

**Mikrogliaaktivierung und Neurogenese bei zentraler vestibulärer
Kompensation: μ PET-Analysen, Immunhistologie, Verhaltenstests und
Therapie nach unilateraler Labyrinthektomie**

von Anja Krämer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Mikrogliaaktivierung und Neurogenese bei zentraler vestibulärer
Kompensation: μ PET-Analysen, Immunhistologie, Verhaltenstests und
Therapie nach unilateraler Labyrinthektomie**

von Anja Krämer

aus Göttingen

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik und am Deutschen
Schwindel- und Gleichgewichtszentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mentor: PD Dr. med. Andreas Zwergal

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Korreferent/en: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Meiner Oma Ilse

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Das vestibuläre System	3
1.1.	Anatomie	3
1.2.	Physiologie	3
1.3.	Mechanoelektrische Transduktion und Transformation	4
1.4.	Neuronale Bahnen des Vestibularorgans	4
2.	Schwindel	6
2.1.	Benigner peripherer paroxysmaler Lagerungsschwindel (BPPV)	8
2.2.	Vestibuläre Migräne	9
2.3.	Morbus Menière	9
2.4.	Akute unilaterale Vestibulopathie (AUV, Neuritis vestibularis)	10
2.5.	Bilaterale Vestibulopathie (BV)	11
2.6.	Zentrale vestibuläre Schwindelsyndrome	12
3.	Schwindelsyndrome in der Tiermedizin	13
3.1.	Unilaterales peripheres Vestibularsyndrom	13
3.1.1.	Otitis interna	14
3.1.2.	Idiopathisches Vestibularsyndrom	15
3.1.3.	Ototoxizität	15
3.2.	Zentrales Vestibularsyndrom	16
3.3.	Paradoxes Vestibularsyndrom	16
4.	Vestibuläre Kompensation	17
4.1.	Definition und Verlauf	17
4.2.	Kompensationsfördernde Therapieansätze	18
5.	Plastizitätsmechanismen	19
5.1.	Plastizität bei vestibulärer Kompensation	19
5.2.	Neurogenese	20
5.2.1.	Neurogenese bei vestibulärer Kompensation	21
5.2.1.1.	Hippocampale Atrophie und räumliche Orientierung	22
5.3.	Mikrogliaaktivierung	23
5.3.1.	Translocator Protein 18kDa (TSPO)	24

5.3.2.	Mikrogliaaktivierung bei vestibulärer Kompensation.....	26
6.	Etifoxin	27
6.1.	Wirkungsprinzip.....	27
6.2.	Therapeutische Möglichkeiten	28
7.	Positronen-Emissions-Tomographie.....	29
7.1.	Physikalische Grundlagen	29
7.1.1.	Radioaktivität	29
7.1.2.	Halbwertszeit.....	30
7.1.3.	β^+ -Zerfall	31
7.2.	Medizinische Anwendung.....	32
7.2.1.	Funktion und Aufbau des PET	33
7.2.2.	[^{18}F]GE180 (Flutriciclamid).....	34
7.2.3.	[^{18}F]FLT (Desoxyfluorothymidin)	35
8.	Arbeitshypothesen.....	36
8.1.	Plastizitätsmechanismen.....	36
8.1.1.	Neurogenese	36
8.1.2.	Räumliches Gedächtnis	36
8.1.3.	Mikrogliaaktivierung.....	37
8.2.	Therapiestudie Etifoxin	37
III.	MATERIAL UND METHODEN	39
1.	Material	39
1.1.	Chemikalien	39
1.2.	Lösungen	41
1.3.	Geräte	42
1.4.	Software	43
2.	Tiermodell.....	43
2.1.	Haltung der Versuchstiere.....	44
2.2.	Narkose und Analgesie.....	45
2.3.	Chemische unilaterale Labyrinthektomie.....	45
2.4.	Transkardiale Perfusionsfixierung	46
2.5.	Euthanasie	47
3.	Verhaltensanalysen	47
3.1.	Klinisches Scoring.....	47

3.1.1.	Nystagmus	48
3.1.2.	Kopfschiefhaltung	48
3.1.3.	Posturale Asymmetrie	48
3.1.4.	Elevation Tail Rotation Test	49
3.2.	Open Field	50
3.3.	T-Maze	51
3.3.1.	Training	51
3.3.2.	Versuchsablauf	52
3.3.3.	Abbruchkriterien	53
3.3.4.	Auswertung	53
4.	Positronen-Emissions-Tomographie.....	54
4.1.	[¹⁸ F]GE180	55
4.2.	[¹⁸ F]FLT	55
4.3.	Datenverarbeitung	56
4.3.1.	Rekonstruktion	56
4.3.2.	Koregistrierung.....	58
4.3.3.	Normierung	59
4.3.4.	SPM-und VOI-Analysen	59
5.	Immunhistologie	60
5.1.	BrdU-Injektion	60
5.2.	Kryostatschnitte.....	60
5.3.	Immunhistologische Färbung.....	61
5.4.	Quantitative Auswertung.....	62
6.	Statistische Analysen.....	63
6.1.	SPSS	63
6.2.	SPM.....	63
7.	Versuchsdesign	64
7.1.	Plastizitätsmechanismen.....	64
7.2.	Therapiestudie Etifoxin	65
IV.	ERGEBNISSE	67
1.	Plastizitätsmechanismen.....	68
1.1.	Mikrogliaaktivierung: [¹⁸ F]GE180-μPET	68
1.1.1.	VOI-Analyse	68

1.1.2.	SPM-Analyse	70
1.2.	Neurogenese: [¹⁸ F]FLT-μPET	71
1.2.1.	VOI-Analyse	71
1.2.2.	SPM-Analyse	73
1.3.	Neurogenese: Immunhistologie.....	74
1.3.1.	Vestibuläre Kerne.....	75
1.3.2.	Hippocampus.....	77
1.4.	Räumliche Orientierung: T-Maze	79
1.4.1.	Performance	79
1.4.2.	Abbruchquote	80
1.4.3.	Richtungspräferenz.....	81
1.4.4.	Dauer pro Trial	82
1.4.5.	Geschwindigkeit.....	83
1.4.6.	Zurückgelegte Distanz.....	84
1.4.7.	Immobilitätsphasen	84
1.5.	Korrelationsanalysen	85
1.5.1.	Verhalten und Mikrogliaaktivierung	86
1.5.2.	Verhalten und Neurogenese	86
1.5.3.	Posturale Asymmetrie und T-Maze.....	87
2.	Therapiestudie Etifoxin	88
2.1.	Klinisches Scoring.....	88
2.1.1.	Nystagmus	88
2.1.2.	Kopfschiefhaltung	89
2.1.3.	Posturale Asymmetrie	89
2.1.4.	Elevation Tail Rotation Test	90
2.2.	Open Field	90
2.2.1.	Lokomotionsgeschwindigkeit	90
2.2.2.	Aufenthaltsdauer im Zentrum und am Rand	91
2.2.3.	Heatmaps	92
2.2.4.	Bewegungsphasen	93
2.3.	Mikrogliaaktivierung: [¹⁸ F]GE180-μPET	94
2.3.1.	VOI-Analyse	94
2.3.2.	SPM-Analyse	96
2.4.	Korrelationsanalysen	99

2.4.1.	Verhalten und Mikrogliaaktivierung	99
2.4.2.	Posturale Asymmetrie und Open Field	100
V.	DISKUSSION	101
1.	Mikrogliaaktivierung bei zentraler vestibulärer Kompensation.....	101
1.1.	Mögliche Wirkungsmechanismen der Mikrogliaaktivierung bei der zentralen vestibulären Kompensation	102
1.2.	Wirkung des TSPO-Agonisten Etifoxin bei unilateraler Vestibulopathie	104
1.2.1.	Verhaltensanalysen.....	104
1.2.2.	Mikrogliaaktivierung.....	107
1.2.3.	Ausblick für die therapeutischen Implikationen von Etifoxin	109
2.	Neurogenese bei zentraler vestibulärer Kompensation.....	110
2.1.	Neurogenese im ipsiläsionalen vestibulären Kern nach UL	110
2.2.	Veränderung der Neurogeneserate im Hippocampus.....	112
3.	Räumliche Orientierung nach unilateraler Labyrinthektomie	113
4.	Nachweis proliferierender Zellen mittels [¹⁸F]FLT-μPET und Immunhistologie	116
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	119
VII.	SUMMARY.....	123
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	127
IX.	DANKSAGUNG	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ Fluor]Fluordesoxyglucose
[¹⁸ F]FLT	[¹⁸ Fluor]Desoxyfluorothymidin
[¹⁸ F]GE180	[¹⁸ Fluor]Flutriciclamid
3D	dreidimensional
ABCC	ATP-binding cassette-Transporter
AICA	Arteria cerebelli inferior anterior
Aq. ad inj.	Aqua ad injectabilia
Aq. bidest.	Aqua bidestillata
Aq. dest.	Aqua destillata
AUV	akute unilaterale Vestibulopathie
AVS	akutes vestibuläres Syndrom
β ⁺	Positron
β ⁻	Elektron
BPPV	Benigner peripherer paroxysmaler Lagerungsschwindel
Bq	Bequerel
BrdU	Bromdesoxyuridin
bspw.	beispielsweise
BV	Bilaterale Vestibulopathie
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CA	Cornu ammonis
ca.	circa
cc	Kubikzentimeter
Ci	Curie
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CT	Computer-Tomographie

D	Dalton
d	Tag
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
engl.	englisch
et al.	et alii
eV	Elektronenvolt
F	Fluor
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A R	GABA Typ A-Rezeptor
h	Stunde
HSV-1	Herpes simplex-Virus Typ 1
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
IVC	individually ventilated cages
K ⁺	Kalium
k	Kilo
L	links
l	Liter
LAT	latency-associated transcript
LOR	Line of response
M	Mega
μ	mikro
m	Milli
min	Minuten
mm	Millimeter
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

N	Stickstoff
N.	Nervus
n	Neutron
NaCl	Natriumchlorid
O	Sauerstoff
OAT 3	organischer Anionentransporter 3
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
p ⁺	Proton
PBR	peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PICA	Arteria cerebelli inferior posterior
R	rechts
Ra	Radon
RH	relative Luftfeuchtigkeit
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S-Phase	Synthesephase
SI	internationales Einheitensystem
SGZ	Subgranuläre Zone
SVZ	Subventrikuläre Zone
t _{1/2}	Halbwertszeit
TK	Tyrosinkinase
TSPO	Translocator Protein 18kDa
UL	Unilaterale Labyrinthektomie
UVN	Unilaterale vestibuläre Neurektomie
v	Neutrino

Abkürzungsverzeichnis

VN	vestibulärer Nucleus
VOI	volumes of interest
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Die physiologische vestibuläre Funktion beruht auf einem bilateral ausgeglichenen und symmetrischen Verhältnis der afferenten Informationen, die von den beiden Vestibularorganen im Innenohr zu den vestibulären Kernen im Hirnstamm gelangen. Unilaterale periphere vestibuläre Läsionen führen zu einer Dysbalance zwischen den beiden Kerngebieten und damit zu Drehschwindel, Defiziten des vestibulo-okulären Reflexes, Nystagmus, Gang- und Standunsicherheiten, sowie Einschränkungen der räumlichen Orientierung. Die Symptome verbessern sich innerhalb einiger Tage bis Wochen aufgrund der zentralen vestibulären Kompensation, die unter anderem auf adaptiven plastischen Veränderungen in verschiedenen Regionen des Gehirnes beruht. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit den molekularen und zellulären Mechanismen, die an der Gehirnplastizität während der vestibulären Kompensation beteiligt sind (DUTIA, 2010).

In den vestibulären Kernen konnten nach peripherer vestibulärer Schädigung bspw. eine Aktivierung von Mikroglia (CAMPOS TORRES et al., 1999; ZWERGAL et al., 2017) und eine reaktive Neurogenese (TIGHILET et al., 2007) nachgewiesen werden. Mikrogliazellen werden durch Schädigungen des peripheren oder zentralen Nervensystems aktiviert und beteiligen sich an der Gehirnplastizität, indem sie unter anderem die Neurotransmission oder synaptische Funktionen modulieren (BENARROCH, 2013). Aufgrund ihrer vielseitigen Wirkung ist ihre funktionelle Rolle während der vestibulären Kompensation noch weitestgehend unklar.

Die Entdeckung neugeborener Neuronen im erwachsenen Gehirn von Säugetieren wurde lange Zeit skeptisch betrachtet, da man davon ausging, dass Nervenzellen nicht fähig sind, sich zu regenerieren. Mittlerweile stellt die neuronale Zellproliferation einen anerkannten Plastizitätsmechanismus dar, dessen funktionelle Bedeutung jedoch noch erforscht werden muss (KUHN et al., 2018). Spätestens seit der Entdeckung hippocampaler Neurogenese beim Menschen (ERIKSSON et al., 1998), bietet die Arbeit mit neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen neue Hoffnung für die Heilung diverser neurodegenerativer und neuroinflammatorischer Erkrankungen (KEMPERMANN et al., 1998). Während der vestibulären Kompensation differenzieren sich die neugeborenen Zellen im

ipsiläsionalen vestibulären Kern zu GABAergen Neuronen, die vermutlich eine entscheidende Rolle für die symptomatische Erholung spielen (DUTHEIL et al., 2009).

Ein tieferes Verständnis der vestibulären Kompensation auf zellulärer Ebene könnte zu neuen Strategien und Angriffspunkten bezüglich der Therapie von Schwindelerkrankungen führen. Ziel dieser Studie war daher die Untersuchung der Mikrogliaaktivierung und Neurogenese auf ihre Beteiligung an der strukturellen Gehirnplastizität und der funktionellen Kompensation nach einseitiger peripherer vestibulärer Läsion. Die Versuche wurden an unilateral labyrinthektomierten Ratten durchgeführt, einem etablierten Tiermodell, wodurch die typischen Schwindelsymptome (Nystagmus, Kopfschiefhaltung, posturale Asymmetrie) ausgelöst werden. Die pharmakologische Modulation der Mikrogliaaktivierung mit dem TSPO (Translocator Protein 18kDa)-Liganden Etifoxin diente als Therapieversuch, um die vestibuläre Kompensation zu fördern. Für die visuelle Darstellung der plastischen zerebralen Umgestaltungen wurden in vivo μ PET-Scans durchgeführt. Um die Ergebnisse des neuen Radiotracers [18 F]FLT als Marker für die Zellproliferation zu validieren, wurde die Neurogenese zusätzlich in vitro mittels BrdU-Immunhistologie untersucht. Zur Analyse der funktionellen Relevanz fanden Verhaltensuntersuchungen bezüglich der posturalen und lokomotorischen Verhaltensparameter und der räumlichen Orientierung statt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das vestibuläre System

1.1. Anatomie

Im Felsenbein (Pars petrosa ossis temporalis) befindet sich das Innenohr, das aus dem knöchernen und dem häutigen Labyrinth besteht. Im häutigen Labyrinth ist das Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan) lokalisiert. Es ist mit Endolymphe gefüllt, einer Flüssigkeit, die viel Kalium und wenig Natrium enthält. Die Endolymphe wird von einer natriumreichen und kaliumarmen Perilymphe umgeben (LENARZ & BOENNINGHAUS, 2012).

Das Vestibularorgan setzt sich aus dem lateralen (horizontalen), hinteren (vertikalen) und oberen (anterioren) Bogengang, sowie den beiden Maculaorganen Utriculus und Sacculus zusammen. Die Sensororgane des Vestibularapparates sind mit einem Sinnesepithel ausgekleidet, dessen Sinneshärchen (Stereozilien) in eine gallertige Mukopolysaccharidmasse hineinragen. Diese Gallertschicht wird in den drei Bogengängen als Cupula bezeichnet. In den Maculae befinden sich zusätzlich kleine Kalziumcarbonatkristalle, daher wird die Gallertmasse dort Otolithenmembran genannt. Neben den zahlreich vorhandenen Stereozilien besitzt jede Haarzelle außerdem ein einzelnes, deutlich längeres Kinozilium (ZENNER, 2006).

1.2. Physiologie

Die beiden Maculaorgane dienen der Wahrnehmung von Translationsbeschleunigungen. Die Otolithenmembran besitzt aufgrund der Kalziumkarbonatkristalle ein höheres spezifisches Gewicht als die umgebende Endolymphe. Folglich wird bei linearer Beschleunigung des Körpers die Otolithenmembran abgebremst (Trägheitsprinzip). Auf die Stereozilien wirkt eine Scherkraft, was zu einer Reizung der Haarzellen führt (SCHMIDT et al., 2011).

Dreh- oder Winkelbeschleunigungen werden über die Bogengänge wahrgenommen. Da die Cupula mit der knöchernen Wand der Bogengänge verwachsen ist, bewegt sie sich bei einer Drehung des Kopfes analog in dieselbe Richtung. Die Endolymphe bleibt hingegen zurück und bewirkt eine Auslenkung der Cupula. Diese Bewegung führt zu einer Scherkraft und somit zu einer Reizung auf die Sinneszellen. Die Bogengänge sind dreidimensional angeordnet, sodass alle Richtungen im Raum detektiert werden können.

Je nachdem, in welche Richtung und in welchem Bogengang die Haarzellen bewegt werden, kommt es entweder zu einer Aktivitätssteigerung oder -verringernung der zugehörigen afferenten Nervenfasern (ZENNER, 2006).

1.3. Mechanoelektrische Transduktion und Transformation

Unter mechanoelektrischer Transduktion versteht man die Umwandlung des mechanischen Reizes auf die Stereozilien in ein elektrisches Signal. Ursache ist eine Änderung des Membranpotentials der Haarzellen aufgrund einer Bewegung der Sinneshärchen. Die Stereozilien besitzen am apikalen Ende Ionenkanäle, die in den Endolymphraum hineinragen. Die Kanäle sind teilweise geöffnet, sodass die in der Endolymph vorhandenene Kaliumionen (K^+ -Ionen) in die Zelle einströmen können. Weitere K^+ -Kanäle in der lateralen Zellmembran ermöglichen einen Austritt von Kalium aus der Haarzelle. Befinden sich Ein- und Ausstrom der K^+ -Ionen im Gleichgewicht herrscht ein Ruhemembranpotential. Körperbewegungen führen zu einer Ablenkung der Stereozilien in Richtung des Kinoziliums (Stimulationsrichtung) und zu einer vermehrten Öffnung der Kanäle, sodass der K^+ -Einstrom in die Zelle erhöht wird. Durch die positive Ladung kommt es in der Zelle zu einer Depolarisation. Bei entgegengesetzter Bewegungsrichtung der Sinneshärchen (Inhibitionsrichtung) werden die K^+ -Kanäle geschlossen, sodass die Zelle hyperpolarisiert wird.

Die vestibulären Haarzellen geben in Ruhestellung kontinuierlich Transmittermoleküle an die afferenten Fasern ab. Eine Änderung des Membranpotentials führt zu einer modifizierten Transmitterfreisetzung (Transformation). Bei einer Depolarisation wird die Transmitterausschüttung erhöht und die Aktivität der afferenten Nervenfasern gesteigert. Eine Hyperpolarisation der Haarzellen führt hingegen zu einer verringerten Transmitterabgabe, wodurch die neuronale Entladungsrate reduziert wird (ZENNER, 2006).

1.4. Neuronale Bahnen des Vestibularorgans

Im inneren Gehörgang liegt das Ganglion vestibulare, in dem sich die Zellkörper der Nervenzellen befinden. Die Axone bündeln sich zum Nervus vestibularis und leiten vestibuläre Afferenzen in den Vestibulariskern (mit vier Subkernen), in das Zerebellum und in die Formatio reticularis (Abbildung 1). Der N. vestibularis vereinigt sich mit dem Hörnerven zum VIII. Gehirnnerv (N. vestibulocochlearis) (SALOMON et al., 2005).

Die Vestibulariskerne sind multisynaptisch verschaltet, sodass die aufgenommenen vestibulären Reize mit den Bewegungsinformationen aus den visuellen und

propriozeptiven Sinnessystemen zusammengeführt werden können. Der Nucleus vestibularis superior (Bechterew) und der Nucleus vestibularis medialis (Schwalbe) sind vor allem für die Blickfeldmotorik und die Weiterleitung des vestibulo-okulären Reflexes zuständig. Der Nucleus vestibularis lateralis (Deiters) übernimmt die motorische Stützfunktion und die statischen Reflexe. Der Nucleus vestibularis inferior (Roller) dient vor allem der Integration der Reizeingänge. Die Kerngebiete sind über kommissurale Fasern miteinander verbunden (REIß, 2009).

Von den Vestibulariskernen bestehen zusätzlich direkte Verbindungen in den Tractus vestibulozerebellaris des Kleinhirns und in die Formatio reticularis, sowie zum Thalamus und Cortex. Die Informationen aus den Gleichgewichtsorganen und dem Zerebellum werden von den Vestibulariskernen über Efferenzen an Inter- und Motoneurone im Rückenmark weitergegeben, wodurch vestibulo-spinale Reflexe ausgelöst werden und die Körperbalance aufrechterhalten wird. Weitere Verbindungen laufen zu den Augenmuskelkernen, sodass über vestibulo-okuläre Reflexe die Blickbewegungen an Lageveränderungen des Kopfes angepasst werden können. Im Thalamus werden die vestibulären, visuellen und propriozeptiven Reize koordiniert, während die Verbindung zum Cortex für ein bewusstes Empfinden der Körperbewegung im Raum sorgt. In der Formatio reticularis werden vestibulo-vegetative Erscheinungen, wie z.B. Übelkeit und Erbrechen, ausgelöst. Durch die zahlreichen Verbindungen der Vestibulariskerne können vestibuläre, propriozeptive und visuelle Informationen optimal verarbeitet und Störungen in einem der Systeme ausgeglichen werden (SALOMON et al., 2005).

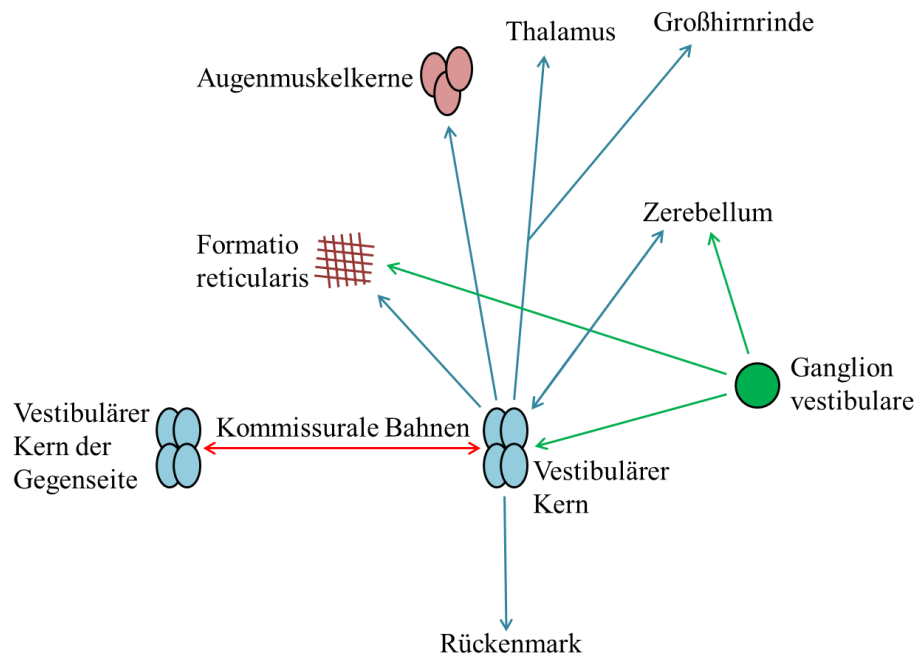


Abbildung 1: Vestibuläre Bahnen. Die efferenten Fasern des N. vestibularis laufen vom Ganglion vestibulare in den ipsilateralen vestibulären Kern (mit dem superioren, medialen, lateralen und inferioren Subkern) in das Zerebellum und in die Formatio reticularis. Vom vestibulären Kern gehen Verbindungen zum vestibulären Kern der Gegenseite (kommissurale Bahnen), in das Rückenmark, in die Formatio reticularis, zu den Augenmuskelkernen des N. oculomotorius, N. trochlearis und N. abducens, zum Thalamus und zur Großhirnrinde. In Anlehnung an SALOMON et al. (2005).

2. Schwindel

„Schwindel“ ist keine eigenständige Erkrankung, sondern ein Leitsymptom, welches durch Krankheitsbilder unterschiedlichster Ätiologie hervorgerufen werden kann. Auslöser kann eine Erkrankung des Innenohrs, Hirnstamms, Kleinhirns oder der Psyche sein, weshalb für eine Diagnosestellung oft verschiedene Fachrichtungen, wie Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Neurologie, Allgemeinmedizin und Psychiatrie, zurate gezogen werden (BRANDT et al., 2012; STRUPP et al., 2013).

Schwindel wird als eine unangenehme Verzerrung der räumlichen Orientierung oder als fehlerhafte Wahrnehmung der Bewegung von sich selbst oder der Umwelt definiert. Betroffene Patienten empfinden dieses Gefühl als Drehen oder Schwanken (BRANDT & DAROFF, 1980; STRUPP & BRANDT, 2008). Verantwortlich für diese Symptome kann ein Ausfall des vestibulären, visuellen oder somatosensorischen Systems sein, die für statische und dynamische Orientierung, sowie für die Haltung, verantwortlich sind. Die funktionellen Bereiche dieser individuellen Systeme überlappen sich teilweise, sodass sie sich bei Ausfällen gegenseitig kompensieren können. Die Intensität des

Schwindels wird demzufolge verstärkt wahrgenommen sobald ein weiteres System wegfällt, wie zum Beispiel bei Patienten mit vestibulären Erkrankungen nach dem Schließen der Augen. Bei den meisten Schwindelsyndromen liegt eine Kombination aus perzeptuellen, okulo-motorischen, posturalen und vegetativen Symptomen vor, die sich als Schwindel, Nystagmus, Ataxie und Übelkeit manifestieren. Das Schwindelgefühl entsteht, indem die kortikale räumliche Orientierung gestört ist, während der Nystagmus aus Defiziten der vestibulo-okulären Reflexe resultiert. Vestibuläre Ataxien und Haltungsinstabilitäten werden durch eine fehlerhafte Aktivierung von mono- oder polysynaptischen vestibulo-spinalen Bahnen ausgelöst. Der vegetative Effekt der Übelkeit beruht auf einer Aktivierung des Brechzentrums in der *Formatio reticularis* im Hirnstamm (BRANDT & DAROFF, 1980).

Kategorisch wird Schwindel in drei Formen unterteilt: Drehschwindel, Schwankschwindel und Benommenheitsschwindel. Von Drehschwindel betroffene Patienten vergleichen dieses Gefühl oft mit Karussellfahren, wobei es zu Fallneigungen kommen kann. Gründe hierfür sind vor allem Lagerungsschwindel durch Störungen der Bogengänge, sowie einseitige Vestibulopathien, bei denen der vestibuläre Nerv oder das Kerngebiet betroffen sein können. Der Schwankschwindel wird oft mit Bootfahren verglichen und ist meist auf bilaterale Erkrankungen zurückzuführen. Die dritte Form beschreibt den sogenannten Benommenheitsschwindel, der zum Beispiel durch phobischen Schwankschwindel oder Medikamentenintoxikation ausgelöst wird (BRANDT et al., 2012; STRUPP et al., 2015).

Das Leitsymptom Schwindel gehört mit einer Lebenszeitprävalenz von ca. 30% zu den häufigsten Vorstellungsgründen in der ärztlichen Praxis und in der Notaufnahme. In der Neurologie ist es nach Kopfschmerzen das zweithäufigste genannte Symptom von Patienten. Innerhalb eines Jahres leiden ungefähr 5% der Bevölkerung an Schwindel (NEUHAUSER, 2007). Die sozialmedizinische Relevanz dieser Erkrankungen wird durch starke Einschränkungen der Betroffenen in ihrem alltäglichen Leben und eine signifikant geringere gesundheitsbezogene Lebensqualität unterstrichen (KROENKE & MANGELSDORFF, 1989; HANNAFORD et al., 2005).

Für die Diagnosestellung ist eine sorgfältige Anamnese hilfreich, da allein anhand der Dauer der Schwindelattacken verschiedene Erkrankungen bereits ausgeschlossen oder angenommen werden können. Die Schwindelform, deren Auslösbarkeit oder Modulierung und die Begleiterscheinungen können ebenfalls Hinweise auf die Ätiologie geben (BRANDT et al., 2012).

