitudinale Relaxation

Das MR-Signal wird nach dem Abschalten des HF-Impulses immer kleiner, je mehr die transversale Magnetisierung M_{XY} abnimmt und sich die Längsmagnetisierung M_Z wieder aufbaut. Einer dieser Vorgänge wird longitudinale Relaxation oder Spin-Gitter Relaxation genannt. Beim Relaxieren geben die Spins ihre Energie an die Umgebung (das Gitter) ab (Abbildung 5) ¹⁰¹.

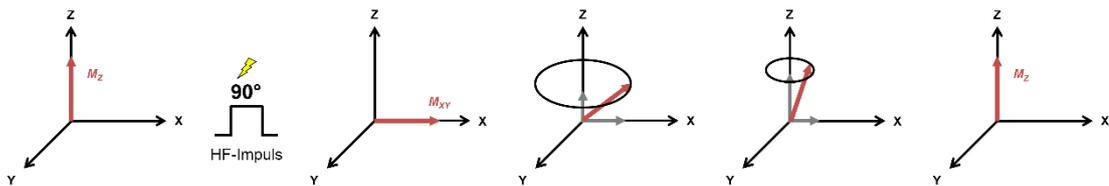


Abbildung 5: Schematische Darstellung der longitudinalen Relaxation. Die Spins befinden sich in der Längsmagnetisierung M_Z und werden durch einen Hochfrequenz (HF)-Impuls um 90° in die transversale Magnetisierung M_{XY} ausgelenkt. Mit der Zeit relaxieren die Spins und gehen unter Abgabe von Energie an die Umgebung in ihre Ausgangsposition M_Z zurück. Die Zeitkonstante der longitudinalen Relaxation ist T1. Abbildung bearbeitet und angepasst nach Weishaupt *et al.* ¹⁰¹ und Amend ¹⁰².

T1 ist die Zeitkonstante der longitudinalen Relaxation. Wird ein MR-Bild hauptsächlich durch die Eigenschaften von T1 bestimmt, nennt man diese Bilder T1-gewichtet. Eine T1-Gewichtung kann beispielsweise durch eine kurze Repetitionszeit (engl.: „*time of repetition*“, TR) erreicht werden. Die TR ist als die Zeit definiert, die verstreicht, bis der nächste HF-Impuls gegeben wird. Während der TR können die Spins wieder in ihre Längsmagnetisierung M_Z zurückkehren. Wird eine kurze TR gewählt, haben nur Spins die rasch relaxieren die Möglichkeit erneut komplett angeregt zu werden. Gewebe mit solchen Spins (zum Beispiel Fett) erzeugen ein höheres Signal und erscheinen hell. Spins, die länger für ihre Relaxation benötigen, können nicht komplett angeregt werden. Diese erzeugen ein geringeres Signal und erscheinen daher im Bild dunkler (zum Beispiel Gewebe mit hohem Flüssigkeitsgehalt). So ist es möglich Kontraste zwischen verschiedenen Geweben in einem T1-gewichteten Bild darzustellen. Wählt man hingegen eine lange TR, können alle Spins relaxieren und wieder komplett angeregt werden. Da nun alle Spins ein ähnlich starkes Signal abgeben, ist das Bild weniger stark T1-gewichtet (Abbildung 6) ¹⁰³.

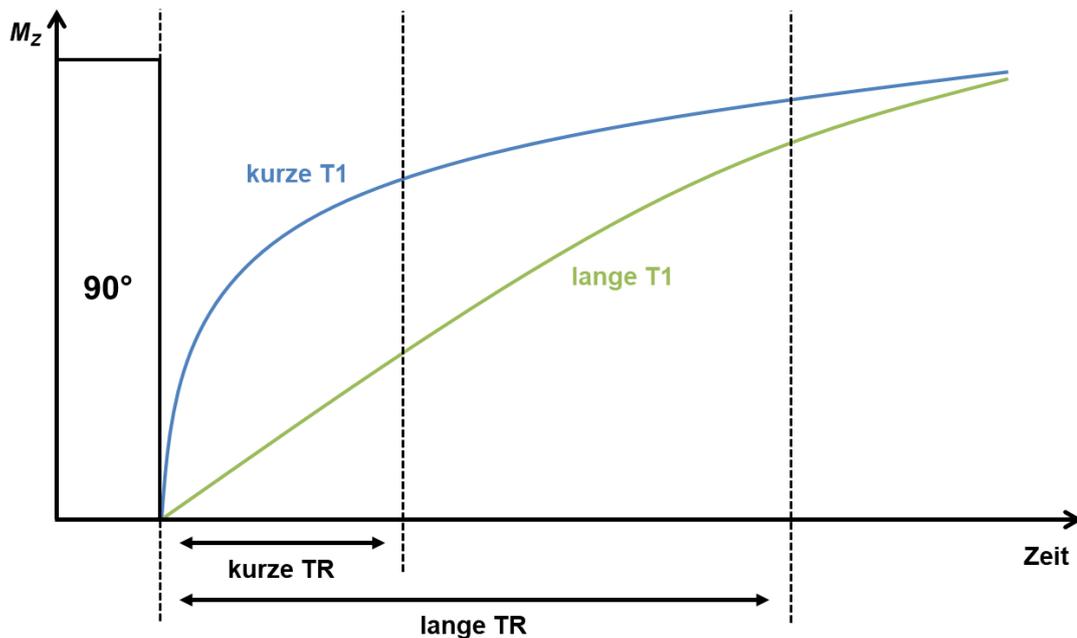


Abbildung 6: Schematische Darstellung der T1-Kontraste bei unterschiedlichen Repetitionszeiten (TR). Nachdem der 90° Hochfrequenz-Impuls ausgeschaltet wurde, relaxieren die Spins. Wird eine kurze TR gewählt erscheinen Gewebe mit einer kurzen T1 hell (hyperintens), da sie schneller relaxieren und somit ein stärkeres Signal erzeugen. Gewebe mit einer langen T1 erscheinen dunkel (hypointens), da sie langsamer relaxieren und somit ein schwächeres Signal erzeugen. Das MR-Bild ist T1 gewichtet. Wird hingegen eine lange TR gewählt, geben alle Gewebe ein ähnlich starkes Signal ab. Die T1-Gewichtung hat abgenommen. Abbildung bearbeitet und angepasst nach Weishaupt *et al.* ¹⁰³.

1.2.1.3 T2/T2*: Transversale Relaxation

Etwas anders verhält es sich beim nächsten Vorgang, der transversalen Relaxation oder Spin-Spin Relaxation. Hier geben die Spins ihre Energie nicht an die Umgebung ab, sondern tauschen sie untereinander aus. Direkt nach der Anregung sind die Spins synchron, sie haben alle eine Phase von 0° . Als Phase wird hier ein Winkel zwischen den Spins bezeichnet. Bei synchronen Spins spricht man von Spins, die „in Phase“ sind, oder von Phasenkohärenz. Sobald der HF-Impuls abgeschaltet wird, geht diese Phasenkohärenz nach und nach verloren. Weil sich die Spins gegenseitig beeinflussen, kommt es hierbei zu lokalen Magnetfeldveränderungen und dadurch bedingt zu verschiedenen Larmorfrequenzen. Die Spins präzedieren nun mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, wodurch sich die einzelnen Magnetvektoren beginnen gegenseitig aufzuheben. Die transversale Relaxation ist durch die Dephasierung der Spins und den damit einhergehenden Verlust der transversalen Magnetisierung definiert. Durch die Dephasierung wird die transversale Relaxation immer kleiner und das MR-Signal immer schwächer (Abbildung 7) ¹⁰¹.

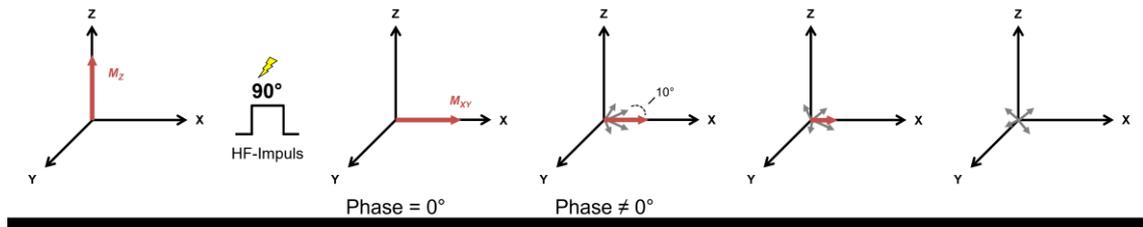


Abbildung 7: Schematische Darstellung der transversalen Relaxation. Die Spins befinden sich in der Längsmagnetisierung M_z und werden durch einen Hochfrequenz (HF)-Impuls um 90° in die transversale Magnetisierung M_{xy} ausgelenkt. Am Anfang befinden sich die Spins in Phasenkohärenz (Spins sind synchron) und haben eine Phase von 0° (Phase beschreibt einen Winkel), die aber mit der Zeit durch die transversale Relaxation abnimmt (Phase $\neq 0^\circ$). Je mehr die Spins dephasieren (transversal relaxieren), desto geringer wird das MR-Signal. Die Zeitkonstante der transversalen Relaxation ist T_2 . Abbildung bearbeitet und angepasst nach Weishaupt *et al.* ¹⁰¹ und Amend ¹⁰².

T_2 ist die Zeitkonstante der transversalen Relaxation. Durch den MRT-Scanner selbst und zusätzlich durch den zu untersuchenden Körper kommt es zu einer starken Inhomogenität des äußeren Magnetfeldes B_0 und sorgt so für eine noch schnellere Dephasierung der Spins. Ihre Zeitkonstante wird T_2^* genannt. Dieses Phänomen tritt vorwiegend an Gewebegrenzflächen auf und kann durch spezielle Messmethoden eliminiert werden (siehe 1.2.1.5.1 Spinecho-Sequenz (SE-Sequenz)). Für die funktionelle Bildgebung werden oft stark gewichtete T_2^* -Sequenzen verwendet (siehe 1.2.1.7 Funktionelle MRT (fMRT)). Im Gegensatz zur TR, die bei T_1 -gewichteten Bildern darüber entscheidet wie ein Bild gewichtet ist, entscheidet bei der T_2 darüber die Echozeit (engl.: „time of echo“, TE). Hierbei handelt es sich um eine Zeitspanne, die zwischen der Anregung der Spins und der Messung des MR-Signals liegt. Nach einer kurzen TE hatten die Spins keine Möglichkeit viel von ihrer Energie an benachbarte Spins abzugeben, somit ist keine oder nur eine geringe T_2 -Gewichtung vorhanden. Nach einer längeren TE geben die Spins mit einer schnellen Relaxation viel Energie und damit Signal ab und das Gewebe (zum Beispiel Bindegewebe oder Muskeln) erscheint dunkel. Spins mit einer langsamen Relaxation geben weniger Energie an die umliegenden Spins ab und besitzen somit noch eine höhere Signalstärke, ihr Gewebe erscheint hell, (zum Beispiel Gewebe mit hohem Flüssigkeitsgehalt, Abbildung 8) ¹⁰³.

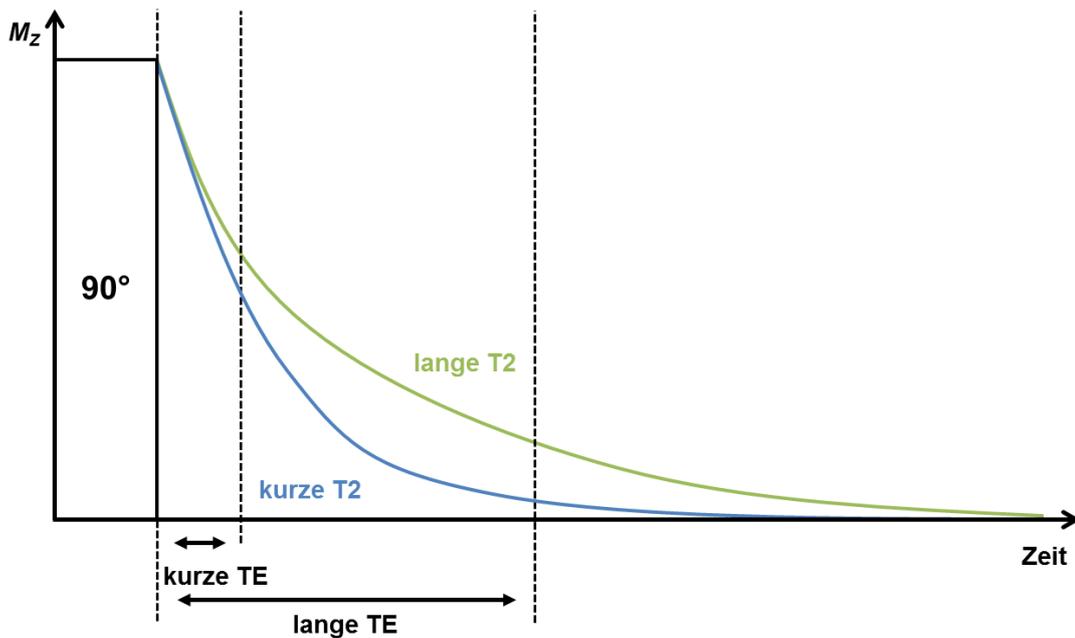


Abbildung 8: Schematische Darstellung der T2-Kontraste bei unterschiedlichen Echozeiten (TE). Nachdem der 90° Hochfrequenz-Impuls ausgeschaltet wurde, dephasieren die Spins. Wird eine kurze TE verwendet, sind die Spins noch nicht in der Lage ihre Energie an benachbarte Spins abzugeben, und die T2-Gewichtung ist gering. Wird eine lange TE gewählt, erscheinen Gewebe mit einer kurzen T2 dunkel, da sie schneller dephasieren und somit auch schnell ihre Signalstärke verlieren. Gewebe mit einer langen T2 erscheinen hell, da sie langsamer dephasieren und somit auch nach längerer Zeit immer noch ein starkes Signal aussenden. Die T2-Gewichtung ist hoch. Abbildung bearbeitet und angepasst nach Weishaupt et al. ¹⁰³.

1.2.1.4 Gradienten

Gradientensysteme im MRT-Scanner sind ein essenzieller Faktor zur erfolgreichen Bildgebung, da sie der Ortskodierung von Spins dienen. Ohne diese Systeme wäre das Magnetfeld überall homogen, alle Spins hätten die gleiche Larmorfrequenz und es wäre nicht möglich, deren Lage genau zu bestimmen. Mittels Gradientenspulen können zusätzlich graduelle Magnetfelder generiert werden. Damit zum Beispiel eine bestimmte Schicht angeregt werden kann, wird durch eine Gradientenspule das Magnetfeld so verändert, dass ein Gradient entlang der Z-Achse (G_z), die gleichzeitig die Körperachse ist, entsteht (Abbildung 9 A). Das Magnetfeld und die dazu proportionale Larmorfrequenz sind dann am Kopfende höher als am Fußende. Jede Schicht kann so durch einen HF-Impuls mit einer anderen Larmorfrequenz angeregt werden, denn durch den Gradienten besitzt jede Schicht eine andere Resonanzfrequenz. Dabei wird die Dicke der Schicht durch die Stärke des Gradienten und die Bandbreite des HF-Impulses bestimmt. Große Gradienten und schmale Bandbreiten ergeben dünnere Schichten, kleine Gradienten bzw. große Bandbreiten ergeben dickere Schichten. Für eine komplette Ortskodierung aller Spins, sind zusätzlich Gradienten in der Y-Achse (Phasenkodierung) und der X-

Achse (Frequenzkodierung) nötig ¹⁰⁴. Bei der Phasenkodierung erzeugt der Gradient (G_y) ein graduelles Magnetfeld entlang der Y-Achse, welches oben höher ist als unten (Abbildung 9 B). Die bereits angeregten und sich auf der XY-Ebene befindenden Spins kreisen dadurch unterschiedlich schnell. Die Spins, die sich weiter oben befinden, kreisen schneller als jene Spins, die sich weiter unten befinden. Wird der Gradient wieder ausgeschaltet, sind die Spins in ihrer Phase verschoben und können so unterschieden werden.

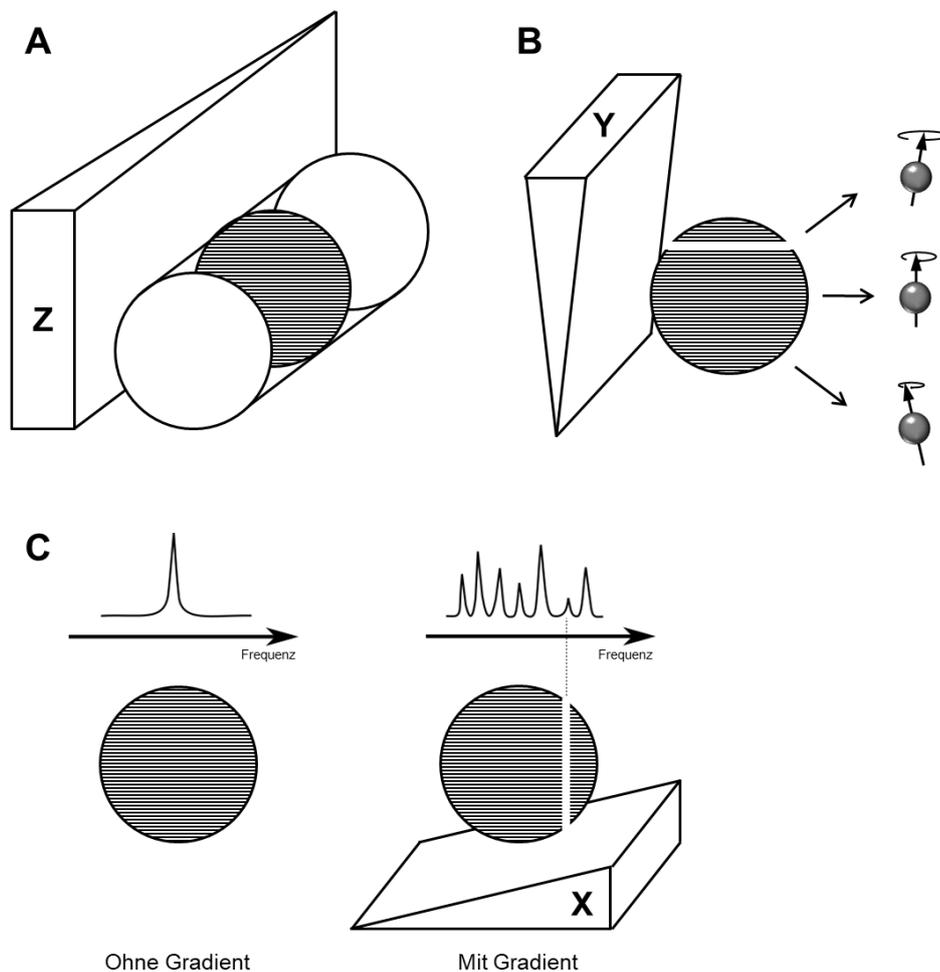


Abbildung 9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Gradienten. (A) Der Gradient entlang der Z-Achse (Körperachse) ist für die Auswahl der Schicht nötig. Durch die unterschiedlichen Resonanzfrequenzen pro Schicht, können Schichten von vorne nach hinten ausgewählt werden. (B) Der Gradient entlang der Y-Achse (von oben nach unten) ist für die Phasenkodierung nötig. Mit ihr werden die Spins in ihrer Phase verschoben, wodurch es möglich ist, Schichten von oben nach unten auszuwählen. (C) Der Gradient entlang der X-Achse (von links nach rechts) ist für die Frequenzkodierung nötig. Ohne Gradient kann nur eine Frequenz gemessen werden, mit Gradient kann dagegen ein Frequenzspektrum gemessen werden. Jede Schicht hat dann eine eigene Frequenz, daher können Schichten von links nach rechts ausgewählt werden. Mit allen drei Gradienten ist man in der Lage, jedes einzelne Volumenelement einem bestimmten Ort zuzuordnen. Abbildung bearbeitet und angepasst nach Weishaupt *et al.* ¹⁰⁴.

Für die Frequenzkodierung wird über die dritte Gradientenspule ein Gradient entlang der X-Achse (G_x ; von links nach rechts) erzeugt (Abbildung 9 C). Wie bei der Phasenkodierung kreisen die Spins bei der Frequenzkodierung auf der rechten Seite schneller als auf der linken Seite, wodurch rechts eine höhere Frequenz gemessen wird als auf der linken Seite. So kann jede horizontale Schicht anhand der Frequenz identifiziert werden. Dank der drei Gradienten innerhalb des Magnetfeldes, kann jede Volumenelement (Voxel) mit seinen Spins eindeutig lokalisiert werden ¹⁰⁴. Schnelligkeit und Stärke des Gradientensystems sind bedeutende Merkmale eines MRT-Scanners und sind bei vielen Messungen wichtig ¹⁰⁵. Neben dem eingebauten Gradientensystem gibt es zusätzlich noch Gradientenspulen, die in den Scanner eingesetzt werden können (Gradienteninsert), um noch schnellere und stärkere Gradienten zu erzeugen und damit die räumliche Auflösung deutlich zu verbessern. Das komplexe Zusammenspiel von HF-Impulsen mit zugeschalteten Gradienten wird MRT-Sequenz genannt.

1.2.1.5 MRT-Sequenzen

Die MRT bietet ein breites Spektrum an Möglichkeiten, um unterschiedlichste Bilder zu generieren. Damit schlussendlich aber ein MR-Bild entsteht, müssen Sequenzen im MRT-Scanner gemessen werden, die grundsätzlich aus den folgenden Schritten bestehen: Anregung durch die HF-Impulse, Ortskodierung, Echoerzeugung und Messung. Es gibt eine Vielzahl von Sequenzen die unter drei große Kategorien zusammengefasst werden können: Spinecho (SE)-Sequenzen, Gradientenecho (GRE)-Sequenzen und *Inversion-Recovery* (IR)-Sequenzen ¹⁰⁶. Eine ebenfalls häufig verwendete Sequenzart sind die Echoplanar (engl. „*echo planar imaging*“, EPI)-Sequenzen. Sie beruhen auf dem Prinzip der GRE-Sequenzen.

1.2.1.5.1 Spinecho-Sequenz (SE-Sequenz)

Wie bei allen MR-Sequenzen erfolgt die Anregung der Spins bei einer SE-Sequenz mit einem 90°-HF-Impuls. Die transversale Magnetisierung zerfällt mit T2 und T2* und die Spins dephasieren. Um diesen Effekt aufzuheben, wird nach der Hälfte der gewählten Echozeit ein 180°-Impuls gegeben. Dieser Impuls dreht die Spins auf der XY-Ebene um 180°, kehrt so die Dephasierung um und die Spins kommen wieder in Phase (Rephasierung). Ein großer Vorteil dieser Sequenz ist, dass Magnetfeldinhomogenitäten eliminiert werden und die Bildqualität gesteigert wird. Durch die langen Messzeiten der Sequenz sind die Bilder allerdings empfindlich gegenüber Bewegungsartefakten ¹⁰⁶.

1.2.1.5.2 Inversion-Recovery-Sequenz (IR-Sequenz)

Im Gegensatz zur SE-Sequenz, geht bei der IR-Sequenz ein 180°-Impuls dem 90°-HF-Impuls voraus und klappt die Längsmagnetisierung in die negative Z-Richtung. Nach

einer gewissen Zeit (Inversionszeit) wird der 90° -Impuls gegeben. Der Bildkontrast kann durch verschiedene Inversionszeiten verändert und so das Signal in einem bestimmten Gewebe sogar unterdrücken werden. Eine Variante der IR-Sequenz ist die *fluid attended inversions recovery* (FLAIR)-Sequenz, die sich durch eine lange Inversionszeit auszeichnet. Sie eignet sich gut um Gehirngewebe darzustellen, da das zerebrospinale Liquorsignal durch die lange Inversionszeit komplett unterdrückt werden kann ¹⁰⁶.

1.2.1.5.3 Gradientenecho-Sequenzen (GRE-Sequenzen)

Die GRE-Sequenz erzeugt das Echo über die Gradientenspulen und verwendet keinen HF-Impuls. G_x wird dabei zur Dephasierung der Spins zunächst mit einer negativen Polarität und danach zur Rephasierung mit einer positiven Polarität eingeschaltet. Dadurch kommt es zum Echo. Durch dieses Vorgehen kann auf den zeitintensiven 180° -Impuls zur Rephasierung verzichtet werden. Der Hauptvorteil ist die schnelle Bildaufnahme, wodurch es zu weniger Bewegungsartefakten kommt. Um einen guten $T2^*$ -Kontrast zu erlangen, werden sowohl TR als auch TE lang gewählt und jeweils kurz, wenn man eine $T1$ -Gewichtung erreichen möchte. Allerdings kann es im Allgemeinen durch die teilweise sehr kurzen TR bei großen Flipwinkeln zur Sättigung kommen, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis verringert sein kann. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch den fehlenden 180° -Impuls die Magnetfeldinhomogenitäten nicht eliminiert werden können und es in Folge dessen zu einem Zerfall des Signals in $T2^*$ kommt ¹⁰⁶.

1.2.1.5.4 Echoplanar-Sequenzen (EPI-Sequenz)

Bei der EPI-Sequenz handelt es sich um eine Sequenz, bei der die Echos durch sehr schnelles hin- und herschalten des Frequenzgradienten G_x erzeugt werden. Dadurch ist eine sehr schnelle Akquisitionszeit (Bildaufnahme) möglich. Diese Sequenz eignet sich daher gut für die dynamische und funktionelle Bildgebung. Allerdings können bei der EPI-Sequenz, da sie auf der GRE-Sequenz beruht, Feldinhomogenität nicht ausgeglichen werden, was einen starken $T2^*$ Signalabfall bedeutet. Durch das mehrmalige Schalten der Frequenzgradienten, kommt es zu einer zusätzlichen Inhomogenität und kann somit durch deren Addition zu einer geometrischen Verzerrung der MR-Bilder führen. Durch den starken Signalabfall von $T2^*$ hat man nur wenig Zeit für die Aufnahme der Echos und benötigt starke Gradientenspulen. Außerdem ist der Bildkontrast oft sehr gering ¹⁰⁷.

1.2.1.6 Diffusionsgewichtete Bilder

Mit der MRT ist es auch möglich, die Bewegung von Molekülen, wie beispielsweise Wasser, in Gewebe mittels Diffusionsbildgebung (engl.: „*diffusion weighted imaging*“, DWI) zu messen. Diese Methodik wird oft für die Schlaganfalldiagnostik verwendet. Um die

kleinen Diffusionsbewegungen in Gewebe zu detektieren, werden diffusionsgewichtete Bilder mit EPI-Sequenzen aufgenommen, da ein schnelles Ein- und Ausschalten von zusätzlich geschalteten Diffusionsgradienten bei dieser Messung wichtig ist. Das grundlegende Prinzip dieser Messung liegt darin, dass nach dem Anregungsimpuls ein identisches Gradientenimpulspaar geschaltet wird. Zwischen dem Gradientenimpulspaar wird ein 180°-HF-Inversionsimpuls geschaltet, danach erfolgt die Signalaufnahme. Durch den ersten Gradientenimpuls wird eine Dephasierung der Spins erreicht. Durch einen 180°-HF-Inversionsimpuls und den zweiten Gradientenimpuls werden die Spins wieder rephasiert. Wassermoleküle, die sich während der eingeschalteten Gradientenimpulspaare bewegen, verändern dadurch die Signalphasen ihrer Spins. Die Signalanteile der Spins addieren sich nicht mehr und es resultiert ein kleineres Signal. Wassermoleküle hingegen, die sich nicht bewegen, verändern die Signalphasen ihrer Spins nicht und haben daher ein starkes Signal. Die Signalstärke hängt also von der mittleren Distanz ab, über die das Wassermolekül in einer gewissen Zeit diffundiert und wird immer kleiner, je schneller und damit auch weiter sich ein Wassermolekül bewegt ¹⁰⁸.

Diese Messmethode bringt automatisch eine lange TE mit sich und die Bilder sind daher nach Definition T2-gewichtete Bilder. Um diesen Effekt zu umgehen und die reine Diffusion der Moleküle zu erhalten, wird die Verschiebung der Wassermoleküle quantitativ über eine richtungsabhängige Diffusionskonstante, den sogenannten scheinbaren Diffusionskoeffizient (engl.: „*apparent diffusion coefficient*“, ADC) beschrieben. ADC gibt die Geschwindigkeit an, mit der die Moleküle diffundieren und wird aus dem Verhältnis der Signalstärken berechnet, die sich aus den b-Faktoren ergeben. Die b-Faktoren geben an, wie stark und wie lange das Gradientenimpulspaar angeschaltet ist, und damit, wie stark die Bilder diffusionsgewichtet sind. Der b-Faktor setzt sich folgendermaßen zusammen (Gleichung [4]):

$$b = \gamma^2 * G^2 * \delta^2 * (\Delta t - \frac{\delta}{3}) \quad [4]$$

Dabei stellt γ das gyromagnetische Verhältnis, G die Amplitude der Impulse, δ die Länge der Impulse und Δt die Zeit zwischen zwei Impulsen dar ¹⁰⁹.

Beispielsweise bedeutet ein b-Faktor von 0, dass der Bildkontrast keinerlei Diffusionsgewichtung ausweist und das Gradientenimpulspaar nicht eingeschaltet ist. Es ergibt sich ein T2-gewichtetes Bild. Ein b-Faktor von 1000 hingegen zeigt eine starke Diffusionsgewichtung des Bildkontrastes und das Gradientenimpulspaar ist stark und lang eingeschaltet ^{108,109}. Um den ADC zu berechnen, muss die Messung mit mindestens zwei

unterschiedlichen b-Faktoren gemessen worden sein, wobei die Berechnung genauer wird, je mehr b-Faktoren während einer Messung verwendet wurden. Über eine lineare Regression wird Voxel-für-Voxel jeder einzelne ADC-Wert berechnet und zu einer ADC-Karte zusammengesetzt ¹⁰⁹.

Die DWI wird oft in der Schlaganfalldiagnostik verwendet, da sich Schlaganfälle schon nach kürzester Zeit identifizieren lassen ^{42,44}. Akute Schlaganfallregionen zeichnen sich auf DWI-Bildern hell ab, da die Beweglichkeit der Wassermoleküle reduziert ist und sich dadurch das Signal nicht so schnell abschwächt ¹⁰⁸. Auf der ADC-Karte zeichnen sie sich hingegen dunkel ab, da die Region eine verringerte Diffusionskonstante aufweist. Im Laufe der Zeit kehrt sich das Signal um und die ADC-Karten haben in der chronischen Phase eines Schlaganfalls eine hohe Signalstärke, da die Integrität der Zellen verloren geht ^{110–112}.

1.2.1.6.1 Diffusionstensor Bildgebung

Die Diffusionstensor Bildgebung (engl.: „*diffusion tensor imaging*“, DTI) ist eine Form der DWI, bietet aber den Vorteil, dass zusätzlich Informationen über die Geometrie der Strukturen gegeben werden. Diffundieren die Wassermoleküle in alle Richtungen gleich weit, spricht man von einer isotropen Diffusion. Diffundieren sie in nur eine Richtung, zum Beispiel entlang eines myelinisierten Axons, spricht man von anisotroper Diffusion. Zur Untersuchung der anisotropen Diffusion werden verschiedene Gradientenrichtungen geschaltet, wobei die Mindestanzahl von 6 Richtungen gegeben sein muss: Die X-, Y- und Z-Richtung, aber auch die XY-, XZ- und die YZ-Richtung. Je mehr Richtungen gewählt werden, desto genauer kann die Diffusionsrichtung von Wassermolekülen durch den fraktionellen Anisotropie (FA)-Wert beschrieben werden. Unendliche viele Richtungen würden die Diffusion am besten beschreiben, allerdings verlängert sich die Akquisitionszeit für jede zusätzliche Richtung. Die FA-Werte variieren zwischen einem Wert von 0 und 1, wobei der Wert 1 eine perfekte anisotrope Diffusion entlang eines Striches und der Wert 0 eine komplett isotrope Diffusion bedeuten würde (Abbildung 10) ¹⁰⁸.

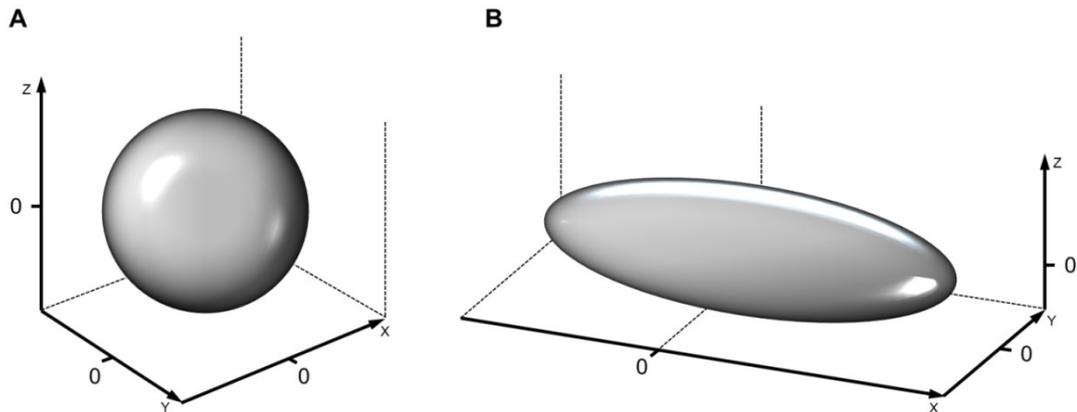


Abbildung 10: Schematische Darstellung der fraktionellen Anisotropie (FA). (A) Der FA-Wert ist 0. Es handelt sich um eine isotrope Diffusion. Alle Moleküle diffundieren in alle Richtungen gleich gut. (B) Der FA-Wert liegt nahe bei 1. Es handelt sich um eine anisotrope Diffusion. Die Moleküle weisen eine bevorzugte Diffusionsrichtung entlang einer Linie auf. Abbildung bearbeitet und angepasst nach Giordano *et al.* ¹¹³.

Hohe FA-Werte werden daher zum Beispiel im *Corpus callosum* im Gehirn erwartet, da diese Hirnstruktur zur weißen Substanz gehört und nur aus Fasertrakten besteht, die nahezu alle Teile beider Hemisphären miteinander verbindet ⁸⁵. Durch die Struktur der Axone erlauben sie eine starke anisotrope Diffusion ¹¹⁴. Der größte Vorteil von DTI EPI-Sequenzen ist, dass das komplette Bild (zum Beispiel das ganze Gehirn) auf einmal aufgenommen werden kann. Dies reduziert zum einen die Messzeiten, und zum anderen, was viel wichtiger ist, die Empfindlichkeit gegenüber mikroskopisch kleinen Bewegungen. Das ist essenziell, da die zu messenden Effekte sehr klein sind.

1.2.1.7 Funktionelle MRT (fMRT)

Bei der funktionellen MR-Bildgebung (fMRT) werden Hirnregionen untersucht, die beispielsweise durch eine Anregung von äußeren Reizen mit einer Signaländerung reagieren. Die Messungen basieren auf Effekten, die sich in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt im Blut ändern: dem sogenannten BOLD-Effekt (engl.: „*blood-oxygen-level-dependent*“) ¹¹⁵. Im Gegensatz zu invasiven Methoden wie der Patch-Clamp-Technik, bei der die neuronale Aktivität über kleine Pipetten gemessen werden kann, die auf der Membran der Zellen aufsitzen ^{73,116}, kann bei der nicht invasiven neuronalen fMRT-Messungen die Aktivität der Neurone indirekt über deren metabolischen Bedarf dargestellt werden. Das BOLD-Signal setzt sich aus unterschiedlichen hämodynamischen Parametern wie Blutfluss, Sauerstoffmetabolismus und das Blutvolumen zusammen, welche die Aktivierung von neuronalen Zellen beeinflussen ¹¹⁷. Für die Aktivierung benötigen die Zellen Energie, die stets über das Blut in Form von genügend Sauerstoff und Glukose bereitgestellt werden muss, da Neuronen keine Energie speichern können. Ein kleiner Teil dieser Energie wird zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials verwendet. Der

größte Teil wird von aktiven Neuronen verbraucht. Sobald Neurone aktiv sind, werden durch die sogenannte Hämodynamische-Antwort Kapillaren erweitert, die durch einen lokal erhöhten Blutfluss dann den benötigten Sauerstoff und Glukose direkt vor Ort zur Verfügung stellen¹¹⁸. Der Sauerstoff ist dabei an dem eisenhaltigen Proteinkomplex Hämoglobin gebunden. Das Hämoglobin im Blut hat verschiedene magnetische Eigenschaften, abhängig davon, ob es oxygeniert oder deoxygeniert ist, also je nachdem, ob Sauerstoff gebunden ist oder nicht. Während oxygeniertes Hämoglobin durch die Abwesenheit von ungepaarten Elektroden kein magnetisches Moment aufweist, ist die magnetische Suszeptibilität (Magnetisierbarkeit) von komplett deoxygeniertem Hämoglobin durch die ungepaarten Elektronen etwa 20% größer¹¹⁹. Zum Messen des BOLD-Effekts werden GRE-EPI-Sequenzen mit starker T2*-Gewichtung verwendet. Durch die erhöhte magnetische Suszeptibilität von deoxygeniertem Hämoglobin dephasieren die Spins schneller, was in einem hypointensen Signal resultiert. Im Gegensatz dazu weist oxygeniertes Hämoglobin ein stärkeres MR-Signal auf¹²⁰. Durch die Hämodynamische-Antwort können somit lokale Veränderungen des oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobins mittels MRT im Gehirn sichtbar gemacht und indirekt Rückschlüsse auf die neuronale Aktivität gezogen werden. Um solche Effekte messen zu können, muss aber nicht immer ein Stimulus gegeben werden. Auch ohne Stimulus kommt es aufgrund der Hämodynamik zu niederfrequenten Schwankungen (< 0,1 Hz), die sowohl räumlich als auch zeitlich korrelieren können¹²¹. Dieses Teilgebiet der fMRT-Forschung dient der Identifikation funktioneller Netzwerke im ruhenden Gehirn und wird als *resting state* (RS)-fMRT bezeichnet. Für die RS-fMRT werden die gemessenen Korrelationen auf funktionale Konnektivitäten innerhalb der Netzwerke untersucht^{115,121,122}. Beispielsweise können so funktionelle Unterschiede vor und nach einem Schlaganfall gemessen werden.

1.2.2 Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Die MRT stellt Strukturen und Funktionen von Geweben und Organen dar, kann aber keinen Einblick über physiologische und biochemische Vorgänge geben. Um diese Abläufe darzustellen, wird die PET verwendet, da sie die Stoffwechselforgänge im Körper sichtbar machen kann. Obwohl das Prinzip der PET-Technik schon seit den frühen 1950igern bekannt war, wurde sie erst in den 1990igern populär und als wichtiges diagnostisches Werkzeug erkannt¹²³. Die PET-Bildgebung basiert, wie der Name schon sagt, auf der Ausstrahlung (Emission) von Positronen. Für diese Art der hochsensiblen passiven Strahlungsmessung werden Moleküle radioaktiv markiert und in den Blutkreislauf eingebracht, wo sie als Tracer fungieren. Die Strahlungsbelastung durch die radioaktiven Isotope ist dabei aber äußerst gering. Bestimmte Tracer binden direkt an Rezeptoren, andere reichern sich über den Stoffwechsel als radioaktive Marker in den

Gewebe an. Indirekt können dann Rückschlüsse auf die Expression des Zielrezeptors oder die Vitalität des Zielgewebes gezogen werden.

1.2.2.1 Radioaktiver β^+ -Zerfall und Positronenemission

Man spricht von radioaktivem Zerfall, wenn instabile Atomkerne, unter Aussendung von Teilchen ihren Kern umwandeln, zerfallen und somit wieder einen stabilen Kern haben. Er ist ein zufällig ablaufendes Ereignis und kann nicht durch äußere Einwirkungen beeinflusst werden ¹²⁴. Bei der PET-Bildgebung wird der radioaktive β -Zerfall gemessen, genauer gesagt der β^+ -Zerfall. Dabei macht ein Protonenüberschuss im Atomkern diesen instabil und das überschüssige Proton (P) zerfällt in ein Neutron (N), ein positiv geladenes Elektron, welches auch als Positron (β^+) bezeichnet wird, sowie ein Neutrino (ν_e). Dieser Prozess kann mit folgender Gleichung (Gleichung [5]) beschrieben werden ¹²³:



Die ausgestrahlten Positronen haben eine definierte kinetische Energie, mit der sie eine definierte Wegstrecke im Gewebe zurücklegen können, die sogenannte Positronenreichweite. Wie weit diese Strecke ist, hängt sowohl von der Energie ab, mit der die Positronen emittiert wurden, als auch von der Elektronendichte des umgebenden Gewebes ¹²³. Dabei resultiert die Interaktionen des Positrons mit dem umgebenden Gewebe in einem Energieverlust ¹²⁴ (Abbildung 11).

Sobald das Positron auf ein Elektron trifft, kommt es zum sogenannten Annihilationsprozess. Dabei zerfallen die sich gegenseitig aufhebenden Elementarteilchen in zwei Photonen oder γ -Quanten, die zum einen genau die gleiche Energie von 511 Kiloelektronenvolt (keV) haben und zum anderen in entgegengesetzte Richtungen emittiert werden ¹²⁴. Dort können sie dann von hoch sensiblen PET-Detektoren erfasst werden.

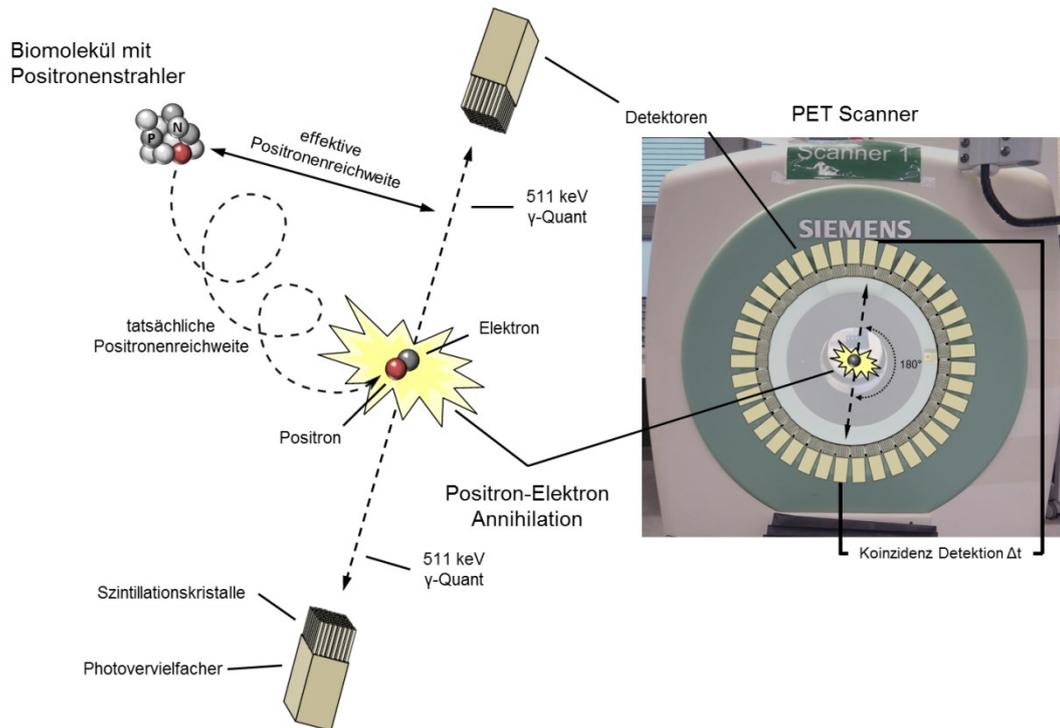


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Annihilationsprozesses. Ein radioaktiver Zellkern, bestehend aus einem Protonenüberschuss (P) und Neutronen (N), zerfällt und gibt dabei ein Positron frei. Sobald dieses auf ein Elektron trifft, findet ein Annihilationsprozess statt. Dabei zerfallen die sich gegenseitig aufhebenden Elementarteilchen in zwei Photonen oder γ -Quanten. Diese werden mit einer Energie von 511 Kiloelektronenvolt (keV) um 180° voneinander ausgestrahlt (emittiert) und dann von den Detektoren in einem definierten Zeitfenster Δt erfasst. Die Szintillationskristalle in den Detektoren wandeln die Photonen in Licht um, der Photovervielfacher vervielfältigt das Signal und wandelt es in ein elektronisches Signal um. Abbildung bearbeitet und angepasst nach Cherry & Gambhir¹²⁵, Cherry & Dahlbom¹²⁶ und Amend¹⁰².

1.2.2.2 Der PET-Scanner

Die γ -Quanten werden nach dem Annihilierungsevent in einem 180° Winkel voneinander emittiert und treffen auf sich gegenüberliegende Detektorblöcke. Die Linie, die zwischen diesen zwei Detektoren entsteht, wird als Koinzidenzlinie oder „*line of response*“ (LOR) bezeichnet. Aber nur wenn die beiden Photonen mit 511keV in einem definierten Zeitfenster auf die Detektoren treffen werden sie als Koinzidenzereignis wahrgenommen und gemessen¹²⁴ (Abbildung 12A). Ein PET-Scanner besteht aus vielen, ringförmig angeordneten Photonen-Detektoren. Jeder Detektor besteht wiederum aus vier Photovervielfachern und acht auf acht nebeneinanderliegenden Szintillations-kristallen^{123,126}. Die Szintillationskristalle wandeln die emittierten γ -Quanten in schwache Lichtsignale um, welche von den Photovervielfachern verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden¹²⁴.

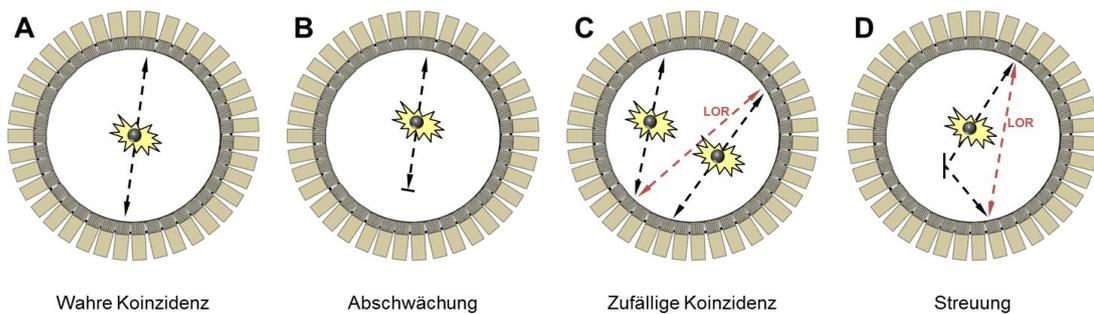


Abbildung 12: Schematische Darstellung unterschiedlicher Koinzidenzen. (A) Treffen zwei Photonen in direkt gegenüberliegende Detektoren wird dies als wahre Koinzidenz bezeichnet. (B) Ein Photon kann zum Beispiel durch die Interaktion mit Gewebe abgeschwächt werden. (C) Wenn zwei gegenüberliegende Detektoren die Photonen aus zwei unterschiedlichen Annihilierungsprozessen als Koinzidenz wahrnehmen, wird eine falsche Koinzidenzlinie (LOR) angenommen und dies als zufällige Koinzidenz bezeichnet. (D) Photonen werden durch Gewebe abgelenkt und es wird eine falsche LOR angenommen. Man spricht von einer Streuung. Abbildung bearbeitet und angepasst von Weirich & Herzog.¹²⁴, Cherry & Gambhir¹²⁵, Cherry & Dahlbom¹²⁶ und Amend¹⁰².

Es kann allerdings vorkommen, dass nur eines der zwei Photonen detektiert wird, da das andere Photon durch Interaktionen mit dem Gewebe abgeschwächt und gestoppt wurde. Dieser Vorgang wird als Abschwächung bezeichnet (Abbildung 12 B). Außerdem können Annihilierungsprozesse falsch zugeordnet werden. Zum einen kann es zu einer zufälligen Koinzidenz kommen, wobei zwei durch unterschiedliche Annihilierungsprozesse erstandenen Photonen zufällig gleichzeitig auf zwei sich gegenüberliegenden Detektoren eintreffen (Abbildung 12 C). Zum anderen besteht die Möglichkeit der Streuung von Photonen. Dabei kommt es, wie bei der Abschwächung auch, zu einer Interaktion mit dem Gewebe. Das Photon wird hier aber nicht abgeschwächt, sondern abgelenkt und trifft so nicht auf den gegenüberliegenden Detektor (Abbildung 12 D). In beiden Fällen werden falsche LORs angenommen und somit auf unwahre Annihilierungsprozesse zurückgeführt. Bei Messungen im Gehirn sind etwa 20% – 30% der gemessenen Photonen gestreut¹²⁴. All diese fehlerhaft zugeordneten Koinzidenzen verringern den Bildkontrast^{124,126}. Damit ein PET-Bild am Ende aber die tatsächlichen Aktivität im Gewebe darstellt, werden die fehlerhafte Koinzidenzen korrigiert, bevor die gemessenen Annihilierungsprozesse zu einem vollständigen Bild rekonstruiert werden¹²⁶.

1.2.2.3 PET- Messung, Korrekturen und Bildrekonstruktion

Um eine PET-Messung *in vivo* durchführen zu können und ein quantitatives dreidimensionales (3D) Bild zu erhalten, muss zunächst ein radioaktiver Tracer appliziert werden. Dies passiert meist intravenös, kann aber auch über Inhalation oder durch eine subkutane Injektion erfolgen. Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Messungen, dynamisch und statisch. Bei der dynamischen Datenaufnahme wird die Messung kurz vor der Injektion

des Tracers gestartet, um die Aktivität über die Zeit darstellen zu können. Diese Messungen finden meist bei radioaktiven Tracern mit kurzer Halbwertszeit (z.B. ^{11}C , ^{18}F) oder mit einer begrenzten Bindungszeit an Rezeptoren statt. Sie werden aber auch durchgeführt, um die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Tracers zu untersuchen. Mittels einer dynamischen Messung erhält man den zeitlichen Verlauf über die Tracer-Verteilung im Gewebe (Zeitaktivitätskurven). Aus diesen Informationen können mit Hilfe vereinfachter mathematischer Modelle Aussagen über die Bindungskinetik und -dynamik des Tracers sowie Rezeptorexpressionen oder enzymatische und metabolische Prozesse getroffen werden ¹²⁷. Bei statischen Messungen hingegen wird der Tracer vor Beginn der Messung injiziert und die Messung erst nach der Akkumulation im Gewebe gestartet. Während dieser Akkumulationszeit wird der Tracer beispielsweise verstoffwechselt und im Gewebe angereichert oder bindet an bestimmte Rezeptoren. Dabei unterscheidet sich die Zeit die für jeden injizierten Tracer und das jeweilige Gewebe. Je nach Isotop und radiomarkierter Substanz kann die Anreicherungszeit zwischen 30 Minuten bis hin zu mehreren Tagen dauern.

Nach der Messung erfolgt die Korrektur der zuvor beschriebenen fehlerhaften Zuordnungen der Annihilierungsprozesse. Im Folgenden wird auf zwei der wichtigsten Korrekturen genauer eingegangen: Die Normalisierung und die Schwächungskorrektur.

Im PET-Scanner ist eine hohe Anzahl an PET-Detektoren verbaut, die sich aufgrund verschiedener Parameter geringfügig voneinander unterscheiden. Diese Unterschiede haben zur Folge, dass die Effizienz, mit der die Koinzidenzen detektiert werden, zwischen den verschiedenen LORs variiert ¹²⁶. Mit Hilfe einer Normalisierungsmessung kann die Ineffizienzen der Detektoren aber korrigiert werden. Dafür wird ein homogener radioaktiver Zylinder genau in das Zentrum des FOV (engl.: „*field of view*“) gelegt. Durch die zentrale Lage des Zylinders wird sichergestellt, dass alle Detektoren gleichmäßig bestrahlt werden ¹²⁶. Für jedes Detektorelement wird die Summe der Koinzidenzen zwischen dem jeweiligen Detektor und allen ihm gegenüberliegenden Detektoren bestimmt. Wenn die Anzahl an Detektoren groß genug ist, kann angenommen werden, dass durch eine Mittlung die errechneten Summen jeweils proportional zur Messeffizienz der Detektoren sind. Zusammen mit dem geometrischen Faktor, der anfangs einmal vom Hersteller bestimmt wird, ergibt sich für jeden Detektor ein Faktor, der dann mit der jeweiligen LOR multipliziert werden kann und die Ineffizienz korrigiert ¹²⁶.

Eine weitere Korrektur ist die Schwächungskorrektur. Dazu werden Transmissionsquellen wie beispielsweise Cobalt-57 (^{57}Co) oder Gallium-68 verwendet, die im Scanner um das zu messende Objekt rotieren ¹²⁸. Es wird sowohl eine Messung ohne Objekt (engl.: „*blank scan*“, BS) als auch eine Messung mit Objekt (engl.: „*transmission scan*“, TS) durchgeführt und die Schwächung des Gewebes bestimmt. Der Faktor, mit

dem die Sinogramme (zweidimensionale Matrixdateien mit allen Informationen über die durchgeführte Messung) der LORs multipliziert und damit korrigiert werden, berechnet sich aus dem Verhältnis zwischen dem BS und dem TS. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Abschwächung des jeweiligen Objekts direkt gemessen werden kann ¹²⁶.

Alle gemessenen Koinzidenzen werden mit den für die spätere Rekonstruktion benötigten Informationen (Koordinaten der Koinzidenzen/Detektoren, Detektionszeit und Energie der detektierten Photonen) in einer „list-mode“-Datei gespeichert. Daraus kann ein Sinogramm mit den kompletten Bilddaten erstellt werden, indem alle Koinzidenzen in eine Matrix entsprechend der PET-Scanner-Geometrie „einsortiert“ werden. Dabei wird der Abstand zwischen den LORs und dem Zentrum des FOVs als x-Achse und der Winkel zwischen den LORs und der transaxialen Schicht als y-Achse beschrieben ^{129,130}.

Um schließlich ein dreidimensionales PET-Bild zu erhalten, muss das Sinogramm rekonstruiert werden. Dafür gibt es verschiedene Rekonstruktionsalgorithmen, die verschiedene Vor- und Nachteile haben. Für eine gute Bildqualität wird häufig der sogenannte „*ordered subset expectation maximization*“3D (OSEM3D)-Algorithmus verwendet. Diese Rekonstruktionsmethode ist zwar zeitintensiv, dafür erhält man aber eine reduzierte Anzahl an Artefakten und damit eine verbesserte Bildqualität.

Eine gute Qualität der Bilder kann neben der Art der Rekonstruktion außerdem auch noch durch die injizierte Dosis des radioaktiven Tracers, seiner Halbwertszeit und der Länge der Messzeit beeinflusst werden. So können eine längere Messzeit und eine höhere injizierte Dosis des Tracers zum Beispiel das Signal-Rausch-Verhältnis erhöhen ¹²⁴. Die räumliche Auflösung der Bilder hängt dagegen vom Aufbau des jeweiligen Scanners ab, wobei unter anderem die Größe der Detektoren und deren Anordnung eine Rolle spielt. Heutzutage liegt die räumliche Auflösung bei etwa 4 bis 6 mm für humane Scanner und bei 1,5 bis 2 mm für Kleintierscanner ^{124,127}.

1.2.2.4 PET-Tracer

Um ein Signal im PET messen zu können, benötigt man sogenannte Tracer (engl: „*trace*“ = Spur). Dafür werden biologisch aktive Moleküle mit einem radioaktiven Isotop markiert. Aufgrund der hohen Sensitivität der PET, können die radioaktiven Substanzen in nanomolaren Konzentrationen injiziert werden. Das gewährleistet unter anderem, dass der Tracer selbst keine pharmakologische Wirkung hat. Man spricht dabei auch vom sogenannten „Tracer-Prinzip“, welches erstmals von Georg Charles de Hevesy beschrieben wurde und ihm 1943 den Nobelpreis brachte ^{124,131}. Neben den bereits beschriebenen funktionellen Unterschieden differenzieren sich radioaktive Tracer außerdem in ihrer Halbwertszeit, d.h. die Zeit, in der die Hälfte der radioaktiven Atomkerne zerfallen sind. In der nachfolgenden Tabelle 1 sind verschiedene Isotope mit ihren

jeweiligen Halbwertszeiten aufgelistet, die für die Markierung von PET-Tracern im klinischen und präklinischen Bereich häufig Anwendung finden ^{123,132}.

