

Aus der

Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie

**Intranasales ^{64}Cu -EPO als Theranostikum beim
ischämischen Schlaganfall**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Lerch, Ronja Katharina

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. J. Pichler

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Ziemann

Tag der Disputation: 04.11.2022

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Überblick über das Krankheitsbild und die Klinik des Schlaganfalls.....	9
1.1.1 Klinik des ischämischen Schlaganfalls.....	9
1.1.2 Versorgungsleitlinien und Therapiemöglichkeiten beim ischämischen Schlaganfall.....	10
1.1.3 Zelluläre Mechanismen beim ischämischen Schlaganfall.....	14
1.2 Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall.....	16
1.2.1 Magnetresonanztomographie versus Computertomographie.....	17
1.2.2 Möglichkeiten der Positronen-Emissionstomographie.....	19
1.3 Erythropoetin als Tracer und sein Potential als Theranostikum.....	22
1.4 Vorteile einer intranasalen Applikationsroute bei zentralnervöser Medikation.....	25
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	28
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Das tMCAO-Schlaganfallmodell in der Ratte.....	31
2.1.1 Operative Induktion des Schlaganfalls.....	31
2.1.2 Postoperative Versorgung der Versuchstiere.....	33
2.2 Intervention.....	34
2.2.1 Versuchsgruppen.....	35
2.2.2 EPO-PET-Tracer.....	35
2.2.3 intranasale Applikation des Tracers.....	37
2.3 ex vivo Biodistribution.....	37
2.4 Autoradiographie.....	38
2.5 Hämatokrit-Bestimmung.....	39
2.6 Die Verhaltensversuche als Parameter für funktionelle Veränderungen nach dem Schlaganfall.....	39
2.6.1 Open Field.....	43
2.6.2 Sticky Label Test.....	43
2.6.3 Forelimb Alternation Test.....	44
2.6.4 Beam Walk.....	44
2.7 Quantifizierung und Charakterisierung des Schlaganfalls.....	45
2.7.1 Bildgebung: PET.....	45
2.7.2 Bildgebung: MRT.....	46
2.7.3 Histologische Untersuchung.....	48
2.7.4 Analyse und statistische Auswertung.....	48
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Charakteristika des PET-Tracers ⁶⁴ Cu-EPO 24 Stunden nach intranasaler Gabe....	50
3.1.1 Pharmakokinetik von ⁶⁴ Cu-EPO 24 Stunden nach intranasaler Gabe.....	51
3.1.2 Darstellung des Schlaganfallgebiets mittels ⁶⁴ Cu-EPO nach intranasaler Gabe.....	53
3.2 Intraoperative Überwachung der Okklusion mittels MRT.....	58
3.3 Dosisabhängiges Potential des EPO-Tracers als intranasal appliziertes Theranostikum.....	61
3.3.1 Verlaufskontrolle des Schlaganfalls mittels multiparametrischer Bildgebung....	62
3.3.2 Verlaufskontrolle der motorischen Defizite nach dem Schlaganfall.....	71

3.4 Systemische Auswirkungen des intranasal applizierten EPO-Tracers: Der Hämatokrit als Marker für potentielle Unerwünschte Nebenwirkungen.....	75
4 Diskussion.....	77
5 Zusammenfassung.....	86
6 Literaturverzeichnis.....	88
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	101
8 Danksagung.....	102

Abkürzungsverzeichnis

%ID	Percent injected dose (prozentualer Anteil der injizierten Dosis)
ADC	Apparent diffusion coefficient (scheinbarer Diffusionskoeffizient)
AHA	American Heart Association
ASL	Arterial spin labelling (arterielle Spinmarkierung)
CA	Carotid artery (Arteria carotis)
CT	Computertomographie
CTA	Computertomographische Angiographie
DFO	Deferoxamin
DWI	Diffusion-weighted image (diffusionsgewichtete Aufnahme)
ECA	External carotid artery (Arteria carotis externa)
EPO	Erythropoetin
HD	High dose (Versuchstiergruppe mit der höchsten Tracer-Dosis)
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPSEC	High pressure size exclusion chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICA	Internal carotid artery (Arteria carotis interna)
iv	Intravenös
KGW	Körpergewicht
LD	Low dose (Versuchstiergruppe mit der niedrigsten Tracer-Dosis)
MCA	Middle cerebral artery (Arteria cerebri media)
MD	Mid dose (Versuchstiergruppe mit einer mittleren Tracer-Dosis)
MRA	Magnetresonanz-Angiographie
MRT	Magnetresonanztomografie
PET	Positronen-Emissionstomographie
PWI	Perfusion-weighted image (perfusionsgewichtete Aufnahme)
PI.	Placebo-Gruppe
rtPA	Rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator
tMCAO	Transient middle cerebral artery occlusion (transienter Verschluss der Arteria cerebri media)
sc	Subkutan
VOI	Volume of interest (Volumen von Interesse)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Top 10 Todesursachen weltweit 2016.....	7
Abbildung 2: Behandlungsmöglichkeiten beim ischämischen Schlaganfall.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zonen eines Schlaganfalls.....	15
Abbildung 4: Das PET-Prinzip.....	20
Abbildung 5: Die protektiven Funktionen von EPO.....	23
Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Versuche.....	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung des operativen Vorgehens.....	32
Abbildung 8: Versuchsgruppen.....	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung des EPO-PET-Tracers.....	35
Abbildung 10: Intranasale Injektion unter Isofluran-Narkose.....	37
Abbildung 11: Die vier im Projekt verwendeten Verhaltensversuche.....	40
Abbildung 12: Biodistribution von ^{64}Cu -EPO nach 24 Stunden – nasal versus iv.....	51
Abbildung 13: PET-Bildgebung mit intranasalem ^{64}Cu -EPO nach 24 Stunden.....	54
Abbildung 14: ^{64}Cu -EPO-PET 24 Stunden nach Injektion.....	55
Abbildung 15: Repräsentative Beispiele der Autoradiographieplatten sowie der zugehörigen Objektträger mit H&E-gefärbten Schnitten (koronare Schnitte).....	57
Abbildung 16: Vergleich zwischen ^{64}Cu -EPO und ^{89}Zr -EPO.....	58
Abbildung 17: Intraoperative Überwachung der Okklusion mittels MRT.....	59
Abbildung 18: Quantifizierung des ischämischen Gebiets während der Okklusion.....	60
Abbildung 19: Änderung des Schlaganfallvolumens in den vier verschiedenen Gruppen im Verlauf von 3 Monaten.....	62
Abbildung 20: Änderung des Schlaganfallvolumens in den verschiedenen Gruppen zu ausgewählten Zeitpunkte.....	63
Abbildung 21: Änderung der Perfusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen im Verlauf von 3 Monaten.....	65
Abbildung 22: Änderung der Perfusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen zu ausgewählten Zeitpunkten.....	66
Abbildung 23: Änderung der Diffusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen im Verlauf von 3 Monaten.....	68
Abbildung 24: Änderung der Diffusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen zu Ausgewählten Zeitpunkten.....	69
Abbildung 25: Dreimonatige Verlaufskontrolle der motorischen Defizite nach Auslösen des Schlaganfalls.....	71

Abbildung 26: Dreimonatige Verlaufskontrolle der motorischen Defizite nach Auslösen des Schlaganfalls.....	72
Abbildung 27: Korrelation zwischen Schlaganfallvolumen, Neuroscore und Änderung der ADC.....	74
Abbildung 28: Bestimmung des Hämatokrits zwei Wochen nach EPO-Trace-Gabe.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Score Sheet für die Erstellung des Neuroscores.....	41
--	----

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung von neuen Behandlungs- und Diagnosemöglichkeiten beim ischämischen Schlaganfall. Der Schlaganfall ist ein hoch relevantes Krankheitsbild: Jährlich werden weltweit 10 bis 15 Millionen Betroffene gezählt, wobei die Krankheit bei ca. 6 Millionen einen tödlichen Verlauf nimmt und damit laut der *Weltgesundheitsorganisation* die zweithäufigste Todesursache weltweit ist (Abbildung 1). Bei weiteren 5 Millionen Betroffenen bleiben zudem dauerhafte Beeinträchtigungen zurück, womit der Schlaganfall die dritthäufigste Ursache für permanente Behinderungen bei Erwachsenen darstellt (Feigin et al. 2017; World Health Organization [Internetquelle, Zugriff am 25.04.2019]; World Heart Federation [Internetquelle, Zugriff am 10.01.2017]). Laut der *American Heart Association* (AHA) ist davon auszugehen, dass sich die Zahl der Betroffenen in den USA bis 2030 um weitere 3,4 Millionen Menschen steigern wird, was einer Erhöhung der Prävalenz um 20,5% entspräche (Benjamin et al. 2019). Dabei steigen vor

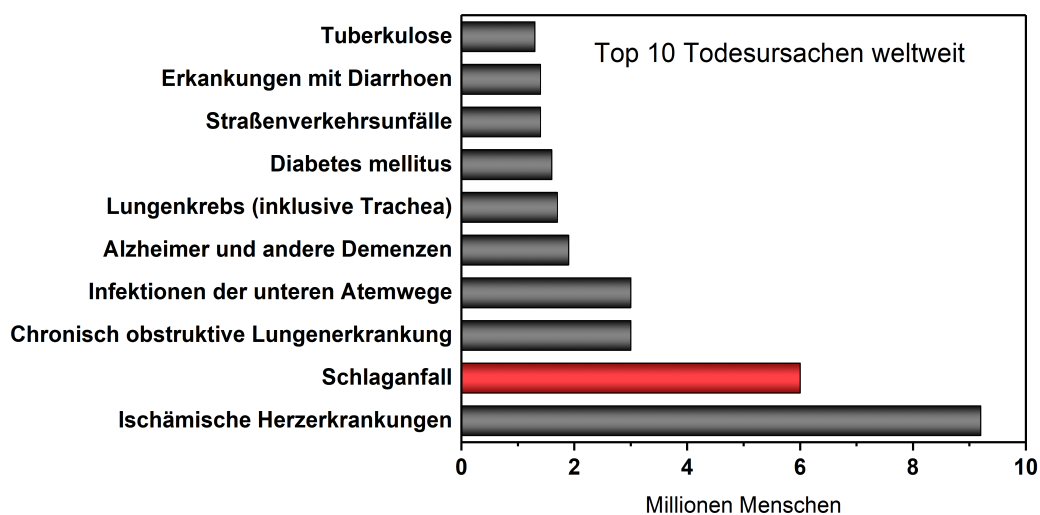


Abbildung 1: Top 10 Todesursachen weltweit 2016 mit dem Schlaganfall als Todesursache Nummer zwei (rot). Abbildung frei erstellt nach den Angaben der World Health Organization (World Health Organization [Internetquelle, Zugriff am 25.04.2019]).

allen in Entwicklungsländern Inzidenz und Mortalität weiter an, während die medizinische Versorgung in Industrienationen seit Jahren für anteilig gleichbleibend Zahlen im Hinblick auf Mortalität und behinderungsbereinigte Lebensjahre sorgt (Feigin et al. 2017; World Heart Federation [Internetquelle, Zugriff am 10.01.2017]).

Auch in Deutschland gehört der Schlaganfall mit 196.000 erstmalig Betroffenen jährlich zu einer der häufigsten Erkrankungen und stellt somit laut des *Robert-Koch-Instituts* die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar (Heuschmann et al. 2010; Robert Koch Institut [Internetquelle, Zugriff am 17.04.2019]). Zusätzlich ist der Schlaganfall die Hauptursache für lebenslange Behinderung unter Erwachsenen in Deutschland und verursacht damit nicht nur Leid bei Betroffenen und deren Angehörigen, sondern auch hohe Ausgaben für das deutsche Gesundheitssystem (lebenslange direkte Behandlungskosten von durchschnittlich 43.129 Euro pro Patient) (EB 2006 in: Deutsches Ärzteblatt). Der Bedeutung dieses Krankheitsbilds wird auch in der Forschung Rechnung getragen: Eine einfache Suche nach dem Stichwort „stroke“ erzielte zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit auf PubMed über 120.000 Treffer.

Im Folgenden werden als Einstieg in die Thematik zunächst die Klinik und Pathophysiologie des Schlaganfalls sowie die aktuellen Behandlungsoptionen erläutert. Anschließend wird speziell auf die verschiedenen Möglichkeiten der Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall und deren Vor- und Nachteile mit Bezug auf die klinische Praxis eingegangen. Kurze Erläuterungen der grundlegenden Funktionsprinzipien der für diese Arbeit verwendeten bildgebende Methoden sollen zudem zum besseren Verständnis der hier erhobenen und diskutierten Daten beitragen. Als Gegenstand dieses Projekts wird schlussendlich radioaktiv markiertes Erythropoetin (EPO) als potentiell Theranostikum für die Behandlung von ischämischen Schlaganfällen und die intranasale Applikationsroute vorgestellt.

1.1 Überblick über das Krankheitsbild und die Klinik des Schlaganfalls

Einem Schlaganfall können zwei verschiedene Pathomechanismen zugrunde liegen: Entweder sorgt ein Gefäßverschluss für eine temporäre Ischämie des Gehirns oder eine Hirnblutung ist die Ursache für eine Unterversorgung des entsprechenden Stromgebiets. Bei 80%, also dem überwiegenden Teil, handelt es sich um Schlaganfälle ischämischer Genese (World Heart Federation [Internetquelle, Zugriff am 10.01.2017]). Daher liegt auch in diesem Projekt der Fokus auf den ischämischen Schlaganfällen.

1.1.1 Klinik des ischämischen Schlaganfalls

Schlaganfälle äußern sich meist durch plötzlich einsetzende fokale neurologische Defizite wie z.B. Paresen der Gliedmaßen oder im Gesicht, Ataxie, Aphasie, Dysarthrie, Gesichtsfeldausfälle, Blickwendung, sensible Ausfälle oder Neglect (Gross und Grose 2017). Als Screening-Test wurde von der AHA das Akronym „FAST“ empfohlen, welches für Face (Gesicht), Arms (Arme), Speech (Sprache) und Time (Zeit) steht und damit die wesentlichen Aspekte erfasst (Powers et al. 2018; Morotti et al. 2019): Möglich sind Hemiparesen sowie Sprach- oder Sprechstörungen und Zeit ist ein kritischer Faktor bei der Versorgung von Schlaganfallpatienten (Stiftung Deutsche Schlaganfall Hilfe [Internetquelle, Zugriff am 20.04.2019]).

Wie oben bereits erwähnt, liegt dem Ischämischen Schlaganfall ein Gefäßverschluss im Gehirn zu Grunde. Dieser Gefäßverschluss kann entweder kardial-embolisch, durch Mikroangiopathien, Atherosklerose oder kryptogen bedingt sein. Zu den kausalen Risikofaktoren zählen daher auch arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Karotisstenosen und Vorhofflimmern. Aber auch weitere Risikofaktoren wie Rauchen, Alkoholabusus und Diabetes mellitus

stehen vermutlich in einem kausalen Zusammenhang. Davon abgeleitet kann also ein gesunder Lebensstil dazu beitragen das Schlaganfallrisiko zu reduzieren (Übersichtsartikel von Hankey 2017).

Neben dem Risiko eines tödlichen Verlaufs besteht nach einem akutem ischämischen Schlaganfall vor allem einerseits das Risiko von permanenten neurologischen Ausfällen (teilweise bei bis zu 75% der Patienten, Prozentsatz regional stark schwankend (World Heart Federation [Internetquelle, Zugriff am 10.01.2017]) und andererseits das Risiko eines Rezidivs (18% nach drei Monaten ohne Therapie). Am häufigsten werden nach einem Schlaganfall Hemiparesen beobachtet, gefolgt von Gehunfähigkeit, kognitiven Defiziten und Depressionen (Go et al. 2014). Als akute Komplikationen können in der Frühphase zum Beispiel Hirnödeme, Blutungen, epileptische Anfälle oder kardiale Komplikationen auftreten (Bart van der Worp et al. 2008). Es wird somit deutlich, dass ein ischämischer Schlaganfall eine lebensbedrohende Erkrankung ist. Jedoch sind trotz Fortschritten in Diagnostik und Behandlung in den letzten Jahren kaum kausale Behandlungsmöglichkeiten verfügbar, worauf im nächsten Kapitel näher eingegangen wird (1.1.2).

1.1.2 Versorgungsleitlinien und Therapiemöglichkeiten beim ischämischen Schlaganfall

Bei Verdacht auf einen ischämischen Schlaganfall empfiehlt die aktuelle deutsche S1-Leitlinie *Diagnostik bei zerebrovaskulären Erkrankungen* eine unverzügliche diagnostische Abklärung der Symptome in einer spezialisierten Versorgungseinheit, welche Anamnese, Befunderhebung, EKG, Basislabor und zerebrale Bildgebung umfasst (Hennerici et al. 2017). Für die kausale Behandlung eines ischämischen Schlaganfalls existieren als einzige Optionen die Gabe von rekombinanten Gewebsplasminogenaktivator (rtPA) zur Auflösung des Thrombus und/oder eine endovaskuläre Therapie zur mechanischen

Entfernung des Thrombus (Powers et al. 2015; Ringleb et al. 2015; Powers et al. 2018) (Abbildung 2).

Dabei steht derzeit laut Leitlinie für die Therapie mit rtPA lediglich ein sehr enges Zeitfenster von 4,5 Stunden zur Verfügung, weswegen zunächst möglichst rasch mittels Computertomographie (CT) zwischen ischämischen und hämorrhagischem Schlaganfall differenziert werden sollte (Hennerici et al. 2017; Powers et al. 2018). Zusätzlich sollte als Grundlage für die Indikationsstellung einer endovaskulären Therapie *„bei Verdacht auf einen proximalen intrakraniellen Gefäßprozess [...] eine Gefäßdarstellung erfolgen“*, wobei hier bevorzugt die CT-Angiographie (CTA) zur Anwendung kommt und gegebenenfalls um weitere Diagnostik mittels CT (z.B. CT-Perfusion) ergänzt werden sollte (Hennerici et al. 2017).

Die Ausdehnung des Zeitfensters für die Behandlung mit rtPA ist Gegenstand aktueller Forschung. Hier zeigt sich, dass eine Behandlung sogar noch nach bis zu 9 oder 12 Stunden bei ausgewählten Patienten durchaus erfolgreich sein kann (Bai et al. 2019; Ma et al. 2019; Ringleb et al. 2019). In der deutschen Leitlinie wird aktuell empfohlen, potentielle Kandidaten für eine Lyse im erweiterten Zeitfenster im Rahmen einer individuellen Therapieentscheidung mittels Multiparametrischer Magnetresonanztomografie (MRT) mit diffusionsgewichteter Aufnahme (DWI), Magnetresonanz-Angiographie (MRA), T2-gewichteten Aufnahmen, *fluid attenuated inversion recovery*-Sequenz und perfusionsgewichteten Aufnahmen (PWI) zu identifizieren. Bei gleicher Sensitivität, aber höherer Spezifität bietet eine multiparametrische MRT-Bildgebung außerdem durchaus Vorteile gegenüber der CT und kann daher auch zur primären Notfalldiagnostik verwendet werden, wenn dies im entsprechendem Zentrum ohne Zeitverzögerung möglich ist (Hennerici et al. 2017).

Neben der oben dargelegten Diagnostik sollten außerdem zur Verlaufskontrolle regelmäßig eine Schlaganfall-Skala (z.B. die *National Institutes of Health*

Stroke Scale) oder funktionelle Scores (z.B. der *Barthel-Index*) zur Anwendung kommen (Hennerici et al. 2017).

Auch wenn mit der intravenösen Thrombolyse und dem endovaskulären Verfahren zwei Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen, können leider nicht alle Patienten mit ischämischen Schlaganfall einer der beiden Behandlungsoptionen zugeführt werden. Das erste Problem stellt der Zeitfaktor dar: Es ist nicht immer zu ermitteln, wann die Symptome eingesetzt haben, und häufig erreicht der Patient erst nach dem Lysefenster von 4,5 Stunden die Klinik. Eine etwas ältere Studie von 2005 hat ermittelt, dass nur 30% der Patienten zeitig genug eingeliefert wurden, um von einer Therapie mit rtPA zu profitieren (Qureshi et al. 2005). In einer etwas neueren Studie von 2012 wird angemerkt, dass diese Zahlen sich über die Jahre nicht wesentlich geändert hätten und ermittelt einen Prozentsatz von ca. 25% (Tong et al. 2012). Da der Erfolg einer Therapie mit rtPA zeitabhängig ist, sollte diese so schnell wie möglich eingeleitet werden. Trotzdem sind die deutschen Leitlinien 2015 dahingehend erweitert worden, dass ein individueller Heilversuch mit rtPA auch bis 6 Stunden nach Einsetzen der Symptome unternommen werden kann. Allerdings gibt es neben dem Zeitfaktor auch andere Kontraindikationen bei der Gabe von rtPA, wie zum Beispiel unkontrollierbare Blutdruckwerte über 185/110 mmHg oder Krebserkrankungen, welche manche Patienten von der Behandlung ausschließen (Ringleb et al. 2015). Zusammengefasst gibt es verschiedene Gründe gegen die Anwendung von rtPA im Akutfall und obwohl inzwischen immer häufiger eine Lysetherapie durchgeführt wird, erhielten beispielsweise noch im Jahr 2009 in Deutschland lediglich 10% der Schlaganfallpatienten eine entsprechende Behandlung (Heuschmann et al. 2010).

Als noch relativ neue Behandlungsempfehlung steht zusätzlich oder alternativ zur Gabe von rtPA die mechanische Rekanalisation (Thrombektomie) zur Verfügung. Dieses Verfahren ist spezialisierten Zentren vorbehalten (Powers et

al. 2015) und das Patientenkollektiv beschränkt sich auf Patienten mit großen Gefäßverschlüssen im vorderen Kreislauf, Basilarisverschlüssen oder Verschluss einer proximalen Hirnbasisarterie bei gleichzeitigem Vorliegen von Kontraindikationen bezüglich einer Lysetherapie. Laut Schätzung von Professor *Gerhard Hamann* gegenüber der *Ärzte Zeitung* sind damit aktuell 3,5 bis 10% der Schlaganfallpatienten geeignete Kandidaten für ein endovaskuläres Verfahren (Müller [Internetquelle, Zugriff am 22.04.2019]). Bei Verschlüssen des vorderen Kreislaufs sollte die Therapie innerhalb von 6 Stunden nach Symptombeginn durchgeführt werden. Allerdings ist auch hier analog zur Behandlung mit rtPA eine Erweiterung des Zeitfensters bei ausgewählten Patienten möglich (Ringleb et al. 2015). Aktuelle Studien berichten dabei von erfolgreicher Rekanalisation mit deutlich verbessertem Outcome nach bis zu 8, 16 und 24 Stunden (Jovin et al. 2015; Albers et al. 2018; Übersichtsartikel von Bhogal et al. 2018; Nogueira et al. 2018). Legt man diese neuen Erkenntnisse zugrunde, könnten in Zukunft deutlich mehr Patienten von einer Thrombektomie profitieren als bisher angenommen (Übersichtsartikel von Bhogal et al. 2018).



Abbildung 2: Behandlungsmöglichkeiten beim ischämischen Schlaganfall. Zur kausalen Behandlung stehen für geeignete Patienten rtPA (rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator) und/oder eine mechanische Rekanalisation zur Verfügung. Als weitere Therapie werden alle Patienten einer intensivmedizinischen Betreuung zugeführt. Die Anwendung von neuroprotektiven Substanzen wird derzeit noch erforscht und ist klinisch nicht verfügbar.

Neben einer kausalen Therapie kann die intensivmedizinische Versorgung in spezialisierten *Stroke Units* als supportive Therapie die Mortalität senken und Komplikationen abfangen (Hankey 2017; Morotti et al. 2019) (Abbildung 2). Die Gabe von neuroprotektiven Substanzen stellt zusätzlich einen attraktiven Therapieansatz dar, weswegen in den vergangenen Jahren einige Substanzen erforscht wurden. Jedoch konnte bisher keine Substanz klinisch eine funktionelle Verbesserung bewirken, weswegen es hierzu aktuell keine Therapieempfehlungen gibt (Hankey 2017; Powers et al. 2018).

1.1.3 Zelluläre Mechanismen beim ischämischen Schlaganfall

Die pathophysiologische Grundlage eines ischämischen Schlaganfalls ist, wie bereits erläutert, eine plötzliche Blockade eines zerebralen arteriellen Segments und die damit verbundene Durchblutungsstörung im Stromgebiet der betroffenen Arterie. So hängen Lage und Ausdehnung des ischämischen Gebiets primär von der Lage des Gefäßverschlusses ab. Auf zellulärer Ebene führt die Minderversorgung des Gewebes zunächst zu einer Ödembildung (Nabavi und Ringelstein 2007). Hier wird zwischen zytotoxischem und vasogenem Ödem unterschieden: Das zytotoxische Ödem ist das unmittelbare Ergebnis der gestörten zellulären Homöostase in Form einer Zellschwellung, während sich das vasogene Ödem allmählich durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität entwickelt (Klatzo 1967). Als Reaktion auf die Schädigung der Zellen durch die Ischämie treten letztendlich Entzündungsreaktionen und Gewebeveränderungen wie Nekrose, Apoptose und schließlich Vernarbung auf (Nabavi und Ringelstein 2007). Vielfältige zelluläre Prozesse, wie Veränderungen in den Mitochondrien, Exzitotoxizität, freie Radikale, Fehlfaltung von Proteinen und Inflammation mit Cytokinausschüttung, sind an den Schädigungs- und Wiederherstellungsprozessen von Hirngewebe beim Schlaganfall beteiligt (Übersichtsartikel von George und Steinberg 2015). Eine

nähere Erläuterung oben genannter Prozesse würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher werden sie an dieser Stelle lediglich zur Übersicht erwähnt. Für ein grundlegendes Verständnis der therapeutischen Ansätze beim ischämischen Schlaganfall werden im Folgenden jedoch noch einige Details zur zeitlichen Entwicklung der Schlaganfallläsion erläutert.

Back et al. teilen in ihrem Übersichtsartikel von 2004 den Schädigungsmechanismus in eine frühe (<12 h) und eine späte Phase (>12 h) ein: In der frühen Phase werden selektiv Neurone geschädigt. Nach zwei bis drei Stunden finden sich geschwollene Zellkörper und anschließend Anzeichen von Nekrose. In dieser Phase ist die durch die Ischämie verursachte Läsion nur schwach demarkiert und die Größe schwer einzuschätzen. In der zweiten Phase finden sich dann vermehrt irreversible Zellschäden, die Größe der Läsion nimmt zu und die Zellen gehen vermehrt apoptotisch unter (Übersichtsartikel von Back et al. 2004).