Vestibuläre Schwindelsyndrome können zentrale oder periphere Ursachen haben, die

anhand fünf klinischer Merkmale mit einer Spezifität von über 90% unterschieden werden können. Charakteristisch für eine zentrale Ätiologie sind eine vertikale Divergenz, ein zentraler Fixationsnystagmus, eine sakkadierte Blickfolge, ein Blickrichtungs- und Spontannystagmus in entgegengesetzte Richtungen, sowie ein physiologischer Kopfpulstest. Diese schnelle Differenzierung ist sehr wichtig, um die weitere Diagnostik und Therapie so schnell wie möglich anzupassen (CNYRIM et al., 2008; STRUPP et al., 2015).

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der am häufigsten vorkommenden Schwindelsyndrome in der Humanmedizin (STRUPP et al., 2015). Auf die relevantesten Erkrankungen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Schwindelform	Häufigkeit in %
Benigner peripherer paroxysmaler Lagerungsschwindel	17,1
Somatoformer phobischer Schwankschwindel	15,0
Zentrale vestibuläre Syndrome	12,3
Vestibuläre Migräne	11,4
Morbus Menière	10,1
Unilaterale Vestibulopathie	8,3
Bilaterale Vestibulopathie	7,1
Vestibularisparoxysmie	3,7
Psychogener Schwindel	2,9
Perilymphfistel	0,5
Unklare Schwindelsyndrome	2,7
Andere	8,8

Tabelle 1: Häufigkeiten verschiedener Schwindelsyndrome in der Schwindelambulanz der Neurologischen Klinik (LMU) und des Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrums (nach STRUPP et al. (2015)).

2.1. Benigner peripherer paroxysmaler Lagerungsschwindel (BPPV)

Beim BPPV handelt es sich mit einer Lebenszeitprävalenz von 2,4% um die häufigste Ursache rezidivierender vestibulärer Schwindelattacken. Betroffen sind Patienten aller Altersgruppen, wobei die Inzidenz im Alter stark ansteigt und Frauen häufiger erkranken (NEUHAUSER, 2007). Die Patienten leiden an kurzen, über wenige Sekunden anhaltenden Drehschwindelattacken, die durch Lageveränderungen des Körpers oder plötzliche Kopfbewegungen ausgelöst werden. Zusätzlich tritt ein rotierender Lagerungsnystagmus in Richtung der Stirn und zum unten liegenden Ohr

auf (BRANDT et al., 2012). Pathophysiologisch wird die Erkrankung durch eine Canalolithiasis hervorgerufen, bei der sich Otolithen vom Utrikulus lösen und sich als Agglomerate frei im Bogengang bewegen. Über die Endolymphe wird je nach Ausrichtung eine Erregung oder Hemmung der vestibulären Haarzellen herbeigeführt (BRANDT & STEDDIN, 1993). In über 95% der Fälle handelt es sich um einen idiopathischen BPPV, bei dem die Ursache nicht geklärt werden kann. Einem symptomatischen BPPV liegen meist ein Schädel-Hirn-Trauma, eine Neuritis vestibularis oder ein Morbus Menière zugrunde (KARLBERG et al., 2000). Häufig tritt ein BPPV auch nach Operationen oder langer Bettruhe auf (BRANDT et al., 2012). Therapeutisch werden die gelösten Otolithen durch diverse Befreiungs- oder Lagerungsmanöver aus dem Bogengang entfernt (BRANDT & STEDDIN, 1993). Unabhängig von dem durchgeführten Befreiungsmanöver liegt die Rezidivrate nach Behandlung bei circa 50%. Von den rezidivierenden Fällen tritt die Erkrankung zu 80% innerhalb des ersten Jahres erneut auf (BRANDT et al., 2006).

2.2. Vestibuläre Migräne

Die Leitsymptome der vestibulären Migräne sind rezidivierende Dreh- oder Schwankschwindelattacken mit Gang- und Standunsicherheiten, Sehstörungen, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Die Schwindelanfälle können von einigen Sekunden oder Minuten bis zu mehreren Stunden und sogar Tagen andauern. Eine Diagnose gilt als gesichert, wenn der Schwindel von okzipital betontem Kopfdruck begleitet wird, eine Familien- oder Eigenanamnese für Migräne vorliegt oder weitere migränetypische Begleitsymptome, wie Licht- und Geräuschempfindlichkeit, auftreten. Bei ca. 30% der Betroffenen treten keine Kopfschmerzen auf, wodurch die Diagnosestellung erschwert wird (DIETERICH & BRANDT, 1999). Auslöser der Attacken, wie z.B. Stress, hormonelle Veränderungen und unregelmäßiger oder ungenügender Schlaf, können als diagnostische Hinweise dienen (LEMPERT & NEUHAUSER, 2009). Zur Behandlung werden Betablocker (z.B. Metoprolol) als Migräneprophylaxe angewandt (FEIL et al., 2018).

2.3. Morbus Menière

Beim Morbus Menière kommt es zu wiederholten Drehschwindelattacken, die 20 Minuten bis zu mehreren Stunden andauern. Klassischerweise treten eine verminderte Hörleistung, Tinnitus und ein Druckgefühl auf einem Ohr als Begleitsymptome auf (BRANDT et al., 2012). Der histopathologische Befund ist ein

Endolymphhydrops, welcher diagnostisch mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) des Felsenbeins nach intratympanaler Instillation eines Kontrastmittels darstellbar ist (MERCHANT et al., 2005). Die Ausprägung der Flüssigkeitsansammlung korreliert signifikant mit dem Verlust audio-vestibulärer Funktionen (GÜRKOV et al., 2011). Der Hydrops entsteht durch eine Überproduktion bzw. verminderte Resorption von Endolymphe, was zum Reißen der Endolymphmembran (Reissner-Membran) oder zur Eröffnung von K^+ -Kanälen führen kann. Die Folge ist eine vermehrte Kaliumansammlung im Perilymphkanal, die zu einer Erregung und nachfolgender Depolarisation des N. vestibulocochlearis führt (YEH et al., 1998). Da die plötzlich und unvorhersehbar auftretenden Schwindelattacken eine große Belastung für die Patienten darstellen, sollte eine prophylaktische Therapie im Vordergrund stehen. Als mögliche Behandlung gelten unter anderem die transtympanale Gabe von Gentamycin oder Glukokortikoiden und eine hochdosierte Langzeitbehandlung mit Betahistindihydrochlorid (MINOR et al., 2004).

2.4. Akute unilaterale Vestibulopathie (AUV, Neuritis vestibularis)

Ein einseitiger Labyrinthausfall führt zu einer Tonusimbalance zwischen dem gesunden und dem verletzten Vestibularorgan, wodurch Schwindelgefühle und Nystagmus hervorgerufen werden. Die Drehschwindelattacken werden von Gangabweichungen und Fallneigungen zur verletzten Seite begleitet, setzen akut ein und bleiben über einige Tage bestehen. Der horizontal-rotierende Spontannystagmus verläuft in Richtung der gesunden Seite. Bei der klinischen Untersuchung lässt sich durch den Kopfpulstest nach Halmagyi-Curthoys eine einseitige Funktionsstörung des horizontalen vestibulookulären Reflexes feststellen (HALMAGYI & CURTHOYS, 1988). Zusätzlich treten Übelkeit und Erbrechen, sowie Scheinbewegungen der Umgebung (Oszillopsien) auf. Meist klingen die Symptome durch den Prozess der zentralen vestibulären Kompensation innerhalb von ein bis zwei Wochen von alleine ab. Der Funktionsausfall kann durch das kontralaterale Vestibularorgan, sowie mittels somatosensorischer und visueller Afferenzen ausgeglichen werden. Die Wiederherstellung der peripheren vestibulären Funktion verläuft meist nur unvollständig (BRANDT et al., 2012).

Eine virale Ätiologie, bei der es durch Reaktivierung einer latenten Infektion mit dem Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) zu einer Neuritis vestibularis kommt, ist wahrscheinlich, konnte bislang jedoch nicht eindeutig bewiesen werden (NADOL, 1995). Dafür sprechen histopathologische Untersuchungen des Schläfenbeins, bei denen entzündliche Degenerationen des Vestibularnervs festgestellt werden konnten

(SCHUKNECHT & KITAMURA, 1981). Die DNA des HSV-1 wurde in vestibulären Ganglien und Kernen, sowie in Makulaorganen und Bogengängen nachgewiesen (ARBUSOW et al., 1999; 2000; 2001). Eine Studie von THEIL et al. (2001), bei der das „latency-associated transcript (LAT)“ mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) im vestibulären Ganglion nachgewiesen werden konnte, unterstützt ebenfalls diese Hypothese. Tierexperimentell konnte eine Neuritis vestibularis durch Inokulation eines HSV-1-Stammes in Mäusen hervorgerufen werden (HIRATA et al., 1995).

Als Therapie werden bei starken Beschwerden innerhalb der ersten Tage Antivertiginosa (z.B. Dimenhydrinat) verabreicht, die jedoch die Symptome im späteren Krankheitsverlauf verschlechtern können und daher nur in der Akutphase gegen Übelkeit und Erbrechen sinnvoll sind. Als kausale Behandlung werden Glukokortikoide eingesetzt. Eine randomisierte, placebokontrollierte Studie zeigte eine signifikante langfristige Verbesserung der peripheren vestibulären Funktion durch eine Monotherapie mit Methylprednisolon. Eine antivirale Behandlung mit Valaciclovir führte hingegen nicht zu einem verbesserten Heilungsverlauf. (STRUPP et al., 2004). Zur Unterstützung der zentralen vestibulo-spinalen Kompensation sollten physiotherapeutische Gleichgewichtsübungen durchgeführt werden. Ein Training der willkürlichen Augenbewegung und Fixationsübungen fördern die Verbesserung der gestörten Blickstabilisation und führen zu einer Wiederherstellung des vestibulo-okulären Reflexes (STRUPP et al., 2001).

2.5. Bilaterale Vestibulopathie (BV)

Das Leitsymptom einer BV ist ein bewegungsabhängiger Schwankschwindel mit Gang- und Standunsicherheit. Die Beschwerden verschlimmern sich wenn die Patienten sich im Dunkeln oder auf unebenem Boden befinden. Die ausgefallene vestibulo-spinale Funktion wird dann nicht mehr durch visuelle und propriozeptive Reize ausgeglichen. Aufgrund eines Ausfalls der vestibulo-okulären Reflexe kommt es außerdem zu Oszillipsien und einer Beeinträchtigung des Sehvermögens (BRANDT et al., 2012). Des Weiteren führt diese Erkrankung zu einer Verschlechterung des räumlichen Gedächtnisses und der Navigationsfähigkeit, die von einer Hippocampusatrophie begleitet wird (BRANDT et al., 2005). Die Ätiologie bleibt bei annähernd der Hälfte der Patienten ungeklärt. Als häufigste Ursachen konnten die Applikation ototoxischer Aminoglykoside, ein beidseitiger Morbus Menière und Enzephalomeningitiden festgestellt werden (ZINGLER et al., 2007). Zur Behandlung wird physio-

therapeutisches Training zur Steigerung der visuellen und somatosensorischen Substitution angewandt. Eine Aufklärung der Patienten über ihre Erkrankung führt oft zu einer Linderung ihres subjektiven Leidens (BRANDT et al., 2012).

2.6. Zentrale vestibuläre Schwindelsyndrome

Zentrale vestibuläre Erkrankungen entstehen durch Schädigungen der vestibulären Bahnen im Hirnstamm oder im Vestibulozerebellum und werden am häufigsten durch Ischämien oder Blutungen ausgelöst. Auch entzündliche Veränderungen durch Multiple Sklerose, Tumoren, Demenz oder neurodegenerative Erkrankungen des Kleinhirns kommen als Ursache infrage. Als Begleitsymptome können Augenbewegungsstörungen, Ataxien, sowie Sprech- und Schluckstörungen auftreten (OBERMANN, 2013). Ein richtungswechselnder Nystagmus, eine Skew-Deviation (vertikale Divergenzstellung der Bulbi) und ein physiologischer Kopfpulstest sind zur Feststellung zentraler Ursachen aussagekräftiger als eine bildgebende Diagnostik mittels MRT (KATTAH et al., 2009). Die Dauer des Schwindels kann je nach Ätiologie stark variieren und beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen wie zerebellären Ataxien, Downbeat-Nystagmus-Syndrom oder Normdruckhydrozephalus über Monate bis Jahre bestehen bleiben (STRUPP et al., 2015). Akut einsetzender Drehschwindel, der Stunden oder wenige Tage andauert, wird als akutes vestibuläres Syndrom (AVS) bezeichnet. Die wichtigsten Differentialdiagnosen sind eine akute unilaterale periphere Vestibulopathie und ein akuter Schlaganfall. Letzterer wird meist durch eine Ischämie im Kleinhirn ausgelöst, bei der das Versorgungsgebiet der PICA (Arteria cerebelli inferior posterior) am häufigsten betroffen ist (LEE et al., 2006). Gelegentlich können auch kombinierte periphere und zentrale Syndrome auftreten, wie z.B. bei einer Ischämie der AICA (Arteria cerebelli inferior anterior). Diese versorgt über die Arteria labyrinthi sowohl das Innenohr, als auch das Kleinhirn. Um eine schnelle kausale Therapie zu ermöglichen, sollten beim Auftreten bestimmter Kombinationen von Symptomen immer weiterführende neurologische und bildgebende Untersuchungen erfolgen (CHOI et al., 2016; ZWERGAL et al., 2018). Aminopyridine stellen ein vielversprechendes Therapieprinzip für bestimmte zentrale vestibuläre Erkrankungen (z.B. Downbeat- und Upbeat-Nystagmus, episodische Ataxie Typ 2) dar. Durch die Blockade von K^+ -Kanälen wird die Aktivität von Purkinjefasern im Zerebellum gesteigert und damit der inhibitorische Einfluss auf vestibuläre und zerebelläre Kerngebiete erhöht (FEIL et al., 2018).

3. Schwindelsyndrome in der Tiermedizin

Da Tiere ihre körperlichen Beschwerden nicht mit Worten beschreiben können, wird der Begriff „Schwindel“ in der Veterinärmedizin nur selten direkt verwendet. Aufgrund identischer Anatomie und Pathophysiologie ist anzunehmen, dass Tiere die Schwindelsymptomatik als genauso unangenehm wahrnehmen wie menschliche Patienten. Die damit einhergehende Belastung des Tieres unterstreicht die praktische Relevanz von vestibulären Erkrankungen in der Tiermedizin.

Als Kardinalsymptom von einseitigen vestibulären Störungen gilt die Kopfschiefhaltung, die durch eine verringerte Erregungsrate des erkrankten Vestibularorgans entsteht. Die Tiere können einen ipsiläsionalen Seitendrall, Umfallen, Schwanken oder Rollen zeigen. Aufgrund des fehlenden vestibulären Inputs auf die Muskelspannung, ist der Extensormuskeltonus auf der erkrankten Seite stark herabgesetzt. Die Gangabweichungen werden als vestibuläre Ataxie bezeichnet (JAGGY, 2010).

Ein spontan auftretender Nystagmus ist ein weiteres Symptom für unilaterale Vestibulopathien. Nystagmus beschreibt die unwillkürlichen rhythmischen Augenbewegungen, die physiologisch bei schnellen Drehbewegungen des Kopfes auftreten. Wird der Kopf auf eine Seite bewegt, folgen die Augen in einer schnellen Phase dieser Richtung und bewegen sich dann langsam zurück zum Ausgangspunkt. Beim Ausfall eines Vestibularapparates herrscht ein Ungleichgewicht der tonischen Stimulation zwischen den vestibulären Neuronen beider Seiten. Infolgedessen kommt es zu Kontraktionen der extraokulären Augenmuskeln und dem Auftreten eines Spontannystagmus. Die Richtung des Nystagmus beschreibt stets dessen schnelle Phase (DE LAHUNTA & GLASS, 2009).

3.1. Unilaterales peripheres Vestibularsyndrom

Analog zur menschlichen unilateralen Vestibulopathie zeigen die betroffenen Tiere einen Gleichgewichtsverlust, ipsiläsionale Kopfschiefhaltung, sowie einen spontanen Nystagmus in die kontraläsionale Richtung. Die Tiere laufen ataktisch bei erhaltener Propriozeption. Sie bewegen sich oft in kleinen Kreisen in Richtung der verletzten Seite und es kann zu Stürzen kommen. Je nach Tierart kann gelegentlich zu Beginn der Erkrankung Erbrechen auftreten. Ein ventraler oder ventrolateraler Strabismus ist ebenfalls häufig zu beobachten. Dieser verschwindet bei einer Änderung der Kopfposition (DE LAHUNTA & GLASS, 2009). Der VII. Gehirnnerv (N. facialis) und die sympathische Innervation des Gesichts verlaufen in unmittelbarer Nähe zum Vestibularapparat. Daher können periphere vestibuläre Läsionen mit einer ipsilateralen

Gesichtsparese oder einem Horner-Syndrom assoziiert sein. Das Horner-Syndrom ist bei Hund und Katze durch eine ipsilaterale Miose, Ptosis, Enophthalmus und einer Protrusion des dritten Augenlides charakterisiert (THOMAS, 2000).

Auch beim Tier verbessern sich die Symptome trotz persistierendem peripher-vestibulären Schadens. Die zentrale Kompensation setzt durch Mechanismen der Neuroplastizität, sensorische Substitution (propriozeptiv und visuell) und adaptives Erlernen ein. Der Nystagmus ist nach ca. drei Tagen verschwunden, während die Kopfschiefhaltung in den meisten Fällen bestehen bleibt. Nach etwa drei Wochen zeigen die Tiere wieder ein physiologisches Gangbild. Symptome, die nach drei Monaten noch bestehen, werden nicht mehr kompensiert und persistieren dauerhaft (VENKER-VAN HAAGEN, 2010). Für die zentrale Kompensation spielt das somatosensorische Feedback eine wichtige Rolle, daher sollten die betroffenen Tiere zu physischer Aktivität motiviert werden. Eine symptomatische Therapie ist nur in der akuten Phase indiziert, da die sensorische Imbalance ein essentieller Stimulus für eine vollständige Heilung darstellt (THOMAS, 2000).

Zu den häufigsten Ursachen vestibulärer Dysfunktion zählen die Otitis interna, idiopathische Erkrankungen und ototoxische Medikamente, die im Folgenden näher beschrieben werden. Als weitere Auslöser seien angeborene Fehlbildungen, Traumata, Tumoren oder Polypen des Innenohres, sowie Stoffwechselerkrankungen (z.B. Hypothyreose) genannt (HARVEY et al., 2003).

3.1.1. Otitis interna

Eine Entzündung des Innenohres (Otitis interna, Labyrinthitis) ist bei ca. jedem zweiten Hund die Ursache eines akuten peripheren Vestibularsyndroms. Sie entsteht meist durch die Ausbreitung einer Entzündung des Mittelohres, die aus einer Otitis externa hervorgeht (SCHUNK & AVERILL, 1983). Neben den vestibulären Symptomen können häufiges Kopfschütteln, Kratzen und eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit im Bereich des erkrankten Ohres beobachtet werden. Die Diagnostik beinhaltet eine sorgfältige Anamnese, klinische Allgemeinuntersuchung, otoskopische Examination und eine Myringotomie. Eine neurologische Untersuchung sollte zur Abgrenzung eines zentralen Vestibularsyndroms stattfinden. Bei unklarem Untersuchungsbefund kann das Innenohr mittels Röntgen, Computer-Tomographie (CT) oder MRT bildlich dargestellt werden. Vor der Behandlung ist eine Parazentese mit bakteriologischer Untersuchung und Antibiotogramm empfehlenswert. Die medizinische Versorgung beinhaltet die gründliche Reinigung und Spülung unter Anästhesie, um den Gehörgang von

infiziertem Gewebe und Exsudat zu befreien. Die Tiere werden mit einem Breitbandantibiotikum systemisch für mindestens vier bis acht Wochen behandelt. Zusätzlich kann eine entzündungshemmende topische oder systemische Therapie angewandt werden. Bei erfolgreicher Behandlung erholen sich die Tiere vollständig von der Erkrankung. Chirurgische Maßnahmen, wie eine Bullaosteotomie oder Ablation des Gehörganges, können bei rezidivierenden oder chronischen Beschwerden in Betracht gezogen werden (ROSSMEISL, 2010).

3.1.2. Idiopathisches Vestibularsyndrom

Idiopathische vestibuläre Dysfunktionen sind nach der Otitis interna die zweithäufigste Ursache peripherer vestibulärer Erkrankungen. Das canine idiopathische Vestibularsyndrom tritt nur bei älteren Hunden mit einem durchschnittlichen Alter von 12,5 Jahren auf (geriatrisches Vestibularsyndrom). (SCHUNK & AVERILL, 1983). Katzen können in jedem Lebensabschnitt betroffen sein. Die Tiere zeigen eine plötzlich auftretende Kopfschiefhaltung, stark ausgeprägte Ataxie und einen rotierenden oder horizontalen Nystagmus. Episodisches Erbrechen kann vor Beginn der vestibulären Erscheinungen einsetzen. Die Diagnose erfolgt durch den Ausschluss anderer Erkrankungen. Die Ursache dieses Syndroms ist nicht bekannt. Aufgrund der Ähnlichkeit zu der Neuritis vestibularis beim Menschen, wird eine virale Ätiologie in Erwägung gezogen (THOMAS, 2000). Für das feline idiopathische Vestibularsyndrom wird die aberrante Migration von Cuterebra-Larven als Auslöser vermutet. Die Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Erkrankung bei Katzen vor allem im Sommer und Herbst bei Freigängertieren auftritt (GLASS et al., 1998). Die Prognose ist sehr gut, da es innerhalb von zwei Wochen zu einer spontanen Heilung kommt. Die Kopfschiefhaltung kann in einigen Fällen in einer mildereren Form lebenslang bestehen bleiben (THOMAS, 2000).

3.1.3. Ototoxizität

Zu den potentiell ototoxischen Substanzen zählen diverse Antibiotika (z.B. Aminoglykoside), Lokalanästhetika, Ceruminolytika oder Trägersubstanzen von Ohrentropfen und -salben (Propylenglycol, Glycerin, Phenole) (HARVEY et al., 2003). Auch Desinfektionsmittel, wie Chlorhexidin-Lösungen, führen bereits bei 0,5-prozentiger Konzentration zu sofort eintretenden vestibulären Dysfunktionen und Erhöhungen der Hörschwelle (GALLE & HAAGEN, 1986). Exotoxine von Pseudomonaden, Staphylokokken und Streptokokken, die häufige Erreger von Otitiden

darstellen, können ebenfalls eine ototoxische Wirkung besitzen (VENKER-VAN HAAGEN, 2010).

Die Substanzen gelangen auf systemischen Weg nach parenteraler Applikation oder durch topische Anwendung am äußeren Gehörgang in das Innenohr (OISHI et al., 2012). Letzteres wird durch ein beschädigtes Trommelfell ermöglicht. Eine Otitis media wirkt begünstigend, da sich im Frühstadium der Entzündung die Permeabilität des runden Fensters erhöht und eine Diffusion des Wirkstoffes erleichtert wird (GOYCOOLEA & LUNDMAN, 1997).

Bei Kontakt mit ototoxischen Substanzen kommt es zu struktureller Veränderung und Degeneration der sensorischen Haarzellen. Je nach Wirkstoff treten vestibuläre und/oder auditorische Dysfunktionen auf. Sobald darauf hinweisende Symptome während der Behandlung beim Tier beobachtet werden, muss das ototoxische Medikament umgehend abgesetzt werden (OISHI et al., 2012). Bei Spülungen des äußeren Gehörganges sollte vor der Wahl der geeigneten Substanz stets das Trommelfell auf mögliche Rupturen untersucht werden (HARVEY et al., 2003). Bei der Anwendung von Aminoglykosiden muss eine gleichzeitige Gabe von Schleifendiuretika unterlassen werden. Diese können die Ototoxizität verstärken, indem sie die relative Konzentration des Wirkstoffes in der Endolymphe erhöhen (MANSFIELD, 1990).

3.2. Zentrales Vestibularsyndrom

Zentrale Vestibularsyndrome erfordern meist ein aufwendigeres und teureres Diagnose- und Therapiemanagement als periphere Erkrankungen. Die Symptome werden durch Läsionen im Hirnstamm oder im Zerebellum hervorgerufen. Wie beim peripheren Vestibularsyndrom ist die Kopfschiefhaltung ipsiläsional gerichtet. Ein Nystagmus kann horizontal, rotierend oder vertikal auftreten. Als wichtigstes Differenzierungsmerkmal für zentrale Ursachen gilt das Auftreten propriozeptiver Defizite. Mentale Veränderungen (bspw. zurückhaltendes oder komatöses Verhalten), Hemiparesen oder eine Beteiligung mehrerer Gehirnnerven sind ebenfalls hinweisend (LORENZ et al., 2010). Als Ursachen können Infarkte, Blutungen, Infektionen, Tumoren oder metabolische Erkrankungen infrage kommen (JAGGY, 2010).

3.3. Paradoxes Vestibularsyndrom

Beim paradoxen Vestibularsyndrom liegen Kopfschiefhaltung, Gleichgewichtsverlust und Propriozeptionsstörungen auf der kontraläsionalen Seite vor. Die klinischen Anzeichen sind spezifisch für Läsionen an den kaudalen Kleinhirnstielen (Pedunculi

cerebellares caudales) oder am Lobus flocculonodularis des Zerebellums. Das Kleinhirn hat physiologisch einen hemmenden Einfluss auf die vestibulären Neuronen. Bei einseitigem Verlust der inhibitorischen Wirkung ist die Aktivität in den Vestibulariskernen auf der ipsilateralen Seite stark erhöht. Da die Kopfschiefhaltung stets in Richtung der schwächer aktivierten Kerne verläuft, richtet sich der Kopf beim paradoxen Vestibularsyndrom auf die gesunde Seite (LOWRIE, 2012).

4. Vestibuläre Kompensation

4.1. Definition und Verlauf

Kompensation beschreibt in der Medizin einen Vorgang, bei dem der Ausfall einer Organfunktion durch andere Mechanismen ausgeglichen wird. Bei unilateralen peripheren vestibulären Schädigungen entstehen die klinischen Symptome durch ein Tonusungleichgewicht zwischen den vestibulären Kernen beider Seiten. Obwohl der Schaden persistiert und sich der geschädigte Nerv nicht regeneriert, verschwindet die Symptomatik in den meisten Fällen progressiv innerhalb von ein bis vier Wochen. Dieser Vorgang wird als vestibuläre Kompensation bezeichnet und beruht auf neuronalen und synaptischen Plastizitätsmechanismen (DIERINGER, 1995; CURTHOYS & HALMAGYI, 1999; DARLINGTON & SMITH, 2000).

Bei einer akuten unilateralen Vestibulopathie ist die Entladungsrate der primären Neurone auf der ipsiläsionalen Seite stark reduziert. Die beiden Vestibulariskerngebiete stehen direkt und indirekt über Interneurone miteinander in Verbindung. Über kommissurale Inhibition können sie ihre Spontanaktivität aneinander angleichen (DARLINGTON & SMITH, 2000). Durch die Wiederherstellung der neuronalen Tonusbalance werden Ruheschwindel, Spontannystagmus und Standabweichungen vollständig kompensiert (HAMANN, 2009). Auf der ipsiläsionalen Seite bleibt die Anzahl der aktiven Neurone nach abgeschlossener Kompensation deutlich reduziert (HAMANN & LANNOU, 1987). Das bestehende quantitative Ungleichgewicht verhindert eine vollständige Erholung der dynamischen Defizite. Daher können Gangabweichungen oder auslösbarer Schwindel und Nystagmus bei Kopfbewegungen bestehen bleiben (HAMANN, 2009).

Die vestibulären Dysfunktionen werden außerdem von multisensorischen Systemen im zentralen Nervensystem (ZNS) substituiert. Visuelle und propriozeptive Reize dienen dem Ausgleich fehlender Informationen eines Vestibularorgans. Bei unilateral labrynthektomierten Ratten kann während dem Anheben an der Schwanzbasis eine

Dekompensation beobachtet werden, da die unterstützende Propriozeption der Gliedmaßen wegfällt (HAMANN & LANNOU, 1987). Das Fehlen von optischen Einflüssen führte bei Katzen, die in Dunkelheit gehalten wurden, zu einer verlangsamten Kompensation im Vergleich zu sehenden Tieren (COURJON et al., 1977). Die Dauer der vestibulären Kompensation, sowie deren zugrunde liegende Mechanismen, können sich je nach Art der vestibulären Schädigung unterscheiden. Ein transienter oder gradueller Verlust der vestibulären Funktion kann schneller kompensiert werden, als ein akutes Auftreten (LACOUR et al., 2009).