Tabelle 1: In der PET-Bildgebung häufig verwendete Isotope mit ihren Halbwertszeiten und maximalen kinetischen Energie ^{126,133}

Isotop	¹⁵ O	¹¹ C	¹³ N	¹⁸ F	⁸⁹ Zr
Halbwertszeit	2,03 min	20,4 min	9,97 min	109,8 min	78,4 h
E _{max} [MeV]	1,73	0,96	1,20	0,63	0,90

¹⁵O: Sauerstoff-15; ¹¹C: Kohlenstoff-11; ¹³N: Stickstoff-13; ¹⁸F: Fluor-18; ⁸⁹Zr: Zirkonium-89; E_{max}: maximale kinetische Energie

Interessanterweise ist die zu detektierende Photonenenergie für alle radioaktiven Tracer mit 511 keV gleich, obwohl sie sich sowohl in ihrer Halbwertszeit als auch ihrer kinetischen Energie unterscheiden ¹²⁴.

Für die klinische und präklinische Anwendung werden die radioaktiven Isotope in einem Zyklotron (Teilchenbeschleuniger) hergestellt. Dabei werden die Atomkerne mit stark beschleunigten Protonen beschossen, um diese in instabile und damit radioaktive Kerne umzuwandeln. Im Anschluss werden mit diesen Isotopen die Tracer synthetisiert. Ein Beispiel für einen sehr häufig in der Klinik eingesetzten Tracer ist Fluor-18 2-Fluor-2-deoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG). Dieser Tracer wird oft in der Tumordiagnostik eingesetzt, da er im Körper zunächst wie Glukose verstoffwechselt wird. Weil Tumore einen erhöhten Metabolismus aufweisen, haben sie daher auch einen erhöhten Glukosebedarf ¹³⁴. [¹⁸F]FDG kann durch die radioaktive Markierung in der Glykolyse nach wenigen Schritten nicht mehr weiter verstoffwechselt werden. Weil [¹⁸F]FDG die Zelle nicht mehr verlassen kann, lagert es sich über die Zeit dort an. Dies passiert vor allem in den Tumorzellen ¹³⁵. Im PET-Bild kann so ein Tumor gut durch die hohe Signalstärke detektiert werden.

Neben den gängigen Tracern wie [¹⁸F]FDG können auch Peptide als Tracer fungieren, nachdem sie radioaktiv markiert wurden. Peptide weisen eine große Bandbreite an biologischen Funktionen auf, und kommen im Körper vielfach als Hormone oder Neurotransmitter vor. Solche radioaktiv markierten Peptide werden beispielsweise auch in der Neuro-Bildgebung eingesetzt, wo sie sich nicht wie FDG im Gewebe anreichern, sondern an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Eine spezifische Bindung des Tracers an den jeweiligen Rezeptor kann durch Blockierung der Bindung überprüft werden. Dabei wird durch Absättigung der Rezeptoren mittels nicht-radioaktiver Peptide eine spezifische Bindung des Tracers an den Rezeptoren blockiert. Es bleibt nur die unspezifische Bindung übrig, die von der Gesamtbindung des Tracers subtrahiert werden kann.

1.2.2.4.1 [⁸⁹Zr]-Deferoxamin-Erythropoietin

Zirkonium-89 (⁸⁹Zr) ist ein radioaktives Isotop mit einer in der präklinischen Forschung relativ langen Halbwertszeit von 3,27 Tagen. Für die Markierung von Antikörpern oder Hormonen, wie EPO, wird ein sogenannter Chelator benötigt. Diese Chelatoren sind organische Verbindungen mit mindestens zwei freien Elektronenpaaren, die Bindungen mit einem zentralen Metallion eingehen können. Ein Chelator, welcher oft in Verbindung mit ⁸⁹Zr verwendet wird, ist Deferoxamin (DFO). Gebunden an ⁸⁹Zr ist dieser Komplex *in vivo* sehr stabil ¹³⁶ und kann *in vitro* über 7 Tage nachgewiesen werden ¹³⁷. Häufig für die Konjugation eingesetzte Derivate von DFO ist das Benzylisothiocyanat (DFO-Bz-NCS) ¹³⁸. Der mit EPO konjugierte Komplex bindet nach der Injektion an die EPOR, die unter anderem im Gehirn exprimiert werden und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

2 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Der Schlaganfall ist eine ernstzunehmende neurologische Erkrankung, die jedes Jahr weltweit viele Menschenleben fordert. Eine schnelle und präzise Diagnose ist ausschlaggebend, um zu entscheiden, ob und welche Therapie angewendet werden soll. Dabei kommen heutzutage bildgebende Verfahren wie die PET und MRT zum Einsatz.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO-PET eine neue Möglichkeit zur Schlaganfalldiagnose zu testen und im weiteren Verlauf die neuroprotektiven Eigenschaften von Ambroxol als neues Therapeutikum zu untersuchen.

EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfall:

Es wurde bereits nachgewiesen, dass EPOR im Schlaganfallgewebe exprimiert sind^{50,139}. Sie stellen daher ein gutes Ziel für einen radioaktiven Tracer dar, der durch seine spezifische Bindung an die Rezeptoren eine Lokalisierung des Schlaganfalls ermöglichen könnte. Zuvor gewonnene, aber bisher nicht veröffentlichte Daten konnten zunächst nur eine spezifische Bindung von [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO *in vitro* zeigen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb die Bindung des Tracers an EPOR untersucht. Dazu wurden *in vivo* PET-Messungen in einem MCAO-Schlaganfallmodell in Ratten durchgeführt und die Stabilität des Tracers im Serum analysiert. In diesem Zusammenhang stellten sich folgende Fragen:

- Ist es möglich, eine spezifische Bindung des Tracers [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO auch *in vivo* nachzuweisen? Zu welchem Zeitpunkt ist die Bindung des Tracers am größten? Zu welchem Zeitpunkt ist der Blockierungseffekt am größten?
- Ist der im Haus konjugierte Tracer-Komplex stabil? Verbleib der Tracer über die Länge der Messzeit (72 h) stabil?

Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle:

Obwohl einige Zellen während eines Schlaganfalls innerhalb kürzester Zeit absterben, können viele Zellen im Penumbra-Bereich durch Therapie vor dem Zelltod bewahrt werden³⁷. Da es bei den etablierten Therapien von Schlaganfällen durch die Reperfusion zusätzliche Schädigungen durch die vermehrte Produktion von ROS und RNS am Gewebe kommt^{26,30}, haben neuroprotektive Therapieansätze in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen. In diesem Zusammenhang wurde der Wirkstoff Ambroxol als potenzielles Therapeutikum im MCAO-Schlaganfallmodell in Ratten untersucht, da es Na⁺- und Ca²⁺-Ionenkanäle blockiert und die Produktion von ROS hemmt^{71,74-78}. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ambroxol in MCAO-Ratten zur Blockade der Na⁺- und Ca²⁺-Ionenkanäle führt und somit den Wassereinstrom und die damit verbundene

Hirnschwellung vermindert. Dadurch könnte die Therapie zusätzlich die folgenreichen Kaskaden abmildern, die zu Exzitotoxizität, ROS-Bildung und Nekrose führen.

Im Zusammenhang mit dem zweiten Teil dieser Arbeit stellten sich daher die folgenden Fragen:

- Kann Ambroxol als neurpotektives Therapeutikum das Schlaganfallvolumen reduzieren? Gibt es Veränderungen in den T2- und ADC-Werten?
- Ist das Gewebe in therapierten Tieren zum letzten Zeitpunkt weniger stark beschädigt? Lassen sich Unterschiede im Gewebe erkennen?
- Sind Tiere, die Ambroxol als Therapeutikum bekommen haben, weniger stark in ihrem Verhalten eingeschränkt? Erholen sich die therapierten Tiere schneller?
- Lassen sich strukturelle Unterschiede in den Fasertrakten der Tiere erkennen?
- Unterscheidet sich die funktionelle Konnektivität der Hirnregionen zwischen den Gruppen?

3 Material und Methoden

Die für diese Doktorarbeit durchgeführten Tierversuche wurden sorgfältig geplant, formgerecht beschrieben und durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Tierversuchsantrag: R 11/16 G).

3.1 EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfall

Um zu überprüfen, ob der radioaktive Tracer [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO durch die Bindung an EPOR in der Schlaganfallregion einen potenziellen Schlaganfalltracer darstellt, wurde ein Blockierungsversuch *in vivo* an Ratten durchgeführt. Da die Radiomarkierung im Haus stattgefunden hatte, wurde *in vitro* außerdem die Stabilität des Tracer-Komplexes über die Zeit mittels eines Serumstabilitätstests untersucht.

3.1.1 Versuchstiere

Für diesen Versuchsteil wurden 15 gesunde männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 400 – 450 g verwendet. Sie wurden in individuell ventilierten Makrolonkäfigen (1500 U, Blue-Line, Tecniplast, Deutschland) mit Einstreu und Zellulosepapier gehalten. Die Tiere wurden in Gruppen von 3 bis 4 Tieren untergebracht und hatten *ad libitum* Zugang zu normalem Haltungsfutter und Wasser. Die Tiere wurden bei einem Tag-Nacht-Lichtzyklus von jeweils 12 Stunden, einer Raumtemperatur von konstanten 22°C (± 1°C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 57% (± 5%) gehalten. Jeder Käfig war außerdem mit einem Häuschen als Versteckmöglichkeit ausgestattet.

3.1.2 Experimenteller Aufbau

Die 15 Ratten wurden in drei Gruppen mit je 5 Tieren aufgeteilt: die Schlaganfallgruppe, die Blockierungsgruppe und die Schein-OP-Gruppe. Alle Tiere wurden operiert, wobei die Tiere in der Schein-OP-Gruppe keinen Schlaganfall mittels MCAO induziert bekamen. Während der Okklusion wurden alle Tiere im MRT-Scanner gemessen. Drei Stunden nach Okklusionsstart wurde [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO in die Schwanzvene injiziert. Damit die EPOR mit größerer Wahrscheinlichkeit blockiert wurden, erhielt die Blockierungsgruppe 30 Minuten vor der [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO Injektion noch eine Injektion mit 500 µl nicht-radioaktiv markiertem EPO, was einer 40-fachen Menge der radioaktiv markierten Dosis entsprach (rekombinantes humanes Erythropoietin-*alpha* (rHuEPO- α), 1mg/ml; Biomol GmbH, Hamburg, Germany). Um die Tiere nach der Operation durch eine zu lange Narkose nicht unnötig zu belasten, wurden 6 h nach der OP nur PET-Messungen durchgeführt. Zusätzliche MRT- und PET-Messungen erfolgten 24 h, 48 h und 72 h nach

Okklusionsstart. Nach der letzten Messung wurden die Tiere unter Narkose dekapitiert und alle Organe, die für die Biodistribution und Autoradiographie benötigt wurden, entnommen. In Abbildung 13 ist der Versuchsablauf grafisch dargestellt.

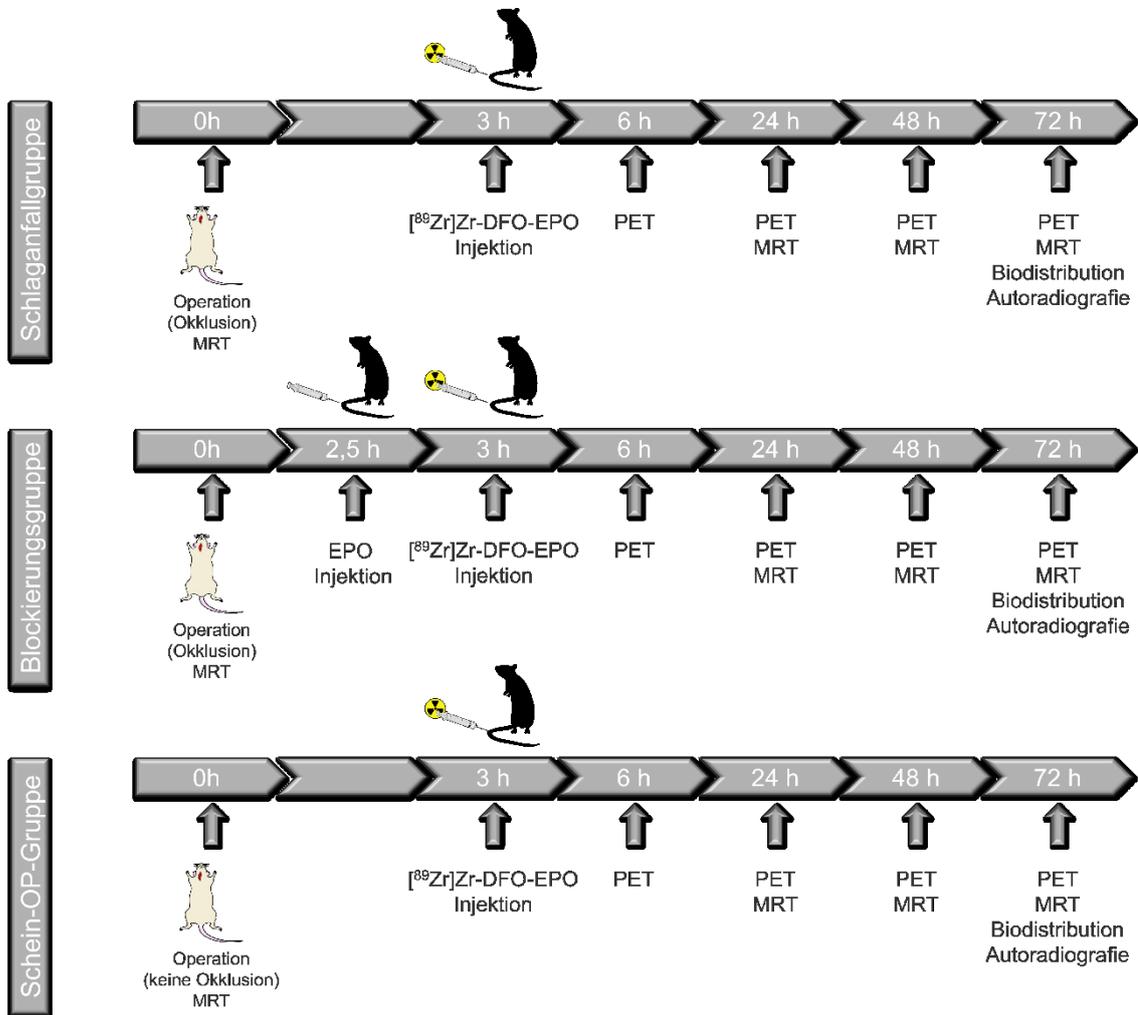


Abbildung 13: Schematische Darstellung des *in vivo* Blockierungsversuchsablaufs. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe lag bei jeweils 5 Tieren. In der Block- und Schlaganfall-Gruppe wurde jeweils ein Schlaganfall induziert, die Schein-OP-Gruppe erhielt eine Scheinoperation. Zusätzlich erhielt die Blockierungsgruppe eine Injektion von purem, nicht-radioaktiv markiertem EPO 30 Minuten bevor der radioaktive Tracer [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO injiziert wurde. Diesen erhielten alle Tiere 3 h nach der Schlaganfallinduktion. Die Tiere wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten (6 h, 24 h, 48 h und 72 h) gemessen und nach einer erfolgreichen Messung nach 72 h für eine Autoradiographie getötet. Teile der Abbildung wurden nach Dragneva *et al.*¹⁴⁰ bearbeitet und mit Hilfe von Bildern aus Servier Medical Art erstellt¹⁴¹

3.1.3 Operativer Eingriff

Für die MCAO-Operation wurden alle Tiere in eine beheizte Narkosebox gesetzt und mit 2 – 5% Isofluran (cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) narkotisiert. Das Isofluran wurde zusammen mit Raumluft in einem Verdampfungsgerät (Vetland D19 Vapoeizer, VETLAND, Kentucky, USA) mit einer Durchflussrate von 0,8 l/min in die Box geleitet. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurden sie auf das Operationsfeld überführt (Abbildung 14).

Das Isofluran wurde auf 2% reduziert und während der Operation je nach Bedarf auf 1,5 – 2,5% eingestellt. Als nächstes wurde Carprofen (5 mg/kg, Rimadyl®, Zoetis Schweiz GmbH, Schweiz) als Schmerzmittel subkutan injiziert. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde eine Augensalbe (Corneregel, BAUSCH + LOMB GmbH, Berlin, Deutschland) aufgetragen. Die Tiere wurden mit dem Rücken auf eine Medres-Wärmeeinheit gelegt (Medres – medical research GMBH, Köln, Deutschland) und eine Rektalsonde als Temperaturfühler eingeführt. Über einen Rückkopplungsmechanismus konnte die Temperatur während der Operation konstant überwacht und bei $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ gehalten werden.

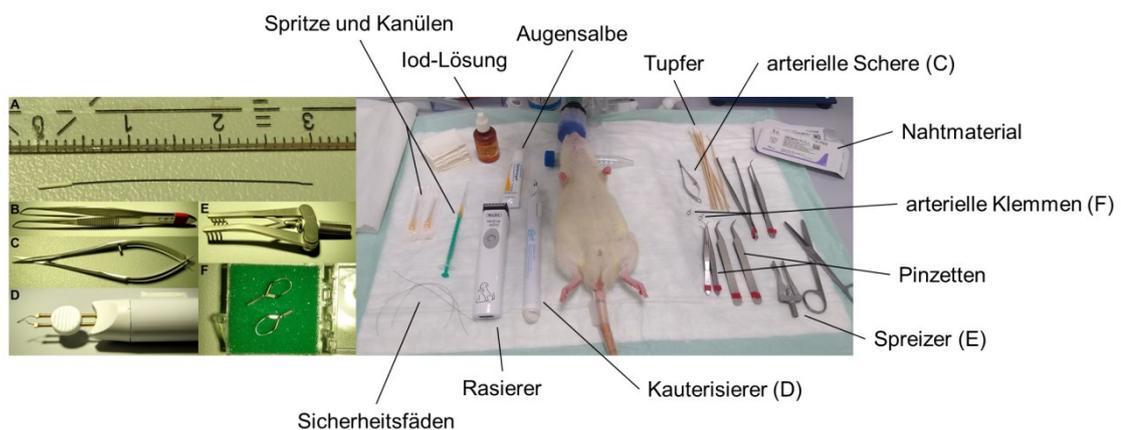


Abbildung 14: Aufbau des Operationsfeldes. Links: Detaillierte Aufnahmen des Operationsbestecks, das während der Operation verwendet wurde: (A) Das Filament mit Lineal zum Größenvergleich, (B) eine Pinzette, (C) die arterielle Schere, (D) der Kauterisierer, (E) der Wundspreizer zum Offenhalten der Wunde und (F) die Klemmen für die Arterien. Rechts: Das vorbereitete Operationsfeld mit Tier. Das Tier lag auf einer beheizten Matte. Benötigte Instrumente, Desinfektion, Tupfer sowie Sicherheitsfäden und Nahtmaterial lagen bereit.

Als nächstes wurde der Operationsbereich am Hals durch eine Rasur und dem Auftragen einer desinfizierenden Iod-Lösung (Braunol, B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vorbereitet. Dann wurde der Zwischenzehenreflex getestet. Während der Operation wurde ein Binokular verwendet.

Für die Tiere aus der Schlaganfall- und Blockierungsgruppe wurde zur Schlaganfallinduktion eine abgewandelte Form des temporären MCAO-Modells verwendet, welches von Longa *et al.* erstmals beschrieben wurde^{142,143}. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte erläutert.

Zunächst erfolgte ein Schnitt durch alle Hautschichten links neben der Trachea. Sämtliches Bindegewebe wurde vorsichtig auseinandergezogen, bis die *Arteria Carotis* zu sehen war (Abbildung 15 A). Damit die Wunde nach dem Eingriff besser verheilen konnte wurde auf das Schneiden des Gewebes verzichtet. Die Wunde wurde mit Hilfe eines Wundspreizers (5,5 mm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland;

Abbildung 14 E) offengehalten und die *Arteria Carotis Communis* (ACC), *Arteria Carotis Interna* (ACI) und *Arteria Carotis Externa* (ACE) freipräpariert. Sobald die Blutgefäße zugänglich waren, wurde ein Sicherheitsfaden (4/0, superamid, Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland) sowohl um die ACC als auch die ACI gelegt, damit im Falle einer ungewollten Gefäßverletzung durch Festziehen der Fäden größere Blutungen vermieden werden konnten. Danach wurde der Blutfluss mit kleinen Gefäßklemmen (6 x 1 mm, Fine Science Tools GmbH; Abbildung 14 F) an der ACC und der ACI unterbrochen (Abbildung 15 B). Mit einem dünnen Faden (7-0, Coated VICRYL®, resorbierbar, Johnson & Johnson Medical GmbH ETHICON, Norderstedt, Deutschland) wurde die ACE so distal wie möglich abgebunden. Die *Arteria Thyroidea Superior* und die *Arteria Occipitalis* wurden kauterisiert (Low Cost Cauterizer Kit, Fine Science Tools GmbH; Abbildung 14 D). Zusammen mit den Klemmen waren nun alle Blutzufuhren um den Abzweig zwischen ACC und ACI unterbrochen. Als nächstes wurde die ACE proximal des Knotens mit einer feinen Arterienschere (Abbildung 14 C) durchgeschnitten (Abbildung 15 C). Ein Nylonfilament (4-0 nylon; Ø = 0,41 mm, 3 – 4 cm Länge, Docol Corporation, Massachusetts, USA; Abbildung 14 A) wurde in den entstandenen Stumpf eingeführt und mit einem dünnen Faden (7-0, Coated VICRYL®) so fixiert, dass es nicht mehr hinaus rutschen konnte. Die Klemme an der ACI wurde vorsichtig gelöst (Abbildung 15 D). Das Filament wurde langsam etwa 2 – 3 cm tief in die ACI bis zur ACM eingeführt und das Filament durch Festziehen des Knotens fixiert (Abbildung 15 E & F). Die zweite Gefäßklemme an der ACC wurde ebenfalls entfernt und die Okklusionszeit von 60 Minuten gestartet. Die Wunde wurde mit 3 bis 4 Stichen genäht (5-0, Coated VICRYL®) um ein Austrocknen und Auslaufen von Wundwasser zu vermeiden, da die Tiere während der Okklusion für etwa 45 Minuten im MRT gemessen wurden.

Nach der Messung wurde die Wunde wieder geöffnet und nach Ablauf der Okklusionszeit das Filament vorsichtig entfernt. Anschließend wurde der Stumpf mit einem permanenten Knoten fest verschlossen. Sofern keine Blutungen mehr festgestellt werden konnten, wurde die Wunde mit einer kompletten Naht verschlossen (5-0, Coated VICRYL® (polyglactin 910), resorbierbar) und erneut Iod zur Desinfektion aufgetragen. Zum Schluss erfolgte eine subkutane Schmerzmittelbehandlung mit Carprofen (5 mg/kg), die bis zu drei Tage nach dem operativen Eingriff fortgeführt wurde. Zum Erwachen wurden die Tiere in einen sauberen und mit einer Heizmatte gewärmten Käfig gelegt.

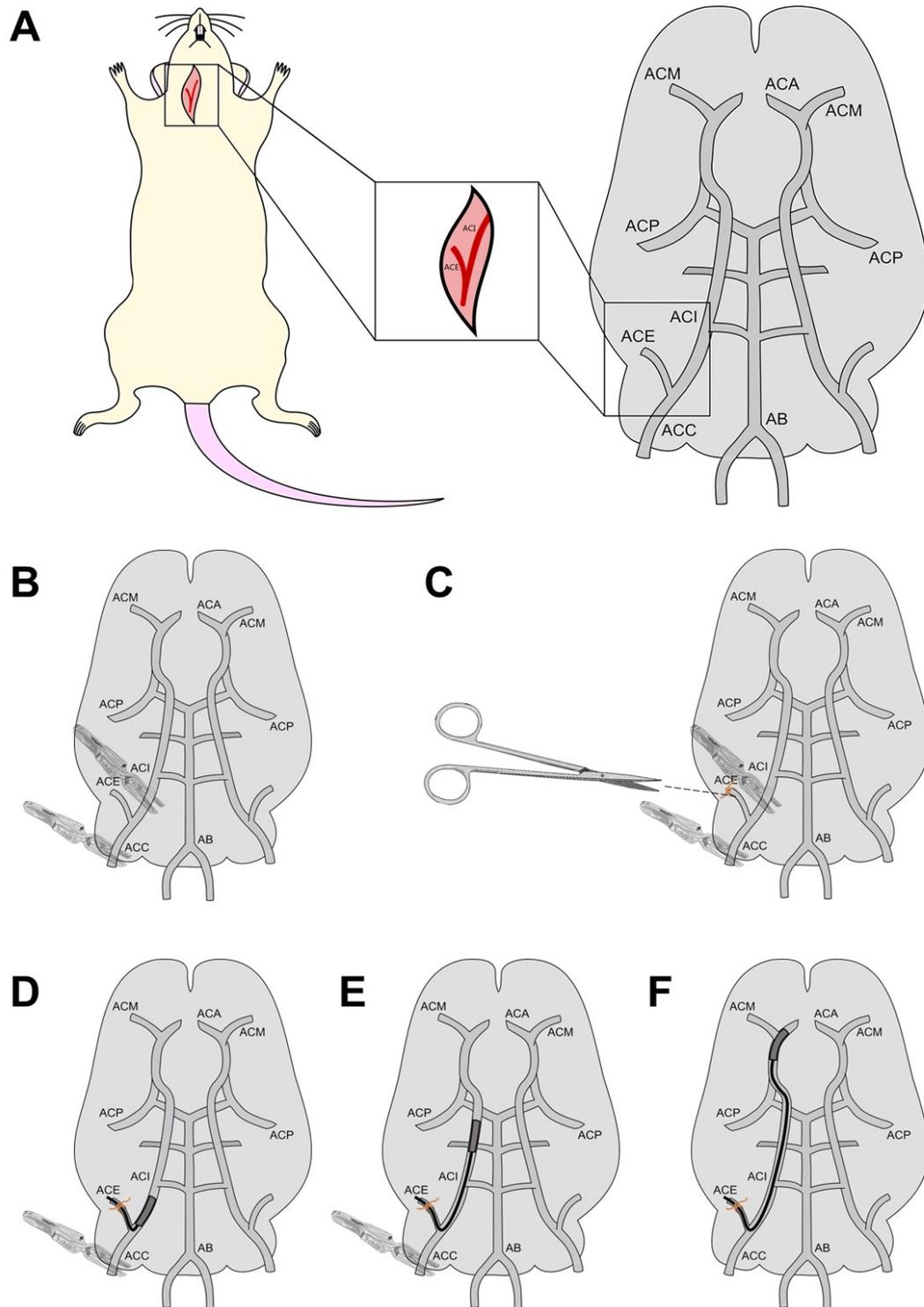


Abbildung 15: Schematische Darstellung des MCAO-Schlaganfallmodells. (A) Schematische Darstellung des Operationsbereichs. Das Tier lag auf dem Rücken, der Schnitt erfolgte links neben der Trachea. Zu sehen sind die Arteria Carotis Externa (ACE) und die Arteria Carotis Interna (ACI). (B) Die Arteria Carotis Communis (ACC) und die ACI wurden mit Arterienklemmen abgeklemmt. (C) Ein Knoten wurde an der ACE gesetzt und die Arterie durchgeschnitten. (D) Das Filament wurde eingeführt, festgebunden und die Klemme an der ACI entfernt. (E) Das Filament wurde vorsichtig entlang der Arterie Richtung Arteria Carotis Media (ACM) geschoben. (F) Richtige Position des Filaments bei der ACM. Start der Okklusionszeit. Arteria Basilaris (AB); Arteria Cerebri Posterior (ACP); Arteria Cerebri Anterior (ACA). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Dragneva *et al.* ¹⁴⁰, Berressem ¹⁴⁴ und Smith *et al.* ¹⁴⁵ bearbeitet und angepasst.

Die Tiere aus der Schein-OP-Gruppe wurden ebenfalls operiert. Der Ablauf war weitestgehend identisch, allerdings wurden nach der Platzierung der ACC- und ACI-Klemmen keine weiteren Arterien abgebunden oder kauterisiert. Das Setzen des Filaments in den anderen Gruppen dauerte etwa 15 Minuten. Daher wurden die Klemmen für dieselbe Zeit an den Arterien belassen und erst danach wieder entfernt. Auch ohne Filament wurde ab dann die Okklusionszeit von 60 Minuten gestartet. Die Wunde wurde für die MRT-Messung provisorisch verschlossen. Nach der MRT-Messung und Ablauf der Okklusionszeit wurde den Tieren aus der Schein-OP-Gruppe die provisorische Naht gelöst und die Wunde wie bei den anderen Tieren verschlossen (5-0, Coated VICRYL®, resorbierbar). Zum Schluss erfolgte eine subkutane Schmerzmittelbehandlung mit Carprofen (5 mg/kg), die bis zu drei Tage nach dem operativen Eingriff fortgeführt wurde. Zum Erwachen wurden die Tiere in einen sauberen und mit einer Heizmatte gewärmten Käfig gelegt.

3.1.4 MRT-Messungen

Alle Tiere wurden mit einem 7 Tesla BioSpec 70/30 USR MRT (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) gemessen (Abbildung 19 A&B). Der Scanner wurde mit der Software Paravision (Version 6.01, Bruker BioSpin MRI GmbH) bedient. Für die MRT-Messungen im *in vivo* Blockierungsversuch wurde eine Ganzkörperrattenspule (RF RES 300 1H 112/086 QSN TO AD, Bruker BioSpin MRI GmbH) und eine Rattengehirnoberflächenspule (RF ARR 300 1H R.BR. 2x2 RO AD, Bruker BioSpin MRI GmbH) verwendet. Sofern die Tiere durch die Operation nicht bereits narkotisiert waren, wurden die Ratten für die MRT-Messungen in einer beheizten Narkosebox mit 2 – 5% Isofluran anästhesiert. Das Isofluran wurde zusammen mit Raumluft in einem Verdampfungsgerät mit einer Durchflussrate von 0,8 l/min in die Box geleitet. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde den Tieren eine Augensalbe aufgetragen. Die Tiere wurden auf ein beheiztes MRT-Rattenbett mit Wärmerückkopplung (Bruker BioSpin MRI GmbH) gelegt, auf dem es mit einer Rektalsonde möglich war, die Körperkerntemperatur konstant auf $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ zu halten. Über ein am Bett angebrachtes Atem-Pad konnte die Atmung während der Messung überprüft und das Isofluran je nach Bedarf auf 1,3 – 2,5% angepasst werden. Die Oberflächenspule wurde über dem Rattenkopf auf dem Bett so fixiert, dass die Spule direkt über dem Gehirn war. Das Bett wurde dann mithilfe des Halters in das FOV des MRTs geschoben. Mittels einer Lokalisierungssequenz wurde die optimale Lage überprüft und gegebenenfalls nachjustiert. T2-gewichtete Bilder mit einer hohen räumlichen Auflösung wurden sowohl in einer longitudinalen als auch in einer transversalen Orientierung über zwei unterschiedliche 3D Turbo Spin Echo Sequenzen aufgenommen (Matrix: 256 x 256, FOV: 35 x 35 mm², TR: 4264,781 ms, TE: 11 ms,

Sichtdicke: 0,8 mm). Diese dienten als anatomische Referenz für die gemessenen PET-Bilder. Während der Okklusionszeit wurde außerdem ein DWI (EPI-DTI Sequenz) aufgenommen (Matrix: 96 x 86, FOV: 25 x 25 mm², TR: 3000 ms, TE: 82,35 ms, Anregungswinkel = 90°, Schnittdicke: 0,8 mm, b-Werte: [400, 600, 800, 1000] s/mm², Diffusionsrichtungen: 6, Anzahl Schnitte: 15), anhand welcher direkt am Scanner überprüft werden konnte, ob es zu einem Verschluss der Arterie gekommen war oder nicht. Nach den Messungen wurden die Tiere zurück in ihre Heimatkäfige gesetzt oder zur Entfernung des Filaments zurück auf den Operationstisch gelegt.

3.1.4.1 MRT-Bildauswertung

Alle MRT-Bilder wurden mithilfe von PMOD (3.2, PMOD Technologies Ltd., Zurich, Switzerland) und einem anatomischen Rattengehirnatlas (Schiffer Rattenhirnatlas ¹⁴⁶) manuell koregistriert. Der Koregistrierungsschritt ermöglichte es, die T2-Anatomien aller Tiere und aller Zeitpunkte gleich auszurichten. Um die Größe des Schlaganfalls zu ermitteln, wurden mit der Software PMOD der Schlaganfall und beide Hemisphären manuell in die 30 Bildschichten eingezeichnet (Schicht 60 bis 90), in denen sich das *Striatum* befand. Schlaganfallregionen, die außerhalb dieser 30 Schichten lagen, wurden nicht beachtet. Die Volumina der Schlaganfälle wurden mit einem Tool in der PMOD Software zusätzlich auf die kontralaterale Seite gespiegelt und angepasst, um die jeweiligen Referenzwerte der identischen Regionen zu erhalten.

3.1.5 PET-Messung

3.1.5.1 [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO Radiomarkierung

Die Konjugation von EPO und DFO, sowie die Radiomarkierung mit ⁸⁹Zr wurde von Ramona Stumm und Dominik Seyfried aus der Abteilung Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Dafür wurde das rHuEPO- α von Biomol (1,15 mg/ml in Natriumacetat-Puffer (0,25 M, pH 6) gelöst; Biomol GmbH) bezogen. Das rHuEPO- α wurde mit DFO als Chelator mit Hilfe von Isothiocyanat als Linker, wie von Perk et al. beschrieben, konjugiert ¹³². Dabei wurde 1 mg des Proteins mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 2,5 μ mol) für 30 min behandelt. Danach wurde das EDTA gegen 0,1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) bei einem pH-Wert von 9 über drei aufeinanderfolgende Ultrafiltrationsschritte (Amicon Ultra-15 Kartusche, 10 kDa, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) ausgetauscht. Eine Lösung aus DFO-Bz-NCS (250 μ g, Macrocyclics, Plano, Texas, USA) in Dimethylsulfoxid (50 μ l) wurde zu dem gepufferten rHuEPO- α gefügt und bei Raumtemperatur für 120 min inkubiert. Das Verhältnis zwischen konjugiertem DFO-EPO und unkonjugiertem EPO wurde mittels HochleistungsgröÙenausschluss-

Flüssigchromatographie (HPSEC, BioSep-SEC-s2000, Phenomenex, Torrance, Kalifornien, USA; mobile Phase: PBS; gibco von Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA)) bestimmt. Hierbei wurden die Moleküle nach ihrer Größe sortiert, mit FeCl_3 angefärbt und dann mit einem UV-Detektor bei 429 nm bestimmt. Das Anfärben diente dazu, einen Markierungsgrad von 7 bis 10 DFO-Molekülen pro EPO-Molekül zu garantieren. Überschüssiger Chelator wurde, wie oben beschrieben, mittels sechs aufeinanderfolgenden Ultrafiltrationsschritten mit 0,25 M Natriumacetatlösung bei einem pH-Wert von 6 entfernt. Als Qualitätskontrolle wurde jeweils vor und nach der Konjugation eine HPSEC durchgeführt. Dabei wurden die Produktpeaks auf Veränderungen untersucht. Unterschieden sich die Peaks der Produkte nach der Konjugation nicht oder nur kaum, war die Konjugation erfolgreich. Eine Veränderung wies auf eine unerwünschte Denaturierung des Proteins hin. Nur Chargen mit erfolgreich konjugierten Proteinen wurden radiomarkiert.

Das radioaktive Zirkonium (^{89}Zr in 1 M Oxalsäure) wurde von Perkin Elmer (PerkinElmer Nederland B.V., Groningen, Niederlande) bezogen. Die Radiomarkierung wurde wie von Perk *et al.* ¹³² beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde die Oxalsäure mit 2 M Natriumcarbonatlösung und 0,5 M HEPES (pH-Wert 7,2) neutralisiert und auf einen pH-Wert von 7,0 – 7,2 gepuffert. Nach der Zugabe von DFO-EPO (0,3 μg pro MBq) wurde die Lösung eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Mit der oben beschriebenen HPSEC konnte die fast vollständige (>90%) Einlagerung des ^{89}Zr in DFO-EPO belegt werden (das heißt: Radiochemische Reinheit von ^{89}Zr -DFO-EPO > 90%). Die spezifische Aktivität betrug 3,33 MBq/ μg . Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist unter spezifischer Aktivität die scheinbare oder effektive spezifische Aktivität zu verstehen, da durch die Konjugation mit DFO das finale Gewicht des DFO-EPO-Komplexes nicht bekannt war. Es ist daher davon auszugehen, dass die tatsächliche spezifische Aktivität geringer war ¹⁴⁷.

3.1.5.2 Tracer Injektion

Für die Injektionen musste ein intravenöser Katheter in die seitliche Schwanzvene der Tiere gelegt werden. Für die Narkose wurde das Isofluran zusammen mit Raumluft in einem Verdampfungsgerät mit einer Durchflussrate von 0,8 l/min mit 2 – 5% in die Narkosebox geleitet. Nach Kontrolle der Narkosetiefe mittels Zwischenzehenreflex, wurde die Narkose bei 1,5 – 2% Isofluran aufrechterhalten. Der Katheter wurde manuell aus einer 30G Injektionskanüle und einem dünnen Schlauch für jedes Tier hergestellt und mit einer heparinhaltigen Kochsalzlösung entlüftet. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurden sie auf eine beheizte Matte gelegt. Zum weiten der Schwanzvene wurde der Rattenschwanz kurz in ein handwarmes Wasserbad getaucht und abgetupft. Der

Katheter wurde in die laterale Schwanzvene gelegt und mit etwas Sekundenkleber fixiert, um das Verrutschen des Katheters bei der Injektion zu vermeiden. Die Blockierungsgruppe erhielt 30 Minuten vor der Injektion des Tracers 500 µl nicht-radioaktiv markiertes rHuEPO-α. Um den Stress bei den Tieren so gering wie möglich zu halten, blieben diese bis zur Injektion des Tracers auf der Heizmatte narkotisiert. Der Tracer selbst wurde in einer Insulinspritze aufgezogen und die Menge der Aktivität in einem Capintec (CRC®-15R, Capintec, Inc., New Jersey, USA) gemessen. Jedem Tier wurde eine Aktivitätsmenge von $30,3 \pm 1,3$ MBq [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO verabreicht. Die Aktivitätsmenge, die Injektionszeit, die Restaktivität in der Spritze sowie der Startzeitpunkt der Messung wurden protokolliert, damit die tatsächlich injizierte Dosis für jedes Tier errechnet werden konnte. Nach der Injektion wurde der Katheter vorsichtig entfernt und die Tiere in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt.

3.1.5.3 Erhebung der PET-Daten

Die statischen PET-Messungen wurden auf einem Inveon Kleintier PET-Scanner (Inveon microPET, Siemens Healthineers, Knoxville, Tennessee, USA, Abbildung 16) durchgeführt und konnten mit der Inveon Acquisition Workplace Software (Siemens Healthineers) bedient werden. Das FOV des Scanners betrug 12,7 cm in axialer Richtung und 10 cm in transaxialer Richtung mit einer räumlichen Auflösung im FOV von etwa 1,4 mm.

Für die Messungen wurden die Tiere in einer beheizten Narkosebox mit 2 – 5% Isofluran narkotisiert. Das Isofluran wurde zusammen mit Raumluft in einem Verdampfungsgerät mit einer Durchflussrate von 0,8 l/min in die Box geleitet. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurden sie auf ein beheiztes Rattenbett mit Wärmerückkopplung (Bruker BioSpin MRI GmbH) überführt und fixiert. Anhand der Atmung wurde die Narkose je nach Bedarf auf 1,5% – 2,5% angepasst. Um das Austrocknen der Augen zu vermeiden, wurde eine Augensalbe aufgetragen und als Temperaturkontrolle eine Rektalsonde eingeführt. Die Körpertemperatur der Tiere konnte mithilfe der selbstregulierenden Medres-Wärmeeinheit konstant auf $37 \pm 0,5^\circ$ C gehalten werden. Die Tiere wurden im Scanner so platziert, dass sich das Gehirn im Zentrum des FOV befand. Danach wurde die Messung gestartet. Der 60-minütigen statischen Emissionsmessung folgte eine 10-minütigen Transmissionsmessung mit einer ⁵⁷Co-Quelle ¹²⁸.



Abbildung 16: Fotografie der PET-Scanner im Labor. Zu sehen sind die drei Scanner, die für die Messungen verwendet wurden.

3.1.5.4 PET-Bildauswertung

Die gemessenen Daten wurden als list-mode-Dateien gespeichert und histogrammiert. Die daraus entstandenen Sinogram-Dateien wurde in der Inveon Research Workplace Software (Version 1.5.0.28, Siemens Healthineers) mit einem OSEM3D Algorithmus (Martix 256 x 256, Voxelgröße 1,5 x 1,5 x 1,5 mm³) rekonstruiert. Mit Hilfe der Transmissionsmessungen konnten Schwächungskorrekturkarten berechnet werden, die jeweils mit den Sinogrammen multipliziert wurde, um so die Abschwächung zu korrigieren. Die rekonstruierten PET-Bilder wurden pro Tier auf die koregistrierten MRT-Bilder in PMOD überlagert. *Volumes of interest* (VOI), die anhand der T2-gewichteten Bilder um die Schlaganfallregion und die Hemisphären gezeichnet wurden, konnten nun auf die PET-Bilder übertragen werden. Für die Schein-OP-Gruppe gab es zu keinem Zeitpunkt VOIs für die Schlaganfallregionen. Daher wurde für diese Gruppe nur die Aktivität in den Hemisphären ausgewertet. Für den 6 h Zeitpunkt wurden für jedes Tier die VOIs vom 24 h Zeitpunkt eingeladen, da kein T2 Bild für diesen Zeitpunkt zur Verfügung stand, um die Schlaganfallregion einzuzeichnen. Die gemessene Aktivität wurde mit Hilfe einer Zerfallskorrektur in die tatsächliche Aktivität umgerechnet und auf die injizierte Dosis normalisiert ((gemessene Aktivität / tatsächliche Aktivität) * 100). Die Daten wurden als Prozent injizierte Dosis pro cm³ (% ID/cm³) angegeben.

3.1.6 Biodistribution

Die Biodistribution wurde nach dem letzten MRT- und PET-Scan zum 72 h Zeitpunkt durchgeführt. Zunächst wurde den Tieren in tiefer Isoflurannarkose mit kleinen Glaskapillaren (Haematokrit-Kapillaren, 75 µl, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland) retrobulbär Blut in Gamma Counter Röhren (5 ml, 75 x 12 mm mit rundem Boden und Eindrückstopfen, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen. Dann wurden die Tiere dekapitiert und Teile von Herz, Leber, Milz, Niere, Oberschenkelknochen, Oberschenkelmuskel, Hirnhaut und Lunge entnommen und ebenfalls in Gamma Counter Röhren überführt. Alle Gamma Counter Röhren wurden vor und nach der Befüllung mit Blut und Organen jeweils gewogen, um das Nettogewicht des Inhalts zu ermitteln. Als nächstes wurde ein Standard angesetzt, indem eine bekannte Menge (1,83 MBq) an Radioaktivität in einen 50 ml Kolben pipettiert und dieser mit PBS aufgefüllt wurde. Dann wurden jeweils 100 µl der radioaktiven Lösung in drei Gamma Counter Röhren gefüllt. Die Röhren mit dem Standard und den Organen wurde im Gamma Counter (2480 Wizard², Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) in einem Energiefenster zwischen 350 und 650 keV gemessen. Die gemessenen Werte wurden zerfallskorrigiert und zur jeweils injizierten Dosis und zum Gewicht der Organe normalisiert. Damit konnten die Werte als Prozent injizierte Dosis pro Gramm Organewebe (% ID/g) angegeben werden.

3.1.7 Autoradiographie

Nach der Dekapitation der Tiere wurde das Gehirn entnommen und in Kryoeinbettkassetten (29 x 20 x 12 mm) mit Tissue-Tek (Tissue-Tek® O.C.T.™, Thermo Fischer Scientific) bei -20°C eingebettet. Nachdem das komplette Gehirn gefroren war, wurden sie mit einem Leica Kyostat (Leica CM1950, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland) in 10 und 20 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträgern (SuperFrost®, 25 x 75 x 1 mm, R. Langenbrinck GmbH) aufgenommen und zusammen mit einem Standard unter die Autoradiographieplatte (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien, USA) gelegt. Als Standard wurden jeweils 0,5 µl des verdünnten Tracers (1%, 0,5%, 0,25% und 0,125% der injizierten Dosis) verwendet. Nach 24 h wurde die Platte mit einem Phosphor-Imager (Storm® 840, Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien, USA) bei einer Ortsauflösung von 50 x 50 µm² pro Pixel ausgelesen.

3.1.8 Statistische Analyse

Für diesen Versuchsteil wurde bei der Analyse der PET-Daten eine zweiseitige Varianzanalyse (engl.: „*analysis of variance*“, ANOVA) mit einer Fishers *Least Significant Difference* (LSD)-Korrektur als nachträglicher Post-hoc-Test zum

Mehrfachgruppenvergleich durchgeführt. Zur Auswertung der Biodistribution wurde eine einseitige ANOVA mit einer Fischers LSD-Korrektur angewendet. Alle statistischen Tests wurden mit MATLAB (R2019b, The MathWorks, Inc., Natick, USA) berechnet. Die Ergebnisse wurden im gängigen Format mit Freiheitsgraden (engl.: „*degree of freedom*“, df), F-Wert und p-Wert dargestellt und sind in der Tabelle 6 zusammengefasst. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Alle Grafiken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt.

3.1.9 Ausschluss von Daten

Nicht alle Tiere konnten in die Auswertung der Daten mit eingehen. Zwei Tiere starben nach der Operation (Schlaganfall- und Schein-OP-Gruppe), ein Tier nach dem 24 h Zeitpunkt (Blockierungsgruppe) und erneut eins nach dem 48 h Zeitpunkt (Schein-OP-Gruppe). Bei einem Tier aus der Schlaganfallgruppe wurden aufgrund technischer Probleme keine Messdaten zum 6 h Zeitpunkt aufgenommen. Die Anzahl der Tiere, die für jeden Zeitpunkt ausgewertet wurden, können der nachfolgenden Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Anzahl der Tiere, die für den *in vivo* Blockierungsversuch an den jeweiligen Zeitpunkten ausgewertet wurden

Zeitpunkt	Schlaganfallgruppe	Blockierungsgruppe	Schein-OP-Gruppe
6 h	3	5	4
24 h	4	5	4
48 h	4	4	4
72 h	4	4	3

3.1.10 Stabilitätstest von [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO im Serum

Damit abgeschätzt werden konnte, wie stabil [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO im Blut ist, wurde ein Serumstabilitätstest durchgeführt. Abgesehen von der Probengewinnung wurde der Serumstabilitätstest inklusive der Auswertung von Dominik Seyfried aus der Abteilung Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Dafür wurde murines Blut in ein Probengefäß gegeben (1,3 ml K3E: 1,6 mg EDTA/ml, SARSTEDT AG & Co. KG) und bei 13.000 g (hier Beschleunigungsgröße der Zentrifuge) 2 Minuten lang zentrifugiert (HERAEUS FRESCO 17 Centrifuge, ThermoFisher SCIENTIFIC, Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Das Blutplasma wurde in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) umgefüllt (Abbildung 17).

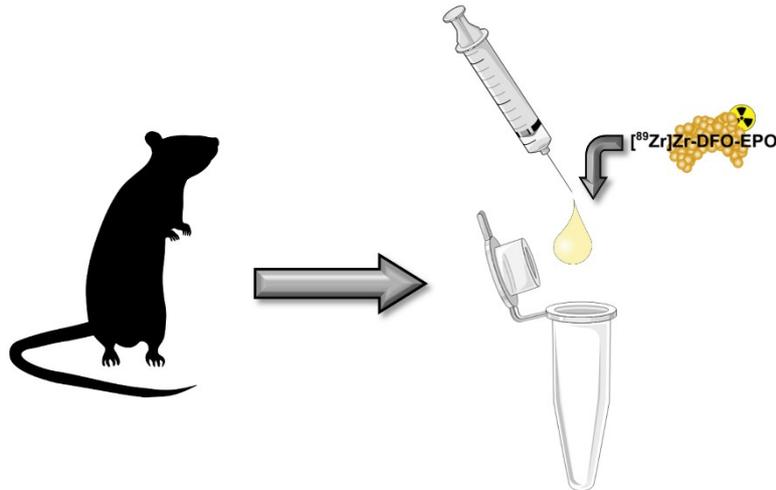


Abbildung 17: Stabilitätstest von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ in murinem Serum. Schematische Darstellung der Probenentnahme für den Serumstabilitätstest. (A) Es wurde Blut von einer Ratte abgenommen und zentrifugiert. Das Rattenserum wurde zusammen mit dem radioaktiven Tracer $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ in ein Reaktionsgefäß gefüllt und bei 37° inkubiert. Die Stabilität des Tracers im Serum wurde bei beide Proben an unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 24h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h und 195 h) mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt. Teile der Abbildung wurden mit Hilfe von Bildern aus Servier Medical Art erstellt ¹⁴¹.

$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ (spezifische Aktivität $1,5 \text{ MBq}/\mu\text{g}$, Reinheit 94%) wurde im Verhältnis 1 zu 1 auf das Rattenserum gegeben und bei 37°C inkubiert.

Für die Auswertung, in welchem Ausmaß $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ im Serum zersetzt wird, wurde eine Dünnschichtchromatographie zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h und 195 h) durchgeführt. Dabei wurden jeweils aus der gleichen Lösung Proben für jeden Zeitpunkt entnommen. Zwischen den Messpunkten wurden die $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ -Serum weiter bei 37°C inkubiert.

Für die Dünnschichtchromatographie wurde etwas Serum auf eine *instant thin layer chromatography* (iTLC)-Platte pipettiert und in Diethylentriaminpenta-Essigsäure als Fließmittel gestellt. Durch die Kapillarkräfte wurde das freie, nicht (mehr) gebundene ^{89}Zr mit dem Fließmittel nach oben gezogen. Das gebundene ^{89}Zr ($[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$) blieb am Startpunkt zurück. Zur Auswertung wurde eine Autoradiographie (Cyclone[®] Plus, Storage Phosphor System, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt und sowohl der prozentuale Anteil des gebundenen ^{89}Zr als auch der des freien ^{89}Zr bestimmt.

3.2 Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurde anhand unterschiedlicher Parameter untersucht, ob sich Ambroxol als neuroprotektives Therapeutikum zur Behandlung von Schlaganfall eignen würde.

3.2.1 Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden insgesamt 80 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River) mit einem Gewicht zwischen 327 – 398 g verwendet, wovon 53 Tiere in die Auswertung eingingen (siehe 3.1.9 Ausschluss von Daten). Die Tiere wurden in individuell ventilierten Makrolonkäfigen (1500 U) mit Einstreu und Zellulosepapier gehalten. Die Tiere wurden in Gruppen von 3 bis 4 Tieren untergebracht, mit normalem Haltungsfutter gefüttert und hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser. Vor der Operation wurden die Tiere restriktiv mit 20 g pro Tag und Tier gefüttert, da für die Verhaltensversuche im Training mit einem Belohnungssystem gearbeitet wurde. Nach der Operation hatten sie uneingeschränkt Zugang zum Futter. In den ersten Tagen nach der Operation wurde den Tieren durch eingeweichte Pellets die Nahrungsaufnahme erleichtert. Die Tiere wurden bei einem Tag-Nacht-Lichtrhythmus von jeweils 12 Stunden, einer Raumtemperatur von konstanten 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 57% ($\pm 5\%$) gehalten. Jeder Käfig war außerdem mit einem Häuschen als Versteckmöglichkeit ausgestattet.

3.2.2 Experimenteller Aufbau

Bei allen Ratten wurde zunächst die Baseline für die Verhaltensversuche und die MRT aufgenommen. Auffälligkeiten sollten so zweifelsfrei auf den Schlaganfall oder die Therapie zurückzuführen sein. Danach wurden die Tiere operiert. Während der Okklusion (0 h) wurden die Tiere im MRT-Scanner gemessen und anhand einer DWI-Messung die Größe des Infarktes festgestellt. Alle Tiere, die in die Auswertung miteingingen ($n = 53$), wurden in eine der folgenden Gruppen eingeteilt: NaCl-Gruppe ($n = 17$), Ambroxolgruppe ($n = 17$) oder Vehikelgruppe ($n = 19$). Durch die Vorauswahl anhand der DWI sollte eine gleichmäßige Größenverteilung der Schlaganfälle gewährleistet werden. Bei der NaCl- und Vehikelgruppe handelte es sich jeweils um eine Kontrollgruppe und bei der Ambroxolgruppe um die Therapiegruppe. Die erste Behandlung erhielten die Tiere direkt nach der Operation. Weitere Behandlungen erfolgten über eine Woche zweimal täglich, um einen gleichmäßigeren Ambroxolspiegel im Blut über die Zeit zu erreichen. Die Verhaltensversuche und MRT-Messungen erfolgten neben der Baseline an den Zeitpunkten 24 h, 72 h, 1 Woche und 1 Monat nach Schlaganfallinduktion (Abbildung 18).

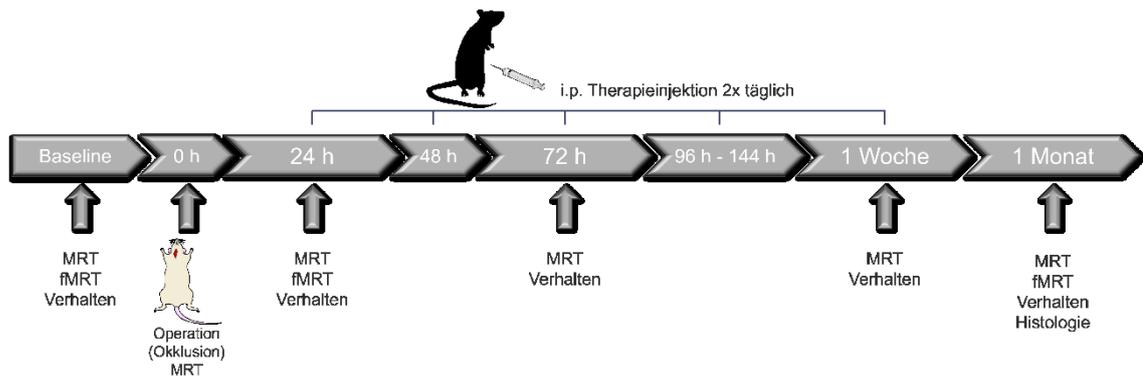


Abbildung 18: Experimenteller Ablauf des Ambroxol-Therapieversuchs. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Es wurden sowohl Verhaltensversuche als auch MRT-Messungen vor der Operation durchgeführt. Nach der Okklusionsmessung (0 h) erfolgten mehrere Messungen (24 h, 72 h, 1 Woche und 1 Monat) sowie eine tägliche Therapiegabe von maximal einer Woche. Am letzten Messzeitpunkt wurden die Tiere getötet und das Gehirn für histologische Färbungen entnommen. Teile der Abbildung wurden nach Dragneva *et al.* ¹⁴⁰ bearbeitet und angepasst. Andere Teile der Abbildung wurden mit Hilfe von Bildern aus Servier Medical Art erstellt ¹⁴¹.

Für die Histologie wurden die Tiere an unterschiedlichen Zeitpunkten getötet und die Gehirne entnommen. Die Entnahmezeitpunkte und Gruppen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Anzahl der Tiere, die zu den jeweiligen Zeitpunkten für die Histologie getötet wurden.

Zeitpunkt des Todes	NaCl	Ambroxol	Vehikel
24 h	4	5	6
72 h	4	2	3
1 Woche	0	0	0
1 Monat	9	10	10
Tiere gesamt	17	17	19

3.2.3 Operativer Eingriff

Für den Therapieversuch wurden alle Tiere wie unter 3.1.3 beschrieben operiert. Die MRT-Messung während der Okklusion dauerte etwa 50 bis 55 Minuten. Nach der Entfernung des Filaments und dem Verschluss der Wunde erfolgte eine subkutane Schmerzmittelbehandlung mit Carprofen (5 mg/kg), die bis zu drei Tage nach dem operativen Eingriff fortgeführt wurde. Sofern die Operation erfolgreich war, wurde direkt mit der intraperitonealen (i.p.) Therapie- oder Kontrollbehandlung begonnen. Zum Erwachen wurden die Tiere in einen sauberen und mit einer Heizmatte gewärmten Käfig gelegt.