Betrachtet man die zeitliche Entwicklung einer Schlaganfallläsion ist vor allem das Konzept der *Penumbra* von Interesse und Gegenstand intensiver Forschung: Die *Penumbra* bezeichnet ein Gebiet um den Kern einer ischämischen Läsion (Abbildung 3). Der Kern selbst stellt ein Areal mit schwerer Ischämie und irreversiblen Zellschäden dar, während in der Umgebung, der *Penumbra*, die Ischämie und ihre Folgen weniger stark ausgeprägt sind. Die *Penumbra* bezeichnet somit ein Hirnareal mit potentiell reversiblen Schäden und ist daher als Ziel für therapeutische Interventionen von besonderem Interesse

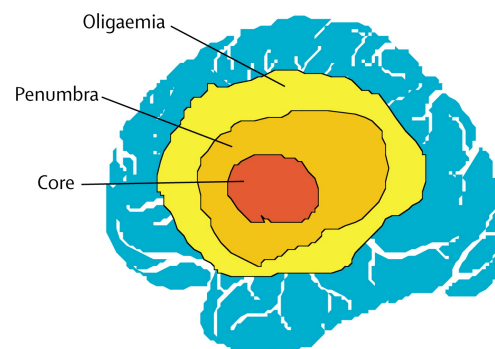


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zonen eines Schlaganfalls. Die Penumbra (orange) umgibt den Kern („Core“; rot) und wird ihrerseits von einem oligämischen Gebiet umgeben („Oligaemia“; gelb). Abbildung übernommen aus *The Lancet Neurology*, Vol. 5, Muir KW, Buchan A, von Kummer R, Rother J, Baron J-C, *Imaging of acute stroke*, 755-768, Copyright (2006), mit Erlaubnis von Elsevier [Lizenznummer: 4587180249411]

(Erstbeschreibung durch Astrup et al. 1981; Übersichtsartikel von Moustafa und Baron 2008). Andersherum kann die *Penumbra* jedoch auch bei weiterer Schädigung in Infarktgewebe übergehen, wenn sich zum Beispiel der Gewebedruck durch die Entwicklung eines vasogenen Ödems erhöht. Darüber hinaus ist die *Penumbra* jedoch auch Gegenstand von Forschung im Bereich der Bildgebung beim Schlaganfall mit Fokus auf die Vorhersage der letztendlichen Infarktgröße und der Identifizierung von geeigneten Patienten für Therapien, wie z.B. Thrombolyse (Übersichtsartikel von Moustafa und Baron 2008). Zum Beispiel konnten *Chung* et al. zeigen, dass Patienten mit bestimmten *Penumbra*-Mustern nach erfolgreicher endovaskulärer Behandlung unabhängig vom Zeitpunkt der Intervention ein besseres funktionales Outcome aufweisen und schlagen daher vor, das *Penumbra*-Muster für die Identifizierung von geeigneten Patienten für eine Therapie in einem erweiterten Zeitfenster zu nutzen (*Chung* et al. 2016).

1.2 Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall

Wie unter 1.1.2 bereits angesprochen, stehen zur Akutdiagnostik des Schlaganfalls im klinischen Setting bildgebenden Verfahren und hierbei, vor allem aufgrund der guten Verfügbarkeit, das CT im Vordergrund. Aber auch MRT-Aufnahmen werden im Rahmen klinischer Routinen verwendet, wohingegen andere bildgebende Verfahren, wie Positronen-Emissionstomographie (PET) oder Single-Photon-Emissions-Computertomographie, hauptsächlich zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen eingesetzt werden (*Thomalla* et al. 2009). Aber auch die bildgebenden Verfahren selbst sind Gegenstand aktueller Forschung und werden permanent weiter entwickelt: Neuere Techniken auf diesem Gebiet sind

zum Beispiel das Gefäßwand-MRT, transkranieller Doppler und 4D CTA oder MRA (Übersichtsartikel von Kilburg et al. 2017).

1.2.1 Magnetresonanztomographie versus Computertomographie

Sowohl MRT als auch CT werden zur Diagnostik von Schlaganfällen eingesetzt. Dabei geht die Tendenz in der Anwendung der beiden Techniken vermehrt in Richtung multiparametrische Bildgebung, um eine „*individuell optimierte Auswahl und Steuerung der Akutbehandlung*“ zu realisieren (Thomalla et al. 2009). Dies spiegelt sich auch in der deutschen Leitlinie wieder, welche für individuelle Therapieentscheidungen explizit multiparametrische MRT-Bildgebung empfiehlt (Hennerici et al. 2017, vergleiche dazu auch Kapitel 1.1.2).

Der unbestreitbare Vorteil einer CT-Bildgebung liegt im Faktor Zeit: Ein CT ist in den meisten Kliniken schnell verfügbar und ein natives CT für einen ersten Überblick ist eine zügig durchgeführte Untersuchung. Nachteile sind unter anderem die Strahlenbelastung und die Belastung durch jodhaltige Kontrastmittel. Außerdem sind der Darstellung ischämischer Läsionen im CT Grenzen gesetzt: So ist zum Beispiel der Hirnstamm im CT aufgrund von Artefakten nur eingeschränkt beurteilbar oder eine erst kurzzeitig bestehende Ischämie gar nicht darstellbar. Ein MRT dagegen ist zwar oft weniger gut verfügbar und für instabile Patienten eventuell ungeeignet, dafür sind mittels DWI-Aufnahmen Ischämien schon kurze Zeit nach Einsetzen der Symptome zu identifizieren und das ganze Gehirn ist mit gutem Weichteilkontrast und über die multiparametrische Bildgebung mit zusätzlichen Informationen darstellbar (Thomalla et al. 2009).

Bei einem DWI-MRT wird vor allem der Kern der Ischämie dargestellt, wobei diese Technik hierfür heute als Goldstandard gilt (Piliszek et al. 2016; Übersichtsartikel von Young und Schaefer 2016). Bei einer DWI-Aufnahme wird

das zytotoxische Ödem erfasst, welches durch einen erniedrigten apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC) gekennzeichnet ist (Fiebach und Schellinger 2003). Der ADC lässt sich aus den Datensätzen eines DWI-MRTs berechnen. Für das DWI-MRT werden die im Magnetfeld parallel und antiparallel ausgerichteten Protonen mittels eines 90° Hochfrequent-Pulses phasenverschoben. Anschließend bringt ein zweiter, entgegengesetzter (180°) Puls diejenigen Protonen zurück in Phase, welche in der Zeit zwischen den Pulsen durch eine Restriktion von freier Diffusion statisch an Ort und Stelle verblieben sind. Bereiche mit Diffusionsrestriktion erscheinen so letztendlich auf dem Bild hyperintens. Da bei dieser Art der Aufnahme auch Anteile des T2-Signals erfasst werden, können hell gezeigte Strukturen jedoch sowohl aufgrund des sogenannten *T2-shine-through-Phänomens* als auch aufgrund einer echten Flüssigkeitsrestriktion hyperintens erscheinen. Daher wird zur besseren Beurteilung eine ADC-Karte berechnet, auf welcher Bereiche mit echter Flüssigkeitsrestriktion hypointens dargestellt werden (Weishaupt et al. 2014).

Es gibt jedoch auch Forschungsergebnisse, die nahelegen, dass sich niedrige ADC-Werte sowohl im Kern als auch in der *Penumbra* finden können, was impliziert, dass ein niedriger ADC nicht unbedingt mit unwiederbringlich geschädigtem Gewebe gleichzusetzen ist (Guadagno et al. 2004). Im Vergleich zum CT ist die Spezifität und Sensitivität eines DWI-MRTs bezüglich der Beurteilung der Infarktgröße jedoch deutlich größer. Zusätzlich zeigte sich in mehreren Studien eine höhere Interratervariabilität bei Beurteilung der CT-Aufnahme im Vergleich zum DWI-MRT. *Fiebach* et al. konnten zeigen, dass vor allem unerfahrenere Assistenzärzte anhand der DWI-MRT die Infarktgröße deutlich häufiger korrekt einschätzen konnten (Fiebach et al. 2002; Saur et al. 2003; Piliszek et al. 2016). Wie eine Metaanalyse von *Biesbroek* et al. zeigt, kann die sehr niedrige Spezifität und Sensitivität (unter 50%) eines nativen CTs durch die Verwendung von CT-Perfusions-Techniken deutlich erhöht werden,

sie reicht dabei allerdings trotzdem nicht an die des DWI-MRTs heran (Biesbroek et al. 2013; Piliszek et al. 2016).

Die multiparametrischen MRT-Bildgebung bietet außerdem die Möglichkeit die Perfusion von Geweben nichtinvasiv, das heißt vor allem auch ohne die Verwendung von Kontrastmitteln, zu messen. Hierfür bietet sich zum Beispiel die Technik des „*arterial spin labeling*“ an: Durch Magnetisierung des Blutes kann dieses als körpereigener Marker verwendet werden, welcher im zu untersuchenden Gewebe zu einer Signalabschwächung führt (Weishaupt et al. 2014). Durch Subtraktion von Datensätzen mit und ohne *labeling* kann so die Perfusion eines Gewebes ermittelt werden (Weishaupt et al. 2014). Als zusätzliche Information lässt sich so durch multiparametrisches MRT und Vergleich von DWI und PWI das *tissue at risk* identifizieren, welches durch den *DWI/PWI-Mismatch* repräsentiert wird. Hierbei handelt es sich also um Gewebe, welches schon minderperfundierte ist, jedoch noch kein zytotoxisches Ödem ausgebildet hat (Fiebach und Schellinger 2003). Für klinische Anwendungen bietet diese Art der Bestimmung des *tissue at risk* robuste Ergebnisse (Übersichtsartikel von: Muir et al. 2006; Mandeville et al. 2017), jedoch ist die Hypothese, dass der *DWI/PWI-Mismatch* die *Penumbra* darstellt, vermutlich nicht zutreffend, da Sobesky et al. zeigen konnten, dass die mittels PET definierte *Penumbra* eher kleiner ist als das *Mismatch-Areal* (Sobesky et al. 2005). Darüber hinaus stellt die Kombination aus DWI- und Perfusions-MRT eine hoch sensitive Methode (bis zu 100%) zur Detektion von ischämischen Veränderungen dar (Piliszek et al. 2016).

1.2.2 Möglichkeiten der Positronen-Emissionstomographie

Die Positronen-Emissionstomographie bietet die Möglichkeit, indirekt biochemische Prozesse in vivo zu beobachten. Hierfür werden radioaktiv markierte Substanzen, sogenannte PET-Tracer, verwendet, welche sich je nach

Eigenschaft des verwendeten Moleküls (Vektor) im Körper verteilen und zum Beispiel an Stoffwechselprozessen teilnehmen oder an Rezeptoren binden. Ein häufig verwendetes Beispiel für einen PET-Tracer ist das Glucose-Analogon ^{18}F -Fluordesoxyglucose, welches sich besonders in Geweben mit hoher Stoffwechselrate und damit hohem Glucoseverbrauch anreichert. Auf Grundlage dieses Funktionsprinzips ist eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten aus Radioisotop und Vektor denkbar, welche zum Beispiel die unterschiedlichsten Stoffwechselprozesse adressieren (Unter anderem erläutert von Cherry 2001; Valk et al. 2006).

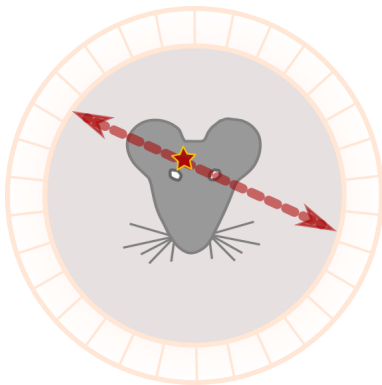


Abbildung 4: Das PET-Prinzip. Durch den dem Tier vorab verabreichten Tracer (Stern) entstehen letztendlich zwei entgegengesetzte Gamma-Photonen mit 511 keV (rote Pfeile), welche auf den Detektorring treffen.

Die für die PET-Bildgebung verwendeten Radioisotope zerfallen unter Emission von Positronen. Treffen diese Positronen auf Elektronen aus der Umgebung, entstehen aus der daraus resultierenden Annihilation zwei sich in die entgegengesetzte Richtung (180°) bewegende Gamma-Photonen mit 511 keV. Diese Photonen werden nun fast gleichzeitig und an gegenüberliegenden Stellen durch die zu einem Ring angeordneten Detektoren eines PET-Scanners registriert, woraus sich die ursprüngliche Position des Radioisotops und damit die des PET-Tracers im Raum berechnen lässt.

Aus diesen Daten lässt sich ein dreidimensionales Bild rekonstruieren, welches mit einer hohen Sensitivität zeigt, wo im Organismus sich der PET-Tracer befindet. Da das resultierende Bild jedoch ausschließlich die Verteilung des PET-Tracers im Organismus zeigt, ist meist ein zusätzliches Bild mittels MRT oder CT nötig, welches die korrelierenden anatomischen Strukturen abbildet. Durch Überlagerung der beiden Bilder entsteht ein dreidimensionales Fusionsbild, welches sowohl die Biodistribution der verwendeten Substanz zeigt, als auch quantitative

Bestimmungen zulässt (Unter anderem erläutert von Cherry 2001; Valk et al. 2006).

Für eine korrekte Quantifizierung eines PET-Scans muss jedoch unter anderem die Abschwächung des Signals bedingt durch Absorption der Photonen im Körper berücksichtigt werden. Dies gelingt durch Erstellung einer *attenuation map* des zu untersuchenden Körpers mittels einer externen radioaktiven oder Röntgen-Quelle, welche bei der Rekonstruktion der Bilder berücksichtigt wird (Zaidi und Hasegawa 2003).

In der Schlaganfallforschung hat die PET-Bildgebung vor allem dazu beigetragen, die verschiedenen Regionen des ischämischen Gebiets zu identifizieren, da sich nur hier die Möglichkeit bietet, metabolische Vorgänge wie zum Beispiel den Sauerstoffverbrauch akkurat zu bestimmen. Daher wird das PET für diese Anwendung zum Beispiel von *Muir et al.* als Goldstandard benannt. So kann heute die *Penumbra* zuverlässig durch die quantitative Bestimmung des regionalen zerebralen Blutflusses sowie des regionalen Sauerstoffverbrauchs ermittelt werden. Für den Blutfluss wird als Tracer am häufigsten ^{15}O -markiertes Wasser verwendet. (Übersichtsartikel von: Markus 2004; *Muir et al.* 2006; Heiss und Zaro Weber 2017). Aber es gibt aus der Forschung auch andere Anwendungsbeispiele für PET-Bildgebung. Zum Beispiel zeigten *Heiss et al.* im Tiermodell, dass ^{11}C -Flumazenil dazu verwendet werden kann, die Größe der letztendlich entstehenden Läsion vorherzusagen und dass eine Abnahme in der Bindung des Tracers irreversible neuronale Schädigungen anzeigt, was in einer Humanstudie bestätigt werden konnte (Heiss et al. 1997; Heiss et al. 1998). Um hypoxische Bereiche des Schlaganfalls darzustellen wurden in Humanstudien schon erfolgreich die Tracer ^{18}F -Misonidazol und ^{62}Cu -Diacetyl-bis(N(4)-Methylthiosemicarbazon) angewendet (Read et al. 1998 zitiert in Baskin et al., 2015; Read et al. 2000;

Markus et al. 2003; Isozaki et al. 2011; Übersichtsartikel von Baskin et al. 2015).

Neben der Darstellung der Läsion oder Subkomponenten der Läsion lassen sich mit der PET auch pathophysiologische Veränderungen auf molekularer Ebene *in vivo* untersuchen, wie zum Beispiel die Verfügbarkeit von Dopamintransportern und D2-Rezeptoren (Momosaki et al. 2017) oder neuroinflammatorische Prozesse (Tóth et al. 2016). Aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten bezeichnet Heiss daher die PET-Bildgebung als bedeutende Technik für die translationale Forschung (Heiss 2014).

1.3 Erythropoetin als Tracer und sein Potential als Theranostikum

Sowohl EPO als auch der EPO-Rezeptor werden unter hypoxischen Bedingungen und damit auch im Falle einer zerebralen Ischämie vermehrt im Gehirn exprimiert. Sie wurden schon früh als endogener Schutzmechanismus bei reduziertem Blutfluss im Gehirn identifiziert und als therapeutisches Agens vorgeschlagen (Bernaudin et al. 1999; Sirén et al. 2001; Übersichtsartikel von Marti 2004). Es wurde sogar postuliert, dass regionale Unterschiede in der Schlaganfall-Mortalität in Zusammenhang mit unterschiedlichen EPO-Leveln steht, welche durch geographische Höhenunterschiede bedingt sind (Ismailov 2012). Heute ist durch eine Vielzahl von Forschungsarbeiten bekannt, dass EPO sowohl anti-apoptotische als auch anti-inflammatorische und anti-oxidative Effekte vermittelt. Des Weiteren stimuliert es die Angiogenese, besitzt neurotrophe Eigenschaften und hat in Tierstudien klare neuroprotektive Eigenschaften gezeigt (Abbildung 5) (Besprochen und zusammengefasst in folgenden Übersichtsartikeln: Sirén et al. 2001; Marti 2004; Ntaios et al. 2008; Subirós et al. 2012; Souvenir et al. 2015). Dadurch ist EPO sowohl als

neuroprotektives Therapeutikum als auch, durch die Hochregulation des Rezeptors in hypoxischem Gewebe, als Biomarker für das Schlaganfallgebiet interessant.

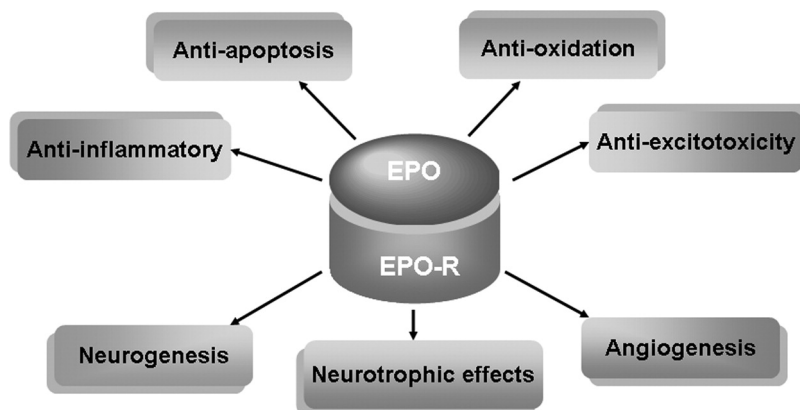


Abbildung 5: Die protektiven Funktionen von EPO. EPO und sein Rezeptor sind in der Lage, anti-inflammatorische, anti-apoptotische, anti-oxidative und anti-exzitotoxische Effekte zu vermitteln sowie Neurogenese, Angiogenese und neurotrophe Effekte zu triggern. Abbildung übernommen von Subirós N, Del Barco DG, Coro-Antich RM (2012): Erythropoetin: still on the neuroprotection road. *Ther Adv Neurol Disord* 5, 161–173 mit Erlaubnis von SAGE Publications

Im Tiermodell wurde EPO schon in verschiedenen Studien erfolgreich als therapeutische Substanz beim ischämischen Schlaganfall eingesetzt. Eine Metaanalyse der präklinischen Forschung zu diesem Thema von 2010 (Jerndal et al. 2010) kommt zu dem Schluss, dass EPO die Infarktgröße um 30% und das verhaltensneurologische Outcome um 39,8% verbessern kann. Für eine Verkleinerung der Infarktgröße scheint dabei schon eine einzelne Dosis ausreichend und effektiv zu sein. Jedoch schränken die Autoren ein, dass bei Studien mit konsequenter Randomisierung und Verblindung der Effekt niedriger ausfällt und die angegebenen Zahlen daher vermutlich zu optimistisch seien (Jerndal et al. 2010).

EPO als therapeutischer Ansatz beim ischämischen Schlaganfall wurde zudem bereits im klinischen Setting in einer Göttinger Studie untersucht. Zunächst

berichteten die Autoren positiv von einem verbesserten klinischen Outcome nach intravenöser Therapie mit hochdosiertem EPO (Ehrenreich et al. 2002). Die im Anschluss durchgeführte Multicenter-Studie konnte dies jedoch nicht bestätigen, sondern gab sogar im Gegensatz dazu den Anlass zu Sicherheitsbedenken aufgrund von unerwarteten Nebenwirkungen und erhöhter Mortalität in der Interventionsgruppe. Jedoch gab die Forschergruppe zu bedenken, dass eine unerwartet hohe Anzahl an Patienten gleichzeitig eine Behandlung mit rtPA erhielt und eine unerwünschte Interaktion der beiden Substanzen nicht auszuschließen sowie eine Kombination der beiden Medikamente in zukünftigen Studien unbedingt zu vermeiden sei. Eine Subgruppenanalyse zeigte zudem, dass auch in dieser Studie Patienten ohne zusätzliche Gabe von rtPA von einer EPO-Therapie profitieren konnten (Ehrenreich et al. 2009). Tatsächlich konnten nachfolgende Studien am Tiermodell zeigen, dass EPO in Kombination mit rtPA zu bis dahin unbekanntem Interaktionen führt, was die Ergebnisse von *Ehrenreich* et al. erklären könnte: So führte eine Kombinationstherapie sechs Stunden nach dem ischämischen Ereignis zu vermehrten Hirnblutungen ohne protektive Effekte und erhöhten Leveln von Matrix-Metalloproteinase-9, NF- κ B und der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase 1 (Jia et al. 2010). Als zugrunde liegender Mechanismus wird vermutet, dass eine massiv erhöhte Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-9 zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Abbau der Extrazellulärmatrix führt (Zechariah et al. 2010). Daher scheint das Potential von EPO als Therapeutikum beim ischämischen Schlaganfall noch ungeklärt und viele Autoren befürworten eine weitere Erforschung der Substanz unter Berücksichtigung von Interaktionen mit anderen Substanzen und/oder Komorbiditäten (Übersichtsartikel von Digicaylioglu 2010; Kumral et al. 2010; Tufekci und Genc 2010; Yip et al. 2011; Yuen et al. 2011; Übersichtsartikel von Subirós et al. 2012). Eine neuere klinische Studie weist darauf hin, dass EPO

als Alternative zur Behandlung mit rtPA eine Option sein könnte (Tsai et al. 2015).

Eine weitere, bisher kaum erforschte Anwendungsmöglichkeit für EPO beim ischämischen Schlaganfall ist die Nutzung als Biomarker für *in vivo* PET-Bildgebung. Fuge et al. haben bereits gezeigt, dass EPO als PET-Tracer benutzt werden kann, um EPO-Rezeptor-positive Tumoren mittels PET zu detektieren. Das hier verwendete ^{68}Ga -DOTA-rhuEpo zeigte *in vivo* eine spezifische Bindung an den EPO-Rezeptor (Fuge et al. 2015). Wissenschaftliche Artikel zur Anwendung eines EPO-PET-Tracers beim ischämischen Schlaganfall sind aktuell nach Kenntnis der Autorin nicht vorhanden, allerdings wurden in unserem Labor schon erste Experimente mit Zirkonium-markiertem EPO im Schlaganfall-Tiermodell erfolgreich durchgeführt (unveröffentlichte Daten, mündliche Mitteilung durch Dr. *Castaneda Vega*).

Die hier dargelegten Eigenschaften von EPO legen die Vermutung nahe, dass man es sowohl zur Therapie als auch zur Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall verwenden kann. Falls das Hormon auch mit radioaktiver Markierung und in einer für PET-Bildgebung geeigneten Dosis therapeutische Wirkung entfaltet, könnte man die Substanz also als Theranostikum verwenden. Diese Möglichkeit soll mit diesem Projekt überprüft werden (siehe 1.5).

1.4 Vorteile einer intranasalen Applikationsroute bei zentralnervöser Medikation

Die Pharmakokinetik einer Substanz spielt eine entscheidende Rolle bei der Erforschung und Entwicklung neuer Medikamente. Bei zentralnervösen Erkrankungen wie dem ischämischen Schlaganfall steht dabei immer die Frage im Raum, ob und wie eine therapeutische Substanz die Blut-Hirn-Schranke überschreitet, um an den Wirkort zu gelangen. Im Speziellen stellen

neurotrophe Faktoren aufgrund ihrer Eigenschaften und Größe ein Problem dar. Für solche Fälle ist die intranasale Applikation eines Wirkstoffs eine interessante Alternative, da auf diesem Weg die Blut-Hirn-Schranke umgangen und so, vermutlich hauptsächlich parazellulär, über das olfaktorische System der frontale Cortex oder über das trigeminale System die Hirnbasis erreicht werden kann (Frey et al. 1997; Thorne et al. 2004; Danielyan et al. 2009; Lochhead et al. 2015) (Außerdem besprochen in: Thorne und Frey 2001; Illum 2004; Hanson und Frey 2008). Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass auch eine intranasale Gabe von Proteinen möglich ist und zu einer relevanten Aufnahme der Substanz in das Gehirn, präziser gesagt den *Bulbus olfactorius*, führt (Thorne et al. 1995). Die intranasale Applikationsroute bietet zudem einige klinisch relevante Vorteile, wie einfache Handhabung, auch bei mehrfacher Gabe, eine nichtinvasive Gabe, sowie eine vergleichsweise schnelle Aufnahme in das Zentrale Nervensystem (ZNS) bei minimaler systemischer Aufnahme (Alcalá-Barraza et al. 2010) und wird daher, abgesehen von den hier angeführten tierexperimentellen Studien, auch erfolgreich am Menschen eingesetzt (Übersichtsartikel von: Illum 2004; Vyas et al. 2005). Auch im Falle oral schlecht absorbierter Substanzen kann die intranasale Gabe eine gute Alternative darstellen, da sowohl lipophile als auch hydrophile Stoffe und Polypeptide über die nasale Mukosa aufgenommen werden können (gezeigt an der Ratte) (Shinichiro et al. 1981).

Im Falle des zuvor besprochenen EPO konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Prozentsatz (bis zu 0,1% der injizierten Dosis pro Gramm) einer systemisch verabreichten Dosis die Blut-Hirn-Schranke überschreitet. Allerdings merken die Autoren an, dass bei einem durch Ischämie geschädigten Gehirn dieser Wert aufgrund von Veränderungen in der Integrität der Blut-Hirn-Schranke abweichen kann (Banks et al. 2004). Abseits dieses geringen Prozentsatzes scheint es jedoch unbestritten, dass EPO trotzdem in einer für therapeutische Zwecke ausreichenden Menge aufgenommen wird (Brines et al.

2000; Banks et al. 2004; Übersichtsartikel von Brines und Cerami 2005). Dabei bleibt jedoch laut einiger Autoren die Sorge bestehen, dass durch die vergleichsweise großen Mengen EPO, welche benötigt werden, um bei systemischer Gabe eine ausreichende Aufnahme ins ZNS zu gewährleisten, unerwünschte Nebenwirkungen wie erhöhte Blutviskosität entstehen könnten (Übersichtsartikel von Merelli et al. 2013). EPO unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke intranasal zu verabreichen scheint hier eine elegante Lösung zu sein und wurde auch schon in einigen tierexperimentellen Studien getestet. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass intranasal verabreichtes EPO rasch in das ZNS aufgenommen wird und dort bereits nach 25 Minuten in relevanten Mengen nachweisbar ist, wobei die aufgenommene Menge je nach Gehirnregion variiert und der *Bulbus olfaktorius* sowie der *Nervus trigeminus* die höchsten Konzentrationen aufweisen (Alcalá-Barraza et al. 2010). Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass intranasal verabreichtes EPO in Kombination mit *insulin-like growth factor-I* im Maus-Modell das Schlaganfallvolumen reduzieren und die neurologische Funktion verbessern kann. Hier konnten die Substanzen zudem schon 20 Minuten nach der Applikation im ischämischen Areal nachgewiesen werden und erreichten höhere Konzentrationen verglichen mit intravenöser, subkutaner oder intraperitonealer Applikation (Fletcher et al. 2009). Des Weiteren kann intranasal verabreichtes EPO schon in kleinsten Dosierungen ab 4,8 U positive Effekte wie ein reduziertes Schlaganfallvolumen und eine Verbesserung motorischer Dysfunktionen zeigen (Yu et al. 2005). Auch Merelli et al. stellten signifikante Effekte von intranasaler EPO-Gabe auf die Spontanmotorik in einem Tiermodell für fokale Hypoxie bei gleichzeitig unveränderter Retikulozytenzahl im Vergleich zu intraperitonealer EPO-Gabe fest (Merelli et al. 2011b). Vor allem Letzteres ist von Interesse bei der Wahl der Administrationsroute, da in einem Maus-Modell mit chronischer Überexpression von EPO und dadurch erhöhtem Hämatokrit gezeigt werden konnte, dass diese Konstellation mit einem schlechteren Outcome nach einem ischämischen

Schlaganfall und somit mit einem Sicherheitsrisiko assoziiert ist (Wiessner et al. 2001). Da bei intranasaler Gabe keine hämatopoetischen Effekte gefunden werden konnten, kann diese Form der Applikation also vermutlich dazu beitragen, systemische Nebenwirkungen von EPO zu vermeiden (Übersichtsartikel von Merelli et al. 2011a).