4.2. Kompensationsfördernde Therapieansätze

In tierexperimentellen Studien konnten über 100 Substanzen, die eine hemmende oder fördernde Wirkung auf die zentrale vestibuläre Kompensation haben, identifiziert werden. In den vestibulären Kerngebieten werden Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter (γ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat, Dopamin, Serotonin) exprimiert, die als therapeutische Angriffspunkte dienen können (STRUPP et al., 2001). Sedative Medikamente, wie Barbiturate, Chlorpromazin und Neuroleptika, haben eine hemmende und verlangsamende Wirkung auf die vestibuläre Kompensation. Stimulierende Pharmaka (z.B. Amphetamine, Koffein, Cardiazol) besitzen einen beschleunigenden Einfluss (SCHAEFER & MEYER, 1974; HAMANN, 2009). Geringer Alkoholkonsum fördert die vestibulären Kompensationsprozesse, wohingegen Alkohol in hohen Dosen eine gegenteilige Wirkung erzielt (SCHAEFER & WEHNER, 1966).

Durch ein physiotherapeutisches Training kann der positive Einfluss propriozeptiver und visueller Reize auf die Kompensationsmechanismen verstärkt werden. Ein Gleichgewichtstraining verbessert die vestibulo-spinale Haltungsregulation. Willkürliche Augenbewegungen führen zu einer Blickstabilisation und Wiederherstellung des vestibulo-okulären Reflexes (STRUPP et al., 1998).

Symptomatisch wirksame Medikamente gegen Schwindel und Übelkeit (z.B. H1-Antihistaminika) besitzen meist eine sedative Wirkung. Sie sollten maximal innerhalb der ersten drei Tage eingesetzt werden, da sie die Kompensation stark beeinträchtigen können (ZWERGAL & SCHNIEPP, 2010). Eine Behandlung mit dem Kalium-Kanalblocker 4-Aminopyridin führte im Tierversuch zu einer Verbesserung der klinischen akuten Symptomatik. Im Langzeitverlauf konnte jedoch eine verringerte und verzögerte vestibuläre Kompensation beobachtet werden. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der symptomatische Druck in der akuten Phase für die vestibuläre Kompensation essentiell ist (BECK et al., 2014).

Vielversprechende Ergebnisse erzielte eine Studie von LINDNER et al. (2019), bei der eine verbesserte und beschleunigte vestibuläre Kompensation durch das Extrakt der Ginkgo biloba-Pflanze (EGb 761) nachgewiesen wurde. Die Wirkung war unter anderem auf eine Modulation des zerebralen Glukosestoffwechsels in den vestibulären Kernen und deren neuronalen Netzwerken zurückzuführen.

Voraussetzung für weitere Therapiestrategien ist, die Mechanismen der vestibulären Kompensation genauer zu verstehen. Eine Behandlung sollte sowohl zu einer Linderung der akuten Symptome führen, als auch den Ablauf der Kompensation verbessern und beschleunigen.

5. Plastizitätsmechanismen

Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Gehirns, seine Struktur und Funktion an Veränderungen durch Lern- und Reifungsprozesse anzupassen. Pathologische Prozesse können ebenfalls zu Modulationen im ZNS führen. Die plastischen Umgestaltungen involvieren verschiedene Ebenen, von Molekülen bis zu gesamten Funktionssystemen. Neuronale Erneuerungen werden von Veränderungen des umgebenden unterstützenden Gewebes, wie z.B. der Gliazellen, begleitet (LLEDO et al., 2006).

5.1. Plastizität bei vestibulärer Kompensation

Die vestibuläre Kompensation stellt ein wichtiges Modell zur Investigation der molekularen und zellulären Plastizitätsmechanismen im ZNS dar (DE WAELE et al., 1996). Die verbesserte klinische Symptomatik trotz persistierendem peripher-vestibulären Schadens ist teilweise auf plastische Veränderungen in den deafferentierten Nuclei vestibulares im Hirnstamm oder den damit verbundenen Strukturen im ZNS zurückzuführen (SMITH & CURTHOYS, 1989; DARLINGTON & SMITH, 2000).

Im ipsiläsionalen medialen vestibulären Kern konnten nach unilateraler Labyrinthektomie (UL) erhöhte GABA-Konzentrationen festgestellt werden, die eng mit der einsetzenden Schwindelsymptomatik korrelierten. Auslöser ist vermutlich eine Hyperaktivität der inhibitorischen Neurone des vestibulären kommissuralen Systems (BERGQUIST et al., 2008). In den vestibulären Kernen tritt außerdem eine Veränderung der Expression von mitochondrialen und metabolisch aktiven Proteinen auf. Diese können auf molekularer Ebene die Plastizität und funktionelle Erholung des vestibulären Systems beeinflussen (PATERSON et al., 2006).

Eine Modulation von Synapsen in den Neuronen des superioren vestibulären Kerns konnte nach UL und Exzision des Vestibularganglions gefunden werden. Die

strukturellen Veränderungen korrelierten mit neurochemischen Modulationen und blieben bis zu zwei Jahre nach dem Eingriff bestehen (GACEK et al., 1998). Des Weiteren führte eine UL zu einer Aktivierung von Astrozyten in den ipsilateralen deafferentierten vestibulären Kernen. Astrozyten sind möglicherweise an der Wiedererlangung des physiologischen Ruhepotentials der Neuronen beteiligt (DE WAELE et al., 1996).

Darüber hinaus wurden mikrogliale Reaktionen (CAMPOS TORRES et al., 1999), sowie eine reaktive Neurogenese (TIGHILET et al., 2007) nach peripherer vestibulärer Schädigung nachgewiesen. Die Untersuchung der Neurogenese und der Mikrogliaaktivierung bei der vestibulären Kompensation sind Gegenstand dieser Arbeit, daher soll auf diese Plastizitätsmechanismen näher eingegangen werden.

5.2. Neurogenese

Adulte Neurogenese beschreibt den Produktionsprozess von neuen Neuronen im ausgewachsenen Gehirn, von der Teilung der Stamm- und Progenitorzellen bis zur funktionellen Integration. Der Grad der postnatalen Neurogenese sinkt mit steigender Gehirnkomplexität. Niedere Vertebraten (z.B. Eidechsen) sind in der Lage, durch zusätzlich gebildete Neuronen ganze Teile ihres Gehirns zu regenerieren (LLEDO et al., 2006). Bei Säugetieren ist die Entwicklung von Nervenzellen spätestens mit Eintritt in die Geschlechtsreife in den meisten Gehirnregionen abgeschlossen. Es existieren jedoch zwei Lokalisationen, in denen bei ausgewachsenen Individuen eine kontinuierliche Neurogenese stattfindet. Diese sogenannten neurogenen Nischen liegen in der subgranulären Zone (SGZ) im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der subventrikulären Zone (SVZ) an der Wand des lateralen Ventrikels im olfaktorischen System (KEMPERMANN, 2006). In der SVZ teilen sich neurale Stammzellen, wodurch Neuroblasten entstehen. Diese wandern entlang des rostralen migratorischen Stroms in Richtung Riechkolben (Bulbus olfactorius), wo sie sich weiter differenzieren können. Die SVZ ist die größte neurogene Zone, in der 10.000 bis 30.000 Neuronen am Tag entstehen können (LLEDO et al., 2006). In der SGZ des Hippocampus befinden sich Progenitorzellen, die dort nach ihrer Teilung zu granulären Neuronen des Gyrus dentatus reifen (LLEDO et al., 2006). Für den Hippocampus konnte nachgewiesen werden, dass bei adulten Mäusen ca. ein Neuron pro 2000 existierenden granulären Zellen im Gyrus dentatus produziert wird (KEMPERMANN et al., 1997).

Um eine neuronale Überproduktion zu vermeiden, unterliegt die Neurogenese einer strengen homöostatischen Regulation. Sie erfolgt unter anderem durch genetische

Programmierung der Vorläuferzellen, Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter, wie Dopamin, Serotonin, GABA und Glutamat.

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, der an drei verschiedene Rezeptoren binden kann (Typ A, B und C). Bei der Neurogenese regulieren GABA-Rezeptoren vom Typ A (GABA_AR) die Proliferation, Differenzierung, Migration und Integration der neugeborenen Zellen in neuronale Netzwerke. GABA_AR werden von Neuroblasten, Astrozyten-ähnlichen Zellen und ausgewachsenen Neuronen exprimiert (PLATEL et al., 2010; SERNAGOR et al., 2010). Aktivierte Mikroglia können im adulten Gehirn ebenfalls an einer Modulation der hippocampalen Neurogenese beteiligt sein (CHOI et al., 2008).

Eine Stimulation der Neurogenese im Hippocampus kann durch gesteigerte Bewegungsaktivität und die Haltung in angereicherter Umgebung (Spielzeug, Partner-tiere) erreicht werden (BROWN et al., 2003). Negative Erfahrungen, Stress und Schlafentzug führen zu einer verringerten Proliferation von Neuronen (LLEDO et al., 2006).

Durch verschiedene pathologische Veränderungen, wie Verletzungen oder Ischämien im Gehirn, kann auch außerhalb der neurogenen Nischen eine Neurogenese induziert werden (MAGAVI et al., 2000; KOKAIA & LINDVALL, 2003). Nach peripheren Deafferentierungen, z.B. durch Vagotomie, kann eine erhöhte Nervenzellproliferation in Hirnnervenkernen im Gehirnstamm ausgelöst werden (BAUER et al., 2005).

5.2.1. Neurogenese bei vestibulärer Kompensation

Nach unilateraler vestibulärer Neurektomie (UVN) konnte in den deafferentierten vestibulären Kernen eine erhöhte Zellproliferation ab Tag 3 post UVN bei Katzen festgestellt werden. Die meisten dieser neugeborenen Zellen differenzierten sich in Mikroglia, Astrozyten und GABAerge Neuronen (TIGHILET et al., 2007).

In den medialen, lateralen und inferioren vestibulären Kernen, die überwiegend für statische und dynamische Haltungsfunktionen zuständig sind, wurde die größte Anzahl neugeborener Neuronen gefunden. Im superioren Kern, der in die okulo-motorischen Funktionen involviert ist, konnte keine Neurogenese beobachtet werden (DUTHEIL et al., 2009). Eine Blockade der Zellproliferation post UVN durch Infusion antimitotischer Medikamente führte zu einer stark verzögerten Kompensation der Haltungs- und Bewegungsdefizite. Dieses Resultat spricht für eine große funktionelle Relevanz der neu generierten Zellen bei der vestibulären Kompensation. Ein verzögerter Abbruch der Neurogenese ab Tag 20 post UVN hat keinen Einfluss mehr auf die funktionelle Erholung. Die ersten drei Wochen scheinen den kritischen Zeitpunkt zu repräsentieren,

in dem die neuroplastischen Mechanismen, die zur Kompensation beitragen, stattfinden (DUTHEIL et al., 2009).

5.2.1.1. Hippocampale Atrophie und räumliche Orientierung

Der Hippocampus befindet sich im medialen Temporallappen und ist ein Teil des medialen, archilimbischen Systems. Letzteres ist für das allgemeine Gedächtnis und die Wahrnehmung von Gerüchen zuständig. Die Hippocampusformation besteht aus Gyrus dentatus, Ammonshorn (Cornu ammonis, CA) und Subiculum (BERLIT, 2011). Sie bildet im menschlichen Gehirn die wichtigste Struktur für Lernprozesse und Erinnerungen. Eine beidseitige partielle oder komplette Hippocampektomie führte bei einer Vielzahl von Patienten zu erheblichen Defiziten des Erinnerns (SCOVILLE & MILNER, 1957). Auch in tierexperimentellen Studien an Ratten traten nach bilateralen hippocampalen Läsionen starke Beeinträchtigungen des Gedächtnisses auf (ERGORUL & EICHENBAUM, 2004). Die adulte hippocampale Neurogenese scheint stark mit dem Gedächtnis und dem Erlernen von Aufgaben assoziiert zu sein. Es konnte eine reduzierte Proliferationsrate in der SGZ des Hippocampus bei älteren Makaken nachgewiesen werden, die eng mit einem verlangsamten und nachlassendem Lernverhalten korrelierte (AIZAWA et al., 2009).

Die Ortszellen im Hippocampus dienen der Navigation und räumlichen Orientierung. Hierdurch können Tiere nach weit zurückgelegten Strecken, selbst bei fehlenden visuellen Hinweisen, wieder an ihren Ausgangspunkt zurückfinden (ETIENNE & JEFFERY, 2004).

Ein beidseitiger chronischer Verlust von vestibulären Funktionen kann zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses führen, die von einer Atrophie des Hippocampus begleitet wird. MRT-Untersuchungen an Patienten mit bilateraler Vestibulopathie ergaben einen Verlust des Hippocampusvolumens von ca. 17%. Bei Tests der räumlichen Orientierung und Navigationsfähigkeit zeigten dieselben Personen starke Defizite ihres räumlichen Erinnerungsvermögens. Das allgemeine Gedächtnis und die Intelligenz waren nicht beeinträchtigt (BRANDT et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen Hippocampusatrophie und BV ist der fehlende Input aus den Vestibularorganen, der für die hippocampale Verarbeitung des räumlichen Gedächtnisses notwendig ist. Das vestibuläre System übermittelt sensorische Informationen für die dreidimensionale Wahrnehmung der Körperposition im Raum an den Hippocampus und kann dort die Aktivität der Ortszellen modulieren (SMITH, 1997). Durch elektrophysiologische Stimulation des vestibulären Labyrinthes

konnte nachgewiesen werden, dass die Informationen des Vestibularapparates einer Seite einen bilateralen Einfluss auf die hippocampale Aktivität und die Entladungsrate der dortigen Orszellen haben (CUTHBERT et al., 2000). Nach unilateralen vestibulären Läsionen konnte eine verringerte elektrische Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen festgestellt werden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl auf der ipsi-, als auch auf der kontraläsionalen Seite (ZHENG et al., 2003).

5.3. Mikrogliaaktivierung

Bei Mikroglia handelt es sich um einen speziellen Typ mononukleärer Makrophagen, die ca. 10% der Gesamtzellpopulation im Gehirn ausmachen. Sie werden als die Immunzellen des zentralen Nervensystems beschrieben. Klassischerweise werden Mikroglia in zwei Subtypen aufgeteilt. Im gesunden ZNS liegen sie als ruhende Zellen mit verzweigter Morphologie vor. Bei Verletzungen spricht man von aktivierten Mikroglia, die eine wandelbare Gestalt besitzen (BENARROCH, 2013). Basierend auf neueren morphologischen, molekularen und genetischen Untersuchungen, handelt es sich bei der Mikrogliaaktivierung nicht um ein Alles-oder-nichts-Prinzip. Die Anpassung der Mikroglia an Veränderungen der Mikroumgebung stellt einen kontinuierlichen Prozess dar. Nicht-aktivierte Mikroglia überwachen das umgebende Gehirnparenchym und dienen als Sensoren für pathologische Veränderungen. Sie leisten einen erheblichen Beitrag zu einem stabilen homöostatischen Gleichgewicht im ZNS (HANISCH & KETTENMANN, 2007).

Mikroglia besitzen eine Vielzahl unterschiedlichster Rezeptoren, bspw. für Neurotransmitter, Peptide, Zytokine, Chemokine oder Komplementfaktoren. Ihre Aktivierung erfolgt durch chemische Signale, worauf sie mit der Produktion bestimmter Effektormoleküle reagieren können. Aktivierte Mikroglia sind sehr plastische Zellen, die in diversen Phänotypen auftreten können und je nach Stimulus verschiedenste Funktionen ausüben. Sie modulieren Reaktionen des Immunsystems, betreiben Phagozytose und können durch Ausschüttung pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine eine Entzündung sowohl provozieren als auch lindern. Des Weiteren haben sie durch die Produktion von Wachstumsfaktoren eine neuroprotektive Wirkung. Eine Abgabe von zytotoxischen Substanzen ist ebenfalls möglich (BENARROCH, 2013).

Mikroglia spielen eine wichtige Rolle in der Gehirnplastizität, da sie unter anderem die Ausschüttung von Neurotransmittern modulieren können und an der Entwicklung von Synapsen beteiligt sind (WU et al., 2015). Je nach Pathologie können sie außerdem die Neurogenese beeinflussen. Entzündungs-assoziierte Mikroglia sind für eine

Verringerung der Proliferationsrate verantwortlich. Mikroglia, die durch Zytokine spezieller T-Helfer-Zellen aktiviert wurden, üben hingegen einen unterstützenden Effekt auf die Produktion von Neuronen aus (HANISCH & KETTENMANN, 2007).

Eine Mikrogliaaktivierung konnte in verschiedensten neurologischen Störungen, wie Ischämien, Traumata, infektiösen Erkrankungen, Gehirntumoren und neurodegenerativen Krankheiten nachgewiesen werden. Aufgrund der vielseitigen Funktionen und Wirkungsmechanismen kann dies sowohl positive, als auch negative Effekte auf den Krankheitsverlauf haben (BENARROCH, 2013).

In vivo kann eine Mikrogliaaktivierung und deren Lokalisation mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dargestellt werden. Aktivierte Mikroglia erhöhen die Expression bestimmter Rezeptoren, wie zum Beispiel des Translocator Proteins 18kDa (TSPO). Radioaktiv markierte TSPO-Liganden können als Biomarker für die Detektion aktivierter Mikroglia eingesetzt werden (BANATI, 2002).

5.3.1. Translocator Protein 18kDa (TSPO)

Bei TSPO handelt es sich um ein hydrophobes Rezeptorprotein mit fünf Transmembrandomänen. Es ist in der äußeren mitochondrialen Membran von Zellen lokalisiert. In früheren Publikationen wird es meist als peripherer Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) bezeichnet. Aufgrund neuer Erkenntnisse bezüglich seiner Struktur und molekularen Funktion wurde von PAPADOPOULOS et al. (2006) diese neue Nomenklatur (TSPO) vorgeschlagen.

TSPO wird hauptsächlich in Geweben exprimiert, in denen Steroide synthetisiert werden (z.B. Nebennieren, Gonaden und Gehirnzellen) (PAPADOPOULOS et al., 2006). Neurosteroid sind Signalmoleküle, die der Modulation von neuraler Entwicklung und Funktion dienen. Sie können auf pathologische Veränderungen reagieren und fungieren als Mediatoren bei der Kommunikation zwischen Gliazellen und Neuronen. Im ZNS erfolgt die Produktion und Metabolisierung von Neurosteroiden primär in Neuronen, aktivierter Mikroglia und reaktiven Astrozyten. In diesen neuroendokrinen aktiven Zellen ist die höchste TSPO-Expression zu finden. (GARCIA-SEGURA & MELCANGI, 2006).

Die wichtigste bekannte Funktion von TSPO ist der Cholesterin-Transport von der äußeren in die innere mitochondriale Membran (RUPPRECHT et al., 2010). TSPO besitzt eine zytoplasmatische Domäne, welche die Aminosäure-Sequenz von Cholesterin erkennt und dessen Translokation ermöglicht. Dies stellt den ersten und limitierenden Schritt bei der Neurosteroidsynthese dar. In der mitochondrialen Matrix

befindet sich die Cholesterin-Monooxygenase (P450scc), die die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenalon katalysiert. Pregnenalon ist eine Hormonvorstufe, aus der alle weiteren Steroidhormone synthetisiert werden können (z.B. Progesteron, Testosteron, Mineral- und Glukokortikoide) (Abbildung 2) (HU et al., 2010).

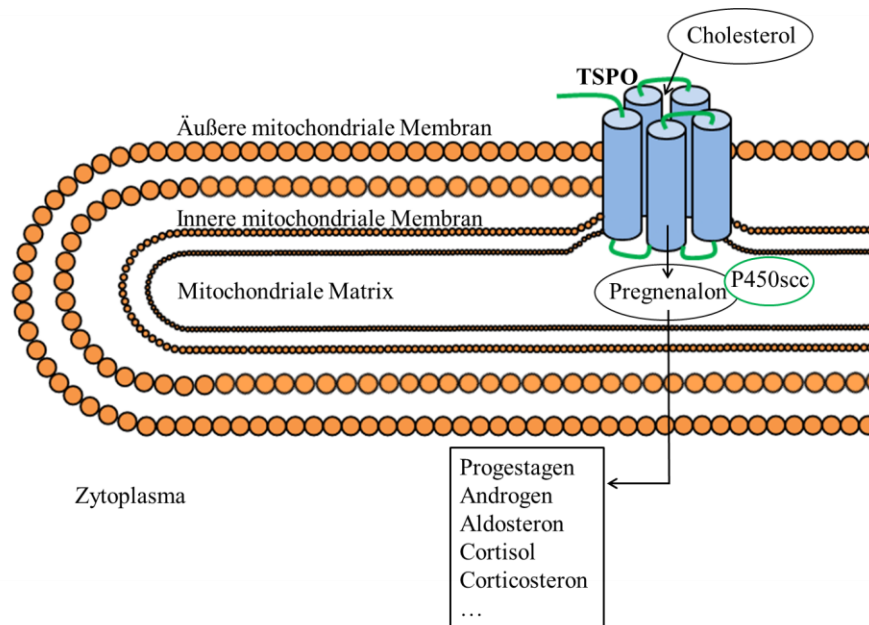


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TSPO-Lokalisation auf der äußeren mitochondrialen Membran. TSPO ermöglicht die Translokation von Cholesterin vom Zytoplasma in das Mitochondrium. Dort wird es durch P450scc zu Pregnenalon synthetisiert. Pregnenalon kann in diverse Steroidhormone umgewandelt werden. In Anlehnung an PAPADOPOULOS et al. (2006).

Im gesunden Gehirn ist die TSPO-Expression relativ gering. Sie wird bei pathologischen Veränderungen lokal in den geschädigten Regionen hochreguliert. Ein starker Anstieg des TSPO-Niveaus ist beispielsweise bei Läsionen des peripheren Nervensystems, Gehirnverletzungen, neurodegenerativen Erkrankungen (bspw. Alzheimer, Multiple Sklerose, Parkinson) und Gehirntumoren zu beobachten (RUPPRECHT et al., 2010).

Radioaktiv-markierte TSPO-Liganden (z.B. $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$) können als sensitive Biomarker für entzündliche Prozesse im ZNS und chronische Neurodegeneration dienen. Durch in vivo-Quantifizierung der TSPO-Bindung können Ausmaß, Lokalisation und zeitlicher Verlauf von Erkrankungen visualisiert werden. Des Weiteren können Evaluationen von Therapiestudien vorgenommen werden (CHAUVEAU et al., 2008).

Neben den diagnostischen Möglichkeiten ist TSPO ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt zur Behandlung von neurologischen und psychiatrischen Störungen. Die Gabe synthetischer TSPO-Liganden führte in diversen Studien zu positiven Effekten auf die neuronale Viabilität, regenerative Prozesse und neuroinflammatorische Reaktionen. Sie können unter anderem die Neurosteroidsynthese und die Bildung von Wachstumsfaktoren erhöhen. Des Weiteren wirken sie neuroprotektiv und führen zu einer Reduktion von Neuroinflammation und Gliose (RUPPRECHT et al., 2010).

5.3.2. Mikrogliaaktivierung bei vestibulärer Kompensation

Nach funktioneller Deafferentierung von vestibulären Neuronen konnte histochemisch eine Mikrogliaaktivierung ab Tag 1 post OP nachgewiesen werden. Diese Reaktion trat nur auf der ipsiläsionalen Seite und nicht bei Sham-operierten Tieren auf. Die Verteilung der mikroglialen Reaktion war in allen vier vestibulären Subkernen homogen. Die Zelldichte der aktivierten Mikroglia erreichte ihren Höchstwert an Tag 14 post OP und blieb bis über die sechste Woche hinaus über den physiologischen Werten (CAMPOS TORRES et al., 1999).

Durch den TSPO-Liganden [¹⁸F]GE180, der diagnostisch als Radiotracer angewendet wird, kann die Mikrogliaaktivierung in vivo mittels PET bildgebend dargestellt werden. Bei unilateral labyrinthektomierten Ratten wurde ein erhöhter [¹⁸F]GE180-Uptake im ipsiläsionalen vestibulären Kerngebiet an den Tagen 7 und 15 post UL festgestellt. Die TSPO-Aktivität korrelierte mit der vestibulären Kompensation der Tiere im Verhaltenstest. Es ist anzunehmen, dass die Mikrogliaaktivierung einen positiven Effekt auf die klinische Symptomatik hat (ZWERGAL et al., 2017).

Die Mechanismen, die eine Mikrogliaaktivierung auslösen, sind weitestgehend unklar. Eine Degeneration oder Apoptose von vestibulären Neuronen, die durch Signalmoleküle eine mikrogliale Reaktion induzieren könnten, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Unterbrechung des Ruhepotentials der primären Neuronen könnte eine Blockade des axonalen Transportes auslösen, wodurch die mikrogliale Reaktion provoziert wird. Auch eine Modulation der Mikroumgebung könnte zu dem Mechanismus der Mikrogliaaktivierung beitragen (CAMPOS TORRES et al., 1999).

Eine mögliche Wirkung der Mikroglia ist die Induktion einer astrozytären Aktivierung, die ebenfalls nach UL beobachtet wurde. Aktivierte Mikroglia geben Mitogene für Astrozyten ab, während eine Blockade von Mikroglia zu einer Inhibition von Astroglia führt (DE WAELE et al., 1996).

Des Weiteren können Mikroglia Synapsen von visuellen und propriozeptiven Afferenzen modulieren, welche die fehlenden vestibulären Informationen teilweise substituieren (CAMPOS TORRES et al., 1999).

Aktivierete Gliazellen exprimieren vermehrt zell-regulatorische Substanzen wie pro- und/oder anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche als Signalmoleküle zwischen Mikroglia, Astrozyten und Neuronen interagieren. Durch transneuronalen Veränderungen könnten Mikroglia einer Degeneration von vestibulären Neuronen entgegenwirken und zur Wiedererlangung des Gleichgewichtes zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission in den vestibulären Kernen beitragen (CAMPOS-TORRES et al., 2005).

6. Etifoxin

Etifoxin (2-ethylamino-6-chloro-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazin) ist eine nicht-benzodiazepine Verbindung, die chemisch zur Familie der Benzoxazine gehört (BOUILLOT et al., 2016). Seit 1982 ist Etifoxin (Stresam®) in Frankreich zur Behandlung von Angststörungen in der Humanmedizin zugelassen. Die anxiolytische und antikonvulsive Wirkung zeigt erfolgreiche Therapieergebnisse (NGUYEN et al., 2006). Etifoxin stellt eine gute Alternative zu Benzodiazepinen dar, die ebenfalls bei psychischen Erkrankungen angewandt werden. Im Gegensatz zu Benzodiazepinen sind bei Etifoxin keine unerwünschten Nebenwirkungen, wie Sedation, Amnesie, Toleranz und Abhängigkeit, bekannt (BOUILLOT et al., 2016).

6.1. Wirkungsprinzip

Der anxiolytische Effekt von Etifoxin beruht auf einer vermehrten Ausschüttung von GABA, dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS. Die Wirkung erfolgt über einen allosterischen Effekt an den GABA_A-Rezeptoren, sowie durch einen indirekten Mechanismus mittels TSPO-Aktivierung (SCHLICHTER et al., 2000).

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Pentamer und besteht aus mehreren Untereinheiten, die einen Chlorid-Kanal (Cl⁻-Kanal) formen. Der Rezeptor besitzt außerdem verschiedene Bindungsstellen für Benzodiazepine, Barbiturate und Neurosteroiden. Diese Stoffe können die Aktivität des Cl⁻-Kanals modulieren und die Bindung von GABA erleichtern. Für Etifoxin konnte ebenfalls eine Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor nachgewiesen werden. Sie liegt vermutlich direkt am Cl⁻-Kanal oder in dessen Nähe. Durch Interaktion von Etifoxin und dem Cl⁻-Kanal kann der positive Effekt von GABA auf die Anxiolyse verstärkt werden (VERLEYE et al., 1999; SCHLICHTER et al.,

2000; VERLEYE et al., 2002). Der Bindungsort von Etifoxin unterscheidet sich von dem von Benzodiazepinen, da die Gabe des Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil die Wirkung von Etifoxin nicht beeinflusst (VERLEYE et al., 1999). GABA_A-R-Agonisten verstärken die Wirkung von Etifoxin, während Antagonisten einen hemmenden Einfluss besitzen. Die GABA_A-R-Funktion wird potenziert, sodass die GABAerge Transmission erleichtert wird (UGALE et al., 2007).

Neben der Wirkung am GABA_AR besitzt Etifoxin eine hohe Affinität zu TSPO. Die Bindung von Etifoxin an das Translocator-Protein führt zu dessen Aktivierung. Der Cholesterol-Transport in die Mitochondrien wird gesteigert, wodurch die Neurosteroidsynthese erhöht wird. Experimentell konnte nach einer Behandlung mit Etifoxin eine Erhöhung des Gehirn- und Plasmaspiegels der Steroide Pregnenolon, Progesteron, 5 α -Dihydroprogesteron und Allopregnanolon nachgewiesen werden (VERLEYE et al., 2005).

Bei Versuchen mit Ratten in einem Elevated Plus Maze zeigte sich eine dosisabhängige anxiolytische Wirkung von Etifoxin, die durch eine zusätzliche Gabe von Allopregnanolon, dem potentesten endogenen Neurosteroid, verstärkt werden konnte. Eine Inhibition der Neurosteroid-Biosynthese verringert die Etifoxin-Wirkung, was deren Beteiligung am Wirkungsmechanismus unterstreicht (UGALE et al., 2007).