3.2.4 MRT-Messungen

Alle Tiere wurden mit einem 7 Tesla BioSpec 70/30 USR MRT (Bruker BioSpin MRI GmbH) gemessen (Abbildung 19 A&B). Der Scanner wurde mit der Software Paravision (Version 6.01) bedient. Sofern die Tiere durch die Operation nicht bereits narkotisiert waren, wurden die Ratten für die MRT-Messungen in einer beheizten Narkosebox mit 2 – 5% Isofluran anästhesiert. Das Isofluran wurde zusammen mit Raumluft in einem Verdampfungsgerät mit einer Durchflussrate von 0,8 l/min in die Box geleitet. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde den Tieren eine Augensalbe aufgetragen. Die Tiere wurden auf ein beheiztes MRT-Rattenbett mit Wärmerückkopplung gelegt, auf dem es mit einer Rektalsonde möglich war, die Körperkerntemperatur konstant auf $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ zu halten. Über ein am Bett angebrachtes Atem-Pad konnte die Atmung während der Messung überprüft und das Isofluran je nach Bedarf auf 1,3 – 2,5% angepasst werden.

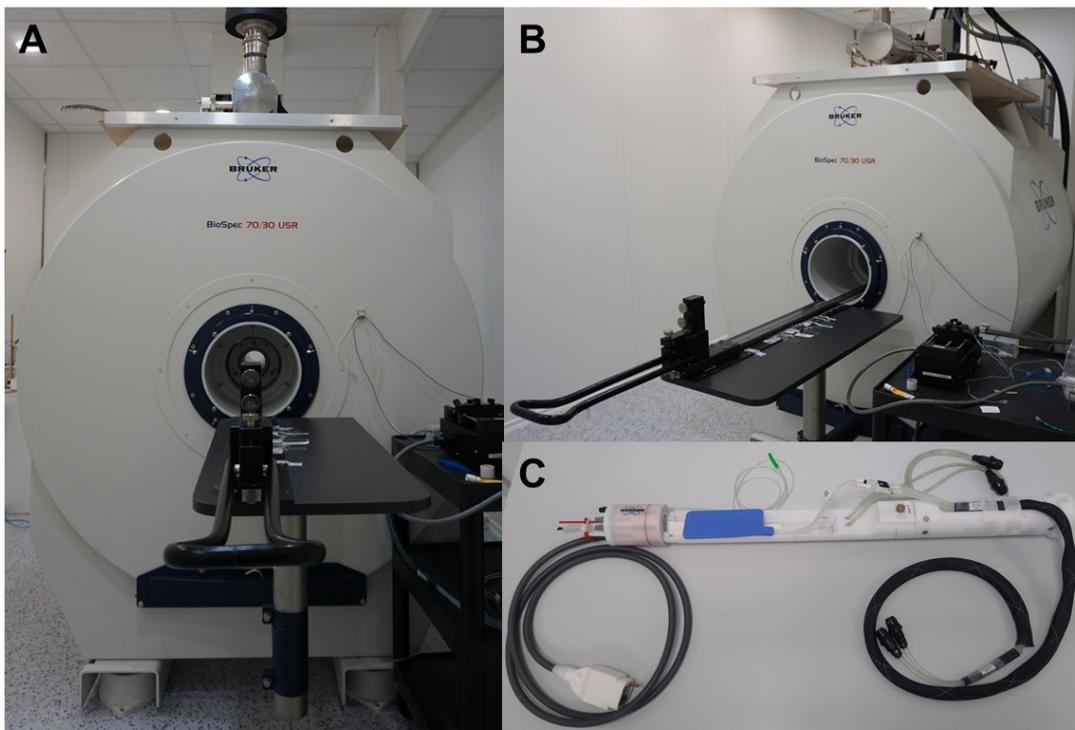


Abbildung 19: Fotografie des MRT-Scanners. Dieser Scanner wurde für die Messungen verwendet und zeigt das Gerät in zwei unterschiedlichen Perspektiven (**A** und **B**). (**C**) Aufbau des beheizten Rattenbetts mit Wärmerückkopplung inklusive der Mausganzkörperpule. Damit die Tiere nicht auskühlten wurden sie zusätzlich mit einer blauen Heizmatte abgedeckt.

Für alle MRT-Messungen im Ambroxol-Therapieversuch wurde die räumliche Auflösung durch den Einbau des B-GA12S HP Gradienten-Inserts (Bruker BioSpin MRI GmbH) verbessert, da es durch einen stärkeren Gradienten möglich war, kleinere Voxel zu messen. Als Hirnvolumenspule wurde die Maus-Ganzkörper-Volumenspule (RF RES 300 1H

075/040 QSN TR; Bruker BioSpin MRI GmbH) verwendet (Abbildung 19 C). Für die Messungen wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet, da während der Okklusion aus Zeitgründen ein verkürztes Protokoll nötig war. Zunächst wurden bei allen Zeitpunkten die Tiere mittels einer Localizer Sequenz im MRT optimal ausgerichtet. Während der Okklusion wurde zuerst ein sogenanntes Shimming durchgeführt, um die entstandenen Inhomogenitäten im Magnetfeld B_0 zu korrigieren und die Bildqualität zu verbessern. Zur Darstellung der Diffusion wurde eine DTI-EPI-Sequenz in koronaler Ebene gemessen (Matrix: 128 x 80, FOV: 25 x 30 mm², TR: 2000 ms, TE: 22,13 ms, Anregungswinkel = 90°, Schnittdicke: 0,8 mm, b-Werte: [400, 600, 800, 1000] s/mm², Diffusionsrichtungen: 6 (n = 15); 30 (n = 65), Anzahl Schnitte: 30). Aus Zeitersparnisgründen wurden zunächst nur 6 Diffusionsrichtungen gewählt. Da aber die Qualität der Bilder stark beeinträchtigt war, wurden die zu messenden Diffusionsrichtungen für die restlichen Messungen auf 30 erhöht. Außerdem wurde eine verkürzte T2 turbo RARE SE-Sequenz ebenfalls in der koronalen Ebene aufgenommen (Matrix: 256 x 256, FOV: 35 x 35 mm², TR: 4206,78 ms, TE: 33 ms, Anregungswinkel = 90°, Schnittdicke: 0,8 mm, Anzahl Schnitte: 40).

Für alle anderen Zeitpunkte wurde nach dem Localizer zuerst die T2 turbo RARE SE-Sequenz in koronaler Ebene aufgenommen (Matrix: 256 x 256, FOV: 35 x 35 mm², TR: 8414,36 ms, TE: 33 ms, Anregungswinkel = 90°, Schnittdicke: 0,5 mm, Anzahl Schnitte: 80) und erst danach das Shimming gemacht. Als nächstes wurde die DTI-EPI-Sequenz gemessen (Matrix: 128 x 80, FOV: 25 x 30 mm², TR: 2000 ms, TE: 22,13 ms, Anregungswinkel = 90°, Schnittdicke: 0,8 mm, b-Werte: [400, 600, 800, 1000] s/mm², Diffusionsrichtungen: 30, Anzahl Schnitte: 30).

Zusätzliche fMRT-Messungen wurden an den Zeitpunkten Baseline, 24 h und 1 Monat durchgeführt. Um den Effekt des Isoflurans so gering wie möglich zu halten, wurden die fMRT-Sequenzen an den jeweiligen Zeitpunkten direkt nach dem Localizer bei 1,3 – 1,5% Isofluran gemessen. Für eine Optimierung der Bildqualität wurde ebenfalls ein zusätzliches Shimming durchgeführt. Für die fMRT-Sequenz wurde eine T2*-gewichtete GE-EPI-Sequenz verwendet (Matrix: 92 x 85, FOV: 25 x 23 mm², TR: 2000 ms, TE: 18 ms, Anregungswinkel = 90°, Schnittdicke: 0,8 mm, Abstand zwischen den Schnitten: 0,2 mm, Anzahl Schnitte: 20, Wiederholungen: 605). Als anatomische Referenz wurde außerdem noch ein T2-gewichtetes Bild (Matrix: 128 x 160, FOV: 40 x 32 mm², TR: 1800 ms, TE: 67,11 ms, Schnittdicke: 32 mm, Anzahl Schnitte: 1) aufgenommen. Danach folgten die T2 turbo RARE- und DTI-EPI-Sequenzen wie oben beschrieben. Nach den Messungen wurden die Tiere zurück in ihre Heimatkäfige gesetzt oder zur Entfernung des Filaments zurück auf den Operationstisch gelegt.

3.2.4.1 MRT-Bildanalyse

Berechnung und Koregistrierung von Karten und Bildern

Zunächst wurden ADC-Karten von den aufgenommenen DWI-Bildern für alle Tiere und Zeitpunkte mit Hilfe von MATLAB berechnet. Dabei wurde zunächst der Mittelwert der Signalintensität für jeden b-Faktor berechnet und dann eine lineare Regression auf die b-Faktoren angewendet. Die FA-Karten wurden direkt von der Paravision 6.01 Software (Bruker Biospin MRI GmbH) berechnet und bereitgestellt. Zusammen mit den T2-Bildern wurde jedes Bild und jede Karte für jeden Zeitpunkt mit der Software PMOD individuell auf den Schiffer Rattenhirnatlas¹⁴⁶ koregistriert und räumlich normalisiert. Durch die Koregistrierung und die Normalisierung wurde sichergestellt, dass alle Gehirne für alle Zeitpunkte die gleiche Größe und Form hatten. Alle Bilder und Karten (T2, ADC, FA) wurden zur weiteren Bearbeitung in eine MATLAB-Tabelle geladen.

„Volume of interest“ – Schlaganfallvolumen, Striatum und Cortex

Als nächstes wurden die Schlaganfallvolumina als VOI für die Zeitpunkte 24 h, 72 h, 1 Woche und 1 Monat nach der Okklusion manuell über die hauseigene MALAB-Funktion ‚*overlayVolume*‘ auf Grundlage der T2-Bilder und ADC-Karten sowie der jeweils gleichen Schwellenwerte eingezeichnet.

Im Gegensatz dazu wurde das Schlaganfallvolumen während der Okklusion über einen Schwellenwert berechnet. Dafür wurde ein VOI aus der Summe aller Volumina vom 24 h Zeitpunkt generiert (VOI-24h). Dieses wurde dann auf die Baseline ADC-Karte für jedes Tier übertragen. Pro Tier wurde ein individueller Schwellenwert ermittelt, der 22% unter dem jeweiligen Baselinemedian lag. Alle Bereiche, die unterhalb dieses individuellen Schwellenwertes lagen, stellten dann für jedes Tier das Schlaganfallvolumen innerhalb des VOI-24h zum 0 h Zeitpunkt dar.

Alle Schlaganfallvolumina wurden ebenfalls für weitere Analysen in die MATLAB-Tabelle geladen. Im nächsten Schritt wurden alle T2-Bilder und ADC-Karten maskiert. Bei der Maskierung wurden alle Voxel außerhalb der Gehirne entfernt.

Alle angegebenen Werte (Volumen, Median) sowie T2- und ADC-Bilder wurden mithilfe von MATLAB generiert oder dargestellt. Wenn zu einem Zeitpunkt für ein Tier kein Schlaganfall vorhanden war, wurde das Volumen als 0 angegeben und der T2- und ADC-Median in der MATLAB-Tabelle als NaN (engl.: „*not a number*“) definiert.

Alle VOIs von Hirnregionen, die neben den Schlaganfallvolumina ebenfalls in den Bildern überlagert wurden (z.B. *Striatum* und *Cortex*), wurden direkt vom Schiffer Rattenhirnatlas übernommen¹⁴⁶. Mittels der überlagerten VOIs konnte zum einen das Schlaganfallvolumen in die Regionen *Striatum* und *Cortex* bestimmt und zum anderen auf der

kontralateralen Hemisphäre Referenzregion dargestellt werden. Für diesen Auswertungsschritt war die genaue Koregistrierung und Normalisierung der Gehirne besonders wichtig. Außerdem konnte mit den in der Tabelle eingetragenen Volumina zusätzlich die gesamte Reduktion des Schlaganfallvolumens zwischen dem 0 h und dem 1 Monat Zeitpunkt berechnet sowie die prozentuale Verteilung des Schlaganfalls auf die unterschiedlichen Hirnregionen ermittelt werden.

Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre der T2- und ADC-Werte berechnet. Dafür wurde der Wert der ipsilateralen Hemisphäre durch den Wert der kontralateralen Hemisphäre geteilt (Verhältnis = ipsilateral/kontralateral).

„Volume of Interest“ – *Corpus callosum*

Die VOIs für das *Corpus callosum* wurden manuell in MATLAB mit der hauseigenen MATLAB-Funktion ‚*overlayVolume*‘ mit Hilfe des Paxinos Rattenhirnatlasses erstellt ¹⁴⁸. Dabei wurden pro Hemisphäre drei unterschiedliche VOIs um verschiedene Bereiche des *Corpus callosum* gezeichnet (Abbildung 20): Die *Capsula externa*, die *Capsula interna* und das *Genu*. Ein viertes VOI wurde durch das Zusammenlegen der drei VOIs als komplettes *Corpus callosum* definiert. Trotz der räumlichen Normalisierung aller Gehirne kam es aufgrund des Ödems zum 24 h und 72 h Zeitpunkt zu Verschiebungen der *Capsula interna* und des *Genus* auf der ipsilateralen Hemisphäre. Für diese Zeitpunkte wurden die VOIs manuell angepasst. Mithilfe von MATLAB wurden neben den Medianen der FA-Werte auch t-Test-Karten berechnet (siehe 3.2.7 Statistische Analyse). Anhand dieser t-Test-Karten wurden die prozentualen Anteile der signifikanten Voxel in allen vier *Corpus callosum* VOIs berechnet.

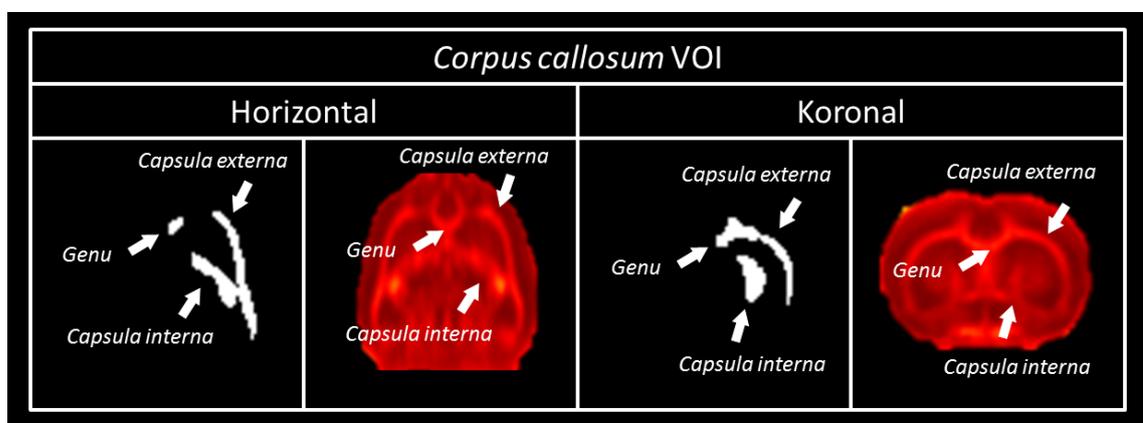


Abbildung 20: „Volume of Interest“ (VOI) im *Corpus callosum*. Beispielhaft sind hier zwei Ausschnitte in horizontaler und koronaler Ausrichtung der VOIs auf der ipsilateralen Hemisphäre gezeigt. Die weißen Pfeile zeigen jeweils auf eines der drei VOI, *Capsula externa*, *Capsula interna* und *Genu*. Zusammen bilden sie das VOI *Corpus callosum* komplett.

Angaben von Werten

Bei den angegebenen Werten handelt es sich entweder um den Median und die jeweilige Reichweite der Daten, wobei in der Klammer immer zuerst der kleinste gemessene Wert und dann der größte gemessene Wert (kleinster Wert – größter Wert) angegeben ist, oder den Mittelwert mit der jeweiligen Standardabweichung.

3.2.4.2 Nachbereitung der fMRT-Daten

Die fMRT-Daten wurden, wie von Ionescu *et al.*¹⁴⁹ beschrieben, nachbereitet. Kurz zusammengefasst wurden zwei unterschiedliche Softwarelösungen verwendet: *Statistical Parametric Mapping 12* (SPM 12, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College London, London, Großbritannien) und *Analysis of Functional NeuroImages* (AFNI, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Zunächst wurden die fMRT-Scans bezüglich kleiner Bewegungen, wie der Atmung, korrigiert, indem alle Scans gleich ausgerichtet (realigned) wurden. Zusätzlich wurde für jeden fMRT-Scan ein Durchschnittsbild erstellt. Diese Bilder wurden verwendet, um binäre Masken mit Hilfe von AFNI zu generieren. Die Masken dienten zur automatischen Entfernung des Schädelknochens samt umliegender Gewebe (skull-stripping) sowohl in den fMRT-Scans als auch den T2-gewichteten Anatomiereferenzbildern. Danach konnten die fMRT-Bilder zu deren jeweiligen Anatomiereferenzbild automatisch koregistriert werden. Anhand der T2-gewichteten Bilder wurden alle Parameter für eine räumliche Normalisierung auf die Orientierung des Paxinos Rattenhirnatlasses berechnet und auf die fMRT-Scans angewendet. Nachdem ein multiples lineares Regressionsmodell verwendet wurde, konnten die Daten schlussendlich mit einem Gauß'schem Kern mit einer Auflösung von 1,5 x 1,5 x 1,5 mm³ geglättet werden.

3.2.4.3 Datenanalyse fMRT

Damit die funktionellen RS-Konnektivitäten ausgewertet werden konnten, wurden 52 Hirnregionen des Schiffer Rattenhirnatlas¹⁴⁶ mit den Ursprungskordinaten des Paxinos Rattenhirnatlas verwendet¹⁴⁸. Alle Regionen, die für die Analyse verwendet wurden, sind zusammen mit der jeweiligen Abkürzung und den Volumina in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Alle Hirnregionen aus dem Schiffer Rattenhirnatlas, die für die Analyse der fMRT-Daten verwendet wurden inklusive der dazugehörigen Volumina und Abkürzungen

Hirnregion (VOI)	VOI Volumen [mm ³]	Abkürzung
<i>Nucleus Accumbens</i>	7,94	NAc
<i>Amygdala</i>	21,12	Amyg
<i>Caudate Putamen (Straitum)</i>	43,55	CPu
<i>Auditorischer Cortex</i>	27,52	Au
<i>Gyrus Cinguli</i>	14,48	Cg
<i>Entorhinaler Cortex</i>	59,02	Ent
<i>Cortex Insularis</i>	21,13	Ins
<i>Medialer präfrontaler Cortex</i>	6,30	mPFC
<i>Motor Cortex</i>	32,61	M1
<i>Orbitofrontaler Cortex</i>	18,94	OFC
<i>Lobus Parietalis</i>	7,63	PaC
<i>Retrosplenualer Cortex</i>	18,92	RS
<i>Somatosensorischer Cortex</i>	71,60	S1
<i>Visueller Cortex</i>	36,14	V1
<i>Hippocampus antero dorsal</i>	25,06	CA1
<i>Hippocampus posterior</i>	9,78	CA1-p
<i>Hypothalamus</i>	18,35	Hyp
<i>Olfaktorischer Cortex</i>	14,01	OC
<i>Colliculus Superior</i>	7,14	SC

<i>Mittelhirn</i>	11,45	MB
<i>Area tegmentalis ventralis</i>	5,53	VTA
<i>Cerebellum graue Substanz</i>	74,98	CG
<i>Cerebellum weiÙe Substanz</i>	23,44	CW
<i>Colliculus inferior</i>	5,74	IC
<i>Thalamus</i>	30,71	Th
<i>Periaquäduktales Grau</i>	9,90	PAG
<i>Septum</i>	9,36	Sep

Von den RS-fMRT-Daten wurde der zeitliche Verlauf von allen Regionen mit der SPM 12 Toolbox *Marseille Boîte À Région d'Intérêt* (MarsBaR) ¹⁵⁰ extrahiert. Davon wurden dann für jeden Datensatz paarweise Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) über einen hausinternen MATLAB-Algorithmus mit folgender Formel (Gleichung [6]) für insgesamt 2704 Korrelationen errechnet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (u_i - \bar{u})(x_i - \bar{x})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (u_i - \bar{u})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad [6]$$

Dabei stellt n die Anzahl der Werte des zeitlichen Verlaufs, u_i und x_i jeweils die einzelnen Werte und \bar{u} und \bar{x} den arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Werte dar. Zusammen ergaben diese eine Korrelationsmatrix mit 52 x 52 Elementen. Die 52 Selbstkorrelationen wurden auf null gesetzt, womit 2652 errechnete Korrelationskoeffizienten blieben. Die errechneten Pearson-Korrelationskoeffizienten wurden mittels der Fischer-Transformation in z-Werte umgewandelt. Um mögliche Unterschiede in den RS-Konnektivitäten zwischen der Ambroxol- und der Kontrollgruppe zu untersuchen, wurden Netzwerke zunächst im gesamten Gehirn (mit allen 52 Hirnregionen) und dann für eine genauere Untersuchung erneut im motorischen Netzwerk (*motorischer Cortex*, *Thalamus*, *somatosensorischer Cortex*, *Striatum*) berechnet. Dabei wurde die Netzwerkstärke als die Summe der Stärken aller Korrelationen zwischen Regionen definiert, die zu einem Netzwerk gehörten ¹⁵¹.

Die Korrelationen wurden in sogenannten Korrelationsmatrizen dargestellt. Beispielhaft ist in Abbildung 21 eine solche Korrelationsmatrize dargestellt.

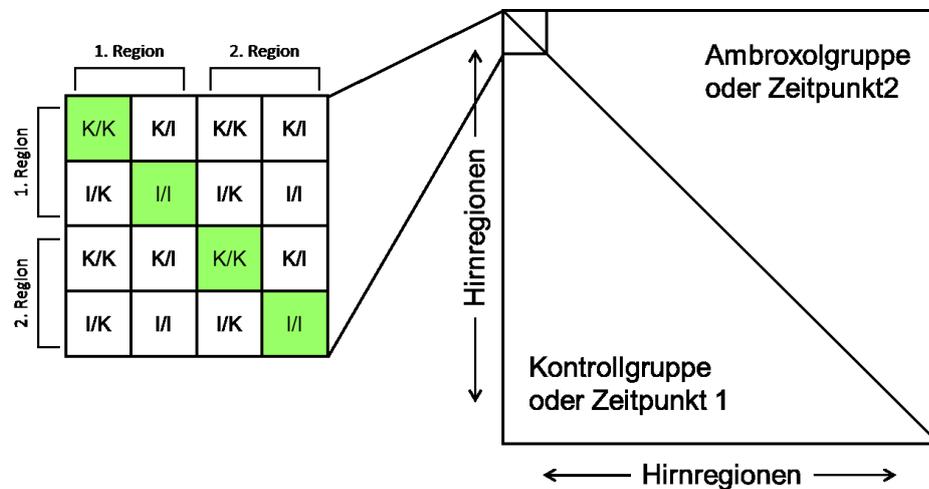


Abbildung 21: Schematische Darstellung der fMRT-Ergebnisse. Die Grafik stellt schematisch die fMRT-Matrizen dar. Entlang der x- und y-Achse sind jeweils die Hirnregionen (Tabelle 4) angegeben. Jedes Viereck in der Matrix stellt einen Korrelationswert dar, der angibt, wie gut die jeweilige Hirnregion einer Hemisphäre mit einer anderen Hirnregion einer Hemisphäre korreliert. Entlang beider Achsen sind immer zuerst die kontralaterale (K) und dann die ipsilaterale (I) Hemisphären pro Hirnregion dargestellt. Selbstkorrelationen (z. B. K/K 1. Hirnregion) wurden auf null gesetzt (grün). Die Diagonale bildet die Grenze zwischen den untersuchten Korrelationen (Gruppe oder Zeitpunkt). Im unteren Dreieck befinden sich die Korrelationen der Kontrollgruppe oder die Korrelationen von Zeitpunkt 1 und im oberen Dreieck die Korrelationen der Ambroxolgruppe oder die Korrelationen von Zeitpunkt 2. Ist die Korrelation zwischen zwei Hirnregionen signifikant höher ($p < 0,05$) als in der anderen Gruppe, ist dies mit einem Signifikanzsternchen in der höher korrelierenden Gruppe gekennzeichnet.

Es wurden entweder die Korrelationen zwischen den beiden Gruppen (Kontrolle und Ambroxol) oder zwischen den drei Zeitpunkten (Baseline, 24 h und 1 Monat) untersucht. Für die Korrelationen zwischen den Gruppen sind in den Korrelationsmatrizen die Kontrollgruppe im unteren und die Ambroxolgruppe im oberen Dreieck dargestellt. Für die Korrelation zwischen den Zeitpunkten sind im unteren Dreieck die Korrelationsmatrizen des zuerst genannten Zeitpunkts und im oberen Dreieck die Korrelationsmatrizen des zweit genannten Zeitpunkts dargestellt.

3.2.5 Verhaltensversuche

Zur Validierung der qualitativen Verbesserung des Verhaltens über die Zeit wurden Verhaltensversuche an insgesamt 48 Tieren durchgeführt. Alle Versuche wurden morgens oder vormittags immer vor der MRT-Messung, Therapie- und Schmerzmittelgabe durchgeführt, damit die Tiere in ihrem Verhalten durch die Narkose nicht beeinflusst wurden. Die Versuche wurden nur an den Tagen durchgeführt, an denen ebenfalls MRT-Messungen stattfanden. Wenn nötig wurden die Tiere für die Versuche vor der Baseline-Messung trainiert.

3.2.5.1 Beam Walk Test

Mit Hilfe des Beam Walk Tests konnte die Motorik und Koordination der Tiere überprüft werden. Dafür mussten die Tiere über einen 1,7 cm breiten Balken balancieren. Dieser war 60 cm lang und 40 cm hoch. Als motivierender Anreiz wurde am Ende des Balkens ein Makrolokäfig mit Einstreu, einem Häuschen und Futter aufgestellt. Dabei wurde das Häuschen so platziert, dass die Tiere ohne Probleme vom Balken auf das Häuschen und damit in den Käfig gelangen konnten (Abbildung 22).

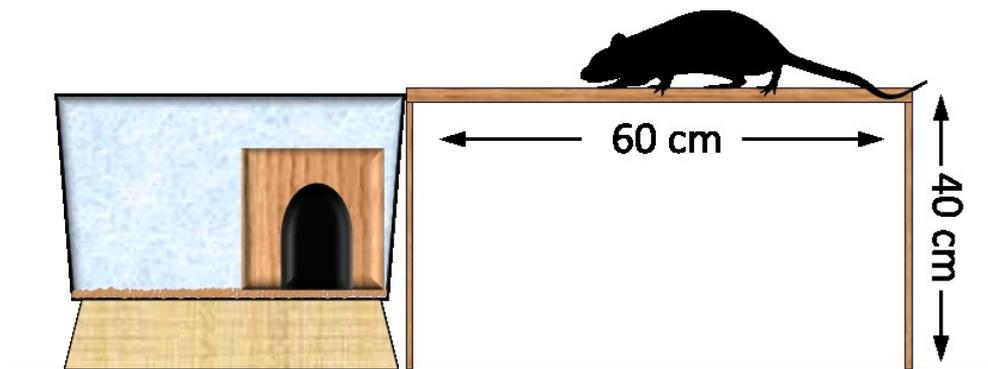


Abbildung 22: Beam Walk Test. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Tiere mussten einen 40 cm hohen, 1,7 cm breiten und 60 cm langen Balken fünf Mal jeweils innerhalb eine Minute überqueren. Am Ende des Balkens war als Motivation ein Käfig mit einem Häuschen so platziert, dass die Tiere diesen problemlos erreichen konnten.

Um diesen Test durchführen zu können, mussten die Tiere vor der Baseline-Messung vier Tage lang trainiert werden. Damit sich bei den Tieren keine Gewöhnung an den Test einstellte, lagen die Trainingstage nicht direkt hintereinander. Vor dem ersten Trainingsdurchlauf wurden die Tiere an den Beam Walk gewöhnt, indem sie zwei Mal auf das Ende des Balkens gesetzt wurden, sodass sie ohne Probleme den Käfig finden konnten. Danach konnte der erste Trainingsdurchlauf beginnen. Die Tiere wurden an den Balken gehalten und es wurde gewartet, bis sie den Balken freiwillig überquerten. Der Balken musste pro Tier fünf Mal hintereinander überquert werden. Nach jedem Durchgang konnten die Tiere im Käfig eine kurze Pause machen (30 Sekunden, 20 Sekunden und 2 x 10 Sekunden). Nach den fünf Durchläufen wurden die Tiere in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt und der Balken mit Desinfektionsmittel (DESCOSEPT, Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland) gereinigt. Die Durchläufe an den folgenden Trainingstagen verliefen gleich. Mit dem fünften Durchlauf startete der Versuch (Baseline). Ab jetzt wurden alle Durchläufe für alle Zeitpunkte auf Video aufgezeichnet. Ein Durchlauf startete, wenn alle vier Pfoten der Ratte auf dem Balken waren und endete, wenn alle vier Pfoten wieder vom Balken unten waren. Pro Durchgang hatten die Tiere eine Minute Zeit, den Balken zu überqueren. Schaffte das Tier dies nicht, wurde der Durchgang

abgebrochen und das Tier in den am Ende stehenden Käfig gesetzt. Jeder Test pro Zeitpunkt bestand aus 5 Durchgängen. Zwischen jedem Durchgang hatten die Tiere eine kurze Pause im Käfig (30 Sekunden, 20 Sekunden und 2 x 10 Sekunden). Fiel ein Tier während eines Durchgangs vom Balken, war der Durchgang beendet und das Tier wurde in den am Ende stehenden Käfig gesetzt.

Ausgewertet wurde dieser Versuch mit einem Punktesystem (Score), das sich wie folgt zusammensetzte: 0 = keinerlei Fehlritte, 1 = maximal zwei Fehlritte, 2 = maximal fünf Fehlritte, 3 = war maximal einmal vom Balken gerutscht und konnte sich aber wieder hochziehen oder hatte maximal 10 Fehlritte, 4 = war mehrmals vom Balken gerutscht und konnte sich aber jedes Mal wieder hochziehen oder hatte maximal 20 Fehlritte, 5 = konnte nicht laufen und den Balken innerhalb einer Minute überqueren, blieb aber auf dem Balken, 6 = Tier fiel runter (angelehnt an Miyanishi *et al.*¹⁵², Chen *et al.*¹⁵³ und Au *et al.*¹⁵⁴). Als Fehltritt wurden Schritte von Vorder- oder Hinterpfote bewertet, die nicht auf den 1,7 cm breiten Balken gesetzt wurden oder von dort abrutschten. Durchgänge, bei denen die Tiere den Balken aus Interessenlosigkeit nicht oder nicht fertig überqueren, wurden aus der Analyse herausgenommen. Dazu zählten die Durchläufe aller Tiere, die während eines vorherigen oder späteren Durchlaufs in der Lage waren, den Balken zu überqueren, aber nun ohne ersichtlichen Grund auf dem Balken verweilten, bis die Zeit abgelaufen war. Für jedes Tier wurde anhand der fünf Durchgänge ein Mittelwert für den Score pro Zeitpunkt sowie die erfolgreichen Überquerungen ermittelt. Nachdem ein Tier den Test vollendet hatte, wurde der Balken mit Descosept gereinigt und das Tier zurück in seinen Heimatkäfig gesetzt.

3.2.5.2 Open Field Test

Das Explorationsverhalten der Tiere wurde mittels des Open Field Testes analysiert. Dafür wurden die Tiere in eine quadratische Arena (47 cm x 47 cm) gesetzt, die 26 cm hohe Plexiglaswände hatte (Abbildung 23).

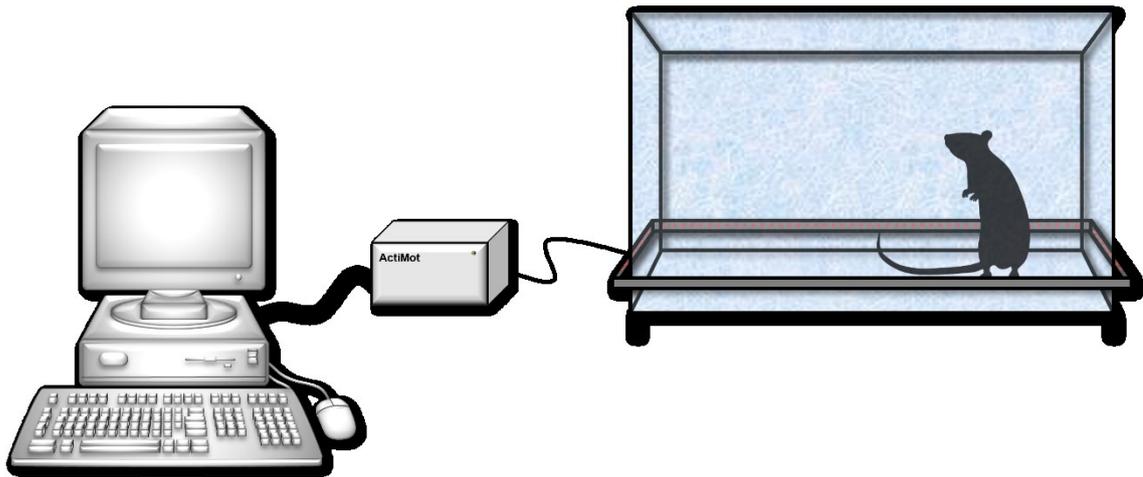


Abbildung 23: Open Field Test. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Tiere befanden sich in einer quadratischen Arena (47 cm x 47 cm x 26 cm) in der über Lichtsensoren die Bewegungen über eine Zeit von 10 Minuten dokumentiert wurden. Eine kleine Empfängerbox übermittelte die Daten an den Computer. Teile der Abbildung wurden mit Hilfe von Bildern aus Servier Medical Art erstellt ¹⁴¹.

Um die Tiere am Rausklettern zu hindern, wurde ein Plexiglasdeckel mit kleinen Löchern oben aufgelegt. Ein Metallrahmen mit Lichtsensoren war über ein Kabel mit einer Empfängerbox (PROCESS CONTROL ActiMot 302020, TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg von der Höhe, Deutschland) verbunden, die über einen Computer gesteuert wurde. Mittels der Lichtsensoren und des Computerprogramms ActiMod (TSE Technical & Scientific Equipment GmbH) konnte der genaue Aufenthaltsort der Tiere über die Versuchszeit dokumentiert werden. Die Messung startete mit einer 1-minütigen Habituationszeit, gefolgt von einer 10-minütigen Aufnahmezeit. Nach der Messung wurden die Tiere zurück in ihre Heimatkäfige gesetzt und die Arena mit Descosept gereinigt. In diesem Versuch wurde die zurückgelegte Distanz analysiert.

3.2.5.3 Sticky Label Test

Mittels des Sticky Label Tests wurden die sensorischen und koordinativen Fähigkeiten der Tiere untersucht. Der Test wurde mit einer Videokamera aufgenommen. Zur Durchführung des Testes wurde den Tieren ein Stück schwarz markiertes Klebeband (3M Transpore™ Kunststoffpflaster, 1527-1, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) mit den Maßen 1,2 cm x 1,2 cm auf die Vorderpfoten geklebt. Die Tiere wurden dann in eine Arena (47 cm x 47 cm) mit 26 cm hohen Plexiglaswänden gesetzt (Abbildung 24).

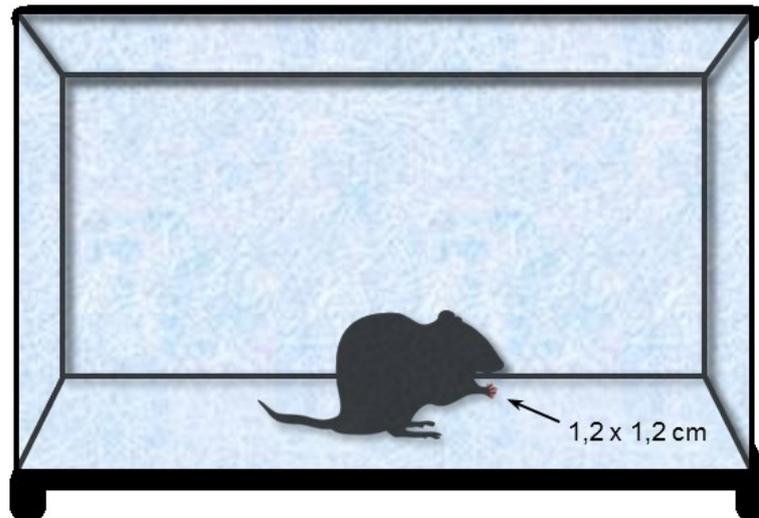


Abbildung 24: Sticky Label Test. Schematische Darstellung des Versuchsaufbau. Den Tieren wurde ein Stück Klebeband (rotes Quadrat) an die Vorpoten geklebt. Sie wurden dann in eine quadratische Arena (47 cm x 47 cm x 26 cm) gesetzt. Die Tiere hatten maximal zwei Minuten Zeit, das Klebeband zu entfernen.

Das natürliche Verhalten der Tiere bedingte eine sofortige Entfernung des Klebebands von den Pfoten. Bei diesem Versuch wurde die Zeit ermittelt, wie lange die Tiere benötigten, um das Klebeband zu entfernen. War es den Tieren nicht möglich, das Klebeband innerhalb von zwei Minuten zu entfernen, wurde der Versuch abgebrochen und als nicht erfolgreich gewertet, beziehungsweise die maximale Zeit protokolliert. Tiere, die zu keinem Zeitpunkt in der Lage waren, das Tape zu entfernen (weder während der Baseline noch zu einem späteren Zeitpunkt), wurden aus der Auswertung dieses Versuches ausgeschlossen ($n = 3$). Nach der Messung wurden die Tiere zurück in ihre Heimatkäfige gesetzt und die Arena mit Descosept gereinigt.

3.2.5.4 Grip Test

Mittels des Grip-Tests sollte die Griffstärke der Tiere an den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt werden. Hierfür wurde ein Griffstärke-Testgerät (BIO-GS3, Bioseb, Vitrolles, Frankreich) verwendet. Für die Durchführung des Testes wurden die Tiere mit allen Pfoten auf das Gitter gesetzt und dann mit gleichbleibender Kraft vom Gitter weggezogen. Sobald die Tiere das Gitter losließen, wurde die Messung von dem Gerät automatisch gestoppt. Es wurde die maximale Kraft der Tiere gemessen. Dieser Versuch wurde fünf Mal pro Zeitpunkt und pro Tier hintereinander wiederholt und der Mittelwert errechnet. Aus diesen Werten wurde dann die prozentuale Verbesserung ausgerechnet, wobei der Baseline-Wert als Referenzwert angenommen wurde. Nach der Messung wurden die Tiere zurück in ihre Heimatkäfige gesetzt und das Gitter mit Descosept gereinigt.

3.2.6 Ambroxol- und Kontrollbehandlung

Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Tiere entweder das Therapeutikum oder eine der beiden Kontrolllösungen. Als Therapie wurde Ambroxolhydrochlorid (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland) verwendet. Um das Pulver zu lösen, wurde zunächst 0,9%ige Natriumchloridlösung (NaCl, Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland GmbH) und Polyethylenglykol 400 (PEG 400; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit einem Anteil von je 50% gemischt. Das Mischverhältnis wurde so angesetzt, dass ein etwa 350 g schweres Tier ein Injektionsvolumen von 2100 μ l erhielt, womit das von der GV-SOLAS vorgeschriebene Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht (KGW) nicht überschritten wurde. Die zu injizierende therapeutische Menge vom Ambroxol betrug pro Tag und pro Tier 90 mg/kg KGW, wobei die Menge auf zwei Injektionen pro Tag aufgeteilt wurde, sodass die Tiere pro Injektion 45 mg/kg KGW Ambroxol erhielten. Die NaCl-Gruppe erhielt als Kontrollgruppe bei jeder Injektion reines 0,9%iges NaCl. Die Vehikelgruppe erhielt als zweite Kontrollgruppe die angesetzte Lösung aus 50% NaCl und 50% PEG 400. Direkt nach der Operation wurde mit der ersten Behandlung gestartet und bis maximal 1 Woche nach Schlaganfallinduktion aufrechterhalten. Die Tiere wurden zweimal täglich sowohl morgens als auch abends mit einem zeitlichen Mindestabstand von sechs Stunden behandelt. Alle Injektionen erfolgten i.p.. Für die Injektion wurden die Tiere kurz in einer beheizten Narkosebox unter 2 – 5% Isofluran narkotisiert. Die Applikation selbst erfolgte unter einer 1,5 – 2,0%igen Isofluran-Narkose. In den ersten Tagen nach der Operation wurde im Zusammenhang mit der Therapie- und Kontrollbehandlung gleichzeitig das Carprofen (5 mg/kg) verabreicht. Fand eine Behandlung am Tag einer Messung statt, wurden die Tiere nach den Verhaltensversuchen injiziert, um einen Einfluss der Behandlung oder Narkose auf das Verhalten zu verhindern

3.2.7 Statistische Analyse

Für diesen Versuchsteil wurde eine zweiseitige ANOVA mit einer Fishers LSD Korrektur als nachträglicher Post-hoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich durchgeführt. Die Ergebnisse wurden im gängigen Format mit df, F-Wert und p-Wert dargestellt und sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Die t-Test-Karten für die FA-Karten Analyse wurden anhand von einem Voxel-für-Voxel Vergleich berechnet. Zur Analyse der funktionalen Netzwerke wurden normale t-Tests zwischen zwei Gruppen und eine zweiseitige ANOVA zwischen drei Zeitpunkten verwendet. Die Mehrfachvergleiche wurden mit einer *false discovery rate correction* (FDR-Korrektur) nach Benjamini-Hochberg korrigiert ¹⁵⁵. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe von MATLAB berechnet. Ein p-Wert von

<0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Alle Grafiken wurden in GraphPad Prism 8 erstellt.

3.2.8 Histologie

Um histologische Schnitte anfertigen zu können, wurden die Gehirne der Ratten in Kryoeinbettkassetten (29 x 20 x 12 mm) mit Tissue-Tek (Thermo Fischer Scientific) bei -20°C eingebettet. Nachdem das komplette Gehirn gefroren war, wurden sie mit einem Leica Kyostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH) in 5, 10 und 20 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträgern (SuperFrost®, R. Langenbrinck GmbH) aufgenommen. Eine Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung wurden in Kooperation mit der Abteilung Dermatologie des Universitätsklinikums Tübingen von den 10 und 20 µm dicken Schnitten angefertigt. Dort wurden die Schnitte zunächst für je fünf Minuten in Formalin und destilliertem Wasser fixiert und dann mittels eines etablierten Färbeprotokolls automatisch gefärbt.

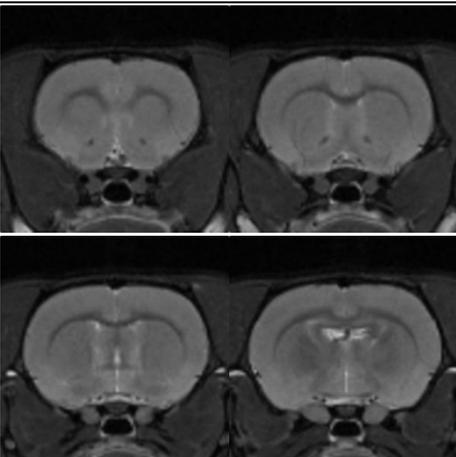
Immunhistochemische (IHC) Färbungen wurden in Kooperation mit der Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie am Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt. Die histologische Analyse wurde in je einem Tier pro Gruppe zum letzten Zeitpunkt (1 Monat) in 5 µm dicken Gefrierschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden entweder 30 min (für Caspase 3 IHC) oder über Nacht (für H&E und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) IHC) in 4%igem Formalin fixiert. Zur Kontrolle wurden die Schnitte beider Gehirne ebenfalls mit H&E gefärbt. Die IHC wurde auf einem automatischen Immunostainer (Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, USA) durchgeführt. Die Gehirne wurden mit den Antikörpern für die Proteine GFAP (6F2, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und gespaltener Caspase 3 (ASP 175; Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland) gefärbt. Positiv- und Negativkontrollen bestätigten dabei jeweils eine erfolgreiche Färbung.

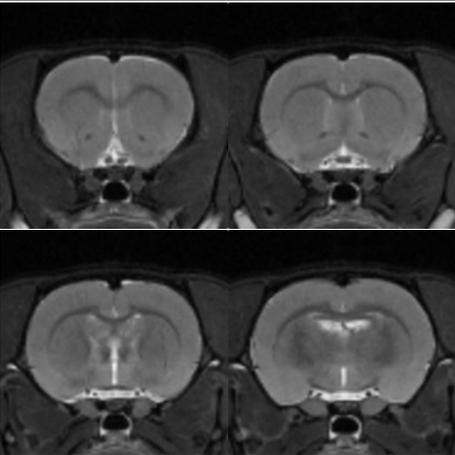
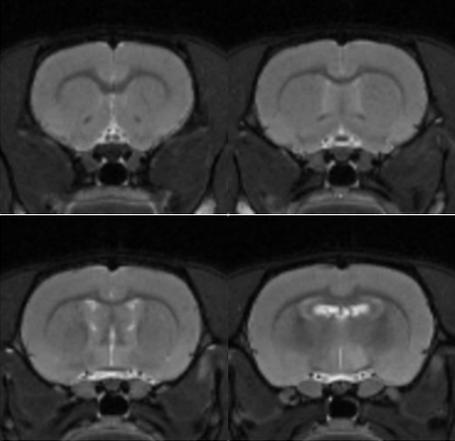
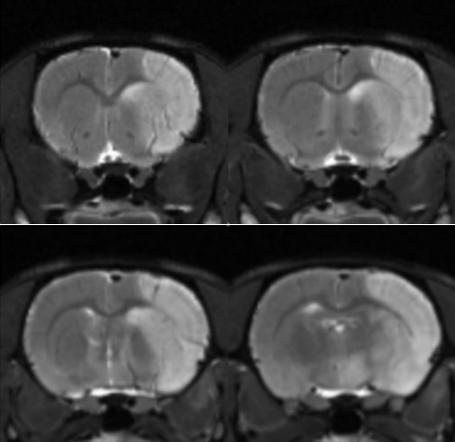
Alle fertigen Histologieschnitte wurden mit Hilfe des NanoZoomers (2.0-HT Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan; 40x Vergrößerung) digitalisiert. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit den Programmen CaseViewer (Version 2.2, 3DHISTECH, Budapest, Ungarn) und Adobe Photoshop CS6 (Version 13.0.1, Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) bearbeitet. Zur Evaluierung der finalen Volumengrößen wurden in allen verfügbaren H&E-Hirnschnitten (Kontrollgruppe: n = 7; Ambroxolgruppe: n = 4) ROIs mit Hilfe der frei zugänglichen Software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)¹⁵⁶ um den Schlaganfall gezeichnet und ein Mittelwert pro Tier errechnet.

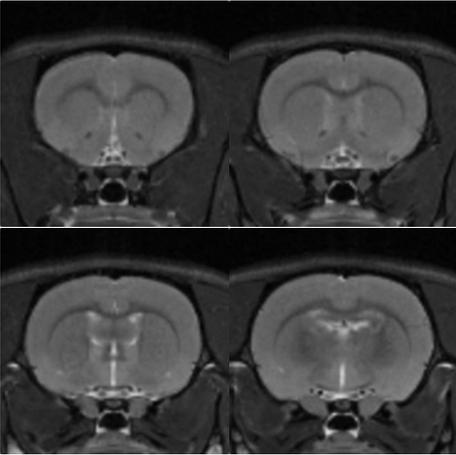
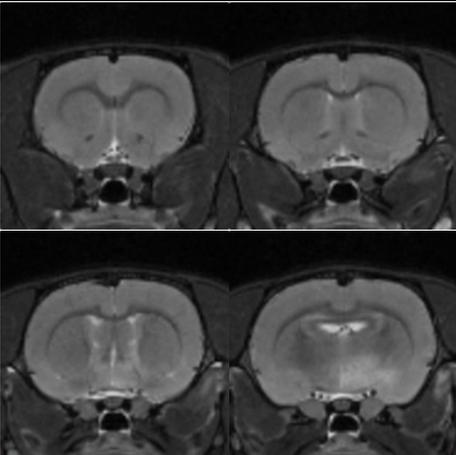
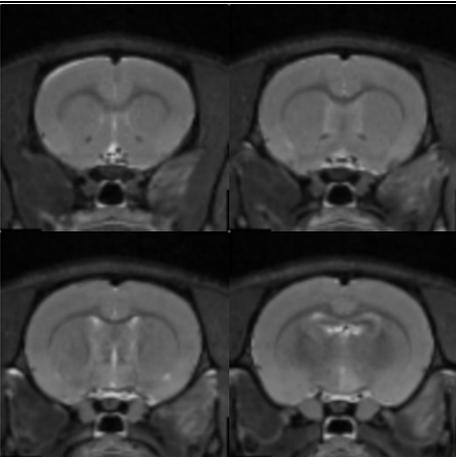
3.2.9 Ausschluss von Daten

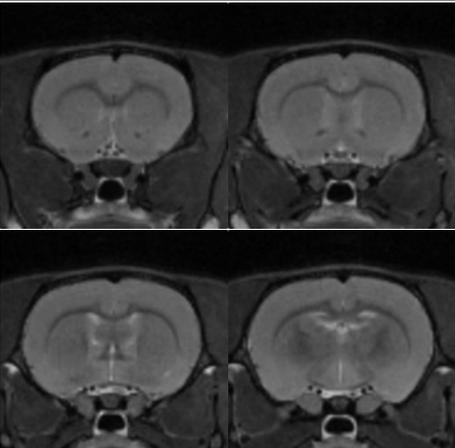
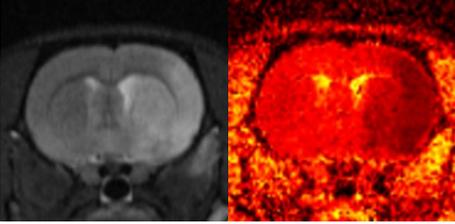
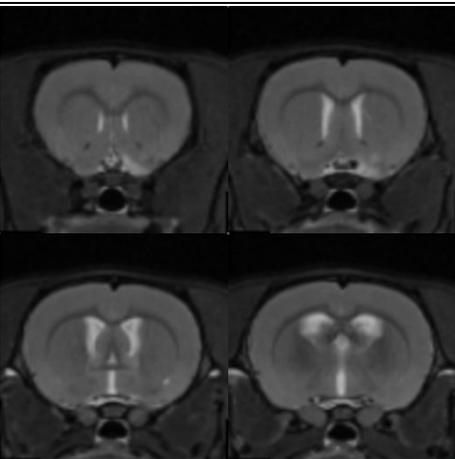
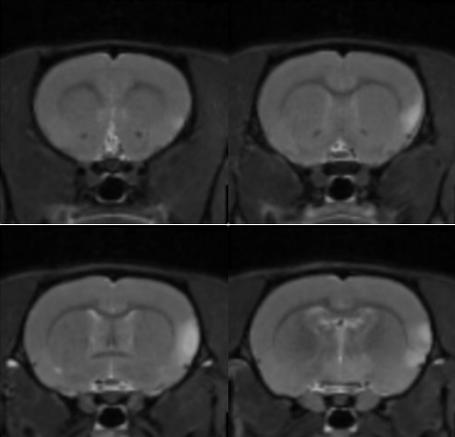
Einige Tiere (n = 27) konnten aus verschiedenen Gründen nicht mit in die Auswertung mit aufgenommen werden. 12 Tiere starben entweder während oder kurz nach der Operation. Vier Tiere wurden in ihren Behandlungsgruppen vertauscht und zwei Tiere hatten entweder keinen oder einen zu kleinen Schlaganfall. Bei sieben Tieren war der Schlaganfall in der falschen Hirnregion lokalisiert, da dieser weder im *Striatum* noch im *Striatum* und im *Cortex* war. Das *Striatum* stellte bei einer MCA-Okklusion den Kern der Schlaganfallregion dar ¹⁵⁷, daher wurde die Okklusion bei diesen sieben Tieren als nicht erfolgreiche MCA-Okklusion gewertet. Bei einem Tier war die Qualität der MRT-Bilder schlecht, so dass diese nicht ausgewertet werden konnten. Bei einem weiteren Tier verblieb beim Entfernen des Filaments die Nylonspitze des Filaments in der Arterie und konnte nicht entfernt werden. Da eine erneute Okklusion durch diesen Fremdkörper nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde dieses Tier ebenfalls komplett aus der Auswertung herausgenommen. Für einen besseren Überblick wurden alle wichtigen Informationen, die zum Ausschluss der Tiere geführt hatten, inklusive der dazugehörigen MRT-Bildern sowie die Gruppenzugehörigkeit in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5: Auflistung aller Tiere, die für den Ambroxol Versuchsteil nicht mit in die Analyse eingegangen sind

Tier Nr.	MRT Bilder	Gruppe	Begründung
082	-	-	Tier verstarb während der Operation
083		NaCl	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion Kein Schlaganfall

084		Ambroxol	Keine erfolgreiche MCA-Oklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region
089	-	-	Tier verstarb während der Operation
094	-	-	Tier wurde aus Analyse entfernt, da das Nylon-Filamentspitze in Arterie verblieben war
096	-	-	Tier verstarb während der Operation
098	-	-	Tier verstarb während der Operation
099	-	-	Tier verstarb während der Operation
100		Vehikel	Keine erfolgreiche MCA-Oklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region
101		Ambroxol	Tier verstarb während der 24h Messung.

103		NaCl	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion Kein Schlaganfall
104		NaCl	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region
105		Vehikel	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region
106	-	-	Tier verstarb während der Operation
107	-	Ambroxol	Tier wurde aus der Analyse entfernt, da es zur Verwechslung der Therapiegruppe kam
108	-	-	Tier verstarb während der Operation
109	-	Vehikel	Tier wurde aus der Analyse entfernt, da es zur Verwechslung der Therapiegruppe kam

117		NaCl	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region
139	-	-	Tier verstarb während der Operation
143		NaCl	Tier wurde aufgrund schlechter Bildqualität der T2- und ADC-Sequenzen aus Analyse genommen (Werte nur halb so groß)
167	-	-	Tier verstarb während der Operation
169	-	-	Tier verstarb während der Operation
175		NaCl	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region
176		NaCl	Keine erfolgreiche MCA-Okklusion. Schlaganfall war nicht in der MCAO-Region, hier nur im <i>Cortex</i> und nicht auch im <i>Striatum</i>

177	-	Ambroxol	Tier wurde aus der Analyse entfernt, da es zur Verwechslung der Therapiegruppe kam
178	-	Ambroxol	Tier wurde aus der Analyse entfernt, da es zur Verwechslung der Therapiegruppe kam
179	-	-	Tier verstarb während der Operation

4 Ergebnisse

4.1 EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfällen

Um zu untersuchen, ob der radioaktive Tracer [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO spezifisch an den EPOR in Schlaganfallregionen bindet, wurden zunächst *in vivo* Blockierungsversuche an Ratten durchgeführt. Um auszuschließen, dass sich das radioaktive Isotop vom EPO-Konstrukt getrennt hatte, wurde außerdem die Stabilität des Tracers im Rattenserum untersucht.

4.1.1 *In vivo* Blockierungsversuche

Zur Bestimmung der spezifischen Bindung des Tracers an den EPOR im Schlaganfallbereich, wurde den Ratten [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO injiziert und die Differenz aus der totalen Bindung und der nicht-spezifischen Bindung bestimmt. Zur Analyse wurde eine zweifache ANOVA verwendet, deren Ergebnisse in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Die Bindung des injizierten Tracers ist in Abbildung 25 dargestellt. Auffällig war hierbei, dass die Werte sehr niedrig waren. Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen, deren Daten bisher nicht veröffentlicht wurden, waren alle Werte um mehr als den Faktor 10 niedriger. In den vorliegenden Daten lag der höchste gemessene Wert für ein Tier aus der Blockierungsgruppe bei 0,046% ID/cm³ in der ipsilateralen Hemisphäre. Insgesamt konnte für alle Gruppen die größte Bindung des Tracers zum ersten Messzeitpunkt (6 h) festgestellt werden, wobei der Median in den Hemisphären (Abbildung 25 A) stets höher war als in den Schlaganfallregionen (Abbildung 25 B). Allerdings wiesen die Daten zu keinem Zeitpunkt ein Blockierungseffekt innerhalb der Schlaganfallregion auf. Der einzige signifikante Gruppeneffekt ($p = 0,017$) wurde in den Hemisphären zum 48 h Zeitpunkt gemessen (Tabelle 6). Hier war die Bindung des Tracers in der kontralateralen Hemisphäre der Schlaganfall-Gruppe höher als in der kontralateralen Hemisphäre der Blockierungsgruppe ($p = 0,05$). Darüber hinaus konnten höhere Bindungswerte des Tracers in der ipsilateralen Hemisphäre der Schlaganfall-Gruppe als in der ipsilateralen Hemisphäre der Schein-OP-Gruppe gemessen werden ($p = 0,04$).