Zusammengenommen ist die intranasale Gabe von EPO also eine interessanter Ansatz zur gezielten neuroprotektiven Therapie bei gleichzeitiger Vermeidung von potentiellen systemischen Nebenwirkungen, wie auch *Merelli et al.* schon geschlussfolgert haben (Übersichtsartikel von: Merelli et al. 2013; Merelli et al. 2015).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Es wurde dargelegt, dass EPO nach wie vor eine interessante therapeutische Option zur Neuroprotektion beim ischämischen Schlaganfall darstellt und aktuell alternative Applikationsrouten, wie die intranasale Gabe dieser Substanz, untersucht werden, was pharmakokinetische Vorteile bieten könnte. Außerdem wurde erläutert, dass radioaktiv markiertes EPO als PET-Tracer für die Bildgebung beim Schlaganfall dienen könnte. Da gezeigt wurde, dass intranasal schon sehr geringe Mengen EPO einen therapeutische Effekt vermitteln können (Yu et al. 2005) und eine minimal wirksame Dosis von EPO beim ischämischen Schlaganfall aktuell nicht bekannt ist (Übersichtsartikel von Digicaylioglu 2010), stellt sich nun die Frage, ob sogar ein für die Bildgebung intranasal applizierter EPO-Tracer positive Effekte vermitteln kann. Beachtet man die limitierten Therapiemöglichkeiten beim ischämischen Schlaganfall und die Bedeutung der PET-Bildgebung für die Schlaganfallforschung ist die Beantwortung dieser Frage sowohl von hoher klinischer Relevanz als auch interessant für weiterführende Grundlagenforschung. Erstes Ziel dieser Arbeit ist es also, die

Frage nach dem therapeutischen Effekt eines EPO-Tracers tierexperimentell, mittels eines etablierten Rattenmodells für ischämische Schlaganfälle, zu beantworten. Hierfür wurde das „*transient middle cerebral artery occlusion*“ (tMCAO) Modell gewählt. Dieses Verfahren zum Verschluss der *Arteria cerebri media* (MCA = *middle cerebral artery*) ist sehr gut untersucht und das meistgenutzte Modell in Studien zur Neuroprotektion bei Schlaganfällen (Howells et al. 2010). Da Pilotversuche zu der genannten Fragestellung einen dosisabhängigen Effekt des intranasalen EPO-Tracer nahelegen, soll auch diesem Aspekt durch die Versuche Rechnung getragen werden: Hierfür wurden vier Versuchsgruppen gebildet, um den Effekt von drei verschiedene Dosierungen des Tracers nach Einmalgabe im Vergleich zu einem Placebo zu untersuchen. Überprüft werden sollten dabei sowohl das langfristige funktionale Outcome, als auch die Entwicklung der Schlaganfallläsion in der multiparametrischen MRT-Bildgebung. Daher wurde ein Großteil der Tiere über einen Zeitraum von drei Monaten regelmäßig untersucht. Das funktionale Outcome wurde mittels eines Sets von in diesem Labor etablierten Verhaltenstests zur Überprüfung sensomotorischer Funktionen evaluiert. Bei den MRT-Messungen kamen eine T2-, eine ASL- und eine DWI-Sequenz zum Einsatz, um möglichst viele Informationen über die Läsion und deren zeitliche Entwicklung zu gewinnen.

Als zweiter Aspekt soll überprüft werden, ob der intranasal gegebene EPO-Tracer in der Schlaganfallläsion bindet und sich in einer der gewählten Dosierungen zur PET-Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall eignet. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden sowohl *in vivo* PET-Messungen als auch *ex vivo* Autoradiographie-Versuche durchgeführt.

Als dritter Punkt sollten zusätzliche *ex vivo* Biodistributionsversuche dazu beitragen die Pharmakokinetik von EPO nach intranasaler Gabe zu untersuchen und die Frage nach der systemischen Verfügbarkeit zu klären.

2 Material und Methoden

Die Fragestellung wurde tierexperimentell untersucht, wobei auf ein bereits publiziertes Rattenmodell zur Simulation einer zerebralen Ischämie zurückgegriffen wurde (Details siehe unter 2.1). Die durchgeführten Versuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Aktenzeichen R16/11, R11/16 und R15/17). Die Charakteristika des Tracers nach intranasaler Gabe wurden 24 Stunden nach Induktion des Schlaganfalls mittels *in vivo* PET-Messungen (2.7.1) sowie *ex vivo* Biodistribution (2.3) und Autoradiographie (2.4) untersucht. Potentielle hämatopoetische Nebeneffekte durch das Erythropoetin wurden durch Hämatokrit-Messungen zwei Wochen nach Tracer-Gabe evaluiert (2.5). Mögliche therapeutische Effekte durch den Tracer wurden longitudinal über einen Zeitraum von drei Monaten durch Verhaltensanalysen und MRT-Aufnahmen erfasst (2.6 und 2.7.2).

Als Überblick und für ein besseres Verständnis des Studiendesigns ist der zeitliche Ablauf aller im Folgenden beschriebenen Experimente in Abbildung 6 gezeigt.

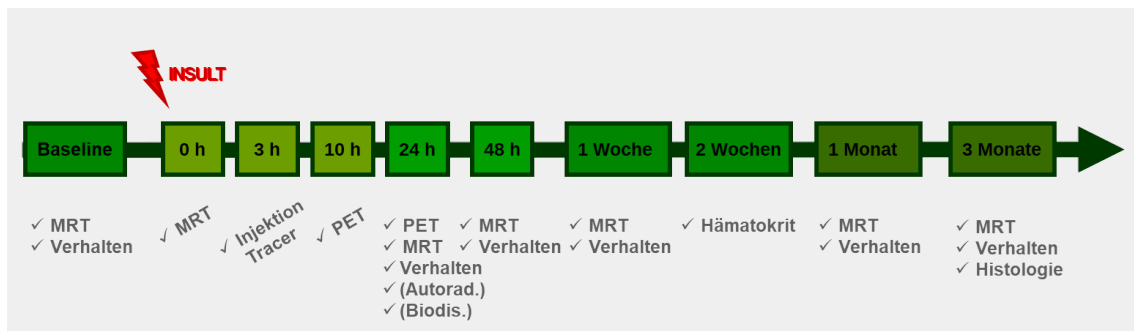


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Versuche. Gezeigt sind die zum jeweiligen Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen. Alle Versuchstiere durchliefen jede Station mit Ausnahme derjenigen Tiere, welche zum Zeitpunkt 24 h für die Biodistribution und Autoradiographie verwendet wurden. Abkürzungen: h = Stunde, Biodis. = Biodistribution, Autorad. = Autoradiographie, MRT = Magnetresonanztomographie, PET = Positronen-Emissionstomographie

2.1 Das tMCAO-Schlaganfallmodell in der Ratte

Für das Projekt wurden männliche *Sprague Dawley* Ratten mit einem Gewicht von ca. 350 g verwendet (*Sprague Dawley Rat Crl:SD Strain Code: 400, Charles River Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland*). Die Tiere wurden in Gruppen von drei bis vier Tieren in individuell ventilierten Käfigen (*SealSafe Plus, Techniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland*) bei 22 ± 1 °C, einer relativen Luftfeuchte von $57 \pm 5\%$ und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Pro Käfig stand Nistmaterial, eine Versteckmöglichkeit sowie Futter und Wasser *ad libidum* zur Verfügung (sofern nicht wie unter 2.6 anders angegeben). Die Schlaganfälle wurden operativ nach Vorbild des tMCAO-Modells ausgelöst (Erstbeschreiber Koizumi et al. 1986; Longa et al. 1989).

2.1.1 Operative Induktion des Schlaganfalls

Für die Operation wurden die Tiere mit *Isofluran* (*Isofluran CP 1 ml/ml, cp pharma, Burgdorf, Deutschland*) narkotisiert (5% zur Einleitung, 1,5-2% zur Aufrechterhaltung der Narkose, in Raumluft ohne zusätzlichen Sauerstoff, Flussrate: 1,5 l/min). Zusätzlich wurde zum Anästhesieren *Metamizol* (*Novaminsulfon-ratiopharm 1g/2ml Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland*) appliziert (100 mg/kg KGW, sc (KGW = Körpergewicht, sc = subkutan)). Die Körpertemperatur der Tiere wurde mittels einer rektalen Temperatursonde kontrolliert und über eine Heizmatte mit Feedback-System (*Medres – medical research GmbH, Köln, Deutschland*) im physiologischen Bereich gehalten. Die Augen wurden durch das Auftragen von Augensalbe (*Corneregel, Bausch&Lomb GmbH, Berlin, Deutschland*) geschützt. Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend platziert und das Operationsfeld im Vorfeld

rasiert und mit *Braunol* (*B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*) desinfiziert.

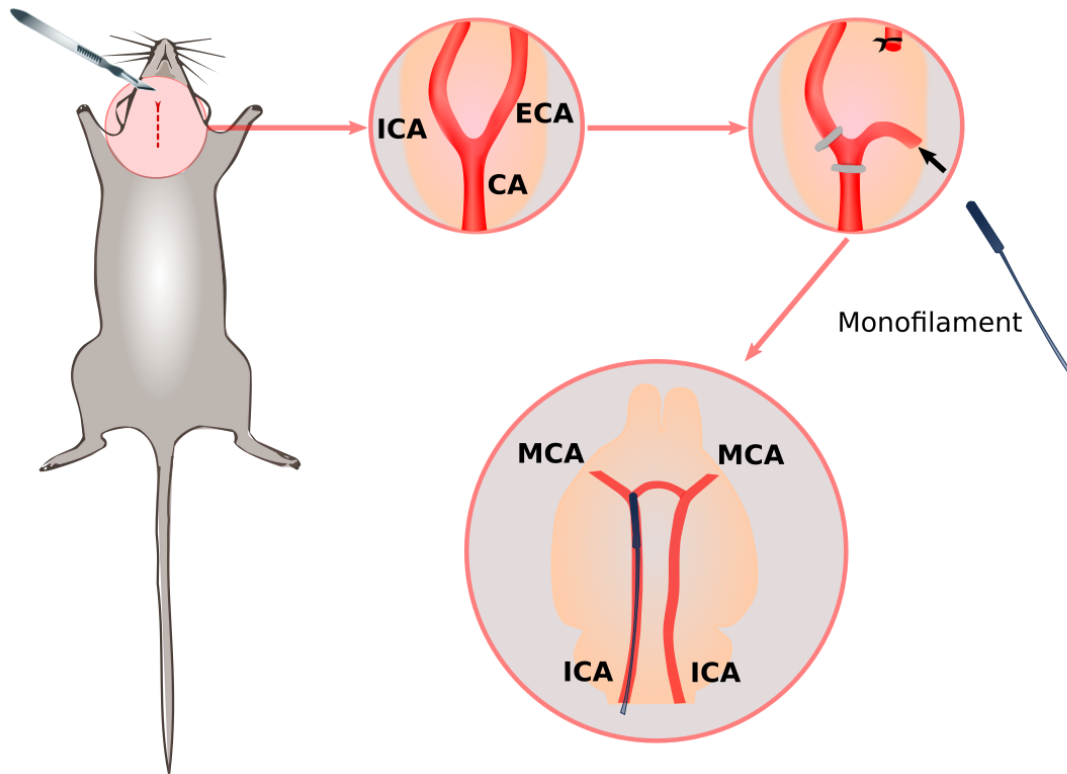


Abbildung 7: Schematische Darstellung des operativen Vorgehens. Links: Halsinzision; oben Mitte: Aufsicht auf das Operationsgebiet bzw. die Bifurkation der CA; oben rechts: Präparierter Gefäßstumpf mit Gefäßklemmen an CA und ICA, sowie Ligatur am kranialen Ende der ECA; unten: Lage des Filaments im Gefäßsystem des Gehirns bei korrekter Platzierung. Abkürzungen: CA = carotid artery (Arteria carotis), ICA = internal carotid artery (Arteria carotis interna), ECA = external carotid artery (Arteria carotis externa), MCA = middle cerebral artery (Arteria cerebri media)

Der Zugang zum Gefäßsystem erfolgte über eine longitudinale Halsinzision im Bereich der Bifurkation der rechten *Arteria carotis* (CA = carotid artery) (Abbildung 7). Über der Arterie liegende Strukturen wurden dabei vorsichtig zur Seite verlagert. Anschließend wurden die CA vor der Bifurkation sowie die *Arteria carotis interna* (ICA = internal carotid artery) mittels Gefäßklemmen verschlossen. Zum Verschluss der *Arteria carotis externa* (ECA = external carotid artery) wurde möglichst weit kranial eine Ligatur mit nicht resorbierbaren

Nahtmaterial (7-0 *Vicryl*, *Ethicon*, Somerville, New Jersey, USA) gesetzt und das Gefäß unterhalb der Ligatur durchtrennt (Abbildung 7). Um Blutungen zu vermeiden, wurden zuvor alle kleineren abzweigenden Gefäße im Verlauf der ECA kauterisiert. Die MCA wurde mittels eines silikonbeschichteten Nylonfadens (*Monofilament*, 0,41 mm Durchmesser, *Doccol Corporation*, Sharon, USA) verschlossen, welcher durch den Gefäßstumpf der ECA eingeführt und nach Abdichtung des Gefäßstumpfs durch eine weitere Ligatur um das freie Ende vorsichtig über die ICA bis zur MCA vorgeschoben wurde (Abbildung 7).

Der damit erreichte Verschluss führte zu einer Minderperfusion des Gehirns im Stromgebiet der MCA, welche mittels intraoperativer MRT (PWI) verifiziert wurde. Hierfür wurden die Klemmen gelöst, die Operationswunde provisorisch mittels fortlaufender Hautnaht (5-0 *Vicryl Plus*, *Ethicon*) verschlossen und das Tier auf das ebenfalls gewärmte MRT-Bett überführt. Die Gasnarkose wurde dabei zu jeder Zeit aufrechterhalten.

Nach einer Occlusionszeit von 50 Minuten wurde das Filament vollständig entfernt, ohne dabei die Ligatur um die ECA zu lösen. Nach sorgfältiger Inspektion des Operationsgebiets auf möglich Blutungsquellen wurde die Wunde mit einer Hautnaht geschlossen, desinfiziert, mit lokalem Schmerzmittel behandelt (*Emla*, Lidocain/Prilocain, *AstraZeneca*, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und mit Silberspray (*Agrochemica GmbH*, Bremen, Deutschland) bedeckt. Zuletzt erhielten die Tiere unmittelbar postoperativ Carprofen (5 mg/kg KGW, sc, *Rimadyl*, *Zoetis Deutschland GmbH*, Berlin, Deutschland) sowie physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, 2,5 ml, intraperitoneal).

2.1.2 Postoperative Versorgung der Versuchstiere

Nach dem Erwachen wurden die Tiere in ihren gewärmten Heimkäfig gesetzt. Das postoperative Versorgungsregime wurde in Anlehnung an eine aktuelle

Publikation zum Überleben von Versuchstieren im tMCAO-Maus-Modell konzipiert (Lourbopoulos et al. 2017), um unabhängig von der Versuchsgruppe das Überleben, eine zügige Rehabilitation und langfristig das allgemeine Wohlbefinden der Tiere zu gewährleisten. Hierfür wurden folgende Maßnahmen ergriffen:

- Engmaschige Überwachung von Körpertemperatur und Allgemeinzustand im Hinblick auf die im Tierversuchsantrag festgelegten Endpunkte bis zu Stabilisierung des Allgemeinzustandes.
- Schmerzbehandlung mit Caprofen (5 mg/kg KGW, zweimal täglich) für mindestens drei Tage.
- Bei Anzeichen von Dehydrierung (stehende Hautfalte) zusätzliche Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung (3,5 ml, zweimal täglich, intraperitoneal).
- Tägliche Gewichtskontrollen und Ergänzung des regulären pelletierten Futters (Ratte-/Maushaltung, *ssniff Spezialdiäten GmbH*, Soest, Deutschland) um Nassfutter (Babynahrung), bis das präoperative Ausgangsgewicht erreicht wurde.
- Sicherstellung der Zugänglichkeit des Futters für alle Tiere mit besonderem Augenmerk auf Tiere mit Paresen. Zunächst nicht eigenständig fressende Tiere wurden mittels einer Einwegspritze zweimal täglich von Hand gefüttert und getränkt.

2.2 Intervention

Die einmalige intranasale Applikation des EPO-PET-Tracers stellt die in diesem Projekt zu untersuchende Intervention dar (2.2.2 und 2.2.3). Pilotversuche wiesen dabei auf einen dosisabhängigen therapeutischen Effekt hin. Um

diesem Aspekt ebenfalls nachzugehen, wurde die Interventionsgruppe in drei Gruppen unterteilt, welche unterschiedliche Dosen des Tracers erhielten (2.2.1).

2.2.1 Versuchsgruppen

HD	^{64}Cu -EPO „high dose“ (30 MBq \cong 15 μg EPO)
MD	^{64}Cu -EPO „mid dose“ (15 MBq \cong 7,5 μg EPO)
LD	^{64}Cu -EPO „low dose“ (7 MBq \cong 3,5 μg EPO)
PI.	Placebo (60 μl physiologische Kochsalzlösung)

Abbildung 8: Versuchsgruppen

Alle Versuchstiere wurden vorbereitend an den Untersucher gewöhnt, für die Verhaltensversuche trainiert (2.6) und durchliefen dann das in Abbildung 6 gezeigte Schema. Für die Intervention (die Injektion des EPO-Tracers) wurden die Tiere in drei Interventionsgruppen (HD, MD, LD) und eine Placebo-Gruppe (PI.) aufgeteilt (siehe Abbildung 8). Die Einteilung in die vier Gruppen erfolgte randomisiert noch vor Beginn des Trainings und den Baseline-Messungen. Eine Verblindung des Untersuchers konnte nicht realisiert werden.

2.2.2 EPO-PET-Tracer

Der in diesem Versuch verwendete Tracer ^{64}Cu -EPO wurde von der Radiochemie-Gruppe des Werner Siemens Imaging Centers hergestellt. ^{64}Cu -EPO besteht aus Erythropoetin als Vektor (Erythropoetin alpha, human recombinant (rHuEPO-a),

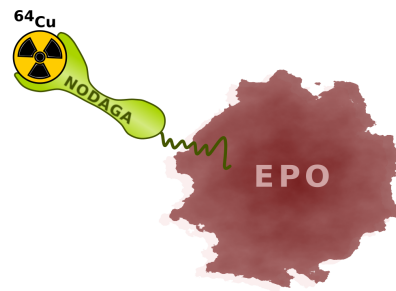


Abbildung 9: Schematische Darstellung des EPO-PET-Tracers.

Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland), dem Chelator NODAGA und dem radioaktiven Kupferisotop ^{64}Cu (Abbildung 9).

Für die Herstellung wurden 0,9 mg EPO in einem Carbonatpuffer (0,1 M Natriumcarbonat pH 9) mit 0,172 mg *p*-NCS-*Bn*-NODAGA konjugiert (eine Stunde, Raumtemperatur). Der überschüssige Chelator wurde anschließend per Ultrafiltration (10 kDa; *Amicon Ultra-15*, *Merck Millipore*, Burlington, Massachusetts, USA) entfernt und gleichzeitig der Puffer gegen 0,1 M Natriumacetat pH 6 ausgetauscht. Zur Radiomarkierung wurde zunächst ^{64}Cu in 0,1 M HCl mit 1,5 Volumen 0,5 M Ammoniumacetat abgepuffert. Anschließend wurde das zuvor hergestellte NODAGA-EPO zugegeben (0,5 μg pro MBq) und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Bindung des Isotops wurde zuletzt per Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel (Eluent: 0,1 M Natriumcitrat pH 5) sowie per *high pressure size exclusion chromatography* (HPSEC, Säule: *BioSep SEC s-2000*, *Phenomenex*, Torrance, Californien, USA; Eluent: Natriumcitrat-Salzpuffer) überprüft.

Für einen Machbarkeitsnachweis im Anschluss an die hier erläuterten Experimente wurde außerdem der Tracer ^{89}Zr -EPO an einem einzelnen Tier getestet. Auch dieser Tracer wurde durch die Radiopharmazie hergestellt. Hierfür wurde das EPO mit dem Chelator Deferoxamin (DFO), wie von Perk et al. beschrieben, konjugiert und anschließend mit dem Zirkoniumisotop ^{89}Zr markiert (Perk et al. 2010): Zunächst wurde 1 mg EPO mit 2,5 μmol Ethylendiamintetraessigsäure für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Puffer durch Ultrafiltration gegen 0,1 M HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) pH 9 ausgetauscht (10 kDa). Nun wurde das EPO mit *Deferoxamin-Bz-NCS* (250 μg ; *Macrocyclics*, Plano, Texas, USA) in 50 μl Dimethylsulfoxid konjugiert (120 Minuten, Raumtemperatur). Das Verhältnis von konjugiertem zu unkonjugiertem DFO wurde nach Anfärbung mit FeCl_3 -Lösung mittels HPSEC (Eluent: phosphatgepufferte Salzlösung) bestimmt. Überschüssiger Chelator wurde per Ultrafiltration mit 0,25 M

Natriumacetat pH 6 entfernt. Für die Radiomarkierung wurde ^{89}Zr -Oxalat (*Perkin Elmer*) zunächst mit 2 M Natriumcarbonat neutralisiert und die Lösung mittels 0,5 M HEPES pH 7,2 auf pH 7,0-7,2 abgepuffert. Anschließend wurde das DFO-EPO (0,3 μg pro MBq) hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde mittels HPSEC die vollständige (>90%) Bindung des Zirkoniums überprüft.

2.2.3 intranasale Applikation des Tracers

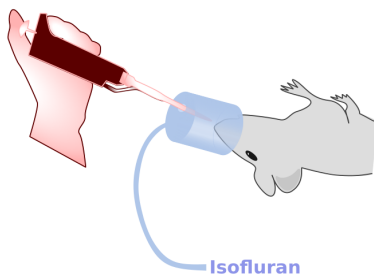


Abbildung 10: Intranasale Injektion unter Isofluran-Narkose
(schematische Darstellung)

Je nach Versuchsgruppe wurde dem jeweiligen Tier drei Stunden nach Beginn der Okklusion entweder der EPO-Tracer für die PET-Messungen oder das Placebo (physiologische Kochsalzlösung) intranasal injiziert. Für diesen Schritt wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert (2% in Raumluft, Flussrate 1,5 l/min). Eine 10 μl -Eppendorfpipette wurde über passende Löcher in der Atemmaske vorsichtig so tief wie möglich in das Nasenloch des auf dem Rücken liegenden Tieres eingeführt (Abbildung 10). Injiziert wurde pro Nasenloch drei mal 10 μl (entspricht einem Gesamtvolumen von 60 μl pro Tier) im Abstand von drei Minuten (modifizierte Methode, Grundprinzip nach Danielyan et al. 2009).

2.3 ex vivo Biodistribution

Für die Biodistribution wurden die Tiere am Tag nach der Okklusion getötet und eine Blutprobe sowie Proben der Meningen, der Knochen, der Muskulatur,

diverser Organe (Herz, Niere, Leber, Lunge, Milz) entnommen und gewogen. Mittels Gammacounter (*2480 Wizard², Perkin Elmer, Waltham, USA*) wurde anschließend die radioaktive Aktivität der Proben bestimmt und für die statistische Auswertung der prozentuale Anteil der injizierten Tracer-Dosis (%ID/g) gewichtsnormiert für jedes Gewebe berechnet. Die so ermittelten Werte für die intranasale Tracer-Gabe wurden mit Daten aus Biodistributionsversuchen nach intravenöser Gabe von ⁶⁴Cu-EPO verglichen, welche von Frau Patzwaldt, einer Laborkollegin, welche zum selben Zeitraum zu anderen Aspekten des Tracers forschte, zur Verfügung gestellt wurden. Zur Detektion statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Applikationsverfahren wurde der *t-Test* mit einem Konfidenzintervall von 0,95 verwendet (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$). Die Berechnung erfolgte mit *OriginPro* (*OriginPro 2017G, OriginLab Corp., Nothampton, USA*).

2.4 Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurden die Tiere ebenfalls am Tag nach der Operation getötet und das Gehirn entnommen. Das Gewebe wurde zügig nativ in *TissueTek* (*TissueTek OCTTM Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland*) eingebettet und durchgefroren. Es wurden 20 µm-Kryoschnitte der infarzierten Regionen angefertigt. Anschließend wurde die Aktivität der Schnitte mittels eines Phosphorimagers erfasst. Nach Abklingen der Aktivität wurden die histologischen Schnitte durch die Hautklinik Tübingen mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und eingebettet. Um die Regionen mit Aktivität auf den Autoradiographieplatten mit den histologischen Strukturen vergleichen zu können, wurden alle gefärbten Schnitte digitalisiert (*NanoZoomer, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan*).

2.5 Hämatokrit-Bestimmung

Die Blutentnahme für die Hämatokrit-Bestimmung erfolgte zwei Wochen nach der Applikation des Tracers retrobulbär unter tiefer Isofluran-Narkose (2 - 2,5% in Raumluft, Flussrate 1,5 l/min). Die Hämatokrit-Kapillare wurde direkt zur Blutentnahme verwendet und mit ca. 75 µl Blut befüllt, auf Eis gelagert, zügig zentrifugiert und der entsprechende Volumenanteil mittels passender Messskala bestimmt.

2.6 Die Verhaltensversuche als Parameter für funktionelle Veränderungen nach dem Schlaganfall

Um die funktionellen Auswirkungen der neurologischen Schäden nach dem Schlaganfall zu quantifizieren, wurde ein Set von Verhaltenstests durchgeführt. Die Testung erfolgte sowohl präoperativ im Rahmen der Baseline-Messung als auch wiederholt postoperativ zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, einer Woche, einem Monat und drei Monaten (siehe auch Abbildung 6). Ein Testreihe bestand aus vier Einzeltests: *Open Field* (2.6.1), *Forelimb Alternation Test* (2.6.3), *Sticky Label Test* (2.6.2) und *Beam Walk* (2.6.4) (Abbildung 11). All diese Tests wurden bereits im Labor des Werner Siemens Imaging Centers für die Anwendung bei Schlaganfallratten etabliert. Es wurde jederzeit darauf geachtet, die Tests zur selben Tageszeit, in derselben Reihenfolge und unter denselben Bedingungen durchzuführen.