Eine Studie von WOLF et al. (2015) konnte zeigen, dass zwischen der TSPO-Bindungsaffinität von Etifoxin und deren Einfluss auf die Pregnenolon-Synthese keine Korrelation vorliegt. Obwohl es nicht zu einer TSPO-Hochregulation kommt, wurde die Produktion von Neurosteroiden stark erhöht. Es lässt sich daher über die Bindungsaffinität eines TSPO-Liganden keine Aussage über dessen pharmakologische Wirkung treffen.

6.2. Therapeutische Möglichkeiten

Neben der anxiolytischen Behandlung ist Etifoxin eine vielversprechende Therapiemöglichkeit bei Neurodegenerationen oder ZNS-Läsionen.

Die Gabe von Etifoxin bei multipler Sklerose führte im Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion der TSPO-Expression und der aktivierten Mikroglia. Des Weiteren verringerte Etifoxin die Immunantwort gegen Oligodendrozyten, wodurch der bei der multiplen Sklerose auftretenden Demyelinisierung von Axonen vorgebeugt werden kann. Eine entzündungshemmende Wirkung konnte durch Reduktion der proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ und der Interleukine (IL) IL-1 β , IL-6 und IL-17 gezeigt werden. Die Effekte wirkten sich allesamt positiv auf die klinische

Symptomatik der Tiere aus (DAUGHERTY et al., 2013; RAVIKUMAR et al., 2016). Bei der Behandlung von Zellkulturen konnten außerdem neuroprotektive Eigenschaften des TSPO-Liganden nachgewiesen werden (RAVIKUMAR et al., 2016).

Bei der kurativen und präventiven Therapie von Gehirnödemen im Tierversuch führte die Gabe von Etifoxin zu einer Reduktion von Flüssigkeit und Elektrolytkonzentration im Gehirn. Die Effekte korrelierten mit einer mildereren Symptomatik der neurologischen Defizite (GIRARD et al., 2009).

Etifoxin beschleunigt außerdem die axonale Regeneration bei peripheren Nervenläsionen, wodurch die funktionelle Erholung schneller erreicht wird (GIRARD et al., 2008). Durch Erhöhung der Allopregnanolon-Synthese kann Etifoxin neuropathische Schmerzen reduzieren (AOUAD et al., 2009).

Traumatische Gehirnverletzungen können ebenfalls eine Indikation für Etifoxin sein. Gehirutraumata führen unter anderem zu einer Aktivierung residenter Mikroglia und Astrozyten, der Produktion von Zytokinen und Chemokinen, sowie zu einer Dysregulation der TSPO-Level. Etifoxin konnte diese Effekte im Rattenmodell verhindern oder stark reduzieren, wodurch es zu einer signifikanten Verbesserung der funktionellen Beeinträchtigung kam. Nach Schädel-Hirn-Traumata erfolgt eine exzessive Freisetzung von erregenden Neurotransmittern, wie Acetylcholin und Glukose. Dem kann durch die Etifoxin-Wirkung am inhibitorischen GABA_A-Rezeptor entgegen gewirkt werden (SIMON-O'BRIEN et al., 2016).

Nach zerebraler Ischämie konnte eine Etifoxin-Behandlung das Infarktvolumen verringern und neurologische Störungen mildern. Hierbei wurde ebenfalls eine Reduktion von Mikroglia, infiltrierenden Leukozyten und Zytokinen festgestellt (LI et al., 2017).

Die Modulation der Mikrogliaaktivierung durch Etifoxin könnte eine vielversprechende Wirkung auf den funktionellen Kompensationsverlauf bei unilateralen peripheren Schwindelerkrankungen darstellen.

7. Positronen-Emissions-Tomographie

7.1. Physikalische Grundlagen

7.1.1. Radioaktivität

Jedes Atom setzt sich aus einer Atomhülle und einem Kern zusammen. Die Hülle besteht aus elektrisch negativ geladenen Elektronen (e^-). Im Atomkern befinden sich positiv geladene Protonen (p^+) und ungeladene Neutronen (n). Die Kernteilchen werden zusammen als Nukleonen bezeichnet. Die Anzahl der Protonen (Ordnungszahl) ist in

jedem Atom eines Elementes konstant. Es können jedoch unterschiedliche Atome des gleichen chemischen Elementes existieren, die sich durch die Anzahl ihrer Neutronen unterscheiden. Atome mit gleicher Ordnungszahl, aber verschiedener Neutronenanzahl, werden als Isotope bezeichnet. Der Begriff Nuklid beschreibt Atomkernarten, die sich von anderen Atomkernen aufgrund ihrer Nukleonenzahl (Massenzahl) unterscheiden. Für die Kennzeichnung von Nukliden wird die Massenzahl vor dem Element angegeben (BANNWARTH et al., 2007). Die Schreibweise ^{18}F bezeichnet beispielsweise ein Fluoratom, das 18 Nukleonen besitzt.

Das Verhältnis zwischen Protonen und Neutronen bestimmt, ob ein Kern in stabilem oder instabilem Zustand vorliegt. Bei leichten Kernen ist ca. ein Neutron pro Proton zur Stabilität notwendig. Schwerere Kerne benötigen einen Neutronenüberschuss. Instabile Kerne versuchen ein besseres Gleichgewicht zu erreichen, indem sie Teilchen und Strahlung abgeben. Die spontane Umwandlung von Atomkernen wird als Radioaktivität oder als radioaktiver Zerfall bezeichnet (HEIDE & STACHEL, 2009). Die Aktivität eines radioaktiven Stoffes beschreibt die Anzahl der Zerfälle pro Sekunde. Sie wird mit der SI-Einheit Becquerel (Bq) angegeben. Oftmals ist noch die ältere Einheit, Curie (Ci), in der Literatur zu finden. 1 Ci entspricht $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq, der Aktivität von einem Gramm Radon (^{226}Ra) (KRUISZ & HITZENBERGER, 2011).

7.1.2. Halbwertszeit

Beim radioaktiven Zerfall handelt es sich um einen zufallsbedingten stochastischen Prozess. Es ist keine Vorhersage über den Zeitpunkt möglich, zu dem sich ein einzelnes Atom umwandelt. Betrachtet man eine Vielzahl von Atomen der gleichen Art, lässt sich anhand von mathematischen Gesetzmäßigkeiten jedoch berechnen, wie viele Kerne nach einer bestimmten Zeit zerfallen sein werden (HARTEN, 1985). Die Zeit, in der die Hälfte dieser Atome zerfällt, wird als Halbwertszeit (HWZ, $t_{1/2}$) bezeichnet. Die Anzahl der Kerne nimmt bei radioaktivem Zerfall exponentiell mit der Zeit ab (Abbildung 3). Diese Zahl ist von der Menge der instabilen Kerne und der Zerfallskonstante des Nuklids abhängig (BAILEY et al., 2005).

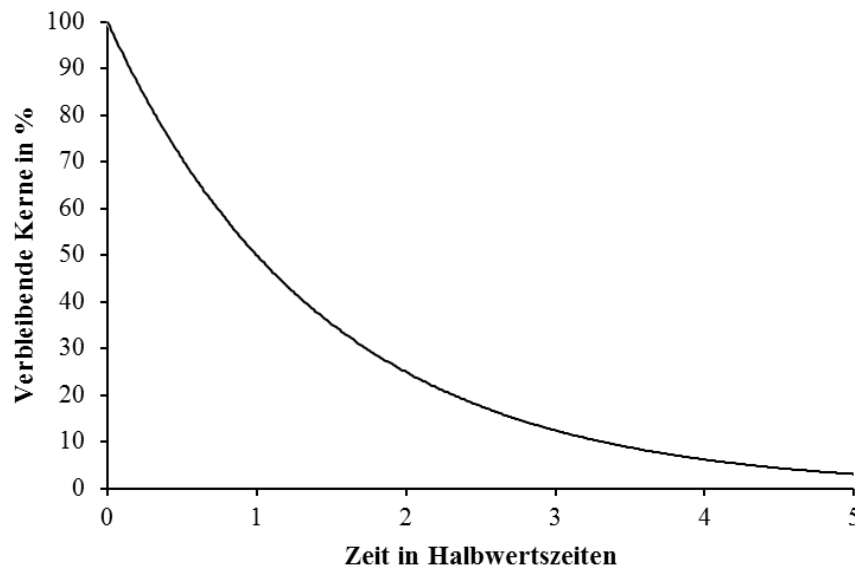


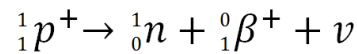
Abbildung 3: Exponentielle Funktion des radioaktiven Zerfalls. Nach einer Halbwertszeit sind 50% der Atomkerne zerfallen, nach zwei HWZ sind noch 25% der Kerne vorhanden. In Anlehnung an BAILEY et al. (2005).

Beim diagnostischen und therapeutischen Einsatz radioaktiver Stoffe muss neben der physikalischen HWZ auch die biologische HWZ berücksichtigt werden. Sie beschreibt die Zeit, die der Organismus benötigt, um die zugeführte Substanz zu verstoffwechseln. Aus der biologischen und der physikalischen HWZ ergibt sich die effektive HWZ. Sie beschreibt die Verringerung der Aktivität durch den Zerfall, sowie durch die Ausscheidung (HARTEN, 1985). Dies ist vor allem zu beachten, wenn beim Patienten Transport- oder Stoffwechselstörungen vorliegen, da die Strahlenbelastung durch einen verminderten Abbau im Organismus stark ansteigen kann. In der Medizin ist die Anwendung langlebiger Nuklide nur unbedenklich, wenn sie eine kurze biologische HWZ besitzen (TRITTHART & DEVANEY, 2011).

7.1.3. β^+ -Zerfall

Beim Zerfall von Nukliden wird radioaktive Strahlung abgegeben (Emission). Je nachdem, welche Teilchen frei werden, wird zwischen α -, β - und γ -Strahlung unterschieden. Für die Messung im PET ist die Abgabe von β^+ -Teilchen (Positronen) relevant. Diese Zerfallsart tritt nur bei künstlich erzeugten Radionukliden auf (TRITTHART & DEVANEY, 2011). In ihrem Kern herrscht ein Überfluss an Protonen. Das Atom erreicht seine Stabilität, indem es ein überschüssiges Proton in ein Neutron und in ein Positron umwandelt. Bei diesem Vorgang entsteht zusätzlich ein

Neutrino (ν). Das Neutron bleibt im Kern zurück, während Positron und Neutrino emittiert werden. Die Nukleonenzahl bleibt im Tochterkern konstant, die Ordnungszahl nimmt hingegen ab (HEIDE & STACHEL, 2009):



Das frei gewordene Positron stößt nach dem Austritt aus dem Kern mit einem Elektron zusammen. Durch das Zusammentreffen wird Materie in elektromagnetische Strahlung umgewandelt (Annihilation, Vernichtungsstrahlung). Dabei werden zwei Photonen mit einer charakteristischen Energie von jeweils 511 keV im Winkel von 180° zueinander emittiert (BAILEY et al., 2005).

7.2. Medizinische Anwendung

Die nuklearmedizinische Bildgebung ermöglicht die Darstellung von Stoffwechselfvorgängen und physiologischen Funktionen. Sie kann als Alternative oder Ergänzung zu anderen bildgebenden Verfahren, mit denen sich anatomische Strukturen im Körper darstellen lassen (z.B. MRT oder CT), genutzt werden. Beim PET werden den Patienten radioaktiv markierte Substanzen (Radiotracer) verabreicht. Die über Annihilation emittierten Positronen werden aufgezeichnet, sodass der Weg des Tracers im Organismus verfolgbar ist. Physiologische Vorgänge, wie Blutfluss, Glukose-metabolismus oder Eigenschaften von Rezeptorbindungen können quantitativ gemessen werden (OLLINGER & FESSLER, 1997). Die größte diagnostische Bedeutung findet die PET in der Onkologie. Sie ist eine sensitive Methode zur Beurteilung von Tumorlokalisierung und -wachstum, Metastasen oder dem Ansprechen auf Therapien. Außerdem wird die PET in der Kardiologie z.B. zur Darstellung von Herzmuskel-perfusionen genutzt. Auch in der Neurologie sind PET-Untersuchungen von immer größer werdender Bedeutung. Aufzeichnungen des Gehirns können Aufschlüsse über neurologische Erkrankungen, wie Epilepsie oder Demenz geben (BAILEY et al., 2005). In der Forschung ist die Nutzung des hochauflösenden mikroPETS (μ PET) von wachsender Relevanz. Die Messung der Traceraufnahme und -verteilung in Mäusen und Ratten wird unter anderem in der Neuropharmakologie eingesetzt. Dabei kann beispielsweise der neuronale Metabolismus, die Aktivität und Quantität von Gehirnrezeptoren oder Neurotransmitterfreisetzungen visualisiert werden (LANCELOT & ZIMMER, 2010).

7.2.1. Funktion und Aufbau des PET

Bei der PET-Untersuchung werden Radioaktivitätsverteilungen im Organismus gemessen. Radioaktive Isotope, beispielweise ^{11}C (Kohlenstoff), ^{13}N (Stickstoff), ^{15}O (Sauerstoff) oder ^{18}F (Fluor), werden mit Molekülen, deren biologische Eigenschaften bekannt sind, markiert. Dieser Radiotracer wird dem Patienten intravenös injiziert. Im Körper kommt es zum β^+ -Zerfall, bei dem ein Positron emittiert wird. Es kollidiert mit einem Elektron, sodass durch die Annihilation zwei Photonen frei werden. Im PET-Scanner befinden sich ringförmig angelegte, unbewegliche Detektoren, mit denen die koinzident gebildeten Photonen registriert werden (Abbildung 4). Da die Quanten im 180° -Winkel voneinander emittiert werden, liegt der Ort der Annihilation auf einer geraden Linie, die als „line of response“ (LOR) bezeichnet wird (OLLINGER & FESSLER, 1997). Zu beachten ist, dass nicht nur die echten Koinzidenzen aufgezeichnet werden, sondern auch Falschinformationen entstehen können. Dies geschieht beispielsweise, wenn zwei Photonen, die nicht im selben Annihilationsereignis entstanden sind, zufällig gleichzeitig aufgezeichnet werden („randoms“, engl.: zufällig). Des Weiteren können die Photonen auf ihrem Weg zum Detektor aus ihrer Richtung abgelenkt werden, sodass sie nicht mehr im 180° -Winkel zu ihrem korrespondierenden Teilchen auftreffen und einer falschen LOR zugeordnet werden (Streuungsfehler). Mittels mathematischer, computergestützter Verfahren können diese Messfehler bis zu einem gewissen Grad eliminiert werden. Neben der Emission erfolgt während des Scans zusätzlich eine Transmissionsmessung, bei der der Patient von einer Strahlenquelle im PET durchdrungen wird. Anhand des Intensitätsverlustes beim Strahlendurchgang wird die Schwächung der LOR durch den Patienten gemessen (SCHICHA & SCHOBER, 2013).

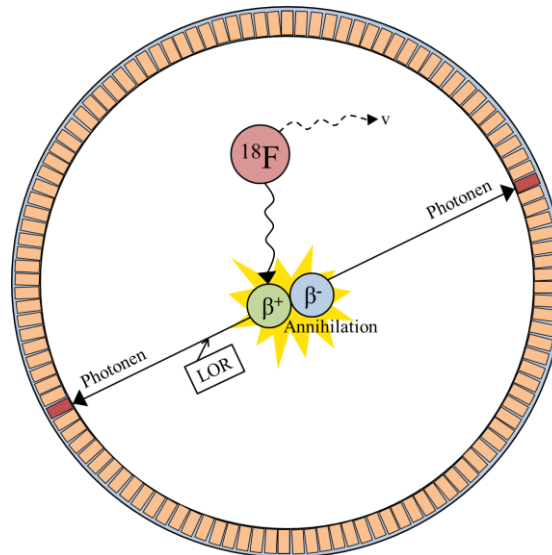


Abbildung 4: Schematische Darstellung des PET. Das ^{18}F -markierte Radiodiagnostikum unterliegt dem β^+ -Zerfall. Ein Positron (β^+) wird emittiert und annihiliert mit einem Elektron (β^-). Zwei Photonen werden in einem 180° -Winkel zueinander emittiert, die vom Detektorring des PET aufgezeichnet werden. Die Linie zwischen den detektierten Photonen wird als „line of response“ (LOR) bezeichnet. In Anlehnung an LANCELOT and ZIMMER (2010).

7.2.2. $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$ (Flutriciclamid)

Bei der medizinischen Anwendung werden die meisten PET-Radiotracer mit ^{18}F markiert. Vorteilhaft ist unter anderem die relativ kurze HWZ von 110 Minuten, mit der sich der Stoff gut handhaben lässt und schnell abgebaut wird. Andererseits ist die HWZ immer noch lang genug, sodass ein Transport über mehrere Stunden möglich ist (MILLER et al., 2008).

Für entzündliche und degenerative Veränderungen im ZNS werden TSPO-spezifische Liganden im PET eingesetzt. Pathophysiologisch kommt es zu einer Aktivierung von Mikroglia, die ihre TSPO-Expression erhöhen (CHING et al., 2012). Als Surrogatmarker für Neuroinflammation wurde lange Zeit der ^{11}C -markierte TSPO-Ligand PK11195 genutzt. Aufgrund des hierbei auftretenden geringen Signal-Rausch-Verhältnisses durch unspezifische Bindungen und der kurzen HWZ von ^{11}C ($t_{1/2} = 20,38$ min) wurden TSPO-Marker der zweiten Generation eingeführt. Deren präklinische Ergebnisse ließen sich jedoch bei der Untersuchung von Menschen nicht reproduzieren. Flutriciclamid ($[^{18}\text{F}]\text{GE180}$) ist ein Tracer der dritten Generation, der in präklinischen Modellen von Schlaganfall und ZNS-Entzündungen etabliert wurde (WADSWORTH et al., 2012). Im Vergleich zu $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ weist $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$ ein signifikant höheres Bindungspotential und ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis auf. Die Quantifizierung von $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$ spiegelt die TSPO-Expression daher präziser

wieder als [¹¹C]PK11195 (DICKENS et al., 2014; BOUTIN et al., 2015). Die Anwendung in der Humanmedizin erzielt erfolgreiche Ergebnisse (FAN et al., 2016).

7.2.3. [¹⁸F]FLT (Desoxyfluorothymidin)

[¹⁸F]FLT kann in der PET als Tracer zum Nachweis für Zellproliferation in vivo eingesetzt werden. Die Anwendung erfolgt vor allem in der Onkologie zur Diagnosestellung und Beobachtung des Tumorwachstums während der Therapie. Dabei gilt es als gute Alternative zu [¹⁸F]FDG, welches zur Darstellung des Glukose-metabolismus genutzt wird. FDG ist jedoch kein selektiver Tracer für Tumorzellen, da Glukose ebenfalls von anderen Zellen verstoffwechselt wird, wodurch ein starkes Hintergrundsignal entsteht. Bei FLT handelt es sich um einen selektiveren Marker für die Zellproliferation, weil es sich direkt in die DNA von synthetisierenden Zellen einbaut (SHIELDS et al., 1998). Durch die intrazelluläre Phosphorylierung von FLT durch die Thymidin-Kinase 1 (TK) kommt es zum Einschluss von FLT in den Zellkern. TK wird während der zellulären Proliferation in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus vermehrt exprimiert. Zum Zeitpunkt der DNA-Synthese steigt die TK-Aktivität um ca. das zehnfache an (SHERLEY & KELLY, 1988). An dem intrazellulären Verbleib von FLT kann die TK-Expression gemessen und die Proliferationsrate quantifiziert werden. Ein selektiver [¹⁸F]FLT-Uptake konnte bspw. bei gesunden Hunden im Knochenmark, einem Gewebe mit hoher Zellteilungsrate, gezeigt werden. Hunde mit Tumoren, sowie menschliche Patienten mit Lungenkrebs, zeigten eine erhöhte [¹⁸F]FLT-Aufnahme im Tumorgewebe (SHIELDS et al., 1998). Der Goldstandard zum Nachweis adulter Neurogenese in der Forschung ist die Immunhistologie. Sie hat den Nachteil, dass meist viele Versuchstiere genutzt werden müssen, weil keine longitudinalen Beobachtungen am selben Tier durchgeführt werden können. Die erste in vivo Darstellung von Neurogenese gelang mittels [¹⁸F]FLT- μ PET, bei dem die Differenzierung neuronaler Stammzellen im gesunden Gehirn nachgewiesen wurde. Des Weiteren konnte eine Mobilisierung der neugebildeten Zellen durch Pharmaka und fokale zerebrale Ischämien stimuliert werden (RUEGER et al., 2010). Die Quantifizierung einer reduzierten Neurogeneserate ist hingegen limitiert, da die Differenz der [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den neurogenen Nischen im Vergleich zu anderen Gehirnregionen sehr niedrig ist. Durch die Gabe von Probenecid, einem Inhibitor von Transportern an der Blut-Hirn-Schranke (ATP-binding cassette (ABCC) und organischer Anionentransporter 3 (OAT3)), kann die Akkumulation von [¹⁸F]FLT im Gehirn dosisabhängig erhöht werden (TAMURA et al., 2016).

8. Arbeitshypothesen

Die vestibuläre Kompensation ist ein komplexer Prozess, dessen genaue Mechanismen bezüglich der zerebralen Plastizität teilweise noch unklar sind. Ziel dieser Arbeit ist daher, die Mikrogliaaktivierung und die Neurogenese nach unilateraler Labyrinthektomie zu erforschen, um das Verständnis dieser Vorgänge, ihre Dynamik und deren Einfluss auf die klinische Symptomatik zu erleichtern und somit Ansatzpunkte für Therapiestrategien zu erkennen.

Diese Dissertation gliedert sich in die zwei Studienabschnitte „Plastizitätsmechanismen“ und „Therapiestudie Etifoxin“, deren Hypothesen im Folgenden näher erläutert werden.

8.1. Plastizitätsmechanismen

Die Untersuchung der Plastizitätsmechanismen bei vestibulärer Kompensation beinhaltet in dieser Arbeit die Erforschung der Neurogenese, räumlicher Orientierung und Mikrogliaaktivierung.

8.1.1. Neurogenese

Die Neurogenese stellt einen wichtigen Plastizitätsmechanismus bei der vestibulären Kompensation dar. Durch unilaterale Neurektomie konnte eine erhöhte Zellproliferationsrate in den vestibulären Kernen im Hirnstamm festgestellt werden (TIGHILET et al., 2007). Die longitudinalen Veränderungen der Neurogenese nach UL sollten in dieser Studie mithilfe von [¹⁸F]FLT- μ PET-Scans untersucht werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die μ PET-Messungen in vivo zu jedem Zeitpunkt an denselben Tieren durchgeführt werden können. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit können präzisere Ergebnisse und eine erhebliche Reduktion der Tierzahl erreicht werden. Als Alternative zu histologischen Untersuchungen könnte somit ein großer Beitrag zum Tierschutz geleistet werden (drei R-Prinzip). Da [¹⁸F]FLT ein für die Darstellung der Neurogenese relativ neuer Tracer ist, wurden zusätzlich immunhistologische Analysen mittels BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) durchgeführt, um die Ergebnisse dieser Methode zu verifizieren.

8.1.2. Räumliches Gedächtnis

Patienten mit bilateraler Vestibulopathie zeigen Beeinträchtigungen in der räumlichen Orientierung und im räumlichen Gedächtnis, die von einer Atrophie des Hippocampus begleitet werden. Inwieweit eine unilaterale Vestibulopathie zu einer verringerten Neurogeneserate im Hippocampus und einem Defizit des räumlichen Gedächtnisses

führt, wurde in dieser Arbeit mittels T-Maze, Immunhistologie und [¹⁸F]FLT-μPET untersucht.

8.1.3. Mikrogliaaktivierung

Im Rattenmodell der unilateralen Vestibulopathie konnte in vivo mittels μPET eine Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern und Nerv nachgewiesen werden (ZWERGAL et al., 2017). In der vorliegenden Studie soll dies anhand weiterer [¹⁸F]GE180-μPET-Scans eingehender analysiert werden, um eine Verknüpfung zu den vestibulären Defiziten und der funktionellen Verbesserung des Verhaltens zu erstellen.

8.2. Therapiestudie Etifoxin

Die Mikrogliaaktivierung und die erhöhte TSPO-Expression bei der unilateralen Vestibulopathie sind vielversprechende Angriffspunkte zur Verbesserung der zentralen vestibulären Kompensation. Eine allosterische Wirkung von TSPO-Liganden am GABA_A-Rezeptor könnte einen positiven Effekt auf den Kompensationsverlauf haben. Der TSPO-Agonist Etifoxin erzielte in tierexperimentellen Studien bereits einige Erfolge bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen des peripheren und zentralen Nervensystems. Das Wirkungsprinzip beruht unter anderem auf einer Erhöhung der Neurosteroidsynthese. In der Humanmedizin wird Etifoxin erfolgreich zur Anxiolyse eingesetzt. Aufgrund der Vielzahl von positiven Ergebnissen wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit von Etifoxin im Rattenmodell der unilateralen Vestibulopathie untersucht.

Zusammenfassend ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

- Eignet sich der Radiotracer [¹⁸F]FLT zum in vivo-Nachweis von Neurogenese im Tiermodell der unilateralen Vestibulopathie?
- Wie verändert sich die Neurogeneserate in den vestibulären Kerngebieten nach UL und inwiefern wird die Symptomatik dadurch moduliert?
- Zeigen Tiere nach UL Defizite bei der räumlichen Orientierung und hängen diese mit einer veränderten Neurogeneserate im Hippocampus zusammen?
- Wie ist der longitudinale Verlauf der Mikrogliaaktivierung nach UL und welche Auswirkungen haben aktivierte Mikroglia auf die funktionelle Kompensation des vestibulären Defizits?
- Kann der TSPO-Agonist Etifoxin die Mikrogliaaktivierung modulieren und dadurch die klinische Symptomatik verbessern?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien

Anti-BrdU antibody [BU1/75 (ICR1)], rat monoclonal	Abcam, Cambridge, UK
Antikörper (sekundär), Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Aqua ad injectabilia (Aq. ad inj.)	Braun, Melsungen
Aqua-Poly/Mount, Mounting Medium	Polysciences, Warrington, USA
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bupivacainhydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bupivacainhydrochlorid, Carbostesin® 0,25%	Aspen Pharma, Dublin, Irland
Dexpanthenol 5%, Bepanthen®, Augen- und Nasensalbe	Bayer-Vital, Leverkusen
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol	Carl Roth, Karlsruhe
Etifoxine hydrochloride	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Goat Serum	Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Isofluran, Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe

Ketaminhydrochlorid, Ketamin	Medistar, Ascheberg
Marbofloxacin, Marbocyl®	Vetoquinol, Ismaning
Meloxicam, Metacam®	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchloridlösung 0,9%, isotonisch	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogen 4-Aminophenylarsonat, Atoxyl	TCI Europe nv, Zwijndrecht, Belgien
Natriumphosphat	Braun, Melsungen
Natriumtetraborat, Na ₂ B ₄ O ₇	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge, NaOH	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Probenecid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, HCl	Merck, Darmstadt
Salzsäure, HCl 37%, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tissue-Tek®, O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton X-100	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Tween® 80	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylazinhydrochlorid, Xylazin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg

1.2. Lösungen

Atoxyl-Lösung	100 mg Natriumhydrogen 4-Aminophenylarsonat in 1 ml Aq. ad inj. lösen
Aufbewahrungs-Lösung für Gehirnschnitte	150 ml Glycerol, 150 ml Ethylenglycol, 150 ml Aq. bidest. und 50 ml Phosphatpuffer zusammengeben
Borat-Puffer	20,1 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ in 1 l Aq. dest. lösen, mit HCl pH auf 8,5 einstellen
BrdU-Lösung	10 mg BrdU in 1 ml NaCl-Lösung lösen
BrdU primärer Antikörper (1:500)	2 μl BrdU-Antikörper und 100 μl Goat Serum zusammengeben, mit PBS-Triton X auf 1000 μl auffüllen
Sekundärer Antikörper (1:1000)	1 μl sekundären Antikörper mit PBS-Triton-X auf 1000 μl auffüllen
Bupivacain-Lösung	200 mg Bupivacainhydrochlorid Monohydrat in 1 ml Ethanol 96% (3:1 mit Aq. ad inject.) in Ultraschallbad lösen
Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung	11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 800 ml Aq. dest. lösen, mit Aq. dest auf 1 l auffüllen
Etifoxin-Lösung	50 mg Etifoxin Hydrochlorid mit 0,04 ml Tween 80 durchmischen, 5 ml NaCl-Lösung hinzugeben, vortexen
Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung	9,078 g KH_2PO_4 in 800 ml Aq. dest. lösen, mit Aq. dest auf 1 l auffüllen
Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 8%	800 ml Aq. dest. auf 60-70°C erwärmen, 80 g PFA hinzugeben, tropfenweise NaOH dazu bis Lösung klar ist, nach Abkühlen mit Aq. dest. auf 1 l auffüllen

PFA 4%	500 ml PFA 8% und 500 ml Phosphatpuffer nach Soerensen zusammengeben
PBS-Triton X	2,5 ml Triton X mit PBS auf 50 ml auffüllen
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	2,6 g NaH_2PO_4 mit 14,4 g Na_2HPO_4 und 87,5 g NaCl zusammengeben, mit Aq. dest. auf 1 l auffüllen, 1:9 mit Aq. dest. verdünnen
Phosphatpuffer nach Soerensen	182 ml Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung und 818 ml Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung zusammengeben
Probenecid-Lösung	500 mg Probenecid, tropfenweise NaOH hinzugeben bis Lösung klar ist, mit Natriumphosphatpuffer pH auf 7,4 einstellen, mit Aq. ad inj. auf 10 ml auffüllen
Salzsäure-Lösung für Gehirnschnitte	67 ml Aqua dest. und 33 ml 37%-ige HCl-Lösung zusammengeben
Zucker-Lösung (30%)	6 g Sucrose und 14 ml PBS zusammengeben

1.3. Geräte

Analysenwaage, CP224S	Sartorius, Göttingen
Chirurgische Einmal-Skalpelle	Braun, Aesculap AG, Tuttlingen
Deckgläser, 24 x 50 cm	Carl Roth, Karlsruhe
Kryostat, Leica CM3050 S	Leica Biosystems, Buffalo Grove, USA
μ PET-Scanner, Inveon, P120	Siemens, München
Mikroskop, Zeiss AXIO Observer Z1	Zeiss, Jena
Nahtmaterial Ethicon ® Prolene™, Polypropylen 5-0	Johnson & Johnson Medical Ltd. Livingston, UK

Narkosegerät Isofluran Vet.Med. Vapor	Drägerwerk AG, Lübeck
Objektträger ELKA, 76 x 26 cm	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Open Field	Laborwerkstatt, Großhadern
Operationsmikroskop, Stemi DV4 Spot	Zeiss, Göttingen
Peristaltikpumpe DOSE IT 910	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Präzisionswaage, Typ 440-49N	Kern, Balingen
Ring- und OSL-Dosimeter	AWST, Helmholtz Zentrum München
T-Maze	Med Associates Inc., St. Albans, USA
Ultraschallbad, Sonorex, Typ RK52H	Bandelin, Berlin
Vortexer, Vortex-T, Genie®2, SI-T256	Scientific Industries, New York, USA

1.4. Software

EthoVision® XT	Version 13.0. 1220, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande
Inveon acquisition workplace	Version 1.5.0.28, Siemens Medical Solutions Molecular Imaging, Knoxville, USA
π .pmod	Biomedical Image Quantification, Version 3.609, Zürich, Schweiz
SPM8	Statistical Parametric Mapping, Version 8, London, UK
SPSS	SPSS Statistics, Version 25, IBM
Zeiss ZEN, Imaging software	Zeiss, Jena

2. Tiermodell

Alle Tierexperimente erfolgten nach Genehmigung des Tierversuchsantrags mit dem Geschäftszeichen ROB-55.2Vet-2532.Vet_02-16-93 und deren angezeigter Änderung von Februar 2018 durch die Regierung von Oberbayern.