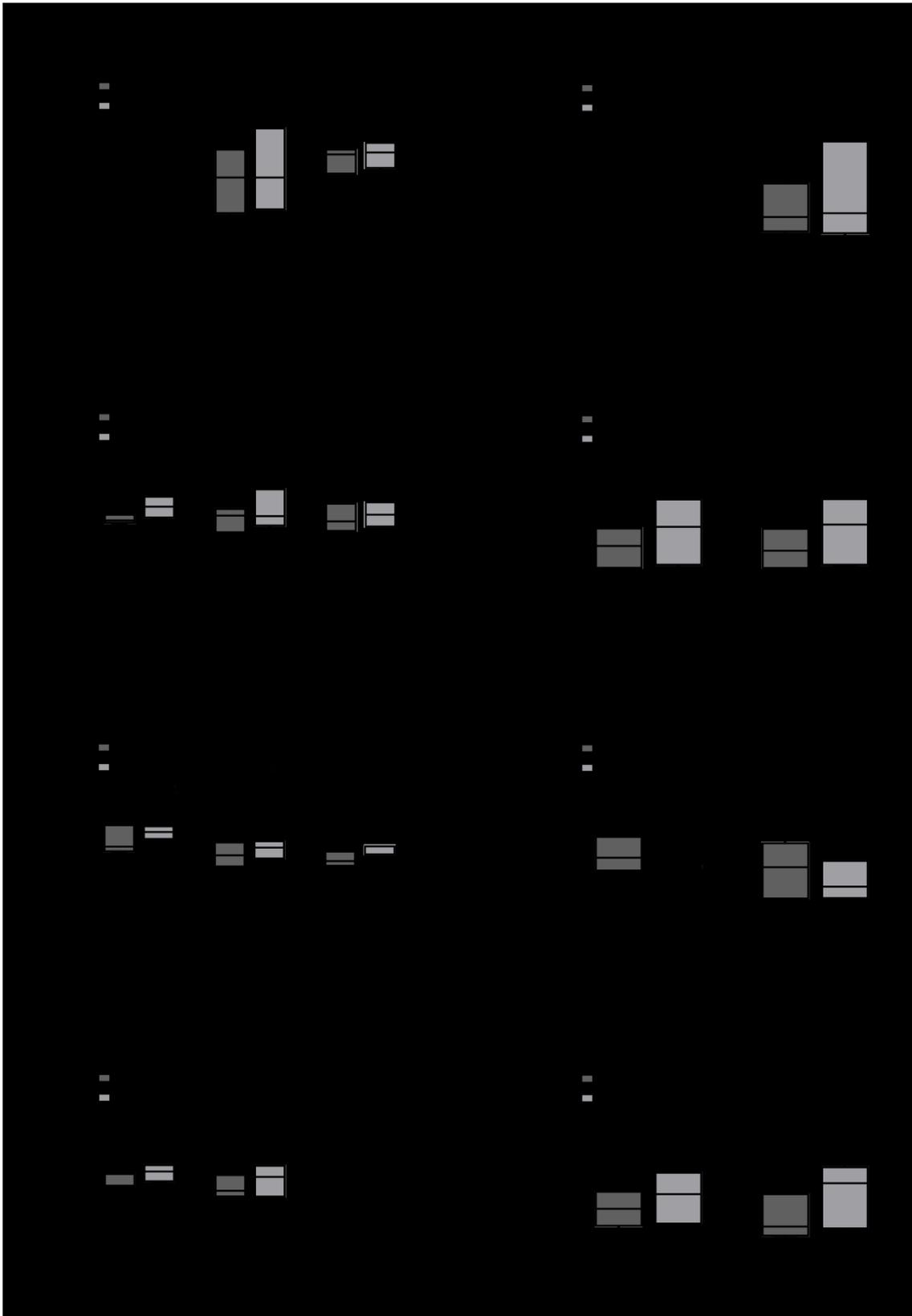


Abbildung 25: Ergebnisse für *in vivo* Blockierungsversuch. Die Grafiken zeigen die Ergebnisse des *in vivo* Blockierungsversuchs über die Zeit. (A) Dargestellt ist die Prozent injizierte Dosis pro cm³ (% ID/cm³) des Tracers [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO für alle drei Gruppen in beiden Hemisphären. (B) Dargestellt ist die % ID/cm³ des Tracers [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO in der Schlaganfallregion und in der gespiegelten Region auf der kontralateralen Hemisphäre. Die Anzahl der ausgewerteten Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten, den Median (zentrale Linie) sowie das obere und untere Quartil. Die Whisker stellen den maximalen und minimalen Wert dar. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: **: p<0,05.

Aufgrund der geringen Tracerbindung im Gehirn wurde das Narbengewebe am Hals der MACO-Operation genauer untersucht, da EPOR nicht nur in an Hypoxie leidendem Gewebe zu finden sind, sondern auch im Zusammenhang mit geschädigter Skelettmuskulatur gefunden wurden^{51,52}. Die Bindung des Tracers war im Narbengewebe deutlich höher als im Gehirn, doch es konnte auch hier kein signifikanter Gruppeneffekt festgestellt werden ($p = 0,41$; Abbildung 26). Die Ergebnisse der zweifachen ANOVA sind in Tabelle 6 aufgelistet. Wie auch im Gehirn war die Bindung des Tracers im Narbengewebe nach 6 h am höchsten und nahm über die Zeit ab.

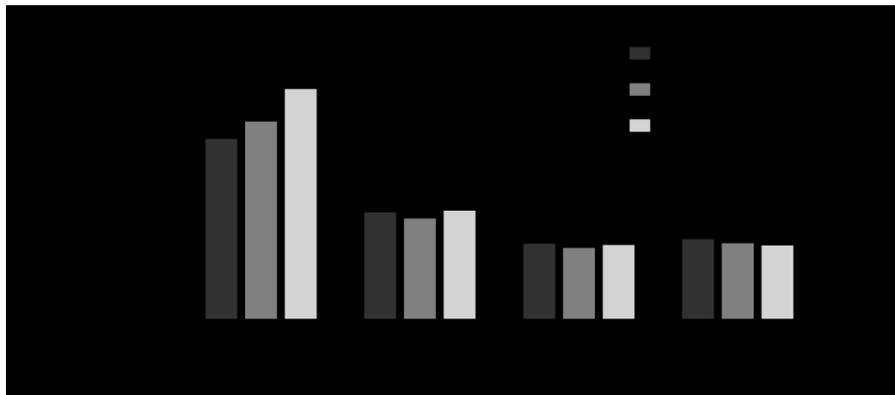


Abbildung 26: Ergebnisse für *in vivo* Blockierungsversuch am Narbengewebe. Dargestellt ist die Prozent injizierte Dosis pro cm^3 (% ID/ cm^3) des Tracers ^{89}Zr Zr-DFO-EPO für alle drei Gruppen im Narbengewebe über die Zeit. Die Anzahl der ausgewerteten Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Jeder Balken zeigt den Median und die Whisker stellen die Reichweite der Daten dar.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Biodistribution dargestellt. Mit einer einfachen ANOVA wurde für kein untersuchtes Gewebe ein Gruppeneffekt gefunden (Tabelle 6). Zwar zeigten die Nieren mit einem Mittelwert von $7,22 \pm 5,30\%$ ID/g für die Schlaganfallgruppe, $6,89 \pm 5,72\%$ ID/g für die Blockierungsgruppe und $7,63 \pm 5,09\%$ ID/g für die Schein-OP-Gruppe den höchsten Wert, allerdings lagen auch die Biodistributionswerte in den vorangegangenen Versuchen deutlich höher. In keinem Organ konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Außerdem war es mit Hilfe der Autoradiographie nicht möglich eine Tracerbindung im Gehirn zu detektieren.

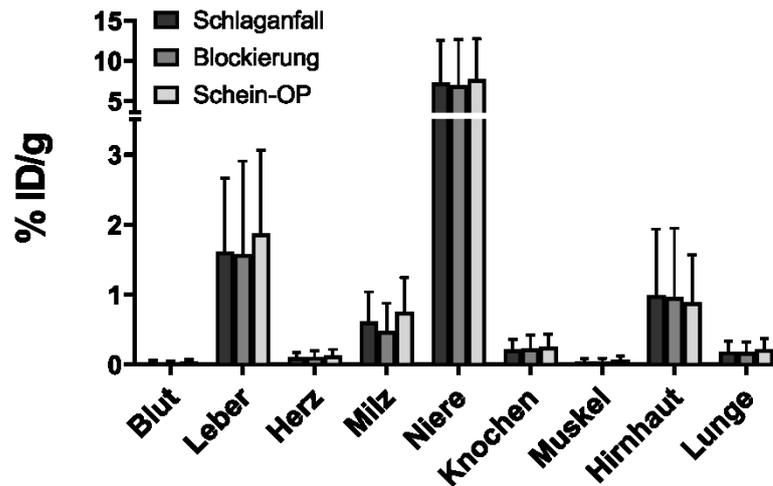


Abbildung 27: Ergebnisse der Biosdistribution des *in vivo* Blockierungsversuchs. Die Grafik zeigt in Prozent die injizierte Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) des Tracers $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ für alle drei Gruppen in den unterschiedlichen Geweben zum letzten Zeitpunkt (72 h). Die Anzahl der ausgewerteten Tiere für jedes Organ und jede Gruppe kann aus Tabelle 2 in der letzten Zeile entnommen werden. Jeder Balken zeigt den Mittelwert der Daten an. Die Whisker stellen die Standardabweichung dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in keinem der untersuchten Gewebe ein Blockierungseffekt gezeigt werden konnte. Zudem wurde festgestellt, dass die Bindung des Tracers sowohl in den Organen als auch im Gehirn sehr gering war. Möglicherweise konnte im Gehirn nur unspezifisches Rauschen detektiert werden.

4.1.2 Stabilitätstest von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ in murinem Serum

Da die gemessene Aktivität so gering war, musste ausgeschlossen werden, dass sich das Isotop vom Tracer-Komplex gelöst hatte. Anhand des Serumstabilitätstests konnte indirekt überprüft werden, ob der konjugierte Tracer-Komplex $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-EPO}$ über die Zeit stabil im Blut verblieb. Dafür wurden anhand des prozentualen Unterschieds zwischen dem gebunden und freien ^{89}Zr Rückschlüsse auf die Stabilität des Komplexes gezogen. In Abbildung 28 A sind exemplarisch drei Zeitpunkte der Autoradiographie dargestellt, die nach der Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurde. Bei der Dünnschichtchromatographie verblieb das gebundene und damit molekular größere ^{89}Zr unten, während das molekular kleinere freie ^{89}Zr im Fließmittel entlang der iTLC lief. In Abbildung 28 B ist der prozentuale Anteil des gebundenen ^{89}Zr abgebildet. Die Prozentzahl ergab sich aus der Menge an Aktivität, die sich im Kreis des unteren Rechtecks befand (gebundenes ^{89}Zr) gegenüber der restlichen Aktivität, die sich im oberen Rechteck befand (freies ^{89}Zr).

Die Ergebnisse in Abbildung 28 B zeigten, dass zu Beginn (0 h) 96,6% des ^{89}Zr im Serum gebunden war und sich nach 195 h auf 84,5% reduzierte. Aufgrund der Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass mindestens 90% des Tracer-Komplexes nach

72 h noch gebunden war. Demnach konnte eine Loslösung des Isotops vom Tracerkomplex ausgeschlossen werden.

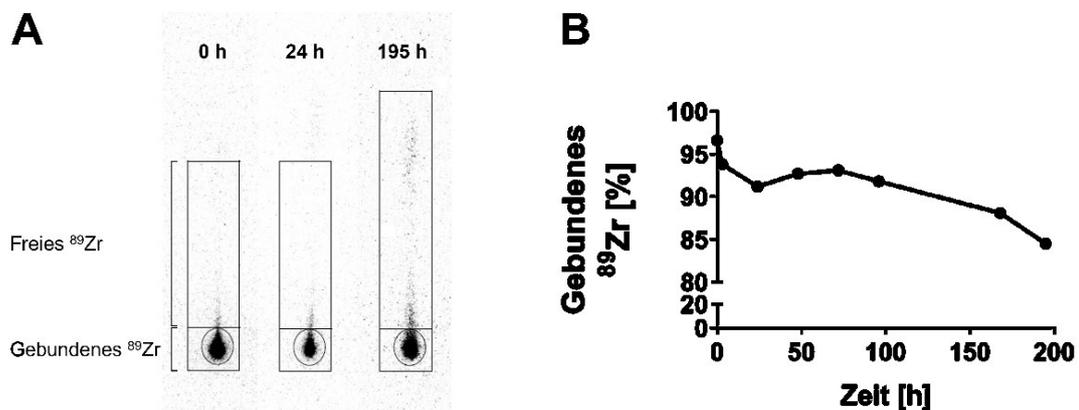


Abbildung 28: Serumstabilitätstest. Die Grafik zeigt die Stabilität des radioaktiv markierten [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO über die Zeit in murinem Serum. **(A)** Beispielhaft sind die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie an drei Zeitpunkten (0 h, 24 h und 195 h) dargestellt. Im unteren Teil befindet sich das an DFO-EPO gebundene ⁸⁹Zr und im oberen Teil befindet sich das freie ⁸⁹Zr. Aus den beiden Teilen wurde die prozentuale Verteilung berechnet. **(B)** Aus den Werten der Dünnschichtchromatographie konnte in einer Kurve dargestellt werden, wie viel Prozent des ⁸⁹Zr über die Zeit nach 0 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h und 195 h noch gebunden war.

4.1.3 Statistik

Die erhobenen Daten wurden statistisch mit einer zweiseitigen (*in vivo* PET-Daten) oder einseitigen (Biodistribution) ANOVA analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Zusammenfassung aller ANOVA Ergebnisse für den EPO-Blockierungsversuch

Parameter	Zeitpunkt	Region	Variablen	df	df-Fehler	F-Wert	p-Wert
<i>In vivo</i>	6 h	Hemisphäre	Gruppe	2	18	1,5	0,25
<i>In vivo</i>	6 h	Hemisphäre	Zeit	1	18	0,15	0,7
<i>In vivo</i>	6 h	Hemisphäre	Gruppe*Zeit	2	18	0,02	0,98
<i>In vivo</i>	6 h	Schlaganfall	Gruppe	1	12	0,41	0,534
<i>In vivo</i>	6 h	Schlaganfall	Zeit	1	12	0,08	0,782
<i>In vivo</i>	6 h	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	1	12	0,29	0,6
<i>In vivo</i>	24 h	Hemisphäre	Gruppe	2	20	0,09	0,91
<i>In vivo</i>	24 h	Hemisphäre	Zeit	1	20	2,06	0,167
<i>In vivo</i>	24 h	Hemisphäre	Gruppe*Zeit	2	20	0,14	0,874

<i>In vivo</i>	24 h	Schlaganfall	Gruppe	1	14	0	0,96
<i>In vivo</i>	24 h	Schlaganfall	Zeit	1	14	1,44	0,25
<i>In vivo</i>	24 h	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	1	14	0	0,962
<i>In vivo</i>	48 h	Hemisphäre	Gruppe	2	18	5,16	0,017
<i>In vivo</i>	48 h	Hemisphäre	Zeit	1	18	2,62	0,123
<i>In vivo</i>	48 h	Hemisphäre	Gruppe*Zeit	2	18	0,13	0,876
<i>In vivo</i>	48 h	Schlaganfall	Gruppe	1	12	3,43	0,089
<i>In vivo</i>	48 h	Schlaganfall	Zeit	1	12	0,157	0,157
<i>In vivo</i>	48 h	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	1	12	0,14	0,718
<i>In vivo</i>	72 h	Hemisphäre	Gruppe	2	16	0,52	0,602
<i>In vivo</i>	72 h	Hemisphäre	Zeit	1	16	1,75	0,205
<i>In vivo</i>	72 h	Hemisphäre	Gruppe*Zeit	2	16	0,02	0,977
<i>In vivo</i>	72 h	Schlaganfall	Gruppe	1	12	0,16	0,701
<i>In vivo</i>	72 h	Schlaganfall	Zeit	1	12	1,37	0,264
<i>In vivo</i>	72 h	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	1	12	0,1	0,759
<i>In vivo</i>	72 h	Narbe	Gruppe	2	36	0,92	0,408
<i>In vivo</i>	72 h	Narbe	Zeit	3	36	35,46	<0,001
<i>In vivo</i>	72 h	Narbe	Gruppe*Zeit	6	36	1,03	0,423
Biodistribution	72 h	Blut	Gruppe	2	8	0,34	0,724
Biodistribution	72 h	Leber	Gruppe	2	8	0,06	0,945
Biodistribution	72 h	Herz	Gruppe	2	8	0,07	0,931
Biodistribution	72 h	Milz	Gruppe	2	8	0,34	0,725
Biodistribution	72 h	Niere	Gruppe	2	8	0,02	0,984
Biodistribution	72 h	Knochen	Gruppe	2	8	0,04	0,963
Biodistribution	72 h	Muskel	Gruppe	2	8	0,14	0,868
Biodistribution	72 h	Hirnhaut	Gruppe	2	8	0,01	0,988
Biodistribution	72 h	Lunge	Gruppe	2	8	0,07	0,929

df: Freiheitsgrade (engl.: „degrees of freedom“)

4.2 Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle

Anhand der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuche sollte untersucht werden, ob Ambroxol einen therapeutischen Effekt auf das Schlaganfallgewebe in Ratten hat. Zur Evaluierung wurden neben verschiedenen MRT-Parameter auch die Auswirkungen auf das Verhalten untersucht sowie die histologisch aufgearbeiteten Gehirne ausgewertet. Ein Großteil der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden von Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸ publiziert.

4.2.1 Kontrollgruppen

Es konnte mittels ANOVA kein Haupteffekt zwischen den beiden Kontrollgruppen NaCl und Vehikel festgestellt werden. Daher wurden die beiden Kontrollgruppen nach Rücksprache mit einer Statistikerin zusammengenommen und als eine Kontrollgruppe gegenüber Ambroxol gewertet. Die Verteilung und Anzahl der Tiere für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Gesamtanzahl aller Tiere für jeden Zeitpunkt und jede Gruppe, die für den Therapieversuch mit Ambroxol in die Analyse miteingingen. Tabelle angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Zeitpunkt	Kontrolle	Ambroxol
Baseline	36	17
0 h	36	17
24 h	36	17
72 h	26	12
1 Woche	19	10
1 Monat	19	10

4.2.2 Schlaganfallvolumen

Zur Validierung des therapeutischen Effekts von Ambroxol, wurde als erster Parameter das Schlaganfallvolumen untersucht. Das Schlaganfallvolumen wurde für jedes Tier und jeden Zeitpunkt (ausgenommen 0 h, siehe 3.2.4.1 MRT-Bildanalyse) durch manuelles Einzeichnen anhand der T2- und ADC-Bilder erhoben und ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Bilder stellen jeweils den Median aller Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt für die eingezeichneten Volumina dar. Zu erkennen sind die kleineren Volumina in der Ambroxolgruppe.

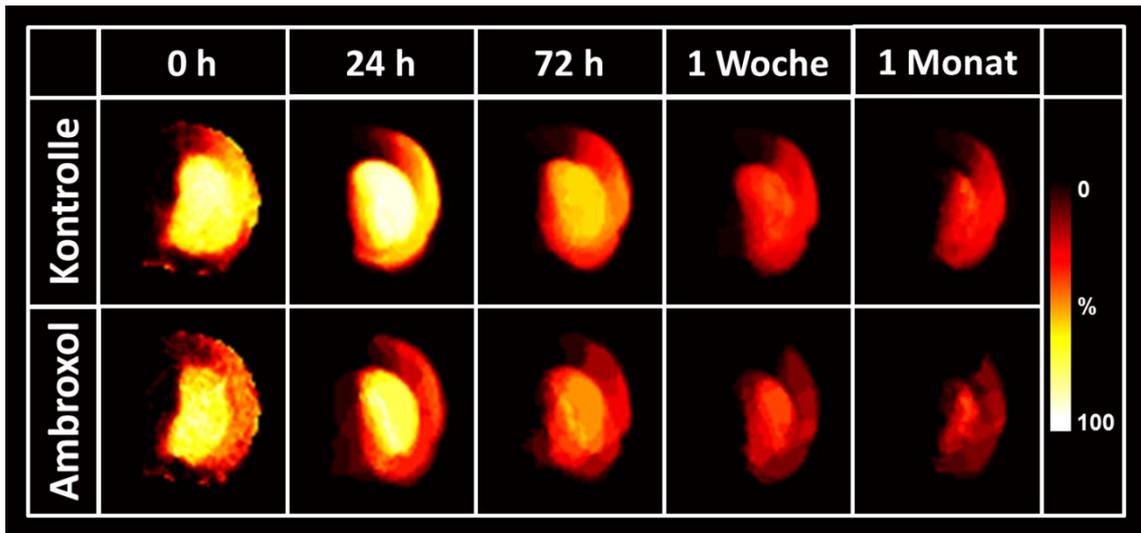


Abbildung 29: Schlaganfallvolumen aller Tiere über die Zeit. In dieser Abbildung sind die ischämischen Schlaganfallvolumina aller ausgewerteten Tiere für jeden Zeitpunkt abgebildet. Für die Darstellung wurden alle manuell gezeichneten oder errechneten (0h) Volumina überlagert und der Median berechnet. Dabei gibt schwarz an, dass 0% aller Tiere einen Schlaganfall in diesem Bereich hatten und weiß, dass 100% aller Tiere in diesem Bereich einen Schlaganfall hatten. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

4.2.2.1 Quantifizierung der Volumina

Die Quantifizierung der in Abbildung 29 aufgezeigten Volumina ist in Abbildung 30 für das gesamte Schlaganfallvolumen (Volumen IS), das striatale Schlaganfallvolumen (IS Volumen *Striatum*) und das kortikale Schlaganfallvolumen (IS Volumen *Cortex*) dargestellt. Die Daten wurden für alle Zeitpunkte ab Therapiegabe (24 h bis 1 Monat) mit einer zweifachen ANOVA analysiert. Alle Informationen bezüglich der statistischen Auswertung kann der Tabelle 9 entnommen werden. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Median und die Reichweite mit dem kleinsten und größten Wert dar.

Das Schlaganfallvolumen war in beiden Gruppen in allen Bereichen gleichmäßig verteilt und reduzierte sich über die Zeit. Obwohl für das gesamte Schlaganfallvolumen ein signifikanter Haupteffekt sowohl zwischen den Gruppen als auch den Zeitpunkten festgestellt wurde (Gruppe: $p = 0,002$; Zeit: $p < 0,001$), konnten mit einer Post-Hoc Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 30 A). Während der Okklusion wies die Kontrollgruppe ein gesamtes Schlaganfallvolumen von $0,269 (0,050 - 0,430) \text{ cm}^3$ und die Ambroxolgruppe von $0,155 (0,070 - 0,452) \text{ cm}^3$ auf. Obwohl der Median in der Ambroxolgruppe geringer war, konnte mittels t-Test aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Daten in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,282$). Nach 1 Monat lag das finale Schlaganfallvolumen für die Kontrollgruppe bei $0,121 (0,002 - 0,315) \text{ cm}^3$ und war in der Tendenz ein bisschen größer als das finale Schlaganfallvolumen der

Ambroxolgruppe (0,019 (0 – 0,147) cm³). Für eine genauere Untersuchung wurde das Schlaganfallvolumen in die Bereiche *Striatum* und *Cortex* unterteilt.

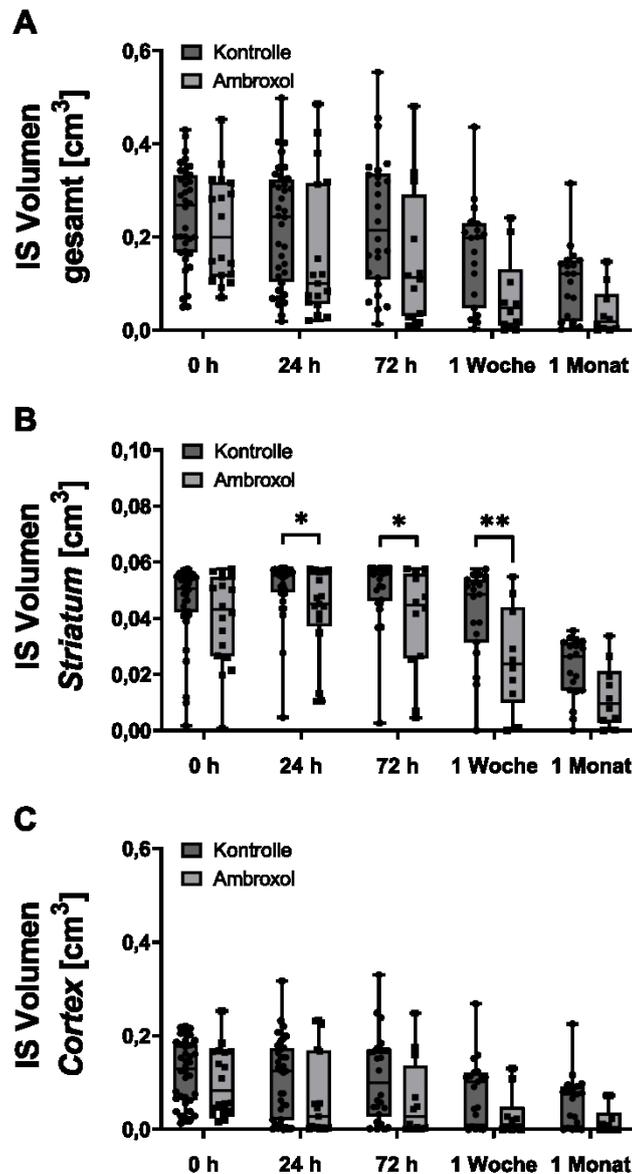


Abbildung 30: Quantifizierung des Schlaganfallvolumens. Graphisch sind hier die quantifizierten Schlaganfallvolumina der Tiere über die Zeit dargestellt. Unterteilt ist die Grafik in (A) gesamtes ischämisches Schlaganfallvolumen (IS Volumen), (B) IS Volumen nur im *Striatum* und (C) IS Volumen nur im *Cortex*. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten aller Tiere (Punkte), den Median (zentrale Linie) sowie das obere und untere Quartil. Die Whisker stellen den maximal und minimal Wert dar. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Im *Striatum* zeigte die zweifache ANOVA ebenfalls einen signifikanten Gruppen- ($p < 0,001$) wie auch Zeiteffekt ($p < 0,001$). Das Schlaganfallvolumen lag während der Okklusion für die Kontrollgruppe bei 0,051 (0,002 – 0,058) cm³ und für die Ambroxolgruppe bei 0,042 (0,001 – 0,058) cm³ (Abbildung 30 B). Die Analyse des t-Test

ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,14$). Über die Zeit reduzierte sich das Schlaganfallvolumen in beiden Gruppen, wobei ein signifikant kleineres Schlaganfallvolumen in der Ambroxolgruppe nach 24 h ($p = 0,02$), 72 h ($p = 0,02$) sowie 1 Woche ($p = 0,003$) gefunden wurde. Die größte Reduktion des Volumens fand in beiden Gruppen zum letzten Zeitpunkt statt, wobei das finale Volumen am Ende für die Kontrollgruppe bei $0,026 (0 - 0,036) \text{ cm}^3$ und für die Ambroxolgruppe bei $0,010 (0 - 0,034) \text{ cm}^3$ lag. Zu diesem Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Ähnlich wie bei der Analyse des gesamten Schlaganfallvolumen konnte im *Cortex* durch die zweifache ANOVA zwar ein signifikanter Haupteffekt zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten festgestellt werden (Gruppe: $p = 0,002$; Zeit: $p = 0,028$), dennoch konnte eine Post-Hoc Analyse zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen finden (Abbildung 30 C). Die Verteilung der Daten sowie die Reduktion des Volumens war in beide Gruppen ähnlich. Nach 1 Monat war das finale Schlaganfallvolumen in der Kontrollgruppe mit $0,075 (0 - 0,225) \text{ cm}^3$ höher als in der Ambroxolgruppe ($0,004 \pm (0 - 0,072) \text{ cm}^3$; $p = 0,16$).

4.2.2.2 Histologische Validierung

Zur Validierung der MRT-Bilder wurden einige Gehirne (immun-) histologisch gefärbt (Abbildung 31). Im Kontrolltier wurde in der H&E-Färbung eine große Läsion mit Kavitationen (Aushöhlungen) und zystischen Räumen in der rechten Hemisphäre gefunden, die sowohl den *Cortex* als auch tiefere Hirnregionen betraf. Das Infarktgebiet war von Gliose umgeben, was anhand der gefärbten Zellen durch die GFAP-Färbung zu erkennen war. Als Gliose wird eine neuropathologische Reaktion bezeichnet, die sich unter anderem durch eine erhöhte Anzahl an Gliazellen in geschädigtem Gewebe auszeichnet. Des Weiteren zeigte die aktivierte Caspase 3 IHC fokale Apoptose an den äußeren Rändern der Läsion. Die H&E-Färbung im Ambroxol-Gehirn zeigte ebenfalls eine ausgedehnte Schädigung des Gewebes, jedoch ohne Kavitationen und zystische Strukturen. Allerdings war die Gliose stärker ausgeprägt, wie durch die hohe Anzahl gefärbter Zellen in der GFAP IHC zu sehen ist. Außerdem zeigte die aktivierte Caspase 3 eine auffällige Präsenz von apoptotischen Kernen.

Anhand weiterer H&E-Färbung wurde die finale Schlaganfallfläche evaluiert, wobei mittels t-Testes kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte ($p = 0,9$, Abbildung 31 B). Die vom Schlaganfall betroffene Fläche war in der Kontrollgruppe etwas größer als in der Ambroxolgruppe.

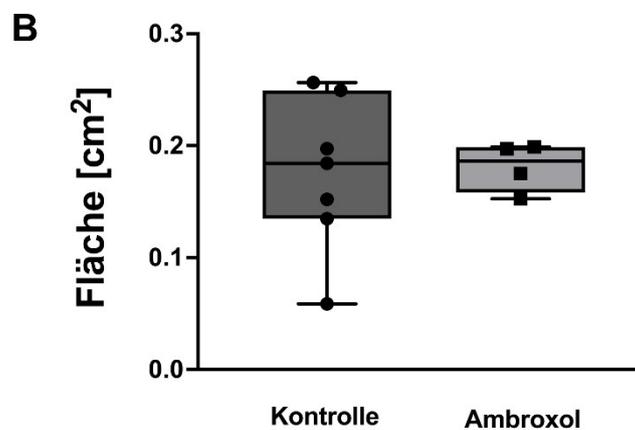
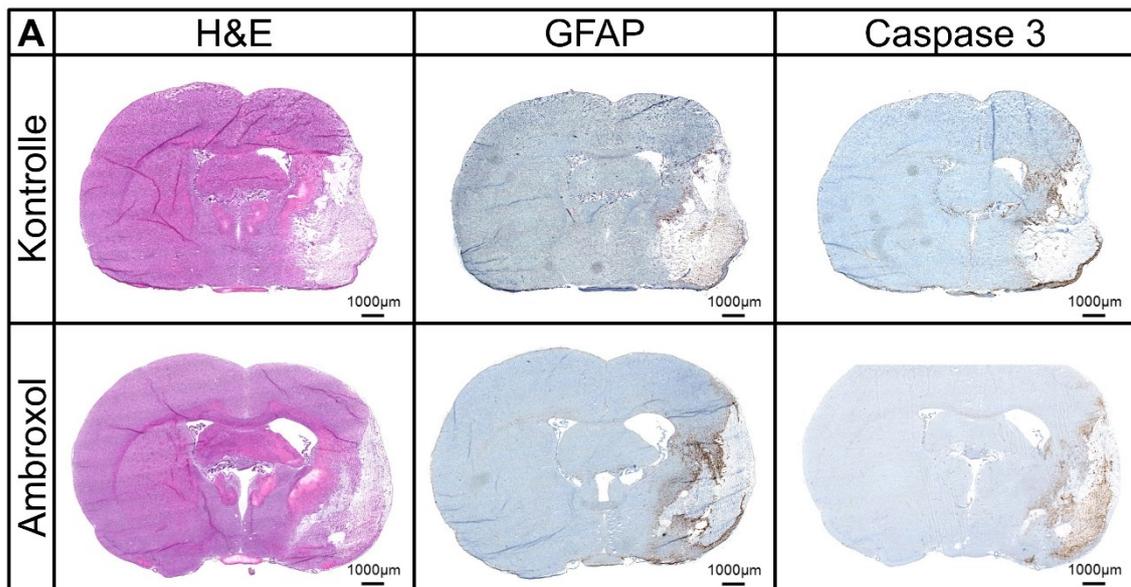


Abbildung 31: Histologische Färbungen. (A) In dieser Grafik sind die histologischen Färbungen von H&E (Hämatoxylin-Eosin) sowie die immunhistochemischen Färbungen von GFAP (engl.: „*glial fibrillary acidic protein*“) und Caspase 3 zum letzten Zeitpunkt (1 Monat) dargestellt (Kontrolle: n = 1; Ambroxol: n = 1). (B) Die Evaluierung der finalen Schlaganfallfläche wurde an den vorhandenen Schnitten durchgeführt (Kontrollgruppe: n = 7; Ambroxolgruppe: n = 4). Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten aller Tiere (Punkte), den Median (zentrale Linie) sowie das obere und untere Quartil. Die Whisker stellen den maximal und minimal Wert dar. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

4.2.2.3 Schlaganfallreduktion

Weder in den MRT-Daten (Abbildung 30) noch in der Histologie (Abbildung 31) war das Volumen bzw. die Fläche zum letzten Zeitpunkt zwischen den Gruppen unterschiedlich. Es sollte daher überprüft werden, ob sich die Reduktion der Volumina zwischen den Gruppen unterschied. Abbildung 32 zeigt die absolute Reduktion zwischen dem ersten (0 h) und letzten (1 Monat) Zeitpunkt beider Gruppen.

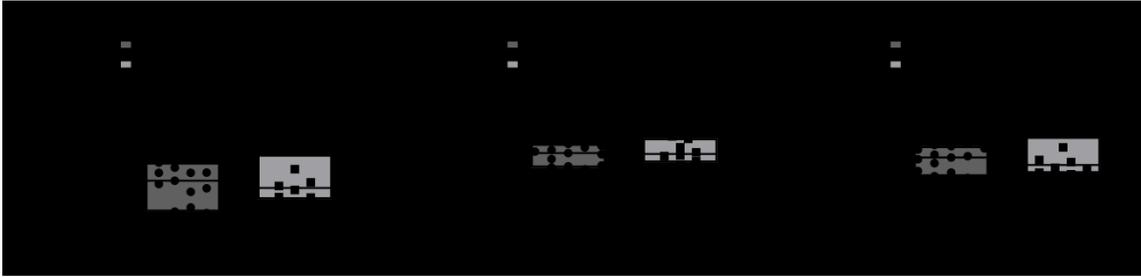


Abbildung 32: Einzelner Verlauf und Reduktion der Volumina zwischen Okklusion und 1 Monat. Die Grafik zeigt die gesamte Reduktion in cm^3 zwischen der Okklusion und dem 1 Monatszeitpunkten sowohl im gesamten ischämischen Schlaganfall (IS) als auch im striatalen IS und im kortikalen IS. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten aller Tiere (Punkte), den Median (zentrale Linie) sowie das obere und untere Quartil. Die Whisker stellen den maximalen und minimalen Wert dar. Kontrollgruppe: $n = 19$; Ambroxolgruppe: $n = 10$.

Mittels t-Test konnte in keiner Region ein signifikanter Unterschied gefunden werden (Gesamt: $p = 0,61$; *Striatum*: $p = 0,99$; *Cortex*: $p = 0,54$). Auffällig war hierbei nur, dass es im *Striatum* und im *Cortex* in beiden Gruppen vereinzelt Tiere gab, deren Schlaganfallvolumen sich über die Zeit vergrößerte (Kontrollgruppe: $n = 3$; Ambroxolgruppe: $n = 1$).

4.2.2.4 Prozentuale Verteilung des Schlaganfalls

Neben dem gesamten Volumen über die Zeit, dem finalen Volumen und der Reduktion des Volumens wurde auch die prozentuale Verteilung des Schlaganfalls genauer analysiert. Alle Tiere, die für diese Studie ausgewertet wurden, hatten einen Schlaganfall mindestens im *Striatum*. Da die Größe der Schlaganfälle innerhalb der Gruppen variierte und sich das Volumen mit diesem Modell nicht auf das *Striatum* begrenzen ließ, breitete sich der Schlaganfall bei vielen Tieren weiter aus. In Abbildung 33 ist die prozentuale Verteilung des Schlaganfalls in den jeweiligen Gebieten dargestellt. Die Daten wurden mit einer zweifachen ANOVA für alle Zeitpunkte ab Therapiegabe (24 h bis 1 Monat) analysiert. Alle Informationen bezüglich der statistischen Ergebnisse können der Tabelle 9 entnommen werden.

Für die Verteilung im *Striatum* konnte nur ein signifikanter Gruppeneffekt ($p = 0,009$) beobachtet werden (Abbildung 33 A). Während der Okklusion waren in der Kontrollgruppe 18,2 (3,2 – 33,9)% und in der Ambroxolgruppe 17,9 (0,8 – 38,8)% des gesamten Schlaganfalls im *Striatum*. Interessanterweise erhöhte sich der prozentuale Anteil in beiden Gruppen über die Zeit. Nach 1 Monat waren 22,0 (0 – 100)% des Schlaganfalls der Kontrollgruppe im *Striatum*, während es 51,0 (0 – 100)% für die Ambroxolgruppe waren. Es konnte aber zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden.

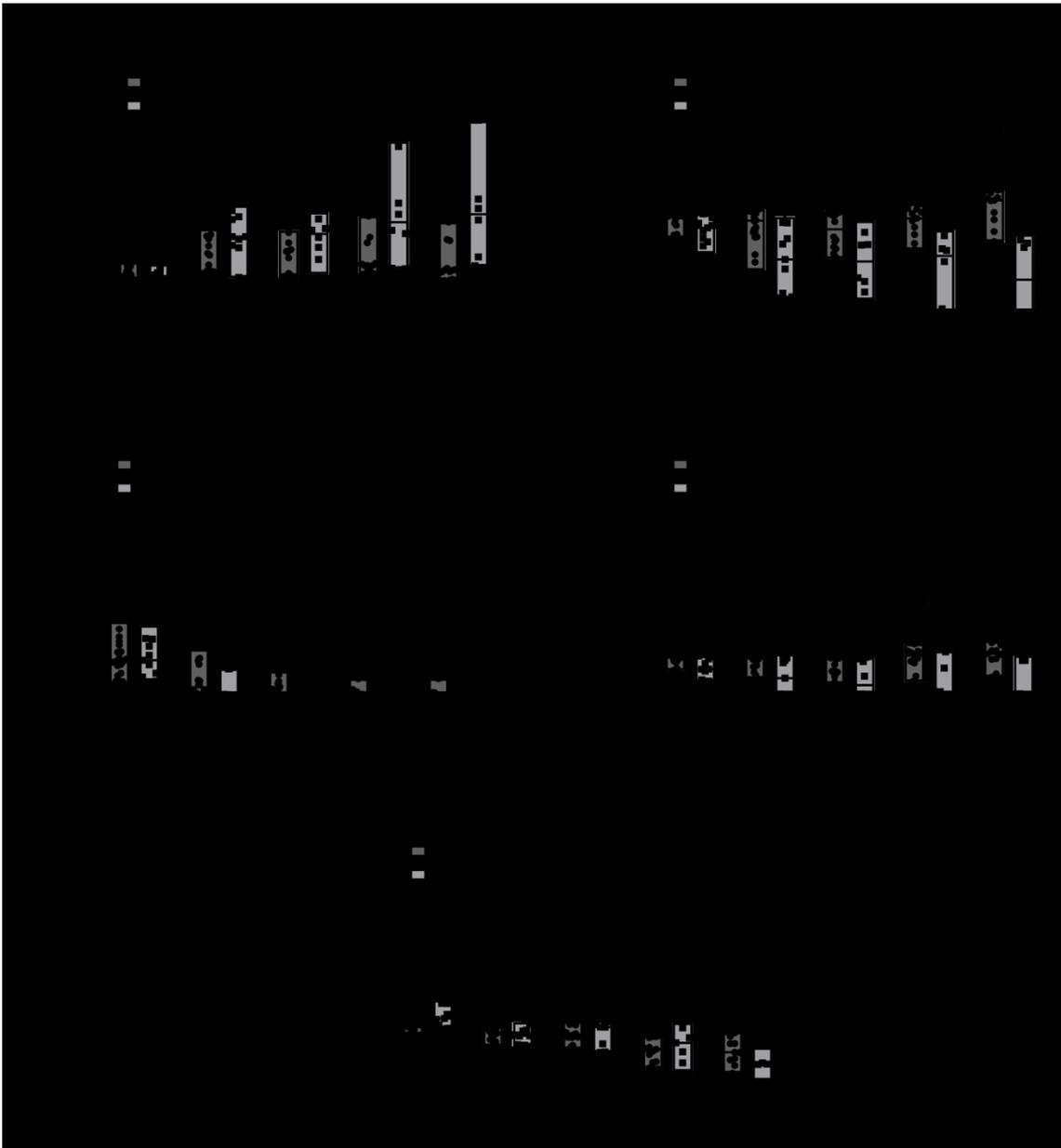


Abbildung 33: Prozentuale Verteilung des Schlaganfalls in den verschiedenen Regionen. Die Grafik stellt dar, wie viel Prozent des Schlaganfalls in einer Region liegt. (A) zeigt den Anteil im *Striatum*, (B) im *Cortex*, (C) im *M1 Cortex*, (D) im *S1 Cortex* und (E) im restlichen Gehirn. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten aller Tiere (Punkte), den Median (zentrale Linie) sowie das obere und untere Quartil. Die Whisker stellen den maximalen und minimalen Wert dar. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: **: $p < 0,05$; ***: $p < 0,01$.

Im kompletten *Cortex* (Abbildung 33 B) konnte beobachtet werden, dass sich nach 1 Monat prozentual mehr Schlaganfallgewebe der Kontrollgruppe im *Cortex* befand als während der Okklusion (Okklusion: 49,8 (16,9 – 58,7)%; 1 Monat: 58,0 (0 – 75,4)%). Im Gegensatz dazu reduzierte sich der prozentuale Anteil des Schlaganfallgewebes für die Ambroxolgruppe zwischen den beiden Zeitpunkten um mehr als die Hälfte (Okklusion: 43,7 (20,2 – 56,9)%; 1 Monat: 16,8 (0 – 66,4)%). Durch den gegensätzlichen Verlauf unterschied sich der prozentuale Anteil des Schlaganfalls im *Cortex* in den Gruppen

nach 1 Woche und nach 1 Monat signifikant voneinander (1 Woche: $p = 0,04$; 1 Monat: $p = 0,003$; Gruppeneffekt: $p < 0,001$).

Für weiterführende Analysen wurde der *Cortex* in den *M1 Cortex* und *S1 Cortex* unterteilt (Abbildung 33 C&D). Dabei war zu beobachten, dass sich die signifikanten Unterschiede nur auf den *S1 Cortex* beschränkten (1 Woche: $p = 0,04$; 1 Monat: $p = 0,02$). Sowohl für den *M1 Cortex* als auch den *S1 Cortex* konnte jeweils ein signifikanter Gruppeneffekt (M1: $p = 0,021$; S1: $p < 0,001$) aber kein Zeiteffekt festgestellt werden.

In Abbildung 33 E ist die prozentuale Verteilung des Schlaganfalls im restlichen Gehirn dargestellt, die sich zwischen den Gruppen kaum unterschied. Im Vergleich zu allen Zeitpunkten waren während der Okklusion prozentual am meisten Bereiche außerhalb des *Striatums* und des *Cortex* vom Schlaganfall betroffen (Kontrolle: 15,0 (7,5 – 22,5)%; Ambroxol: 16,3 (11,8 – 27,5)%) und nach 1 Monat am wenigsten (Kontrolle: 7,6 (0 – 16,3)%; Ambroxol: 4,4 (0 – 20,7)%). Es konnte zwar kein signifikanter Gruppeneffekt ($p = 0,606$) aber dafür ein signifikanter Zeiteffekt ($p = 0,017$) festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen des Schlaganfallvolumens im Bereich des *Striatums* 24 h bis 1 Woche nach dem Schlaganfall ein signifikant kleineres Volumen in der Ambroxolgruppe. Die finale Größe des Schlaganfalls unterschied sich zwischen den Gruppen weder in den MRT-Bildern noch in der Histologie, was auf einen frühen positiven Effekt von Ambroxol hindeutet. Prozentual nahm der Anteil des Schlaganfalls in der Kontrollgruppe im *Cortex* vor allem im *S1 Cortex* über die Zeit zu, während er sich in der Ambroxolgruppe reduzierte, weshalb ein signifikanter Unterschied zu sehen war. Im *Striatum* hingegen war zum letzten Zeitpunkt der prozentuale Anteil des Schlaganfalls in der Ambroxolgruppe größer als in der Kontrollgruppe.

4.2.3 Schlaganfallintensität

Neben den Schlaganfallvolumina wurde außerdem die Signalintensität der T2- und ADC-Werte untersucht, da diese Aussagen über den Schweregrad des Schlaganfalls liefern können. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Median und die Reichweite mit dem kleinsten und größten Wert dar.

4.2.3.1 Signalintensität der T2-Werte

Die T2-Bilder zeigten im Bereich des Schlaganfalls höhere Intensitätswerte, da sich durch die molekularen Vorgänge Wasser in den betroffenen Zellen ansammelte. Dies war gut in beiden Gruppen in Abbildung 34 ab dem 24 h Zeitpunkt zu erkennen. Die Bilder stellen jeweils den Median aller Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt für die T2-Werte

dar. Die Signalintensität war in der Kontrollgruppe nach 1 Monat stärker als in der Ambroxolgruppe.

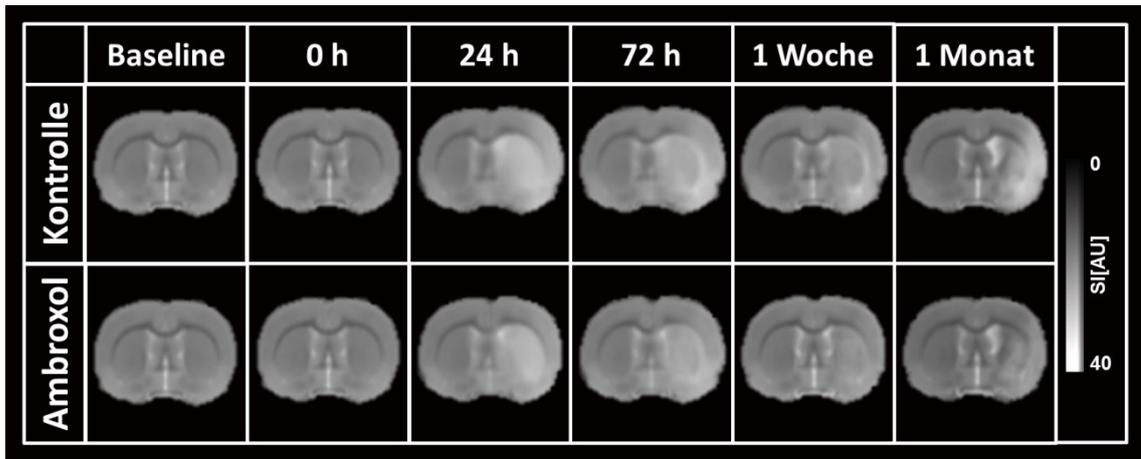


Abbildung 34: T2-Bilder aller Tiere über die Zeit. In dieser Abbildung sind alle ausgewerteten Tiere für jeden Zeitpunkt gezeigt. Die dargestellten T2-Bilder sind der Median, der aus den aufgenommenen T2-Signalintensitäten (SI) aller Tiere einer Gruppe pro Zeitpunkt berechnet wurde. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Abbildung angepasst nach Patzwaldt et al. ¹⁵⁸.

4.2.3.1.1 Quantifizierung der T2-Werte

Quantifiziert wurden sowohl die absoluten (Abbildung 35 A) als auch relativen (Abbildung 35 B) Signalintensitätswerte der T2-Bilder für den gesamten Schlaganfallbereich (IS gesamt), den striatalen Schlaganfallbereich (IS *Striatum*) und den kortikalen Schlaganfallbereich (IS *Cortex*). Die Daten wurden für alle Zeitpunkte ab Therapiegabe (24 h bis 1 Monat) mit einer zweifachen ANOVA analysiert. Alle Informationen bezüglich der statistischen Auswertung kann der Tabelle 9 entnommen werden.

In allen Regionen konnte zunächst eine Signalintensität (SI) von ungefähr 20 für beide Gruppen während der Baseline festgestellt werden (Abbildung 35 A). Bevor sich die absoluten Signalintensitätswerte zum 24 h Zeitpunkt für beide Gruppen deutlich erhöhten, konnte während der Okklusion eine Reduktion der Werte von etwa 15% beobachtet werden. Diese Reduktion zeigte sich jedoch nicht in den relativen Daten, was bedeutet, dass die Reduktion in beiden Hemisphären zu beobachten war (Abbildung 35 B). Nach dem Anstieg der Werte zum 24 h Zeitpunkt unterschied sich der weitere Verlauf der Daten zwischen den Regionen. Im gesamten Schlaganfallvolumen und im *Striatum* reduzierte sich die Signalintensität wieder, während sich diese Dynamik im *Cortex* nicht widerspiegelte.

Für die gesamte Schlaganfallregion konnte neben einem signifikanten Gruppen- ($p = 0,014$) und Zeiteffekt ($p < 0,001$) ebenfalls eine signifikante Interaktion ($p = 0,046$) zwischen den Gruppen und der Zeit festgestellt werden. Nach der Reduktion der

Signalintensitätswerte erhöhte sich der Wert in der Kontrollgruppe zum letzten Zeitpunkt und lag bei 28,6 (18,5 – 37,7) während sich der Wert in der Ambroxolgruppe weiter reduzierte (21,1 (19,0 – 31,4)). Damit unterschieden sich die Gruppen signifikant voneinander ($p < 0,001$), wobei diese Diskrepanz bereits in Abbildung 34 zu beobachten war. Das errechnete Verhältnis der Daten in Abbildung 35 B spiegelt die Ergebnisse der absoluten Daten wider (1 Monat: $p < 0,001$). Beim errechneten Verhältnis lagen alle Werte über 1, womit in keiner Gruppe die Werte der kontralateralen Hemisphäre und somit das Baseline-Niveau erreicht wurden.

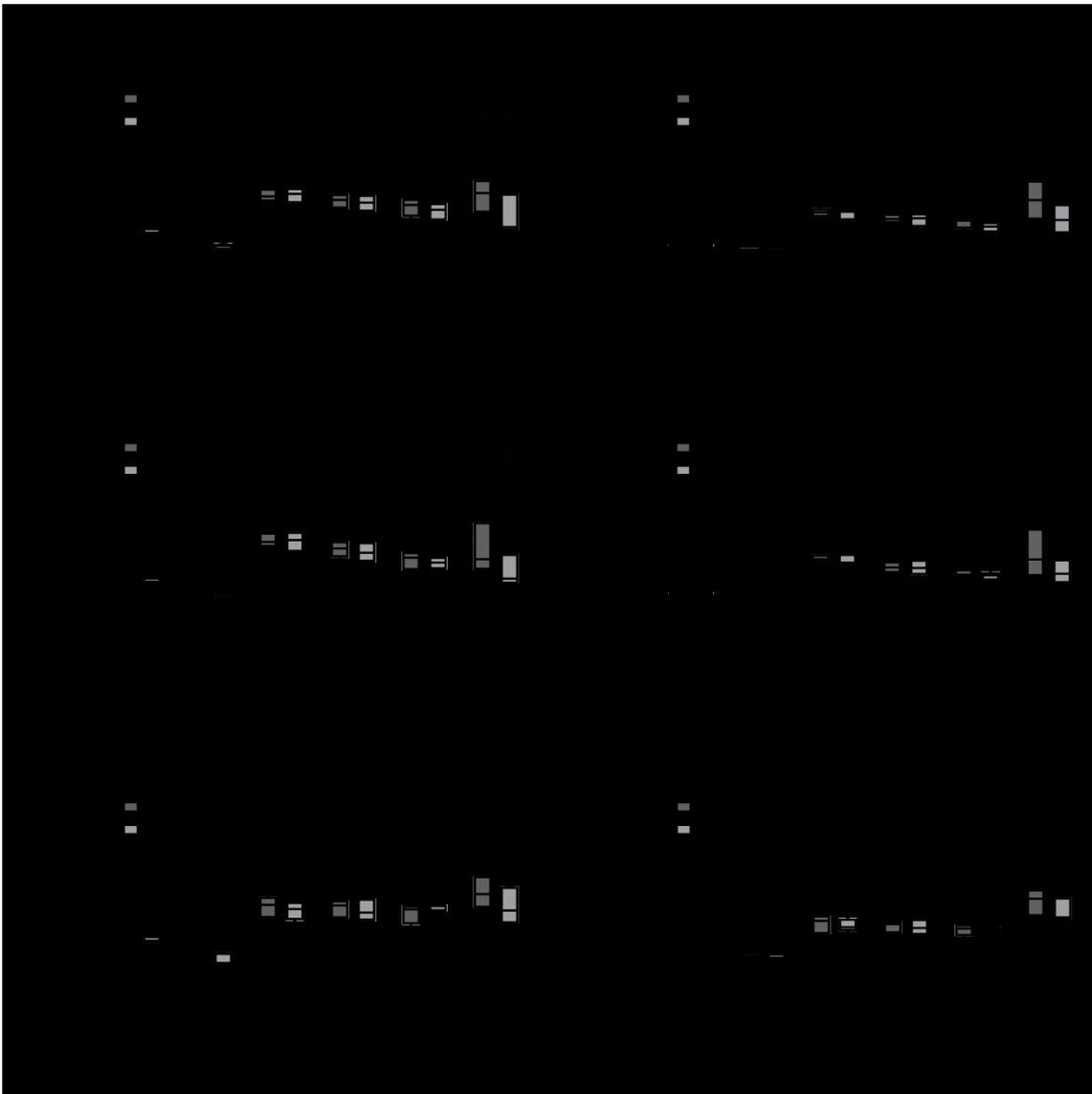


Abbildung 35: T2 Signalintensität und Verhältnis zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre in den Schlaganfallregionen. (A) Graphisch sind die T2 Signalintensitäten (SI) der Tiere über die Zeit dargestellt. Dabei wurde die SI der gesamten ischämischen Schlaganfall (IS)-Region sowie der IS-Region im *Striatum* und der IS-Region im *Cortex* separat dargestellt. (B) Graphisch ist hier das Verhältnis zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre dargestellt. Dabei wurde die SI der gesamten IS-Region sowie der IS-Region im *Striatum* und der IS-Region im *Cortex* separat dargestellt. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten mit dem Median (zentrale Linie) und dem oberen und unteren Quartil. Die Whisker stellen den maximal und minimal Wert dar. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: ****': $p < 0,001$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.*¹⁵⁸.

Im *Striatum* konnte mit der zweifachen ANOVA sowohl für die absoluten als auch die relativen Daten ein signifikanter Gruppen- und Zeiteffekt, sowie eine signifikante Interaktion zwischen den beiden Effekten beobachtet werden (Tabelle 9). Zum letzten Zeitpunkt lag die Signalintensität für die Kontrollgruppe bei 24,7 (18,5 – 39,2) und für die Ambroxolgruppe bei 20,4 (17,8 – 27,0). Da sich die Signalintensitätswerte der Ambroxolgruppe für den letzten Zeitpunkt fast auf den Baseline-Wert verringerten, unterschieden sich die Gruppen zu diesem Zeitpunkt signifikant voneinander ($p < 0,001$). Ebenso unterschieden sich nach 1 Monat die Gruppen im errechneten Verhältnis signifikant voneinander ($p < 0,001$).