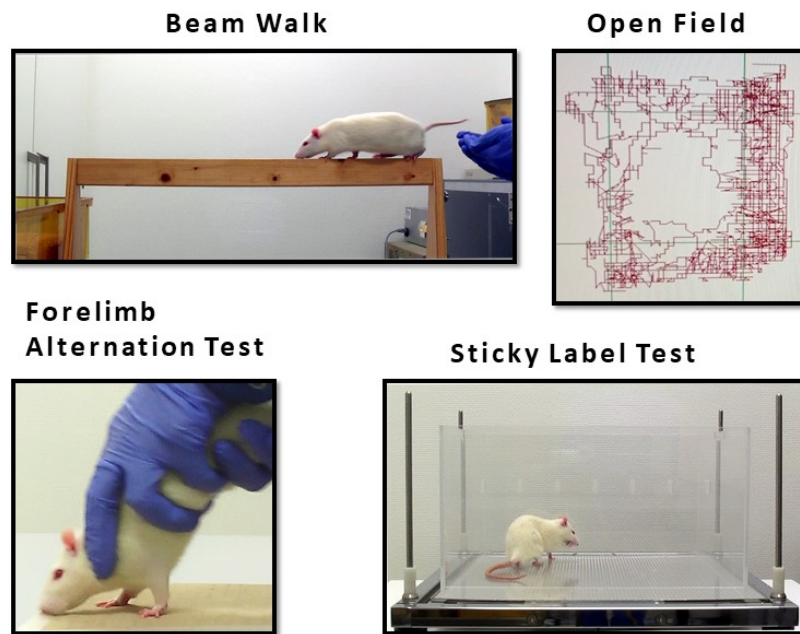


Abbildung 11: Die vier im Projekt verwendeten Verhaltensversuche: Ausschnitte der für die Auswertung verwendeten Kameraaufnahmen des Beam Walks, des Forelimb Alternation Tests und des Sticky Label Tests sowie beispielhaft das Laufmuster einer gesunden Ratte im Open Field (oben rechts).

Zwei der Tests, der *Beam Walk* (2.6.4) und der *Forelimb Alternation Test* (2.6.3), benötigten ein vorbereitendes Training. Nach ca. einer Woche Eingewöhnungsphase mit allgemeinem Handling der Tiere durch den Untersucher wurde den Ratten über einen Zeitraum von zwei Wochen die zu bewältigenden Aufgaben schrittweise in kurzen Trainingseinheiten von 10 bis 15 Minuten täglich beigebracht. Unterstützt wurde das Training durch Belohnung in Form von Futter. Für diese Trainingsphase wurde die *ad libidum* Fütterung der Tiere auf tägliche Fütterung einer für das Alter und Gewicht der Ratten angemessenen Menge umgestellt, welche direkt nach dem Training für die nächsten 24 Stunden zur Verfügung gestellt wurde. Diese Maßnahme sollte sicherstellen, dass die Futterbelohnung im Training eine ausreichende

Motivation für die Tiere darstellte. Regelmäßiges Wiegen stellte sicher, dass alle Tiere unter diesem Regime ausreichend Nahrung für eine altersgemäße Gewichtsentwicklung erhielten.

Alle Testsets wurden auf Video aufgezeichnet und nachträglich nach festgelegten Kriterien ausgewertet. Die einzelnen Parameter wurden zuletzt mit Hilfe eines in diesem Labor neu entwickelten Score Sheets (Tabelle 1) zusammengeführt. Dieses wurde von Frau Patzwaldt auf Basis ihrer Erfahrung mit den im Folgenden näher beschriebenen Verhaltensversuchen erstellt, wobei andere, in der Literatur beschriebene, kombinierte Neuroscores zum Vorbild genommen wurden (exemplarisch beispielsweise in Encarnacion et al. 2011). Statistisch analysiert wurden sowohl die einzelnen Tests als auch die zusammengefassten Daten des Neuroscores. Um longitudinale Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu detektieren, wurde eine *ANOVA mit Messwiederholungen* sowie gegebenenfalls der *Dunnnett-Test* als post-hoc-Test verwendet. Alle Berechnungen erfolgten mit *SPSS (IBM SPSS Statistics 24, Armonk, USA)*, die grafische Aufarbeitung erfolgte mit *OriginPro*.

Tabelle 1: Score Sheet für die Erstellung des Neuroscores

Kategorie	Parameter	Punkte
Allgemeinzustand: Fell	normal	0
	leicht gesträubt	1
	stark gesträubt	2
Allgemeinzustand: Pfoten / Laufen	normal	0
	Pfote wird leicht nachgezogen und/oder weitgehend normales Laufen	1
	Pfote wird nachgezogen und/oder Laufen ist leicht beeinträchtigt	2
	Pfote wird deutlich nachgezogen und/oder Laufen ist stark beeinträchtigt	3
	Pfote stark beeinträchtigt und/oder Tier bewegt sich hauptsächlich in eine Richtung	4

2.6 Die Verhaltensversuche als Parameter für funktionelle Veränderungen nach dem Schlaganfall

Kategorie	Parameter	Punkte
	Pfote unbeweglich und/oder Tier läuft nur in eine Richtung	5
Beam Walk	Überquerung ohne Fehltritt oder mit Fehlritten, aber <5 s	0
	Fehlritte, <10 s	1
	Fehlritte / Stürze auf dem Balken / 10 – 30 s	2
	Fehlritte / Stürze auf dem Balken / max. ein Absturz vom Balken mit Halten / >30 s	3
	Fehlritte / Stürze auf den Balken / mehrere Abstürze vom Balken mit Halten / <60 s	4
	Absturz ohne Halten / Tier bewegt sich nicht / >60 s	5
Sticky Label Test	Tier entfernt beide Label ohne Probleme in unter 30 s bzw. in gleichbleibender Zeit im Vergleich zur Baseline	0
	Tier entfernt beide Label, braucht länger im Vergleich zur Baseline (31 – 60 s)	1
	Tier entfernt ein Label zügig und braucht deutlich länger für das Zweite, <120 s	2
	Tier entfernt nur ein Label, schafft es nicht das Zweite innerhalb von 120 s zu entfernen	3
	Tier entfernt nur ein Label und versucht nicht/nur geringfügig das Zweite zu entfernen	4
	Tier entfernt keines der beiden Label	5
Open Field	Laufstrecke im Vergleich zur Baseline >90% / Anzahl der Männchen im Vergleich zur Baseline >90%	0
	Laufstrecke im Vergleich zur Baseline 80 – 89% / Anzahl der Männchen im Vergleich zur Baseline >90%	1
	Laufstrecke im Vergleich zur Baseline 60 – 79% / Anzahl der Männchen im Vergleich zur Baseline 50 – 89%	2
	Laufstrecke im Vergleich zur Baseline 41 – 59% / Anzahl der Männchen im Vergleich zur Baseline <50%	3
	Laufstrecke im Vergleich zur Baseline 21 – 40% / Tier bewegt sich nur in vier Quadranten / 1-2 Männchen insgesamt	4
	Laufstrecke im Vergleich zur Baseline <20% / Tier bewegt sich nur in drei Quadranten / keine Männchen	5
Forelimb Alternation Test	normale Alternation	0
	Zehen einer Pfote werden in 1-2 Durchgängen nachgezogen	1
	Zehen einer Pfote werden in mehr als zwei Durchgängen nachgezogen	2
	Zehen einer Pfote werden in mehr als zwei Durchgängen	3

Kategorie	Parameter	Punkte
	nachgezogen, Alternation erschwert	
	Zehen einer Pfote werden in mehr als zwei Durchgängen nachgezogen, Alternation stark beeinträchtigt	4
	Keine Alternation	5

2.6.1 Open Field

Dieser Test soll das spontane explorative Verhalten der Tiere überprüfen und somit auch Aufschluss über den Zustand der Tiere geben. Hierbei wurde die jeweils getestete Ratte für 11 Minuten (1 Minute Habituation, 10 Minuten Messzeit) in eine quadratische Plexiglasbox (47 * 47 * 26 cm³) gesetzt, welche über Lichtschranken die Bewegungen der Ratte detektierte (Software: *ActiMod*, *TSE systems*, Bad Homburg, Germany) (Abbildung 11). Analysiert wurde dabei die Zeit, welche das Tier in Bewegung verachte, die zurückgelegte Distanz und wie oft sich die Ratte auf die Hinterbeine aufrichtete.

2.6.2 Sticky Label Test

Bei diesem Test wurde ein kleines Stück Klebeband (ca. 1*1 cm *3M Transpore*, Saint Paul, USA) an den Unterseiten der Pfoten der Tiere befestigt und beobachtet, wie viel Zeit die Tiere benötigen, um die Klebefolie wieder von den Pfoten zu entfernen (modifizierte Methode, Erstbeschreibung Schallert et al. 1982). Diese Aufgabe stellte eine kombinierte Testung von sensiblen als auch motorischen Ausfällen dar. Es ist davon auszugehen, dass Tiere mit stärkeren Halbseitenausfällen die Klebefolie auf der beeinträchtigten Seite nicht entfernen können oder sie als nicht so störend empfinden, wie dies auf der gesunden Seite der Fall wäre. Der Versuch galt spätestens nach drei Minuten auch ohne

erfolgreiches Entfernen beider Label als beendet. Gemessen wurde die Zeit bis zum Entfernen beider Label sowie die Anzahl entfernter Label (2, 1 oder 0).

2.6.3 *Forelimb Alternation Test*

Dieser Test sollte Aufschluss über das Gangbild der Vorderpfoten der Tiere geben. Dafür wurde die Ratte vom Untersucher am Rumpf so gehalten, dass das Tier seine Vorderpfoten frei bewegen konnte und der Körper in einem ca. 45°-Winkel zu einer rutschfesten Oberfläche positioniert war (Abbildung 11). Eine leichte Vorwärtsbewegung durch den Untersucher animierte die Tiere dazu, mit den Vorderpfoten über die Oberfläche zu laufen (Khaing et al. 2013). Wie eingangs bereits erwähnt, benötigte dieser Test eine vorbereitende Trainingsphase, um die Ratten an das Gehen auf den Vorderpfoten zu gewöhnen. Ein Durchgang dieses Tests bestand aus fünf direkt nacheinander durchgeführten Aufnahmen einer Gehstrecke von ca. 40 cm. Für die Auswertung wurde das Gangbild der Tiere analysiert (Tabelle 1) und der Anteil nicht korrekter, das heißt flüssig alternierender Schritte gezählt. Bei Tieren, welche sich bei diesem Test lediglich vom Untersucher über die Oberfläche schieben ließen, wurde der Test mit zu 100% fehlerhaften Schritten gewertet.

2.6.4 *Beam Walk*

Der *Beam Walk* in diesem Labor ist ein 60 cm langer und 1.7 cm breiter Balken auf 40 cm langen, stabilen Füßen. Die Ratte wurde für diesen Versuch an einem Ende mit beiden Vorderpfoten auf dem Balken platziert. Am anderen Ende des Balkens befand sich der Heimatkäfig des Tieres. Die Tiere sollten nun den Balken zügig überqueren und ihren Körper dabei korrekt ausbalancieren (Abbildung 11). Diese Aufgabe benötigte ebenfalls ein vorbereitendes Training, wurde jedoch von allen Tieren sehr schnell verstanden, so dass hier nur fünf

Tage zur Vorbereitung aufgewendet wurden. Ein Test bestand aus fünf direkt aufeinanderfolgenden Überquerungen des *Beam Walk*. Eine Überquerung galt als beendet, wenn das Tier den Heimatkäfig erreichte, sich nicht auf dem Balken halten konnte oder nach 60 Sekunden das Ziel nicht erreicht hatte.

Bei diesem Test sollte das Gangbild und die Balance beurteilt werden. Daher wurde für die Analyse das Verhältnis von Fehlritten zu der Gesamtzahl der zur Überquerung des Balkens benötigten Schritte ermittelt, sowie die Zeit pro Überquerung gestoppt. Außerdem wurde ermittelt, wie oft das Tier die Balance, d.h. die relativ zum Balken parallele Körperhaltung, verlor (modifizierte Methode ausgehend von Aronowski et al. 1996).

2.7 Quantifizierung und Charakterisierung des Schlaganfalls

Die in diesem Projekt verwendeten bildgebenden Methoden sollten einerseits die Größe der Schlaganfälle im zeitlichen Verlauf darstellen und eine Quantifizierung zulassen (2.7.2), andererseits sollte überprüft werden, ob sich nach intranasaler Gabe von ^{64}Cu -EPO der Schlaganfall oder bestimmte Regionen des Schlaganfalls mittels PET-Messung nachweisen lassen (2.7.1). Die histologischen Schnitte dienen dem Vergleich mit der zuletzt gelaufenen MRT-Aufnahme (2.7.3).

2.7.1 Bildgebung: PET

In Pilotversuchen wurden verschiedenen Zeitpunkte für eine PET-Messung in Betracht gezogen und getestet. Von den Zeitpunkten 6 h, 24 h und 48 h wurde der Zeitpunkt 24 h als derjenige mit den besten Bildern für alle folgenden Versuche ausgewählt. Alle Messungen fanden unter Isofluran-Narkose (1,5 - 2% in Raumluft, Flussrate 1,5 l/min) auf gewärmten Betten mit Feedback-

System statt, welches für eine Körpertemperatur von 37°C sorgte (*Medres – medical research GmbH*, Köln, Deutschland). Für die Aufnahmen wurden Kleintier-PET-Scanner der Firma *Siemens* verwendet (*Inveon, Siemens Healthineers*, Erlangen, Deutschland). Die Augen der Tiere wurden während der Messung durch das Auftragen von Augensalbe geschützt und der Kopf mit Hilfe eines Zahnhalters fixiert. Placebo-Tiere, welche keine PET-Messung erhielten, wurden für die Dauer einer PET-Messung ebenfalls narkotisiert, um Behandlungsgleichheit zu gewährleisten.

Die PET-Scans bestanden aus 20 – 46 (^{64}Cu) oder 60 (^{89}Zr) Minuten statischer Messung der Emission, gefolgt von der Aufnahme der Transmission (803 Sekunden) zur Erstellung einer *Attenuation Map*. Die gewonnenen Datensätze wurden mittels eines *OSEM3D/MAP-Algorithmus* rekonstruiert (Voxelgröße in XY-Richtung: 0,400 mm, Voxelgröße in Z-Richtung: 0,796 mm, Auflösung 0,200 mm).

2.7.2 Bildgebung: MRT

MRT-Aufnahmen wurden sowohl für die Baseline-Messungen, als auch während der Okklusion und zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, eine Woche, ein Monat und drei Monate nach Okklusion erstellt (Abbildung 6). Auch für diese Messungen befanden sich die Tiere unter Isofluran-Narkose (1,5 - 2% in Raumluft, Flussrate 1,5 l/min), die Augen wurden durch Augensalbe geschützt, und die Tiere wurden auf speziellen gewärmten Betten platziert (*Bruker BioSpin MRI GmbH*, Ettlingen, Deutschland). Diese erlaubten es, den Kopf der Tiere stereotaktisch zu fixieren. Da während der Messung kein Sichtkontakt zum jeweils getesteten Tier bestand, wurden Atmung und Körpertemperatur kontinuierlich über entsprechende Sonden überwacht.

Die Aufnahmen wurden mit einem 7 T Kleintier-MRT (*Biospec, Bruker BioSpin MRI GmbH*, Ettlingen, Deutschland) mit einer Ganzkörperspule als

Transmitterspule und einer Kopf-Oberflächenspule für Ratten erstellt. Mit Hilfe einer „Localizer“-Sequenz wurde der Kopf des Tieres im Bildfeld zentriert. Alle Messungen beinhalteten T2-, DWI- und PWI-Aufnahmen mit folgenden Spezifikationen:

- T2: Zwei Aufnahmen (longitudinal und transversal) mit einer 3D-spoiled-Turbo-Spin-Echo-Sequenz mit hoher Flächenauflösung (256*256 Matrix, 35*35 mm² Bildfeld, 4264 ms Repetitionszeit, 33 ms Echozeit, 0,8 mm Schichtdicke).
- DWI: Verwendet wurde eine Sequenz für echoplanare diffusions-tensor Bildgebung mit 30 Richtungen (Matrix: 96*96, 25*25 mm² Bildfeld, 2503 ms Repetitionszeit, 34,5 ms Echozeit, 0,8 mm Schichtdicke) und vier b-Werten (400, 600, 800, 1000 s/mm²). Um die Bildqualität zu verbessern, wurde vor dieser Sequenz geshimt.
- ASL: Die Aufnahme beinhaltete eine Baseline ASL-Sequenz (M0) und eine Mehrschicht-ASL-Sequenz (128*96 Matrix, 28,16*21,12 mm² Bildfeld, 7000 ms Repetitionszeit (für B0: 10295,174 ms Repetitionszeit), 24,36 ms Echozeit, 1,0 mm Schichtdicke, 18000 ms Inversionszeit, 40 Wiederholungen).

Für die Messung zum Zeitpunkt der Okklusion musste der Messablauf verändert und neu etabliert werden, um die Okklusionszeit von 50 Minuten einhalten zu können: So musste die Zeit im Scanner so verkürzt werden, dass nach Platzieren des Filaments innerhalb von 50 Minuten der Transfer vom OP zum Scanner, die Messung und anschließend der Rücktransfer in den OP realisiert werden konnte. Da sich durch die Pathologie des Schlaganfalls zudem andere Anforderungen an die Bildgebung stellten, wurde auch die Reihenfolge der Sequenzen für diese Messung verändert: Am wichtigsten zu diesem Zeitpunkt war es, die Verminderung der Perfusion im Stromgebiet der MCA zu beobachten, während die T2-Messung eher nachrangig behandelt wurde, da in einem solch frühen Stadium eine Infarktdemarkation allenfalls in der

Diffusionsbildgebung zu erwarten war. Die entsprechende Anpassung des Messablaufs war ebenfalls Gegenstand der ersten Versuche und wird daher in den Ergebnissen dargestellt.

Aus den ASL- und DWI-Datensätzen wurden nach der Messung mit Hilfe von *MATLAB* (2016b (Version9.1)), *The Math Works Inc.*, Natick, USA) parametrische Karten zur weiteren Analyse berechnet.

2.7.3 Histologische Untersuchung

Nach der letzten Messung (nach 3 Monaten) wurden die Tiere getötet, um die Gehirne für histologische Untersuchungen zu gewinnen. Die nativen Gehirne wurden in *TissueTek* eingebettet und anschließend 10 µm-Schnitte der Schlaganfallregion angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend durch die Hautklinik Tübingen gefärbt (H&E).

2.7.4 Analyse und statistische Auswertung

Die Analyse der PET- und MRT-Datensätze erfolgte mit Hilfe von *PMOD* (Version 3.204, *PMOD Technologies LLC*, Zürich, Schweiz). Zunächst wurden alle Datensätze eines Tieres durch den Untersucher zueinander und auf eine T2-gewichtete Muster-Anatomie coregistriert. Dieser Schritt war notwendig, da die PET- und MRT-Messungen auf unterschiedlichen Betten stattfanden, da eine lückenlose Messung nacheinander auf beiden Geräten vom Versuchsablauf her nicht realisierbar war und gleichzeitig die Narkosezeit für die Tiere jeweils möglichst kurz gehalten werden sollte. Dies bedeutete jedoch, dass die Position des Tieres im Raum in den beiden Scannern leicht unterschiedlich war und die Bilder aus den verschiedenen Scannern daher zunächst anatomisch korrekt übereinandergelegt werden mussten. Eine akkurate Bildfusion ist im Falle des Gehirns mit unterschiedlichen Methoden

inklusive manueller Ausrichtung an anatomischen Landmarken möglich (Andersson et al. 1995). Das Verwenden einer T2-gewichteten Muster-Anatomie als Template sorgte hierbei dafür, dass sich die Aufnahmen aller Tiere an derselben Position im dreidimensionalen Raum befanden.

Die analysierten Parameter umfassten das Schlaganfallvolumen, welches durch den Untersucher anhand der hyperintensiven Areale in der T2-Aufnahme ermittelt wurde, sowie die durchschnittlichen Werte für die Diffusion, Perfusion und die Aktivität im PET-Scan in dem auf der T2-Aufnahme ermittelten Schlaganfallareal und den entsprechenden kontralateralen Strukturen. Zur Analyse der Baseline- und Okklusionsmessungen wurde ein festgelegtes *volume of interest* (VOI) verwendet, welches die zukünftige Schlaganfallregion und damit das Striatum sowie große Teile des Cortex umfasste. Des Weiteren wurde für die Okklusionsmessung ermittelt, wie groß das minderperfundierte Areal in der Schlaganfall-Hemisphäre war. Als minderperfundierte wurden diejenige Areale angesehen, deren Perfusion um 60% oder mehr im Vergleich zu den Perfusionswerten der kontralateralen Hemisphäre reduziert waren.

Wie auch schon bei den Verhaltensversuchen, erfolgte die statistische Analyse mittels *SPSS* und die grafische Aufarbeitung mit *OriginPro*. Die aus den MRT-Aufnahmen gewonnenen Daten wurden longitudinal auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht. Ebenfalls wie bei den Verhaltensversuchen wurde hierfür die *ANOVA mit Messwiederholungen* und der *Dunnet-Test* als post-hoc Test verwendet. Die Aktivität in der Schlaganfallhemisphäre aus den PET-Scans wurde mit der Aktivität in der nicht betroffenen Hemisphäre verglichen. Statistische Unterschiede sollte hier der *t-Test* mit einem Konfidenzintervall von 0,95 (Signifikanzniveau $p=0,05$) zeigen.

3 Ergebnisse

Die Operation zur Generierung des tMCAO-Rattenmodells (2.1) wurde insgesamt an 24 Tieren, verteilt auf vier Kohorten, erfolgreich im Sinne eines abgeschlossenen Eingriffs durchgeführt. Von diesen 24 Tieren sind insgesamt 21 in Vorbereitung auf die funktionellen Testungen über zwei Wochen wie unter 2.6 beschrieben trainiert worden. Für diese 21 Tiere wurden vor dem Auslösen des Schlaganfalls Baseline-Messungen für alle Verhaltenstests und MRT-Messungen durchgeführt. Alle operierten Tiere durchliefen im Anschluss den in Abbildung 6 gezeigten Versuchsablauf. Da jedoch insgesamt sechs Tiere für die Biodistributions- und Autoradiographie-Versuche verwendet wurden, umfasste die Kohorte für die longitudinale, dreimonatige Überwachung des Schlaganfalls letztendlich 18 bzw. 16 trainierte Tiere. Die exakte Größe des Stichprobenumfangs der einzelnen Versuche sowie die Verteilung auf die Versuchsgruppen wird im Folgenden zusammen mit den jeweiligen Ergebnissen dargestellt.

3.1 Charakteristika des PET-Tracers ^{64}Cu -EPO 24 Stunden nach intranasaler Gabe

Insgesamt 20 der operierten Tiere wurden den Interventionsgruppen zugeteilt und erhielten entweder 7 MBq, 15 MBq oder 30 MBq ^{64}Cu -EPO. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle zwei Tieren ohne Schlaganfall 30 MBq ^{64}Cu -EPO intranasal injiziert. Um die Kinetik des Tracers 24 Stunden nach intranasaler Gabe zu überprüfen, wurde bei einigen Tieren die Biodistribution des Tracers

ermittelt (3.1.1). Die Aufnahme des Tracers durch die Nase in das Gehirn und vor allem in das Schlaganfallgebiet wurde mittels Autoradiographie von den Gehirnen einiger Tiere sowie durch PET-Scans aller 22 Tiere evaluiert (3.1.2).

3.1.1 Pharmakokinetik von $^{64}\text{Cu-EPO}$ 24 Stunden nach intranasaler Gabe

Um mehr über die Kinetik des EPO-Tracers nach intranasaler Gabe zu erfahren, wurde die Biodistribution des Tracers *ex vivo* in verschiedenen

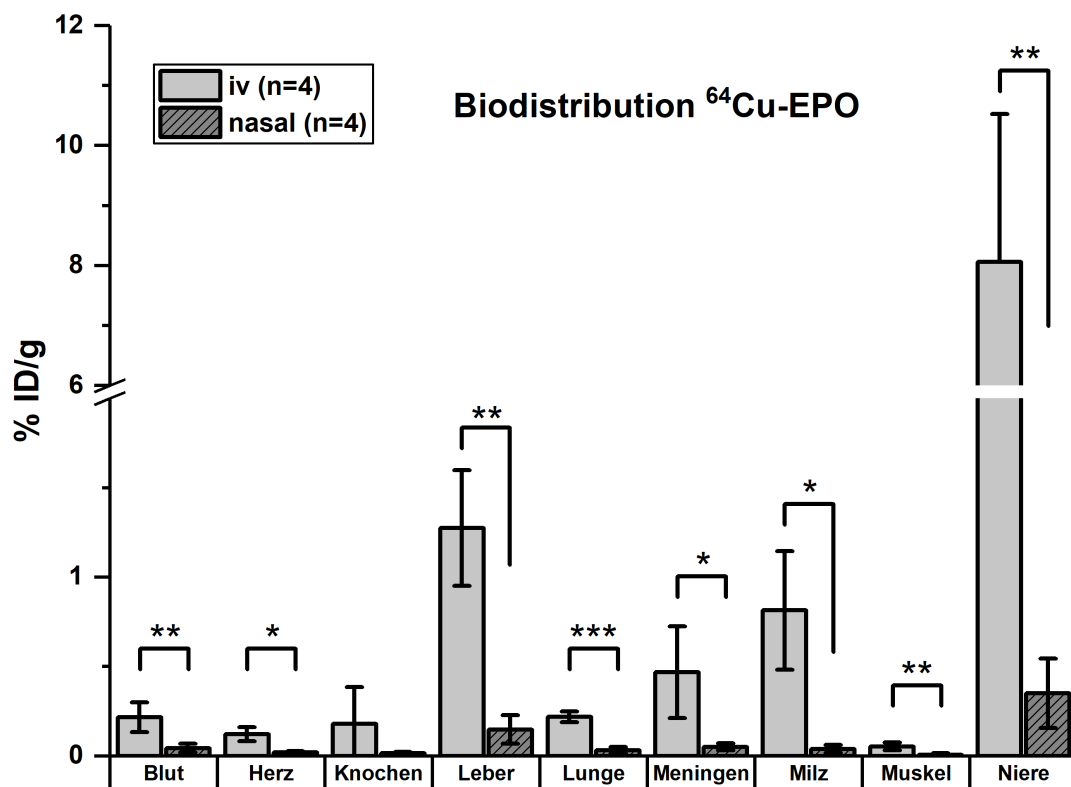


Abbildung 12: Ex vivo Biodistribution von $^{64}\text{Cu-EPO}$ nach 24 Stunden – nasal versus iv. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Applikationsrouten im t-Test bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$. Signifikante Unterschiede wurden für alle Gewebeproben mit Ausnahme von Knochen detektiert. Der Stichprobenumfang n umfasste pro Gruppe je vier Tiere. Die Versuche zur Biodistribution nach intravenöser Gabe wurden von Frau Patzwaldt durchgeführt und die Rohdaten für diese Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Verwendete Tracer-Mengen: 10 MBq für i.v., 1x 7 MBq, 1x 15 MBq und 2x 30 MBq nasal.

Organen 24 Stunden nach Applikation gemessen (2.3) und mit Daten von der Biodistribution des Tracers nach venöser Gabe verglichen (Abbildung 12). Für die Biodistributionsversuche nach intranasaler Gabe wurden vier Tiere aus der Interventionsgruppe verwendet. Die Daten nach intranasaler Gabe zum Vergleichen stammen von vier Tieren aus den Versuchen von Frau Patzwaldt. Da die Daten aus unterschiedlichen Versuchen stammen unterscheidet sich die applizierte Gesamtmenge des Tracers. Um die Gruppengrößen für die longitudinalen Untersuchungen nicht asymmetrisch zu verändern wurde für diese Untersuchung ein Tier aus jeder Gruppe plus ein zusätzliches Tier aus der HD-Gruppe verwendet (siehe Bildbeschreibung Abbildung 1). In exakten, zerfallskorrigierten Mengen ausgedrückt wurde für diesen Versuch je ein Tier mit 7,2, 14,7, 24,1 und 31,9 MBq ^{64}Cu -EPO injiziert. Eine Rezeptorbindung nach intranasaler Injektion ist dabei zumindest für höherer Dosierungen anzunehmen, da hierfür auch eine Akkumulation von Aktivität im Schlaganfallgebiet in den Audioradiografie-Versuchen gezeigt werden konnte (siehe unter 3.1.2 dargestellte Ergebnisse bzw. Abbildung 4). Intravenös wurden den vier Tieren je insgesamt 10 MBq verabreicht und damit im Schnitt weniger als den Tieren aus diesem Versuch. Letztendlich muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass trotz der normierten Daten aufgrund der unterschiedlichen Mengen verwendeter Aktivität sowohl innerhalb der intranasal-Gruppe als auch zwischen den zu vergleichenden Applikationsrouten die Zahlen möglicherweise nur eingeschränkt vergleichbar sind und hier ein größer angelegtes Experiment inklusive Überprüfung der Rezeptorbindung von ^{64}Cu -EPO sicherlich wünschenswert wäre.