2.1. Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley Ratten verwendet, da ihre Nutzung sich in vorhergegangenen Studien gut bewährt hat und somit eine Standardisierung und Vergleichbarkeit erfolgen konnte. Die Tiere wurden jungadult im Alter von 8-9 Wochen mit einem Gewicht von 300-400 g aus einer spezifisch pathogenfreien Zucht (Charles River, Sulzfeld) geliefert und gingen nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit in den Versuch.

Die Haltung erfolgte in einer IVC-Anlage (individually ventilated cages), wo je 2-3 Tiere zusammen in einem zweistöckigen Käfig (Typ GR1800, Double Decker, Tecniplast) eingestallt wurden. Als Untergrundmaterial diente die Labortiereinstreu aus sterilisiertem und entrindetem Espenholz der Firma Abedd. Die Käfige waren mit je zwei Trinkflaschen ausgestattet, sodass die Tiere jederzeit Zugang zu Leitungswasser hatten. Die Fütterung erfolgte ebenfalls ad libitum durch ein Alleinfuttermittel in Pelletform (Hersteller Ssniff).

Als Rückzugsort befand sich in jedem Käfig ein sterilisiertes Papphäuschen („rat corner homes“, datesand group), das außerdem zur Beschäftigung benagt werden konnte. Als weiteres Enrichment diente ein Holzstückchen zum Nagen (Abedd, 10 x 2 x 2 cm). Häuschen und Nageholz wurden bei Bedarf ausgetauscht, während die Käfige mindestens einmal in der Woche gewechselt und gereinigt wurden.

Die Käfige befanden sich in einem ausschließlich für die Rattenhaltung vorgesehenen Raum, in welchem auch die Verhaltenstests stattfanden. Das Lichtregime erfolgte in einem 12 h-Tag-und-12 h-Nachtrhythmus. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 45-65% RH und die Temperatur betrug 20-24°C. Die Klimawerte wurden mindestens einmal täglich kontrolliert und protokolliert.

Als Hygienemanagement wurde beim Betreten des Raumes eine Schleuse durchquert, in der die Hände desinfiziert, sowie Kittel, Haube, Mundschutz und Handschuhe angezogen wurden. Für das Hygiene-Monitoring wurden außerdem zwei Sentinels (weibliche Lewis-Ratten) in der IVC-Anlage nach dem „dirty-bedding“-Prinzip gehalten. Bei jedem Käfigwechsel bekamen die Tiere verschmutzte Einstreu aus jedem Käfig der Versuchstiere. Alle drei Monate wurde ein Sentinel aus der Haltung entfernt und auf Keime oder Erreger untersucht.

Der gesundheitliche Zustand der Versuchstiere wurde täglich mithilfe eines Score-Sheets auf die Parameter Körpergewicht, Allgemeinzustand, Verhalten und modellbedingte Symptome kontrolliert und aufgezeichnet.

2.2. Narkose und Analgesie

Für die chemische unilaterale Labyrinthektomie, sowie bei allen μ PET-Messungen, wurden die Tiere mit dem Narkosegas Isofluran betäubt.

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Narkosebox aus Plexiglas (28 x 14 x 15 cm), die mit 2,5%-igem Isofluran und Sauerstoff geflutet wurde. Die Durchflussrate betrug 2 l/min. Zur Narkoseerhaltung wurde den Tieren nach Entnahme aus der Box das gleiche Gasgemisch mit einer Isoflurankonzentration von 1,8% über eine Nasenmaske zugeführt. Um ein Auskühlen während der Narkose zu verhindern, lagen die Tiere während sämtlichen Eingriffen auf einer Wärmematte. Da der Lidschutzreflex während der Narkose ausgeschaltet ist, wurde Augensalbe als Hornhautschutz aufgetragen.

Bei der Labyrinthektomie wurden für die perioperative Analgesie 30 Minuten vor dem Eingriff 2 mg/kg Meloxicam subkutan injiziert. Als Lokalanästhesie wurde eine 0,25%-ige Bupivacain-Lösung (Carbostesin®) subkutan an der Inzisionsstelle appliziert.

Vor der transkardialen Perfusion wurden die Tiere mittels tiefer Injektionsnarkose betäubt. Sie erhielten eine intraperitoneale Injektion von 120 mg/kg Ketamin und 8 mg/kg Xylazin. Daraufhin erfolgte die intravenöse Applikation derselben Dosierung über einen 24-G-Katheter in die laterale Schwanzvene, um ein Sistieren der Atmung und eine vollständige Schmerzfreiheit zu erreichen.

2.3. Chemische unilaterale Labyrinthektomie

Ziel dieser Operation ist es, einen irreversiblen Ausfall eines Vestibularorgans herbeizuführen und so bei den Ratten eine Symptomatik zu erzeugen, die dem klinischen Krankheitsbild der akuten unilateralen Vestibulopathie des Menschen entspricht.

30 Minuten vor dem Eingriff wurden die Tiere durch eine subkutane Injektion von 2 mg/kg Meloxicam (Metacam®) und 2 mg/kg Marbofloxacin (Marbocyl®) analgetisch und antibiotisch vorbehandelt. Eine ebenfalls subkutane Verabreichung von je 2,5 ml pro Körperseite 0,9%-iger isotonischer Natriumchlorid-Lösung diente als Flüssigkeitssubstitution zur Kreislaufstabilisierung.

Die chirurgische Toleranz wurde mittels Überprüfung des Zwischenzehenreflexes sichergestellt. Das Operationsfeld über dem linken Ohr wurde geschoren, desinfiziert und das Lokalanästhetikum Bupivacainhydrochlorid subkutan appliziert.

Mit einem Skalpell wurde eine ca. 1 cm lange paramediane Inzision dorsal des linken Ohres gesetzt. Es erfolgte eine stumpfe Präparation in die Tiefe zwischen Schläfenmuskel und dem seitlichen Nackenstrecker bis der äußere Gehörgang freigelegt war. Mit einer Pinzette fand die Perforation des Trommelfells statt. Über diesen Zugang

wurden 200 µl einer 20%-igen Bupivacain-Lösung mit einer 26-G-Kanüle in das Mittelohr appliziert. Dies wurde unter mikroskopischer Kontrolle bei 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Flüssigkeit wurde drei Minuten lang mehrmals aspiriert und erneut instilliert. Nach der letzten Aspiration wurde der Vorgang mit 10%-iger Arsanilsäure (Atoxyl®) wiederholt. Die Wirkung des Bupivacains tritt durch Betäubung der Haarsinneszellen im Gleichgewichtsorgan sofort ein und ist reversibel, während die Arsanilsäure die Haarzellen protrahierend und irreversibel zerstört.

Tiere für Kontrollgruppen wurden einer Sham-Operation unterzogen, welche analog ablief. Die ototoxischen Substanzen werden dabei durch 0,9%-Natriumchlorid-Lösung ersetzt. Die Funktion des Vestibularapparates wird so nicht beeinträchtigt und die Tiere zeigen keine Symptomatik.

Der Verschluss der Hautwunde oberhalb des Ohres erfolgte mit zwei bis drei Knopfheften aus resorbierbarem Nahtmaterial (Polypropylen, 0,5 metric, Ethicon®).

Während der Aufwachphase wurden die Tiere zur Beobachtung in eine separate, mit Zellstoff ausgepolsterte Box gesetzt, die sich partiell auf einer Wärmematte befand. Nachdem sie vollständig erwacht waren, wurden sie wieder in ihre Heimkäfige verbracht, in welche Gelpads und eingeweichtes Futter zur erleichterten Wasser- und Futteraufnahme gelegt wurden.

Die Infektionsprophylaxe mit Marbofloxacin, sowie die Schmerzbehandlung durch Meloxicam, wurden über drei Tage post OP fortgeführt.

2.4. Transkardiale Perfusionsfixierung

Zur Gewebefixation der Gehirne für die immunhistologische Untersuchung wurde eine transkardiale Perfusion durchgeführt.

Für diesen Eingriff wurden die Tiere mit einer tiefen Injektionsnarkose aus einer Überdosis von Ketamin und Xylazin betäubt. Nachdem die Atmung sistierte, erfolgte eine Thorakotomie und das Herz wurde freipräpariert. Eine 4 cm lange Knopfkanüle wurde in den Apex des linken Herzventrikels eingeführt und in die Aorta vorgeschoben. Für den Abfluss der Flüssigkeit wurde ein Schnitt in den rechten Herzvorhof gesetzt. Die Kanüle war über einen Schlauch mit einer Peristaltikpumpe verbunden, über die zunächst 200 ml PBS-Lösung für 7 Minuten zum Ausspülen des Blutes aus dem Kreislauf des Tieres gegeben wurde. Im Anschluss erfolgte über die Pumpe eine Applikation von 450 ml Paraformaldehydlösung (PFA 4%) als Fixationslösung. Nach 20 Minuten wurde die Kanüle aus dem Herz entfernt und der Kopf des Tieres vom Rumpf getrennt. Die Schädelkalotte wurde mit einer Hohlmeißelzange eröffnet, das

Gehirn entnommen und für 24 Stunden in einem Zentrifugenröhrchen mit PFA eingelegt. Danach wurde es bis zur weiteren Verarbeitung für mindestens drei Tage in ein Röhrchen mit 30%-iger Zuckerlösung eingebettet, was dem osmotischen Wasserentzug des Organs und somit dem Kryoschutz diente.

2.5. Euthanasie

Tiere, deren Gehirne nicht für eine histologische Untersuchung vorgesehen waren, wurden nach Beendigung des Versuches mit einer überdosierten Narkose euthanasiert. Nach vorangehender Betäubung durch Isoflurannarkose, wurde ein Katheter in die laterale Schwanzvene gelegt, über den 60 mg/kg Xylazin verabreicht wurde. Nach sorgfältiger Kontrolle des Aussetzens von Atmung und Herzschlag wurden die Tiere zusätzlich zervikal disloziert.

3. Verhaltensanalysen

Die Symptomausprägung nach unilateraler Labyrinthektomie wurde anhand des klinischen Scorings, des Open-Field-Tests und des T-Maze evaluiert. Um zirkadiane Schwankungen auszuschließen, erfolgten die Untersuchungen in allen Tiergruppen stets morgens während der Hellphase zwischen 07:30 Uhr und 11:30 Uhr. Zur Vermeidung einer Beeinflussung der Symptome durch eine vorangegangene Narkose, wurden die Verhaltenstests immer vor den μ PET-Scans durchgeführt. Open-Field und T-Maze waren von einem schwarzen Vorhang umgeben, damit die Tiere nicht durch visuelle Eindrücke der Umgebung abgelenkt werden konnten. Ebenso wurden jegliche Geräusche im Raum während der Versuche vermieden. Die Apparaturen wurden nach jedem Tier mit Desinfektionsmittel ausgewischt, um Einflüsse durch den Geruch des Vorgängertieres auszuschließen. Die Durchführung der Tests erfolgte stets von den gleichen Personen, an die sich die Tiere bereits vor Versuchseintritt gewöhnen konnten.

3.1. Klinisches Scoring

Durch die unilaterale vestibuläre Deafferentierung nach UL kommt es zu einem Tonusungleichgewicht zwischen den beiden Vestibularorganen. Die Tiere zeigen eine typische Drehschwindelsymptomatik, analog zu Patienten mit unilateraler Vestibulopathie.

Mit einem etablierten Protokoll nach BERGQUIST et al. (2008) wurden beim klinischen Scoring die drei Parameter Nystagmus, posturale Asymmetrie und Kopfschiefhaltung mit einem Punktesystem von 0-10 beurteilt (0 = keine Symptomatik, 10 = schwerste symptomatische Ausprägung) (Abbildung 5). Zusätzlich wurde die

somatosensorische Kompensation durch den „Elevation Tail Rotation Test“ evaluiert. Zur Beurteilung wurden die Tiere auf einen Tisch mit einer abgegrenzten Fläche von ca. 70 x 70 cm gesetzt und über mehrere Minuten beobachtet.



Abbildung 5: Ratte beim klinischen Scoring, Tag 8 post UL. Das Tier zeigt eine asymmetrische Haltung und eine ipsiläsionale Kopfschiefhaltung.

3.1.1. Nystagmus

Ein Tier mit spontan auftretendem Nystagmus erhielt 6-10 Punkte. Die horizontalen Schläge des Auges wurden gezählt und für 60 Schläge pro Minute je 1 Punkt vergeben. Lag kein Spontannystagmus vor, erfolgte eine Provokation durch Anheben des Tieres oder durch Erzeugung eines leichten Luftzuges oberhalb des Auges. Konnte ein Nystagmus ausgelöst werden, wurde dieser mit 1-5 Punkten erfasst, wobei ebenfalls 60 Schläge in der Minute einen Punkt gaben.

3.1.2. Kopfschiefhaltung

Während der Beobachtung des Tieres auf der Tischfläche wurde der Neigungswinkel zwischen dem Unterkiefer des Tieres und der Horizontalen beurteilt. Hierbei gab es die vier Abstufungen 0, 45, 60, oder 90 Grad, die entsprechend mit 0, 5, 7 oder 10 Punkten bewertet wurden.

3.1.3. Posturale Asymmetrie

Die Haltungs- und Ganganomalien nach unilateraler Labyrinthektomie werden als vestibulo-spinales Syndrom bezeichnet. Die ipsiläsionalen Extremitäten weisen eine starke Flexion auf, während es auf der gesunden Seite zu einer Hyperextension kommt. Die Tiere zeigen eine Neigung in Richtung der ipsiläsionalen Seite. Die motorischen

Verhaltensabweichungen weisen auf eine asymmetrische Innervation der Haltungsmuskulatur hin (HAMANN & LANNOU, 1987).

Beim Parameter der posturalen Asymmetrie wurden das Gangbild, sowie Haltungs- und Stelldefizite der Ratten nach dem Punkteschema von BERGQUIST et al. (2008) bewertet (Tabelle 2).

Verhalten	Punkte
Posturale Asymmetrie nur beim Anheben erkennbar	1
Kaum erkennbare posturale Asymmetrie	2
Fortbewegungen mit Neigung in Richtung der ipsiläsionalen Seite	3
Fortbewegungen mit gelegentlichen Schwankungen auf die ipsiläsionale Seite	4
Fortbewegungen mit beidseitiger Unterstützung der Gliedmaßen	5
Fortbewegungen auf einer Seite oder Unterstützung der ipsiläsionalen Gliedmaßen	6
Ipsiläsionale Unterstützung der Gliedmaßen	7
Liegende Position auf der deafferentierten Seite ohne Unterstützung der Gliedmaßen	8
Rotation um die Längsachse durch leichte Berührung oder Luftzug provozierbar	9
Spontane Rotation um die Längsachse	10

Tabelle 2: Bewertung der posturalen Asymmetrie nach BERGQUIST et al. (2008).

3.1.4. Elevation Tail Rotation Test

Dieser Test dient der Beurteilung der perzeptiven somatosensorischen Funktionalität. Die Ratte wird dabei an der Schwanzbasis gehalten und für wenige Sekunden angehoben. Die Wegnahme der propriozeptiven Reize aus den Fußsohlen führt zu einem Verlust von Informationen, die zur vestibulären Kompensation beitragen. Physiologisch würde das Tier alle vier Beine ausstrecken und den Körper gerade angespannt halten. Labyrinthektomierte Ratten drehen sich um ihre Körperachse. Mehrmalige Rotationen um die Längsachse gaben 10 Punkte, eine Umdrehung zwischen 180-360 Grad 8 Punkte und eine Drehung unter 180 Grad 6 Punkte.

3.2. Open Field

Der Open Field-Test wurde 1932 von Calvin Hall (HALL & BALLACHEY, 1932) zur Messung der Defäkation als Indikator für Scheue und Ängstlichkeit beschrieben. Mittlerweile handelt es sich um einen anerkannten Verhaltenstest, der für diverse Spezies genutzt werden kann. Die Versuchstiere bewegen sich für eine bestimmte Zeit unter definierten Bedingungen in einem freien Feld. Dabei können zahlreiche Parameter (z.B. Bewegungen, Vokalisation, Exploration, Reaktionen auf Reize) aufgezeichnet und ausgewertet werden (WALSH & CUMMINS, 1976).

Der Open Field-Test diente in der vorliegenden Studie der Evaluation der Lokomotion und Exploration von unilateral labyrinthektomierten Ratten, um einen Einfluss des TSPO-Agonisten Etifoxin auf die dynamische zentrale Kompensation zu beurteilen. Jedes Tier wurde einzeln in einen schwarzen quadratischen Kasten (70 x 70 x 36 cm) gesetzt, in dem sie sich 10 Minuten lang frei bewegen konnten. Die Bewegungen des Tieres wurden mit einer Kamera aufgezeichnet, die sich mittig über der Apparatur befand. Die Videobilder wurden auf die Software EthoVision® übertragen, mit der jede Bewegung der Ratte verfolgt und gespeichert wurde. Für die Auswertung wurden die Parameter Geschwindigkeit (cm/s), Fortbewegung und Immobilität (%), sowie die kumulative Aufenthaltsdauer (s) an den Randzonen und im Zentrum des Open Fields betrachtet. Mit Heatmaps erfolgte eine bildliche Darstellung der kumulierten gemittelten Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Bereichen des Open Fields (Abbildung 6). Der Ablauf wurde standardisiert, indem alle Tiere an der gleichen Seite des Kastens eingesetzt wurden. Vor der unilateralen Labyrinthektomie absolvierte jede Ratte einen Baseline-Lauf, der als Vergleichswert zu den Zeitpunkten nach der Operation diente.

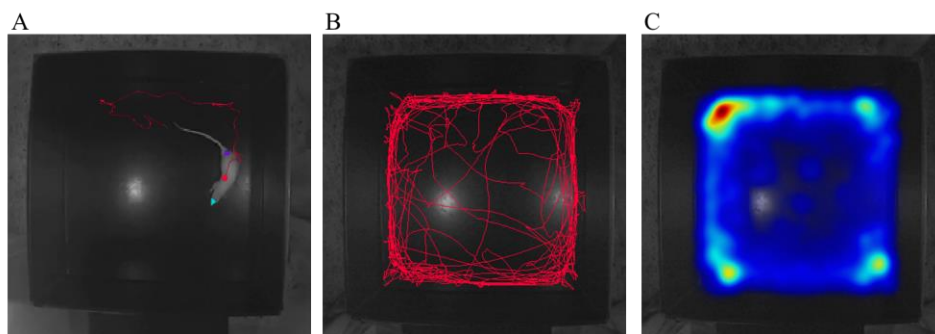


Abbildung 6: Aufnahmen des Open Field-Tests aus EthoVision®. A: Ratte im Open Field. Nase (grünes Dreieck), Körperzentrum (roter Punkt) und Schwanzbasis (lila Quadrat) werden von der Software erkannt und markiert. B: Aufgezeichnete Fortbewegung des Körperzentrums eines Laufs. C: Kumulierte gemittelte Darstellung der Bewegungsmuster als Heatmap im blau-rot-Spektrum (rot entsprechend höherer Aufenthaltsdauer am Ort).

3.3. T-Maze

Das T-Maze ist ein Verhaltenstest, welcher der Erfassung des Arbeitsgedächtnisses und möglicher Defizite der räumlichen Orientierung nach unilateraler Vestibulopathie dient. Der Test ist sehr sensitiv für Läsionen des Hippocampus und dem daraus resultierenden veränderten Lernverhalten bei Versuchstieren (WENK, 2001).

Das T-Maze ist eine T-förmige Apparatur, deren Zonen in Startbox, Zentrum, sowie linker und rechter Arm aufgeteilt sind (Abbildung 7). Die Zugänge zwischen den Bereichen können mit Türen geöffnet und verschlossen werden.

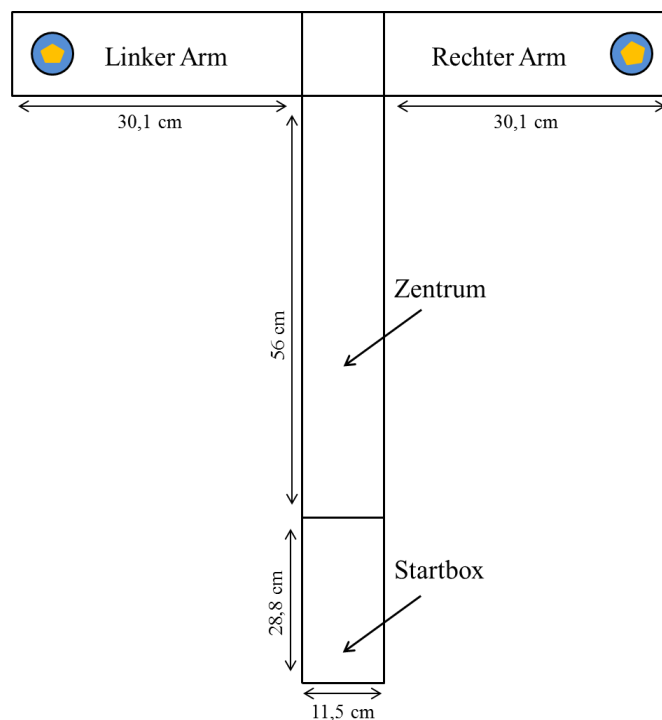


Abbildung 7: Schematische Darstellung des T-Maze. Am unteren Ende befindet sich die Startbox, die über eine Tür mit dem Zentrum verbunden ist. Der linke und rechte Arm lassen sich mit Türen vom Zentrum abgrenzen. In den Zielarmen sind Futternapfe mit einem Cornflake.

3.3.1. Training

Zur Gewöhnung an die Umgebung und das Handling beim Versuchsablauf erfolgte mit den noch nicht operierten Tieren ein fünftägiges Training im T-Maze. Die Einteilung der Trainingstage, sowie die weitere experimentelle Durchführung, beruhten auf einer Kombination aus etablierten Protokollen (PACKARD & MCGAUGH, 1996; WENK, 2001; DEACON & RAWLINS, 2006) und auf eigenen Erfahrungen mit Übungstieren. Das Training erfolgte nach folgendem standardisiertem Schema:

- Tag -5: Zwei Tiere aus einem Käfig wurden für 15 Minuten zu zweit in das T-Maze gesetzt und durften dies frei erkunden. Im gesamten T-Maze lagen Maisflocken verstreut. Jede Ratte wurde ein bis zwei Mal aus jedem Arm, sowie aus dem Zentrum herausgenommen und wieder in die Startbox verbracht. Die Türen der Arme wurden gelegentlich geöffnet und geschlossen, um die Tiere an diesen Vorgang zu gewöhnen.
- Tag -4: Der Ablauf des Versuchs entsprach dem vorherigen Tag, allerdings befanden sich die Maisflocken nur noch in den Armen.
- Tag -3: Jedes Tier wurde einzeln über 10 Minuten in das T-Maze gesetzt, die Belohnungen befanden sich im Napf.
- Tag -2: Jedes Tier lief einzeln im T-Maze, wobei immer ein Arm geschlossen wurde. Nach Betreten des offenen Armes wurde die Ratte erneut in die Startbox gesetzt. Im nächsten Durchgang wurde die Tür des zuvor betretenden Armes geschlossen. Auch hier verblieb das Tier für 10 Minuten im T-Maze.
- Tag -1: Der letzte Trainingstag entsprach dem weiteren Versuchsablauf, der im Folgenden beschrieben wird.

3.3.2. Versuchsablauf

An Tag 0 wurden 12 Ratten unilateral labyrinthektomiert. Der Test erfolgte ab Tag 1 dreimal wöchentlich (montags, mittwochs, freitags) bis einschließlich Tag 31 post UL. Für einen Vergleich wurde der Versuch außerdem an 10 Tieren, bei denen keine Operation stattfand, durchgeführt.

Im ersten Trial wurde die Ratte in die Startbox gesetzt und die Verbindungstür zum Zentrum geöffnet. Der Versuch wurde von zwei Untersuchern durchgeführt, von denen einer vor der Startbox stand, die Ratte einsetzte und die Tür öffnete. Der zweite Experimentator stand gegenüber und hielt die Türen der beiden Zielarme offen. Das Tier konnte sich frei entscheiden, ob es zuerst in den linken oder in den rechten Arm läuft. In beiden Armen befand sich in einem Napf eine Belohnung in Form einer Maisflocke (Cornflake). Nach dem Betreten wurde die Tür des Armes geschlossen und die Ratte durfte fressen. Danach wurde das Tier erneut in die Startbox verbracht und musste sein erstes Entscheidungstrial laufen, bei dem es nun den Arm aufsuchen sollte, den es zuvor nicht betreten hatte. War dies der Fall, durfte die Ratte die Belohnung fressen und es folgte das nächste Trial.

Dieses Versuchsprinzip beruht auf der spontanen Alternation: Dem physiologischen Explorationsverhalten einer Ratte entsprechend, laufen die Tiere immer abwechselnd in die Arme. Nach Auffinden einer Belohnung würden sie nicht erneut denselben Ort aufsuchen (WENK, 2001). Die Maisflocke wurde immer in den Arm gelegt, in den das Tier laufen sollte. Entschied es sich für die falsche Seite, konnte keine Belohnung gefunden werden. Das Trial wurde gewertet, wenn die Ratte den Arm mit Vorder- und Hintergliedmaßen vollständig betrat oder wenn sie den Arm so weit explorierte, dass sie in den Napf schauen konnte. Jede Ratte hatte pro Testtag fünf Entscheidungstrials zu absolvieren.