Wie bereits erwähnt, konnte im *Cortex* keine deutliche Reduktion der Werte beobachtet werden. Mittels zweifacher ANOVA konnte nur für die relativen Werte ein signifikanter Effekt über die Zeit ($p < 0,001$) gefunden werden (Tabelle 9). Nach 1 Monat erhöhten sich die Signalintensitätswerte für die Kontrollgruppe auf 30,2 (24,6 – 37,2) während sie für die Ambroxolgruppe bei 26,5 (23,4 – 32,2) lagen. In beiden Gruppen waren die Signalintensitätswerte im Cortex zum letzten Zeitpunkt am höchsten, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte.

4.2.3.2 Signalintensität der ADC-Werte

Während bei den T2-Bildern nach dem Schlaganfall eine erhöhte Signalintensität beobachtet werden konnte, zeigten die ADC-Werte zunächst eine Reduktion der Werte (Abbildung 36). Dies war bereits während der Okklusion (0 h) zu sehen. Die Bilder stellen ADC-Karten dar, die aus dem Median der errechneten ADC-Karten aller Tiere pro Gruppe und pro Zeitpunkt berechnet wurden. Nach 1 Monat waren die ADC-Werte in der Kontrollgruppe deutlich höher als in der Ambroxolgruppe.

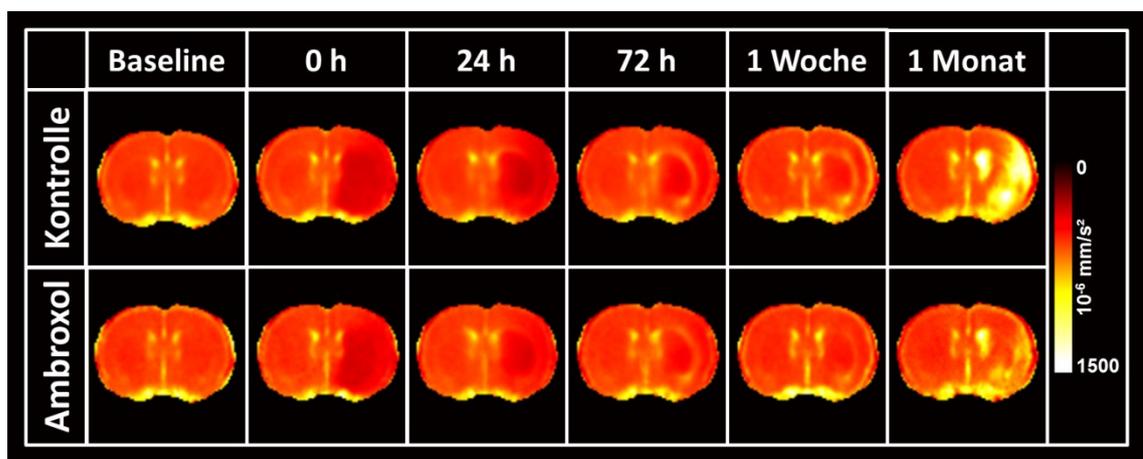


Abbildung 36: ADC-Karten aller Tiere über die Zeit. In dieser Abbildung sind die ausgewerteten Tiere für jeden Zeitpunkt gezeigt. Die dargestellten ADC-Karten sind der Median, der aus den errechneten ADC-Karten aller Tiere einer Gruppe pro Zeitpunkt berechnet wurde. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

4.2.3.2.1 Quantifizierung der ADC-Werte

Auch die ADC-Werte wurden für den gesamten Schlaganfallbereich (IS gesamt), den striatalen Schlaganfallbereich (IS *Striatum*) und den kortikalen Schlaganfallbereich (IS *Cortex*) quantifiziert. Ähnlich wie bei den Signalintensitätswerten der T2-Bilder, gab es in Bezug auf die absoluten (Abbildung 37 A) und relativen (Abbildung 37 B) ADC-Werte bis auf den letzten Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Daten wurden für alle Zeitpunkte ab Therapiegabe (24 h bis 1 Monat) mit einer zweifachen ANOVA analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt. In allen Regionen und beiden Gruppen lag der Median der absoluten ADC-Werte während der Baseline zwischen $664 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ und $712 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. Während der Okklusion verringerten sich die ADC-Werte zunächst im Schnitt um mehr als 30% und erhöhten sich danach wieder. Interessanterweise erreichten beide Gruppen nach spätestens 1 Woche fast wieder den Baseline-Wert. Dies ließ sich vor allem in den relativen Werten gut erkennen, da sich diese in beiden Gruppen dem Wert 1 näherten. Der größte Anstieg konnte zwischen 1 Woche und 1 Monat verzeichnet werden. Ähnliches konnte auch für die relativen Daten beobachtet werden.

In der gesamten Schlaganfallregion konnte neben einem signifikanten Gruppen- und Zeiteffekt ebenfalls eine signifikante Interaktion zwischen der Gruppe und der Zeit beobachtet werden ($p < 0,001$, Tabelle 9). Nach der Reduktion der ADC-Werte während der Okklusion auf einen Wert von $467 (360 - 508) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ für die Kontrollgruppe und $466 (429 - 535) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ für die Ambroxolgruppe, erreicht die Kontrollgruppe nach 1 Monat einen finalen ADC-Wert von $1143 (697 - 1638) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. Dieser Wert lag damit signifikant höher ($p < 0,001$) als der ADC-Wert für die Ambroxolgruppe ($831 (759 - 1156) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$). Dieser Unterschied war bereits in Abbildung 36 nach 1 Monat durch ein deutlich höheres Signal in der Schlaganfallregion für die Kontrollgruppe zu erkennen. Die relativen ADC-Werte der gesamten Schlaganfallregion unterschieden sich wie die absoluten Werte nach 1 Monat ebenfalls signifikant ($p < 0,001$).

Auch für die ADC-Werte im *Striatum* konnte mit der zweifachen ANOVA ein signifikanter Gruppen- und Zeiteffekt sowie eine signifikante Interaktion festgestellt werden (Tabelle 9). Während der Okklusion reduzierten sich die Werte für die Kontrollgruppe auf einen Wert von $455 (340 - 531) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ und für die Ambroxolgruppe auf $464 (431 - 541) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ und erreicht nach einem kontinuierlichen Anstieg nach 1 Monat ein Maximum von $1037 (690 - 1984) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ für die Kontrollgruppe und $764 (712 - 999) \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ für die Ambroxolgruppe. Während die Werte der Ambroxolgruppe nur etwas über dem Baseline-Wert lagen, waren die Werte in der Kontrollgruppe etwa 1,5-mal höher, womit sich die Gruppen nach 1 Monat signifikant voneinander unterschieden

($p < 0,001$). Auch im *Striatum* war der Verlauf der relativen Werte ähnlich zu den absoluten Werten mit einem signifikanten Unterschied zum letzten Zeitpunkt ($p < 0,001$).

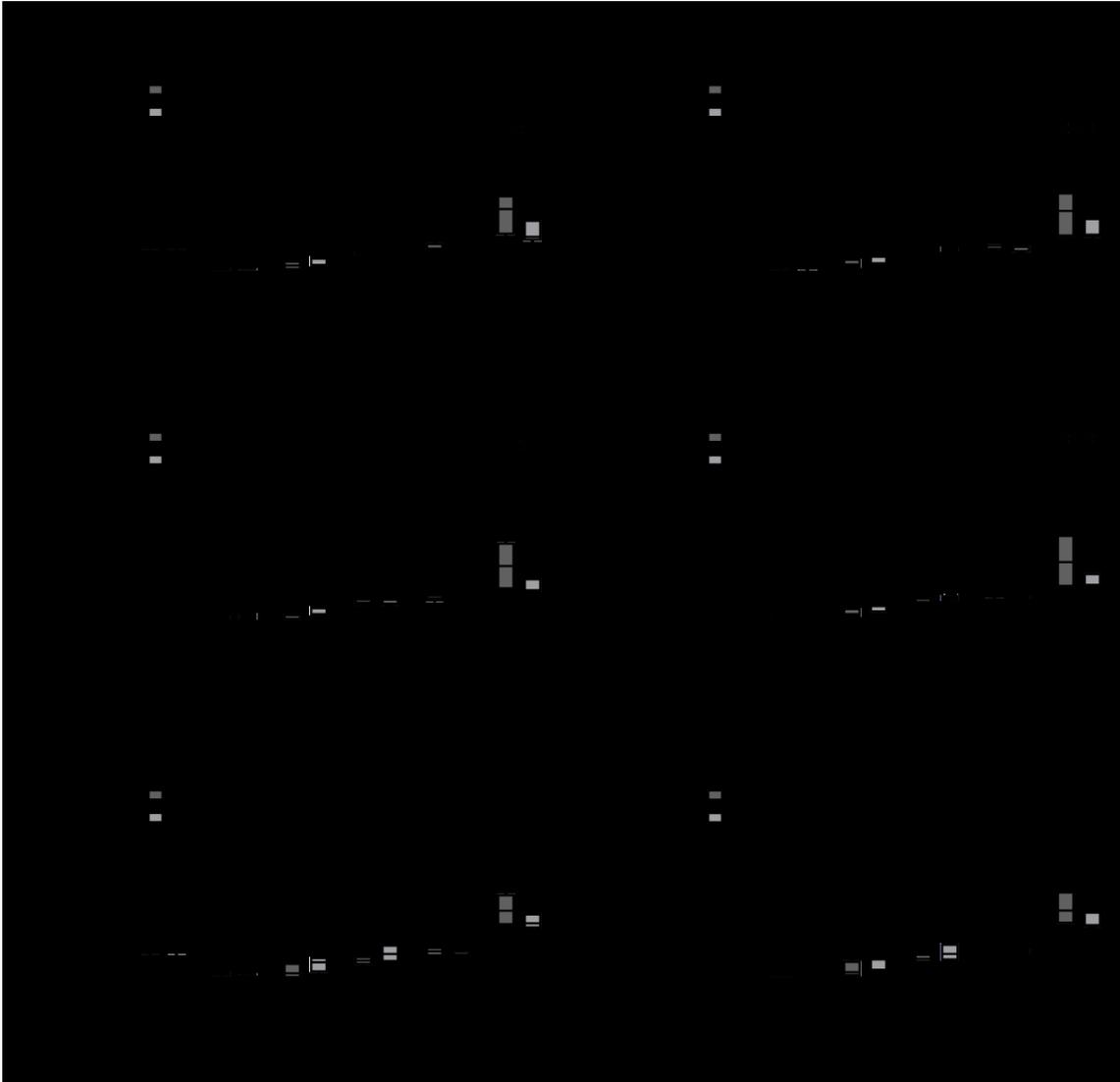


Abbildung 37: ADC-Werte und Verhältnis zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre in den Schlaganfallregionen. (A) Graphisch sind hier die ADC-Werte der Tiere über die Zeit dargestellt. Dabei wurden die Werte der gesamten ischämischen Schlaganfall (IS)-Region sowie der IS-Region im *Striatum* und der IS-Region im *Cortex* separat dargestellt. (B) Graphisch ist hier das Verhältnis zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre dargestellt. Dabei wurden die Werte der gesamten IS-Region sowie der IS-Region im *Striatum* und der IS-Region im *Cortex* separat dargestellt. Die Anzahl der Tiere für jeden Zeitpunkt und Gruppe ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten mit dem Median (zentrale Linie) und dem oberen und unteren Quartil. Die Whisker stellen den maximal und minimal Wert dar. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: '****': $p < 0,001$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Im *Cortex* konnte mit der zweifachen ANOVA für die absoluten und relativen Werte jeweils ein signifikanter Zeiteffekt und Interaktion zwischen den Gruppen und der Zeit gefunden werden (Tabelle 9). Obwohl die Daten im *Cortex* den Daten im gesamten Schlaganfall und im *Striatum* ähnlich waren, gab es weder für die absoluten noch für die relativen Werte zu irgendeinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Tendenziell waren aber die Werte der Ambroxolgruppe höher als die der

Kontrollgruppe, vor allem nach 24 h und 72 h. Wie bei den T2-Werten erreichten auch bei den ADC-Werten beide Gruppen zum letzten Zeitpunkt ihren höchsten Wert in der *Cortex*-Region. Dabei lag der Wert in der Kontrollgruppe bei 1184 (872 – 1646) $\times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ und in der Ambroxolgruppe bei 1043 (970 – 1161) $\times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$.

Zusammenfassend konnte interessanterweise weder für die T2-Werte noch für die ADC-Werte Veränderungen zwischen den Gruppen zu den Zeitpunkten gefunden werden, an denen ein signifikanter Unterschied im Schlaganfallvolumen beobachtet wurde (24 h, 72 h, 1 Woche). Andersherum gab es zum letzten Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied der T2-Werte und der ADC-Werte zwischen den Gruppen für die komplette Schlaganfallregion und im *Striatum*, während zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied in der finalen Schlaganfallgröße zu beobachten war, weder im Volumen (MRT-Daten) noch in der Fläche (Histologie).

4.2.4 Verhaltenstests

Um zu überprüfen, ob Ambroxol einen positiven Effekt auf die Verbesserung der sensorischen und motorischen Eigenschaften der Tiere hatte, wurden vier verschiedene Verhaltenstests durchgeführt (Abbildung 38). Die angegebenen Werte für alle Verhaltensversuche stellen den Mittelwert und die Standardabweichung dar. Es konnten nicht alle Tiere zu jedem Zeitpunkt ausgewertet werden, da zum einen durch technische Probleme der Apparatur (Open Field) teilweise Datensätze nicht gespeichert wurden und zum anderen Tiere aus unterschiedlichen Gründen verschiedene Tests nicht durchgeführt haben, beziehungsweise aus der Auswertung herausgenommen wurden (siehe 3.2.5 Verhaltensversuche). Einen Überblick verschafft Tabelle 8, in der die Anzahl der Tiere aufgelistet wurde, die für die jeweiligen Versuche ausgewertet wurden.

Tabelle 8: Gesamtanzahl aller Tiere, die pro Zeitpunkt und Gruppe für die unterschiedlichen Verhaltensversuche ausgewertet wurden. Abbildung angepasst nach Patzwaldt et al. ¹⁵⁸.

Zeitpunkt	Beam Walk		Sticky Label		Open Field		Grip Test	
	Kontrolle	Ambroxol	Kontrolle	Ambroxol	Kontrolle	Ambroxol	Kontrolle	Ambroxol
Baseline	32	15	31	14	22	11	33	15
24 h	33	15	31	14	21	10	33	15
72 h	26	12	25	11	18	10	26	12
1 Woche	19	10	18	9	17	9	19	10
1 Monat	19	10	18	9	12	8	19	10

Zur Analyse aller Verhaltensversuche wurde eine zweifache ANOVA mit den Zeitpunkten 24 h bis 1 Monat durchgeführt. Alle Ergebnisse bezüglich der statistischen Auswertung der ANOVA können der Tabelle 9 entnommen werden. Unterschiede zwischen den Gruppen während der Baseline wurden mit einem zweiseitigen t-Test überprüft. Zur Analyse des Erfolgs wurde ein Chi²-Test durchgeführt.

Für den ersten Verhaltensversuch mussten die Tiere über einen Balken balancieren (Beam Walk Test). Zur besseren Validierung der Ergebnisse wurde ein Punktesystem (Score) eingeführt, mit dem die Tiere beim Überqueren des Balkens bewertet wurden. Je höher der Score war, desto schlechter schnitt das Tier im Versuch ab. Es konnte sowohl ein signifikanter Gruppeneffekt ($p = 0,036$) als auch ein signifikanter Zeiteffekt ($p = 0,004$) beobachtet werden. Während der Baseline überquerten alle Tiere den Balken etwa gleich gut (Kontrollgruppe: $0,38 \pm 0,32$; Ambroxolgruppe: $0,62 \pm 0,36$). Nach der Operation verschlechterte sich das Verhalten zunächst in beiden Gruppen auf einen Score von $3,08 \pm 2,23$ für die Kontrollgruppe und einen Score von $1,92 \pm 2,03$ für die Ambroxolgruppe ($p = 0,026$), besserte sich aber über die Zeit wieder. Nach 1 Monat erreichte die Kontrollgruppe wieder einen Score von $1,36 \pm 1,0$ und die Ambroxolgruppe von $1,1 \pm 0,75$, womit das Baseline-Niveau erreicht wurde. Zusätzlich zum Score wurde die erfolgreiche Überquerung des Balkens ausgewertet. Während der Baseline waren in beiden Gruppen 100% der Tiere in der Lage den Balken zu überqueren. Diese Zahl reduzierte sich nach 24 h auf 67% in der Kontrollgruppe und 87% in der Ambroxolgruppe. Damit waren signifikant weniger Tiere aus der Kontrollgruppe in der Lage den Balken zu überqueren ($p = 0,02$). Für die restlichen Zeitpunkte erholte sich die Prozentzahl wieder und lag für beide Gruppen zwischen 98% und 100%, wobei es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen Gruppen gab.

Beim Sticky Label Test wurde die Zeit gemessen, wie lange die Tiere benötigten, um ein kleines Stück Klebeband von den Vorderpfoten zu entfernen. Es konnte ein signifikanter Gruppen- und Zeiteffekt beobachtet werden ($p < 0,001$). Ähnlich wie bei dem Beam Walk Test verschlechterte sich das Verhalten aller Tiere zunächst nach der Operation und besserte sich über die Zeit wieder. Während der Baseline konnten die Tiere das Tape im Schnitt innerhalb von 37,7 s entfernen. 24 h nach dem Schlaganfall benötigte die Kontrollgruppe $105,3 \pm 32,5$ s und die Ambroxolgruppe $63,1 \pm 47,3$ s ($p = 0,001$). Die Zeit verbesserte sich für die Kontrollgruppe für die restlichen Zeitpunkte und erreichte eine finale Zeit von $38,3 \pm 35,0$ s. Dagegen hatte die Ambroxolgruppe ihren schlechtesten Wert nach 72 h und verbesserte sich danach auf eine finale Zeit von $16,3 \pm 9,5$ s, die sogar noch unter der Baseline-Zeit lag. Zusätzlich zu der Zeit wurde die erfolgreiche Entfernung des Tapes ausgewertet. Während der Baseline waren 94% in der Kontrollgruppe und 100% in der Ambroxolgruppe in der Lage das Tape zu entfernen. Nach 24 h

waren es in der Kontrollgruppe 19% und in der Ambroxolgruppe 64% ($p < 0,001$). Obwohl in der Kontrollgruppe nach 72 h wieder mehr Tiere in der Lage waren das Tape zu entfernen als nach 24 h, und sich die Zahl der Tiere in der Ambroxolgruppe noch einmal verringerte, waren dennoch die Tiere aus der Ambroxolgruppe zu diesem Zeitpunkt signifikant erfolgreicher ($p = 0,009$). Nach 1 Monat erreichte die Erfolgschance in der Ambroxolgruppe 100% und in der Kontrollgruppe 89%, wobei es keinen signifikanten Unterschied mehr gab.

Während des Open Field Tests konnten sich die Tiere in einer kleinen Arena frei bewegen, wobei ihre zurückgelegte Strecke aufgezeichnet wurde. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, wobei es weder einen signifikanten Gruppen- noch Zeiteffekt gab (Tabelle 9). Die zurückgelegte Strecke der Tiere reduzierte sich nach 24 h zunächst in beiden Gruppen etwas und stieg danach wieder an. Nach 1 Monat bewegte sich die Tiere aus der Kontrollgruppe weiter als während der Baseline (Baseline: $104,5 \pm 39,1$ m; 1 Monat $110,8 \pm 33,2$ m), während die Tiere aus der Ambroxolgruppe sich nach 1 Monat weniger weit bewegten als während der Baseline (Baseline: $103,7 \pm 33,0$ m; 1 Monat: $87,2 \pm 26,7$ m).

Im Grip Test wurde die Griffstärke der Tiere gemessen. Dafür wurden die Tiere von einem Gitter weggezogen, welches die maximale Griffstärke maß. Ausgehend von der Baseline wurde die Besserung errechnet. Es konnte sowohl ein signifikanter Gruppen- ($p = 0,035$) als auch Zeiteffekt ($p = 0,006$) beobachtet werden. In der subakuten und frühen chronischen Phase gab es zunächst kein Unterschied zwischen den Gruppen. Während sich die Kraft der Kontrolltiere nur gering veränderte, stieg sie für die Tiere aus der Ambroxolgruppe an und war nach 1 Monate signifikant größer ($p = 0,043$), als die Kraft der Tiere aus der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: $96 \pm 16\%$; Ambroxolgruppe: $110 \pm 18\%$).

Zusammenfassend konnte für den Beam Walk und den Sticky Label Test ein signifikant besseres Verhalten für die Ambroxoltiere in der frühen Phase nach dem Schlaganfall beobachtet werden. Der Grip Test zeigte in der Ambroxolgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine prozentual höhere Griffstärke zum letzten Zeitpunkt als während der Baseline.

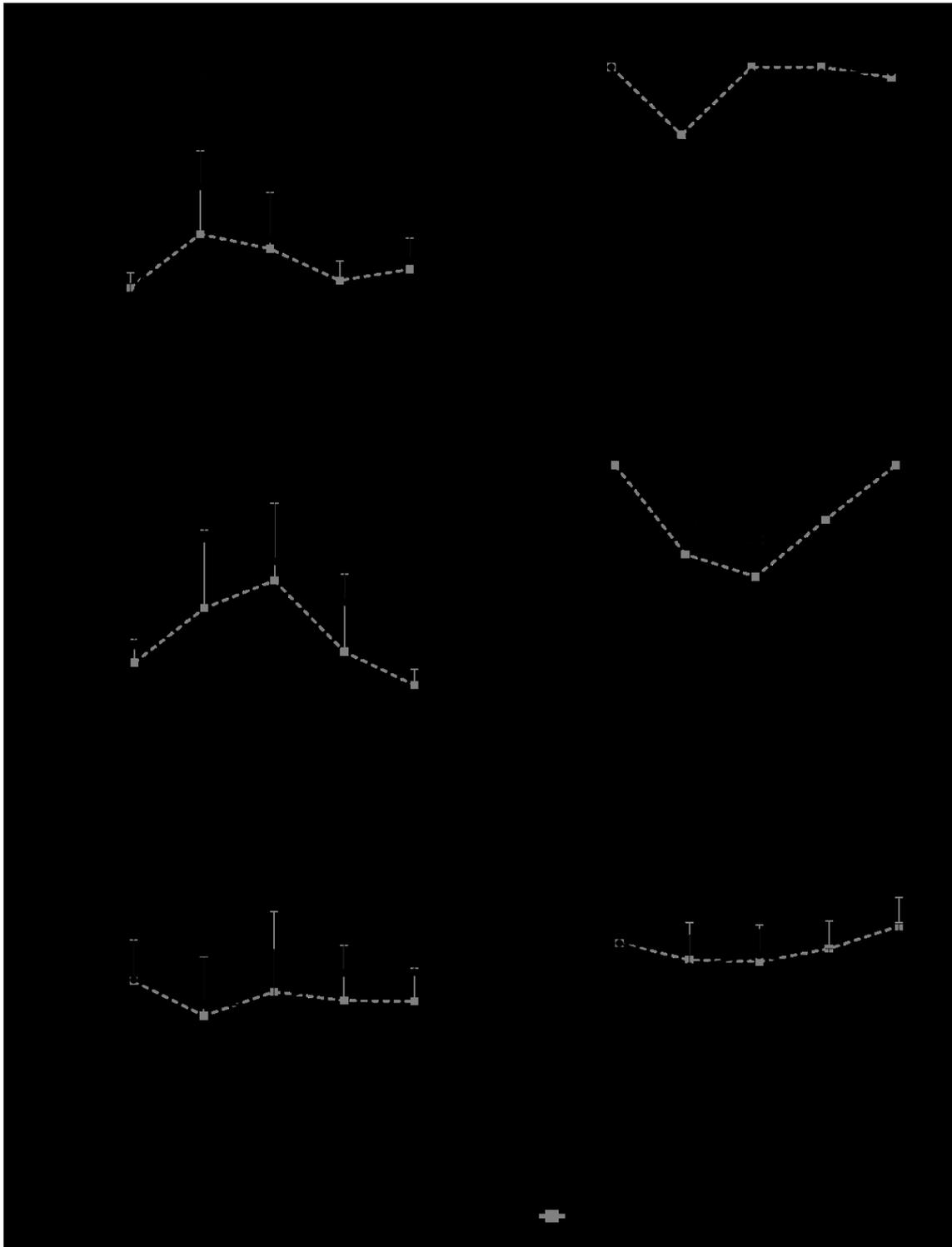


Abbildung 38: Ergebnisse der Verhaltenstests. Die Grafik zeigt die Ergebnisse der vier unterschiedlichen Verhaltenstests über die Zeit. Die Anzahl der Tiere, die ausgewertet wurden, sind für jeden Test, Zeitpunkt und Gruppe in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte dar, die Whisker die Standardabweichung. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: **: $p < 0,05$; ***: $p < 0,01$; ****: $p < 0,001$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

4.2.5 Fraktionelle Anisotropie – Integrität der Weißen Substanz

Nachdem in der Ambroxolgruppe die Ergebnisse einen positiven Effekt der Therapie auf das Verhalten zeigten, stellte sich die Frage nach der Integrität der betroffenen Neurone. Dies wurden anhand der berechneten FA-Karten genauer untersucht. Wie bereits erwähnt, lassen sich mit der FA-Karte Strukturen darstellen, die eine stark gerichtete Diffusion haben. Dies ist unter anderem in den Fasertrakten des *Corpus callosums* der Fall, wodurch diese gut mit FA-Karten sichtbar gemacht werden können (Abbildung 39). Abweichungen der FA-Werte im *Corpus callosum* nach der Okklusion können Auskunft über strukturelle Veränderungen im Gehirn geben. Für die statistische Auswertung wurde für die Zeitpunkte 24 h bis 1 Monat eine zweifache ANOVA angewendet. Die Unterschiede während der Okklusion wurden mit einem t-Test berechnet. Alle Informationen bezüglich der statistischen Auswertung der ANOVA können der Tabelle 9 entnommen werden. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Median und die Reichweite mit dem kleinsten und größten Wert dar.

Während der Okklusion (0 h) konnte auf den FA-Bildern kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 39 A). Dennoch ist im Vergleich zur Baseline in beiden Gruppen eine erhöhte Signalintensität in allen Bereichen zu sehen. Danach nahm die Intensität in beiden Gruppen ab. Dies ließ sich vor allem in der Hypointensität im Bereich der *Capsula externa* erkennen, die sich durch eine über die Zeit dünner werdende Linie und geringeren Signalintensität auszeichnete. Ein Unterschied zwischen den Gruppen war hier vor allem 72h und 1 Woche nach dem Schlaganfall zu beobachten (weißer Pfeil). Eine Quantifizierung der Ergebnisse ist in Abbildung 39 B-D dargestellt. Dabei wurde das *Corpus callosum* im Ganzen und seine Bereiche *Capsula interna*, *Capsula externa* und *Genu* genauer analysiert.

Allgemein konnte ein wellenförmiger Verlauf der Daten in allen Bereichen des *Corpus callosum* festgestellt werden, wobei dieser Verlauf am deutlichsten in der *Capsula externa* zu beobachten war (Abbildung 39 D). In allen Regionen und beiden Gruppen erhöhte sich die Signalintensität der FA-Werte während der Okklusion, was bereits in Abbildung 39 A zu erkennen war. Nach 72 h oder spätestens 1 Woche waren die FA-Werte am niedrigsten und erhöhten sich erneut leicht zum letzten Zeitpunkt, wobei die Werte in beiden Gruppen stets unterhalb der jeweiligen Baseline-Werte lagen.

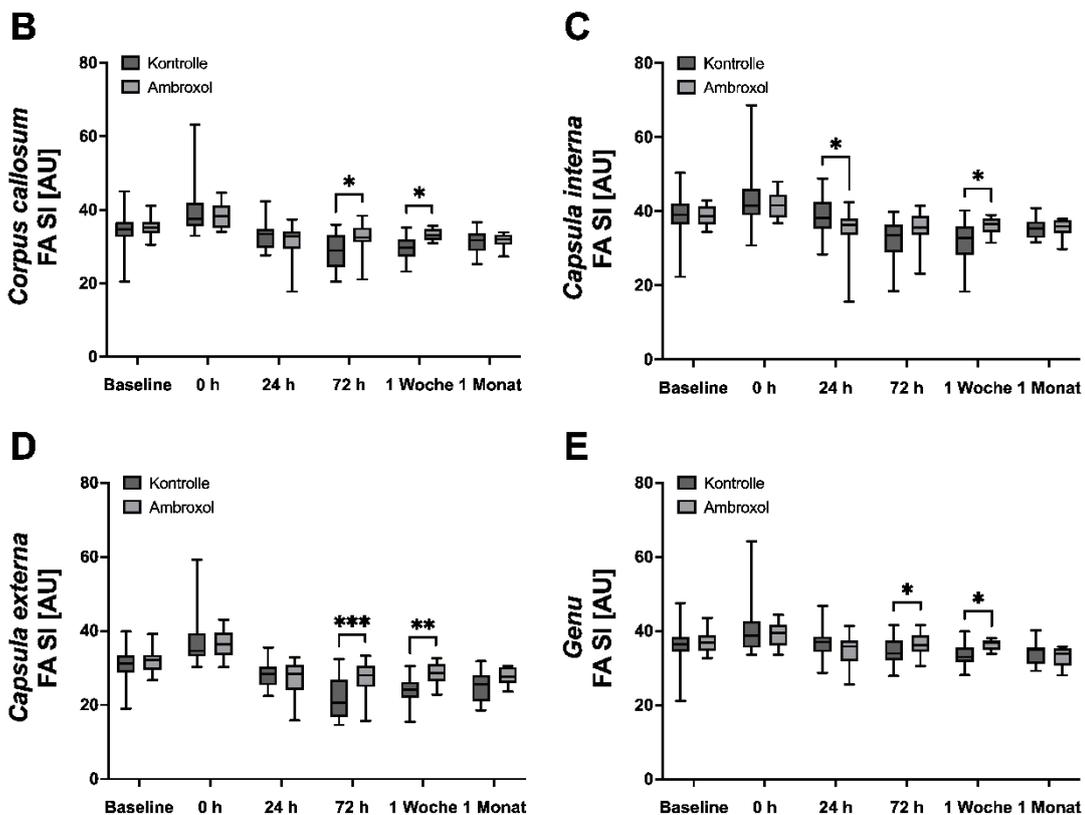
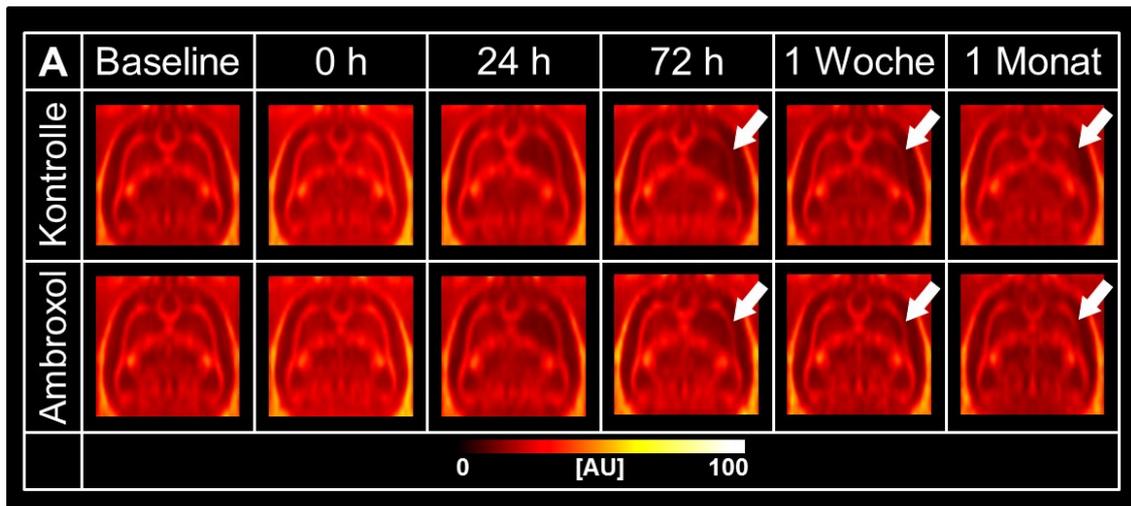


Abbildung 39: Fraktionale Anisotropie (FA)-Werte im *Corpus callosum*. Die Grafik zeigt (A) FA-Karten aus den Medianen, die pro Gruppe und pro Zeitpunkt aus allen Tieren berechnet wurden. Die weißen Pfeile zeigen auf die unterschiedlich starken Signalintensitäten (SI) der *Capsula externa* zwischen den Gruppen. Die FA-Karten zeigen die SI im Bereich (B) des ganzen *Corpus callosum*, (C) der *Capsula interna*, (D) der *Capsula externa* und (E) des *Genu* für beide Gruppen über die Zeit. Die Anzahl der ausgewerteten Tiere kann der Tabelle 7 entnommen werden. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten mit dem Median (zentrale Linie) und dem oberen und unteren Quartil. Die Whisker stellen den maximal und minimal Wert dar. Signifikanzen sind wie folgt angegeben: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Im kompletten *Corpus callosum* konnte mit der zweifachen ANOVA ein signifikanter Gruppeneffekt ($p = 0,042$) und eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ($p = 0,006$), aber kein signifikanter Zeiteffekt ($p = 0,184$) gefunden werden (Abbildung 39 B). Während der Okklusion wurden die höchsten FA-Werte gemessen

(Kontrollgruppe: 37,6 (33,0 – 63,2); Ambroxolgruppe: 38,3 (33,9 – 44,6)). Die FA-Werte der Kontrollgruppe waren nach 72 h mit 29,0 (20,5 – 36,0) am niedrigsten und erreichten nach 1 Monat einen finalen Wert von 31,7 (25,2 – 36,6). Die FA-Werte der Ambroxolgruppe lagen nach 72 h mit 32,5 (21,1 – 38,4) im Vergleich dazu höher und erreichten einen finalen FA-Wert von 32,0 (27,3 – 33,9). Zu den Zeitpunkten 72 h und 1 Woche waren die FA-Werte in der Ambroxolgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (72 h: $p = 0,01$; 1 Woche: $p = 0,02$).

In der *Capsula interna* war der Baseline-Wert für beide Gruppen im Vergleich zu den anderen Regionen am höchsten (Kontrollgruppe: 39,1 (22,3 – 50,4); Ambroxolgruppe: 38,7 (34,4 – 42,9); Abbildung 39 C). Obwohl für diese Region kein signifikanter Gruppeneffekt gefunden wurde, konnte ein signifikanter Zeiteffekt ($p = 0,041$) sowie eine signifikante Interaktion ($p = 0,004$) festgestellt werden. Nach 24 h waren zunächst die Werte in der Kontrollgruppe signifikant höher ($p = 0,02$), während nach 1 Woche die Werte in der Ambroxolgruppe signifikant höher waren ($p = 0,02$). Letzteres kann damit begründet werden, dass die Kontrollgruppe ihren tiefsten Wert nach 1 Woche (32,8 (18,3 – 40,2)) erreichte, während die Ambroxolgruppe ihren tiefsten Wert bereits nach 72 h (35,7 (23,3 – 41,5)) erreichte. Nach 1 Monat wies die Kontrollgruppe einen finalen FA-Wert von 35,3 (31,6 – 40,8) und die Ambroxolgruppe von 36,0 (29,9 – 38,0) auf.

In der *Capsula externa* wurde sowohl ein signifikanter Gruppen- ($p < 0,001$), als auch Zeiteffekt ($p = 0,015$) sowie eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ($p = 0,006$) gefunden (Abbildung 39 D). Während der Baseline lagen die Signalintensitätswerte für die Kontrollgruppe bei 31,2 (19,0 – 39,9) und für die Ambroxolgruppe bei 32,1 (26,7 – 39,2) und stiegen während der Okklusion auf 34,6 (30,3 – 59,2) für die Kontrollgruppe und auf 36,4 (30,2 – 43,0) für die Ambroxolgruppe an. Nach 72 h konnte für die Kontrollgruppe der niedrigste FA-Median (20,6 (14,6 – 32,4)) gemessen werden, der dann bis zum letzten Zeitpunkt auf 25,6 (18,6 – 31,8) wieder anstieg. Die FA-Werte für die Ambroxolgruppe veränderten sich hingegen nach dem 24 h Zeitpunkt (28,4 (15,9 – 32,9)) kaum und erreichten einen finalen FA-Wert von 27,6 (23,6 – 30,5). Durch die höheren FA-Werte in der Ambroxolgruppe unterschieden sich die Gruppen nach 72 h ($p < 0,001$) und 1 Woche ($p = 0,005$) signifikant voneinander.

Die Signalintensitätswerte im *Genu* zeigten von allen Regionen am wenigsten Veränderungen und es konnte nur eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ($p = 0,006$) beobachtet werden (Abbildung 39 E). Nach einer leichten Erhöhung der Signalintensitätswerte während der Okklusion lagen die FA-Werte nach 1 Monat für die Kontrollgruppe bei 35,0 (29,2 – 40,2) und für die Ambroxolgruppe bei 33,9 (28,1 – 35,8).

Trotz der geringen Veränderungen konnte in der Ambroxolgruppe nach 72 h ($p = 0,05$) und 1 Woche ($p = 0,03$) signifikant höhere Werte gemessen werden.

In Abbildung 40 sind die FA-Werte der kontralateralen Hemisphäre dargestellt. Dort konnten nur kleinere Schwankungen um den Baseline-Wert in der jeweiligen Region gemessen werden. Aufgrund der signifikanten Interaktion zwischen der Gruppe und der Zeit ($p = 0,02$), unterschieden sich die Werte im Genu nach 24 h signifikant voneinander ($p = 0,04$), wobei höhere Werte in der Kontrollgruppe gemessen wurden. Es konnte zu keinem weiteren Zeitpunkt und in keiner weiteren Region ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

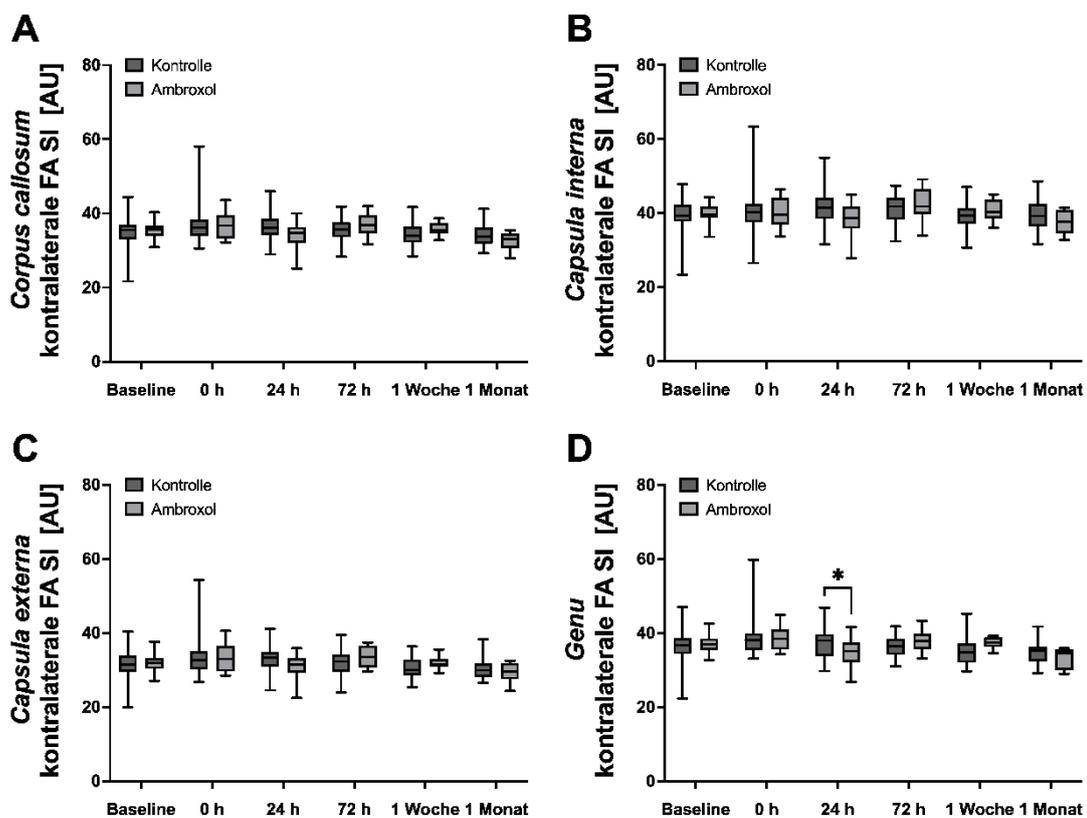


Abbildung 40: Fraktionelle Anisotropie (FA) Werte der kontralateralen Hemisphäre. Die Grafik zeigt die Signalintensität (SI) der FA-Karten im Bereich (A) des ganzen *Corpus callosum*, (B) der *Capsula interna*, (C) der *Capsula externa* und (D) des *Genu* für beide Gruppen über die Zeit. Die Anzahl der ausgewerteten Tiere kann der Tabelle 7 entnommen werden. Jeder Boxplot zeigt die Verteilung der Daten mit dem Median (zentrale Linie) und dem oberen und unteren Quartil. Die Whisker stellen den maximal und minimal Wert dar.

4.2.5.1 Fraktionelle Anisotropie – t-Test-Karten

Um den Unterschied der FA-Werte zu verdeutlichen, wurde eine Karte aus einer Voxel-für-Voxel t-Test-Analyse zwischen den Gruppen für jeden Zeitpunkt berechnet. Jeder weiße Voxel in der Abbildung 41 A stellt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen dar. Während der Okklusion gab es keine nennenswerten Unterschiede. Die Anzahl der signifikanten Voxel nahmen mit der Zeit zu und reduzierten sich nach 1 Monat wieder. Eine Quantifizierung der Beobachtungen innerhalb des *Corpus callosums* ist in der Abbildung 41 B dargestellt. Die Zahl gibt an, wie viel Prozent der gesamten VOIs sich insgesamt signifikant voneinander unterscheiden.

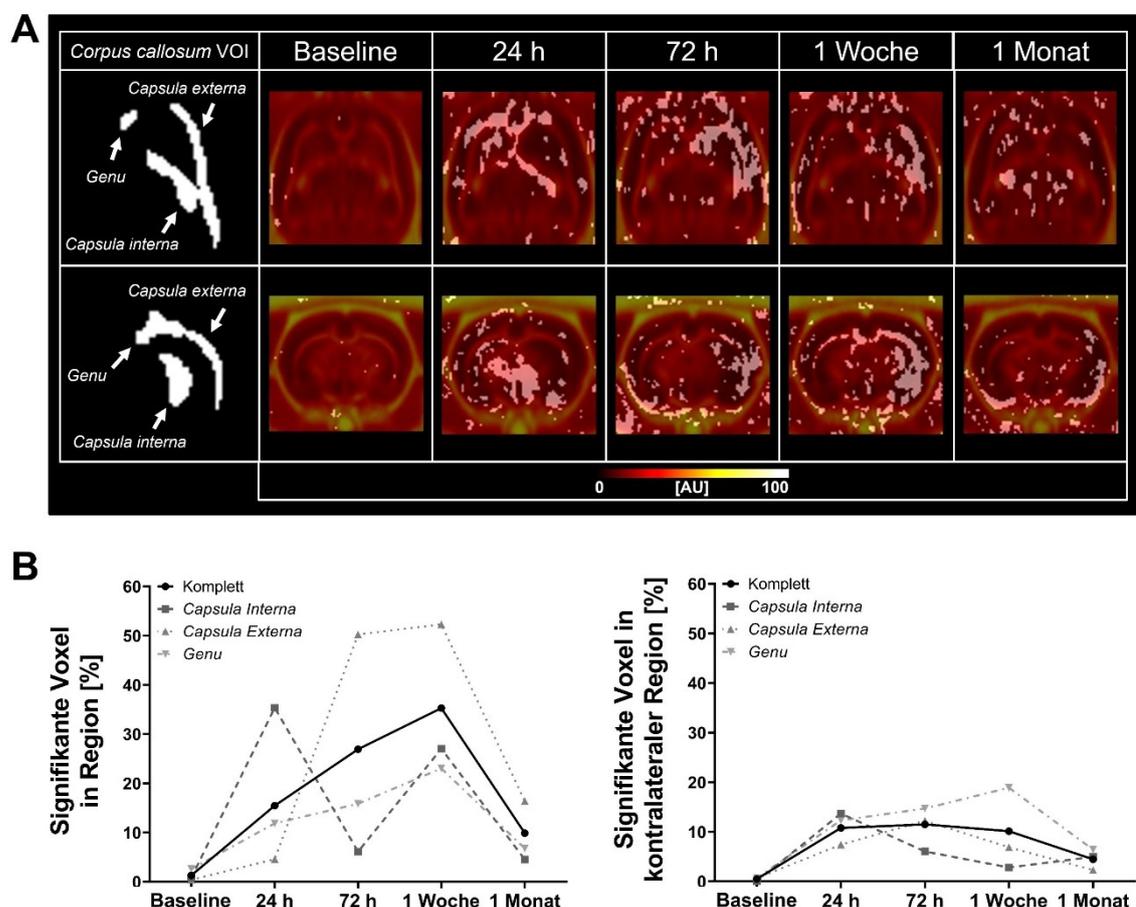


Abbildung 41: Fraktionelle Anisotropie (FA) t-Test-Karten. Die Grafik zeigt alle signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Ambroxolgruppe über die Zeit. **(A)** Dargestellt sind die VOI (engl.: „volume of interest“), die zur Auswertung manuell angefertigt wurden (links). Die FA-Karten sind aus dem Median aller Tiere beider Gruppen zusammen für jeden Zeitpunkt errechnet. Jeder weiße Voxel stellt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen dar. **(B)** Quantifizierung der in A dargestellten Bilder in beiden Hemisphären. Die Zahlen stellen dar, wie viel Prozent des jeweiligen VOI aus Volumen mit signifikanten Voxel besteht. Die Anzahl der ausgewerteten Tiere kann der Tabelle 7 entnommen werden. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Während der Okklusion lag die Prozentzahl der signifikanten Voxel im niedrigen einstelligen Bereich und erhöhte sich in allen Bereichen über die Zeit. Interessanterweise

konnten zu unterschiedlichen Zeitpunkte unterschiedlich große Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nach 24 h konnten die meisten signifikanten Voxel in der *Capsula interna* (35,4%) gefunden werden. Nach 72 h und 1 Woche waren die meisten signifikanten Voxel in der *Capsula externa* zu finden (jeweils über 50%). Im Genu gab es einen moderaten Anstieg, der seinen Höhepunkt nach 1 Woche mit 23,0% erreichte. Während der prozentuale Anteil der signifikanten Voxel im kompletten Corpus callosum, in der *Capsula externa* und im *Genu* kontinuierlich anstiegen, kam es in der *Capsula interna* zu großen Schwankungen. Dies spiegelt auch die Ergebnisse der FA-Werte wider, da die Werte in der *Capsula interna* zunächst in der Kontrollgruppe und später in der Ambroxolgruppe signifikant höher waren. Für alle Bereiche reduzierte sich der prozentuale Anteil zum letzten Zeitpunkt, bis sich im gesamten *Corpus callosum* nach 1 Monat noch 9,9%, in der *Capsula interna* 4,5%, im *Genu* 6,8% und in der *Capsula externa* 16,4% der Voxel zwischen den Gruppen signifikant unterschieden.

Auf der kontralateralen Hemisphäre konnten ebenfalls signifikante Voxel gefunden werden, wobei der prozentuale Anteil geringer war als in der ipsilateralen Hemisphäre. Die *Capsula interna* hatte mit 13,7% den größten Unterschied nach 24 h erreicht, während er für das komplette *Corpus callosum* mit 11,5% und die *Capsula externa* mit 12,2% nach 72 h erreicht war. Wie bereits in der ipsilateralen Hemisphäre hatte das *Genu* über die Zeit hinweg einen kontinuierlichen Anstieg, der nach 1 Woche bei 18,9% lag und damit der höchste Wert in der kontralateralen Hemisphäre war. Zum letzten Zeitpunkt lagen die Werte aller VOIs zwischen 2,3% und 6,4%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Signalintensität der FA-Werte für beide Gruppen während der Okklusion nur auf der ipsilateralen Hemisphäre anstieg und sich danach wieder reduzierte. Insgesamt konnte in der *Capsula externa* die größte Veränderung beobachtet werden. Aufgrund der niedrigeren FA-Werte in der Kontrollgruppe nach 72 h und 1 Woche, kam es zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, was auf eine geringere Integrität der Axone in der Kontrollgruppe hindeutete. Die Voxel-für-Voxel t-Test-Analyse zeigte prozentual am meisten Unterschiede in der *Capsula externa*. Außerdem waren starke Schwankungen in der *Capsula interna* zu sehen, die auch bereits während der Quantifizierung der FA-Werte beobachtet werden konnten.

4.2.6 Funktionelle Konnektivität mit fMRT

Als letzter Parameter wurde die funktionelle Konnektivität zwischen verschiedenen Gehirnarealen der Tiere mittels fMRT gemessen und untersucht. Dafür wurden Korrelationsmatrizen zwischen den gewünschten Arealen erstellt. In Abbildung 21 ist schematisch eine Matrize abgebildet. Entlang der x- und y-Achse sind jeweils die gleichen zu

korrelierenden Gehirnregionen dargestellt. Eine Auflistung der Abkürzungen ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Jede Hirnregion stellt mit beiden Hemisphären jeweils ein Viereck dar, wobei die kontralaterale (linke) Hemisphäre immer zuerst abgebildet ist. Die Farbe des Vierecks gibt Aufschluss über die Stärke der Korrelation. Selbstkorrelationen, wie beispielsweise die Korrelation des linken *Striatums* mit dem linken *Striatum*, wurden auf null gesetzt (grün markierte Vierecke). Entlang dieser diagonalen Linie verläuft in der Korrelationsmatrize die Grenze zwischen den Gruppen oder den Zeitpunkten.

Nur Tiere, die einen vollständigen fMRT-Datensatz (Baseline, 24 h und 1 Monat) hatten, wurden ausgewertet (Kontrolle: $n = 17$; Ambroxol: $n = 9$). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der FDR-Korrektur nach Benjamini-Hochberg auf Mehrfachvergleiche korrigiert. In den Abbildungen sind auch die nicht-korrigierten Signifikanzen angegeben. Vergleiche, die nach der FDR-Korrektur noch immer signifikant waren, wurden durch ein blaues Signifikanzsternchen mit Kries farblich kenntlich gemacht.

4.2.6.1 Korrelationen zwischen den Gruppen

In Abbildung 42 sind zunächst die Korrelationen des gesamten Gehirns beider Gruppen dargestellt. Es konnten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, die nach der FDR-Korrektur aber nicht mehr signifikant waren. Daher sollten die Gruppenvergleiche generell mit Vorsicht betrachtet werden.

Während der Baseline war der Median des Pearson-Korrelationskoeffizienten in beiden Gruppen ähnlich, wobei er für die Kontrollgruppe etwas höher lag (Kontrollgruppe: $r = 0,424$; Ambroxolgruppe: $r = 0,387$). Dadurch konnten vor der FDR-Korrektur vereinzelt signifikant höhere Korrelationen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Ambroxolgruppe festgestellt werden. Nach 24 h reduzierte sich die Stärke der Korrelationen in beiden Gruppen, wobei eine größere Reduktion des Pearson-Korrelationskoeffizienten in der Ambroxolgruppe beobachtet werden konnte (Kontrollgruppe: $r = 0,360$; Ambroxolgruppe: $r = 0,249$). Zu diesem Zeitpunkt waren in der Kontrollgruppe vor der FDR-Korrektur 230 Korrelationen signifikant höher als in der Ambroxolgruppe. Nach 1 Monat gab es hingegen kaum Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Korrelationen in den Hirnregionen waren in beiden Gruppen wieder höher wobei der Korrelationskoeffizient für die Kontrollgruppe bei $r = 0,342$ und in der Ambroxolgruppe bei $r = 0,321$ lag. Damit war der Korrelationskoeffizient in beiden Gruppen etwas niedriger als während der Baseline.

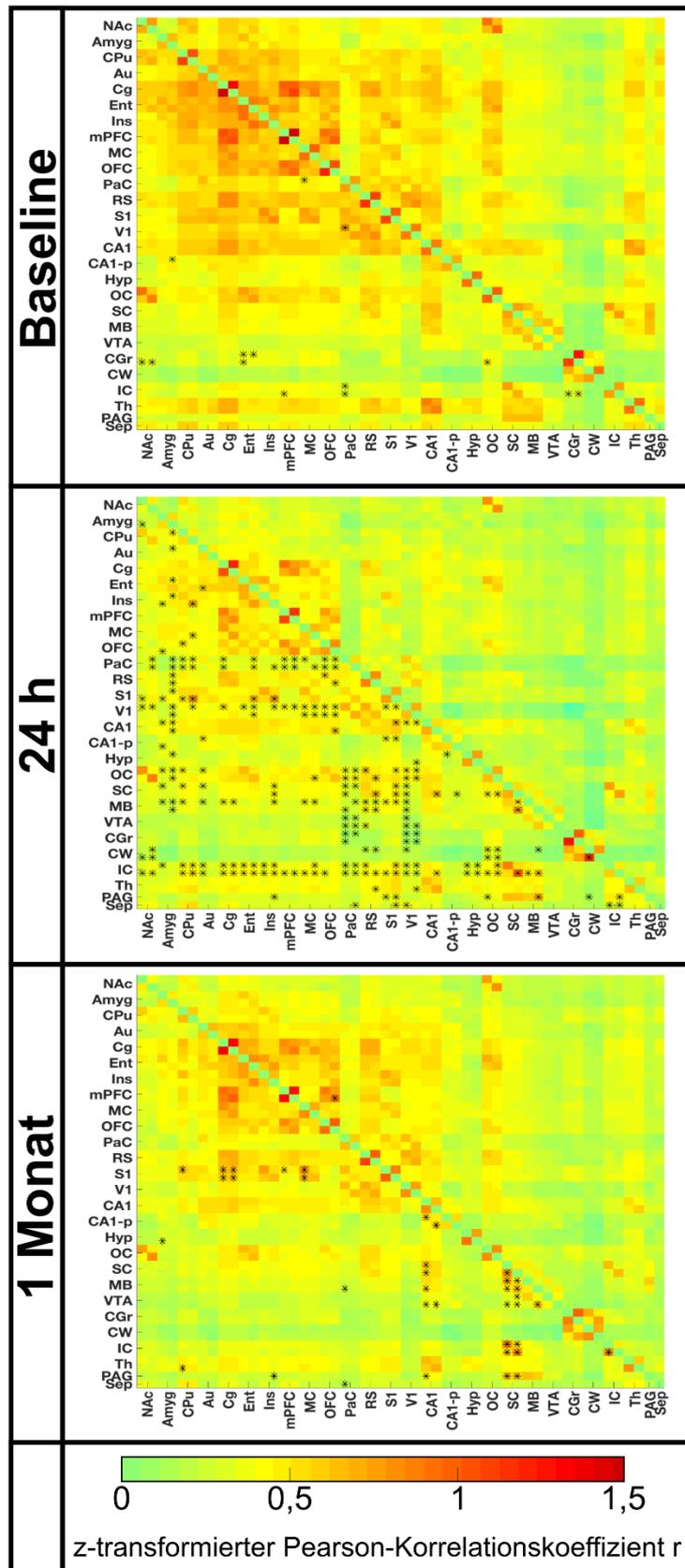


Abbildung 42: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Gruppen für das ganze Gehirn. Die Grafik zeigt die Korrelationsmatrizen zu den drei Zeitpunkten (Baseline, 24 h und 1 Monat) des ganzen Gehirns. Im oberen Dreieck sind die Korrelationen der Ambroxolgruppe und im unteren Dreieck die Korrelationen der Kontrollgruppe dargestellt. Die Abkürzungen der einzelnen Hirnregionen können der Tabelle 4 entnommen werden. Die Farbskala stellt den z-transformierten Pearson-Korrelationskoeffizient r dar. Signifikanzen vor FDR-Korrektur sind wie folgt angegeben: “*”: $p < 0,05$. Kontrolle: $n = 17$; Ambroxol: $n = 9$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Da die motorische Bahn durch das MCAO-Schlaganfallmodell besonders betroffen war, wurden die funktionellen Konnektivitäten zwischen den Regionen innerhalb der motorischen Bahn genauer untersucht (Abbildung 43). Während der Baseline konnte kein Unterschied zwischen den Korrelationen der beiden Gruppen gefunden werden. Der Median des Korrelationskoeffizienten war in beiden Gruppen ähnlich (Kontrollgruppe: $r = 0,561$; Ambroxolgruppe: $r = 0,509$). Nach 24 h konnte in der motorischen Bahn vor der FDR-Korrektur eine signifikant höhere Korrelation in der Kontrollgruppe vor allem zwischen dem ipsi- und kontralateralem *Striatum* und dem ipsilateralen *S1* und *M1 Cortex* festgestellt werden. Der Median des Korrelationskoeffizienten lag für die Kontrollgruppe höher ($r = 0,486$) als für die Ambroxolgruppe ($r = 0,359$). Nach 1 Monat waren Korrelationen in der Kontrollgruppe vor der FDR-Korrektur vor allem zwischen dem *S1 Cortex*, dem kontralateralen *M1 Cortex* und dem kontralateralen *Striatum* gegenüber der Ambroxolgruppe signifikant höher. Insgesamt blieb der Korrelationskoeffizient nach 1 Monat für die Kontrollgruppe bei $r = 0,486$ und war damit immer noch etwas höher als für die Ambroxolgruppe ($r = 0,410$).