Insgesamt ist 24 Stunden nach intranasaler Gabe in allen gemessenen Proben deutlich weniger Aktivität vorhanden als nach intravenöser Gabe (Abbildung 12). Am prominentesten ist dieser Unterschied in der Niere, wo nach intravenöser Gabe 8,1% ID/g ermittelt wurden, während nach intranasaler Gabe nur 0,4% ID/g gemessen wurden. Aber auch in Leber (1,3% ID/g *versus*

0,1% ID/g), Milz (0,8% ID/g *versus* 0,04% ID/g) und Meningen (0,5% ID/g *versus* 0,05% ID/g) sind deutliche Unterschiede zu verzeichnen. Die radioaktive Belastung der Organe ist z.T. nach intravenöser Gabe um das 20-fache höher als nach intranasaler Gabe, trotz geringerer Gesamtdosis (Abbildung 12). Statistisch signifikante Unterschiede im t-Test wurden für alle Gewebeproben mit Ausnahme der Knochen gefunden (Lunge: $p < 0,001$, Herz: $p = 0,013$, Leber: $p = 0,005$, Milz: $p = 0,018$, Niere: $p = 0,008$, Muskel $p = 0,006$, Meningen: $p = 0,047$, Blut: $p = 0,007$). Da nur für Lunge, Muskel und Blut Varianzgleichheit gegeben war, beinhalten die hier dargestellten p-Werte für die übrigen Gewebeproben eine Welch-Korrektur.

Insgesamt stellt sich jedoch die Frage, wo der Rest der applizierten Gesamtaktivität nach nasaler Applikation verbleibt, da, wie gezeigt, insgesamt nur sehr wenig in den einzelnen Organen anzukommen scheint. Letztendlich kann diese Frage nicht mit abschließender Sicherheit beantwortet werden. Um den folgenden Ausführungen vorweg zu greifen soll an dieser Stelle jedoch bereits erwähnt werden, dass auf den PET-Bildern der überwiegende Teil der Aktivität in der Nase zu sehen war und ein gut sichtbarer Teil auch in die Speiseröhre gelangte. So steht zu vermuten, dass zumindest ein Teil des intranasal applizierten Tracers über den Magen-Darm-Trakt verstoffwechselt wurde (siehe hierzu auch Diskussion ab Seite 83).

3.1.2 Darstellung des Schlaganfallgebiets mittels ^{64}Cu -EPO nach intranasaler Gabe

Um die Frage zu beantworten, ob intranasal verabreichtes ^{64}Cu -EPO sich für die Bildgebung eignet, wurden von allen 22 mit ^{64}Cu -EPO injizierten Tieren 24 Stunden nach der Injektion PET-Scans des Kopfbereichs angefertigt. Von den 24 tMCAO-Ratten erhielten 11 Tiere 30 MBq, 5 Tiere 15 MBq und 4 Tiere 7

MBq des Tracers. Ein Tier aus der HD-Gruppe wurde im Nachhinein von den Analysen ausgeschlossen, da es zum Zeitpunkt 24h trotz stattgefundener Ischämie keinen Schlaganfall aufwies.

Die Analyse der Daten erwies sich als schwierig, da auf den PET-Scans kaum anatomische Landmarken zu erkennen waren, was das korrekte Coregistrieren der PET-Bilder zu den MRT-Aufnahmen erschwerte. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurden daher auch die durch die Transmissionsmessung gewonnene *Attenuation Map* als PET-Bild rekonstruiert, auf welcher die Umrisse des Tieres zu sehen waren. Dieses Bild wurde nun in einem ersten Schritt zu einer T2-gewichteten Muster-Anatomie coregistriert und die dafür benötigte Verschiebung des PET-Bilds in allen drei Raumachsen als PMOD-Transformationsmatrix gespeichert. Die so gewonnene Transformationsmatrix

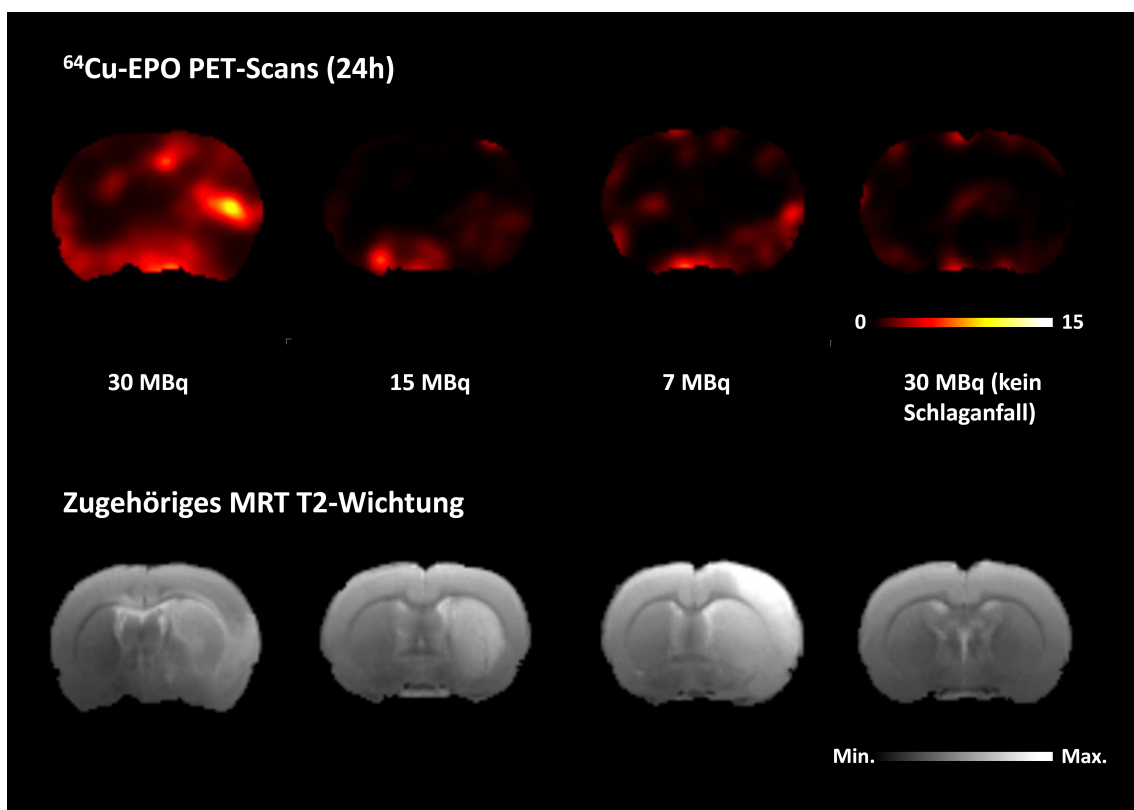


Abbildung 13: PET-Bildgebung mit intranasalem ^{64}Cu -EPO nach 24 Stunden. Für jede verwendete Dosis (30, 15 und 7 MBq) ist je ein Beispiel gezeigt plus ein Tier ohne Schlaganfall als Negativkontrolle. In der unteren Reihe ist die zugehörige T2-Aufnahme gezeigt (koronar).

wurde nun genutzt, um das eigentliche PET-Bild für die weiterhin manuelle Feinjustierung in die richtige Position zu den MRT-Aufnahmen zu bringen. Aufgrund der relativen Unschärfe der rekonstruierten *Attenuation Map* bleibt trotzdem ein Rest Ungenauigkeit in der Bildnachbearbeitung. Auffällig war, dass sich bei allen Tieren der größte Teil der Aktivität im Bereich Pharynx / Oesophagus und der Lamina cribrosa sowie um den Bulbus olfaktorius befand. Andere Strukturen wie z.B. das Integument wiesen kaum bis keine Aktivität auf. Aktivität in anderen Bereichen des Gehirns waren im Vergleich zu denen im Bulbus olfaktorius deutlich schwächer ausgeprägt.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft für jede applizierte Dosis ein PET-Bild aus der Schlaganfallregion sowie die zugehörige T2-gewichtete Anatomie. Bei allen Tieren ist diffuse Aktivität um das Gehirn herum, vor allem basal, zu erkennen. Im Vergleich mit der MRT-Aufnahme könnte diese Aktivität sowohl vom Cortex und anderen oberflächlich

liegenden Strukturen, also auch von den Meningen oder den Liquor cerebrospinalis, ausgehen. Das Tier ohne Schlaganfall weist zudem nur mittig im gezeigten Schnitt noch schwache Aktivität auf (Abbildung 13, rechts). Es liegt die Vermutung nahe, dass sich hier der Tracer eher im Liquorraum und weniger im Parenchym befindet. Bei den Tieren mit der Dosis 7 MBq und 15 MBq zeigt auch das

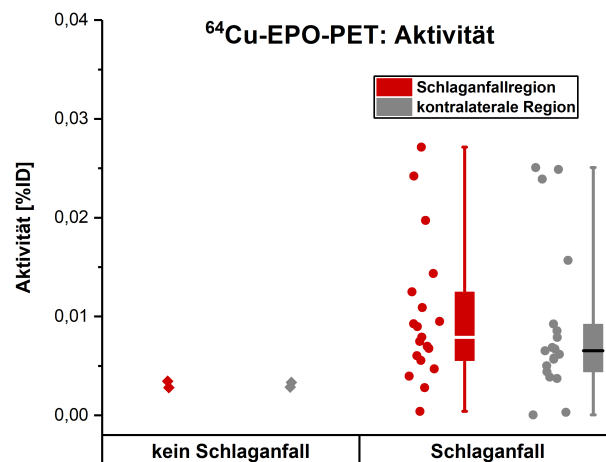


Abbildung 14: ^{64}Cu -EPO-PET 24 Stunden nach Injektion: Quantifizierung der Gesamtaktivität bezogen auf die applizierte Gesamtdosis in der Schlaganfallregion im Vergleich zur kontralateralen Seite (Quantifizierung anhand der im MRT festgelegten VOI (=Schlaganfallgebiet). Für die kontralaterale Seite wurde diese VOI gespiegelt um dasselbe Volumen zu untersuchen). Gezeigt sind die Daten von zwei Tieren ohne Schlaganfall sowie die Werte von 19 tMCAO-Ratten.

Hirnparenchym schwache Aktivität, welche sich vermehrt basal und in der ischämischen Hemisphäre befindet (Abbildung 13, Mitte). Im Vergleich mit der Anatomie fällt jedoch auf, dass die Schlaganfälle eine andere Ausprägung zeigen. Die meiste Aktivität im Hirnparenchym zeigt die tMCAO-Ratte mit 30 MBq intranasalem ^{64}Cu -EPO. Hier sieht es außerdem so aus, als ob sich das Maximum der Aktivität mitten im Schlaganfallgebiet befindet (Abbildung 13, links). Leider war das hier gezeigte Tier das einzige der 10 mit 30 MBq injizierten Tiere, welches solch eine ausgeprägte Aufnahme des Tracers in das Hirnparenchym aufwies. Alle Übrigen glichen mehr den Aufnahmen, wie sie hier für die beiden Tiere mit 15 und 7 MBq gezeigt sind (Abbildung 13). Dieser eher subjektive Eindruck konnte zusätzlich quantifiziert werden, indem die Gesamtaktivität in der Schlaganfallregion, sowie in der kontralateralen Hemisphäre im Bezug zur injizierten Gesamtdosis ermittelt wurde (Abbildung 14, Quantifizierung anhand der im MRT festgelegten VOI (Schlaganfallgebiet), Spiegelung dieser VOI zur kontralateralen Seite um dasselbe Volumen und ähnliche anatomische Strukturen zu untersuchen (siehe 2.7.4), Angabe als Gesamtaktivität ohne Normierung auf das gemessene Volumen): Insgesamt wird ein sehr geringer Anteil des Tracers in das Hirnparenchym aufgenommen (es wurden maximal 0,027 %ID gemessen). Tendenziell wird bei Schlaganfallratten mehr Aktivität gemessen (im Mittel 0,0079 %ID) als bei nativen Ratten (um die 0,0031 %ID). Bei beiden Gruppen sind dabei keine Unterschiede zwischen den Hemisphären zu erkennen.

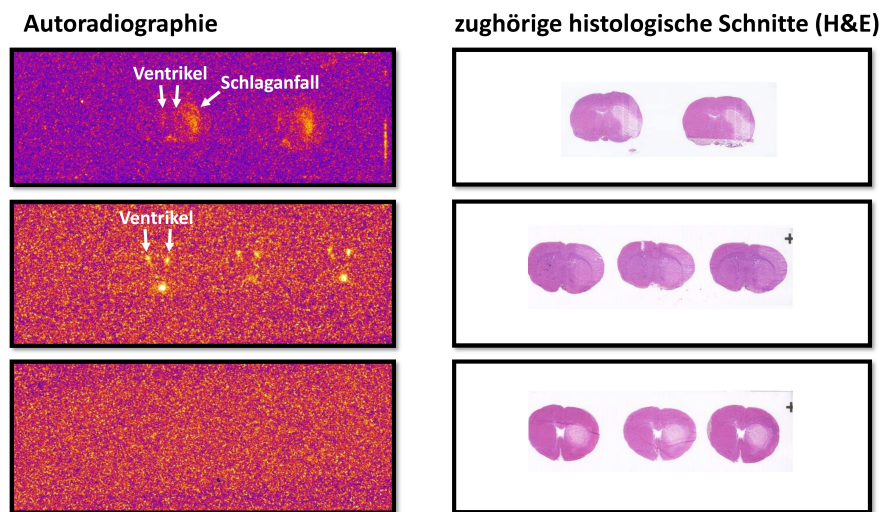


Abbildung 15: Repräsentative Beispiele der Autoradiographieplatten sowie der zugehörigen Objektträger mit H&E-gefärbten Schnitten (koronare Schnitte). Oben/Mitte: 30 MBq; Unten: 7 MBq, pro Zeile ist ein Tier gezeigt.

Eine höhere Auflösung als ein PET-Scan bietet die Autoradiographie. Um zu klären, ob der PET-Tracer in das Gehirn aufgenommen wird und ob er in der Schlaganfallregion bindet, wurden insgesamt sechs Tiere für diesen Versuch verwendet. Vier davon bekamen 30 MBq und je eines 15 bzw. 7 MBq ^{64}Cu -EPO. Insgesamt konnten drei unterschiedliche Verteilungsmuster auf den Autoradiographieplatten beobachtet werden, welche in Abbildung 15 mit drei repräsentativen Ausschnitten und den zugehörigen Objektträgern gezeigt sind. Bei den Tieren mit den niedrigen Dosierungen war keine Aktivität auf den Autoradiographieplatten zu sehen (Abbildung 15, unten). Wie zu Beginn des Kapitels bereits erwähnt, zeigte von den vier Tieren mit der höchsten Dosierung eines trotz Ischämie während der Okklusionszeit keinen sichtbaren Schlaganfall auf der T2-Aufnahme nach 24 Stunden und wurde daher von der Analyse ausgeschlossen. Bei den verbliebenen drei Tieren mit 30 MBq Tracer ist deutlich zu erkennen, dass der Tracer sich trotz gleicher Dosierung und gut ausgeprägten Schlaganfällen unterschiedlich verteilt hat: Ein Tier zeigt Aufnahme des Tracers in das Ventrikelsystem, jedoch nicht ins Hirnparenchym

(Abbildung 15, Mitte). Ein weiteres Tier zeigt sowohl Aufnahme in das Ventrikelsystem als auch eine deutliche Darstellung der Schlaganfallregion (Abbildung 15, oben). Das zuletzt erwähnte ist dasselbe Tier, bei welchem auch im PET-Scan die Schlaganfallregion zu sehen war (Abbildung 13, links).

Als Machbarkeitsnachweis wurde nach Abschluss der Experimente mit ^{64}Cu -EPO ein Tier mit 30 MBq ^{89}Zr -EPO injiziert und eine Autoradiographie des Gehirns erstellt. Dieser Versuch wurde aufgrund zeitlicher Engpässe freundlicherweise von Frau Patzwaldt durchgeführt. Durch die längere Halbwertszeit des Zirkoniums sollte die Bildqualität und damit die Möglichkeit zur Detektion des Schlaganfallgebiets verbessert werden. Tatsächlich zeigte sich auf dieser Platte ein kräftigeres Signal als auf den Platten der zuvor mit ^{64}Cu -EPO injizierten Tiere (siehe Abbildung 16).

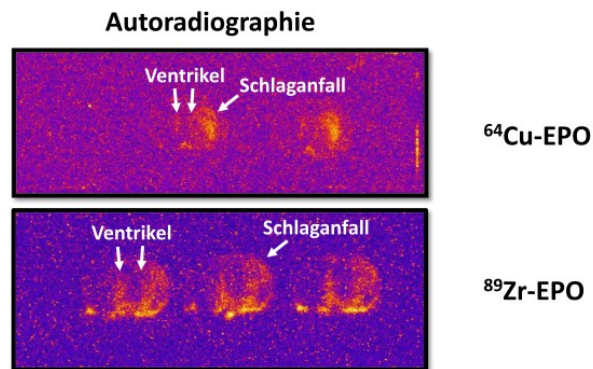


Abbildung 16: Vergleich zwischen ^{64}Cu -EPO und ^{89}Zr -EPO. Repräsentative Beispiele der Autoradiographieplatten (koronare Schnitte) nach Injektion von je 30 Mbq Tracer. Anfertigung der Schnitte und Durchführung des Versuchs durch Frau Patzwaldt.

3.2 Intraoperative Überwachung der Okklusion mittels MRT

Um sicherzugehen, dass die Operation bei allen Tieren zu einer Minderperfusion im Stromgebiet der A. cerebri media führt und um bereits Daten über den Schlaganfall vor der Intervention zu sammeln wurde das

Protokoll für die MRT-Messungen so angepasst, dass während der Okklusionszeit eine Messung stattfinden konnte:

- T2: Hier nur eine longitudinale Messung, Messparameter ansonsten unverändert.
- DWI: Repetitionszeit geändert auf 3000 ms, Echozeit geändert auf 82,35 ms, übrige Parameter unverändert.
- ASL: Parameter unverändert

Der Fokus lag hierbei auf ASL-Sequenz, da diese zu diesem frühen Zeitpunkt der Ischämie die meisten Informationen zu bieten hat.

Mit diesem neuen Protokoll konnte die durch das Filament verursachte Ischämie erfolgreich verifiziert (Beispielhaft gezeigt in Abbildung 17) und das Ausmaß des ischämischen Gebiets quantifiziert werden (Abbildung 18). Diese Messung sollte während jeder Operation durchgeführt werden, aufgrund technischer Schwierigkeiten während der ersten Versuche fehlen jedoch für einige Tiere die entsprechenden Datensätze: Insgesamt liegen für

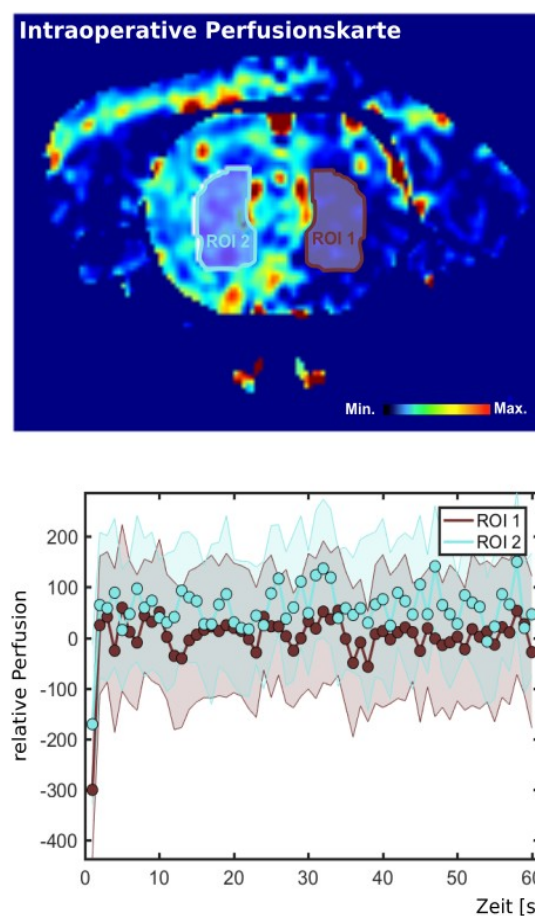


Abbildung 17: Intraoperative Überwachung der Okklusion mittels MRT. Oben: Perfusionsskizze des Gehirns (koronarer Schnitt). Die „regions of interests“ (ROI) wurden um das Striatum gezeichnet. Unten: Relative Perfusion im im Bereich der beiden ROIs. Die rechte Hemisphäre zeigt bei rechts gesetztem Filament eine deutlich niedrigere Perfusionsrate auf.

17 der 24 operierten Tiere die MRT-Messungen zum Zeitpunkt null vor (Abbildung 18).

Abbildung 18 zeigt, dass das durch die Operation generierte minderperfundierte Areal im Gegensatz zu Berichten aus der Literatur (Takano et al. 1997; Übersichtsartikel von Fluri et al. 2015) in seiner Ausdehnung durchaus variabel ist (Automatisierte Bestimmung des Areals, welches im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre eine um mindestens 60% reduzierte Perfusion aufwies, also mittels eines individuellen Thresholds für jedes Tier (siehe 2.7.4)). Die Spanne reicht von 0,013 cm³ bis zu 0,158 cm³. Des Weiteren zeigen die vier Versuchsgruppen trotz randomisierter Einteilung in die Versuchsgruppen vor der Intervention (siehe 2.2.1) ein unterschiedliches Verteilungsmuster, jedoch ohne signifikanten Unterschied (ANOVA: F(3,13)=1,001, p=0,423). Die Gruppe MD zeigt die größte Spannweite. In der Gruppe LD wurde dagegen im Vergleich relativ ähnliche, ausgedehnte ischämische Areale produziert, welche im Mittel eine Größe von 0,115 cm³ aufwiesen. Die Mediane der Gruppen HD

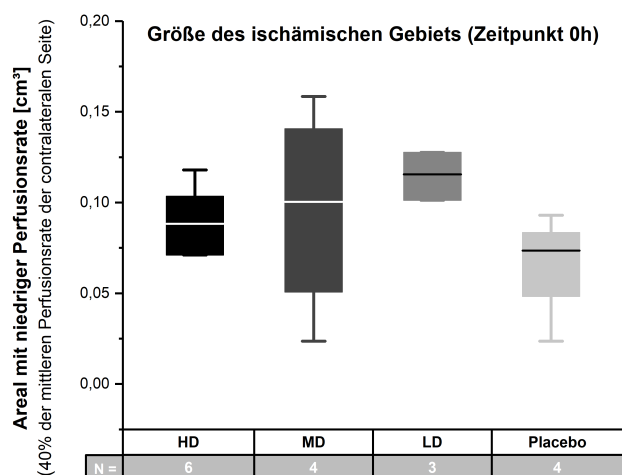


Abbildung 18: Quantifizierung des ischämischen Gebiets während der Okklusion (Zeitpunkt 0h). Box: Interquartilsabstand, begrenzt durch das obere und untere Quartil. Horizontale Linie in der Box: Median. Antennen der Boxen: Ausreißer (innerhalb des 1,5-fachem Interquartilsabstands)

und MD sind sich mit 0,088 und 0,1 cm³ recht ähnlich. In der Placebo-Gruppe war das ischämische Gebiet mit 0,073 cm³ im Mittel am kleinsten.

In der Retrospektiven stellt sich hier die Frage nach einer stratifizierte Randomisierung nach der Induktion des Schlaganfalls, um die

Gruppen gleich zu gestalten. Dies ist jedoch im hier dargestellten Versuchsablauf nicht umsetzbar, da aufgrund der zeitaufwändigen Operation immer nur einige wenige Tiere zeitgleich in den Versuch starten können. Für eine stratifizierte Randomisierung wäre es jedoch im Prinzip notwendig, dass bei allen Tieren zur selben Zeit ein Schlaganfall ausgelöst wird und innerhalb der drei Stunden bis zur Injektion des Tracers der komplette MRT-Datensatz der Okklusionsmessung ausgewertet wird. Eine Ungleichverteilung aufgrund eines Bias erscheint wiederum auch unwahrscheinlich, da die Tiere schon vor der Operation den Interventionsgruppen zugeteilt waren und der Operateur während des laufenden Versuchs keine Kenntnis von den MRT-Scans und damit von der Größe des Perfusionsdefizits hatte, da diese von einer zweiten Person angefertigt wurden.

Nebenbei noch auffallend war, dass auch das aufgrund des fehlenden Schlaganfalls von der Analyse ausgeschlossene Tier zum Zeitpunkt der Okklusion mit dieser Messmethode ein ischämisches Gebiet von $0,051 \text{ cm}^3$ aufwies. Damit lag es zwar insgesamt eher im unteren Bereich, jedoch gab es auch Tiere, welche noch kleinere Areale aufwiesen und trotzdem nach 24 Stunden ein ausgeprägtes Ödem zeigten.

3.3 Dosisabhängiges Potential des EPO-Tracers als intranasal appliziertes Theranostikum

Das therapeutische Potential des EPO-Tracers wurde in diesem Projekt in Abhängigkeit von der applizierten Dosis (HD, MD, LD) und longitudinal über einen Zeitraum von drei Monaten gegen Placebo untersucht. Als

Verlaufparameter wurden das Schlaganfallvolumen, gemessen an den T2-Aufnahmen, die Änderung von Perfusion und Diffusion im Schlaganfallgebiet, sowie die Erkenntnisse aus den Verhaltensversuchen verwendet, welche im Folgenden einzeln vorgestellt werden.

3.3.1 Verlaufskontrolle des Schlaganfalls mittels multiparametrischer Bildgebung

Für die Grafiken zum Zeitpunkt 24 h wurden die MRT-Datensätze von insgesamt 23 tMACO-Tieren verwendet (wie oben bereits erwähnt, wurde ein

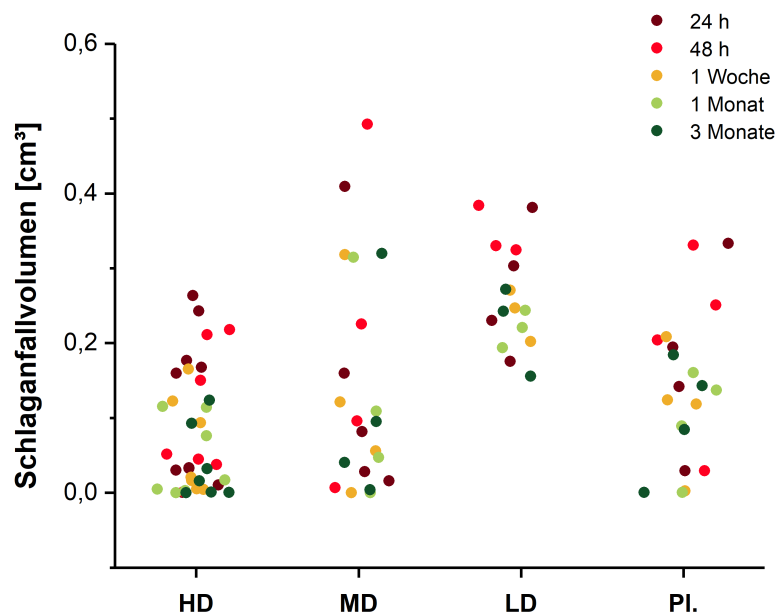


Abbildung 19: Änderung des Schlaganfallvolumens in den vier verschiedenen Gruppen im Verlauf von 3 Monaten. Über die Zeit (farbcodiert) zeigen alle Gruppen eine Reduktion des Schlaganfallvolumens. Im Vergleich zur Ausgangsmessung (Abbildung 18) sind die Schlaganfälle in der Placebo-Gruppe im Mittel nun nicht mehr am kleinsten, sondern vergleichbar mit der Gruppe MD. Die Schlaganfälle der LD-Gruppe bleiben dagegen vergleichsweise groß (grüne Punkte). Jeder Punkt steht für eine Einzelmessung.