3.3.3. Abbruchkriterien

In folgenden Situationen wurde ein Trial abgebrochen und das Tier für das nächste Trial erneut in die Startbox gesetzt:

- Keine Fortbewegung der Ratte über 90 Sekunden
- Kein Eintritt in einen Arm nach fünf Minuten

Der Test wurde an dem Versuchstag für das jeweilige Tier vorzeitig abgeschlossen, wenn:

- zwei Trials der Ratte abgebrochen werden mussten
- das Tier insgesamt länger als 15 Minuten für die Trials benötigte

3.3.4. Auswertung

Für jede Ratte wurde der Verlauf des Experimentes protokolliert. Die Erfassung der Gesamtdauer, der abgebrochenen Trials, die Anzahl der richtigen und falschen Trials, die Seite des gewählten Arms und das Fressen der Belohnung, erfolgte manuell von den Untersuchern. Die einzelnen Trials wurden mit einer Kamera aufgezeichnet, die sich über dem T-Maze befand. Die Auswertung der Videos fand mit der Software EthoVision® statt (Abbildung 8). Dabei wurden die Dauer der Trials, die zurückgelegte Distanz, die Mobilität und die Bewegungsgeschwindigkeit analysiert.

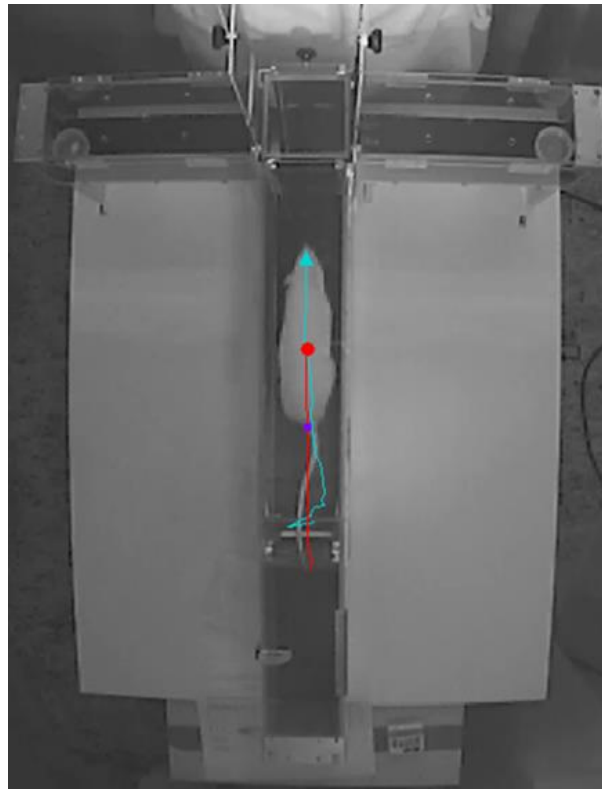


Abbildung 8: Aufnahme des T-Maze aus EthoVision®. Die Ratte läuft im Zentrum des T-Maze, unterhalb befindet sich die Startbox, oben links und rechts die Zielarme. In jedem Arm steht ein Futternapf. Bei diesem Trial ist der rechte Napf leer und der linke mit einer Maisflocke gefüllt. Die rote und die blaue Linie markieren die Bewegung von Nasen- und Zentrumspunkt des Tieres, das lila Quadrat die Schwanzbasis.

4. Positronen-Emissions-Tomographie

Die μ PET-Messungen mit [^{18}F]GE180 und [^{18}F]FLT wurden für die in vivo-Darstellung der Mikrogliaaktivierung und der Neurogenese nach UL durchgeführt.

Die Narkose der Tiere erfolgte mit Isoflurangas (siehe III.2.2). Um ein Austrocknen der Hornhaut während der Narkose zu verhindern, wurde Augensalbe aufgetragen. Für die Tracer-Applikation wurde den Tieren ein 24-G-Katheter in die laterale Schwanzvene gelegt und auf korrekten Sitz, sowie Durchgängigkeit mit dem Spülen einer NaCl-Lösung überprüft. In den Katheter wurden 50 MBq (± 2 MBq) der Tracer-Lösung appliziert. Die injizierte Flüssigkeit wurde vorher mit NaCl-Lösung aufgefüllt, sodass jedes Tier ein konstantes Injektionsvolumen von 0,5 ml erhielt (Abbildung 9). Der Radiotracer wurde direkt vor Ort in der Radiopharmazeutischen Chemie in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universität München hergestellt. Um eine optimale Traceraufnahme in den Organismus zu gewährleisten und dessen Verbleib im Katheter zu vermeiden, wurde direkt nach der Applikation mit 0,2 ml NaCl-Lösung nachgespült.

Die μ PET-Messungen erfolgten statisch. In der Uptake-Phase zwischen Tracer-Applikation und Emissionsmessung wurden die Tiere von der Narkose entfernt. In dieser Wachphase konnten sie sich in einer größeren Box frei bewegen, was zu einer verbesserten Biodistribution des Tracers führen sollte. 10 Minuten vor Scan-Beginn wurden die Ratten erneut betäubt und in Bauchlage auf dem μ PET-Scanner platziert. Für die Messung wurden sie am Rücken mit einem Klebeband an der Liege des Tomographen fixiert und inhalierten 1,5% des Isoflurangases. Die Unterlage, auf der sich die Ratten auf dem Scanner befanden, wurde auf 22°C beheizt, um ein Auskühlen zu verhindern. Mithilfe einer Lasermarkierung wurden die Tiere so positioniert, dass sich die Gehirne im Detektionsbereich des μ PET-Scanners befanden. Zuerst wurde die Transmissions- und im Anschluss die Emissionsmessung durchgeführt. Nach dem Scan wurden die Tiere in eine Aufwachbox verbracht und nach vollständiger Erholung von der Narkose in ihre Heimkäfige zurückgesetzt. Die durchführenden Personen trugen während des Umgangs mit der Radioaktivität stets Ring- und Körper-Dosimeter nach Strahlenschutzverordnung. Zur Überwachung der aufgenommenen Strahlendosis wurden die Dosimeter monatlich gemessen und gewechselt.

4.1. [18F]GE180

Der [18F]GE180- μ PET-Scan für die Visualisierung der Mikrogliaaktivierung wurde an je zwei Tieren zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Die Uptake-Phase erfolgte über 60 Minuten. Die gewählte Dauer beruht auf vorherigen Studien, bei denen die Ergebnisse im Zeitrahmen von 60-90 Minuten nach Tracer-Applikation ausgewertet wurden (ZWERGAL et al., 2017). Auf dem Scanner lagen jeweils zwei Tiere gegenüber in Bauchlage, wobei die Köpfe sich nebeneinander befanden. Die Transmissionsmessung über 15 Minuten wurde der 30-minütigen Emission vorangestellt.

4.2. [18F]FLT

Der Radiotracer [18F]FLT dient dem Nachweis von proliferierenden Zellen. Das hervorgerufene Signal im μ PET ist deutlich schwächer als beim [18F]GE180 (TAMURA et al., 2016). Um ein möglichst großes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten und eine Überlagerung durch Koinzidenzen eines anderen Tieres zu vermeiden, wurde jedes Tier einzeln gemessen.

Nach der Narkoseeinleitung wurde den Tieren 100 mg/kg Probenecid-Lösung intraperitoneal verabreicht. Dies diente der Hemmung von Transportern an der Blut-Hirn-Schranke, wodurch eine erhöhte [18F]FLT-Akkumulation im Gehirn erreicht

werden kann (TAMURA et al., 2016). 10 Minuten später erfolgte die Applikation der [^{18}F]FLT-Lösung über einen Katheter in die Vena caudalis lateralis, analog zu den [^{18}F]GE180- μPET -Scans. In der Uptake-Phase befanden sich die Tiere ebenfalls im Wachzustand. Die Transmissionsmessung über sieben Minuten erfolgte 38 Minuten nach der Tracer-Applikation. Im Anschluss fand die 30-minütige Emission statt. Der hieraus resultierende Uptake von 45 Minuten basiert auf einer Studie von TAMURA et al. (2016), bei der während 90-minütiger Messung ein Plateau bei 45 min erreicht wurde.



Abbildung 9: Ratte kurz vor der [^{18}F]FLT-Applikation. Das Tier liegt in Narkose auf einer Wärmematte und atmet Isofluran über die Nasenmaske ein. Auf die Hornhaut wurde Salbe zur Prävention vor Austrocknung gegeben. Der Katheter liegt in der lateralen Schwanzvene und wurde mit NaCl-Lösung gespült. Die Spritze mit der [^{18}F]FLT-Lösung ist bis zur Anwendung in einem Behältnis aus Blei abgeschirmt (links im Bild).

4.3. Datenverarbeitung

4.3.1. Rekonstruktion

Während der μPET -Messung werden die gleichzeitig emittierten Photonen, die beim β^+ -Zerfall der Radionuklide im Organismus der Ratten entstehen, von den Detektoren des μPET -Scanners registriert. Bei Koinzidenz werden diese in Form von sogenannten Sinogrammen gespeichert. Hierbei handelt es sich um ein zweidimensionales Bild, in dem Informationen aller lines of response (LOR) enthalten sind und welches zur Rekonstruktion verwendet wird.

Mit der Software Inveon Acquisition Workplace® wurden die Bilder in eine

dreidimensionale (3D) Darstellung rekonstruiert. Hierfür wurden die Algorithmen OSEM3D („ordered subset expectation maximization“) und MAP3 („maximum a Posteriori“) genutzt, die eine Korrektur für die Streuung beinhalten. Ein Teil der Strahlung wird während der Messung im μ PET von der Ratte selbst absorbiert. Um diese Schwächung zu korrigieren, wurden die korrespondierende Transmissionsmessung des Tieres und Transmissionsdaten eines Referenz-Scans ohne ein Objekt („blank“, engl. leer) in die Datenverarbeitung einbezogen. Die Blank-Scans wurden aufgrund des Zerfalls der Quelle monatlich aktualisiert. Die Leistungsfähigkeit von den verschiedenen Detektorpaaren kann je nach Lokalisation im Ring des μ PET-Scanners variieren. Um die aufgezeichneten Daten zu vereinheitlichen, wurde daher eine Normierung als Inhomogenitätskorrektur durchgeführt.

Bei dem angewandten Verfahren handelt es sich um eine iterative Rekonstruktion („iterative“, engl. wiederholt). Dabei werden die Bilder mehrfach rekonstruiert, wofür bei jeder Wiederholung das zuvor entstandene Ergebnis genutzt wird, sodass eine möglichst präzise Darstellung erreicht werden kann. Das Resultat ist ein 3D-Bild mit $128 \times 128 \times 159$ Voxeln und einem Voxel-Volumen von $0,78 \times 0,78 \times 0,8 \text{ mm}^3$. Die aufgenommene Aktivität des Radiotracers ist in den Bildern pro Voxel-Volumen gespeichert (kBq/cc) (Abbildung 10).

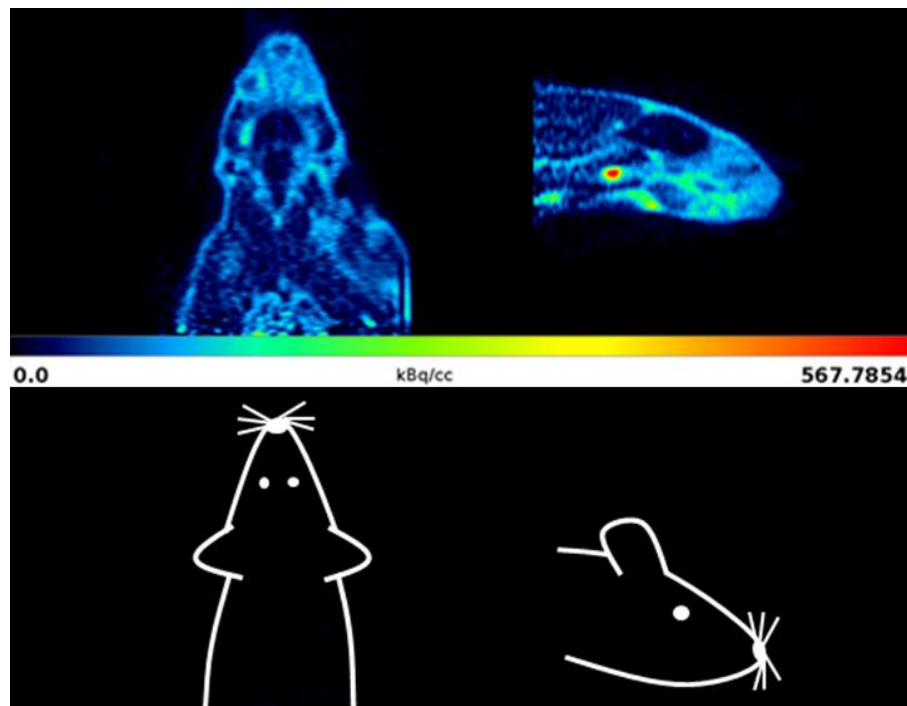


Abbildung 10: Rekonstruiertes Bild einer Ratte beim $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}\mu\text{PET}$. Oben links: Transversalebene; oben rechts: Sagittalebene. Die Aktivitätsanreicherung ist anhand einer Farbskala in Kilobequerel pro Voxel-Volumen abgebildet (Bild aus Pmod). Unten: Analoge schematische Darstellung der Ratte.

4.3.2. Koregistrierung

Für die Visualisierung der aufgenommenen Aktivität im Gehirn wurde eine Koregistrierung der Bilder auf ein Template (engl. Vorlage) durchgeführt.

Die Erstellung der Templates erfolgte mit rekonstruierten μ PET-Datensätzen von gesunden Kontrolltieren (25 Tiere für $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$, 14 Tiere für $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$). Eines dieser Bilder wurde als Basis verwendet und die Scans aller anderen Tiere wurden sowohl manuell als auch automatisch auf dieses koregistriert, sodass ein Durchschnittsbild entstand. Um möglichst passgenaue Ergebnisse zu erhalten, wurde jedes einzelne Bild eines Tieres nochmals auf das Durchschnittsbild projiziert. Die Informationen aus den Bildern wurden erneut gemittelt und die daraus entstandene Vorlage diente als Template für die Analyse aller weiteren μ PET-Bilder.

Die acquirierten Bilder wurden im Fusion-Tool der Software Pmod manuell durch Verschieben, Skalieren und Rotieren auf das Template koregistriert. Daraus resultierte ein Bild mit $124 \times 125 \times 237$ Voxeln und einer Voxelgröße von $0,13 \times 0,13 \times 0,13 \text{ mm}^3$. Zur Standardisierung für die weitere Bearbeitung erfolgte die Umwandlung in das Dateiformat NIFTI (Neuroimaging Informatics Technology Initiative). Im nächsten Schritt wurde der in Pmod implementierte SPM-Algorithmus zur automatischen elastischen Koregistrierung verwendet. Um Bildrauschen zu reduzieren, das vor allem bei den $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$ -Bildern entstanden war, wurde bei diesen Scans ein $0,8 \text{ mm}$ 3D-Gauß-Filter zur Glättung angewandt (Abbildung 11).

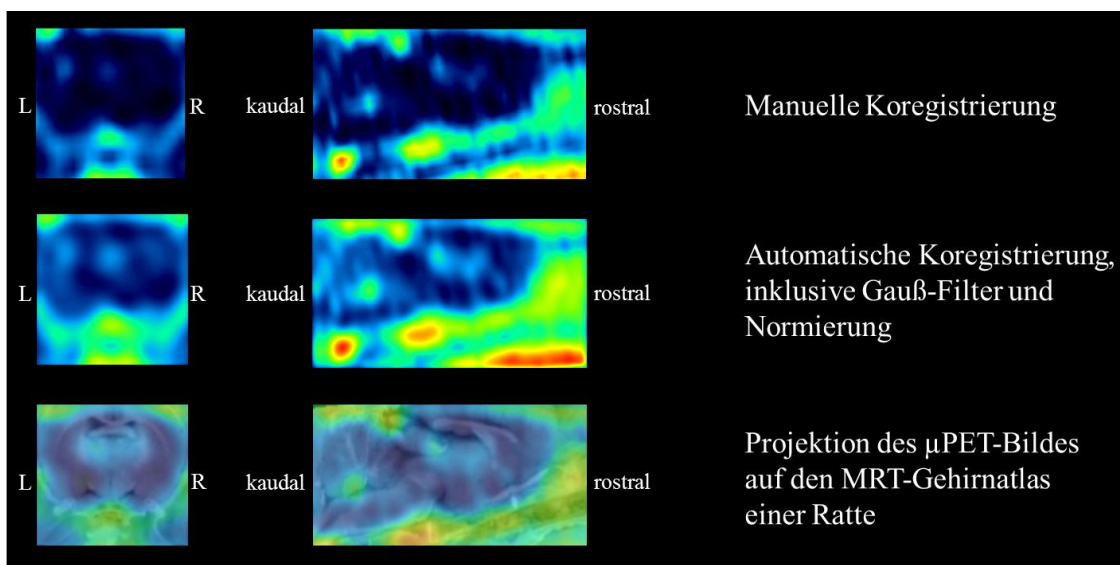


Abbildung 11: Schritte der Datenverarbeitung in Pmod am Beispiel eines $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$ - μ PET-Scans. Die rekonstruierten Bilder wurden manuell und automatisch koregistriert. Nach einer Glättung mittels Gauß-Filter wurde die Aktivitätsanreicherung für das gesamte Gehirn normiert. Das Bild wurde auf einen MRT-basierten Ratten-Gehirnatlas projiziert. Links: Sagittalebene; rechts: Koronarebene; L: links, R: rechts.

4.3.3. Normierung

Die erfassten Bilder wurden auf die mittlere Aktivität im gesamten Gehirn normiert („whole brain normalization“, „global mean“), um eine Vergleichbarkeit der aufgenommenen Aktivität der verschiedenen Tiere zu erreichen. Die enthaltenen Bildwerte stellen damit das Verhältnis zwischen der Aktivität eines Voxels im Gehirn und der Durchschnitts-aktivität im Gehirn dar. Diese Methode wurde als Alternative zu einer Berechnung des SUV (standard uptake value) gewählt, bei der die injizierte Aktivität mit einbezogen wird. Die Ermittlung der tatsächlich aufgenommenen Menge des Tracers ist nicht möglich, da Teile der Lösung paravenös laufen können und eine geringe Menge der Aktivität im Katheter oder in der Spritze verbleibt. Außerdem werden durch die Normierung individuelle anatomische Abweichungen der Rattengehirne berücksichtigt. Eine Analyse der Bilder mittels Normierung auf das gesamte Gehirn stellt in diesem Versuchsmodell daher die Methode mit einer geringeren Anfälligkeit für Berechnungsfehler dar.

4.3.4. SPM-und VOI-Analysen

Zur Darstellung der unterschiedlichen [^{18}F]FLT- bzw. [^{18}F]GE180-Anreicherung in den anatomischen Lokalisationen wurden die fertigen μPET -Bilder auf einen MRT-Gehirnatlas einer Ratte projiziert. Mit der Software SPM8 (statistical parametric mapping, (PENNY et al., 2011)) wurden voxelweise statistische Tests durchgeführt. Eine erhöhte oder verringerte Tracer-Anreicherung an den Tagen post UL wurde im Vergleich mit den Baseline-Scans der gesunden Tiere bildlich dargestellt. In der Therapiestudie wurde die [^{18}F]GE180-Aufnahme von den Scans der Etifoxin-Gruppe mit denen der Sham-Gruppe verglichen.

Für eine quantitative Auswertung in studienrelevanten Regionen des Gehirns wurden mit Pmod manuell VOIs („volumes of interest“) in die Bilder eingezeichnet. Diese befinden sich im Hippocampus und in den beiden vestibulären Kerngebieten im Hirnstamm (Abbildung 12).

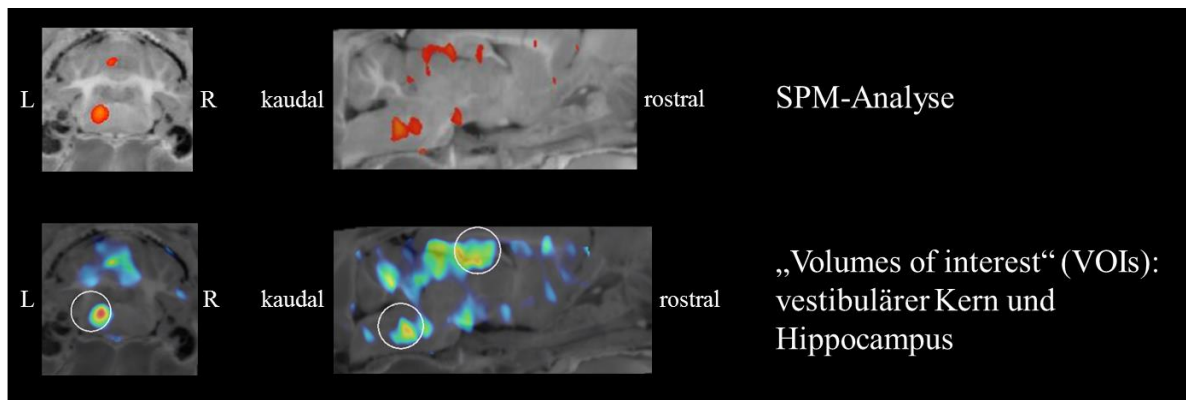


Abbildung 12: [^{18}F]GE180- μPET -Scan einer unilateral labyrinthektomierten Ratte an Tag 15 post UL. Oben: In der SPM-Analyse ist der Unterschied der Aktivitätsanreicherung zwischen Baseline und Tag 15 post UL in orange dargestellt ($p = 0,005$). Unten: In der Software Pmod wurden die VOIs für das linke vestibuläre Kerngebiet und für den linken Hippocampus manuell eingezeichnet (weiße Kreise). L: links, R: rechts.

5. Immunhistologie

Der Goldstandard zum in vivo-Nachweis von Zellproliferation ist die immunhistologische Untersuchung mittels BrdU. Hierbei handelt es sich um ein halogenisiertes Thymidin-Derivat, das sich nach Injektion in den Organismus als Pyrimidin-Analogon in die DNA proliferierender Zellen einbaut. Mit spezifischen monoklonalen Antikörpern kann das inkorporierte BrdU markiert werden. Die Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie stellt eine sehr sensitive Methode zur Untersuchung der DNA-Syntheserate dar (GRATZNER, 1982).

5.1. BrdU-Injektion

Die immunhistologische Untersuchung fand im selben Zeitintervall wie die [^{18}F]FLT- μPET -Scans statt. Für jeden Zeitpunkt wurden drei labyrinthektomierte und drei Sham-operierte Tiere untersucht. 24 Stunden vor der Perfusion wurde den Tieren 50 mg/kg BrdU-Lösung intraperitoneal appliziert. Am nächsten Tag erfolgte die transkardiale Perfusion der Tiere mit anschließender Entnahme der Gehirne (siehe III.2.4).

5.2. Kryostatschnitte

Um sagittale Schnitte anzufertigen, wurden die Gehirne der perfundierten Ratten mit einem Skalpell in der Mitte halbiert. Jede Hälfte wurde in einem Plastikgefäß in Tissue Tek eingebettet. Die Gehirne wurden über wenige Minuten bei -80°C eingefroren und nach vollständiger Trocknung des Tissue Teks in einem Kryostat mit einer Kammer-temperatur von -22°C auf 80 μm Schichtdicke geschnitten.

Die Schnitte einer Gehirnhälfte wurden fortlaufend in eine Mikrotiterplatte mit je sechs Vertiefungen gegeben, sodass sich in einem Schacht jeder sechste Schnitt befand. Die Platten waren mit PBS gefüllt und die anschließende Färbung erfolgte im Free Floating-Verfahren (engl.: frei schwimmend). Die im Folgenden beschriebene BrdU-Immunhistologie erfolgte pro Gehirnhälfte an den Schnitten aus je einem Schacht. Bei den übrigen Schnitten wurde das PBS durch eine Aufbewahrungs-Lösung ersetzt, was eine längerfristige Lagerung der Proben bei -20°C ermöglicht.

5.3. Immunhistologische Färbung

Für den histologischen Nachweis von proliferierenden Zellen wurde eine indirekte Immunfluoreszenz angewandt. Im ersten Schritt wird ein primärer Antikörper, der an das intrazelluläre BrdU bindet, auf die Schnitte gegeben. Daraufhin wird ein sekundärer Antikörper, der an den primären Antikörper andockt, hinzugefügt. Der zweite Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, mit dem die BrdU-positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden (Abbildung 13). Die Bindung des primären Antikörpers an das intrazelluläre BrdU ist nur möglich, wenn die DNA als Einzelstrang vorliegt. Daher müssen die Schnitte für 20 Minuten in Salzsäure inkubiert werden, wodurch die DNA hydrolysiert wird. Um die zugesetzte Säure zu neutralisieren, wurden die Schnitte danach mit Boratpuffer gewaschen. Die immunhistologische Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 20 min mit Salzsäure inkubieren
- dreimal je 10 min mit Boratpuffer waschen
- zweimal je 10 min mit PBS waschen
- 24 h bei 4°C mit primärem Antikörper gegen BrdU inkubieren
- dreimal je 10 min mit PBS waschen
- zwei Stunden bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper inkubieren
- dreimal je 10 min mit PBS waschen

Die Gehirnschnitte wurden mit einem Pinsel aus der PBS-Lösung entnommen und auf einen Objektträger gelegt. Auf jeden Schnitt wurde ein Tropfen Mounting Medium gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Nach der Trocknung erfolgte die Lagerung der Schnitte bei 4°C .

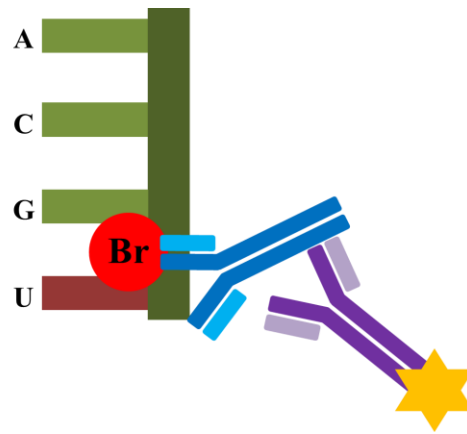


Abbildung 13: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. BrdU baut sich in die DNA einer proliferierenden Zelle ein. Bei der immunhistologischen Färbung bindet ein primärer Antikörper (blau) gegen BrdU an die einzelsträngige DNA. Der sekundäre Antikörper (lila) ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert (gelber Stern) und bindet an den ersten Antikörper. (Br = Brom, U = Uridin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin). In Anlehnung an KEMPERMANN et al. (1998).

5.4. Quantitative Auswertung

Für die quantitative Analyse der gefärbten Zellen wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet, bei dem die BrdU-positiven Zellen auf dem entsprechenden Farbkanal leuchtend erscheinen. Für die Untersuchung einer Veränderung der Neurogeneserate im Hippocampus wurden die fluoreszierenden Zellen im Gyrus dentatus gezählt. Um Proliferationsvorgänge im Hirnstamm zu erkennen, wurden die angefärbten Zellen im vestibulären Kerngebiet ausgewertet (Abbildung 14). Pro Gehirnhälfte wurden drei mediale Schnitte analysiert.

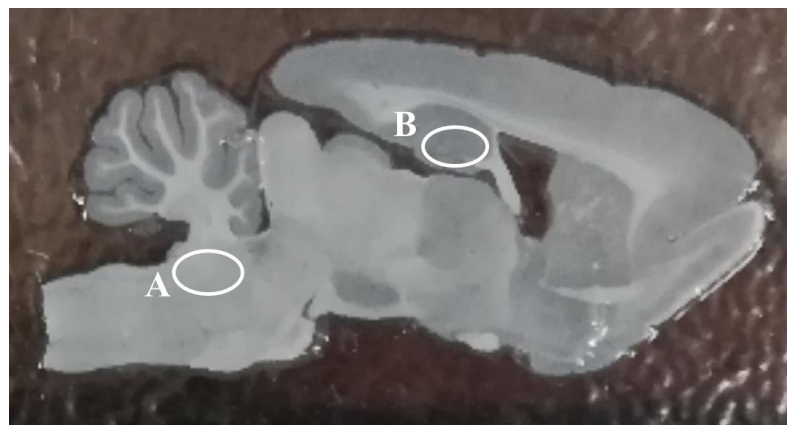


Abbildung 14: Foto eines verarbeiteten Gehirnschnittes auf einem Objektträger. Die weißen Kreise markieren die Lokalisationen, in denen die BrdU-positiven Zellen ausgezählt wurden. A: vestibuläres Kerngebiet; B: Gyrus dentatus.

6. Statistische Analysen

6.1. SPSS

Die statistische Auswertung der Verhaltenstests, der VOI-basierten μ PET-Daten und der Immunhistologie erfolgte mit der Software SPSS. Für jeden Parameter wurde das arithmetische Mittel von allen Tieren pro Zeitpunkt ausgerechnet. Bei den Score Points handelt es sich um ordinalskalierte Variablen, während die Ergebnisse aus dem Open Field, der VOI-Analysen und die Anzahl der BrdU-positiven Zellen metrisch sind.