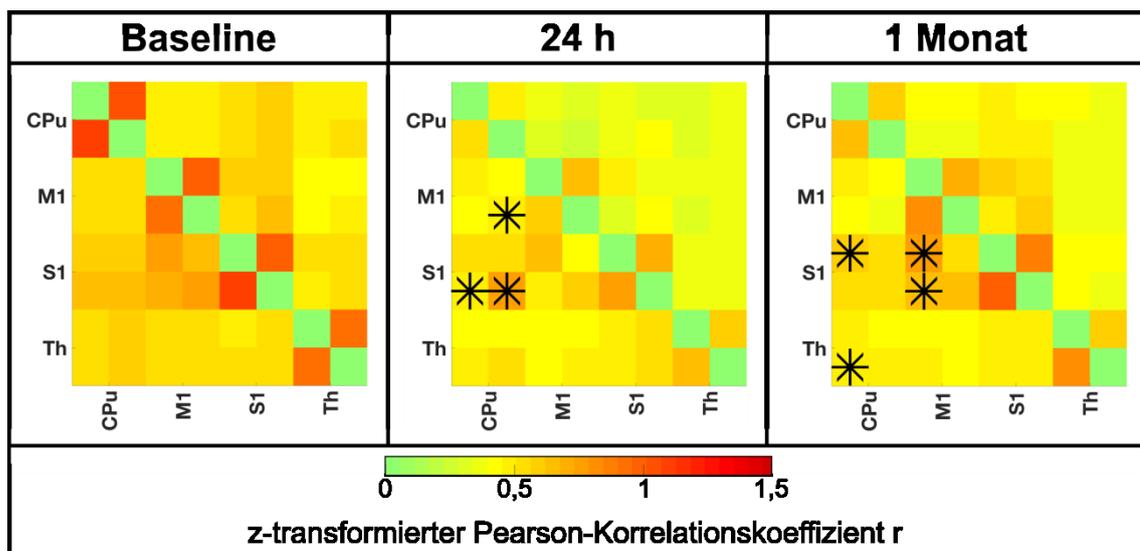


Abbildung 43: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Gruppen für die motorische Bahn. Die Grafik zeigt die Korrelationsmatrizen zu den drei Zeitpunkten (Baseline, 24 h und 1 Monat) der motorischen Bahn. Die Abkürzungen der einzelnen Hirnregionen können der Tabelle 4 entnommen werden. Die Farbskala stellt den z-transformierten Pearson-Korrelationskoeffizient r dar. Signifikanzen vor FDR-Korrektur sind wie folgt angegeben: '*': $p < 0,05$. Kontrolle: $n = 17$; Ambroxol: $n = 9$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

4.2.6.2 Korrelationen zwischen den Zeitpunkten

Um zu überprüfen, ob und welche Veränderungen in der funktionellen Konnektivität innerhalb der Gruppen über die Zeit vorhanden waren, wurden die Konnektivitäten im ganzen Gehirn und in der motorischen Bahn für jede Gruppe einzeln untersucht. In Abbildung 44 sind die Konnektivitäten mit allen 52 Hirnregionen dargestellt. In beiden

Gruppen zeigte sich eine Reduktion der funktionellen Konnektivität nach 24 h im Vergleich zur Baseline. Allerdings waren, wie zuvor bereits beobachtet wurde, in der Ambroxolgruppe deutlich mehr Korrelationen signifikant reduziert (355 Korrelationen vor der FDR-Korrektur; 14 Korrelationen nach der FDR-Korrektur), als in der Kontrollgruppe (202 Korrelationen vor der FDR-Korrektur; 8 Korrelationen nach der FDR-Korrektur). Während sich zwischen 24 h und 1 Monat die Korrelationen in der Kontrollgruppe kaum erholten (11 Korrelationen vor der FDR-Korrektur; 0 Korrelationen nach der FDR-Korrektur), fiel auf, dass in der Ambroxolgruppe nach 1 Monat Korrelationen wieder signifikant höher waren als zum 24 h Zeitpunkt (110 Korrelationen vor der FDR-Korrektur; 2 Korrelationen nach der FDR-Korrektur). Der Vergleich zwischen der Baseline und 1 Monat zeigt die langfristigen Veränderungen in den Korrelationen durch den Schlaganfall. Hier konnte beobachtet werden, dass in der Kontrollgruppe während der Baseline 140 Korrelationen vor der FDR-Korrektur (2 Korrelationen nach der FDR-Korrektur) signifikant höher waren als nach 1 Monat und in der Ambroxolgruppe während der Baseline 69 Korrelationen vor der FDR-Korrektur (0 Korrelationen nach der FDR-Korrektur) signifikant höher waren als nach 1 Monat. Auffällig war hierbei, dass in der Kontrollgruppe vor der FDR-Korrektur viele Korrelationen im Zusammenhang mit dem ipsilateralen *Striatum* während der Baseline signifikant höher waren als nach 1 Monat. In der Ambroxolgruppe hingegen waren vor der FDR-Korrektur hauptsächlich Korrelationen mit dem Hypocampus während der Baseline signifikant höher als nach 1 Monat.

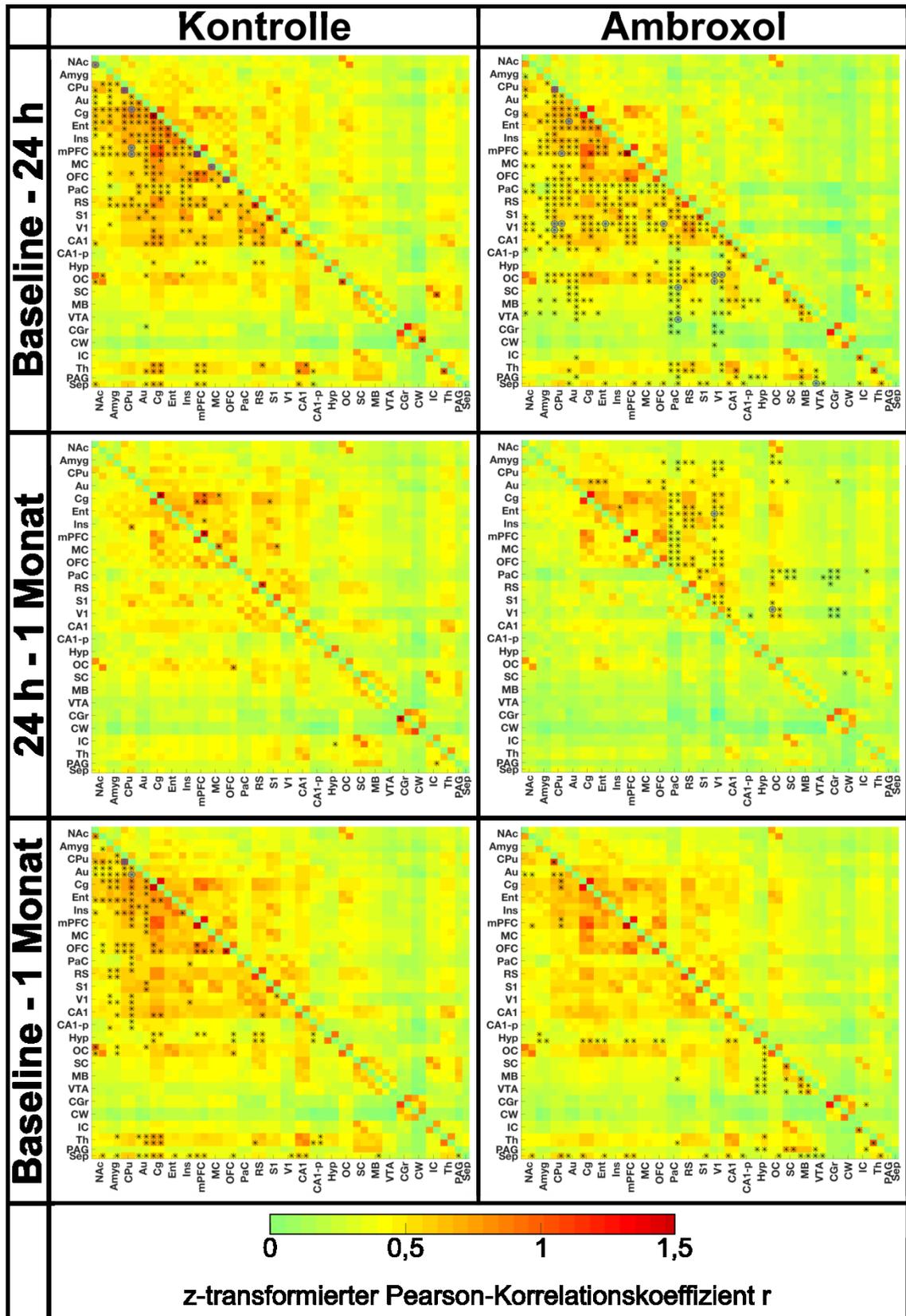


Abbildung 44: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Zeitpunkten für das ganze Gehirn. Die Grafik zeigt die Korrelationsmatrizen der Gruppen zwischen den Zeitpunkten (Baseline/24h, 24h/1Monat und Baseline/1Monat) für das ganze Gehirn. Die Abkürzungen der einzelnen Hirnregionen können der Tabelle 4 entnommen werden. Die Farbskala stellt den z-transformierten Pearson-Korrelationskoeffizient r dar. Signifikanzen vor der FDR-Korrektur sind wie folgt angegeben: ‘*’: $p < 0,05$. Signifikanzen nach der FDR-Korrektur sind blau und mit einem Kreis umrandet. Kontrolle: $n = 17$; Ambroxol: $n = 9$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Als nächstes wurde die motorische Bahn genauer untersucht (Abbildung 45). Wie bereits durch die Verhaltensversuche erwartet, wurden in beiden Gruppen in der motorischen Bahn reduzierte Korrelationen zum 24 h Zeitpunkt im Vergleich zur Baseline gefunden. Dabei war auffällig, dass in der Ambroxolgruppe die Korrelationen vor allem zum kontralateralen *Striatum* nach 24 h im Vergleich zur Baseline signifikant reduziert waren, obwohl die Gruppe in allen Verhaltensversuchen besser abschnitt. In beiden Gruppen war außerdem die stärkste Korrelationsreduktion zwischen dem ipsi- und kontralateralen *Striatum* von über 50% zu beobachten (Kontrollgruppe: 51%; Ambroxolgruppe: 55%), die auch nach der FDR-Korrektur signifikant war. Während die reduzierten Korrelationen in der Kontrollgruppe nach der FDR-Korrektur fast alle signifikant blieben, waren es in der Ambroxolgruppe nur noch 2 Korrelationen.

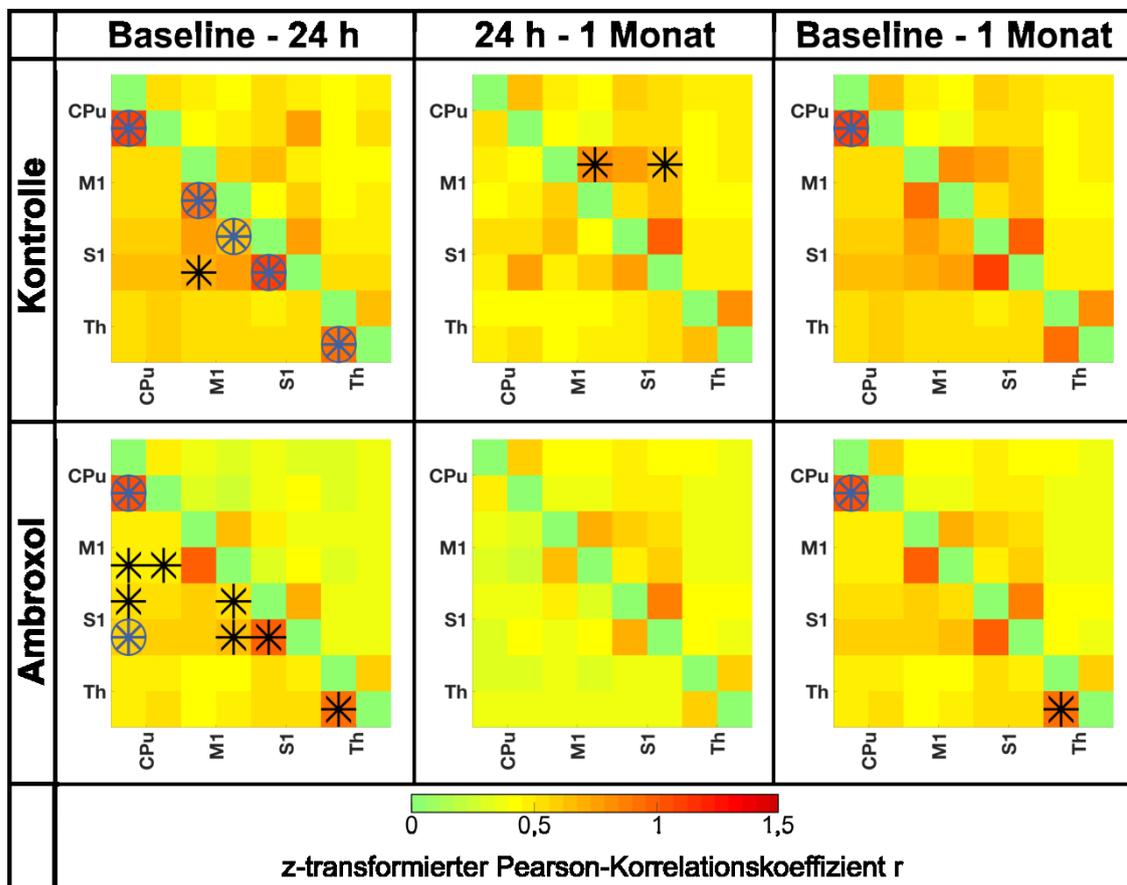


Abbildung 45: fMRT-Korrelationsmatrizen zwischen den Zeitpunkten für die motorische Bahn. Die Grafik zeigt die Korrelationsmatrizen für die Gruppen zwischen den Zeitpunkten (Baseline/24h, 24h/1Monat und Baseline/1Monat) der motorischen Bahn. Die Abkürzungen der einzelnen Hirnregionen können der Tabelle 4 entnommen werden. Die Farbskala stellt den z-transformierten Pearson-Korrelationskoeffizient r dar. Signifikanzen vor der FDR-Korrektur sind wie folgt angegeben: “*”: $p < 0,05$. Signifikanzen nach der FDR-Korrektur sind blau und mit einem Kreis umrandet. Kontrolle: $n = 17$; Ambroxol: $n = 9$. Abbildung angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Zwischen den Zeitpunkten 24 h und 1 Monat unterschied sich der Korrelationskoeffizient der Kontrollgruppe im Mittel kaum (24 h: $r = 0,486$; 1 Monat: $r = 0,486$), wodurch nach der FDR-Korrektur auch in der Kontrollgruppe keine signifikanten Korrelationen mehr beobachtet werden konnte. Obwohl der Unterschied des Medians des Korrelationskoeffizienten in der Ambroxolgruppe deutlich größer war (24 h: $r = 0,359$; 1 Monat: $r = 0,410$), konnte hier weder vor noch nach der FDR-Korrektur signifikant höhere Korrelationen festgestellt werden. Im Vergleich zwischen der Baseline und 1 Monat war zu erkennen, dass in beiden Gruppen die Korrelation zwischen dem ipsi- und kontralateralen *Striatum* nach 1 Monat immer noch signifikant niedriger war als während der Baseline. Zwar verbesserte sich die Korrelation für beide Gruppen, dennoch waren sie um 43% für die Kontrollgruppe und um 44% für die Ambroxolgruppe reduziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten, da der Median des Pearson-Korrelationskoeffizienten in der Ambroxolgruppe nach 24 h deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe. Dennoch konnten nur vor der FDR-Korrektur im direkten Gruppenvergleich im gesamten Gehirn und in der motorischen Bahn signifikante Veränderungen gefunden werden. Darüber hinaus waren mehr Korrelationen in der motorischen Bahn der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Ambroxolgruppe, obwohl zwischen Baseline und 24 h insgesamt auch nach der FDR-Korrektur im ganzen Gehirn mehr Signifikanzen in der Ambroxolgruppe gefunden werden konnten.

4.2.7 Statistik

Die erhobenen Daten wurden statistisch mit einer zweiseitigen ANOVA im Zeitraum der Therapiegabe (24 h bis 1 Monat) analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Zusammenfassung aller ANOVA Ergebnisse für den Ambroxol-Versuch. Tabelle angepasst nach Patzwaldt *et al.* ¹⁵⁸.

Hemisphäre	Parameter	Region	Variablen	df	df-Fehler	F	p
Ipsilateral	ADC	Schlaganfall	Gruppe	1	140	5,32	0,023
Ipsilateral	ADC	Schlaganfall	Zeit	3	140	82,62	<0,001
Ipsilateral	ADC	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	3	140	6,44	<0,001
Ipsilateral	ADC	<i>Striatum</i>	Gruppe	1	138	5,56	0,02
Ipsilateral	ADC	<i>Striatum</i>	Zeit	3	138	49,74	<0,001
Ipsilateral	ADC	<i>Striatum</i>	Gruppe*Zeit	3	138	6,16	<0,001

Ipsilateral	ADC	<i>Cortex</i>	Gruppe	1	129	0,06	0,803
Ipsilateral	ADC	<i>Cortex</i>	Zeit	3	129	91,28	<0,001
Ipsilateral	ADC	<i>Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	129	3,33	0,022
Verhältnis	ADC	Schlaganfall	Gruppe	1	140	4,3	0,04
Verhältnis	ADC	Schlaganfall	Zeit	3	140	77,65	<0,001
Verhältnis	ADC	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	3	140	5,85	<0,001
Verhältnis	ADC	<i>Striatum</i>	Gruppe	1	138	5,56	0,028
Verhältnis	ADC	<i>Striatum</i>	Zeit	3	138	49,74	<0,001
Verhältnis	ADC	<i>Striatum</i>	Gruppe*Zeit	3	138	6,16	<0,001
Verhältnis	ADC	<i>Cortex</i>	Gruppe	1	129	0,06	0,684
Verhältnis	ADC	<i>Cortex</i>	Zeit	3	129	91,28	<0,001
Verhältnis	ADC	<i>Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	129	3,33	0,031
-	Beam Walk	-	Gruppe	1	136	4,47	0,036
-	Beam Walk	-	Zeit	3	136	4,73	0,004
-	Beam Walk	-	Gruppe*Zeit	3	136	0,73	0,538
Ipsilateral	FA	CC	Gruppe	1	141	4,2	0,042
Ipsilateral	FA	CC	Zeit	3	141	1,64	0,184
Ipsilateral	FA	CC	Gruppe*Zeit	3	141	4,32	0,006
Ipsilateral	FA	Interna	Gruppe	1	141	1,2	0,275
Ipsilateral	FA	Interna	Zeit	3	141	2,82	0,041
Ipsilateral	FA	Interna	Gruppe*Zeit	3	141	4,58	0,004
Ipsilateral	FA	Externa	Gruppe	1	141	14,69	<0,001
Ipsilateral	FA	Externa	Zeit	3	141	3,59	0,015
Ipsilateral	FA	Externa	Gruppe*Zeit	3	141	4,21	0,007
Ipsilateral	FA	<i>Genu</i>	Gruppe	1	141	0,76	0,386
Ipsilateral	FA	<i>Genu</i>	Zeit	3	141	1,93	0,127
Ipsilateral	FA	<i>Genu</i>	Gruppe*Zeit	3	141	4,35	0,006
Kontralateral	FA	CC	Gruppe	1	141	0,02	0,894
Kontralateral	FA	CC	Zeit	3	141	4,29	0,006
Kontralateral	FA	CC	Gruppe*Zeit	3	141	3,03	0,032
Kontralateral	FA	Interna	Gruppe	1	141	0,58	0,447

Kontralateral	FA	Interna	Zeit	3	141	3,04	0,031
Kontralateral	FA	Interna	Gruppe*Zeit	3	141	2,62	0,053
Kontralateral	FA	Externa	Gruppe	1	141	0,03	0,856
Kontralateral	FA	Externa	Zeit	3	141	4,63	0,004
Kontralateral	FA	Externa	Gruppe*Zeit	3	141	2,4	0,071
Kontralateral	FA	<i>Genu</i>	Gruppe	1	141	0	0,966
Kontralateral	FA	<i>Genu</i>	Zeit	3	141	3,79	0,012
Kontralateral	FA	<i>Genu</i>	Gruppe*Zeit	3	141	3,36	0,021
-	Grip	-	Gruppe	1	136	4,53	0,035
-	Grip	-	Zeit	3	136	4,37	0,006
-	Grip	-	Gruppe*Zeit	3	136	1,74	0,163
-	Open Field	-	Gruppe	1	97	1,66	0,201
-	Open Field	-	Zeit	3	97	1,17	0,325
-	Open Field	-	Gruppe*Zeit	3	97	0,85	0,471
Ipsilateral	% IS	<i>Striatum</i>	Gruppe	1	141	7,03	0,009
Ipsilateral	% IS	<i>Striatum</i>	Zeit	3	141	1,16	0,326
Ipsilateral	% IS	<i>Striatum</i>	Gruppe*Zeit	3	141	0,3	0,822
Ipsilateral	% IS	<i>Cortex</i>	Gruppe	1	141	17,58	<0,001
Ipsilateral	% IS	<i>Cortex</i>	Zeit	3	141	0,09	0,967
Ipsilateral	% IS	<i>Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	141	0,71	0,549
Ipsilateral	% IS	<i>M1 Cortex</i>	Gruppe	1	141	5,42	0,021
Ipsilateral	% IS	<i>M1 Cortex</i>	Zeit	3	141	0,46	0,71
Ipsilateral	% IS	<i>M1 Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	141	0,13	0,945
Ipsilateral	% IS	<i>S1 Cortex</i>	Gruppe	1	141	14,18	<0,001
Ipsilateral	% IS	<i>S1 Cortex</i>	Zeit	3	141	0,26	0,857
Ipsilateral	% IS	<i>S1 Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	141	0,37	0,778
Ipsilateral	% IS	Rest	Gruppe	1	141	0,27	0,606
Ipsilateral	% IS	Rest	Zeit	3	141	3,5	0,017
Ipsilateral	% IS	Rest	Gruppe*Zeit	3	141	1,05	0,371
-	Sticky	-	Gruppe	1	127	12,16	<0,001
-	Sticky	-	Zeit	3	127	13,43	<0,001

-	Sticky	-	Gruppe*Zeit	3	127	0,86	0,462
Ipsilateral	T2	Schlaganfall	Gruppe	1	140	6,2	0,014
Ipsilateral	T2	Schlaganfall	Zeit	3	140	6,46	<0,001
Ipsilateral	T2	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	3	140	2,74	0,046
Ipsilateral	T2	<i>Striatum</i>	Gruppe	1	138	6,91	0,01
Ipsilateral	T2	<i>Striatum</i>	Zeit	3	138	14,61	<0,001
Ipsilateral	T2	<i>Striatum</i>	Gruppe*Zeit	3	138	2,98	0,034
Ipsilateral	T2	<i>Cortex</i>	Gruppe	1	129	0,65	0,42
Ipsilateral	T2	<i>Cortex</i>	Zeit	3	129	2,39	0,072
Ipsilateral	T2	<i>Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	129	1,26	0,291
Verhältnis	T2	Schlaganfall	Gruppe	1	140	6,63	0,011
Verhältnis	T2	Schlaganfall	Zeit	3	140	9,43	<0,001
Verhältnis	T2	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	3	140	2,7	0,048
Verhältnis	T2	<i>Striatum</i>	Gruppe	1	138	5,28	0,023
Verhältnis	T2	<i>Striatum</i>	Zeit	3	138	12,65	<0,001
Verhältnis	T2	<i>Striatum</i>	Gruppe*Zeit	3	138	3,38	0,02
Verhältnis	T2	<i>Cortex</i>	Gruppe	1	129	0,9	0,346
Verhältnis	T2	<i>Cortex</i>	Zeit	3	129	17,1	<0,001
Verhältnis	T2	<i>Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	129	0,84	0,472
Ipsilateral	Volume	Schlaganfall	Gruppe	1	141	10,39	0,002
Ipsilateral	Volume	Schlaganfall	Zeit	3	141	7,58	<0,001
Ipsilateral	Volume	Schlaganfall	Gruppe*Zeit	3	141	0,11	0,951
Ipsilateral	Volume	<i>Striatum</i>	Gruppe	1	141	22,56	<0,001
Ipsilateral	Volume	<i>Striatum</i>	Zeit	3	141	30,45	<0,001
Ipsilateral	Volume	<i>Striatum</i>	Gruppe*Zeit	3	141	0,36	0,784
Ipsilateral	Volume	<i>Cortex</i>	Gruppe	1	141	10,22	0,002
Ipsilateral	Volume	<i>Cortex</i>	Zeit	3	141	3,11	0,028
Ipsilateral	Volume	<i>Cortex</i>	Gruppe*Zeit	3	141	0,07	0,977

df: Freiheitsgrade (engl.: „degrees of freedom“); ADC: engl.: „apparent diffusion coefficient“; FA: fraktionelle Anisotropie; CC: *Corpus callosum*; Interna: *Capsula interna*; Externa: *Capsula externa*; IS: ischämischer Schlaganfall

5 Diskussion

5.1 EPO als Biomarker zur Detektion von Schlaganfällen

EPO ist für unseren Körper ein wichtiges Protein, da es neben der Erythrozytenbildung auch maßgeblich an Kaskaden beteiligt ist, die für das Überleben von Zellen in hypoxischem Gewebe verantwortlich sind^{46,159,160}. Dabei stimuliert endokrines, parakrines und autokrines EPO die Expression von EPO und EPOR über selbstregulierende Systeme und verhindert somit unter anderem die Apoptose und reduziert die Hypoxie in Geweben^{46,50,139,161–163}. In einigen Studien wurde festgestellt, dass EPO sogar das Schlaganfallvolumen reduzieren kann^{164,165}. In vorangegangenen Versuchen wurde bereits gezeigt, dass EPO als radioaktiver Tracer [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO in Schlaganfallgewebe sowohl in Mäusen, als auch in Ratten bindet. Bisher war es aber nur *ex vivo* gelungen eine Bindung des Tracers in Ratten und Mäusen anhand einer Autoradiographie zu zeigen. Ebenso wurde seine Spezifität in vorherigen Versuchen bisher nur *in vitro* dargelegt (Daten bisher nicht veröffentlicht). Im ersten Versuchsteil dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe eines Blockierungsversuchs auch *in vivo* bewiesen werden, dass [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO spezifisch an den EPOR bindet. Die vorliegenden Daten konnten dies leider nicht zeigen (Abbildung 25). Dabei war direkt zu Beginn recht auffällig, dass im Vergleich zu vorherigen Versuchen in Mäusen und Ratten, deutlich weniger Tracer im Gehirn band. In den noch nicht veröffentlichten Daten konnten Werte von bis zu 0,6% ID/cm³ bei Ratten mit einem Schlaganfall und sogar immer noch 0,3% ID/cm³ bei Ratten ohne Schlaganfall gemessen werden. Damit lagen die Werte in den vorherigen Versuchen um mehr als ein Zehntel über den hier gemessenen Werten (höchster Wert hier: 0,046% ID/cm³), obwohl die injizierte Aktivität mit 6 MBq und 18 MBq in den vorherigen Versuchen deutlich weniger war als bei dieser Arbeit mit 30 MBq.

Ein möglicher Grund dafür könnte die Größe des EPOs sein. EPO selbst besteht aus 165 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa⁴⁵. Intravenös injiziert, kann es durch die Blutbahn über kleine Gefäße fast überall hingelangen, sogar ins Gehirn, obwohl dieses von der Blut-Hirn-Schranke umgeben ist. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine physiologische Barriere, die zum Schutz des Gehirns selektiv die Bewegungen von Molekülen und Ionen zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystems bestimmt^{166–168}. Dadurch wird beispielsweise auch die Aufnahme von Medikamenten ins Gehirn erschwert¹⁶⁹. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus kapillaren Endothelzellen, welche an das Zentralnervensystem angrenzen, die so eng aneinander liegen, dass sich so genannte ‚*Tight Junctions*‘ (TJ) zwischen den Zellen bilden. Die Endothelzellen sind von einer Basallamina, Perizyten und den Endfüßchen der Astrozyten umgeben⁶². Diese

Endfüßchen sind eine spezialisierte Membrandomäne mit vielen Transportproteinen und Kanälen, die für die Aufrechterhaltung der Homöostase sorgen^{29,168}. Fast jeder Astrozyt hat über die Endfüßchen Kontakt zu mindestens einem der Blutgefäße und gewährleistet so die zelluläre Verbindung zu den Neuronen^{168,170}. Die Funktion der TJ als Barriere wird hauptsächlich von Transmembranproteinen gesteuert, die sich zwischen den Kontaktstellen befinden und eine parazelluläre Bewegung der meisten Moleküle verhindern¹⁶⁸. Diese Barriere können mehr als 98% aller kleinen Moleküle (< 400 Da) und nahezu 100% aller großen Moleküle nicht überwinden¹⁷¹. Kleine Gasmoleküle und kleine lipophile Moleküle wie Alkohol und wenige Medikamente diffundieren über die Barriere hinweg. Andere Moleküle, die nicht über die Blut-Hirn-Schranke diffundieren, können teilweise mit Hilfe von Transportproteinen durch die Zellen gelangen^{168,172–174}. Beispielsweise haben Studien gezeigt, dass auch EPO, obwohl es ein relativ großes Molekül ist, langsam über die Barriere transportiert wird^{49,173}. Die Tatsache, dass EPO in den vorliegenden Daten dennoch eine geringe Bindung auswies, könnte möglicherweise auf die Konjugation mit DFO (~752,9 Da pro Molekül^{175,176}) und der Radiomarkierung zurückzuführen sein, wodurch das Molekül zu groß für den Transport geworden ist. Darüber hinaus ist nicht sichergestellt, ob das konjugierte und radioaktiv markierte EPO noch immer von den Transporterproteinen erkannt wird. Außerdem ist eine schnelle Bindung des Tracers für radiologische Untersuchung wichtig.

Um sicherzustellen, dass das konjugierte und radioaktiv markierte EPO tatsächlich ins Gehirn gelangt und nicht von der Blut-Hirn-Schranke zurückgehalten wird, wurde für diese Studie ein durch den Schlaganfall eintretendes Phänomen genutzt. Durch die molekularen Vorgänge während eines Schlaganfalls kann es früher oder später zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke kommen^{177,178}. Dieser Zusammenbruch ist unter anderem durch Veränderungen der TJ und der endozytotischen Transportmechanismen charakterisiert, welche mit der Zeit die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht und sie so auch für größere Moleküle durchlässig macht¹⁷⁹. Es kann zu einer mehrphasigen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke kommen, deren Länge und Stärke von unterschiedlichen Parametern abhängig ist. Darunter zählt unter anderem die Dauer der Okklusion, das Ausmaß der Reperfusion und die Art des Schlaganfallmodells sowie die Tierart^{62,180}. Die erste Phase der biphasischen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke ereignet sich nach etwa 4-6 Stunden gefolgt von einer verspäteten Öffnung nach etwa 2-3 Tagen^{62,179,180}. Um bei dieser Studie von der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke zu profitieren und den langsamen Transport von EPO durch die Membran zu umgehen, wurde der Tracer 3 Stunden nach der Schlaganfallinduktion injiziert. Somit sollte eine schnelle Aufnahme des Tracers im Gehirn sichergestellt sein. Trotz dieser Maßnahme waren die Bindungswerte unerwartet niedrig. Dies könnte im Zusammenhang mit der

Okklusionsdauer stehen. Die Okklusionszeit in bisherigen Versuchen betrug 100 Minuten und war damit 1,5-mal länger. Um die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere zu erhöhen, wurde die Okklusionszeit für die Versuche dieser hier vorliegenden Arbeit auf 60 Minuten reduziert. Die kürzere Okklusionszeit könnte eine geringere Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zur Folge gehabt haben. Allerdings konnte dies nicht die ebenfalls geringen Biodistributionswerte in den anderen Organen erklären (Abbildung 27). Darüber hinaus war auch die Verteilung der Aktivität in den Organen anders als in vorherigen Versuchen. Dort zeigte die Milz die zweithöchste Tracerbindung, wobei die Werte von Herz, Knochen und Lunge vergleichbar waren. Außerdem hatte der Muskel deutlich höhere Werte als das Blut (Daten bisher nicht veröffentlicht). Daraufhin wurde das postoperative Narbengewebe in der Muskulatur genauer untersucht (Abbildung 26). Der Vorteil an diesem Gewebe ist, dass es zum einen nicht von der Blut-Hirn-Schranke umgeben ist und es zum anderen Hinweise darauf gibt, dass EPO eine wichtige Rolle bei der Heilung der Skelettmuskulatur spielt und somit auch bei diesem Prozess EPOR exprimiert wurden^{51,52,181,182}. Es konnte in diesem Bereich zwar eine erhöhte Konzentration des Tracers festgestellt werden, aber die Bindung des Tracers war ebenfalls sehr gering und es konnte kein Blockierungseffekt nachgewiesen werden. Daher müssen andere Gründe vorliegen, welche die niedrigen Werte erklären können.

Ein weiterer Faktor, der eine Rolle spielen könnte, ist die spezifische Aktivität. Um eine möglichst hohe spezifische Aktivität zu erreichen, wurde die Konzentration von DFO zu EPO im Vergleich zu den vorherigen Versuchen erhöht, damit mehr Bindungsstellen für das ⁸⁹Zr zur Verfügung standen. Trotzdem lag die spezifische Aktivität in diesem Versuch bei nur 3,33 MBq/μg und war damit im Vergleich zu den vorherigen Versuchen (10 MBq/μg) drei Mal geringer. Da durch die Konjugation mit DFO außerdem das finale Gewicht des EPO-DFO-Komplexes nicht bekannt war, konnte hier nur die scheinbare spezifische Aktivität angegeben werden¹⁴⁷. Die wahre spezifische Aktivität könnte daher durchaus schlechter sein. Die deutlich niedrigere spezifische Aktivität, verbunden mit einer 10-fach geringeren Bindung im Gewebe, könnte einer der Gründe dafür sein, warum die Tracerbindung in diesem Versuch so gering war. Eine hohe spezifische Aktivität des Tracers ist jedoch für eine gute Bindungsaffinität des Tracers, einem geringeren Risiko von Nebenwirkungen und für einen guten Bildkontrast im PET wichtig¹⁸³. Des Weiteren kann die Gegenwart von nicht-radioaktiv markierten Peptiden einen negativen Effekt auf die Bindung des Tracers haben¹⁸³. In diesem Zusammenhang sollte auch bedacht werden, dass eine höhere Chelatorkonzentration zwar die spezifische Aktivität steigern kann, gleichzeitig aber die Bindungsaffinität von EPO reduziert. Daher könnte es sein, dass für diesen Versuch das konjugierte EPO durch die erhöhte Chelatorkonzentration weniger gut an die EPOR band und damit einen weiteren Hauptgrund für die

geringen Werte darstellte. Andere Faktoren, wie eine Instabilität des Tracers, bei der sich der Chelator vom Nukleotid trennte, wie sie von einigen Studien beschrieben wurde^{184,185}, konnte ausgeschlossen werden. Die Stabilität des Tracers wurde in murinem Serum getestet und es konnte festgestellt werden, dass dieser während der Messzeitpunkte zu etwa $93,5\% \pm 2,8\%$ stabil war. Nach einer Woche waren knapp 90% des ⁸⁹Zr immer noch an den Chelator und das EPO gebunden, was sich mit den Ergebnissen von weiteren Studien deckt^{132,136,137}.

Nichtsdestotrotz hätte auch mit geringeren Bindungswerten, zumindest im Narbengewebe, ein Blockierungseffekt zu finden sein können, was aber nicht der Fall war. Möglicherweise spielte hier die Interaktion zwischen EPO und EPOR eine Rolle. Wie bereits erwähnt, ist die Genexpression von EPO ein geschlossener Kreislauf⁴⁵. Studien haben gezeigt, dass EPO selbst die EPOR hochregulieren kann^{181,186,187}. Es könnte also sein, dass durch die Injektion von reinem EPO, welches eigentlich die Rezeptoren blockieren sollte, die Expression von weiteren EPOR induziert wurde. Dadurch standen viele weitere Bindungsstellen, unter anderem auch für den Tracer, zur Verfügung. Möglicherweise mussten das radioaktive und das nicht-radioaktive EPO gar nicht um die Bindungsstellen konkurrieren, weshalb kein Blockierungseffekt festgestellt werden konnte. Darüber hinaus könnte die Wahl der Messzeitpunkte ebenfalls eine Rolle spielen. Fuge *et al.* konnte mit einem Blockierungsversuch an einem Tumormodell in Mäusen zeigen, dass EPO spezifisch an die Rezeptoren bindet¹⁸⁸. Allerdings konnte dieser Effekt nur nach 3 h und 6 h nach Injektion beobachtet werden. Nach 9 h war keine signifikant reduzierte Bindung in der blockierten Gruppe mehr zu erkennen¹⁸⁸. Dementsprechend könnte es sein, dass im Gehirn ebenfalls nur 6 h nach Injektion ein Blockierungseffekt zu erwarten ist. Interessanterweise konnten zu diesem Zeitpunkt in der vorliegenden Arbeit die höchsten Werte von allen gemessenen Zeitpunkten festgestellt werden, was diese Theorie unterstützen würde. Da aber eine durch den Schlaganfall induzierte erhöhte EPOR-Expression erst nach 12 bis 48 h vorhanden ist^{139,186}, kann angenommen werden, dass zu den gewählten Messzeitpunkt in den vorliegenden Ergebnissen kein Effekt detektiert werden konnte. Nicht nur deshalb, sondern auch, weil die gemessenen Werte eher einem Rauschen als einer echten Tracerbindung ähnelten, wurden die signifikanten Unterschiede, die zum 48 h gefunden werden konnten, als nicht aussagekräftig definiert. Um dieses Problem zu umgehen, sollten in zukünftigen Studien beide Substanzen möglichst simultan zu einem Zeitpunkt injiziert werden, an dem eine Expression von EPOR im Schlaganfallgewebe sichergestellt ist. Die nicht veröffentlichten Daten von früheren Studien zeigten die größte Bindung nach 48 h. Dennoch sollte dieser Zeitpunkt möglicherweise durch immunhistochemische Färbungen zuvor verifiziert werden. Die eigentliche Messung sollte dann innerhalb von 3 h bis 6 h nach Injektion stattfinden. Eine

dynamische PET-Messung direkt nach der Tracer-Injektion könnte darüber hinaus wichtige Informationen bezüglich der initialen Bindung des Tracers im Gewebe liefern.

5.1.1 Fazit und Ausblick von EPO zur Detektion von Schlaganfällen

Der *in vivo* Blockierungseffekt konnte mit diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist davon auszugehen, dass dies auf eine zu geringe spezifische Aktivität sowie eine verringerte Affinität von EPO zu den Rezeptoren zurückzuführen ist. Die Stabilität des Tracers während der Messzeitpunkte konnte allerdings bestätigt werden. Nachdem *ex vivo* in verschiedenen Spezies eine spezifische Bindung des Tracers bereits bewiesen wurde, ist es daher mit gut gewählten Messzeitpunkten nicht vollkommen auszuschließen, dass mit einem *in vivo* Blockierungsversuch die spezifische Bindung von [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO nachgewiesen werden kann. Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass die EPOR mRNA 12 h bis 24 h nach der Okklusion in Hypoxiegewebe exprimiert ist, sowie dass die EPOR in diesem Zeitraum immunreaktiv sind.^{50,139} Dies bedeutet, dass sowohl eine erhöhte EPOR Expression als auch eine Bindung des Tracers in Schlaganfallgewebe an noch lebenden Neuronen erwartet werden kann¹³⁹. In einem Experiment in der Retina, konnte in einem Ischämie ähnlichen Hypoxiezustand ein Rezeptorpeak bei 48 h festgestellt werden¹⁸⁹. In den vorherigen, aber bisher noch nicht veröffentlichten Daten konnte eine Bindung des Tracers nach bereits 24 h festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten auch, dass diese Bindung nach 48 h und 72 h nochmal höher war. In Anbetracht dessen und dass zu diesem Zeitpunkt ebenfalls mit einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu rechnen ist¹⁷⁹, sollte für eine Wiederholung des Versuchs der Zeitpunkt 48 h nach Schlaganfallbeginn für die simultane Injektion beider Substanzen gewählt werden. Alternativ könnte zusätzlich der Zeitpunkt der stärksten Rezeptorexpression mittels IHC und der größten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke mittels MRT ermittelt werden. In jedem Fall sollten die PET-Messung 3 h bis 6 h nach der Injektion erfolgen, da es Hinweise darauf gibt, dass kein Blockierungseffekt vor und nach diesen Zeitpunkten zu erwarten ist¹⁸⁸. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden nach 6 h die höchsten Aktivitätswerte gemessen. Außerdem sollte für weitere Versuche eventuell eine längere Okklusionszeit in Betracht gezogen werden, um eine hohe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu gewährleisten. Schlussendlich sollte außerdem eine hohe spezifische Aktivität des Tracers sichergestellt sein, da so zum einen weniger Peptide um die Rezeptoren konkurrieren würden und zum anderen die Bildqualität vom PET besser wäre¹⁸³. Allerdings sollte eine hohe spezifische Aktivität nicht auf Kosten der Affinität von [⁸⁹Zr]Zr-DFO-EPO zu den Rezeptoren erreicht werden.

5.2 Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle

Die Behandlung von Schlaganfällen ist eine sehr große Herausforderung, die in Zukunft durch die ansteigende Zahl der Patienten immer wichtiger wird. Die beiden bisher zugelassenen Behandlungsoptionen (tPA und mechanische Entfernung des Thrombus) können das Ausmaß des Schlaganfalls minimieren, dennoch stellt hauptsächlich das jeweilige zeitliche Therapiefenster und die reperusionsbedingten Schäden ein großes Problem in der Klinik dar^{54,55,57,58,61,69}. Neuroprotektive Therapien könnten hier einen Ausweg bieten, da sie den Verlust von Gewebe durch zelluläre oder molekulare Veränderungen mittels Gabe von pharmakologisch aktiven Substanzen verringern und die Schwere des Verlaufs reduzieren können^{33,66,69,190}. Ambroxol bringt viele Eigenschaften mit, die ein neuroprotektives Therapeutikum haben sollte. Daher wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit anhand unterschiedlicher Parameter untersucht, ob Ambroxol als neuroprotektives Medikament die Auswirkungen bei einem Schlaganfall reduzieren kann.

Bei der Analyse der Ergebnisse wurde zunächst die Größe des Schlaganfallvolumens untersucht, da ein kleineres Volumen in der Therapiegruppe ein Indiz für eine therapeutische Wirkung darstellen könnte. Zusätzlich wurden die motorischen und sensorischen Defizite anhand von Verhaltensversuchen analysiert. Weitere Erkenntnisse bezüglich der Schlaganfallentwicklung wurden aus den Ergebnissen der T2, DWI (ADC und FA) und fMRT-Messungen erlangt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse in drei zeitliche Bereiche unterteilt und diskutiert: die akute Phase (während der Okklusion (0 h)), die subakute Phase (24 h und 72 h) und in die chronische Phase (1 Woche und 1 Monat). Die Phasen wurden anhand der in dieser Arbeit gemessenen Zeitpunkte bestimmt.

5.2.1 Die akute Phase des Schlaganfalls

Als akute Phase ist im Zusammenhang dieser Arbeit der Zeitabschnitt während der Okklusion definiert. Während der Okklusion wurde eine MRT-Messung durchgeführt, die zunächst für die Bestätigung einer erfolgreichen Okklusion und später als Vergleichsvolumen diente, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Therapiegabe stattgefunden hatte. Es konnte zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 30). Eine erfolgreiche Okklusion wurde zunächst am Scanner anhand der DWI festgestellt und das Volumen später mit der errechneten ADC bestimmt, da eine frühe IS Diagnostik im MRT zunächst nur mit DWI/ADC aber nicht mit T2 möglich war^{42,191}. Obwohl keine Veränderungen der T2-Signalintensität innerhalb der ersten Stunden nach dem Schlaganfall zu erwarten sind, wurden in der ipsilateralen Hemisphäre während der Okklusion trotzdem reduzierte T2-Werte beobachtet (Abbildung 35).

Allerdings entsprach das errechnete Verhältnis zwischen den beiden Hemisphären nahezu 1. Dies ließ den Schluss zu, dass dieser Effekt nicht durch die Okklusion hervorgerufen wurde, sondern auf die verkürzte Sequenz während der Okklusion zurückzuführen ist. Zur Verkürzung der Messzeit während der Okklusion wurden sowohl die TR als auch die Anzahl der Schichten deutlich verringert. Um aber dennoch das ganze Gehirn abbilden zu können, wurden dickere Schichten gemessen. Da sich die Spins bei kürzeren TRs nicht vollständig relaxieren können, kommt es zu einer Sättigung. Als Folge kann sich beim nächsten HF-Impuls weniger Längsmagnetisierung aufbauen, wodurch sich insgesamt die Signalintensität der Bilder reduziert ¹⁰³.

Wie bereits erwähnt, kommt es während einer Okklusion innerhalb kürzester Zeit zu einem Zusammenbruch des Zellmetabolismus. Dabei folgen die Ionen zunächst dem zellulären elektrochemischen Gradienten. Um das osmotische Gleichgewicht beizubehalten, kommt es in Folge dessen zu einer Migration der Wassermoleküle in die Zellen ²⁴. Dadurch schwellen die Zellen an, reduzieren den extrazellulären Bereich und die Diffusion von Molekülen ist eingeschränkt ^{28,192,193}. Das Ergebnis dieses Vorgangs wird auch als zytotoxisches Ödem bezeichnet und ist eines der ersten Phänomene, die während eines Schlaganfalls auftreten ²⁸. Die eingeschränkte Diffusion der Moleküle kann mit Hilfe von ADC sichtbar gemacht werden, da Bereiche, die von einem Schlaganfall betroffen sind, niedrige ADC-Werte aufweisen (Abbildung 37). Dieser Effekt kann bereits 30-45 Minuten nach Okklusionsstart gemessen werden ^{42-44,194}. Die ADC-Werte in der ipsilateralen Hemisphäre waren im Gegensatz zu den ADC-Werten auf der kontralateralen Hemisphäre 30 bis 40 Minuten nach der Okklusion deutlich reduziert, was anhand der Werte in Abbildung 37 B zu erkennen ist.

Eine weitere Beobachtung, die während der Okklusion gemacht werden konnte, waren erhöhte FA-Werte im *Corpus callosum* (Abbildung 39). Generell können hohe FA-Werte vor allem dann gemessen werden, wenn die Diffusion anisotrop ist, wie es zum Beispiel im Bereich der weißen Substanz der Fall ist. Die Höhe der FA-Werte ist eng mit der Dichte und der Parallelität der Fasertrakte, sowie von der intakten Myelinscheide um die Axone herum verbunden und wird daher gerne als Maß für den Verletzungsgrad der weißen Substanz nach einem Schlaganfall verwendet ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Erhöhte FA-Werte während der akuten Phase des Schlaganfalls wurden bereits in anderen Studien gefunden ^{198,199}. Diese erhöhten Werte lassen sich in der akuten Phase auf das zytotoxische Ödem zurückführen, und haben vermutlich keinen strukturellen Zusammenhang ²⁰⁰. Wie zuvor erläutert, findet eine Diffusion von Molekülen in der weißen Substanz vornehmlich parallel zu den Fasertrakten statt und nicht orthogonal dazu. Wenn die Zellen während der Okklusion durch das zytotoxische Ödem anschwellen, verringert sich der Platz zwischen den Fasern und vergrößert somit die Richtungseinschränkung der Wassermoleküle.

Diese sind dann gezwungen noch mehr entlang der Fasern zu diffundieren, wodurch es zu erhöhten FA-Werten während der Okklusion kam ²⁰¹.

5.2.2 Die subakute Phase des Schlaganfalls

Als subakute Phase wurde hier die Phase definiert, in der das Ödem als Folge des Schlaganfalls nach der Okklusion bei den Messungen eine große Rolle spielt. Bei dieser Arbeit ist diese Phase in der Zeit zwischen 24 h und 72 h. Allgemein beschreibt das Ödem im Zusammenhang mit Schlaganfall das Anschwellen von Hirngewebe in den ischämischen Bereichen. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der Wassertransfer über die Zellmembran und die Blut-Hirn-Schranke ausbalanciert und somit bleibt auch das Gehirnvolumen gleich ²⁸. Eine Störung des Systems, wie bei einem Schlaganfall, hat allerdings verheerende Folgen für den Wasserausgleich. Nach der Bildung des zytotoxischen Ödem in der akuten Phase des Schlaganfalls kommt es durch die größer werdende Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zunächst zum vasogenen Ödem und schlussendlich zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke ²⁸. Dieser Zusammenbruch hat mehrere Phasen, deren Dauer und Stärke, wie bereits unter 5.1 beschrieben, von unterschiedlichen Parametern abhängig sind. Neben den bereits erwähnten Öffnungen der Blut-Hirn-Schranke nach 4 bis 6 Stunden und 2 bis 3 Tagen, kann es durch die reperfusionsbedingte akute Erhöhung des zerebralen Blutflusses zusätzlich zu einer frühen und kurzzeitigen Permeabilität kommen ⁶². Um eine frühe Öffnung der Blut-Hirn-Schranke zu erreichen, ist eine Okklusion von mindestens 60 Minuten nötig ²⁰². Obwohl gezeigt wurde, dass Ambroxol trotz seiner Größe die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann ⁸⁰, wurde die frühe kurzzeitige Permeabilität für die erste Injektion des Therapeutikums direkt nach der Operation und die späteren Öffnungen für die weiteren Therapien genutzt.

Um den Therapieeffekt von Ambroxol zu evaluieren, wurde als erstes das Volumen nach dem Schlaganfall untersucht. Das größte Schlaganfallvolumen ist mit dem Höhepunkt des Ödems je nach Stärke des Schlaganfalls nach 24 h bis 72 h Stunden erreicht ¹⁹³. Große Ödeme sind einer der Hauptgründe für die Sterblichkeit nach einem Schlaganfall, daher haben Patienten bessere Chancen auf eine Genesung, wenn sie den Zeitpunkt des größten Ödems überleben ^{193,203,204}. Das bedeutet wiederum, dass die Verringerung des Ödems nach einem Schlaganfall ein Schlüssel sein könnte, um die Auswirkungen des Schlaganfalls bei Patienten zu verringern. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich durch das Blockieren der Na⁺-Ionenkanäle das Ödem nach einem Schlaganfall verringern lässt ²⁰⁵⁻²⁰⁸. In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die Tiere, die mit Ambroxol behandelt wurden, in der subakuten Phase des Schlaganfalls ein signifikant geringeres Schlaganfallvolumen im *Striatum* hatten als die Tiere, die mit der

Kontrollsubstanz behandelt wurden (Abbildung 30). Es kann davon ausgegangen werden, dass Ambroxol als potenter Na^+ - und Ca^{2+} -Kanal Blocker das Ödem in den behandelten Tieren signifikant reduzierte.

Ein weiterer Nebeneffekt des Na^+ -Einstroms in die Zelle führt neben einer Wasseraufnahme auch zur Depolarisation von Zellen. Dies hat einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge, was wiederum die NO-Produktion erhöht. Dadurch werden Enzyme aktiviert, die wiederum für eine höhere Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und damit auch für einen Wassereinstrom in den ischämischen Bereichen sorgen^{30,35}. Durch eine geringere Ca^{2+} -Konzentration könnten durch eine geringere ROS und RNS Produktion außerdem die DNA-Schädigung und die damit verbundene Apoptose abgemildert werden^{25,30}. Möglicherweise konnte Ambroxol durch das Blockieren der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle diese Kaskade unterbrechen und hatte somit einen Ödem-reduzierenden Effekt auf das Schlaganfallgewebe.

Neben dem Schlaganfallvolumen wurde ebenfalls der Schweregrad des Schlaganfalls genauer untersucht. Es war zu erkennen, dass sich die Signalintensität der T2-Bilder im gesamten und im striatalen Schlaganfallvolumen in der subakuten Phase über die Zeit reduzierte, was auch in anderen Studien beobachtet wurde (Abbildung 35)^{202,209,210}. Generell wurde eine leichte Reduktion der Signalintensität erwartet, da das Ödem und damit auch das Wasservolumen etwas abnahm^{24,211}. Der Hauptgrund für die Signalintensitätsabnahme ist allerdings auf die Verteilung des Wassers im Schlaganfallgewebe zurückzuführen. Das Wasser in Geweben kommt sowohl gebunden als auch frei vor, wobei sich beide Wasserarten in der Länge der T2 Relaxation unterscheiden^{210,212}. Ein Versuch mit Eiern zeigte, dass sich die Signalintensität der T2 drastisch änderte, je härter die Eier gekocht waren, sich aber der Wassergehalt kaum veränderte²¹³. Gebundenes Wasser, wie es in Zellen zu finden ist, hat eine schnellere T2 (niedrigere Signalintensität), freies Wasser, das sich beispielsweise nach dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke in den Zellzwischenräumen befindet, hat eine langsame T2 (höhere Signalintensität)^{210,212}. Dies liegt vor allem daran, dass die Proteine, die durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke im Zusammenhang mit dem vasogenen Ödem in die Zellzwischenräume gelangt sind, die T2 Relaxation verlangsamen, wohingegen das in den Zellen gebundene Wasser nur Elektrolyte aufweist, die kaum einen T2 relaxationsverlängernden Einfluss haben, wie es von Naruse *et al.* zusammengefasst wurde²¹². Die T2-Signalintensität stellt daher eine Kombination aus gebundenem und freiem Wasser dar²¹⁰, wobei die höheren T2-Werte am Beginn der subakuten Phase hauptsächlich auf die erhöhte Signalintensität des freien Wassers des vasogenen Ödems zurückzuführen ist. Nach dem Höhepunkt des Ödems, reduzierte sich das Wasservolumen und damit der Einfluss des freien Wassers auf die T2-Werte. Da die T2-Werte nun hauptsächlich

durch das gebundene Wasser definiert wurden, verringerte sich auch die Signalintensität. Die relative Veränderung des Wassers im Schlaganfall lässt sich vor allem gut in Abbildung 35 B beobachten, da die Daten hier mit der kontralateralen Hemisphäre normalisiert wurden. Wann genau der Höhepunkt des Ödems in diesen Daten erreicht wurde, lässt sich nicht erkennen. Anhand der Daten zum Schlaganfallvolumen könnte dieser in der Ambroxolgruppe bereits nach 24 h erreicht worden sein und in der Kontrollgruppe nach 72 h. In beiden Gruppen reduzieren sich aber die T2-Werte nach dem 24 h Zeitpunkt bereits, vor allem im *Striatum*. Für eine konkrete Aussage über den Verlauf des Ödems wären weitere Messzeitpunkte nach 48 h hilfreich. Zudem sollte bei der Interpretation der Daten beachtet werden, dass einige Tiere bereits nach dem 24 h Zeitpunkt getötet wurden, sodass keine weitere Verfolgung über die Entwicklung des Ödems möglich war. Die fehlenden Daten könnten so den wahren Höhepunkt des Ödems etwas verzerren. Warum sich die T2-Werte nur in der kompletten Schlaganfallregion und in der Schlaganfallregion des *Striatums* reduzierten ist spekulativ und könnte darauf zurück zu führen sein, dass im MCAO-Schlaganfallmodell das *Striatum* den Schlaganfallkern darstellt¹⁵⁷. Dafür sprächen die T2-Werte, die im *Striatum* etwas höher waren, als im *Cortex* und somit für ein stärkeres Ödem in dieser Region sprechen könnten. In der subakuten Phase ließ sich aber anhand der T2-Werte kein Unterschied des vasogenen Ödems zwischen den Gruppen feststellen.