Tier im Nachgang von der Analyse ausgeschlossen, da es nach 24 Stunden keinen Schlaganfall aufwies (siehe dazu auch 3.1.2)). Durch den Verwendung einiger Tiere für die Biodistribution und Autoradiographie nach 24 h umfasst der Stichprobenumfang für die longitudinale Analyse jedoch insgesamt nur 18 Tiere (HD=7 / MD=4 / LD=3 / Placebo=4).

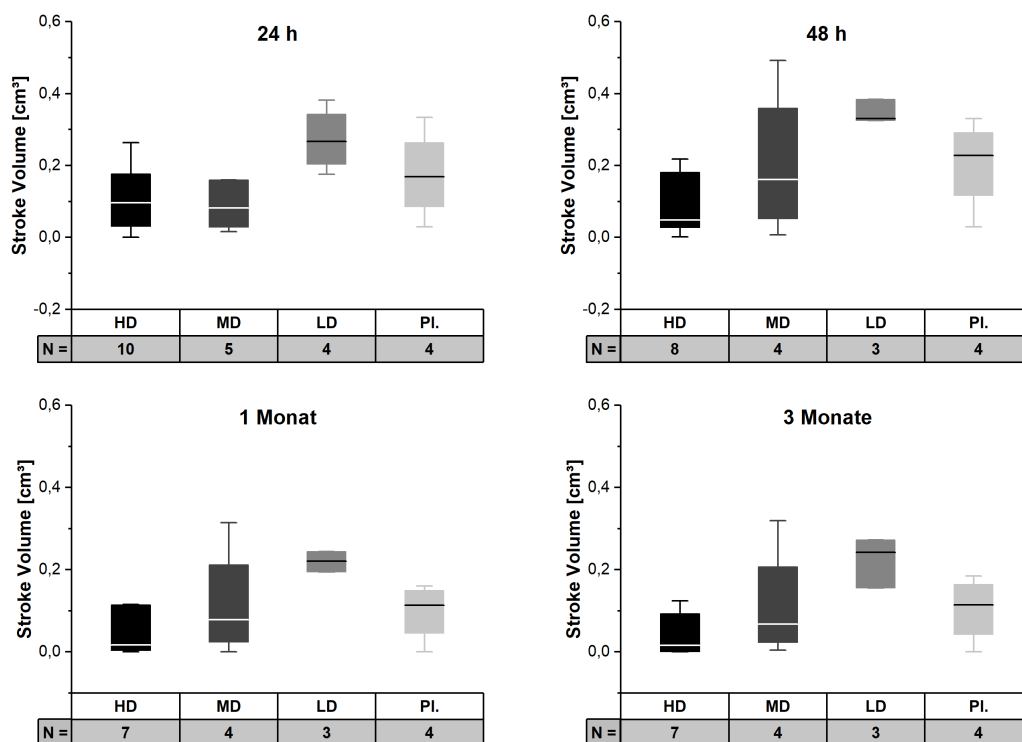


Abbildung 20: Änderung des Schlaganfallvolumens in den verschiedenen Gruppen zu ausgewählten Zeitpunkten (Oben links: 24 h / Oben rechts: 48 h / Unten links: 1 Monat/ Unten rechts: 3 Monate). Auf die Darstellung vom Zeitpunkt „1 Woche“ wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Der Stichprobenumfang N ist jeweils unter der Gruppe angegeben. Box: Interquartilsabstand, begrenzt durch das obere und untere Quartil. Horizontale Linie in der Box: Median. Antennen der Boxen: Ausreißer (innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands)

Abbildung 19 und Abbildung 20 zeigen die Entwicklung des Schlaganfallvolumens über einen Zeitraum von drei Monaten in Abhängigkeit von der Interventionsgruppe (Quantifizierung über manuelles Auswählen einer

VOI um das hyperintense Schlaganfallgebiet (siehe 2.7.4)). Zu sehen ist, dass sich die Gruppen zueinander ähnlich verhalten wie schon bereits während der Okklusion (siehe dazu Abbildung 18): Die Gruppe LD weist im Mittel die größten Schlaganfälle auf und in der Gruppe MD haben die Schlaganfälle die größte Spannbreite. Im Vergleich zur Messung während der Okklusion sind die Schlaganfälle in der Placebo-Gruppe nun aber größer als die in Gruppe HD und MD. Zum Zeitpunkt 24 h hat die Gruppe HD im Mittel ein Schlaganfallvolumen von $0,097 \text{ cm}^3$ (Abbildung 20), was ungefähr dem zum Zeitpunkt 0 h ermittelten minderperfundierten Areal aus Abbildung 18 entspricht. Die Schlaganfälle in der Gruppe MD fallen mit $0,082 \text{ cm}^3$ etwas kleiner aus als in der vorherigen Berechnung. In den Gruppen LD und Placebo hat sich jedoch das betroffene Areal mit $0,267$ und $0,168 \text{ cm}^3$ fast verdoppelt (Abbildung 20). Nach 48 h hat sich das Schlaganfallvolumen in allen Gruppen mit Ausnahme der Gruppe HD nochmals vergrößert. Für die HD-Gruppe hat die Größe des Schlaganfalls im Mittel schon nach 48 h abgenommen ($0,048 \text{ cm}^3$, Abbildung 20). Nach drei Monaten ist das betroffene Areal bei allen Gruppen kleiner als zu Beginn. Die Gruppe HD weist hier insgesamt mit durchschnittlich $0,016 \text{ cm}^3$ die kleinsten Schlaganfälle auf, gefolgt von der Gruppe MD mit $0,068 \text{ cm}^3$. Die Tiere in der LD-Gruppe hatten nach wie vor mit einem Median von $0,242 \text{ cm}^3$ die größten Schlaganfälle. Die Placebo-Gruppe liegt mit $0,114 \text{ cm}^3$ weiter zwischen MD und LD (Abbildung 20). Im Vergleich zum Zeitpunkt der größten Ausdehnung hat sich das Schlaganfallvolumen nach 3 Monaten in der Gruppe HD um ein Vielfaches verringert. In den anderen Gruppen ist diese Reduktion weniger stark ausgeprägt, trotzdem hat sich das Volumen auch in der Placebo-Gruppe nach drei Monaten im Vergleich zum Zeitpunkt 48 h um ca. die Hälfte reduziert.

Insgesamt nimmt also das Schlaganfallvolumen bei Gabe der hohen Dosis EPO schneller und ausgeprägter ab, während die Tiere in der Gruppe mit der niedrigen Dosis im Vergleich zum Placebo im Hinblick auf die Größe des

Schlaganfalls nicht zu profitieren scheinen. Von den beobachteten Effekten erweist sich jedoch nur die Änderung der Schlaganfälle insgesamt über die Zeit als statistisch signifikant (unabhängig von der Gruppe, ANOVA mit Messwiederholungen: $F(4,56)=36,814$, $p<0,001$). Für die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde in der ANOVA mit Messwiederholungen lediglich ein sub-signifikanter Effekt mit $F(3,14)=2,981$, $p=0,067$ festgestellt.

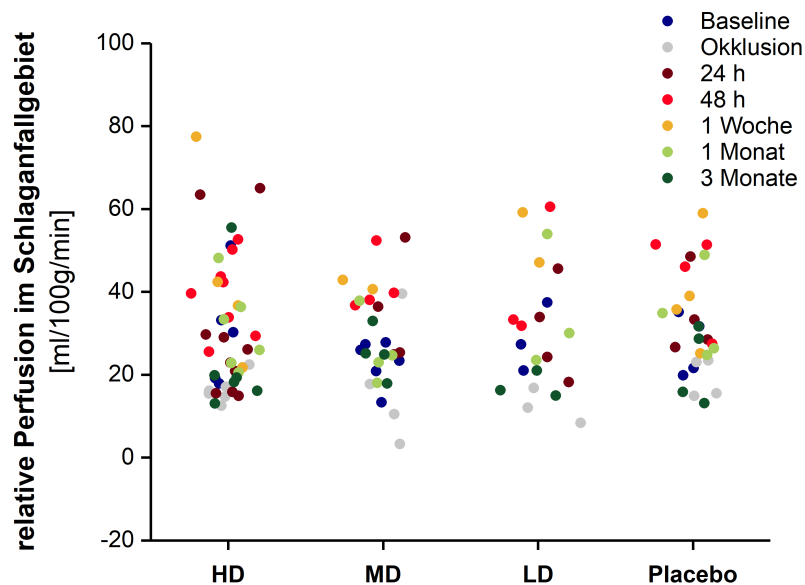


Abbildung 21: Änderung der Perfusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen im Verlauf von 3 Monaten. Während der ersten Woche (Rot und Gelb) steigt die Perfusion deutlich über das Ausgangsniveau an. Nach einem Monat sinkt die Perfusion wieder auf das Ausgangsniveau – nach drei Monaten zeigt sie sich leicht erniedrigt. Zusammengefasst finden sich zwischen den Gruppen keine auffälligen Unterschiede. Jeder Punkt steht für eine Einzelmessung, die zeitliche Entwicklung ist farbcodiert.

Zusätzlich zu den Veränderungen im Schlaganfallvolumen wurden auch die Veränderungen in Diffusion und Perfusion im Bereich des Schlaganfallgebiets mittels MRT longitudinal erfasst (Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23, Abbildung 24).

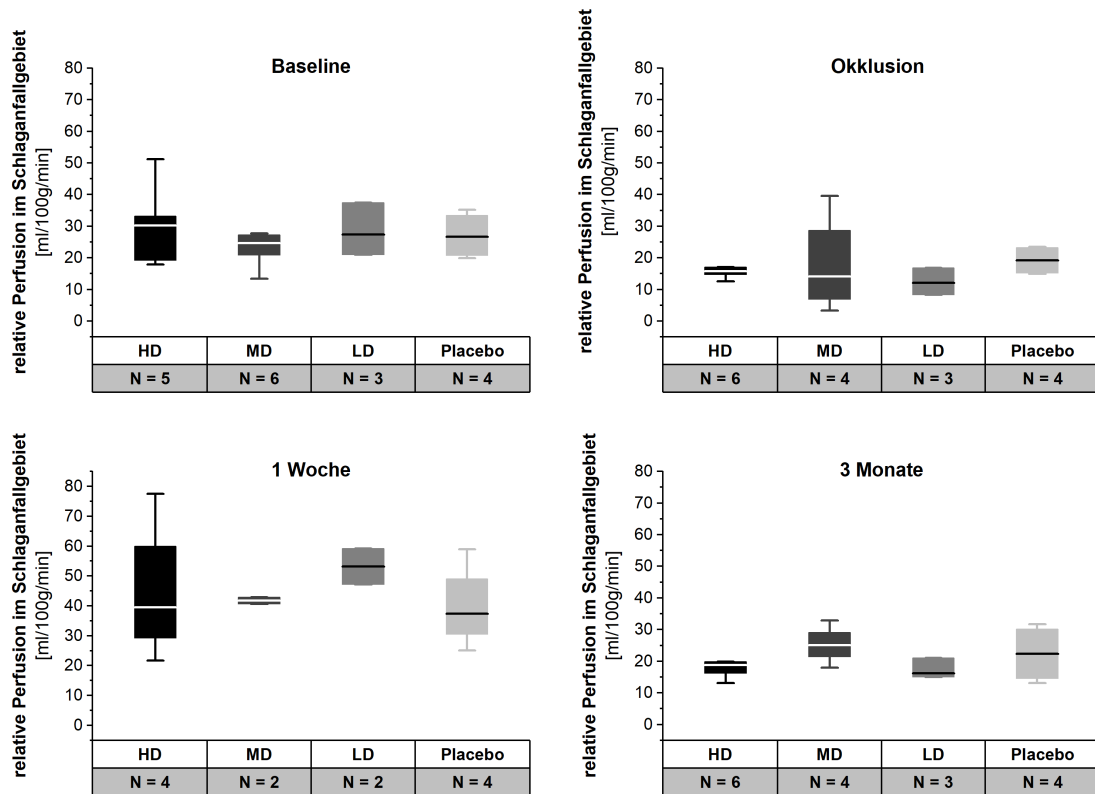


Abbildung 22: Änderung der Perfusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen zu ausgewählten Zeitpunkten. Nach der ersten Woche (unten links) steigt die Perfusion deutlich über das Ausgangsniveau (oben links) an. Nach 3 Monaten zeigt sie sich die Perfusion leicht erniedrigt (unten rechts), jedoch bleibt sie etwas höher als während der Okklusion (oben rechts). Oben links: Baseline / Oben rechts: Okklusion / Unten links: 1 Woche / Unten rechts: 3 Monate). Auf die Darstellung der übrigen Zeitpunkte wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Der Stichprobenumfang N ist jeweils unter der Gruppe angegeben. Box: Interquartilsabstand, begrenzt durch das obere und untere Quartil. Horizontale Linie in der Box: Median. Antennen der Boxen: Ausreißer (innerhalb des 1,5-fachem Interquartilsabstands)

Die Perfusion zeigt schon bei der Baseline-Messung deutliche Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren (Minimum: 13 ml/100g/min / Maximum: 51 ml/100g/min), befindet sich im Mittel bei allen Gruppen jedoch bei 25-30 ml/100g/min. Während der Okklusion sinkt die Perfusionsrate erwartungsgemäß bei allen Tieren eindeutig (Median: 12-19 ml/100g/min). Starke Schwankungen treten hier nur in der Gruppe MD auf, welche später auch die größte Variabilität in der Schlaganfallgröße zeigt (Minimum: 3 ml/100g/min / Maximum: 40 ml/100g/min). Während der ersten Woche steigt

die Perfusion des Schlaganfallgebiets in allen Gruppen kontinuierlich an. Das Maximum wird zum Messzeitpunkt 1 Woche erreicht (Median: 37-35 ml/100g/min). Nach einem Monat befinden sich die Werte dagegen wieder auf Ausgangsniveau (Median: 24-30 ml/100g/min) und sinken anschließend weiter auf 16-25 ml/100g/min (gemessen nach drei Monaten). Auffällige Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht zu erkennen (Abbildung 21 und Abbildung 22). Dieser Eindruck wird durch die Varianzanalyse bestätigt: Über die Zeit ändert sich die Perfusion im Schlaganfallgebiet statistisch signifikant (ANOVA mit Messwiederholungen: $F(4,32)=8,644$, $p<0,001$), während zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Effekte festgestellt werden konnten (ANOVA mit Messwiederholungen: $F(3,8)=0,154$, $p=0,924$).

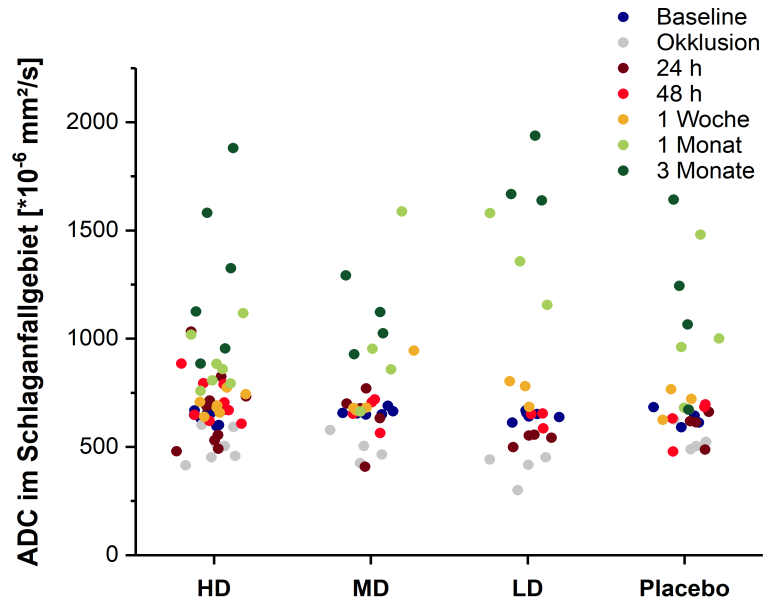


Abbildung 23: Änderung der Diffusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen im Verlauf von 3 Monaten. Der ADC sinkt während der Okklusion (hellgraue Datenpunkte) und steigt anschließend zunächst auf das Niveau der Baseline-Messung (blaue Datenpunkte). Nach ein und drei Monaten steigt der ADC nochmals deutlich an (grüne Datenpunkte). Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen LD und den übrigen Gruppen. Jeder Punkt steht für eine Einzelmessung.

Die Änderung der Diffusion (ADC = *apparent diffusion coefficient*) im Schlaganfallgebiet ist in Abbildung 23 und Fehler: Verweis nicht gefunden dargestellt. In der Baseline-Messung liegen die Werte aller Gruppen dicht beieinander und streuen kaum (Median: $628-655 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ / Minimum: $590 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ / Maximum: $689 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$). Während der Okklusion sinkt der ADC in allen Gruppen deutlich, am stärksten jedoch in der LD-Gruppe ($429 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs. $484-513 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ in den übrigen Gruppen). Nach 24 h befindet sich der ADC in der Gruppe HD und MD ungefähr wieder auf Ausgangsniveau, jedoch streuen die Daten nun deutlicher als zuvor (Median: $677-689 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ / Minimum: $408 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ / Maximum: $1033 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$). Bei den LD- und Placebo-Tieren bleibt der ADC zunächst erniedrigt ($547 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ und

616*10⁻⁶ mm²/s). Im Verlauf der ersten Woche steigt der ADC im Schlaganfallgebiet bei allen Tieren wieder an und bewegt sich wieder ungefähr in der Größenordnung des Ausgangswertes (Median: 779-697*10⁻⁶ mm²/s). Nach ein und drei Monaten hat der ADC im Schlaganfallgebiet sowohl im Mittel als auch in der Spannweite der Werte deutlich zugenommen (Median: 1074-1226*10⁻⁶ mm²/s / Minimum: 672*10⁻⁶ mm²/s / Maximum: 1938*10⁻⁶ mm²/s (3 Monate)).

Auffallend ist, dass zu diesen beiden Zeitpunkten der mittlere ADC der LD-Gruppe mit 1668*10⁻⁶ mm²/s um ca. 500*10⁻⁶ mm²/s höher liegt als der der

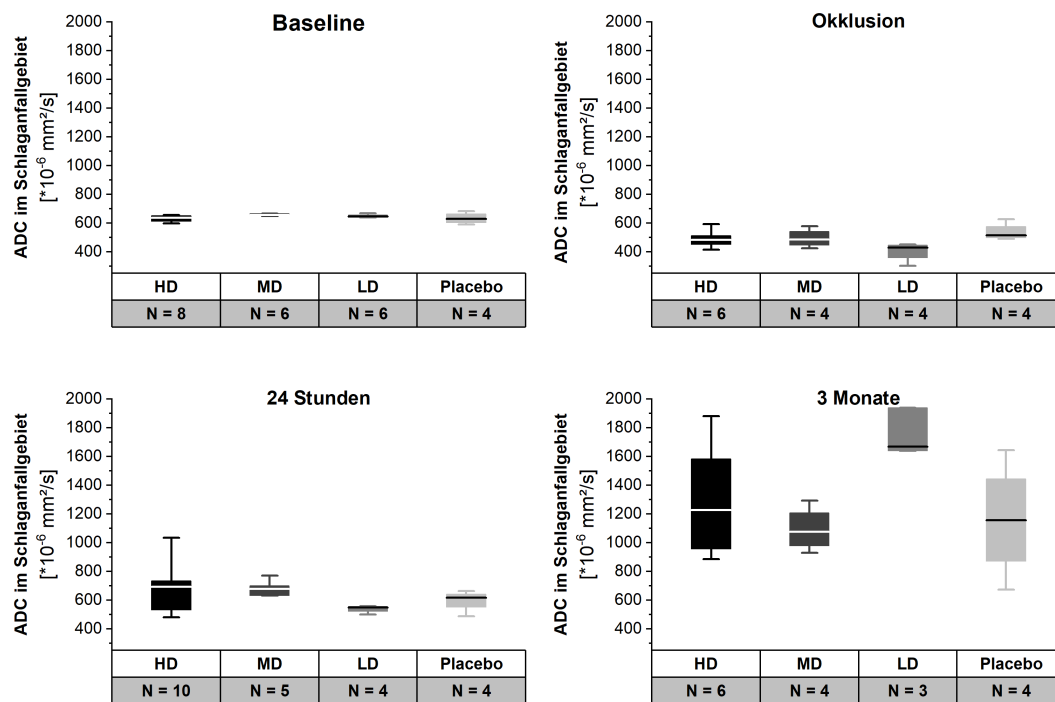


Abbildung 24: Änderung der Diffusion im Schlaganfallgebiet in den vier verschiedenen Gruppen zu Ausgewählten Zeitpunkten. Der ADC sinkt während der Okklusion (oben rechts) und steigt anschließend zunächst ca. auf das Niveau der Baseline-Messung (vgl. oben links und unten links). Nach drei Monaten ist der ADC deutlich angestiegen (rechts unten). Hier zeigt sich auch ein Unterschied zwischen LD und den übrigen Gruppen. Oben links: Baseline / Oben rechts Okklusion / Unten links: 24 Stunden Woche / Unten rechts: 3 Monate). Auf die Darstellung der übrigen Zeitpunkte wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Der Stichprobenumfang N ist jeweils unter der Gruppe angegeben. Box: Interquartilsabstand, begrenzt durch das obere und untere Quartil. Horizontale Linie in der Box: Median. Antennen der Boxen: Ausreißer (innerhalb des 1,5-fachem Interquartilsabstands)

anderen Gruppen und somit deutlich unterscheidet (Abbildung 23: hellrote Datenpunkte).

Statistisch signifikante Unterschiede finden sich auch für diesen Parameter lediglich im zeitlichen Verlauf (ANOVA mit Messwiederholungen: $F(4,52)=34,191$, $p<0,001$). Der ermittelte p-Wert für Unterschiede zwischen den Gruppen liegt mit $F(3,13)=3,062$, $p=0,066$ wie für das Schlaganfallvolumen auch knapp über der vorausgesetzten Signifikanzgrenze von 0,05.

3.3.2 Verlaufskontrolle der motorischen Defizite nach dem Schlaganfall

Die Tiere wurden während der dreimonatigen Verlaufskontrolle nach Auslösen des Schlaganfalls regelmäßig funktionellen Testungen unterzogen, wie in 2.6 beschrieben. Die Einzelparameter der vier Tests sowie der Allgemeinzustand der Tiere flossen in den hierfür entwickelten Neuroscore ein, welcher das funktionelle Outcome der Experimente widerspiegeln sollte. Hierbei werden

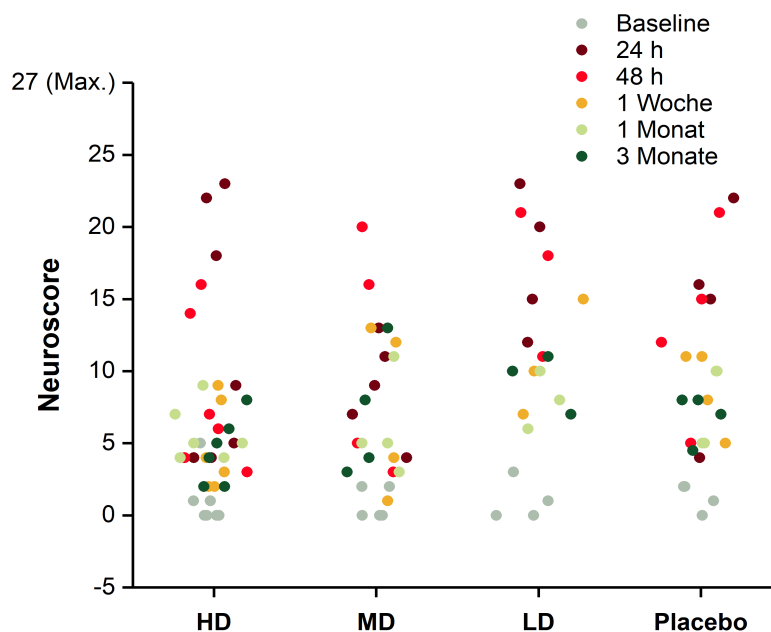


Abbildung 25: Dreimonatige Verlaufskontrolle der motorischen Defizite nach Auslösen des Schlaganfalls. Je höher die Punktzahl, desto eingeschränkter ist das Tier in seiner Beweglichkeit, bei einer Maximalpunktzahl von 27 Punkten. Der Zeitverlauf ist farblich codiert; jeder Punkt steht für eine Einzelmessung.

maximal 27 Punkte vergeben, wobei eine höhere Punktzahl eine größere Beeinträchtigung bedeutet. Die Punktwertung setzt sich aus je maximal fünf Punkten für den *Open Field*, den *Sticky Label Test*, den *Forelimb Alternation Test* und den *Beam Walk*, sowie maximal sieben Punkten für Allgemeinzustand und freie Beweglichkeit zusammen. Ein gesundes Tier, welches alle Aufgaben korrekt ausführt, sollte im Neuroscore 0 Punkte erreichen. Um den zeitlichen

Verlauf verständlich darzustellen, sind die longitudinalen Ergebnisse dieser Untersuchung in Abbildung 25 und Abbildung 26 grafisch aufgearbeitet.

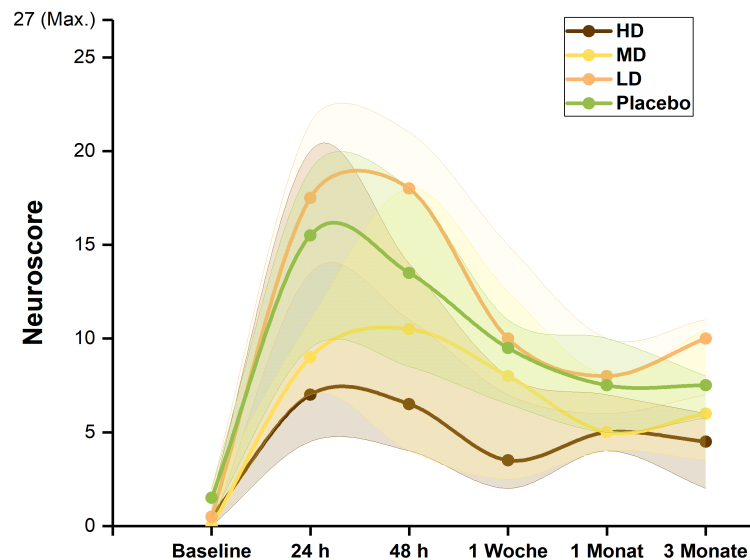


Abbildung 26: Dreimonatige Verlaufskontrolle der motorischen Defizite nach Auslösen des Schlaganfalls. Je höher die Punktzahl, desto eingeschränkter ist das Tier in seiner Beweglichkeit, bei einer Maximalpunktzahl von 27 Punkten. Die Punkte markieren die Mediane zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Wertebereich zwischen dem 1. und dem 3. Quartil ist durch farblich passende Flächen gezeigt. Gemessen wurde nur zu den markierten Zeitpunkten – für Verlauf der Linie zwischen den Punkten wurde aus graphischen Gründen eine Bezierkurve interpoliert.