Longitudinale Veränderungen wurden im Intertagesvergleich mit dem Friedmann-Test für verbundene Stichproben ermittelt. Die Analyse erfolgte für die Verhaltenstests, die Tracer-Anreicherung und die Immunhistologie. Für Gruppenvergleiche an den einzelnen Tagen diente der Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. Beim T-Maze wurden die labyrinthektomierten Tiere mit einer gesunden Kontroll-Gruppe verglichen. In der Therapiestudie erfolgte der Test zwischen der Etifoxin- und der Sham-Gruppe. Im μ PET wurden die ipsi- und die kontraläsionalen Seiten miteinander verglichen. Bei der Zählung der BrdU-positiven Zellen diente der Mann-Whitney-U-Test dem Vergleich zwischen Sham- und UL-operierten Tieren, sowie zwischen der linken und der rechten Gehirnhälfte. Für eine Korrelationsanalyse zwischen der Tracer-Anreicherung in den VOIs und den Ergebnissen der Verhaltenstests wurde der Kendall-Tau-Test angewandt.

Das Signifikanzniveau (p) für eine falsche Annahme der Nullhypothese wurde für alle Tests auf $p < 0,05$ gesetzt. Bei einem p -Wert von unter 0,01 wurden die Ergebnisse als hoch signifikant eingestuft. Ab $p < 0,001$ galten die Ergebnisse als höchst signifikant.

6.2. SPM

Die statistische Auswertung der Aktivitätsverteilung im Gehirn erfolgte voxelweise mit dem Programm SPM8. Zur Feststellung einer veränderten Proliferationsrate und Mikrogliaaktivierung nach UL wurden die [18 F]FLT- bzw. [18 F]GE180-Uptakes an den post operativen Tagen mit der Anreicherung bei den Baseline-Scans verglichen. Da im gesamten Versuchsverlauf immer dieselben Tiere getestet wurden und es sich um verbundene Stichproben handelt, wurde in der statistischen Auswertung der abhängige t -Test (Paardifferenz-Test, engl.: paired t -test) angewandt.

In der Therapiestudie wurde die [18 F]GE180-Anreicherung zwischen der Etifoxin- und der Sham-Gruppe verglichen. Hierfür wurde der multiple Zweistichproben- t -Test (engl.: two-sample t -test) genutzt.

Visuell konnte mittels positiver oder negativer Kontraste eine erhöhte oder eine verringerte Tracer-Anreicherung (Aktivierung bzw. Deaktivierung) im Rattengehirn dargestellt werden. Das Signifikanzniveau betrug in den SPM-Analysen $p < 0,005$. Es wurde ein Schwellenwert von 20 Voxel festgelegt. Befanden sich die Signale unter dieser Grenze, wurden sie nicht mehr in die Wertung einbezogen, um Areale mit sehr geringem Volumen auszuschließen.

7. Versuchsdesign

7.1. Plastizitätsmechanismen

Um eine Modulation der Neurogenese post UL nachzuweisen, wurden 12 Ratten mittels [^{18}F]FLT im μPET gemessen. Der Verhaltenstest im T-Maze diente der Evaluation von Auswirkungen auf das Lernverhalten und die räumliche Orientierung. Für die Untersuchung der Mikrogliaaktivierung wurden dieselben Tiere mit dem TSPO-Liganden [^{18}F]GE180 im μPET gescannt.

Nach einer Eingewöhnungszeit von 7 Tagen begann ein 5-tägiges Training im T-Maze. In dieser Zeit erfolgten außerdem zwei Baseline-Scans mit [^{18}F]FLT und [^{18}F]GE180. Post UL absolvierten die Tiere von Tag 1 bis Tag 31 dreimal in der Woche das T-Maze. Die μPET -Scans wurden wöchentlich an den Tagen 3, 10, 17, 24 und 31 mit [^{18}F]FLT, sowie an den Tagen 1, 8, 15, 22 und 29 post UL mit [^{18}F]GE180 durchgeführt (Abbildung 15).

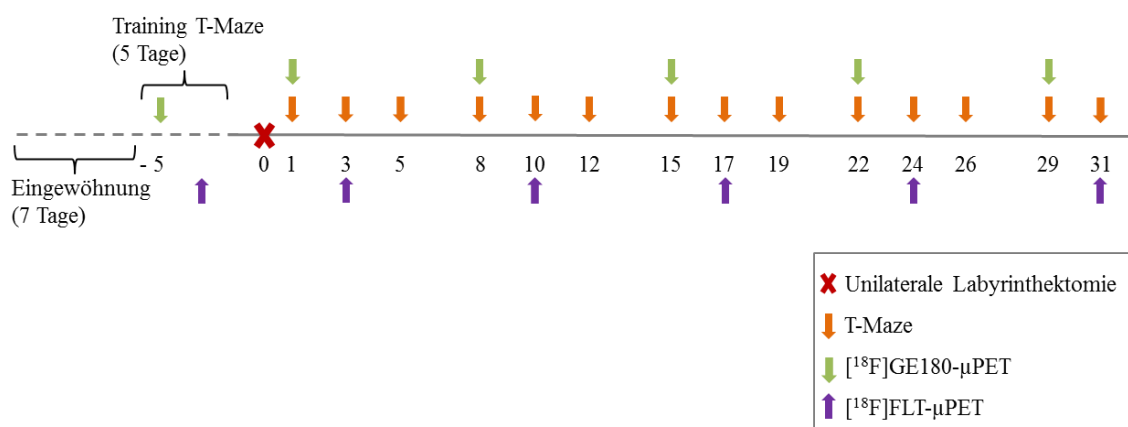


Abbildung 15: Versuchsablauf der Plastizitätsstudie. Nach 7-tägiger Eingewöhnung erfolgten über 5 Tage das Training im T-Maze, sowie zwei Baseline-Scans. Die μPET -Messungen mit [^{18}F]FLT und [^{18}F]GE180 fanden je einmal in der Woche statt. Die Tests im T-Maze wurden dreimal wöchentlich durchgeführt.

Um die T-Maze-Ergebnisse der unilateral labyrinthektomierten Tiere mit dem physiologischen Verhalten vergleichen zu können, wurden zehn nicht-operierte Tiere im gleichen Zeitintervall im T-Maze getestet.

Für einen immunhistologischen Nachweis der Neurogenese mittels BrdU wurden zu jedem korrelierenden Zeitpunkt eines [^{18}F]FLT- μPET -Scans drei unilateral labyrinthektomierte und drei Sham-operierte Tiere perfundiert. Als Vergleich dienten drei gesunde Tiere (Baseline). In Tabelle 3 sind die verwendeten Tierzahlen der Plastizitätsstudie aufgelistet.

Versuchsgruppe	Operation	Tierzahl
Kontroll-Gruppe T-Maze	keine	n = 10
T-Maze & μPET	UL	n = 12
BrdU UL	UL	n = 17
BrdU Sham	Sham-OP	n = 16
BrdU Baseline	keine	n = 3

Tabelle 3: Tierzahlen der Plastizitätsstudie.

7.2. Therapiestudie Etifoxin

In diesem Versuchsabschnitt sollte der Einfluss des TSPO-Agonisten Etifoxin auf die Mikrogliaaktivierung nach UL und der Einfluss auf die funktionelle Verbesserung der zentralen Kompensation untersucht werden.

Nach 7-tägiger Eingewöhnungszeit wurde mit einer Baseline-Messung im μPET mit [^{18}F]GE180 begonnen. Weitere Scans fanden einmal pro Woche an den Tagen 1, 8, 15, 22 und 29 post UL statt. Zur Beurteilung der Etifoxin-Wirkung auf das Verhalten erfolgten das klinische Scoring und ein 10-minütiger Lauf im Open Field. Die Verhaltenstests wurden an den korrelierenden Tagen der μPET -Messungen und zusätzlich an den Tagen 2 und 3 post UL durchgeführt (Abbildung 16). Für das Experiment wurden 21 Tiere einer unilateralen Labyrinthektomie unterzogen. Davon wurden elf Ratten über sieben Tage mit Etifoxin (25 mg/kg) behandelt. Die intraperitoneale Applikation erfolgte einmal täglich. An Tag 1 wurde sie mindestens drei Stunden nach der μPET -Messung durchgeführt, damit der Rezeptor nicht mehr durch den Radiotracer blockiert war. Als Kontrollgruppe bekamen zehn Tiere unter den gleichen Versuchsbedingungen dieselbe Menge NaCl-Lösung injiziert (Tabelle 4).

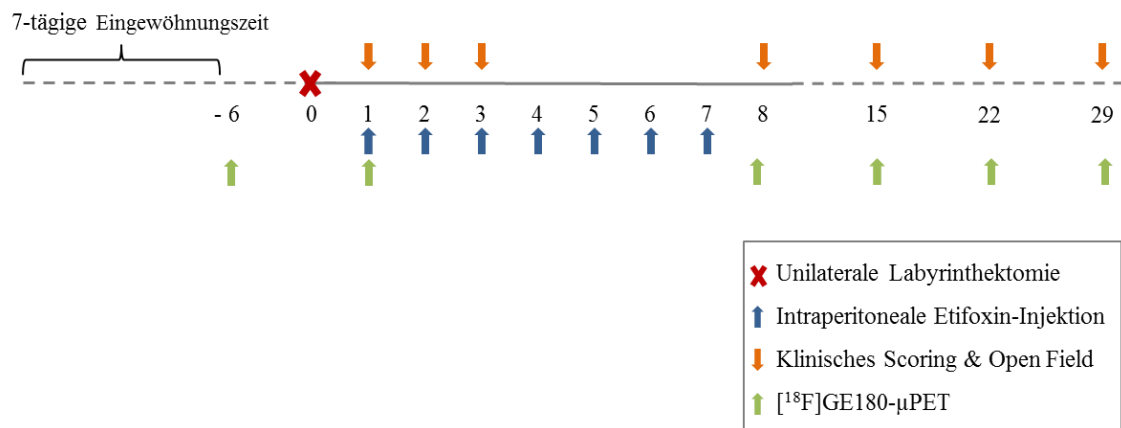


Abbildung 16: Versuchablauf der Therapiestudie. Nach 7-tägiger Eingewöhnungszeit erfolgte ein $[^{18}\text{F}]$ GE180-Baseline-Scan; post UL fanden wöchentliche Scans statt. Die intraperitoneale Applikation von Etifoxin, bzw. NaCl-Lösung, erfolgte post UL 1 x täglich über sieben Tage. Das klinische Scoring und der Open Field Test wurden an den korrelierenden Tagen der μ PET-Messungen, sowie an Tag 2 und 3 durchgeführt.

Behandlung	Tierzahl
Etifoxin (25 mg/kg)	n = 12
Sham (NaCl-Lösung)	n = 12

Tabelle 4: Tierzahlen der Therapiestudie.

IV. ERGEBNISSE

Als Modell der unilateralen Vestibulopathie diente in den durchgeführten Experimenten die unilaterale Labyrinthektomie (UL) von Ratten. Für die Plastizitätsstudie wurden 12 Tiere der Operation unterzogen. Die Tiere zeigten post UL die erwarteten Symptome (Nystagmus, Kopfschiefhaltung und posturale Asymmetrie). Für die immunhistologische Untersuchung der Neurogenese wurde an 17 Ratten eine UL und an 16 Ratten eine Sham-OP durchgeführt. Ein Tier verstarb intra operationem während der transtympanalen Applikation der Atoxyl-Lösung. Bei der intraperitonealen Injektion der BrdU-Lösung verstarb ebenfalls eine Ratte. Ein weiteres Tier zeigte nach UL keine Symptomatik und wurde aus dem Versuch genommen. Von 24 Ratten der Etifoxin-Therapiestudie blieben zwei Tiere post UL asymptomatisch. Ein weiteres Tier erlitt nach dem Baseline-Scan im μ PET den Tod durch Apnoe.

Insgesamt wurden 82 Tiere für die Versuche genutzt, sechs davon entfielen in der Auswertung. Dies entspricht einer Ausfallquote von 7,3%. In Tabelle 5 sind die Tierzahlen der verwendeten Ratten aufgeführt.

Studie	Verwendete Tierzahl			Fehlende Symptomatik post UL	Verstorben	Tierzahl im Versuch
	UL	Sham-OP	keine OP			
Plastizität	12	0	0	0	0	12
Etablierung T-Maze	0	0	10	-	0	10
Immunhistologie	17	16	3	1	2	33
Therapiestudie Etifoxin	24	0	0	2	1	21
Gesamt	53	16	13	3	3	76
	82					

Tabelle 5: Tierzahlen der verwendeten Ratten, aufgeteilt nach Studienabschnitt und OP-Variante. Insgesamt wurden 82 Tiere verwendet, von denen jeweils 3 aufgrund von fehlender Symptomatik oder Exitus nicht in die Versuchsauswertung eingingen.

1. Plastizitätsmechanismen

Die zentrale Plastizität spielt eine wichtige Rolle in der symptomatischen Verbesserung nach vestibulären Läsionen. Ziel dieser Studie war es, die zellulären Mechanismen und deren Effekt auf die klinische Symptomatik während der vestibulären Kompensation zu untersuchen. Mikrogliaaktivierung und Neurogenese wurden in vivo mittels [^{18}F]GE180- und [^{18}F]FLT- μPET an 12 unilateral labyrinthektomierten Ratten untersucht. Die Operation erfolgte zu Standardisierungszwecken bei jedem Tier auf der linken Seite. Um die Veränderungen der Tracer-Aufnahme im Intertagesvergleich in den vestibulären Kernen (VN) und im Hippocampus quantitativ darzustellen, wurden „volumes of interest“ (VOIs) für die μPET -Bilder bestimmt. Für diese Gehirnregionen wurde der prozentuale Unterschied zwischen der mittleren Aktivitätskonzentration pro Voxel und der mittleren Konzentration im gesamten Gehirn berechnet (normierter Uptake in %).

1.1. Mikrogliaaktivierung: [^{18}F]GE180- μPET

1.1.1. VOI-Analyse

Der [^{18}F]GE180-Uptake war im linken VN ab Tag 1 post UL im Vergleich zur Baseline erhöht (Abbildung 17). Der Höchstwert wurde an Tag 8 erreicht (116,2%). Im rechten VN sank die [^{18}F]GE180-Aufnahme an Tag 1 auf 97,3%. Ab Tag 8 passte sich die [^{18}F]GE180-Konzentration auf der kontraläsionalen Seite wieder an das Baseline-Level an; ipsiläsional blieb sie bis einschließlich Tag 29 erhöht.

Im linken vestibulären Kerngebiet war der Uptake ab Tag 1 stets höher als im rechten VN. Der Unterschied zwischen den Aktivitätskonzentrationen beider Seiten war an Tag 1 signifikant ($p = 0,009$). Im Intertagesvergleich waren die longitudinalen Veränderungen nicht signifikant.

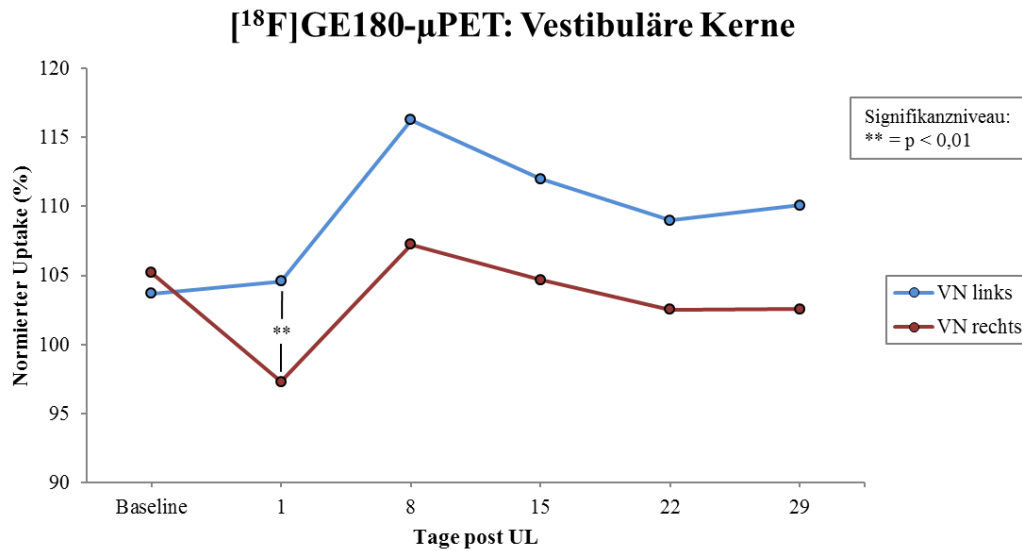


Abbildung 17: Normierter [¹⁸F]GE180-Uptake in den vestibulären Kernen. Die Mikrogliaaktivierung war im ipsiläsionalen VN (links) post UL durchgehend im Vergleich zur Baseline erhöht. Kontraläsional sank der Uptake an Tag 1 post UL und stieg ab Tag 8 wieder auf das Baseline-Niveau. Der Unterschied der [¹⁸F]GE180-Anreicherung war zwischen den beiden Seiten an Tag 1 signifikant. VN: vestibulärer Nucleus, UL: unilaterale Labyrinthektomie.

Im Hippocampus war die [¹⁸F]GE180-Bindung auf beiden Seiten prozentual stets niedriger als im gesamten Gehirn. Ab Tag 1 post UL stieg der [¹⁸F]GE180-Uptake im Vergleich zur Baseline über die Zeit tendenziell auf beiden Seiten an (Abbildung 18). Die höchste Tracer-Anreicherung wurde an Tag 22 im linken Hippocampus gemessen (1,14-fach im Vergleich zur Baseline). Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Seiten und im Intertagesvergleich vor.

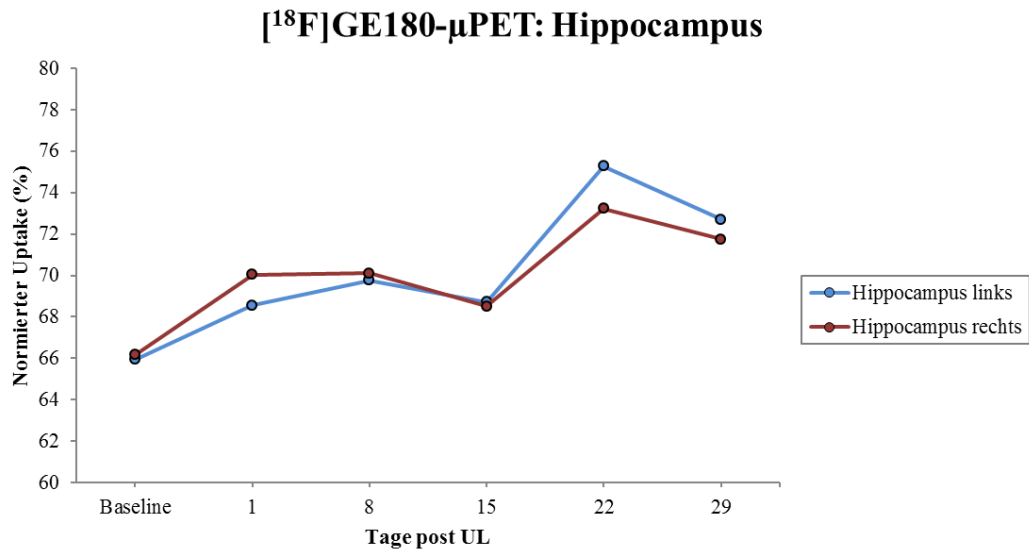


Abbildung 18: Normierter [¹⁸F]GE180-Uptake im Hippocampus. Die Mikrogliaaktivierung war auf beiden Seiten post UL erhöht und erreichte ihren Höchstwert an Tag 22. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.1.2. SPM-Analyse

Bei der SPM-Analyse wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,005$) zwischen der Baseline und den Tagen post UL mit einem Paardifferenztest ermittelt. Die Aktivierungen wurden auf einen MRT-Gehirnatlas einer Ratte projiziert und farblich kodiert (rot: Signalanstieg).

Ab Tag 1 post UL war die Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen VN und im Zerebellum im Vergleich zur Baseline erhöht (Abbildung 19). Die vermehrte [¹⁸F]GE180-Anreicherung blieb bis einschließlich Tag 29 bestehen. Im Hippocampus trat ab Tag 1 post UL ebenfalls eine Aktivierung der Mikroglia auf (Abbildung 20). Diese war an den Tagen 1, 22 und 29 bilateral und an Tag 8 kontraläsional vorhanden.

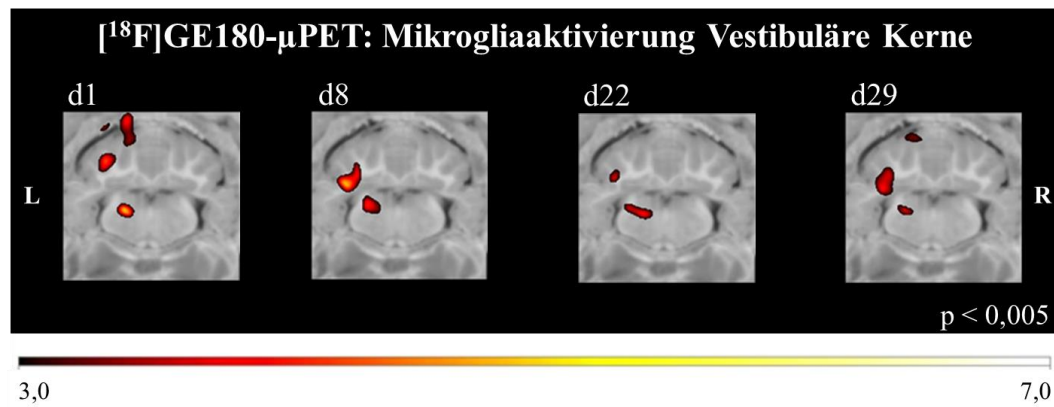


Abbildung 19: Mikrogliaaktivierung in den vestibulären Kernen im $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}\mu\text{PET}$ post UL. Im ipsiläsionalen vestibulären Kern und im Zerebellum war die Mikrogliaaktivierung an allen Tagen post UL erhöht. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im rot-gelb-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7, Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Transversalebene; L: links, R: rechts; d: Tag post UL.

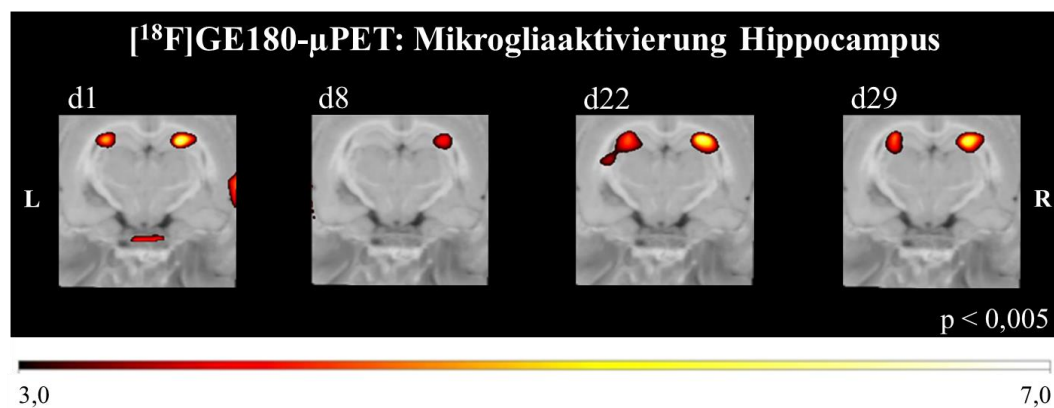


Abbildung 20: Mikrogliaaktivierung im Hippocampus im $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}\mu\text{PET}$ post UL. An Tag 8 trat eine kontraläsionale Mikrogliaaktivierung auf, an den Tagen 1, 22 und 29 war diese bilateral. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im rot-gelb-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7, Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Koronarebene; L: links, R: rechts; d: Tag post UL.

1.2. Neurogenese: $[^{18}\text{F}]\text{FLT-}\mu\text{PET}$

1.2.1. VOI-Analyse

Im linken VN war die $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Anreicherung an Tag 3 post UL im Vergleich zur Baseline auf das 1,1-fache erhöht, im rechten VN auf das 0,9-fache verringert (Abbildung 21). Der Unterschied zwischen dem linken und dem rechten Kerngebiet war an Tag 3 signifikant ($p = 0,008$). Ab Tag 10 nahm die Aktivitäts-

konzentration ipsiläsional ab und erreichte an Tag 31 wieder den Baseline-Level. Im kontraläsionalen Kern entsprach die [^{18}F]FLT-Aufnahme ab Tag 10 den Werten der Baseline-Messung. Der Anstieg, bzw. die Verringerung der Neurogeneserate, war im Intertagesvergleich nicht signifikant.

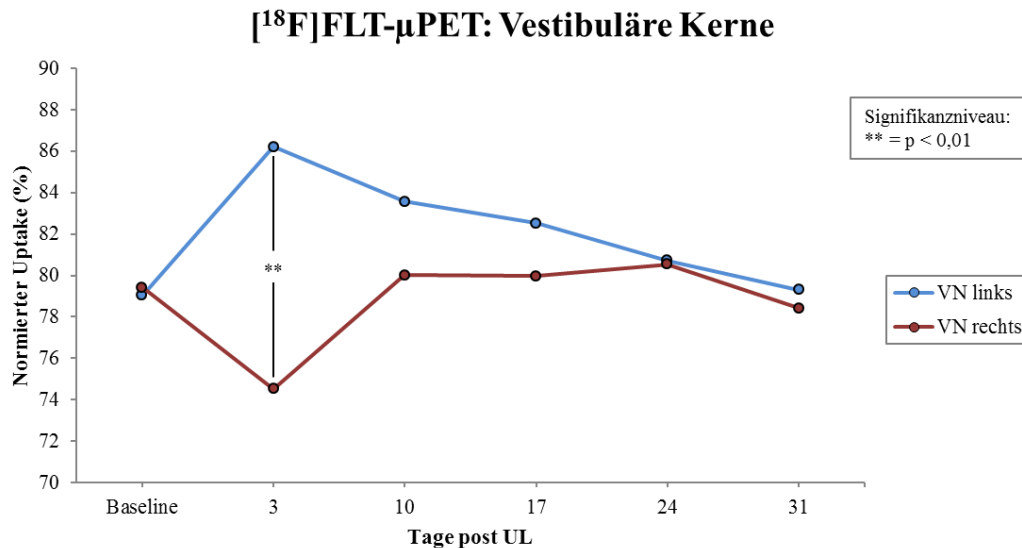


Abbildung 21: Normierter [^{18}F]FLT-Uptake in den vestibulären Kernen. Ipsiläsional war die [^{18}F]FLT-Anreicherung an Tag 3 post UL erhöht, kontraläsional erniedrigt. Auf beiden Seiten gleichen sich die Werte wieder an das Baseline-Niveau an. Der Unterschied ist zwischen der linken und der rechten Seite an Tag 3 post UL signifikant. VN: vestibulärer Nucleus, UL: unilaterale Labyrinthektomie.

Im linken Hippocampus stieg die [^{18}F]FLT-Aufnahme post UL stetig an und erreichte ihren Höchstwert an Tag 24 (65,9%; 1,08-fach gegenüber Baseline) (Abbildung 22). Im rechten Hippocampus war die Neurogeneserate an Tag 3 post UL leicht verringert und stieg im longitudinalen Verlauf an. Der Peak wurde ebenfalls an Tag 24 erreicht (66,6%; 1,12-fach gegenüber Baseline). Die gesteigerte Neurogenese war kontraläsional zwischen der Baseline-Messung und Tag 24 signifikant ($p = 0,042$). Zwischen dem linken und dem rechten Hippocampussegment traten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivitätskonzentration auf.