Ähnliches war ebenfalls bei den ADC-Werten zu beobachten. Zwischen den Gruppen konnte in der subakuten Phase ebenfalls kein Unterschied gefunden werden. Nach der Reduktion der ADC-Werte während der Okklusion ist zu erkennen, dass sich die ADC-Werte in allen Regionen mit der Zeit langsam erholten und etwa nach 72 h fast den Baseline-Wert wieder erreichten (Abbildung 37). Zu sehen war dies auch am Verhältnis zwischen den Hemisphären da der Wert bei etwa 1 lag. Das vasogene Ödem ist im Gegensatz zum zytotoxischen Ödem isoosmotisch und sammelt sich daher hauptsächlich im extrazellulären Raum an^{28,32}. Durch die Akkumulation außerhalb der Zellen wird der durch das zytotoxische Ödem verengte extrazelluläre Raum wieder erweitert und die ADC-Werte normalisieren sich³². Man spricht hier allerdings von einer Pseudonormalisierung der ADC-Werte, da die T2-Werte durch das Ödem immer noch deutlich erhöht waren und eine richtige Normalisierung wiederlegen²¹⁴.

Obwohl in der subakuten Phase sich die positiven Effekte von Ambroxol zunächst nur in Form einer Volumenreduktion zeigten, profitierte auch das Verhalten der behandelten Tiere. Anhand von Verhaltensversuchen lassen sich generell sowohl Verbesserungen als auch Verschlechterungen im Verhalten über die Zeit gut beobachten. Dies ist wichtig, um mögliche Fortschritte durch die Therapie erfassen zu können, da diese eventuell auch ohne pathologische Besserungen vorkommen²¹. Die motorischen und

sensorischen Defizite, welche am häufigsten bei einem Schlaganfall auftreten, wurden hier hauptsächlich durch den Beam Walk und den Sticky Label Test aufgezeigt (Abbildung 38)^{3,215–221}. Das *Striatum* stellt zusammen mit dem *Thalamus* eine wichtige Schnittstelle für die Weiterleitung neuronaler Informationen dar. Es wird, genau wie die *Capsula interna* sowie der motorische und der sensorische *Cortex*, von der ACM mit Blut versorgt. Daher werden in diesem Bereich bei einer MCAO auch die größten Defizite erwartet^{85,222}. Dies war in den vorliegenden Daten gut zu erkennen, da sich das Verhalten für alle Tiere zum 24 h Zeitpunkt deutlich verschlechterte. Allerdings schnitten die Tiere, die mit Ambroxol behandelt wurden, im Beam Walk und im Sticky Label Test in der subakuten Phase des Schlaganfalls signifikant besser ab als die Tiere aus der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse unterstützen weiter die Theorie, dass Ambroxol das Ödem im *Striatum* verringerte, da die Größe des Ödems die neurologischen Defizite signifikant beeinflusst²²³. Weder im Open Field noch im Grip Test konnten Unterschiede in der subakuten Phase zwischen den Gruppen festgestellt werden. Im Open Field verringerte sich nach dem Schlaganfall die gelaufene Distanz in beiden Gruppen, was auch in anderen Studien beobachtet werden konnte^{224,225}.

Alles in allem konnte in der subakuten Phase weder in den ADC- noch in den T2-Werten ein signifikanter Unterschied gefunden werden, obwohl das Schlaganfallvolumen und die Verhaltensversuche auf ein reduziertes Ödem in der Ambroxolgruppe hinwiesen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Ambroxol eine Wirkung auf die Ausbreitung aber nicht auf die Intensität des Ödems haben könnte. Ein Ereignis, das häufig bei einem Schlaganfall auftritt und diese Theorie unterstützt, ist die Streuung der Depolarisierung neuronaler Zellen (engl.: „*spreading depolarization*“, SpD). Darunter versteht man einen nahezu kompletten Zusammenbruch der Ionengradienten und die damit zusammenhängende Depolarisierung von Neuronen, die bis zu diesem Zeitpunkt nur wenig durch den Schlaganfall betroffen waren oder an den ischämischen Bereich angrenzen^{226,227}. Die Depolarisierung der Zellen wird durch den Infarktkern ausgelöst, da dort die schlaganfallinduzierte Glutamatfreisetzung eine Dauererregung der Neurone verursacht^{32,34}. Ein Prozess, der sich in den umliegenden Geweben fortsetzt³². Durch die Depolarisierung kommt es automatisch zu einem höheren Energiebedarf, da die Zellen ihr Membranpotential mittels ATP-abhängiger Ionenpumpen wieder herstellen^{32,37}. Um den Bedarf an Glukose und Sauerstoff zu decken führt das in gesundem Gewebe zu einem erhöhten Blutfluss²²⁸. In ischämischen Bereichen ist dies aber nicht möglich³⁷. Die verbleibende Energie, welche die Zellen am Leben erhält, wird noch schneller verbraucht und sorgt für ein weites Absterben der Neurone. Eine Studie zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Depolarisierungen und der Zunahme des Schlaganfallvolumens²²⁹. Bezogen auf die vorliegenden Daten könnte es also sein, dass Ambroxol die

SpD durch eine verringerte Aufnahme von Na^+ und Ca^{2+} abgemildert hat, da eine erhöhte Glutamatausschüttung und die damit verbundene Depolarisation der Zellen verhindert wurden. Dies würde einen geringeren Energieverbrauch der noch lebenden Zellen bedeuten, wodurch sich das Volumen weniger ausbereitete und so das Absterben weiterer Zellen sowie größere Schädigungen von weiteren Zellen verringert wurden.

Weitere Hinweise, dass Ambroxol einen positiven Effekt auf den Schlaganfallverlauf hat, liefern die FA-Daten (Abbildung 39). Nach der Erhöhung der FA-Werte während der akuten Phase konnte in der subakuten Phase eine Reduktion der Werte im *Corpus callosum* beobachtet werden, die auch in anderen Studien gefunden wurde^{230,231}. Diese Reduktion zeigte sich im kompletten *Corpus callosum*, war aber vor allem in der *Capsula externa* sehr ausgeprägt und konnte auf das zunehmende vasogene Ödem zurückgeführt werden. Durch die massive Zunahme an Wasser, vor allem in der weißen Substanz, war die Diffusion sehr eingeschränkt und die FA-Werte reduziert^{28,199}. Eine Erklärung könnte sein, dass diese Reduktion durch den Verlust des axonalen Transports und dem damit verbundenen Verlust der neuronalen Funktionen verursacht worden ist^{231–233}. Allerdings ist die Theorie des axonalen Transports, also der Molekültransport in Vesikeln entlang der Mikrotubuli¹, umstritten, da Beaulieu *et al.* mit Hilfe von Vinblastin zeigen konnte, dass eine anisotrope Diffusion immer noch gemessen werden konnte, obwohl der axonale Transport durch das Vinblastin inhibiert wurde²³⁴. Ein weiterer Grund könnte die Zerstörung der Myelinscheiden um die Axone sein, die ebenfalls zur Diffusion der Moleküle entlang des Axons beitragen^{230,235}. Die Myelinscheiden werden von Oligodendrozyten gebildet und sind von den Auswirkungen des Schlaganfalls ebenso stark betroffen wie alle anderen Zellen auch. Sie schwellen an und können ebenso absterben²³⁶. Anhand von verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine anisotrope Diffusion hauptsächlich durch die Orientierung der Membrane in den eng verpackten Axonbündeln in der weißen Substanz verursacht wird und dass die Myelinisierung nur die Stärke der Anisotropie beeinflusst^{114,234,237}. Daher werden eine Demyelinisierung und die Degeneration der Axone unter anderem als FA-Wert reduzierender Faktor angesehen^{230,238,239}. Im weiteren Verlauf verringerte sich die Signalintensität der FA-Werte zum 72 h Zeitpunkt für die Kontrollgruppe weiter, während sie für die Ambroxolgruppe etwa auf dem 24 h Wert verblieben. Sowohl im kompletten *Corpus callosum* als auch in der *Capsula externa* konnten nach 72 h signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden wobei sich insgesamt 50% der Voxel innerhalb des Schlaganfallvolumens in der *Capsula externa* signifikant unterschieden (Abbildung 41). Die T2- und ADC-Werte deuteten bereits darauf hin, dass es keinen Unterschied in der Stärke des Ödems gab. Es ist daher davon auszugehen, dass hauptsächlich das zunehmende vasogene Ödem zunächst für eine Reduktion der FA-Werte nach 24 h in beiden Gruppen

sorgte. Für den späteren Zeitpunkt könnten die niedrigeren FA-Werte in der Kontrollgruppe hauptsächlich auf eine größere Verletzung der Axone und damit eine größere Demyelinisierung und Degeneration zurückzuführen sein (Abbildung 39). Es könnte sein, dass durch eine geringere Ausbreitung des Schlaganfallvolumens in der Ambroxolgruppe die Oligodendrozyten weniger stark beschädigt wurden und daher in den intakten Axonen eine höhere anisotrope Diffusion zu höheren FA-Werten führte. Der signifikante Unterschied im gesamten *Corpus callosum* kann hauptsächlich auf den Einfluss der Werte in der *Capsula externa* zurückgeführt werden.

Auch in den *Capsula interna* konnten zum 24 h Zeitpunkt Veränderungen beobachtet werden. So waren etwa 35% der Voxel innerhalb des Schlaganfallvolumens zu diesem Zeitpunkt zwischen beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. Die Werte in Abbildung 39 zeigten, dass die FA-Werte in der Kontrollgruppe nach 24 h signifikant höher waren als in der Ambroxolgruppe. Die *Capsula interna* führt die meisten Fasertrakte als myelinisierte Bündel, die den *Cortex* über das *Striatum* und den *Thalamus* mit den subkortikalen Zentren verbindet^{2,19,85}. Sie kann grob in die beiden Bereiche vorderer und hinterer Schenkel eingeteilt werden. Im vorderen Teil des hinteren Schenkels verläuft unter anderem der Corticospinaltrakt und im hinteren Teil verlaufen die sensorischen Bahnen^{240–242}. Eine Blutunterversorgung des hinteren Schenkels durch einen Schlaganfall führte zu Defiziten und Ausfallerscheinungen im Verhalten^{240–242}. Die vorliegenden FA-Werte in der *Capsula interna* spiegeln jedoch nicht das verschlechterte Verhalten der Tiere zu diesem Zeitpunkt wider, da die FA-Werte der Kontroll-Tiere auf Baseline-Niveau waren, die Tiere aber dennoch deutlich schlechter im Verhalten abschnitten. Auf der anderen Seite waren die FA-Werte der Ambroxolgruppe signifikant reduziert und die Tiere schnitten in den Verhaltensversuchen besser ab. Ein möglicher Grund dieses Widerspruchs könnte die Größe der VOIs sein, da sie mehr als nur den hinteren Schenkel umfassten. Da die *Capsula interna* neben der ACM noch von weiteren Arterien mit Blut versorgt wird²⁴⁰, könnte es sein, dass die nicht oder kaum betroffenen Teile der *Capsula interna* einen Effekt der FA-Werten maskierten. Eine Möglichkeit die Maskierung zu umgehen wäre eine Unterteilung der *Capsula interna* in ihre verschiedenen Funktionsbereiche mittels kleinerer VOIs. Aufgrund der Auflösung war es in den vorliegenden Daten jedoch nicht möglich, die Fasertrakte aufgrund ihrer Funktion zu unterscheiden. Im weiteren Verlauf reduzierten sich die FA-Werte in der Kontrollgruppe. Diese Reduktion nach 72 h wurde auch von anderen beobachtet²³¹ und könnte zum einen mit dem Erreichen des Höhepunkts des Ödems und zum anderen mit einer höheren Demyelinisierung und Degeneration der Axone zusammen hängen. Nach 72 h unterschieden sich prozentual nur noch wenige Voxel zwischen den Gruppen, wobei jetzt die Kontrollgruppe die niedrigeren FA-Werte hatte. Eine größere Ausdehnung des Ödems würde eine weitflächigere

Beeinträchtigung der Axone bedeuten und damit ebenfalls eine großflächigere Demyelinisierung und Degeneration der Axone und niedrigere FA-Werte in der Kontrollgruppe zur Folge haben. Die Daten scheinen darauf hinzudeuten, dass die FA-Werte der Ambroxolgruppe weniger stark vom vasogenen Ödem und der damit verbundene Demyelinisierung und Degeneration beeinflusst waren als in der Kontrollgruppe.

Im Genu konnte allgemein am wenigsten Veränderung über die Zeit hinweg gefunden werden, was darauf hindeutete, dass diese *Corpus callosum* Region am wenigsten durch den Schlaganfall betroffen war. Dennoch konnten bei dieser Arbeit signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Das Genu ist der Bereich, in dem die Fasertrakte der weißen Substanz die Hemisphären verbinden. Zum Beispiel projizieren Axone Signale aus dem M1 und S1 über das Genu in die jeweilige kortikale Region auf der kontralateralen Seite²⁴³. Während die Werte auf der ipsilateralen Seite nach 24 h nur knapp nicht signifikant waren ($p = 0,0504$), konnte auf der kontralateralen Hemisphäre signifikant höhere Werte festgestellt werden. Ähnlich wie bei der *Capsula interna* waren die Werte nach 24 h zunächst in der Kontrollgruppe höher und kehrte sich dann für die restlichen Zeitpunkte um. Nach 72 h waren die Werte in der Ambroxolgruppe signifikant höher. Diese Ergebnisse könnten ebenfalls im Zusammenhang mit dem Höhepunkt des Ödems stehen.

Neben den strukturellen Veränderungen wurden in dieser Arbeit auch die funktionellen Veränderungen im Gehirn, die durch den Schlaganfall verursacht wurden, untersucht. Dafür wurde in diesem Versuch mittels fMRI überprüft, ob Ambroxol unter anderem einen funktionalen Effekt auf das Gehirn ausübte. In beiden Gruppen wurde eine reduzierte Konnektivität 24 h nach dem Schlaganfall festgestellt (Abbildung 42). Die reduzierte Konnektivität in den ersten Tagen nach dem Schlaganfall deckte sich sowohl mit den Beobachtungen anderer Studien^{244,245} als auch mit den Ergebnissen der durchgeführten Verhaltensversuche. Der Pearson-Korrelationskoeffizient reduzierte sich in der Ambroxolgruppe um mehr als das Doppelte. Dies deutet auf einen globalen Effekt von Ambroxol über das ganze Gehirn verteilt hin, da die Reduktion der Korrelationen nicht nur auf die ipsilaterale Hemisphäre begrenzt war. Durch den Zusammenbruch des Zellmetabolismus werden in der Regel verschiedene Neurotransmitter wie Glutamat und GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) ausgeschüttet. Die Ausschüttung ist dabei höchstwahrscheinlich unspezifisch, da neben den Neurotransmitter außerdem intrazelluläre Metaboliten mit ausgeschüttet werden³². Da aber die Glutamatrezeptoren NMDA und AMPA mit dem exzitatorischem Zelltod in Verbindung stehen, sind sie bei einem Schlaganfall die am besten untersuchten Rezeptoren²⁴⁶. Glutamat ist ein wichtiger Neurotransmitter, aber in zu hohen Konzentrationen setzt es Kaskaden in Gang, deren Ergebnis zunächst eine Dauererregung der Neurone und dann den Zelltod zur Folge hat^{32,34}.

Studien haben gezeigt, dass der Ischämie-induzierte Zelltod reduziert werden kann, wenn die durch Na^+ -Ionen hervorgerufene Glutamatausschüttung verringert wird^{247,248}. Es kann vermutet werden, dass die folgenreichen Kaskaden in der Kontrollgruppe nicht unterbrochen wurden und somit die Korrelationen durch die Dauererregung höher waren als in der Ambroxolgruppe, da Ambroxol die komplette Signaltransduktion im Gehirn durch das Blockieren der Na^+ -Ionenkanäle reduzierte. Dies würde für die Kontrolltiere eine höhere neuronale Aktivität und damit einen höheren lokalen Blutfluss bedeuten, wodurch sich die höheren Korrelationen erklären lassen könnten. Für die Ambroxolgruppe könnte es eine geringere Glutamatausschüttung und dadurch bedingt eine geringere neuronale Aktivität bedeuten, was schlussendlich die Exzitotoxizität und damit den Zelltod reduziert haben könnte.

Mit Blick auf die motorische Bahn war zu erkennen, dass die somatosensorische und die motorische Funktion in beiden Gruppen stark reduziert war, da einige Korrelationen im Zusammenhang mit S1 und M1 zur Baseline signifikant höher waren (Abbildung 45). Dies ließ sich auch anhand des Beam Walks und des Sticky Label Tests bestätigen. Beide Gruppen waren beim 24 h Zeitpunkt schlechter, den Balken zu überqueren und benötigten deutlich mehr Zeit, um das Tape zu entfernen als während der Baseline. Insgesamt konnten zunächst mehr reduzierte Korrelationen in der Ambroxolgruppe als in der Kontrollgruppe gefunden werden, die nach der FDR-Korrektur nicht mehr vorhanden waren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Verhaltensversuche, da die Ambroxolgruppe in den Tests besser abschnitt, denn obwohl der Pearson-Korrelationskoeffizient der motorischen Bahn in der Ambroxolgruppe insgesamt geringer war, konnten schlussendlich weniger signifikant reduzierte Korrelationen detektiert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Ambroxol zwar insgesamt die neuronale Konnektivität reduzierte, dies aber weniger Einfluss auf die funktionellen Konnektivitäten der motorischen Bahn und damit auf das Verhalten hatte.

5.2.3 Die chronische Phase des Schlaganfalls

Als chronische Phase wurde hier die Phase definiert, in der ein Ödem bei den Messungen kein vorherrschendes Phänomen mehr darstellen sollte. Bei dieser Arbeit ist diese Phase in der Zeit zwischen 1 Woche und 1 Monat definiert. Zwischen 72 h und 1 Woche konnte zum ersten Mal eine deutliche Reduktion zwischen den Volumina festgestellt werden (Abbildung 30). Dies konnte auf die Abwesenheit des Ödems zurückgeführt werden, da der Höhepunkt nach spätestens 72 h erreicht sein sollte¹⁹³. Dennoch konnte im *Striatum* zu diesem Zeitpunkt immer noch ein signifikanter Unterschied des Schlaganfallvolumens zwischen den Gruppen gefunden werden. Auch im Verhalten waren die Ambroxol behandelten Tiere nach 1 Woche noch immer signifikant schneller das Tape

zu entfernen als die Kontrollgruppe (Abbildung 38). Nach 1 Monat gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen mehr. Die histologischen Schnitte bestätigten ebenfalls, dass zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied im finalen Schlaganfallvolumen zwischen den Gruppen mehr festgestellt werden konnte (Abbildung 31 B). Auch die Verhaltensversuche zeigten nach einem Monat keinen signifikanten Unterschied mehr auf. Ebenso konnte in Bezug auf die gesamte Volumenreduktion kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (Abbildung 32). Einzelne Anstiege des Schlaganfallvolumens über die Zeit in beiden Gruppen wurde auf die Art der Datenerhebung zum 0 h Zeitpunkt zurückgeführt. Durch die objektive Herangehensweise mittels eines Schwellenwertes sind einzelne Fehler durch Artefakte nicht auszuschließen, da es zu Unterschätzungen des eigentlichen Schlaganfallvolumens zum Okklusionszeitpunkt gekommen sein könnte. Insgesamt aber lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass sich die Auswirkungen von Ambroxol in Bezug auf das Schlaganfallvolumen und das Verhalten nur in der subakuten bis hin zur frühen chronischen Phase bemerkbar machten. Dabei ist zu bedenken, dass diese Unterschiede nur in der Zeit beobachtet werden konnten, in der auch die Therapie verabreicht wurde. Dies wirft zwei Frage auf: 1) wie lange lässt sich tatsächlich ein Unterscheid zwischen den Gruppen erkennen und 2) würde eine längere Ambroxolbehandlung zu späteren Zeitpunkten auch noch ein Unterschied im Schlaganfallvolumen zwischen den Gruppen zeigen? Anhand der Daten kann dies nicht endgültig beantwortet werden. Dafür müssten weitere Versuche zunächst mit weiteren Messzeitpunkten und später auch mit unterschiedlichen Therapiezeiträumen durchgeführt werden.

Um die Dynamik des Schlaganfalls besser zu verstehen, wurde dessen prozentuale Verteilung über die Zeit genauer betrachtet. Dabei war zunächst erstmal interessant, dass es in der subakuten Phase keinen Unterschied zwischen den Gruppen gab (Abbildung 33). In der chronischen Phase dagegen konnten nach 1 Woche im gesamten *Cortex* und im *S1 Cortex* Unterschiede festgestellt werden. Der prozentuale Anteil des Schlaganfalls erhöhte sich für die Ambroxolgruppe im *Striatum* und für die Kontrollgruppe im *Cortex*. Im Gegensatz dazu verringerte sich der prozentuale Anteil des Schlaganfalls für die Ambroxolgruppe im *Cortex* und für die Kontrollgruppe im *Striatum*. Obwohl sich die prozentuale Verteilung im *Cortex* in der chronischen Phase zwischen den Gruppen signifikant unterschied, konnte kein signifikanter Unterschied im Schlaganfallvolumen selbst festgestellt werden. Auf Grund der Tatsache, dass es sich beim *Cortex* um sekundäres Schlaganfallgewebe handelt, könnten diese Daten einen Hinweis darauf geben, dass Ambroxol durch seine neuroprotektiven Eigenschaften den sekundären Zelltod durch weniger SpD und Exzitotoxizität verringerte.

Ähnlich wie bei der prozentualen Verteilung des Schlaganfalls wurden sowohl bei den T2- als auch bei den ADC-Werten große Unterschiede zwischen den Gruppen in der chronischen Phase nach 1 Monat gefunden (Abbildung 35 & Abbildung 37). Die T2-Signalintensitätswerte stiegen in der Kontrollgruppe zwischen 1 Woche und 1 Monat stark an, was in der Ambroxolgruppe nicht der Fall war. Bei den ADC-Werten konnte dagegen in beiden Gruppen ein starker Anstieg der Werte zwischen 1 Woche und 1 Monat festgestellt werden. Diese hohen Werte in T2 und ADC zeigten nekrotische Bereiche im Schlaganfallgebiet. Zellen, die von einem Infarkt und von Nekrose betroffen sind verlieren die Integrität ihrer Membran, was sich in einer Formierung von Zysten bemerkbar macht ¹¹². Die flüssigkeitsgefüllten Zysten führen zu einer Verflüssigung des nekrotischen Gewebes, was wiederum durch die größere Molekülbeweglichkeit eine Erhöhung der T2- und ADC-Werte zur Folge hat ^{111,157,211}. Je höher die Werte in T2 und ADC sind, desto mehr freie Wasserbewegung und Nekrose ist demnach vorhanden. Damit würden signifikant höhere Werte in der Kontrollgruppe für mehr nekrotische Bereiche im Schlaganfallgewebe sprechen. Da in der Ambroxolgruppe nach 1 Monat weniger nekrotisches Gewebe vorhanden war, deutet dies darauf hin, dass die neuroprotektiven Eigenschaften von Ambroxol in der früheren subakuten Phase des Schlaganfalls das Gewebe vor Schäden durch Nekrose schützte. In den immunhistochemisch gefärbten Schnitten konnten im Kontroll-Tier Zysten ausgemacht werden, die im Ambroxol-Tier nicht gefunden wurden. Dies könnte ein Hinweis auf mehr nekrotisches Gewebe in der Kontrollgruppe sein als in der Ambroxolgruppe. Obwohl aufgrund der ADC-Daten nicht davon auszugehen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Zysten auf Gefrierartefakte zurückzuführen sind. Darüber hinaus wurden in beiden Tieren apoptotische Zellen gefunden. In diesem Zusammenhang ist allerdings zu bedenken, dass die IHC nur an einem Tier pro Gruppe durchgeführt wurden. Um eine endgültige Aussage bezüglich nekrotischer und apoptotischer Gewebe machen zu können, müssen weitere Schnitte von anderen Tieren untersucht werden. Außerdem sollten zukünftige immunhistochemische Färbungen mit paraffinierten Proben durchgeführt werden, um Artefakte durch Gefrierbrand auszuschließen.

Während bei den T2- und ADC-Werten in der chronischen Phase die größten Unterschiede gefunden wurden, besserte sich das Verhalten in beiden Gruppen bis zum letzten Zeitpunkt. Dennoch gab es im Grip Test einen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 38). Die Tiere aus der Ambroxolgruppe waren etwas stärker beim Grip Test im Vergleich zur Baseline als die Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sollten allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da es sich beim Grip Test um einen sehr fehleranfälligen Test handelt, der durch viele Faktoren, wie zum Beispiel die Versuchsausführung und die Motivation der Tiere, beeinflusst werden kann ^{249,250}. Die Griffstärke der Tiere ist

außerdem sehr stark von deren Körpergewicht abhängig, daher könnte der Verlust von Muskelmasse durch die restriktive Fütterung vor der Operation eine Rolle auf die Ergebnisse gespielt haben^{249,251}. In dieser Studie konnte allerdings keinerlei Korrelation in den Gruppen zwischen dem Gewicht und der Kraft gefunden werden (Daten nicht dargestellt). Um pro Tier dennoch einen individuellen Ausgangswert zu haben, wurden die Ergebnisse zur Baseline normalisiert. Da der Effekt des Gewichtes somit aber nicht komplett eliminiert wurde, können größere Schwankungen in den Gruppen nicht ausgeschlossen werden. Möglichen Abweichungen durch weitere Faktoren wie der Winkel oder die Geschwindigkeit, mit dem die Tiere vom Gitter weg gezogen wurden, wurden durch eine gleichmäßige Versuchsdurchführung weitestgehend entgegengewirkt^{249,250}. Des Weiteren sollten für zukünftige Tests eine Unterscheidung zwischen Vorderpfoten und Hinterpfoten in Erwägung gezogen werden, da es Indizien dafür gibt, dass sich die Ergebnisse unterscheiden können²⁴⁹. Anhand von nicht veröffentlichten Daten haben Maurissen *et al.* herausgefunden, dass es neben den biochemischen Unterschieden zwischen den Gliedmaßen auch verhaltensbedingte Unterschiede gab²⁴⁹. Bei einer Schlaganfallstudie könnte darüber hinaus auch die Unterteilung in linke und rechte Vorderpfote beziehungsweise Hinterpfote wertvolle Erkenntnisse liefern. Bei den hier vorliegenden Daten ist davon auszugehen, dass eine Griffstärke über 100% auf eine geringere Kraft während der Baseline zurückzuführen ist, bedingt entweder durch das restriktive Füttern vor der Operation oder aufgrund des geringeren Gewichts während der Baseline. Die signifikant höhere Griffstärke der Ambroxolgruppe könnte dabei eventuell im Zusammenhang mit den besseren sensorischen Fähigkeiten stehen²⁴⁹. Zwar konnte nach 1 Monat kein signifikanter Unterschied im Sticky Label Test zwischen den Gruppen mehr festgestellt werden, dennoch entfernten die Ambroxol behandelten Tiere das Tape schneller als die Tiere aus der Kontrollgruppe. Dies lässt auf bessere sensorische Fähigkeiten dieser Tiere schließen. Außerdem konnte in der prozentualen Verteilung des Schlaganfalls in der Ambroxolgruppe signifikant weniger Schlaganfallgewebe im *S1 Cortex* gefunden werden als in der Kontrollgruppe. Dennoch darf die Variabilität der Parameter nicht außer Acht gelassen werden. Möglichweise könnte eine höhere Tierzahl in zukünftigen Untersuchungen die hohe Variabilität der Daten kompensieren, und somit verlässlichere Aussagen ermöglichen.

Im Open Field bewegten sich die Tiere aus der Kontrollgruppe nach 1 Woche und 1 Monat etwas weiter als die Ambroxoltiere. Der Open Field Test sorgt bei den Tieren für eine nicht-konditionierte Konfliktsituation. Das natürliche Verhalten der Tiere bedingt auf der einen Seite neue Gegenden zu erkunden und auf der anderen Seite offene Bereiche, also das Zentrum des Open Fields, zu meiden²²⁰. Demnach würde man ein ausgeprägtes Explorationsverhalten in gesünderen Tieren erwarten, was hier aber nicht der Fall

war. Zwar konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden, dennoch bewegten sich die Tiere aus der Kontrollgruppe an den letzten beiden Zeitpunkten tendenziell etwas weiter. Diese Beobachtungen wurden auch in anderen Studien mit unterschiedlichen Schlaganfallmodellen gemacht ^{252–254}, was interessant ist, da man durch die motorischen Defizite und Habituation zunächst ein geringeres Bewegungsverhalten erwartet hätte ²⁵⁰. In einer nicht veröffentlichten Studie konnte sogar gezeigt werden, dass sich durch die Gabe von unterschiedlichen neuroprotektiven Medikamenten, die das Schlaganfallvolumen nachweislich reduzierten, auch die erhöhte Beweglichkeit der Tieren im Open Field reduzieren ließ ²⁵⁰. Dies deckt sich mit den hier vorliegenden Daten. Auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant waren, könnte dies die erhöhte Beweglichkeit in der Kontrollgruppe erklären. Dennoch sollten auch diese Daten restriktiv betrachtet werden, da viele Daten durch technische Probleme verloren gingen oder entfernt werden mussten und der Datensatz daher nicht vollständig war.

Zusätzlich deutete die Entwicklung der FA-Werte auf einen positiven Effekt von Ambroxol hin (Abbildung 39). Studien haben gezeigt, dass sich die FA-Werte nach etwa 3 Wochen wieder erholen, sofern keine komplette Zerstörung der Zellen vorlag ^{209,230}. Beispielsweise zeigte eine Studie von Zhang *et al.* nach einer permanenten Okklusion der ACM, dass sich die Reduktion der FA-Werte weder in der *Capsula interna* noch in der *Capsula externa* wieder erholten ²³⁰. Außerdem war dort in der Histologie zu erkennen, dass die weiße Substanz durch Vakuolen und zerstörtes Myelin geschädigt war ²³⁰. Während sich in der vorliegenden Arbeit die Werte der Ambroxolgruppe bereits nach 24 h nicht weiter reduzierten, konnte in der Kontrollgruppe ein Anstieg der FA-Werte erst in der chronischen Phase beobachtet werden. Der größte Unterschied zwischen den Gruppen war in der *Capsula externa* nach 1 Woche erreicht, wobei sich mehr als 50% der Voxel innerhalb des VOIs signifikant unterschieden (Abbildung 41). Es kann daher bei den vorliegenden Ergebnissen davon ausgegangen werden, dass höhere FA-Werte in der Ambroxolgruppe, wie bereits in der subakuten Phase, im Zusammenhang mit intakteren Axonen steht ^{230,238}.

In der *Capsula interna* unterschieden sich die Anzahl der signifikanten Voxel in den VOIs nach 1 Woche zu etwa 27% zwischen den Gruppen, wobei die Werte in der Ambroxolgruppe signifikant höher waren. Obwohl sich diese Ergebnisse mit dem besseren Verhalten in der Ambroxolgruppe deckten, ist davon auszugehen, dass sie nicht im kausalen Zusammenhang zum Verhalten stehen. Bereits in der subakuten Phase konnte vermutlich auf Grund der VOI-Größe kein direkter Zusammenhang zwischen Verhalten und FA-Werten festgestellt werden, und dass, obwohl die Ergebnisse der Verhaltensversuche in der subakuten Phase noch eindeutiger waren. Daher ist hier davon auszugehen, dass es sich, wie in der *Capsula externa*, um weniger intakte Axone in der

kompletten *Capsula interna* der Kontrollgruppe handelte. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, müssten die VOIs kleiner gewählt sowie diese dann genau auf die motorische Bahn abgestimmt werden.

Im Genu konnte im Verlauf der Zeit immer größer werdende Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nach 1 Woche unterschieden sich etwa 20% des VOIs sowohl auf der ipsi- als auch auf der kontralateralen Hemisphäre signifikant. Dabei waren die FA-Werte in der Kontrollgruppe auf der ipsilateralen Hemisphäre signifikant geringer. Wie bereits erwähnt, projizieren die Axone von einer Hemisphäre zur anderen, wobei das Genu als Schnittstelle zwischen den Hemisphären dient²⁴³. Durch den Schlaganfall wurden einige betroffene Axone zerstört, wie sich nach 1 Monat sowohl anhand der T2- und ADC-Werte als auch an der Histologie zeigte. Durch den Verlust einiger Axone in der ipsilateralen Hemisphäre ist davon auszugehen, dass die axonalen Verbindungen, die auf die kontralaterale Hemisphäre projizieren, ebenfalls verloren gegangen sind. Dieser Vorgang wird auch als Waller-Degeneration bezeichnet und ist nach einem Schlaganfall ein bekanntes Phänomen^{114,255}. Unter Berücksichtigung, dass sich das FA-Signal bei dem Verlust von Nervenfasern verändert, da die richtungsvorgebende Struktur des Zytoskeletts verloren geht^{114,256}, könnte dies den signifikanten Unterschied und die geringeren FA-Werte der Kontrollgruppe nach 1 Woche auf beiden Hemisphären erklären.

Von allen Strukturen des *Corpus callosum* war die *Capsula externa* vom Schlaganfall am stärksten betroffen. Dies könnte mit ihrer Lage zusammenhängen, da sie zwischen dem *Striatum* und dem *Cortex* liegt und so sowohl von der striatalen als auch kortikalen Seite her durch das Schlaganfallgewebe beeinträchtigt wurde. Die FA-Werte der *Capsula externa* sowie in den anderen Regionen verbesserten sich zwar über die Zeit im Vergleich zur subakuten Phase, dennoch wurde in keiner der Regionen oder Gruppen nach 1 Monat der Baseline-Wert wieder erreicht. Zhang *et al.* haben bei ihren Untersuchungen rausgefunden, dass es nach einer permanenten Okklusion zu einer kompletten und permanenten Zerstörung der Zellen kam und sich die FA-Werte nicht mehr normalisierten²³⁰. Andere Studien wiederum beschrieben, dass dank Oligodendrozyten-Vorläuferzellen 2 Wochen nach einer temporären Okklusion eine Remyelinisierung von Axonen in peripheren Schlaganfallbereichen stattfinden kann^{257,258}. Die verbesserten FA-Werte über die Zeit in der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Integrität der Zellen hier nicht vollständig verloren gegangen ist. Da die FA-Werte für die Ambroxolgruppe ab dem 24 h Zeitpunkt für die restlichen Messungen etwa gleich blieben, ist außerdem davon auszugehen, dass Ambroxol die Myelinisierung nicht förderte, wie es in anderen Versuchen mit anderen Substanzen gezeigt wurde^{195,259,260}, sondern eventuell die Zerstörung von Myelin verringerte und somit weniger Schäden an den Axonen vorhanden

waren. In der Kontrollgruppe könnte eine Erhöhung der FA-Werten über die Zeit dagegen im Zusammenhang mit einer Remyelinisierung der Axone stehen^{209,260,261}. Dennoch bleibt offen, warum nach 1 Monat keine Baseline-Werte gemessen werden konnten, weder in der Ambroxol- noch in der Kontrollgruppe. Zum einen könnte es daran gelegen haben, dass es noch nicht zu einer kompletten Remyelinisierung gekommen war²⁰⁹ und die Werte daher noch etwas niedriger waren, zum anderen könnte es sein, dass einige Axone doch permanenten Schaden erlitten haben und somit für geringere FA-Werte sorgten^{114,256}. Letzteres könnte im Zusammenhang mit der in T2 und ADC gemessenen Nekrose stehen. Durch die Bildung der mit Flüssigkeit gefüllten Zysten des nekrotischen Gewebes liegt eine eher isotrope Diffusion vor, womit die FA Werte tendenziell etwas geringer sind²⁵⁶. Für eine genaue Analyse wären allerdings weitere Messungen mit mehr Zeitpunkten und genaueren histologischen Untersuchungen nötig.

Neben den positiven Entwicklungen im Verhalten und in den FA-Werten konnte in beiden Gruppen außerdem eine Erhöhung der funktionellen Konnektivität beobachtet werden. Durch die deutliche Reduktion der Konnektivität in der Ambroxolgruppe während der subakuten Phase konnten vermutlich nun mehr signifikant höhere Korrelationen zwischen den Zeitpunkten 24 h und 1 Monat in der Ambroxolgruppe festgestellt werden als in der Kontrollgruppe (Abbildung 44). Obwohl die Kontrollgruppe in der subakuten Phase vor der FDR-Korrektur höhere Korrelationen aufwies (Abbildung 42), konnten im Vergleich zwischen Baseline und 1 Monat zum letzten Zeitpunkt mehr reduzierte Konnektivitäten festgestellt werden als in der Ambroxolgruppe (Abbildung 44). Beides könnte darauf zurückzuführen sein, dass Ambroxol als globaler Effekt die gesamte Konnektivität zwischen den Regionen reduzierte und damit eventuell das Ausmaß an Gewebeschädigungen verringerte. Für die Ambroxolgruppe lagen die meisten Veränderungen der Konnektivität vor der FDR-Korrektur sowohl im *Septum* als auch im *Hypothalamus* und nur wenige im *Striatum* (Abbildung 44). Der *Hypothalamus* koordiniert hauptsächlich das vegetative Nervensystem und ist bei Tieren unter anderem für die Erfüllung von Bedürfnissen wie das Fressverhalten verantwortlich¹⁹. Möglicherweise könnten durch weiterführende Versuche untersucht werden, ob die durch Ambroxol signifikant reduzierten Korrelationen im *Hypothalamus* einen Einfluss auf das Fressverhalten der behandelten Tiere haben. In der Kontrollgruppe hingegen waren nach 1 Monat im ipsilateralen *Striatum* viele Korrelationen im Vergleich zur Baseline vor der FDR-Korrektur reduziert (Abbildung 44). Durch die Rolle des *Striatums* als Umschaltstelle von neuronalen Informationen könnte dies ein Grund dafür sein, dass die Kontrollgruppe zum Beispiel im Beam Walk nach 1 Monat im Vergleich zu Baseline immer noch schlechter abschloss als die Ambroxolgruppe. Allerdings konnte in der motorischen Bahn nach 1 Monat selbst kein Hinweis darauf gefunden werden (Abbildung 45). Beide Gruppen hatten nach 1 Monat

eine signifikant geringere Korrelation zwischen beiden *Striata* im Vergleich zur Baseline. Diese Daten sprechen dafür, dass es einen vorerst permanenten Konnektivitätsverlust zwischen dem ipsi- und kontralateralen *Striatum* gab. Da kein Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf den permanenten Konnektivitätsverlust im *Striatum* gefunden werden konnte, lässt sich nur aus den T2- und ADC-Werten sowie der Histologie erkennen, dass die Kontrollgruppe mehr nekrotisches Gewebe im *Striatum* hatte (Abbildung 31, Abbildung 35 & Abbildung 37). Bei genauerer Betrachtung der Unterschiede zwischen den Gruppen fiel auf, dass die Kontrollgruppe, trotz größerer Defizite im Verhalten, nach 1 Monat dennoch einige höhere Korrelation in der motorischen Bahn im *Striatum*, *S1 Cortex* und *M1 Cortex* hatten (Abbildung 43). Diese Signifikanzen waren aber nach der FDR-Korrektur verschwunden. Wenngleich diese Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten sind, zeigt es dennoch, dass diese Korrelationen in der Kontrollgruppe höher waren. Die Daten deuten darauf hin, dass es in der Kontrollgruppe vermutlich zu einer Kompensation mit Hilfe der kontralateralen Hemisphäre kam, obwohl die Kontrolltiere in den meisten Verhaltenstests schlechter abschnitten als die Tiere, die mit Ambroxol behandelt wurden. Vor allem der kontralaterale *M1 Cortex* könnte in den ersten 4 Wochen nach einem Schlaganfall eine bedeutende Rolle bei der Genesung der motorischen Funktionen gespielt haben ²⁶², da seine Korrelationen in der Kontrollgruppe in der chronischen Phase höher waren, als in der Ambroxolgruppe. Dies könnte möglicherweise auch mit der erhöhten Beweglichkeit im Open Field der Kontrolltiere zusammenhängen. Interessanterweise konnte dieses Phänomen auch in anderen Bereichen beobachtet werden. Beispielsweise führt die Neurodegeneration der dopaminergen Neurone bei Parkinsonpatienten ebenfalls zu einer höheren Korrelation im Cortex, wobei auch hier möglicherweise von einer Art kompensatorischen Effekt ausgegangen werden kann ^{263–265}. Allgemein sollen drei wichtige Prozesse für eine Besserung nach einem Schlaganfall auf funktionaler Ebene sprechen: eine Reorganisation der Neurone um den Schlaganfallbereich, eine erhöhte Aktivierung der kontralateralen Hemisphäre im Zusammenhang mit projizierenden Axone zur ipsilateralen Hemisphäre sowie neuronale Plastizität mit einer erhöhten dendritischen Verzweigung in der kontralateralen Hemisphäre ²⁶⁶. Wie und welche Art der Kompensation bei den Tieren stattgefunden hat, lässt sich aber anhand dieser Daten nicht endgültig sagen. Dafür wären weitere Versuche nötig. Dennoch ist davon auszugehen, dass Tiere, die mit Ambroxol behandelt wurden, einen weniger schweren Verlauf der Schlaganfälle hatten und es für diese Tiere daher nicht nötig war, die Defizite mit der kontralateralen Seite zu kompensieren, wie es bei den Tieren aus der Kontrollgruppe der Fall war.

5.2.4 Fazit und Ausblick von Ambroxol als Therapeutikum für Schlaganfälle

Ein Schlaganfall kann innerhalb weniger Minuten verheerenden und permanenten Schaden an Zellen anrichten und folgenreiche Kaskaden in Gang setzen. Darunter zählen unter anderem der Verlust der Energieversorgung, Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Level, Nekrose, Exzitotoxizität, SpD, Generierung von freien Radikalen, Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, Entzündungsreaktion und schlussendlich Apoptose²¹. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse der Versuche im Rahmen dieser Arbeit, kann man davon ausgehen, dass Ambroxol einen therapeutischen Effekt im MCAO-Rattenmodell hat. Es konnte gezeigt werden, dass behandelte Tiere in der subakuten Phase im *Striatum* signifikant weniger Schlaganfallvolumen auswiesen, signifikant besser in den meisten Verhaltensversuchen abschnitten und ebenfalls signifikant höhere FA-Werte hatten als die Kontrolltiere. Es kann vermutet werden, dass die frühe Gabe von Ambroxol durch das Blockieren der Na^+ -Ionenkanäle die Aufnahme von Na^+ -Ionen reduzierte, damit der Wassereinstrom geringer war, und folglich ein geringeres Ausmaß des Ödems mit sich brachte. Durch das Blockieren der Ca^{2+} -Ionenkanäle könnte die Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen reduziert gewesen sein, wodurch es zu einer reduzierten Produktion von RNS gekommen sein könnte. Durch eine geringere Menge an NO und NO_3^- wäre somit die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke reduziert, wodurch das finale vasogene Ödem positiv beeinflusst worden wäre. Außerdem hemmt Ambroxol die Produktion von ROS, das nachweislich zu einer Verschlimmerung des Schlaganfallvolumen beiträgt^{26,30,75–78}. Dadurch könnte das Ausmaß der oben genannten Folgeschäden in den mit Ambroxol behandelten Tieren geringer gewesen sein. Schlussendlich konnte jedoch kein Unterschied im finalen Schlaganfallvolumen zwischen den Gruppen gefunden werden. Dennoch zeigte sich vor allem bei den T2- und ADC-Ergebnissen, dass die Ambroxolgruppe zum letzten Zeitpunkt weniger Nekrose aufwies. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, dass sich die Gewebe zwischen den Gruppen unterschieden, da das Gewebe in den Tieren, die mit Ambroxol behandelt wurden, weniger stark beschädigt war. Um diese Beobachtung aber schlussendlich verifizieren zu können, muss die Tierzahl für die immunhistochemischen Untersuchungen deutlich erhöht werden. Rückblickend betrachtet ist das Schlaganfallvolumen möglicherweise für den letzten Zeitpunkt ein weniger gut geeigneter Biomarker, um die Therapieeffekte von Ambroxol zu zeigen. Es sollten dafür eher Aspekte in Bezug auf die Nekrose (ADC, T2 und Histologie) herangezogen werden. Anhand der FA-Werte konnte in der sub-akuten und frühen chronischen Phase intaktere Axone in der Ambroxolgruppe festgestellt werden. Zusammen mit dem geringeren Schlaganfallvolumen könnte dies die besseren Ergebnisse in den Verhaltensversuche seitens der mit

Ambroxol behandelten Tiere erklären. In Bezug auf die Verbesserung im Verhalten konnte kein großer Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auffällig war jedoch, dass die Behandlung mit Ambroxol nicht dazu führte, dass sich die Tiere im Verhalten schneller erholten. In der funktionellen Konnektivität konnte ebenfalls vor allem in der subakuten Phase Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Spannungsgesteuerte Na⁺-Ionenkanäle sind generell wichtig für die Reizweiterleitung in den Neuronen. Daher könnte es sein, dass die reduzierte funktionelle Konnektivität in der Ambroxolgruppe ein Indiz für deren Hemmung darstellte. In der chronischen Phase sprechen die besseren Korrelationen in der Kontrollgruppe für eine Kompensation der verlorenen Funktionen seitens der Kontrolltiere.

Obwohl verschiedene Facetten für diesen Versuch beleuchtet wurden, bleiben dennoch viele Fragen offen, die nur durch weitere Versuche beantwortet werden können. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die zu applizierende Dosis von Ambroxol. Ambroxol wurde bereits nach Applikation im Gehirn nachgewiesen, wobei davon ausgegangen werden kann, dass etwa 30-35% der applizierten Ambroxolmenge im Gehirn ankommt⁸⁰. Dennoch bleibt unklar, welche Applikationsmenge den größten therapeutischen Effekt aufweist und welche Applikationsroute die besten Ergebnisse erzielt. Dies sollte zusammen mit dem optimalen Applikationszeitpunkt und der optimalen Applikationsdauer in weiteren Versuchen untersucht werden. Für eine genaue Analyse des Ödemverlaufs wären außerdem mehr Messzeitpunkte hilfreich, an denen auch fMRT gemessen werden sollte. Die zusätzlichen Messzeitpunkte sollten zu jedem Zeitpunkt gewählt werden, an denen die Therapie verabreicht wird. Zusätzlich sollte auch über einen früheren Messzeitpunkt zwischen 4 h bis 6 h in Betracht gezogen werden, da dies den Startpunkt des vasogenen Ödems durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke darstellt. Außerdem wären zusätzlich spätere Zeitpunkte wie zum Beispiel 2 Wochen und 3 Monate für die Entwicklung des Schlaganfallvolumen und des nekrotischen Gewebes interessant. Weitere immunhistochemische Färbungen sollten zudem durchgeführt werden, da so eine tatsächliche Analyse über die Integrität aller Zellen möglich ist. Dabei spielen vor allem Färbungen eine große Rolle, die den Grad der Nekrose, Demyelinisierung und Degeneration von Axonen darstellen.

Selbstverständlich gibt es auch einige Faktoren, die bei der Beurteilung der Ergebnisse beachtet werden sollten. Zunächst stellt das MCAO-Modell die offensichtlichste Wahl zur Untersuchung von Schlaganfalltherapien dar, birgt aber auch Nachteile. Etwa 65 % aller Schlaganfälle beim Menschen treten in der MCA auf⁸⁴. Das MCAO-Modell ist daher das am häufigsten verwendete Tiermodell bei Nagetieren und darunter sind mehr als 40% aller Versuche neuroprotektiver Methoden gewidmet^{82,86}. Dennoch ist zu bedenken, dass bei diesem Modell die Wahl des Filaments und seine Beschaffenheit sowie Größe

eine Rolle spielen⁸². Unterschiedliche Dicken der Filamentspitze stellen eine komplette Okklusion bei Tieren mit unterschiedlichen Gewichten sicher. In dieser Arbeit wurde auf die Verwendung unterschiedlicher Größen der Filamente verzichtet. Obwohl keinerlei Korrelation zwischen der Größe des Infarkts und des Gewichts festgestellt werden konnte (Daten nicht dargestellt), wäre eine Verwendung von unterschiedlichen Filamentgrößen für zukünftige Experimente ratsam, um einen möglichen Effekt auszuschließen. Das mittlere Gewicht der Tiere lag bei dieser Arbeit am Tag der Operation bei $157,5 \pm 16,9$ g, wobei das leichteste Tier 327 g und das schwerste Tier 398 g wog. Obwohl das Modell als sehr gut reproduzierbar gilt, wurde dennoch große Unterschiede zwischen den Schlaganfallvolumina festgestellt ($0,05 \text{ cm}^3 - 0,45 \text{ cm}^3$).

Des Weiteren war die Therapiegabe bei dieser Studie ein limitierender Faktor. Um eine bestmögliche Verteilung des Therapeutikums zu gewährleisten, wäre ein Zeitfenster von 12 Stunden für die Therapiegabe optimal gewesen. Leider war dies durch die Dauer und den Zeitpunkt der Operation, die Durchführung der Verhaltensversuche und der MRT-Messungen logistisch jedoch nicht möglich.

Die Ergebnisse der fMRT-Messungen sollten außerdem mit Vorsicht betrachtet werden. Da beim RS-fMRT die nur sehr kleinen BOLD-Effekte gemessen werden, ist diese Methode sehr anfällig für Einflüsse von außen, insbesondere durch die Verwendung von Narkosen. Eine ausreichende Gruppengröße aufgrund der geringen Sensitivität des MRTs ist daher unerlässlich. Während Menschen bei einer fMRT-Messung in der Regel wach sind, werden Tiere meist narkotisiert²⁶⁷. Theoretisch wäre es ebenfalls möglich, wache Tiere zu messen, sofern sie an die Prozedur gewöhnt wären^{268,269}, allerdings können so spontane Bewegungen und Stressreaktion seitens der Tiere nicht ausgeschlossen werden²⁷⁰. Vor allem bei Tieren mit einem Schlaganfall können Probleme auftreten. Durch den Schlaganfall kann es bei den Tieren unter anderem zu Veränderungen der motorischen Kontrolle und des Gedächtnisses kommen und zusammen mit der durch Stress induzierten Depression die Habituation beeinträchtigen^{267,271}. Narkotisierte Tiere liefern somit belastbarere Ergebnisse. Aufgrund seiner gefäßverengenden Eigenschaften, konnte allerdings ein Einfluss von Isofluran auf die fMRT-Messungen nachgewiesen werden, da es zum einen den Blutfluss erhöht und zum anderen die natürlich vorkommenden funktionellen Konnektivitäten maskiert^{270,272,273}. Eine weitere naheliegende Möglichkeit wären die Verwendung von Narkosen, die weniger Einfluss auf das BOLD-Signal haben, wie zum Beispiel *alpha*-Chloralose oder eine Kombination aus Isofluran und Medetomidin²⁷⁰. Allerdings ist zu beachten, dass eine lange Medetomidinnarkose neben einer erhöhten Herzfrequenz auch eine Hypoxie auslösen kann^{267,274}. Während aber Isofluran und Medetomidin insgesamt für die Tiere besser verträglich sind, sollten die Tiere nach der Verwendung von *alpha*-Chloralose auf Grund der gravierenden

physiologischen Probleme, wie einer metabolischen Azidose, euthanaisiert werden ²⁷⁵. Obwohl eine Studie eine wiederholte Verwendung von Ratten mit Hilfe von geringen Mengen von *alpha*-Chloralose zeigt ²⁷⁶, sollten im Sinne des Tierwohls dennoch die Bestimmungen der GV-SOLAS eingehalten werden, die eine wiederholte Verwendung nicht empfiehlt ²⁷⁵. Eine longitudinale Verfolgung des Schlaganfalls ist damit nicht möglich, ist aber bei der Untersuchung zur Wirksamkeit von Medikamenten gerade wichtig, vor allem wenn das MCAO-Modell verwendet wurde ²⁶⁷. Das MCAO-Modell ist gut geeignet, um den humanen Schlaganfall zu imitieren, aber die Variabilität stellt für die fMRT-Bildgebung ein Problem dar. Weber *et al.* hat zum Beispiel gezeigt, dass Ratten, die alle der gleichen MCAO-Operation unterzogen wurden, unterschiedliche Aktivitätsmuster des BOLD Signals aufwiesen ²⁷⁷. Interessanterweise hing dabei in der chronischen Phase die Größe des Schlaganfallvolumens nicht zwangsläufig mit den funktionellen Ergebnissen zusammen ²⁷⁷. Dies zeigt, wie variabel das Schlaganfallmodell auch im Bereich des fMRT sein kann und wie wichtig daher eine longitudinale Verfolgung der einzelnen Tiere ist ²⁶⁷. Glücklicherweise haben weitere Studien, die von Crofts *et al.* zusammengefasst worden sind, gezeigt, dass die Effekte von Isofluran auf das BOLD Signal dosisabhängig sind ^{245,267}. Damit könnte eine geringere Isoflurankonzentration ein guter Kompromiss sein. Denn trotz des Einflusses von Isofluran, konnten in der vorliegenden Arbeit durch die fMRT-Messungen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden. Dabei wurde auf eine Isoflurankonzentration von 1,5% während der Messungen geachtet. Außerdem wurden die fMRT-Messungen als erstes durchgeführt, um die Beeinträchtigung durch Isofluran so gering wie möglich zu halten. Dennoch könnte für zukünftige fMRT-Messungen eine Kombinationsnarkose aus Isofluran und Medetomidin eine gute Alternative darstellen, sofern die Messzeiten nicht zu lang gewählt sind ²⁷⁴. Studien haben gezeigt, dass die Ergebnisse der Kombinationsnarkose reproduzierbar sind und mit den Ergebnissen von wachen Tieren verglichen werden können ^{270,278}. Allerdings wäre vor einer Verwendung zu klären, ob Medetomidin einen Einfluss auf das Schlaganfallereignis hat oder nicht.

Die Erhebung von histologischen Daten ist ein wichtiger Aspekt, damit anhand von verschiedenen Färbungen und Immunhistochemie weitere Erkenntnisse über die Morphologie von Zellen erlangt werden können. Die Gehirne der Tiere wurden nach der letzten Messung zur Untersuchung verschiedener im Gehirn vorkommender Metaboliten entnommen. Mit diesen Analysen sollten im Rahmen einer Kooperation metabolische Veränderungen charakterisiert werden, die möglicherweise durch die Ambroxolgabe im Gehirn hervorgerufen wurden. Diese Daten sind hier nicht dargestellt, sind aber Gegenstand eines gemeinschaftlichen Papers ¹⁵⁸. Da für die Analyse hauptsächlich Tiere verwendet wurden, die mit Ambroxol behandelt wurden, standen für die histologischen

Analysen deutlich weniger Tiere aus der Ambroxolgruppe als aus der Kontrollgruppe zur Verfügung. Durch ein längeres Einfrieren der Gewebe kam es außerdem teilweise zur Zerstörung von Zellen. Für weitere Versuche könnte eine Konservierung der Gehirne in Paraffin eine Möglichkeit zu Verbesserung darstellen. Zwar reduziert sich das Gesamtvolumen des Gehirns durch die Entwässerung des Gewebes, dennoch könnte eine Zerstörung der Zellen durch Gefrierbrand vermieden und außerdem die Aufbewahrung der Gehirne erleichtert werden.