Abbildung 25 zeigt analog zu den MRT-Daten die zentrale Tendenz der Ergebnisse: Die Gruppe LD weist zusammengenommen die höchsten Werte im Neuroscore auf. In der Baseline-Messung erreichen nahezu alle Tiere 0 bis 2 Punkte. In den ersten Tagen steigt die Punktzahl im Score bei allen Tieren stark an. Der Maximalwert liegt hier bei 23 Punkten. Im Verlauf sinkt die erreichte Punktzahl in allen Gruppen. In Abbildung 26 wird der Unterschied zwischen den Gruppen trotz der breiten Streuung der Werte deutlicher. Auffällig ist die hohe Variabilität des Ergebnisses nach 24 h und 48 h (Spannbreite 4-23

bzw. 3-21 Punkte). Im Mittel liegen hier die erreichten Punkte der HD- und MD-Tiere jedoch deutlich unter dem Niveau der LD- und Placebo-Tiere (Median (24 h): HD=7 Punkte / MD=9 Punkte / LD=17,5 Punkte / Placebo=15,5 Punkte). Nach drei Monaten liegen die Ergebnisse im Mittel wieder dichter beieinander (Median: HD=4,5 Punkte / MD=6 Punkte / LD=10 Punkte / Placebo=7,5 Punkte), jedoch bleibt die erreichte Punktzahl im Vergleich zur Baseline erhöht. Hierbei verhalten sich die Gruppen zueinander wie schon beim Schlaganfallvolumen: In der Gruppe HD werden die niedrigsten Punkte im Neuroscore erreicht, der Reihe nach gefolgt von den Gruppen MD, Placebo und LD. Wie auch schon beim Schlaganfallvolumen zeigt die Gruppe MD am Ende die größte Spannbreite (Minimum: 3 Punkte / Maximum: 13 Punkte). Wie auch bei den MRT-Daten sind die Veränderungen im Neuroscore zwischen den einzelnen Messzeitpunkten signifikant unterschiedlich (ANOVA mit Messwiederholungen: $F(4,52)=14,333$, $p<0,001$). Der Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen ist mit $F(3,13)=1,497$, $p=0,262$ jedoch nicht signifikant. Um sicher zu gehen, dass durch das Punktesystem des Neuroscores keine Effekte der Einzeltests kaschiert werden, wurden auch die Ergebnisse der vier Verhaltenstests zusätzlich separat statistisch untersucht. Hierfür wurden die gemessenen Parameter mittels Z-Transformation standardisiert und für jeden Test gemittelt (Beispiel: Im *Open Field* wurden sowohl die zurückgelegte Strecke als auch die Anzahl der Männchen und die Zeit in Bewegung beobachtet. Für jede Messung wurden nun die entsprechenden Z-Scores mit SPSS berechnet und gemittelt.). Mit Hilfe dieser mathematischen Standardisierung sollte eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Parameter trotz unterschiedlicher Messskalen und Werteverteilung gewährleistet werden. Anschließend wurde für jeden Test eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse bestätigen die Ergebnisse des Neuroscores: Signifikant sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (*Open Field*:

$F(4,52)=14,503$, $p<0,001$ / *Sticky Label Test*: $F(4,52)=10,984$, $p<0,001$ / *Forelimb Alternation Test*: $F(4,52)=5,989$, $p<0,001$ / *Beam Walk*: $F(4,52)=6,052$, $p<0,001$), jedoch nicht die zwischen den vier Gruppen (*Open Field*: $F(3,13)=0,413$, $p=0,747$ / *Sticky Label Test*: $F(3,13)=1,233$, $p=0,337$ / *Forelimb Alternation Test*: $F(3,13)=0,858$, $p=0,487$ / *Beam Walk*: $F(3,13)=3,155$, $p=0,061$). Von den vier Tests zeigt lediglich der Beam Walk mit $p=0,061$ dieselbe subsignifikante Tendenz zwischen den Gruppen wie auch das Schlaganfallvolumen.

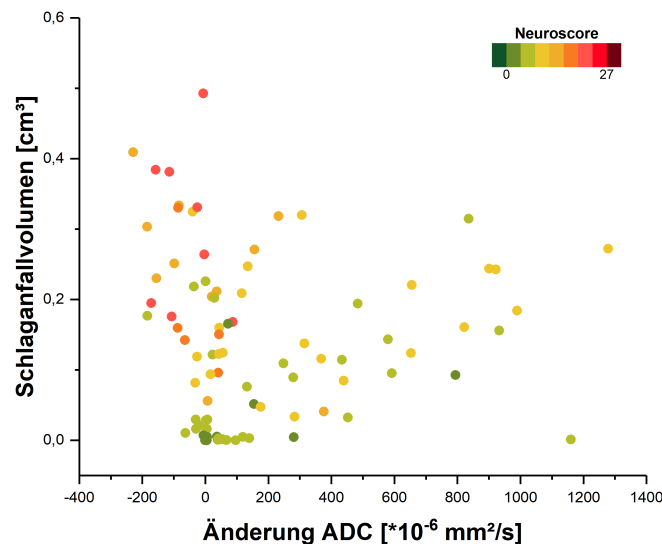


Abbildung 27: Korrelation zwischen Schlaganfallvolumen, Neuroscore und Änderung der ADC: Kleine Schlaganfälle korrelieren mit einer niedrigeren Punktzahl im Neuroscore und umgekehrt. Eine Abnahme der ADC korreliert mit einer hohen Punktzahl im Neuroscore.

Die Daten aus den Verhaltensversuchen legen nahe, dass die mit dieser Testbatterie beobachteten motorischen Defizite mit der Größe der Läsion im MRT korrelieren (Abbildung 27). Um diese Beobachtung zu objektivieren, wurden mit Hilfe des Pearson Tests die Wahrscheinlichkeit für eine Korrelation sowie der Korrelationskoeffizient ρ zwischen den einzelnen Parametern

berechnet. Signifikante Korrelationen finden sich zwischen Schlaganfallvolumen und Neuroscore ($p < 0,001$ / $\rho = 0,658$) sowie Änderung der Diffusion (=Differenz zwischen der mittleren Diffusion kontralateral und der mittleren Diffusion im Schlaganfallgebiet) und Neuroscore ($p = 0,015$, $\rho = -0,259$). Das Schlaganfallvolumen korreliert also positiv mit der Punktzahl des Neuroscores, während eine Abnahme des ADC im Zusammenhang mit hohen Punktwerten im Neuroscore gefunden wird.

3.4 Systemische Auswirkungen des intranasal applizierten EPO-Tracers: Der Hämatokrit als Marker für potentielle Unerwünschte Nebenwirkungen

Um zu überprüfen, ob der intranasal applizierte EPO-Tracer auch systemisch eine Wirkung vermitteln kann, wurde nach Verfügbarkeit bei einigen Ratten zwei bis drei Wochen nach der Tracer-Gabe der Hämatokrit bestimmt. Als Normalwert für den Hämatokrit einer Ratte lassen sich in der Literatur verschiedene Angaben finden, häufig wird jedoch ein Bereich von 36 bis 48 Vol% genannt (Müller 2017; 3Rs-Centre Utrecht Life Sciences [Internetquelle, Zugriff am 21.11.2018]).

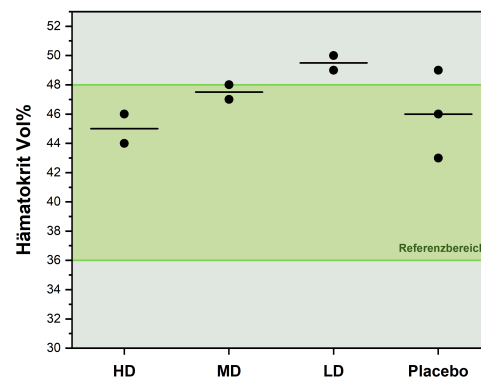


Abbildung 28: Bestimmung des Hämatokrits zwei Wochen nach EPO-Trace-Gabe. Die Abbildung enthält Daten von insgesamt neun Tieren, jeder Punkt steht für ein Tier. Angabe des Medians durch horizontale Striche. Grüne Fläche entspricht dem in der Literatur angegebenen Normalbereich.

Abbildung 28 zeigt, dass sich alle Ratten unabhängig von der Gruppe überwiegend im hochnormalen Bereich bewegen. Die Tiere aus der LD-Gruppe weisen einen zu dem in der Literatur angegebenen Referenzwert leicht erhöhten Hämatokrit von im Mittel 49,5 Vol% +/- 0,5 Vol% auf, jedoch zeigen auch ein mit Placebo behandeltes Tier einen vergleichbaren Wert mit 49 Vol%. Aufgrund des niedrigen Stichprobenumfangs wurde auf eine statische Analyse der Werte verzichtet. Vergleicht man die Placebo-Gruppe mit den übrigen Gruppen, ist hier kein großer Unterschied zu erkennen. Es liegt der Schluss nahe, dass der EPO-Tracer keine Auswirkung auf den Hämatokrit der Tiere hat.

4 Diskussion

Diese Arbeit sollte vor allem überprüfen, ob der ^{64}Cu -EPO einen dosisabhängigen therapeutischen Effekt vermitteln kann. Hierfür wurden longitudinal über drei Monate die Größe der Schlaganfallläsionen, die Perfusion und Diffusion im Schlaganfallgebiet sowie durch die Verhaltensversuche und über den Neuroscore auch funktionelle Aspekte untersucht. Die Daten zusammenfassend lässt sich diese Frage leider nicht abschließend klären. Obwohl durchaus gewisse Trends zu einem günstigeren Outcome bei der Gabe von 30 MBq ^{64}Cu -EPO zu erkennen sind, konnte für keinen der überprüften Parameter ein signifikanter Effekt gefunden werden. Bezüglich des Schlaganfallvolumens lagen die Unterschiede zwischen den Gruppen mit $p=0,067$ nur knapp oberhalb der gewählten Signifikanzgrenze und betrachtet man die Entwicklung der Läsionen im zeitlichen Verlauf, so gewinnt man den Eindruck, dass die Läsion bei den Gruppen HD und MD innerhalb der ersten Tage vergleichsweise kleiner ausfällt und vor allem die Gruppe HD auch langfristig im Vergleich zum Placebo kleinere Läsionen aufweist. Überraschend war, dass die Tiere aus der LD-Gruppe größere Läsionen aufwiesen als die mit Placebo behandelten Tiere. Anhand der Literaturdaten (wie auch schon in der Einleitung dargelegt) scheint es keinen Anhalt dafür zu geben, dass ausgerechnet kleine Mengen EPO einen negativen Effekt haben könnten. Eine mögliche Erklärung ist die Inhomogenität der produzierten Schlaganfälle: Schon zum Zeitpunkt 0 Stunden unterscheiden sich die ischämischen Gebiete in ihrer Ausdehnung zwischen den Gruppen sowohl im Mittel als auch sehr deutlich in der Spannweite. Das tMCAO-Modell wird im Allgemeinen als gut reproduzierbar angesehen (Takano et al. 1997; Übersichtsartikel von Fluri et al. 2015), jedoch wird die Variabilität der durch das Modell produzierten Infarktgröße auch von einigen Autoren kontrovers diskutiert (Übersichtsartikel

von Liu und McCullough 2011). Die Unterschiede zwischen den Gruppen zu Beginn des Versuches sind zwar nicht signifikant, trotzdem ist die Größenvariabilität mit z.B. einem Minimum von 29,26 mm³ und einem Maximum von 333,41 mm³ für die Placebo-Gruppe nach 24 Stunden hier um einiges höher als die von Takano et al. berichteten +/- 33-44 mm³ (Takano et al. 1997). Angesichts dieser Variabilität und des kleinen Stichprobenumfangs dieser Arbeit ist die Aussagekraft der statistischen Untersuchung deutlich eingeschränkt und wurde eher der Vollständigkeit halber durchgeführt (Einschätzung durch Prof. Dr. Eichner, Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, mündliche Mitteilung im Rahmen der statistischen Beratung). Abschließend kann also nicht sicher beurteilt werden, ob es sich bei dem Trend zur relativ größeren Reduktion des Schlaganfallvolumens nach einer hohen Dosis ⁶⁴Cu-EPO um einen therapeutischen Effekt handelt. Um diese Frage abschließend zu klären, wären vermutlich Versuche mit deutlich größerem Stichprobenumfang nötig. Gleichzeitig könnten die MRT-Aufnahme während der Okklusion dabei helfen Ausreißer in der Schlaganfallgröße in Zukunft durch geeignete Auswahlkriterien zu eliminieren. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Verminderung der Perfusion während der Okklusionszeit nicht unbedingt zu einer sichtbaren Infarktdemarkation nach 24 Stunden führen muss, sollte in Erwägung gezogen werden als Kriterium nicht nur die Änderung der Perfusion, sondern auch die Änderung der Diffusion zu betrachten.

Den Empfehlungen des *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* für präklinische Forschung folgend wurden in diesem Projekt neben der Entwicklung der Läsionsgröße im MRT auch Perfusion und Diffusion im Schlaganfallgebiet sowie das funktionale Outcome überprüft (Fisher et al. 2009). Bezüglich der Perfusion im Schlaganfallgebiet ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Da gezeigt wurde, dass das Endothel von Gehirnkapillaren zwei Formen des EPO-Rezeptors exprimiert (Yamaji et al. 1996), haben Sirén und Ehrenreich die Hypothese aufgestellt,

dass EPO über Neovaskularisation neuroprotektiv wirken kann (Sirén und Ehrenreich 2001). Unterschiede in der Perfusion des Schlaganfallgebiets als Ausdruck einer therapeutischen Wirkung von EPO wären also durchaus denkbar gewesen. Eventuell war jedoch auch die hier gewählte Methode zur Analyse der Perfusionsmessungen nicht geeignet, um durch Angiogenese hervorgerufene Änderungen zu entdecken, da gezeigt wurde, dass sich diese Prozesse vor allem am Rand der Läsion und im Gebiet der strukturellen Reorganisation des Hirngewebes nach ischämischer Schädigung finden. Angiogenese und zerebraler Blutfluss in diesen Regionen werden durch die Gabe von EPO verstärkt und müssen nicht mit einer Reduktion der Läsionsgröße einhergehen (Li et al. 2009; Ding et al. 2010). In dieser Arbeit wurde die Perfusion im anhand der T2-Aufnahme identifizierten ischämischen Gebiet betrachtet. Somit kann es durchaus sein, dass die beschriebenen Veränderungen hier nicht innerhalb des gewählten VOI lagen. Alternative Auswertemethoden wie zum Beispiel Ansätze aus dem Bereich *Machine Learning* könnten hier entscheidende Vorteile bieten, um multiparametrische Datensätze objektiv auf Unterschiede zu untersuchen.

Erwartungsgemäß änderte sich die Perfusion dagegen im zeitlichen Verlauf bei allen Tieren unabhängig von der Interventionsgruppe: Nach der durch den operativen Eingriff erfolgreich verminderten Perfusion zeigt sich in der Woche danach eine Hyperperfusion des Schlaganfallgebiets (ca. +10 ml/100g/min). Ein gesteigerter Blutfluss im tMCAO-Modell in den Tagen 1 bis 14 nach der Operation ist bereits in der Literatur vorbeschrieben und der Zeitpunkt der maximalen Hyperperfusion hat sich als prädiktiver Marker für die finale Läsionsgröße gezeigt (Wegener et al. 2013). Nach drei Monaten ist die Perfusion im ischämischen Gebiet unter den Ausgangswert gesunken, was bedingt durch den Umbau des nekrotischen Materials zu erwarten war. So konnte unter anderem in einer Langzeitstudie zur Charakterisierung des MCAO-Modells gezeigt werden, dass ab drei Monaten ein Großteil des ischämischen

Gebiets zu einer flüssigkeitsgefüllten Höhle umgebaut ist (Rewell et al. 2017). In diesem Gebiet sollte folglich keine Perfusion zu messen sein, dafür umso höhere ADC-Werte, was sich ebenso in den hier vorgestellten Daten widerspiegelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden für die LD- und Placebo-Gruppe höhere ADC-Werte ermittelt, was darauf hindeuten könnte, dass sich in diesen Gruppen innerhalb des Läsionsgebiet ein größerer mit Liquor gefüllter Defekt formiert hatte. Auch in den ersten Tagen nach dem Schlaganfall fanden sich sub-signifikante Unterschiede zwischen der LD und dem Placebo versus MD und HD: Im Falle der letztgenannten beiden Gruppen war der ADC schon nach 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert gestiegen, was ein Hinweis auf ein geringer ausgeprägtes zytotoxisches Ödem sein könnte. Wie *Mandeville et al.* in ihrem Übersichtsartikel erläutern, ist die Reduktion des ADC ein sehr früher sensitiver Marker für das zytotoxische Ödem. Diese Reduktion ist im MCAO-Modell normalerweise auch noch nach 48 Stunden zu sehen und normalisiert sich im späteren Verlauf, um dann mit dem weiteren Umbau des Gewebes anzusteigen (Übersichtsartikel von Mandeville et al. 2017). In diesem Zusammenhang wird auch von einer Pseudonormalisierung nach ein bis zwei Wochen gesprochen. Aufgrund dieser bekannten zeitlichen Entwicklung wurde auch vorgeschlagen, den ADC für die klinische Einschätzung des Läsionsalters zu benutzen (Lansberg et al. 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine frühzeitige Änderung der Läsionsgröße in der ADC-Karte nach zwei Stunden sehr gut dazu geeignet ist, ein Therapieansprechen vorherzusagen (Simpkins et al. 2017). Es ist nicht bekannt, welche Aussagekraft bezüglich des therapeutischen Ansprechens eine wie hier gezeigte Normalisierung des ADC nach 24 Stunden hat, jedoch legen die von *Simpkins et al.* gezeigten Daten nahe, dass die als günstig bezeichnete Normalisierung des ADC auch nach 24 Stunden noch zu sehen ist. Zusammenfassend lässt dies die Vermutung zu, dass die hier gezeigte Normalisierung des ADC in den Gruppen HD und MD auf eine günstige Wirkung des EPO-Tracers zurückzuführen sein könnten.

Die Ergebnisse der funktionellen Testung passen dabei zu diesem Rückschluss, da die HD- und LD-Tiere in der Tendenz in den ersten beiden Tagen nach dem Schlaganfall eine niedrigere Punktzahl im Neuroscore erreichten und damit die Aufgaben besser bewältigten als Tiere der LD- oder Placebo-Gruppe. Eine funktionelle Verbesserung, auch ohne eine Abnahme der Läsionsgröße als Reaktion auf eine Therapie mit EPO, wurde schon in der Literatur beschrieben (Li et al. 2009; Ding et al. 2010). Es wurde bereits gezeigt, dass intranasal verabreichtes EPO das Schlaganfallvolumen und die motorischen Funktionen nach 24 Stunden auch in kleinen Dosierungen verbessern kann (Yu et al. 2005). Langzeitergebnisse mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 90 Tagen bietet die Studie von *Fletcher et al.*, welche zeigen konnte, dass eine Dosis von 100 U eine langfristige signifikante Verbesserung des funktionalen Outcomes bewirken kann (Fletcher et al. 2009). Ein ähnlich ausgeprägter Effekt wie in diesen beiden Studien konnte hier nicht gezeigt werden. Eine Begründung hierfür kann einerseits die naturgemäß geringe Dosierung von EPO bei der Verwendung als PET-Tracer oder die oben genannten Schwächen der Studie, bedingt durch den geringen Stichprobenumfang, sein.

Wie weiter oben schon angesprochen, muss eine Verbesserung in den Verhaltensexperimenten nicht unbedingt mit einer kleineren Läsion oder anderen histologischen Endpunkten korrelieren. Ganz im Gegenteil finden sich hier in MACO-Studien oft keine Korrelationen, weswegen Forscher dazu tendieren, weiterhin sowohl funktionelle als auch histologische Aspekte in ihren Studien zu untersuchen (DeVries et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten diese Experimente eine moderate Korrelation zwischen den Ergebnissen des Neuroscores und des Schlaganfallvolumens sowie der Änderung des ADC zeigen. Dies kann einerseits für die Stärke des hier verwendeten Neuroscores sprechen, andererseits könnte man argumentieren, dass der Effekt durch die fehlende Verblindung des Untersuchers zustande kommen könnte. Andererseits wurden die Videos der Verhaltensversuche vor den MRT-Messungen

aufgezeichnet, sodass zumindest bei der Durchführung der Verhaltensexperimente der Experimentator unbeeinflusst gewesen sein sollte.

Zweites Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob der intranasal gegebene EPO-Tracer in der Schlaganfallläsion bindet und sich in einer der gewählten Dosierungen zur PET-Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall eignet. Sowohl der optische Eindruck der PET-Bilder als auch die Quantifizierung der Aktivität im Schlaganfallgebiet zeigen, dass intranasal verabreichtes ^{64}Cu -EPO in den hier untersuchten Dosierungen für diesen Zweck weniger gut geeignet zu sein scheint. Da es jedoch ein Tier gab, welches sowohl in der PET-Bildgebung als auch in der Autoradiographie eine deutliche Akkumulation des Tracers im Bereich der ischämischen Läsion zeigte, scheint das Problem eher nicht der Tracer selbst zu sein. *Fletcher et al.* konnten mittels Autoradiographie und Flüssigkeitsszintillation bereits zeigen, dass intranasal verabreichtes ^{125}I -EPO in einem durch Ischämie geschädigten Gehirn schnell an- und langsam abflutet. Außerdem zeigte diese Studie, dass ^{125}I -EPO in der Schlaganfallregion akkumuliert und bei intranasaler Gabe mehr EPO das Gehirn erreicht als nach intravenöser Gabe (Fletcher et al. 2009). Allerdings haben *Fletcher et al.* im Gegensatz zu dieser Arbeit das ^{125}I -EPO nicht mittels PET detektiert, sondern haben mit der Autoradiographie und Flüssigkeitsszintillation zwar sensitive, aber auch invasive Methoden verwendet. Trotzdem stellt sich die Frage, weshalb in dieser Arbeit mit ^{64}Cu -EPO keine ähnlichen Ergebnisse erzielt werden konnten. Insgesamt könnten zahlreiche Gründe dafür vorliegen, wie unter anderem Unterschiede zwischen den verwendeten Substanzen, den verwendeten Spezies (*Fletcher et al.* experimentierten mit Mäusen) oder auch Unterschiede in der Dosierung des EPOs. Als genereller Machbarkeitsnachweis wurde daher in den Ergebnissen eine Autoradiographie mit dem Tracer ^{89}Zr -EPO vorgestellt, welche ähnlich vielversprechende Ergebnisse aufwies, wie das einzelne positive Ergebnis mit ^{64}Cu -EPO. Es scheint also naheliegend zu sein, dass

radioaktiv markiertes EPO durchaus intranasal aufgenommen wird und im Schlaganfallgebiet akkumulieren kann und dass die Methode für stabile Ergebnisse noch verfeinert werden muss. Ein Ansatz wäre zum Beispiel, das Injektionsvolumen deutlich zu verringern, um eine gute Aufnahme der Substanz über die Nase zu gewährleisten (William Frey, mündliche Mitteilung). Alternative Zubereitungsformen der Injektionslösung, wie zum Beispiel kolloidale Partikel durch die Zugabe von S-1-Dodecanoylprolin, könnten außerdem eine verbesserte Passage durch die Zellen der Nasenschleimhaut gewährleisten (Bijani et al. 2012). Des Weiteren könnte eine Überprüfung der Qualität des verwendeten EPOs Schwankungen zwischen den vom Hersteller bezogenen Chargen und dadurch bedingte Inkonsistenzen in den Versuchsergebnissen ausschließen und zur Qualitätssicherung bei der Herstellung des Tracers beitragen. Schlussendlich müssten außerdem weitere Experimente folgen, um eine optimale Dosis zu finden. Inwiefern sich intranasales EPO letztendlich tatsächlich für die PET-Bildgebung eignet, bleibt fraglich, jedoch bietet die Verwendung von radioaktiv markiertem EPO den unbestreitbaren Vorteil, dass neben Untersuchungen zur therapeutischen Wirkung auch, wie in dieser Arbeit, pharmakokinetische Aspekte der Substanz überprüft werden können.

Die Pharmakokinetik von EPO nach intranasaler Gabe wurde als drittes Ziel dieser Arbeit durch zusätzliche *ex vivo* Biodistributionsversuche untersucht. Im Vergleich zur intravenösen Gabe zeigte sich in den untersuchten Gewebeproben eine deutlich geringere prozentuale Aufnahme, was die These unterstützt, dass die Substanz nach intranasaler Gabe in einem geringeren Umfang systemisch verfügbar ist. Hierdurch könnten unerwünschte systemische Nebenwirkungen vermieden werden, wie zum Beispiel die Stimulation der Blutbildung. Dieser Rückschluss liegt nahe, da bereits gezeigt werden konnte, dass nach nasaler EPO-Gabe im Gegensatz zur intraperitonealen Gabe keine Zunahme der Retikulozytenzahl erfolgt (Merelli et

al. 2011b). Aktuell existieren nur wenige Studien zur intranasalen Gabe von EPO und nach Kenntnis der Autorin beschäftigt sich derzeit keine davon mit der Biodistribution der Substanz abseits des ZNS nach nasaler Gabe. Die hier vorgestellten Daten bieten also neue Erkenntnisse, wobei der Aspekt, dass vor allem die Nieren 24 Stunden nach intranasaler Gabe des Tracers eine deutlich geringere Aktivität aufweisen als nach intravenöser Gabe, besonders interessant ist. Hier stellt sich nun die Frage, wie genau der Tracer nach intranasaler Gabe metabolisiert und ausgeschieden wird.

Auch weitere Beobachtungen decken sich mit bereits publizierten Daten. So zeigten zum Beispiel die PET-Bilder eine besonders hohe Aktivität im Bereich des Bulbus olfaktorius. Auch andere Forschungsgruppen konnten beobachten, dass diese Region und der Nervus trigeminus nach intranasaler EPO-Gabe die höchsten Konzentrationen der Substanz innerhalb des ZNS aufweisen (Alcalá-Barraza et al. 2010). Dies passt zu der Annahme, dass intranasal verabreichte Substanzen über die olfaktorische und trigeminale Route in das Gehirn aufgenommen werden (Übersichtsartikel von Hanson und Frey 2008).

Insgesamt passen die Ergebnisse dieser Arbeit gut zu bereits bekanntem Wissen und publizierten Daten. Es wurde dargelegt, dass in den ersten beiden Tagen nach dem Schlaganfall ein gewisser Trend zu einer Reduktion des zytotoxischen Ödems und einer rascheren Besserung der motorischen Funktion bei den Tieren mit hoher oder mittlerer EPO-Dosis zu erkennen ist, auch wenn die limitierenden Aspekte der Studie hier keine sichere Beurteilung zulassen. Neu an diesem Projekt waren die Verwendung von EPO als PET-Tracer und die damit verbundenen Biodistributionsversuche. Hier konnten neue Erkenntnisse über die Verteilung von EPO nach intranasaler Gabe gewonnen werden. Für ein besseres Verständnis der Metabolisierung von nasalem EPO wären in der Zukunft Versuche mit Ganzkörper *in vivo* PET-Scans, welche sowohl den zeitlichen Verlauf als auch die genaue Route zeigen, von Interesse. Solche Versuche könnten auch hilfreich bei der Verfeinerung der Methode zur

intranasalen Applikation von EPO sein. Ziel wäre es hier, das Vorgehen so zu verändern, dass individuelle Schwankungen bei der Aufnahme des Tracers über die Nasenschleimhaut in das Gehirn möglichst weit reduziert werden. Damit ließe sich dann hoffentlich abschließend beurteilen, ob sich der intranasale EPO-Tracer auch zur Bildgebung eignet oder nicht. Aufgrund der längeren Halbwertszeit und der vielversprechenden Ergebnisse in der Autoradiographie wäre für solche Experimente vermutlich der Zirkonium-Tracer zu favorisieren.