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ambroxol, wenn es direkt nach einem Schlaganfall verabreicht wurde, in der subakuten und frühen chronischen Phase des Schlaganfalls einen therapeutischen Effekt aufwies. Da vor allem die Ödembildung zu diesen Zeitpunkten für die Patienten einen der größten Risikofaktoren darstellt, an den Folgen eines Schlaganfalls zu versterben, könnte Ambroxol dort einen wichtigen Beitrag zum Überleben dieser Patienten leisten^{193,204,279–282}. Auch wenn sich schlussendlich das finale Schlaganfallvolumen nicht unterschied, kann davon ausgegangen werden, dass Ambroxol sowohl das Verhalten als auch die funktionelle und strukturelle Konnektivität in der subakuten Phase verbesserte, sowie Schäden wie beispielsweise Nekrose in der chronischen Phase reduzierte und so allgemein zu einem besseren Krankheitsverlauf beitrug. Nichtsdestotrotz müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden, um auch die offenen Fragen in Bezug auf die Dosis, das Therapiefenster sowie den Therapiestartzeitpunkt zu beantworten. Höchstwahrscheinlich ist nicht davon auszugehen, dass der therapeutische Effekt in Ratten automatisch auch auf den Menschen übertragbar ist. Vor allem, da die Erfolgchance bisher bei den meisten vielversprechenden Medikamente sehr gering war^{69,283}. Dies liegt zum größten Teil daran, dass die Versuchsbedingungen im Labor meist nicht mit der Lebenssituation der Betroffenen übereinstimmen. Bei Patienten spielen unter anderem das Alter, das Geschlecht, unterschiedliche Vorerkrankungen aber auch die Lebensumstände und Risikofaktoren eine große Rolle^{26,284}. Damit ein Medikament mit größerer Wahrscheinlichkeit auch beim Menschen im klinischen Alltag angewendet werden kann, hat der STAIR (*Stroke Treatment Academic Industry Roundtable*) Kriterien aufgezählt, die für eine erfolgreiche therapeutische Wirkung erfüllt sein sollten^{68,284}. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien ist es wichtig, weiter nach Alternativen für die Behandlung von Schlaganfällen zu suchen. Denn obwohl die Zahl der tödlich verlaufenden Schlaganfälle in den letzten Jahrzehnten aufgrund besserer Behandlungsmethoden zurückgegangen ist, zählt der Schlaganfall noch immer zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland⁹. Darüber hinaus kann in der Zukunft aufgrund des demographischen Wandels mit einer Zunahme von Schlaganfällen gerechnet werden²⁸⁵. Diese Aussichten sollten einen weiteren Motivationsfaktor darstellen neue Behandlungsoptionen zu evaluieren, um einerseits

für betroffene Patienten die Aussicht auf eine erfolgreiche Behandlung zu erhöhen und um andererseits die Kosten für das Gesundheitssystem nicht weiter zu steigern. Die Erkenntnisse dieser Arbeit in Bezug auf Ambroxol stellen dabei einen Beitrag für diesen weiteren Forschungsweg dar.

Literaturverzeichnis

1. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuronen und Gliazellen. In: Neurowissenschaften. Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 25–58.
2. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Bewegungskontrolle durch das Gehirn. In: Neurowissenschaften. Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 517–555.
3. Gelmers H-J, Krämer G, Hacker W, Hennerici M. Klinische Syndrome, Pathogenese und Differentialdiagnose. In: Zerebrale Ischämie. Springer Berlin Heidelberg; 1989. p. 55–101.
4. Chalela JA, Kidwell CS, Nentwich LM, Luby M, Butman JA, Demchuk AM, Hill MD, Patronas N, Latour L, Warach S. Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison. *Lancet*. 2007;369:293–298.
5. Phelps ME. Positron Emission Tomography Provides Molecular Imaging of Biological Processes. *Natl. Acad. Sci.* 1999;97:9226–9233.
6. Baskin A, Buchegger F, Seimbille Y, Ratib O, Garibotto V. PET Molecular Imaging of Hypoxia in Ischemic Stroke: An Update. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2015;13:209–217.
7. Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, Von Stockert TR. A Prospective Community-Based Study of Stroke in Germany—The Erlangen Stroke Project (ESPro). *Stroke*. 1998;29:2501–2506.
8. Heuschmann APU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas PL, Berger K, Prof K, Heuschmann PU. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland Frequency and Care of Stroke in Germany. *Akt Neurol.* 2010;37:333–340.
9. Robert Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und Destatis - Gesundheit in Deutschland. 2015.
10. Stahmeyer JT, Stubenrauch S, Geyer S, Weissenborn K, Eberhard S. Häufigkeit und Zeitpunkt von Rezidiven nach inzidentem Schlaganfall. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2019;116:711–717.
11. Yew KS, Cheng EM. Diagnosis of acute stroke. *Am. Fam. Physician.* 2015;91:528–536.
12. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur. Hear. Netw.* 2017;
13. Hmwe Kyu H, Abate D, Hassen Abate K, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392:1859–1922.
14. Busch MA, Kuhnert R. 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. *J. Heal. Monit.* 2017;1:70–76.
15. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN, et al. Heart disease and stroke

- statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2020;E139–E596.
16. Ursachen eines Schlaganfalls. Dtsch. Stift. Schlaganfall-Hilfe - <https://www.schlaganfall-hilfe.de/de/verstehen-vermeiden/schlaganfall-ursachen>.
 17. Fiebach JB, Schellinger PD. Moderne kernspintechiken beim schlaganfall. *Radiologe*. 2003;43:251–264.
 18. Vavilala MS, Lee LA, Lam AM. Cerebral blood flow and vascular physiology. *Anesthesiol. Clin. North America*. 2002;20:247–264.
 19. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Die Struktur des Nervensystems. In: *Neurowissenschaften*. Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 191–274.
 20. Fantini S, Sassaroli A, Tgavalekos KT, Kornbluth J. Cerebral blood flow and autoregulation: current measurement techniques and prospects for noninvasive optical methods. *Neurophotonics*. 2016;3:031411.
 21. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2007;87:179–197.
 22. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Die neuronale Membran im Ruhezustand. In: *Neurowissenschaften*. Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 59–83.
 23. Siesjö BK, Kristián T, Uchino H. Triggering Events in Ischemic Brain Damage. In: *Cerebral Blood Flow*. Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 45–59.
 24. Hossmann KA, Sakaki S, Zlmmerrmann V. Cation activities in reversible ischemia of the cat brain. *Stroke*. 1977;8:77–81.
 25. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: Friend and foe for ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*. 2019;16.
 26. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22:391–397.
 27. Hatashita S, Hoff JT. Brain Edema and Cerebrovascular Permeability During Cerebral Ischemia in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1988;8:552–559.
 28. Jia SW, Liu XY, Wang SC, Wang YF. Vasopressin hypersecretion-associated brain edema formation in ischemic stroke: Underlying mechanisms. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis*. 2016;25:1289–1300.
 29. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2016;36:513–538.
 30. Sun MS, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang FL, Guo ZN, Yang Y. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2018;2018.
 31. Durward QJ, Del Maestro RF, Amacher AL, Farrar JK. The influence of systemic arterial pressure and intracranial pressure on the development of cerebral vasogenic edema. *J. Neurosurg*. 1983;59:803–809.
 32. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2006;26:1057–1083.
 33. Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, Buchan AM. Neuroprotection in stroke: The importance of collaboration and reproducibility. *Brain*. 2017;140:2079–2092.
 34. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurotransmittersysteme. In: *Neurowissenschaften*. Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 153–190.

35. Smith WS. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: A Therapeutic Perspective. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2004;15.
36. Poeggel G. Allgemeine Zellbiologie. In: Kurzlehrbuch – Biologie. Georg Thieme Verlag KG; 2013. p. 60–61.
37. Hossmann K-A. The Ischemic Penumbra: Pathophysiology and Therapeutic Implications. In: Cerebral Blood Flow. Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 137–146.
38. Hossmann K -A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 1994;36:557–565.
39. Morawetz RB, DeGirolami U, Ojemann RG, Marcoux FW, Crowell RM. Cerebral blood flow determined by hydrogen clearance during middle cerebral artery occlusion in unanesthetized monkeys. *Stroke.* 1978;9:143–149.
40. Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Jacewicz M, Wang XJ, Pulsinelli W. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke.* 1991;22:1032–1039.
41. Ishiyama S, Brecht M. Why are we ticklish? — Press Portal. https://www.huberlin.de/en/press-portal/nachrichten-en/archive/pm1611/nr_161110_01. 2016;
42. Moseley ME, Cohen Y, Mintorovitch J, Chileuitt L, Shimizu H, Kucharczyk J, Wendland MF, Weinstein PR. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: Comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 1990;14:330–346.
43. Moseley ME, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Cohen Y, Kurhanewicz J, Derugin N, Asgari H, Norman D. Diffusion-Weighted MR Imaging of Acute Stroke: Correlation with T2- Weighted and Magnetic Susceptibility-Enhanced MR Imaging in Cats. *Am. J. Neuroradiol.* 1990;11:423–429.
44. Mintorovitch J, Moseley ME, Chileuitt L, Shimizu H, Cohen Y, Weinstein PR. Comparison of diffusion- and T2-weighted MRI for the early detection of cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Magn. Reson. Med.* 1991;18:39–50.
45. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J. Exp. Biol.* 2004;207:3233–3242.
46. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003;62:228–236.
47. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* 1999;55:808–820.
48. Farrell F, Lee A. The Erythropoietin Receptor and Its Expression in Tumor Cells and Other Tissues. *Oncologist.* 2004;9:18–30.
49. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, De Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97:10526–10531.
50. Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.* 2001;101:271–276.
51. Jia Y, Suzuki N, Yamamoto M, Gassmann M, Noguchi CT. Endogenous erythropoietin signaling facilitates skeletal muscle repair and recovery following pharmacologically induced damage. *FASEB J.* 2012;26:2847–2858.
52. Suresh S, Rajvanshi PK, Noguchi CT. The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Front. Physiol.* 2020;10.

53. Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Mol. Brain Res.* 2000;81:29–42.
54. Smith WS. Endovascular Stroke Therapy. *Neurotherapeutics.* 2019;16:360–368.
55. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 1995;333:1581–1588.
56. Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, Lutsep HL, Nesbit GM, Grobelny T, Rymer MM, et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: Results of the MERCI trial. *Stroke.* 2005;36:1432–1438.
57. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:1317–1329.
58. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet.* 2010;375:1695–1703.
59. Tong D, Reeves MJ, Hernandez AF, Zhao X, Olson DWM, Fonarow GC, Schwamm LH, Smith EE. Times from symptom onset to hospital arrival in the get with the guidelines-stroke program 2002 to 2009: Temporal trends and implications. *Stroke.* 2012;43:1912–1917.
60. Papanagiotou P, Ntaios G. Endovascular Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2018;11.
61. Saver JL, Goyal M, Van Der Lugt A, Menon BK, Majoie CBLM, Dippel DW, Campbell BC, Nogueira RG, Demchuk AM, Tomasello A, et al. Time to treatment with endovascular thrombectomy and outcomes from ischemic stroke: A meta-analysis. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 2016;316:1279–1288.
62. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* 2008;32:200–219.
63. Berntman L, Welsh FA, Harp JR. Cerebral protective effect of low-grade hypothermia. *Anesthesiology.* 1981;55:495–498.
64. Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KMA. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: Comparison to normothermia and hyperthermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1989;9:141–148.
65. Carlsson C, Hagerdal M, Siesjö BK. Protective effect of hypothermia in cerebral oxygen deficiency caused by arterial hypoxia. *Anesthesiology.* 1976;44:27–35.
66. Rajah GB, Ding Y. Experimental neuroprotection in ischemic stroke: A concise review. *Neurosurg. Focus.* 2017;42.
67. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2016;15:869–881.
68. Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C. Neuroprotection for ischaemic stroke: Translation from the bench to the bedside. *Int. J. Stroke.* 2012;7:407–418.
69. Chamorro Á, Lo EH, Renú A, Van Leyden K, Lyden PD. The future of neuroprotection in stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2020;92:129–135.
70. Malerba M, Ragnoli B. Ambroxol in the 21st century: Pharmacological and clinical

- update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2008;4:1119–1129.
71. Weiser T. Ambroxol: A CNS Drug? *CNS Drug Rev.* 2008;14:17–24.
72. Fischer J, Pschorn U, Vix JM, Peil H, Aicher B, Müller A, De Mey C. Efficacy and tolerability of ambroxol hydrochloride lozenges in sore throat. Randomised, double-blind, placebo-controlled trials regarding the local anaesthetic properties. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 2002;52:256–263.
73. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Das Aktionspotenzial. In: *Neurowissenschaften*. Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 85–115.
74. Weiser T, Wilson N. Inhibition of tetrodotoxin (TTX)-resistant and TTX-sensitive neuronal Na⁺ channels by the secretolytic ambroxol. *Mol. Pharmacol.* 2002;62:433–438.
75. Štětinová V, Herout V, Květina J. In vitro and in vivo antioxidant activity of ambroxol. *Clin. Exp. Med.* 2004;4:152–158.
76. Gillissen A, Bartling A, Schoen S, Schultze-Werninghaus G. Antioxidant function of ambroxol in mononuclear and polymorphonuclear cells in vitro. *Lung.* 1997;175:235–242.
77. Gillissen A, Schäriling B, Jaworska M, Bartling A, Rasche K, Schultze-Werninghaus G. Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine. *Res. Exp. Med.* 1996;196:389–398.
78. Nowak D, Antczak A, Król M, Bialasiewicz P, Pietras T. Antioxidant properties of ambroxol. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;16:517–522.
79. Bianchi M, Mantovani A, Erroi A, Dinarello CA, Ghezzi P. Ambroxol inhibits interleukin 1 and tumor necrosis factor production in human mononuclear cells. *Agents Actions.* 1990;31:275–279.
80. Yang C-N, Peng W-Y, Lin L-C, Tsai T-H. Protein unbound pharmacokinetics of ambroxol in the blood and brains of rats and the interaction of ambroxol with *Polygala tenuifolia* by multiple microdialysis. *J. Ethnopharmacol.* 2021;269.
81. Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke.* 1976;7:46–53.
82. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015;9:3445–3454.
83. Casals JB, Pieri NCG, Feitosa MLT, Ercolin ACM, Roballo KCS, Barreto RSN, Bressan FF, Martins DS, Miglino MA, Ambrósio CE. The use of animal models for stroke research: A review. *Comp. Med.* 2011;61:305–313.
84. Bogousslavsky J, Melle G Van, Regli F. The lausanne stroke registry: Analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988;19:1083–1092.
85. Trepel M. Blutversorgung des Gehirns. In: *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. München Jena: Urban & Fischer; 2022. p. 284–305.
86. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, Van Der Worp HB, Traystman RJ, MacLeod MR. Different strokes for different folks: The rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010;30:1412–1431.
87. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985;17:497–504.

88. Labat-gest V, Tomasi S. Photothrombotic Ischemia: A Minimally Invasive and Reproducible Photochemical Cortical Lesion Model for Mouse Stroke Studies. *J. Vis. Exp.* 2013;76:50370.
89. Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD, Bethea JR. Photochemically induced cerebral infarction - I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol.* 1987;72:315–325.
90. Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, Watson BD. Photochemically induced cortical infarction in the rat. 1. Time course of hemodynamic consequences. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1986;6:184–194.
91. Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Høyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992;12:484–490.
92. Fiebach JB, Schellinger PD, Gass A, Kucinski T, Siebler M, Villringer A, Ölkens P, Hirsch JG, Heiland S, Wilde P, et al. Stroke Magnetic Resonance Imaging Is Accurate in Hyperacute Intracerebral Hemorrhage. *Stroke.* 2004;35:502–506.
93. Fiebach JB, Schellinger PD, Jansen O, Meyer M, Wilde P, Bender J, Schramm P, Jüttler E, Oehler J, Hartmann M, et al. CT and Diffusion-Weighted MR Imaging in Randomized Order. *Stroke.* 2002;33:2206–2210.
94. Brown RW, Cheng YCN, Haacke EM, Thompson MR, Venkatesan R. Magnetic Resonance Imaging. John Wiley & Sons Ltd; 2014.
95. Huettel SA, Song AW, McCarthy G. FUNCTIONAL Magnetic Resonance Imaging SECOND EDITION. Sinauer Associates, Inc.; 2009.
96. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. Wie funktioniert MRI? Springer Berlin Heidelberg; 2014.
97. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature.* 1973;242:190–191.
98. Plewes DB, Kucharczyk W. Physics of MRI: A primer. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2012;35:1038–1054.
99. Kuperman V. Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Applications. Academic Press; 2000.
100. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Weishaupt D. Spins und das Magnetresonanz-Phänomen. In: Wie funktioniert MRI? Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 1–5.
101. Weishaupt D. Relaxation. In: Wie funktioniert MRI? Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 7–10.
102. Amend M. Multifunctional PET/MR Imaging Decodes Brain Function on Hemodynamic and Metabolic Scales. 2018; Dissertation (Universität Tübingen)
103. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Weishaupt D. Bildkontrast. In: Wie funktioniert MRI? Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 11–19.
104. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Weishaupt D. Schichtwahl und Ortskodierung. In: Wie funktioniert MRI? Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 21–27.
105. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Weishaupt D. Aufbau eines MR-Tomographen. In: Wie funktioniert MRI? Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 41–45.
106. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Weishaupt D. Basis-Pulssequenzen. In: Wie funktioniert MRI? Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 47–54.

107. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Weishaupt D. Schnelle Pulssequenzen. In: *Wie funktioniert MRI?* Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 55–62.
108. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Nanz D. Diffusionsbildgebung. In: *Wie funktioniert MRI?* Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 99–104.
109. Graessner J. Frequently Asked Questions: Diffusion-Weighted Imaging (DWI). *MAGNETOM Flash*. 2011;84–87.
110. Allen LM, Hasso AN, Handwerker J, Farid H. Sequence-specific MR imaging findings that are useful in dating ischemic stroke. *Radiographics*. 2012;32:1285–1297.
111. Shen JM, Xia XW, Kang WG, Yuan JJ, Sheng L. The use of MRI apparent diffusion coefficient (ADC) in monitoring the development of brain infarction. *BMC Med. Imaging*. 2011;11.
112. Takahashi M, Fritz-Zieroth B, Chikugo T, Ogawa H. Differentiation of chronic lesions after stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats using diffusion weighted MRI. *Magn. Reson. Med*. 1993;30:485–488.
113. Giordano C, Kleiven S. Connecting fractional anisotropy from medical images with mechanical anisotropy of a hyperviscoelastic fibre-reinforced constitutive model for brain tissue. *J. R. Soc. Interface*. 2014;11.
114. Thomalla G, Glauche V, Koch MA, Beaulieu C, Weiller C, Röther J. Diffusion tensor imaging detects early Wallerian degeneration of the pyramidal tract after ischemic stroke. *Neuroimage*. 2004;22:1767–1774.
115. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Nanz D. Kardiovaskuläre Bildgebung. In: *Wie funktioniert MRI?* Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 75–97.
116. Verkhratsky A, Parpura V. History of electrophysiology and the patch clamp. *Methods Mol. Biol*. 2014;1183:1–19.
117. Buxton RB. Interpreting the BOLD response. In: *Introduction to Functional Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques*. Cambridge University Press; 2009. p. 400–423.
118. Lv H, Wang Z, Tong E, Williams LM, Zaharchuk G, Zeineh M, Goldstein-Piekarski AN, Ball TM, Liao C, Wintermark M. Resting-State Functional MRI: Everything That Nonexperts Have Always Wanted to Know. *AJNR Am. J. Neuroradiol*. 2018;39:1390–1399.
119. Pauling L, Coryell CD. The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1936;22:210–216.
120. Ogawa S, Lee T -M, Nayak AS, Glynn P. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn. Reson. Med*. 1990;14:68–78.
121. Biswal B, Zerrin Yetkin F, Haughton VM, Hyde JS. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar mri. *Magn. Reson. Med*. 1995;34:537–541.
122. Wehrl H. Möglichkeiten und Grenzen der kombinierten PET/MR-Bildgebung in der onkologischen und neurologischen Grundlagenforschung. 2013; Dissertation (Universität Tübingen)
123. Townsend DW. Basic Science of PET and PET/CT. In: *Positron Emission Tomography*. Springer London; 2006. p. 1–16.
124. Weirich C, Herzog H. Instrumentation and Physical Principles. In: *Molecular Imaging in the Clinical Neurosciences*. 2012. p. 1–22.

125. Cherry SR, Gambhir SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR J.* 2001;42:219–232.
126. Cherry SR, Dahlbom M. PET: Physics, Instrumentation, and Scanners. In: Phelps ME, editor. *PET.* Springer New York; 2006. p. 1–117.
127. van den Hoff J. Kinetic Modeling. In: *Small Animal Imaging - Basics and Practical Guide.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag ; 2011. p. 387–403.
128. Mannheim JG, Judenhofer MS, Schmid A, Tillmanns J, Stiller D, Sossi V, Pichler BJ. Quantification accuracy and partial volume effect in dependence of the attenuation correction of a state-of-the-art small animal PET scanner. *Phys. Med. Biol.* 2012;57:3981–3993.
129. Defrise M, Kinahan PE, Michel CJ. Image Reconstruction Algorithms in PET. In: *Positron Emission Tomography.* Springer-Verlag; 2006. p. 63–91.
130. Mannheim JG. Evaluierung der Quantifizierungsgenauigkeit und des Partialvolumeneffektes in Abhängigkeit der Schwächungskorrektur für die PET sowie Analyse der Kinetik von Kleintier MRT- und CT-Kontrastmitteln und deren Auswirkungen auf die Tierphysiologie in vivo. 2014; Dissertation (Universität Tübingen)
131. Eckelman WC. The Use of Positron Emission Tomography in Drug Discovery and Development. In: *Positron Emission Tomography.* Springer-Verlag; 2006. p. 327–341.
132. Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, Van Dongen GAMS. P-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: A new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2010;37:250–259.
133. Conti M, Eriksson L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. *EJNMMI Phys.* 2016;3.
134. De Berardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2016;2.
135. Piel M, Rösch F. Radiopharmaceutical Chemistry. In: *Molecular Imaging in the Clinical Neurosciences.* 2012. p. 41–73.
136. Meijs WE, Herscheid JDM, Haisma HJ, Pinedo HM. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A.* 1992;43:1443–1447.
137. Holland JP, Sheh Y, Lewis JS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl. Med. Biol.* 2009;36:729–739.
138. Severin GW, Engle JW, Nickles RJ, Barnhart TE. 89Zr Radiochemistry for Positron Emission Tomography. *Med. Chem. (Los. Angeles).* 2011;7:389–394.
139. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999;19:643–651.
140. Dragneva G, Korpisalo P, Ylä-Herttuala S. Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: Challenges in translating preclinical potential into clinical success. *DMM Dis. Model. Mech.* 2013;6:312–322.
141. CC-BY SMART Servier. <https://smart.servier.com/> (Lizenznummer: CC-BY 3.0 license).
142. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84–91.

143. Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E, Başkaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J. Vis. Exp.* 2011;
144. Berressem D. Stroke | Nutritional Neuroscience Research Group, Goethe-University of Frankfurt, Germany | Gunter P. Eckert, Ph.D.
145. Smith HK, Russell JM, Granger DN, Gavins FNE. Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice. *J. Neurosci. Methods.* 2015;249:99–105.
146. Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, Alexoff DL, Patel V, Dewey SL. Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J. Neurosci. Methods.* 2006;155:272–284.
147. Coenen HH, Gee AD, Adam M, Antoni G, Cutler CS, Fujibayashi Y, Jeong JM, Mach RH, Mindt TL, Pike VW, et al. Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry - Setting the record straight. *Nucl. Med. Biol.* 2017;55:v–xi.
148. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press Inc.; 1998.
149. Ionescu TM, Amend M, Hafiz R, Biswal BB, Maurer A, Pichler BJ, Wehrl HF, Herfert K. Striatal and prefrontal D2R and SERT distributions contrastingly correlate with default-mode connectivity. *Neuroimage.* 2021;243.
150. Brett M, Anton J-L, Valabregue R, Poline J-B. Region of interest analysis using an SPM toolbox [abstract]. Presented at the 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, June 2-6, 2002, Sendai, Japan. Available on CD-ROM in NeuroImage, Vol 16, No 2, abstract 497.
151. Rubinov M, Sporns O. Complex network measures of brain connectivity: Uses and interpretations. *Neuroimage.* 2010;52:1059–1069.
152. Miyanishi K, Choudhury ME, Watanabe M, Kubo M, Nomoto M, Yano H, Tanaka J. Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model. *Neurochem. Int.* 2019;122:38–46.
153. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2001;32:1005–1011.
154. Au JL, Weishaupt N, Nell HJ, Whitehead SN, Cechetto DF. Motor and hippocampal dependent spatial learning and reference memory assessment in a transgenic rat model of Alzheimer's disease with stroke. *J. Vis. Exp.* 2016;
155. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate : a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1995;57:289–300.
156. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nat Methods.* 2012;9:671–675.
157. Matsumoto K, Lo EH, Pierce AR, Wei H, Garrido L, Kowall NW. Role of vasogenic edema and tissue cavitation in ischemic evolution on diffusion-weighted imaging: comparison with multiparameter MR and immunohistochemistry. *Am. J. Neuroradiol.* 1995;16:1107–1115.
158. Patzwaldt K, Berezhnoy G, Ionescu T, Schramm L, Wang Y, Owczorz M, Calderón E, Poli S, Serna Higuera LM, Gonzalez-Menendez I, et al. Repurposing the mucolytic agent ambroxol for treatment of sub-acute and chronic ischemic stroke. *Brain Commun.* 2023;5.
159. Juul S. Recombinant erythropoietin as a neuroprotective treatment: In vitro and in

- vivo models. *Clin. Perinatol.* 2004;31:129–142.
160. Chong ZZ, Lin S-H, Kang J-Q, Maiese K. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J. Neurosci. Res.* 2003;71:659–669.
 161. Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:4044–4049.
 162. Schäfer R, Mueller L, Buecheler R, Proksch B, Schwab M, Gleiter CH, Danielyan L. Interplay between endothelin and erythropoietin in Astroglia: The role in protection against hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:2858–2875.
 163. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:4635–4640.
 164. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck H-H, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, et al. Erythropoietin Therapy for Acute Stroke Is Both Safe and Beneficial. *Mol. Med.* 2002;8:495–505.
 165. Minnerup J, Heidrich J, Rogalewski A, Schäbitz WR, Wellmann J. The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. *Stroke.* 2009;40:3113–3120.
 166. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7:a020412.
 167. Zlokovic B V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron.* 2008;57:178–201.
 168. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7:41–53.
 169. Larsen J, Martin D, Byrne M. Recent Advances in Delivery Through the Blood-Brain Barrier. *Curr. Top. Med. Chem.* 2014;14:1148–1160.
 170. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 2002;22:183–192.
 171. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today.* 2007;12:54–61.
 172. Pardridge WM, Eisenberg J, Yang J. Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism.* 1987;36:892–895.
 173. Banks WA, Jumble NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: A comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;505:93–101.
 174. William A. Banks. Leptin Transport Across the Blood-Brain Barrier: Implications for the Cause and Treatment of Obesity. *Curr. Pharm. Des.* 2001;7:125–133.
 175. Sramshetty VB, Grishagin I, Nguyễn Đ-T, Peryea T, Skovpen Y, Stroganov O, Katzel D, Sheils T, Jadhav A, Mathé EA, et al. NCATS Inxight Drugs: a comprehensive and curated portal for translational research. *Nucleic Acids Res.* 2021;50:1307–1316.
 176. Inxight Drugs - <https://drugs.ncats.io/drug/TMK6ND3QJH>.
 177. Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: Molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2011;37:3–

- 23.
178. Jiang X, Andjelkovic A V., Zhu L, Yang T, Bennett MVL, Chen J, Keep RF, Shi Y. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* 2018;163–164:144–171.
179. Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: Targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2018;315:C343–C356.
180. Prakash R, Carmichael ST. Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr. Opin. Neurol.* 2015;28:556–564.
181. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood.* 2004;104:2073–2080.
182. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT, Tom Noguchi C. Erythropoietin Stimulates Proliferation and Interferes with Differentiation of Myoblasts. *J. Biol. Chem.* 2000;275:39754–39761.
183. Velikyan I, Beyer GJ, Bergström-Pettermann E, Johansen P, Bergström M, Långström B. The importance of high specific radioactivity in the performance of ⁶⁸Ga-labeled peptide. *Nucl. Med. Biol.* 2008;35:529–536.
184. Heskamp S, Raavé R, Boerman O, Rijpkema M, Goncalves V, Denat F. ⁸⁹Zr-Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art ⁸⁹Zr Radiochemistry. *Bioconjug. Chem.* 2017;28:2211–2223.
185. Laverman P, Van Der Geest T, Terry SYA, Gerrits D, Walgreen B, Helsen MM, Nayak TK, Freimoser-Grundschober A, Waldhauer I, Hosse RJ, et al. Immuno-PET and immuno-SPECT of rheumatoid arthritis with radiolabeled anti-fibroblast activation protein antibody correlates with severity of arthritis. *J. Nucl. Med.* 2015;56:778–783.
186. Zhu L, Huang L, Wen Q, Wang T, Qiao L, Jiang L. Recombinant human erythropoietin offers neuroprotection through inducing endogenous erythropoietin receptor and neuroglobin in a neonatal rat model of periventricular white matter damage. *Neurosci. Lett.* 2017;650:12–17.
187. Rogers H, Wang L, Yu X, Alnaeeli M, Cui K, Zhao K, Bieker JJ, Prchal J, Huang S, Weksler B, et al. T-cell Acute Leukemia 1 (TAL1) Regulation of Erythropoietin Receptor and Association with Excessive Erythrocytosis. *J. Biol. Chem.* 2012;287:36720.
188. Fuge F, Doleschel D, Rix A, Gremse F, Wessner A, Winz O, Mottaghy F, Lederle W, Kiessling F. In-vivo detection of the erythropoietin receptor in tumours using positron emission tomography. *Eur. Radiol.* 2015;25:472–479.
189. Xie Z, Wu X, Qiu Q, Gong Y, Song Y, Gu Q, Li C. Expression Pattern of Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in Experimental Model of Retinal Detachment. *Curr. Eye Res.* 2007;32:757–764.
190. Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Exp. Neurol.* 2017;288:25–37.
191. Loubinoux I, Volk A, Borredon J, Guirimand S, Tiffon B, Seylaz J, Méric P. Spreading of vasogenic edema and cytotoxic edema assessed by quantitative diffusion and T2 magnetic resonance imaging. *Stroke.* 1997;28:419–427.
192. Katzman R, Clasen R, Igor K, Meyer JS, Pappius HM, Waltz AG. IV. Brain Edema in Stroke: Study group on brain edema in stroke. *Stroke.* 1977;8:512–540.

193. Rosenberg GA. Ischemic brain edema. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1999;42:209–216.
194. Baird AE, Warach S. Magnetic resonance imaging of acute stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998;18:583–609.
195. Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA, Panda S, Davarani SPN, Athiraman H, Li Q, et al. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008;28:1440–1448.
196. Watanabe T, Honda Y, Fujii Y, Koyama M, Matsuzawa H, Tanaka R. Three-dimensional anisotropy contrast magnetic resonance axonography to predict the prognosis for motor function in patients suffering from stroke. *J. Neurosurg.* 2001;94:955–960.
197. Jiang Q, Zhang ZG, Chopp M. MRI evaluation of white matter recovery after brain injury. *Stroke.* 2010;41.
198. Alegiani AC, MacLean S, Braass H, Siemonsen S, Gerloff C, Fiehler J, Cho TH, Derex L, Hermier M, Berthezene Y, et al. Comprehensive analysis of early fractional anisotropy changes in acute ischemic stroke. *PLoS One.* 2017;12:e0188318.
199. Yang Q, Tress BM, Barber PA, Desmond PM, Darby DG, Gerraty RP, Li T, Davis SM. Serial Study of Apparent Diffusion Coefficient and Anisotropy in Patients With Acute Stroke. *Stroke.* 1999;30:2382–2390.
200. Green HAL, Peña A, Price CJ, Warburton EA, Pickard JD, Carpenter TA, Gillard JH. Increased anisotropy in acute stroke: A possible explanation. *Stroke.* 2002;33:1517–1521.
201. Armitage PA, Bastin ME, Marshal I, Wardlaw JM, Cannon J. Diffusion anisotropy measurements in ischaemic stroke of the human brain. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* 1998;6:28–36.
202. Neumann-Haefelin T, Kastrup A, De Crespigny A, Yenari MA, Ringer T, Sun GH, Moseley ME. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: Dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. *Stroke.* 2000;31:1965–1973.
203. O'Donnell ME. Blood-brain barrier Na transporters in ischemic stroke. In: *Advances in Pharmacology.* Academic Press Inc.; 2014. p. 113–146.
204. Dharmasaroja PA. Fluid Intake Related to Brain Edema in Acute Middle Cerebral Artery Infarction. *Transl. Stroke Res.* 2016;7:49–53.
205. Chen YJ, Wallace BK, Yuen N, Jenkins DP, Wulff H, O'Donnell ME. Blood-brain barrier KCa3.1 Channels: Evidence for a role in brain na uptake and edema in ischemic stroke. *Stroke.* 2015;46:237–244.
206. O'Donnell ME, Tran L, Lam TI, Liu XB, Anderson SE. Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004;24:1046–1056.
207. O'Donnell ME, Lam TI, Tran LQ, Foroutan S, Anderson SE. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006;26:1234–1249.
208. Yan Y, Dempsey RJ, Flemmer A, Forbush B, Sun D. Inhibition of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage. *Brain Res.* 2003;961:22–31.

209. van der Zijden JP, van der Toorn A, van der Marel K, Dijkhuizen RM. Longitudinal in vivo MRI of alterations in perilesional tissue after transient ischemic stroke in rats. *Exp. Neurol.* 2008;212:207–212.
210. Knight RA, Ordidge RJ, Helpers JA, Chopp M, Rodolosi LC, Peck D. Temporal evolution of ischemic damage in rat brain measured by proton nuclear magnetic resonance imaging. *Stroke.* 1991;22:802–808.
211. Lin SP, Schmidt RE, McKinstry RC, Ackerman JJH, Neil JJ. Investigation of mechanisms underlying transient T2 normalization in longitudinal studies of ischemic stroke. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2002;15:130–136.
212. Naruse S, Horikawa Y, Tanaka C, Hirakawa K, Nishikawa H, Yoshizaki K. Proton nuclear magnetic resonance studies on brain edema. *J. Neurosurg.* 1982;56:747–752.
213. Unger E, Littlefield J, Gado M. Water Content and Water Structure in CT and MR Signal Changes: Possible Influence in Detection of Early Stroke. *Am. J. Neuroradiol.* 1988;9:687–691.
214. Warach S, Gaa J, Siewert B, Wielopolski P, Edelman RR. Acute human stroke studied by whole brain echo planar diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann. Neurol.* 1995;37:231–241.
215. Hausser N, Johnson K, Parsley MA, Guptarak J, Spratt H, Sell SL. Detecting behavioral deficits in rats after traumatic brain injury. *J. Vis. Exp.* 2018;2018.
216. Bouët V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp. Neurol.* 2007;203:555–567.
217. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke.* 1997;28:2060–2066.
218. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp. Transl. Stroke Med.* 2010;2.
219. Karthikeyan S, Jeffers MS, Carter A, Corbett D. Characterizing Spontaneous Motor Recovery Following Cortical and Subcortical Stroke in the Rat. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2019;33:27–37.
220. Höltner SM, Glasl L. High-throughput mouse phenotyping. In: *Neuromethods.* 2011. p. 109–133.
221. Roulston CL, Callaway JK, Jarrott B, Woodman OL, Dusting GJ. Using behaviour to predict stroke severity in conscious rats: Post-stroke treatment with 3', 4'-dihydroxyflavonol improves recovery. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;584:100–110.
222. Navarro-Orozco D, Sánchez-Manso JC. *Neuroanatomy, Middle Cerebral Artery.* StatPearls Publishing; 2022.
223. Dostovic Z, Dostovic E, Smajlovic D, Ibrahimagic OC, Avdic L. Brain Edema After Ischaemic Stroke. *Med. Arch.* 2016;70:339–341.
224. Li J, Henman MC, Tatlisumak T, Shaw GG, Doyle KM. The pre-ischaemic neuroprotective effects of N1-dansyl-spermine in a transient focal cerebral ischaemia model in mice. *Brain Res.* 2005;1055:180–185.
225. Kaiser EE, Waters ES, Fagan MM, Scheulin KM, Platt SR, Jeon JH, Fang X, Kinder HA, Shin SK, Duberstein KJ, et al. Characterization of tissue and functional deficits in a clinically translational pig model of acute ischemic stroke. *Brain Res.* 2020;1736.
226. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and

- spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 2011;17:439–447.
227. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA. Ischaemic stroke. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2019;5:70.
228. Back T, Kohno K, Hossmann KA. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: Effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994;14:12–19.
229. Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct dc shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport.* 1993;4:709–711.
230. Zhang J, Chen S, Shi W, Li M, Zhan Y, Yang L, Zou H, Lei J, Chai X, Gao K, et al. Effects of Xiaoshuan Enteric-Coated Capsule on White and Gray Matter Injury Evaluated by Diffusion Tensor Imaging in Ischemic Stroke. *Cell Transplant.* 2019;28:671–683.
231. Zhang X xue, Yin L kang, Hao X zhu, Tian J qi, Li C chan, Feng X yuan, Yang Y mei. Imaging the Transformation of Ipsilateral Internal Capsule Following Focal Cerebral Ischemia in Rat by Diffusion Kurtosis Imaging. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2017;26:42–48.
232. Ozsunar Y, Grant PE, Huisman TAGM, Schaefer PW, Wu O, Sorensen AG, Koroshetz WJ, Gilberto Gonzalez R. Evolution of Water Diffusion and Anisotropy in Hyperacute Stroke: Significant Correlation between Fractional Anisotropy and T2. *Am. Soc. Neuroradiol.* 2004;25:699–705.
233. Yam PS, Dewar D, McCulloch J. Axonal injury caused by focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neurotrauma.* 1998;15:441–450.
234. Beaulieu C, Allen PS. Determinants of anisotropic water diffusion in nerves. *Magn. Reson. Med.* 1994;31:394–400.
235. Hajnal J V., Doran M, Hall AS, Collins AG, Oatridge A, Pennock JM, Young IR, Bydder GM. Mr imaging of anisotropically restricted diffusion of water in the nervous system: Technical, anatomic, and pathologic considerations. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1991;15:1–18.
236. Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003;23:263–274.
237. Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - A technical review. *NMR Biomed.* 2002;15:435–455.
238. Cengiz P, Uluc K, Kendigelen P, Akture E, Hutchinson E, Song C, Zhang L, Lee J, Budoff GE, Meyerand E, et al. Chronic neurological deficits in mice after perinatal hypoxia and ischemia correlate with hemispheric tissue loss and white matter injury detected by MRI. *Dev. Neurosci.* 2011;33:270–279.
239. Wang S, Wu EX, Cai K, Lau HF, Cheung PT, Khong PL. Mild hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain: Longitudinal evaluation of white matter using diffusion tensor MR imaging. *Am. J. Neuroradiol.* 2009;30:1907–1913.
240. Emos MC, Agarwal S. Neuroanatomy, Internal Capsule. StatPearls Publishing; 2022.
241. Frost SB, Barbay S, Mumert ML, Stowe AM, Nudo RJ. An animal model of capsular infarct: Endothelin-1 injections in the rat. *Behav. Brain Res.* 2006;169:206–211.
242. Wen TC, Sindhurakar A, Ramirez VC, Park H, Gupta D, Carmel JB. Targeted Infarction of the Internal Capsule in the Rat Using Microstimulation Guidance. *Stroke.* 2019;50:2531–2538.

243. Zhou J, Wen Y, She L, Sui YN, Liu L, Richards LJ, Poo MM. Axon position within the corpus callosum determines contralateral cortical projection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:E2714.
244. van Meer MPA, Otte WM, van der Marel K, Nijboer CH, Kavelaars A, van der Sprenkel JWB, Viergever MA, Dijkhuizen RM. Extent of bilateral neuronal network reorganization and functional recovery in relation to stroke severity. *J. Neurosci.* 2012;32:4495–4507.
245. van Meer MPA, van Der Marel K, Wang K, Otte WM, El Bouazati S, Roeling TAP, Viergever MA, Van Der Sprenkel JWB, Dijkhuizen RM. Recovery of sensorimotor function after experimental stroke correlates with restoration of resting-state interhemispheric functional connectivity. *J. Neurosci.* 2010;30:3964–3972.
246. Simard JM, Tarasov K V., Gerzanich V. Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2007;1772:947–957.
247. Gasparly HL, Simon RP, Graham SH. BW1003C87 and NBQX but not CGS19755 reduce glutamate release and cerebral ischemic necrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 1994;262:197–203.
248. Graham SH, Chen J, Sharp FR, Simon RP. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993;13:88–97.
249. Maurissen JPJ, Marable BR, Andrus AK, Stebbins KE. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicol. Teratol.* 2003;25:543–553.
250. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013;33:330–338.
251. Albee RR, Mattsson JL, Yano BL, Chang LW. Neurobehavioral effects of dietary restriction in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 1987;9:203–211.
252. Hillman KL, Wall HJ, Matthews LO, Gowing EK, Clarkson AN. Altered Hippocampal–Prefrontal Dynamics Following Medial Prefrontal Stroke in Mouse. *NeuroMolecular Med.* 2019;21:401–413.
253. Zhou LYY, Wright TE, Clarkson AN. Prefrontal cortex stroke induces delayed impairment in spatial memory. *Behav. Brain Res.* 2016;296:373–378.
254. Hewlett KA, Kelly MH, Corbett D. “Not-so-minor” stroke: Lasting psychosocial consequences of anterior cingulate cortical ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* 2014;261:543–550.
255. Zuo M, Guo H, Wan T, Zhao N, Cai H, Zha M, Xiong Y, Xie Y, Ye R, Liu X. Wallerian degeneration in experimental focal cortical ischemia. *Brain Res. Bull.* 2019;149:194–202.
256. Sotak CH. The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain - A review. *NMR Biomed.* 2002;15:561–569.
257. Tanaka K, Nogawa S, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A. Upregulation of oligodendrocyte progenitor cells associated with restoration of mature oligodendrocytes and myelination in peri-infarct area in the rat brain. *Brain Res.* 2003;989:172–179.
258. Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain. *Neuroreport.* 2001;12:2169–2174.
259. Li L, Jiang Q, Ding G, Zhang L, Zhang ZG, Li Q, Panda S, Kapke A, Lu M, Ewing JR, et al. MRI identification of white matter reorganization enhanced by erythropoietin treatment in a rat model of focal ischemia. *Stroke.* 2009;40:936–

- 941.
260. Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, Silver B, Zhang L, Meng H, Lu M, Pourabdillah-Nejed-D. S, Wang L, Savant-Bhonsale S, et al. MRI detects white matter reorganization after neural progenitor cell treatment of stroke. *Neuroimage*. 2006;32:1080–1089.
261. Wang C, Stebbins GT, Nyenhuis DL, deToledo-Morrell L, Freels S, Gencheva E, Pedelty L, Sripathirathan K, Moseley ME, Turner DA, et al. Longitudinal changes in white matter following ischemic stroke: A three-year follow-up study. *Neurobiol. Aging*. 2006;27:1827–1833.
262. Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science*. 1996;272:1791–1794.
263. Moraschi M, Giulietti G, Giove F, Guardati M, Garreffa G, Modugno N, Colonnese C, Maraviglia B. fMRI study of motor cortex activity modulation in early Parkinson's disease. *Magn. Reson. Imaging*. 2010;28:1152–1158.
264. Thobois S, Dominey P, Decety J, Pollak P, Gregoire MC, Broussolle E. Overactivation of primary motor cortex is asymmetrical in hemiparkinsonian patients. *Neuroreport*. 2000;11:785–789.
265. Sabatini U, Boulanouar K, Fabre N, Martin F, Carel C, Colonnese C, Bozzao L, Berry I, Montastruc JL, Chollet F, et al. Cortical motor reorganization in akinetic patients with Parkinson's disease. A functional MRI study. *Brain*. 2000;123:394–403.
266. Abo M, Chen Z, Lai LJ, Reese T, Bjelke B. Functional recovery after brain lesion - Contralateral neuromodulation: An fMRI study. *Neuroreport*. 2001;12:1543–1547.
267. Crofts A, Kelly ME, Gibson CL. Imaging Functional Recovery Following Ischemic Stroke: Clinical and Preclinical fMRI Studies. *J. Neuroimaging*. 2020;30:5–14.
268. Stenroos P, Paasonen J, Salo RA, Jokivarsi K, Shatillo A, Tanila H, Gröhn O. Awake rat brain functional magnetic resonance imaging using standard radio frequency coils and a 3D printed restraint kit. *Front. Neurosci*. 2018;12.
269. King JA, Garelick TS, Brevard ME, Chen W, Messenger TL, Duong TQ, Ferris CF. Procedure for minimizing stress for fMRI studies in conscious rats. *J. Neurosci. Methods*. 2005;148:154–160.
270. Paasonen J, Stenroos P, Salo RA, Kiviniemi V, Gröhn O. Functional connectivity under six anesthesia protocols and the awake condition in rat brain. *Neuroimage*. 2018;172:9–20.
271. Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, Zhou H, Teng GJ, Chen BA. Anhedonia and activity deficits in rats: Impact of post-stroke depression. *J. Psychopharmacol*. 2009;23:295–304.
272. Masamoto K, Fukuda M, Vazquez A, Kim SG. Dose-dependent effect of isoflurane on neurovascular coupling in rat cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci*. 2009;30:242–250.
273. Maekawa T, Tommasino C, Shapiro HM, Keifer-Goodman J, Kohlenberger RW. Local cerebral blood flow and glucose utilization during isoflurane anesthesia in the rat. *Anesthesiology*. 1986;65:144–151.
274. Pawela CP, Biswal BB, Hudetz AG, Schulte ML, Li R, Jones SR, Cho YR, Matloub HS, Hyde JS. A protocol for use of medetomidine anesthesia in rats for extended studies using task-induced BOLD contrast and resting-state functional connectivity. *Neuroimage*. 2009;46:1137.

275. Becker K, Bergadano A, Eberspächer E, Haberstroh WJ, Henke J, Sager M, Zahner D, Giessen M, Arras Z. Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT Fachinformation zum Einsatz von α -Chloralose bei Versuchen mit Nagetieren und Kaninchen. 2016.
276. de Celis Alonso B, Makarova T, Hess A. On the use of α -chloralose for repeated BOLD fMRI measurements in rats. *J. Neurosci. Methods*. 2011;195:236–240.
277. Weber R, Ramos-Cabrer P, Justicia C, Wiedermann D, Strecker C, Sprenger C, Hoehn M. Early prediction of functional recovery after experimental stroke: Functional magnetic resonance imaging, electrophysiology, and behavioral testing in rats. *J. Neurosci*. 2008;28:1022–1029.
278. Grandjean J, Schroeter A, Batata I, Rudin M. Optimization of anesthesia protocol for resting-state fMRI in mice based on differential effects of anesthetics on functional connectivity patterns. *Neuroimage*. 2014;102 Pt 2:838–847.
279. Gartshore G, Patterson J, Macrae IM. Influence of ischemia and reperfusion on the course of brain tissue swelling and blood-brain barrier permeability in a rodent model of transient focal cerebral ischemia. *Exp. Neurol*. 1997;147:353–360.
280. Bounds J V, Wiebers DO, P WJ, Okazaki H. Mechanisms and Timing of Deaths from Cerebral Infarction. *Stroke*. 1981;12:474–477.
281. Ropper AH. Brain Edema After Stroke: Clinical Syndrome and Intracranial Pressure. *Arch. Neurol*. 1984;41:26–29.
282. Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, Von Kummer R. “Malignant” middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch. Neurol*. 1996;53:309–315.
283. Green AR. Why do neuroprotective drugs that are so promising in animals fail in the clinic? An industry perspective. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2002;29:1030–1034.
284. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*. 1999;30:2752–2758.
285. Foerch C, Misselwitz B, Sitzer M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T. Die Schlaganfallzahlen bis zum Jahr 2050. *Dtsch. Arztebl*. 2008;105:467–473.

Danksagung

Mein Dank gilt all Jenen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet, motiviert und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich aber ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Bernd J. Pichler bedanken, denn nur durch die Annahme meines Forschungsprojektes wurde es mir überhaupt erst ermöglicht, meine wissenschaftlichen Experimente am Werner Siemens Imaging Center durchzuführen und diese Arbeit anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für seine Unterstützung in den letzten Jahren bedanken, die es mir unter anderem ermöglichte, meine Arbeit auf internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Kristina Herfert für die Übernahme meines Forschungsprojekts als Erstgutachterin und für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die ich im Rahmen unserer Neurogruppenmeetings stets als Bereicherung gesehen habe.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei Herrn Dr. Salvador Castaneda Vega bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke, dass Du immer an mich geglaubt hast und mich auf meinem Weg fortwährend unterstützt hast. Danke für die engagierte Betreuung, die anregenden Diskussionen, die Korrektur meiner Arbeit und das offene Ohr.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dr. Carsten Calaminus für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die zahlreichen Diskussionen und Beratungen zu den Tierversuchsanträgen bedanken. Für die Bereitschaft meine Doktorarbeit Korrektur zu lesen, möchte ich mich auch herzlich bei Frank Patzwaldt, sowie bei Dr. Andreas Schmid, Dr. Nicolas Bézière, Dr. Gerald Reischel, Tudor Ionescu, Prof. Dr. Dr. Jürgen Steinacker und Arndt Schelling danken.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern der Radiopharmazie, aber vor allem Ramona Stumm und Dominik Seyfried für die Produktion und Markierung von meinen PET-Tracern und die ständige Bereitschaft sich meinen Fragen zu stellen.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Dr. Sven Poli und Dr. Yi Wang für die tolle Zusammenarbeit, die interessanten Diskussionen und die Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Meinen Dank möchte ich auch Sandro Aidone, Maren Harant, Natalie Herrmann, Isabel Sehnke, Laura Kübler, Dr. Sabrina Hoffmann, Marilena Poxleitner, Linda Schramm, Un

Jang und Eduardo Calderón für deren großartige Unterstützung und Hilfe bei meinen Versuchen aussprechen. Mein Dank gilt hier auch Tudor Ionescu, ohne dessen Hilfe die Messungen und Auswertungen der fMRT-Daten nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Maurer und Daniel Bleher für ihre Unterstützung in allen chemischen Angelegenheiten bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Werner Siemens Imaging Centers, die meine Zeit als Doktorandin dort zu etwas Besonderem gemacht haben. Ich möchte mich auch bei Dr. Julia Mannheim, Ines Herbon und Dr. Rebecca Rock sowie dem gesamten Office für alle administrativen Angelegenheiten bedanken.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend und Irene Gonzales für die gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich ebenfalls noch bei Lina Maria Serna Higuera vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie des Universitätsklinikums Tübingen für die fachmännische Unterstützung in Bezug auf meine statistischen Fragen bedanken.

Nicht vergessen möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großmüttern sowie meinem Onkel und meiner Tante zu danken, weil sie immer an mich geglaubt und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben. Ich danke außerdem auch meinen Freunden für das offene Ohr und ihre aufmunternden Worte, während dieser anspruchsvollen Zeit.

Mein besonderer Dank gilt aber meinem Ehemann Arndt Schelling für seine großartige Unterstützung und seine unendliche Geduld, diese anspruchsvolle Zeit mit allen Höhen und Tiefen zusammen mit mir durchgestanden zu haben.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Evaluation eines neuen Biomarkers und eines neuen neuroprotektiven Wirkstoffes für ischämischen Schlaganfall in Ratten mit Positronen-Emissions-Tomographie und Magnetresonanztomographie“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet zu haben. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.05.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, 2023

Beiträge zu dieser Arbeit

Die Konjugation und Radiomarkierung des für diese Arbeit verwendeten Tracers wurde von Ramona Stumm und Dominik Seyfried der Abteilung Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie durchgeführt. Außerdem führte Dominik Seyfried die DC-Messungen und Auswertungen für die Serumstabilität durch. Die finale Grafik sowie die finale Interpretation der Daten wurden von mir erstellt bzw. vorgenommen.

Die Versuche wurden größtenteils eigenständig von mir durchgeführt. Bei den Injektionen von Tracern und Medikamenten sowie den Messungen erhielt ich freundlicherweise Unterstützung durch unsere technischen Assistenten und Assistentinnen sowie der Tierpflegerin. Bei der Durchführung der Operationen unterstützten mich Ronja Lerch, Yi Wang sowie Linda Schramm.

Die Auswertung der Versuche wurde ebenfalls größtenteils von mir vorgenommen. Beratende Unterstützung erhielt ich von Dr. Salvador Castaneda. Für die Analyse der fMRT-Daten stellte Tudor Ionescu freundlicherweise alle MATLAB-Skripte zur Verfügung.

Die histologischen Schnitte für die immunhistologischen Färbungen wurden von Marilena Poxleitner angefertigt. Die Färbungen wurden von Mitarbeiterinnen der Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie am Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt. Die Schnitte zur Evaluierung der finalen Schlaganfallgröße wurden von mir angefertigt und von Mitarbeiterinnen der Dermatologie Abteilung des Universitätsklinikum Tübingen gefärbt. Das Volumen wurde von Eduardo Calderón

ingezeichnet. Die finale Interpretation der Daten sowie die Anfertigung der Grafik wurden von mir vorgenommen.

Un Jang und Eduardo Calderón unterstützten mich bei der Auswertung einiger Videos der Verhaltensversuche. Die finale Auswertung, Anfertigung der Grafiken und Interpretation der Daten wurden von mir durchgeführt.

Publikationen

Wissenschaftliche Journals

Salvador Castaneda-Vega†, Prateek Katiyar†, Francesca Russo, **Kristin Patzwaldt**, Luisa Schnabel, Sarah Mathes, Johann-Martin Hempel, Ursula Kohlhofer, Irene Gonzalez-Menendez, Leticia Quintanilla-Martinez, Ulf Ziemann, Christian la Fougere, Ulrike Erнемann, Bernd J. Pichler, Jonathan A. Disselhorst†, Sven Poli† (2020). Machine learning identifies stroke features between species. *Theranostics*

Hannes Becker†, Salvador Castaneda-Vega†, **Kristin Patzwaldt**, Justyna M. Przystal, Bianca Walter, Filippo C. Michelotti, Denis Canjuga, Marcos Tatagiba, Bernd Pichler, Susanne C. Beck, Eric C. Holland, Christian la Fougère, Ghazaleh Tabatabai (2022). Multiparametric longitudinal profiling of RCAS-tva-induced PDGFB-driven experimental glioma. *Brain Sciences*

Kristin Patzwaldt, Tudor Ionescu, Linda Schramm, Georgy Berezhnoy, Miriam Owczorz, Yi Wang, Eduardo Calderón, Christoph Trautwein, Sven Poli, Bernd Pichler, Salvador Castaneda Vega (2023). Repurposing the mucolytic agent ambroxol for treatment of sub-acute and chronic ischemic stroke. *Brain Communications*

Fertiges Manuskript

Salvador Castaneda-Vega, **Kristin Patzwaldt**, Ramona Stumm, Francesca Russo, Dominik Seyfried, Laura Kübler, Carsten Calaminus, Christian Kesenheimer, Sandra Beer-Hammer, Ursula Kohlhofer, Irene Gonzalez-Menendez, Leticia Quintanilla-Martinez, Dr. Andreas Maurer, Bernd Nürnberg, Christian la Fougère, Bernd J. Pichler. Imaging of cellular injury and hypoxia using Erythropoietin.

Posterpräsentationen

Kristin J. Patzwaldt, Linda Schramm, Yi Wang, Prateek Katiyar, Sven Poli, Bernd J. Pichler, Salvador Castaneda Vega: Evaluation of the therapeutic effects of Ambroxol in ischemic stroke rats. European Molecular Imaging Meeting, 2020, 28. – 31. August, Online-Konferenz.

Patzwaldt K.J., Russo F., Kuebler L., Seyfried D., Maurer A., Neumann M., Poli S., Pichler B.J., Castaneda Vega S.: [⁸⁹Zr] Deferoxamine-EPO can target Erythropoietin receptors in human and rat stroke tissue. Brain and Brain PET, 2019, 04. – 07. Juli, Yokohama, Japan

Patzwaldt K.J., Russo F., Kuebler L., Seyfried D., Maurer A., Neumann M., Poli S., Pichler B.J., Castaneda Vega S.: Erythropoietin receptors can be targeted in human and rat stroke tissue using [⁸⁹Zr]-Deferoxamine-EPO. European Molecular Imaging Meeting, 2019, 19. – 22. März, Glasgow, Großbritannien.

Patzwaldt K.J., Katiyar P., Wang Y., Yang X., Lerch R.K., Disselhorst J.A., Poli S., Castaneda Vega S., Pichler B.J.: Stroke Volume and Behavioral Tests corroborate the analysis of multi-parametric MRI data with ADC as a strong predictor. European Molecular Imaging Meeting, 2018, 19. – 22. März, San Sebastián, Spanien

Patzwaldt K.J., Katiyar P., Wang Y., Yang X., Lerch R.K., Disselhorst J.A., Poli S., Castaneda Vega S., Pichler B.J.: Determination of stroke volume using multi-parametric analysis based on in vivo MRI measurements in rats. Society for Neuroscience, 2017, 11. – 15. November, Washington DC, USA.

Kristin J. Patzwaldt, Hanna Napieczynska, Carsten Calaminus, Bernd J. Pichler and Salvador Castaneda Vega: Characterization of sensorimotor deficits on rats with corticostriatal strokes using behavioral assessments in combination with multiparametric MRI. European Molecular Imaging Meeting, 2016, 08. – 10. März, Utrecht, Niederlande.