5 Zusammenfassung

Hauptziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob ^{64}Cu -EPO einen dosisabhängigen therapeutischen Effekt bei Ratten mit Schlaganfall vermitteln kann. Hierfür wurden longitudinal über drei Monate die Größen der Schlaganfallläsionen mittels multiparametrischer Bildgebung sowie funktionelle Aspekte untersucht.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass in den ersten beiden Tagen nach dem Schlaganfall ein gewisser Trend zu einer Reduktion des zytotoxischen Ödems und einer rascheren Besserung der motorischen Funktion bei den Tieren mit hoher oder mittlerer Dosis ^{64}Cu -EPO zu erkennen ist. Abschließend klären lässt sich die Frage nach dem therapeutischen Effekt jedoch nicht, da sich die Studie, unter anderem durch den geringen Stichprobenumfang und eine hohe Ausgangsvariabilität bezüglich des gewählten Tiermodells, als limitiert aussagekräftig zeigte. Des Weiteren wurde diskutiert, dass die gewählte Analyseverfahren eventuell nicht geeignet war, um zum Beispiel eine potentiell durch EPO induzierte Angiogenese am Rand der Läsion zu erfassen. Die Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen korrelierten zudem sowohl mit der Läsionsgröße als auch mit der Änderung des ADC, sodass davon ausgegangen werden kann, dass durch das gewählte Setup strukturelle Änderungen auch auf funktioneller Ebene gut erfasst wurden.

Neu an diesem Projekt waren die Verwendung von EPO als PET-Tracer und die damit verbundenen Biodistributionsversuche. Jedoch kann auch die Frage, ob sich der intranasal gegebene EPO-Tracer zur PET-Bildgebung beim ischämischen Schlaganfall eignet, nicht abschließend beantwortet werden, da der Tracer in der Autoradiographie zwar zum Teil eine deutliche Akkumulation im Bereich der ischämischen Läsion zeigte, der Uptake ins Gehirn insgesamt jedoch großen Schwankungen unterlag und die Darstellbarkeit der Läsion

mittels PET weniger gut gegeben war. Als vielversprechender erwies sich hier die Verwendung eines langlebigeren Isotops (^{89}Zr). Um die Problematik der individuellen Schwankungen beim Uptake des Tracer zu adressieren, wurden zudem multiple Möglichkeiten zur methodischen Verbesserung der intranasalen Injektion vorgestellt, welche insgesamt zu einem homogeneren Ergebnis beitragen könnten.

Als drittes Ziel dieser Arbeit bietet die Studie neue Erkenntnisse zur Biodistribution von EPO nach intranasaler Gabe, da gezeigt werden konnte, dass sich die Verteilung des Tracer nach intranasaler Gabe im Vergleich zu intravenöser Gabe signifikant unterscheidet und vor allem die Niere 24 Stunden nach intranasaler Gabe des Tracers eine deutlich geringere Aktivität in den untersuchten Organen aufwies. Die Frage, wie genau der Tracer nach intranasaler Gabe metabolisiert und ausgeschieden wird, wurde dabei durch die Versuche nicht adressiert und bleibt offen. Insgesamt decken sich jedoch die in den PET-Aufnahmen gemachten Beobachtungen zur Distribution des Tracers über olfaktorische und trigeminale Routen gut mit bereits publizierten Daten.

6 Literaturverzeichnis

- Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, McTaggart RA, Torbey MT, Kim-Tenser M, Leslie-Mazwi T, et al. (2018): Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med* 378, 708–718
- Alcalá-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH, McLoon LK (2010): Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J Drug Target* 18, 179–190
- Andersson JLR, Sundin A, Valind S (1995): A Method for Coregistration of PET and MR Brain Images. *Journal of Nuclear Medicine* 36, 1307–1315
- Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC (1996): An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficit. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 705–713
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981): Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725
- Back T, Hemmen T, Schüller OG (2004): Lesion evolution in cerebral ischemia. *Journal of Neurology* 251, 388–397
- Bai Q-K, Zhao Z-G, Lu L-J, Shen J, Zhang J-Y, Sui H-J, Xie X-H, Chen J, Yang J, Chen C-R (2019): Treating ischaemic stroke with intravenous tPA beyond 4.5 hours under the guidance of a MRI DWI/T2WI mismatch was safe and effective. *Stroke Vasc Neurol* 4, 8–13
- Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC (2004): Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *Eur J Pharmacol* 505, 93–101
- Bart van der Worp H, Dianne Raaijmakers TWM, Jaap Kappelle L (2008): Early complications of ischemic stroke. *Curr Treat Options Neurol* 10, 440–449
- Baskin A, Buchegger F, Seimbille Y, Ratib O, Garibotto V (2015): PET Molecular Imaging of Hypoxia in Ischemic Stroke: An Update. *Curr Vasc Pharmacol* 13, 209–217

- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, et al. (2019): Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 139, e56–e528
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999): A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 643–651
- Bhogal P, Andersson T, Maus V, Mpotsaris A, Yeo L (2018): Mechanical Thrombectomy-A Brief Review of a Revolutionary new Treatment for Thromboembolic Stroke. *Clin Neuroradiol* 28, 313–326
- Biesbroek JM, Niesten JM, Dankbaar JW, Biessels GJ, Velthuis BK, Reitsma JB, van der Schaaf IC (2013): Diagnostic accuracy of CT perfusion imaging for detecting acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc Dis* 35, 493–501
- Bijani C, Arnarez C, Brasselet S, Degert C, Broussaud O, Elezgaray J, Dufourc EJ (2012): Stability and structure of protein-lipoamino acid colloidal particles: toward nasal delivery of pharmaceutically active proteins. *Langmuir* 28, 5783–5794
- Brines M, Cerami A (2005): Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 6, 484–494
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000): Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10526–10531
- Cherry SR (2001): Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development. *J Clin Pharmacol* 41, 482–491
- Chung J-W, Kim JY, Park H-K, Kim BJ, Han M-K, Lee J, Choi K-H, Kim J-T, Jung C, Kim JH, et al. (2016): Impact of the Penumbra Pattern on Clinical Outcome in Patients with Successful Endovascular Revascularization. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26, 360–367
- Danielyan L, Schäfer R, von Ameln-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, Klopfer T, Burkhardt U, Proksch B, Verleysdonk S, Ayturan M, et al. (2009): Intranasal delivery of cells to the brain. *Eur J Cell Biol* 88, 315–324

- DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD (2001): Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev* 25, 325–342
- Digicaylioglu M (2010): Erythropoietin in stroke: quo vadis. *Expert Opin Biol Ther* 10, 937–949
- Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Wang Y, Zhang ZG, Lu M, Panda S, Li Q, Ewing JR, Chopp M (2010): Cerebral tissue repair and atrophy after embolic stroke in rat: a magnetic resonance imaging study of erythropoietin therapy. *J Neurosci Res* 88, 3206–3214
- EB (2006): Schlaganfall: Was die lebenslange Therapie kostet. *Dtsch Arztebl International* 103, A-1409
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck H-H, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, et al. (2002): Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8, 495–505
- Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, et al. (2009): Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 40, e647-656
- Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, Bliss TM, Steinberg GK, Shamloo M (2011): Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *J Neurosci Methods* 196, 247–257
- Feigin VL, Norrving B, Mensah GA (2017): Global Burden of Stroke. *Circ Res* 120, 439–448
- Fiebach JB, Schellinger PD (2003): Moderne Kernspintechiken beim Schlaganfall. *Radiologe* 43, 251–264
- Fiebach JB, Schellinger PD, Jansen O, Meyer M, Wilde P, Bender J, Schramm P, Jüttler E, Oehler J, Hartmann M, et al. (2002): CT and diffusion-weighted MR imaging in randomized order: diffusion-weighted imaging results in higher accuracy and lower interrater variability in the diagnosis of hyperacute ischemic stroke. *Stroke* 33, 2206–2210
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH, STAIR Group (2009): Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40, 2244–2250

- Fletcher L, Kohli S, Sprague SM, Scranton RA, Lipton SA, Parra A, Jimenez DF, Digicaylioglu M (2009): Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 111, 164–170
- Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C (2015): Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* 9, 3445–3454
- Frey WH, Liu J, Chen X, Thorne RG, Fawcett JR, Ala TA, Rahman Y-E (1997): Delivery of 125I-NGF to the Brain via the Olfactory Route. *Drug Delivery* 4, 87–92
- Fuge F, Doleschel D, Rix A, Gremse F, Wessner A, Winz O, Mottaghy F, Lederle W, Kiessling F (2015): In-vivo detection of the erythropoietin receptor in tumours using positron emission tomography. *Eur Radiol* 25, 472–479
- George PM, Steinberg GK (2015): Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron* 87, 297–309
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, et al. (2014): Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 129, e28–e292
- Gross H, Grose N (2017): Emergency Neurological Life Support: Acute Ischemic Stroke. *Neurocrit Care* 27, 102–115
- Guadagno JV, Warburton EA, Aigbirhio FI, Smielewski P, Fryer TD, Harding S, Price CJ, Gillard JH, Carpenter TA, Baron J-C (2004): Does the acute diffusion-weighted imaging lesion represent penumbra as well as core? A combined quantitative PET/MRI voxel-based study. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 1249–1254
- Hankey GJ (2017): Stroke. *Lancet* 389, 641–654
- Hanson LR, Frey WH (2008): Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci* 9, S5
- Heiss W-D (2014): Radionuclide imaging in ischemic stroke. *J Nucl Med* 55, 1831–1841

- Heiss W-D, Zarow Weber O (2017): Validation of MRI Determination of the Penumbra by PET Measurements in Ischemic Stroke. *J Nucl Med* 58, 187–193
- Heiss WD, Graf R, Fujita T, Ohta K, Bauer B, Löttgen J, Wienhard K (1997): Early detection of irreversibly damaged ischemic tissue by flumazenil positron emission tomography in cats. *Stroke* 28, 2045–2051; discussion 2051-2052
- Heiss WD, Grond M, Thiel A, Ghaemi M, Sobesky J, Rudolf J, Bauer B, Wienhard K (1998): Permanent cortical damage detected by flumazenil positron emission tomography in acute stroke. *Stroke* 29, 454–461
- Hennerici MG, Kern R, et al. (2017): S1-Leitlinie Diagnostik akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Hrsg Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 17.04.2019)
- Heuschmann P, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas P, Berger K (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Aktuelle Neurologie* 37, 333–340
- Howells DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, Traystman RJ, Macleod MR (2010): Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1412–1431
- Illum L (2004): Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol* 56, 3–17
- Ismailov RM (2012): The role of erythropoietin in the „stroke belt“ phenomenon. *Med Hypotheses* 79, 181–185
- Isozaki M, Kiyono Y, Arai Y, Kudo T, Mori T, Maruyama R, Kikuta K, Okazawa H (2011): Feasibility of ⁶²Cu-ATSM PET for evaluation of brain ischaemia and misery perfusion in patients with cerebrovascular disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38, 1075–1082
- Jerndal M, Forsberg K, Sena ES, Macleod MR, O'Collins VE, Linden T, Nilsson M, Howells DW (2010): A systematic review and meta-analysis of erythropoietin in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 961–968

- Jia L, Chopp M, Zhang L, Lu M, Zhang Z (2010): Erythropoietin in combination of tissue plasminogen activator exacerbates brain hemorrhage when treatment is initiated 6 hours after stroke. *Stroke* 41, 2071–2076
- Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, San Román L, Serena J, Abilleira S, Ribó M, et al. (2015): Thrombectomy within 8 Hours after Symptom Onset in Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine* 372, 2296–2306
- Khaing ZZ, Geissler SA, Schallert T, Schmidt CE (2013): Assessing Forelimb Function after Unilateral Cervical SCI using Novel Tasks: Limb Step-alternation, Postural Instability and Pasta Handling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 79, e50955
- Kilburg C, Scott McNally J, de Havenon A, Taussky P, Kalani MYS, Park MS (2017): Advanced imaging in acute ischemic stroke. *Neurosurg Focus* 42, E10
- Klatzo I (1967): Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26, 1–14
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986): Experimental studies of ischemic brain edema. *Jpn J Stroke* 8, 1–8
- Kumral A, Genc S, Kutluk K, Ozkan H (2010): Safety concerns with the clinical use of erythropoietin in acute ischemic stroke. *Stroke* 41, e469
- Lansberg MG, Thijs VN, O'Brien MW, Ali JO, Crespigny AJ de, Tong DC, Moseley ME, Albers GW (2001): Evolution of Apparent Diffusion Coefficient, Diffusion-weighted, and T2-weighted Signal Intensity of Acute Stroke. *American Journal of Neuroradiology* 22, 637–644
- Li L, Jiang Q, Ding G, Zhang L, Zhang ZG, Li Q, Panda S, Kapke A, Lu M, Ewing JR, Chopp M (2009): MRI identification of white matter reorganization enhanced by erythropoietin treatment in a rat model of focal ischemia. *Stroke* 40, 936–941
- Liu F, McCullough LD (2011): Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–9
- Lochhead JJ, Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG (2015): Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in

- the brain after intranasal administration. *J Cereb Blood Flow Metab* 35, 371–381
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989): Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84–91
- Lourbopoulos A, Mamrak U, Roth S, Balbi M, Shrouder J, Liesz A, Hellal F, Plesnila N (2017): Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 2084–2097
- Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, Churilov L, Levi CR, Hsu C, Kleinig TJ, Wijeratne T, Curtze S, Dewey HM, et al. (2019): Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *New England Journal of Medicine* 380, 1795–1803
- Mandeville ET, Ayata C, Zheng Y, Mandeville JB (2017): Translational MR Neuroimaging of Stroke and Recovery. *Transl Stroke Res* 8, 22–32
- Markus HS (2004): Cerebral perfusion and stroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75, 353–361
- Markus R, Reutens DC, Kazui S, Read, Wright P, Chambers BR, Sachinidis JI, Tochon-Danguy HJ, Donnan GA (2003): Topography and Temporal Evolution of Hypoxic Viable Tissue Identified by ¹⁸F-Fluoromisonidazole Positron Emission Tomography in Humans After Ischemic Stroke. *Stroke* 34, 2646–2652
- Marti HH (2004): Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 207, 3233–3242
- Merelli A, Caltana L, Lazarowski A, Brusco A (2011a): Experimental evidence of the potential use of erythropoietin by intranasal administration as a neuroprotective agent in cerebral hypoxia. *Drug Metabol Drug Interact* 26, 65–69
- Merelli A, Caltana L, Girimonti P, Ramos AJ, Lazarowski A, Brusco A (2011b): Recovery of motor spontaneous activity after intranasal delivery of human recombinant erythropoietin in a focal brain hypoxia model induced by CoCl₂ in rats. *Neurotox Res* 20, 182–192
- Merelli A, Czornyj L, Lazarowski A (2013): Erythropoietin: a neuroprotective agent in cerebral hypoxia, neurodegeneration, and epilepsy. *Curr Pharm Des* 19, 6791–6801
-

- Merelli A, Czornyj L, Lazarowski A (2015): Erythropoietin as a new therapeutic opportunity in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci* 125, 793–797
- Momosaki S, Ito M, Yamato H, Iimori H, Sumiyoshi H, Morimoto K, Imamoto N, Watabe T, Shimosegawa E, Hatazawa J, Abe K (2017): Longitudinal imaging of the availability of dopamine transporter and D2 receptor in rat striatum following mild ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 605–613
- Morotti A, Poli L, Costa P (2019): Acute Stroke. *Semin Neurol* 39, 61–72
- Moustafa RR, Baron J-C (2008): Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br J Pharmacol* 153, S44–S54
- Muir KW, Buchan A, von Kummer R, Rother J, Baron J-C (2006): Imaging of acute stroke. *Lancet Neurol* 5, 755–768
- Müller K: HeimtierSkills: Praxisleitfaden zu Diagnose und Therapie bei kleinen Heimtieren. (MemoVet); Schattauer, Stuttgart 2017
- Nabavi DG, Ringelstein EB: Der ischämische Schlaganfall: Eine praxisorientierte Darstellung von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Kohlhammer Verlag, Stuttgart 2007
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, Yavagal DR, Ribo M, Cognard C, Hanel RA, et al. (2018): Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med* 378, 11–21
- Ntaios G, Savopoulos C, Chatzinikolaou A, Hatzitolios AI (2008): The neuroprotective role of erythropoietin in the management of acute ischaemic stroke: from bench to bedside. *Acta Neurol Scand* 118, 362–366
- Perk LR, Vosjan V Maria JW, Visser V Gerard W, Budde B, Jurek P, Kiefer GE, van Dogen GAMS (2010): 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* 37, 250–259
- Piliszek A, Witkowski G, Sklinda K, Szary C, Ryglewicz D, Dorobek M, Walecki J (2016): Comprehensive imaging of stroke - Looking for the gold standard. *Neurol Neurochir Pol* 50, 241–250

- Powers WJ, Derdeyn CP, Biller J, Coffey CS, Hoh BL, Jauch EC, Johnston KC, Johnston SC, Khalessi AA, Kidwell CS, et al. (2015): 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 46, 3020–3035
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B, et al. (2018): 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 49, e46–e110
- Qureshi AI, Kirmani JF, Sayed MA, Safdar A, Ahmed S, Ferguson R, Hershey LA, Qazi KJ, Buffalo Metropolitan Area and Erie County Stroke Study Group (2005): Time to hospital arrival, use of thrombolytics, and in-hospital outcomes in ischemic stroke. *Neurology* 64, 2115–2120
- Read SJ, Hirano T, Abbott DF, Sachinidis JI, Tochon-Danguy HJ, Chan JG, Egan GF, Scott AM, Bladin CF, McKay WJ, Donnan GA (1998): Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and 18F-fluoromisonidazole. *Neurology* 51, 1617–1621
- Read SJ, Hirano T, Abbott DF, Markus R, Sachinidis JI, Tochon-Danguy HJ, Chan JG, Egan GF, Scott AM, Bladin CF, et al. (2000): The fate of hypoxic tissue on 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography after ischemic stroke. *Ann Neurol* 48, 228–235
- Rewell SSJ, Churilov L, Sidon TK, Aleksoska E, Cox SF, Macleod MR, Howells DW (2017): Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat: Selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-centre preclinical trials. *PLoS One* 12, e0171688
- Ringleb P, Bendszus M, Bluhmki E, Donnan G, Eschenfelder C, Fatar M, Kessler C, Molina C, Leys D, Muddegowda G, et al. (2019): Extending the time window for intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke using magnetic resonance imaging-based patient selection. *Int J Stroke* 14, 483–490
- Ringleb PA, Hamann GF, Röther J, Jansen O, Groden C, Veltkamp R (2015): Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Ergänzung 2015:

- Rekanalisierende Therapie. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Hrsg Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 5, 1–26
- Saur D, Kucinski T, Grzyska U, Eckert B, Eggers C, Niesen W, Schoder V, Zeumer H, Weiller C, Röther J (2003): Sensitivity and interrater agreement of CT and diffusion-weighted MR imaging in hyperacute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 24, 878–885
- Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, Vaughn D, Wilcox RE (1982): Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav* 16, 455–462
- Shinichiro H, Takatsuka Y, Tai M, Hiroyuki M (1981): Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *International Journal of Pharmaceutics* 7, 317–325
- Simpkins AN, Dias C, Norato G, Kim E, Leigh R (2017): Early Change in Stroke Size Performs Best in Predicting Response to Therapy. *Cerebrovasc Dis* 44, 141–149
- Sirén AL, Ehrenreich H (2001): Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251, 179–184
- Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H (2001): Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 101, 271–276
- Sobesky J, Zaro Weber O, Lehnhardt F-G, Hesselmann V, Neveling M, Jacobs A, Heiss W-D (2005): Does the mismatch match the penumbra? Magnetic resonance imaging and positron emission tomography in early ischemic stroke. *Stroke* 36, 980–985
- Souvenir R, Doycheva D, Zhang JH, Tang J (2015): Erythropoietin in stroke therapy: friend or foe. *Curr Med Chem* 22, 1205–1213
- Subirós N, Del Barco DG, Coro-Antich RM (2012): Erythropoietin: still on the neuroprotection road. *Ther Adv Neurol Disord* 5, 161–173
- Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG, Fisher M (1997): Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci* 153, 8–11

- Thomalla G, Audebert H, Berger K, Fiebach J, Fiehler J, Kaps M, Neumann-Haefelin T, Schellinger P, Siebler M, Sobesky J, et al. (2009): Bildgebung beim Schlaganfall – eine Übersicht und Empfehlungen des Kompetenznetzes Schlaganfall. *Aktuelle Neurologie* 36, 354–367
- Thorne RG, Frey WH (2001): Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 40, 907–946
- Thorne RG, Emory CR, Ala TA, Frey WH (1995): Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res* 692, 278–282
- Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH (2004): Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127, 481–496
- Tong D, Reeves MJ, Hernandez AF, Zhao X, Olson DM, Fonarow GC, Schwamm LH, Smith EE (2012): Times from symptom onset to hospital arrival in the Get with the Guidelines--Stroke Program 2002 to 2009: temporal trends and implications. *Stroke* 43, 1912–1917
- Tóth M, Little P, Arnberg F, Häggkvist J, Mulder J, Halldin C, Gulyás B, Holmin S (2016): Acute neuroinflammation in a clinically relevant focal cortical ischemic stroke model in rat: longitudinal positron emission tomography and immunofluorescent tracking. *Brain Struct Funct* 221, 1279–1290
- Tsai T-H, Lu C-H, Wallace CG, Chang W-N, Chen S-F, Huang C-R, Tsai N-W, Lan M-Y, Sung P-H, Liu C-F, Yip H-K (2015): Erythropoietin improves long-term neurological outcome in acute ischemic stroke patients: a randomized, prospective, placebo-controlled clinical trial. *Crit Care* 19, 49
- Tufekci KU, Genc K (2010): Neurovascular protection by erythropoietin: from the bedside back to the bench. *Stroke* 41, e462
- Valk PE, Delbeke D, Bailey DL, Townsend DW, Maisey MN: *Positron Emission Tomography: Clinical Practice*. Springer Science & Business Media, Berlin 2006
- Vyas TK, Shahiwala A, Marathe S, Misra A (2005): Intranasal drug delivery for brain targeting. *Curr Drug Deliv* 2, 165–175

- Wegener S, Artmann J, Luft AR, Buxton RB, Weller M, Wong EC (2013): The Time of Maximum Post-Ischemic Hyperperfusion Indicates Infarct Growth Following Transient Experimental Ischemia. *PLoS One* **8**, e65322
- Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B, Fröhlich JM (Hrsg.): *Wie funktioniert MRI? eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung ; mit 9 Tabellen. 7., überarb. und erg. Aufl;* Springer, Berlin 2014
- Wiessner C, Allegrini PR, EkatoDRAMIS D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M (2001): Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 857–864
- Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y (1996): Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* **239**, 494–500
- Yip H-K, Tsai T-H, Lin H-S, Chen S-F, Sun C-K, Leu S, Yuen C-M, Tan T-Y, Lan M-Y, Liou C-W, et al. (2011): Effect of erythropoietin on level of circulating endothelial progenitor cells and outcome in patients after acute ischemic stroke. *Crit Care* **15**, R40
- Young JY, Schaefer PW (2016): Acute ischemic stroke imaging: a practical approach for diagnosis and triage. *Int J Cardiovasc Imaging* **32**, 19–33
- Yu Y-P, Xu Q-Q, Zhang Q, Zhang W-P, Zhang L-H, Wei E-Q (2005): Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* **387**, 5–10
- Yuen C-M, Sun C-K, Leu S, Yip H-K (2011): Effect of erythropoietin therapy on clinical outcome in patients after acute ischemic stroke: a debatable issue. *Crit Care* **15**, 425
- Zaidi H, Hasegawa B (2003): Determination of the attenuation map in emission tomography. *J Nucl Med* **44**, 291–315
- Zechariah A, ElAli A, Hermann DM (2010): Combination of tissue-plasminogen activator with erythropoietin induces blood-brain barrier permeability, extracellular matrix disaggregation, and DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **41**, 1008–1012
- 3Rs-Centre
Utrecht
Life
Sciences.
<https://www.humane-endpoints.info/de/ratte/physiologische-parameter>
[Zugriff am 21.11.2018]

- Müller T.
<https://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/herzKreislauf/schlaganfall/article/935403/wir-analysieren-jede-thrombektomie.html> [Zugriff am 22.04.2019]
- Robert Koch Institut.
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesundAZ/Content/S/Schlaganfall/Inhalt/schlaganfall_inhalt.html [Zugriff am 17.04.2019]
- Stiftung Deutsche Schlaganfall Hilfe.
<https://www.schlaganfall-hilfe.de//de/verstehen-vermeiden/schlaganfall-erkennen/fast-test/> [Zugriff am 20.04.2019]
- World Health Organization.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Zugriff am 25.04.2019]
- World Heart Federation. <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/stroke/> [Zugriff am 10.01.2017]

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung für präklinische Bildgebung und Radiopharmazie unter Betreuung von Prof. Dr. Bernd Pichler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Salvador Castaneda Vega.

Sämtliche Versuche wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben nach Einarbeitung durch Dr. Salvador Castaneda und Kristin Patzwaldt von mir eigenständig geplant und vorbereitet und mit zeitweiser Unterstützung durch Kristin Patzwaldt und Dr. Salvador Castaneda Vega durchgeführt. Einzige Ausnahmen bildet die Hämatoxylin&Eosin-Färbung der histologischen Schnitte, welche durch das histologische Labor der Hautklinik in Tübingen durchgeführt wurde, sowie die verwendeten PET-Tracer, welche von den Laborkollegen der Radiopharmazie produziert und zur Verfügung gestellt wurden.

Alle erhobenen Daten wurden von mir nach Einarbeitung durch Kristin Patzwaldt und Dr. Salvador Castaneda Vega selbständig bearbeitet und analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch mich. Um die Daten meiner Biodistributionsversuche vergleichen und statistisch auswerten zu können, hat mir Frau Patzwaldt freundlicherweise Daten aus von ihr durchgeführten Versuchsreihen zur intravenösen Applikation des EPO-Tracers zu Verfügung gestellt. Die Herkunft dieser Daten wird im betreffenden Abschnitt des Ergebnisteils explizit erwähnt.

Da ich selbst an der Produktion der PET-Tracer nicht beteiligt war, stammt die entsprechende Beschreibung im Methoden-Teil in Gänze von Dr. Andreas Maurer (Kapitel 2.2.2, Übernahme in paraphrasierter Form). Davon abgesehen versichere ich das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Braunschweig, den

8 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Pichler für die Unterstützung danken sowie dafür, dass ich meine Dissertation im Werner Siemens Imaging Center mit seinen ausgezeichneten Möglichkeiten und der vielfältigen Expertise anfertigen durfte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Salvador Castaneda für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen Ratschläge und sein immer offenes Ohr für alle Probleme und Stolpersteine.

Ein ganz großes Dankeschön gebührt meiner Mitdotorandin Kristin Patzwaldt für die geduldige Einarbeitung und ihre Zeit und Hilfe bei der Durchführung der Versuche. Neben Kristin haben noch viele liebe und hilfsbereite Menschen am Werner Siemens Imaging Center zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und ich möchte bei allen für die tolle Zeit, den Zusammenhalt und die moralische sowie fachliche Unterstützung bedanken.

Natürlich gilt mein Dank auch dem IZKF Promotionskolleg für die Förderung, die mir dieses Projekt erst ermöglicht hat.

Von ganzem Herzen danke ich auch zuletzt auch meiner Familie und meinem Mann für die unendliche Geduld und liebevolle Unterstützung.