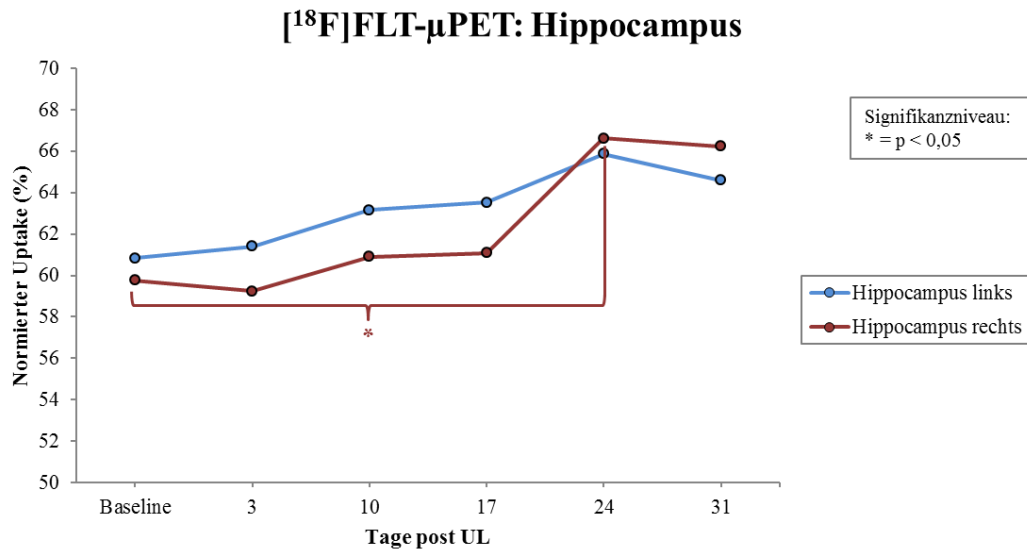


Abbildung 22: Normierter [¹⁸F]FLT-Uptake im Hippocampus. Die Tracer-Anreicherung nahm auf beiden Seiten post UL zu, der Anstieg war kontraläsional von der Baseline auf Tag 24 signifikant. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.2.2. SPM-Analyse

Die [¹⁸F]FLT-Anreicherung war ab Tag 3 post UL im linken Innenohr (ipsiläsionales OP-Gebiet) und im vestibulären Kern im Vergleich zur Baseline erhöht (Abbildung 23). Die gesteigerte Zellproliferation im ipsiläsionalen Innenohr nahm longitudinal bis Tag 31 ab, im ipsiläsionalen Kern bis Tag 17. Ab Tag 10 trat ein erhöhter [¹⁸F]FLT-Uptake in der Mitte des medullären Hirnstammes auf, der sein Maximum an Tag 17 erreichte und bis Tag 31 vorlag. Im Hippocampus trat an Tag 24 und Tag 31 überwiegend kontraläsional eine gesteigerte Proliferationsrate auf (Abbildung 24).

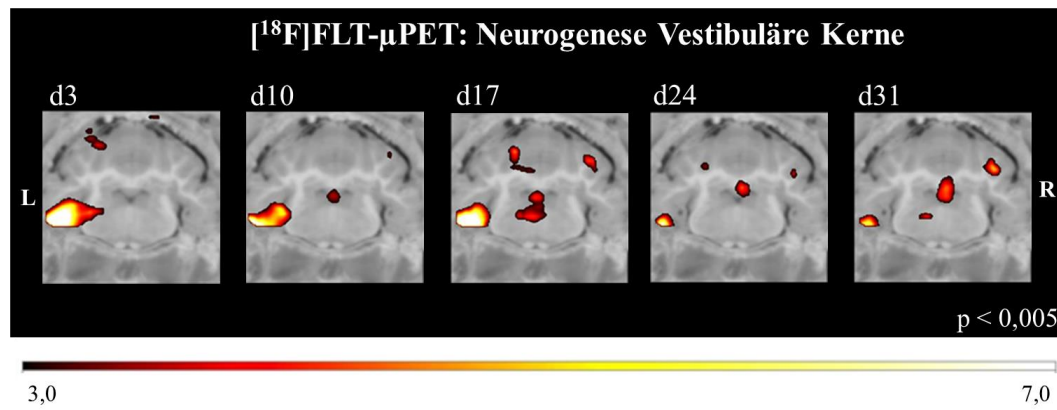


Abbildung 23: Neurogenese im Hirnstamm im $[^{18}\text{F}]\text{FLT-}\mu\text{PET}$ post UL. Ab Tag 3 trat eine erhöhte Tracer-Anreicherung im ipsiläsionalen Innenohr auf, die im longitudinalen Verlauf abnahm. Ein erhöhtes $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Signal im ipsiläsionalen vestibulären Kern bestand an Tag 3 post UL. Ab Tag 10 war eine gesteigerte Neurogeneserate im medialen Hirnstamm zwischen den vestibulären Kernen zu erkennen, die ihr Maximum an Tag 17 erreichte. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im rot-gelb-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7, Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Transversalebene; L: links, R: rechts; d: Tag post UL.

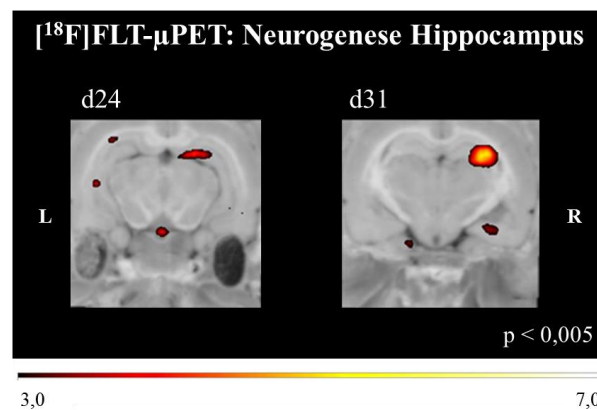


Abbildung 24: Neurogenese im Hippocampus im $[^{18}\text{F}]\text{FLT-}\mu\text{PET}$ post UL. An Tag 24 und 31 war die Neurogenese im Vergleich zur Baseline überwiegend im kontraläsionalen Hippocampus erhöht. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im rot-gelb-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7, Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Koronarebene; L: links, R: rechts; d: Tag post UL.

1.3. Neurogenese: Immunhistologie

Die Ergebnisse des Radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ wurden durch eine Immunhistologie mittels BrdU-Markierung validiert. Die Methode stellt den derzeitigen Goldstandard für die Untersuchung der Neurogenese dar. An jedem korrelierenden Tag eines $[^{18}\text{F}]\text{FLT-}\mu\text{PET}$ -Scans wurden die Gehirnschnitte von drei Tieren post UL und von drei Tieren nach Sham-OP untersucht. Zum

Vergleich dienten drei Gehirne gesunder Tiere (Baseline).

1.3.1. Vestibuläre Kerne

In der UL-Gruppe stieg die Neurogeneserate im Vergleich zur Baseline auf der ipsiläsionalen Seite an Tag 3 post UL 2,16-fach an, verringerte sich an Tag 10 und 17 und war an Tag 24 erneut erhöht (2,53-fach) (Abbildung 25, Abbildung 26). Auf der rechten Seite blieb die Neurogenese zunächst auf Baseline-Level und nahm an Tag 24 auf das 1,93-fache zu. Der Anstieg war kontraläsional von Tag 10 auf Tag 24 signifikant ($p = 0,04$). Im Seitenvergleich war die Neurogeneserate an allen untersuchten Zeitpunkten auf der ipsiläsionalen Seite höher als kontraläsional. An den Tagen 3 ($p = 0,027$), 24 ($p = 0,048$) und 31 ($p = 0,006$) war dieser Unterschied signifikant.

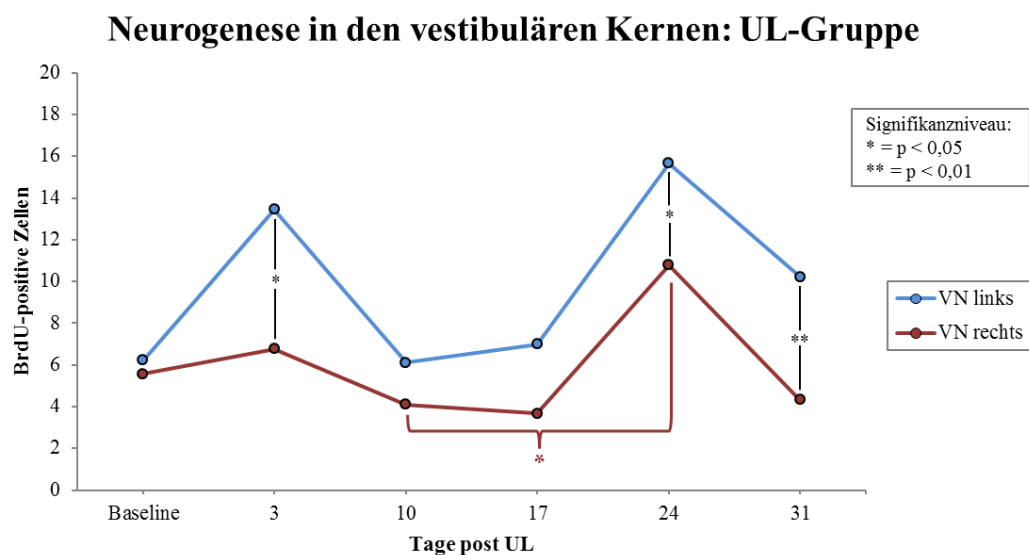


Abbildung 25: BrdU-positive Zellen in den vestibulären Kernen der UL-Gruppe. Auf der ipsiläsionalen Seite traten zwei Höchstwerte an Tag 3 und 24 post UL auf. Kontraläsional war die Neurogenese von Tag 10 auf Tag 24 signifikant erhöht. An den Tagen 3, 24 und 31 war die Proliferationsrate auf der linken Seite signifikant höher als rechtsseitig. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Zellzählung auf drei konsekutiven Gehirnschnitten von jeweils drei Tieren dar. VN: vestibulärer Nucleus, UL: unilaterale Labyrinthektomie, BrdU: Bromdesoxyuridin.

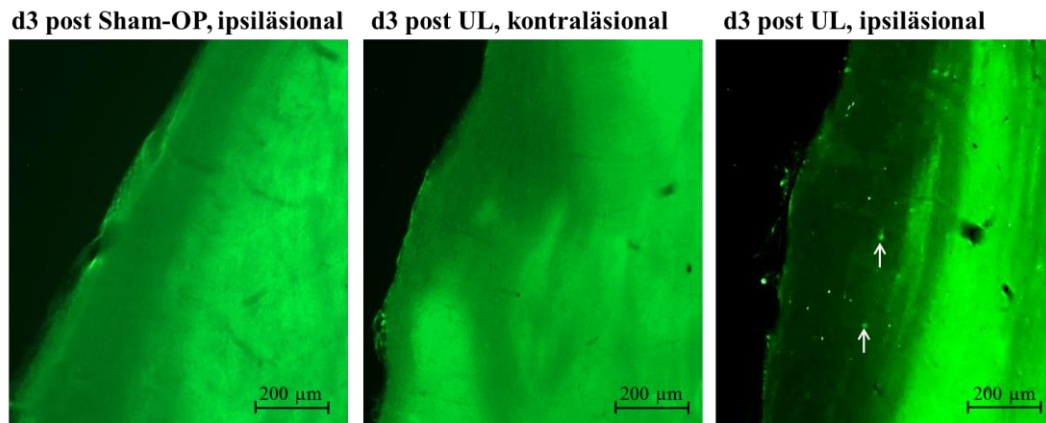


Abbildung 26: Neurogenese in den vestibulären Kernen. In der Sham-Gruppe und auf der kontraläsionalen Seite der UL-Gruppe waren keine BrdU-positiven Zellen vorhanden. Im ipsiläsionalen Kerngebiet war die Neurogenese an Tag 3 post UL erhöht. Dargestellt sind repräsentative Schnitte im Bereich der vestibulären Kerne. OP: Operation, UL: unilaterale Labyrinthektomie, d: Tag.

In der Sham-Gruppe blieb die Neurogeneserate an den Tagen 3 bis 24 auf dem Baseline-Level. Auf der rechten Seite trat an Tag 31 eine erhöhte Proliferation auf; der Anstieg war von Tag 10 auf Tag 31 signifikant ($p = 0,002$). Die Zellzahl war an Tag 31 rechtsseitig signifikant höher als links ($p = 0,007$).

Im Gruppenvergleich war die Neurogenese auf der Läsionsseite an den Tagen 3 ($p = 0,024$), 24 ($p = 0,003$) und 31 ($p = 0,042$) in der UL-Gruppe signifikant höher als in der Sham-Gruppe (Abbildung 27). An Tag 17 bestand eine Tendenz zur Signifikanz ($p = 0,05$). In den kontraläsionalen VN war die Neurogeneserate an Tag 24 post OP in der UL-Gruppe signifikant höher als in der Sham-Gruppe ($p = 0,037$), an Tag 31 signifikant niedriger ($p = 0,001$).

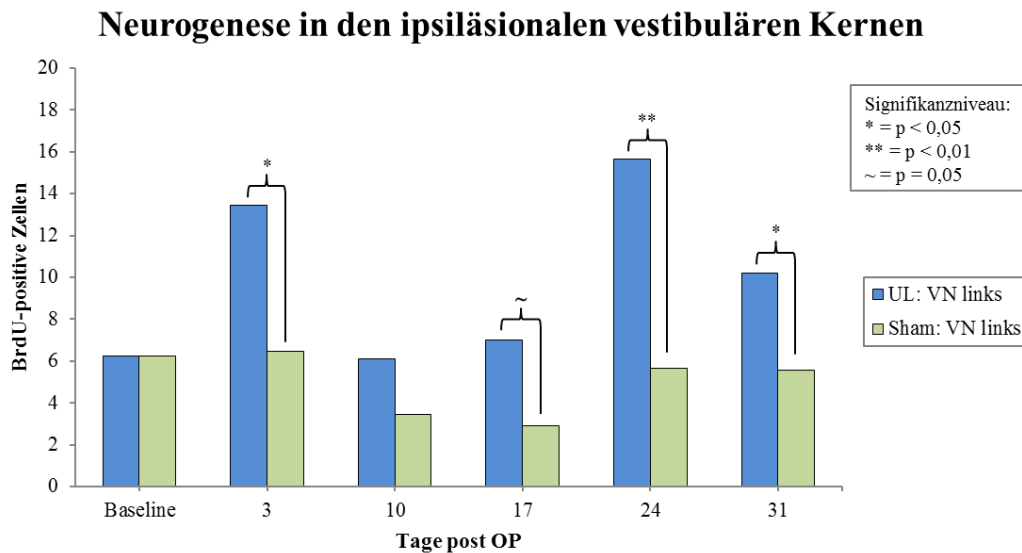


Abbildung 27: BrdU-positive Zellen im ipsiläsionalen vestibulären Kern im Gruppenvergleich. In der UL-Gruppe war die Neurogeneserate stets höher als in der Sham-Gruppe. Die Unterschiede waren an den Tagen 3, 24 und 31 signifikant, an Tag 17 bestand eine Tendenz zur Signifikanz. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Zellzählung auf drei konsekutiven Gehirnschnitten von jeweils drei Tieren dar. VN: vestibulärer Nucleus, OP: Operation, BrdU: Bromdesoxyuridin.

1.3.2. Hippocampus

Post OP verringerte sich die hippocampale Neurogeneserate tendenziell in beiden Gruppen (Abbildung 28, Abbildung 29). In der UL-Gruppe war die Reduktion auf der ipsiläsionalen Seite von der Baseline auf Tag 3 ($p = 0,02$) und auf Tag 10 ($p = 0,008$) signifikant. Rechtsseitig nahm die Anzahl der proliferierten Zellen von der Baseline auf Tag 17 signifikant ab ($p = 0,004$) und stieg auf Tag 24 signifikant an ($p = 0,002$). In der Sham-Gruppe war die Verringerung auf der kontraläsionalen Seite von der Baseline auf Tag 17 signifikant ($p = 0,03$). In beiden Gruppen wurde die Neurogeneserate der Baseline-Zählung bis Tag 31 nicht wieder erreicht.

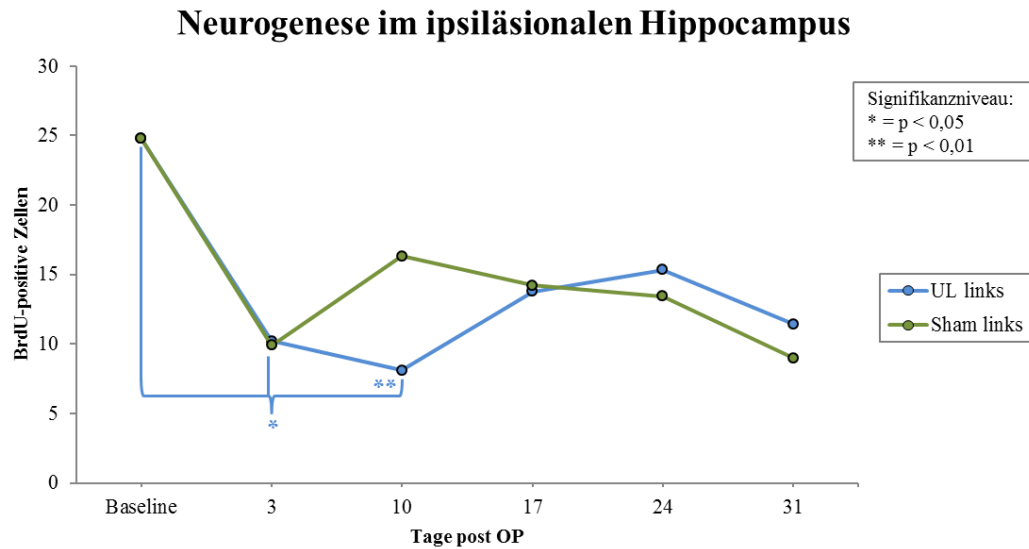


Abbildung 28: BrdU-positive Zellen im ipsiläsionalen Hippocampus im Gruppenvergleich. In beiden Gruppen nahm die Neurogenese post OP ab. Die Veränderungen waren ipsiläsional in der UL-Gruppe von der Baseline auf die Tage 3 und 10 signifikant. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Zellzählung auf drei konsekutiven Gehirnschnitten von jeweils drei Tieren dar. OP: Operation, BrdU: Bromdesoxyuridin.

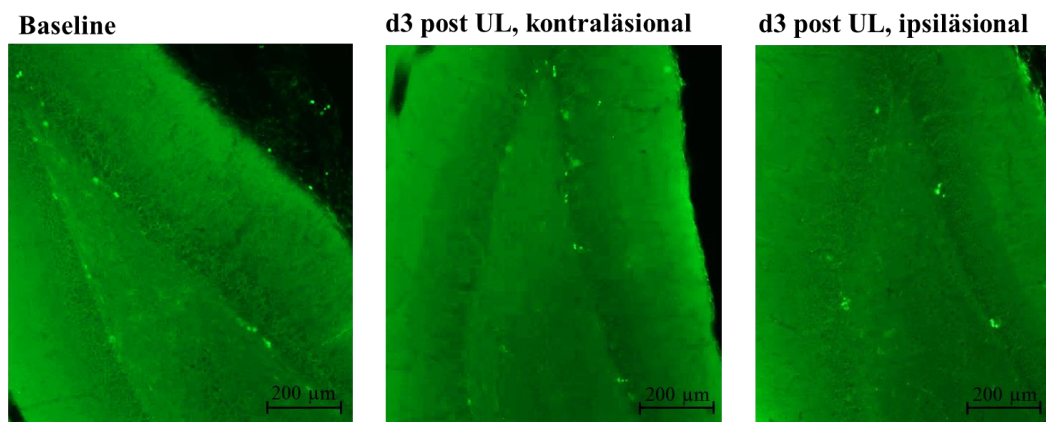


Abbildung 29: Neurogenese im Hippocampus. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen nahm post UL beidseitig ab. Dargestellt sind repräsentative Schnitte durch den Gyrus dentatus. UL: unilaterale Labyrinthektomie, d: Tag.

Im Seitenvergleich war die Zellzahl in der UL-Gruppe auf der ipsiläsionalen Seite des Hippocampus an Tag 24 gegen die rechte Seite signifikant verringert ($p = 0,034$) (Abbildung 30). In der Sham-Gruppe traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Seiten auf.

Die Neurogeneserate der UL-Gruppe war an Tag 10 auf der ipsiläsionalen Seite

signifikant niedriger als in der Sham-Gruppe ($p = 0,041$). Auf der kontraläsionalen Seite war die Zellzahl an Tag 24 ($p = 0,033$) und Tag 31 ($p = 0,046$) in der Sham-Gruppe signifikant geringer als in der UL-Gruppe.

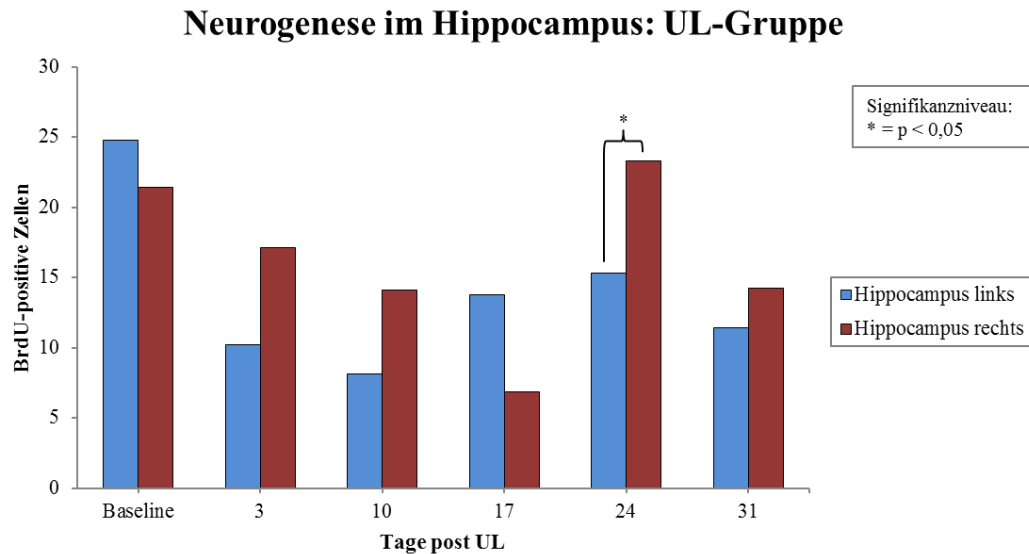


Abbildung 30: BrdU-positive Zellen im Hippocampus der UL-Gruppe. Die Neurogenese war auf der ipsiläsionalen Seite an Tag 24 signifikant niedriger als kontraläsional. UL: unilaterale Labyrinthektomie, BrdU: Bromdesoxyuridin.

1.4. Räumliche Orientierung: T-Maze

Bilaterale Vestibulopathien können zu Beeinträchtigungen des räumlichen Gedächtnisses führen, die von einer Verringerung des Hippocampusvolumens begleitet sind. Für die Untersuchung der räumlichen Orientierung nach UL wurden 12 Ratten (UL-Gruppe) im T-Maze getestet. Zum Vergleich dienten zehn gesunde Tiere (Kontroll-Gruppe), die an den korrelierenden Tagen im T-Maze gelaufen sind.

1.4.1. Performance

Jedes Tier lief pro Testtag 6 Trials im T-Maze. Ziel des Experimentes war die Untersuchung der spontanen Alternation, d.h. die Tiere sollten die beiden Zielarme in jedem Trial abwechselnd aufsuchen. Jede alternierende Entscheidung wurde als richtig gewertet, jedes Aufsuchen des vorherigen Armes als falsch. Der prozentuale Anteil richtiger Entscheidungen wurde als Performance bezeichnet.

Die Tiere der Kontroll-Gruppe zeigten leichte Fluktuationen in der Performance im Versuchsablauf, wobei der höchste Wert an Tag 19 (79,3% richtige Trials) und

der niedrigste Wert an Tag 8 (62,0% richtige Trials) erreicht wurde (Abbildung 31). Für den gesamten Versuchsablauf erreichten die Tiere der Kontroll-Gruppe im Mittel 70,7% richtig alternierte Trials.

In der UL-Gruppe war die Varianz der Performance zwischen den Versuchstagen tendenziell höher. Die höchste Performance fand an Tag 22 post UL statt (76,7% richtige Trials). Die wenigsten richtigen Trials wurden an Tag 1 post UL gelaufen (40,0% richtige Trials). Der Mittelwert der Performance betrug in der UL-Gruppe 60,2%. Im Intertagesverlauf zeigten sich innerhalb der Gruppen keine signifikanten Veränderungen. Die Tiere der Kontroll-Gruppe hatten an allen Tagen, exklusive Tag 22 und 31, eine höhere Anzahl richtiger Trials als die UL-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

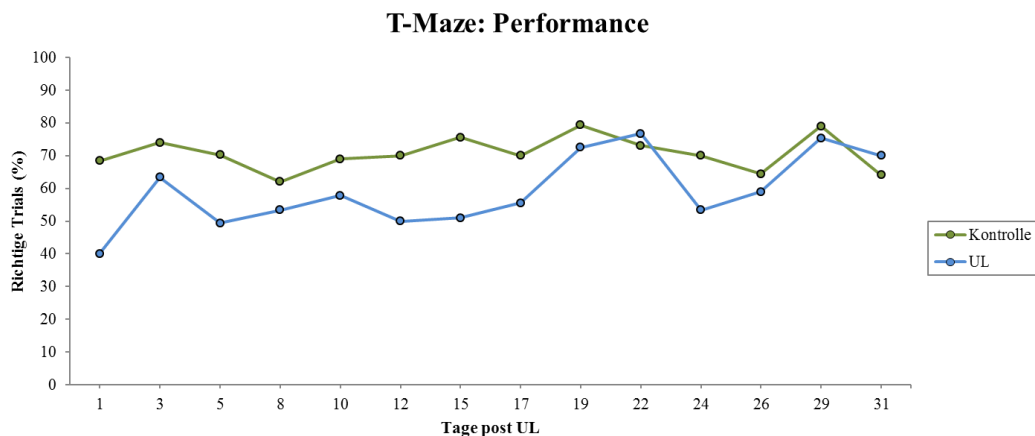


Abbildung 31: Mittelwerte der Performance im T-Maze. Die Kontroll-Gruppe lief an fast allen Tagen mehr richtige Trials als die UL-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen und im Intertagesvergleich waren nicht signifikant. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.4.2. Abbruchquote

Trials wurden ohne Ergebnis vorzeitig abgebrochen, wenn die Tiere zu lange für eine Entscheidung benötigten oder über längere Zeit still sitzen blieben.

Im Baseline-Lauf hatten beide Gruppen eine ähnliche Abbruchquote: In der Kontroll-Gruppe wurden 54,0% der Trials erfolgreich beendet, in der UL-Gruppe 53,3%. Post UL verringerten sich die beendeten Trials auf 13,3% und stiegen an den folgenden Tagen langsam wieder an (Abbildung 32). Die meisten beendeten Trials wurden in der UL-Gruppe an Tag 29 mit einem Mittelwert von 76,7% erreicht. Im Intertagesvergleich war der Anstieg der Anzahl abgeschlossener

Trials von Tag 1 auf Tag 29 signifikant ($p = 0,03$).

In der Kontroll-Gruppe nahm die Anzahl der absolvierten Trials nach dem ersten Lauf zu. An den Tagen 3, 8, 12, 17 und 31 liefen die Tiere 100% der geforderten Trials. Im Intertagesvergleich traten in der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen auf. Im Mittelwert erreichten die Tiere der Kontroll-Gruppe 94,0% beendete Trials, die UL-Gruppe 63,1%.

Die Kontroll-Gruppe lief an jedem Testtag mehr Trials als die UL-Gruppe. Der Unterschied zwischen den Gruppen war an Tag 1 ($p \leq 0,001$) und an Tag 3 ($p = 0,001$) hoch signifikant. An den Tagen 5 ($p = 0,045$), 8 ($p = 0,012$), 17 ($p = 0,049$) und 31 ($p = 0,049$) waren die Gruppenunterschiede signifikant.

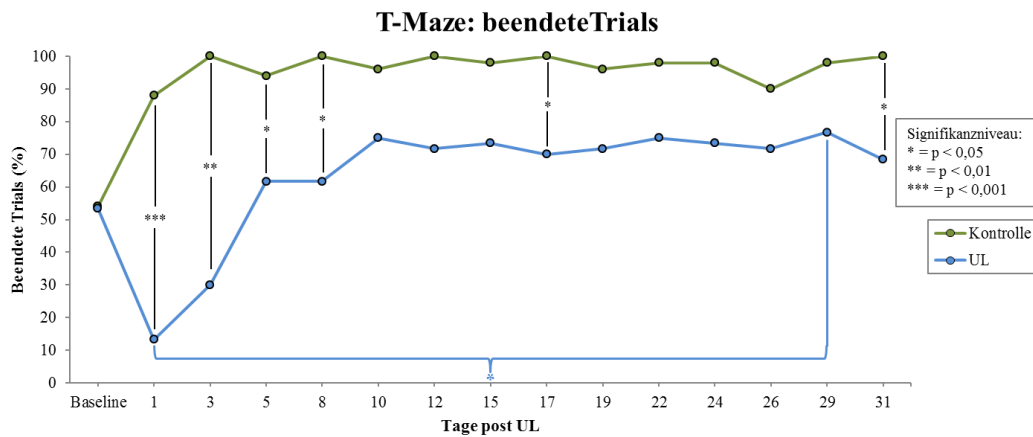


Abbildung 32: Mittelwerte der beendeten Trials im T-Maze. Die Anzahl der absolvierten Trials nahm in der Kontroll-Gruppe nach dem Baseline-Lauf zu und in der UL-Gruppe ab. Signifikante Gruppenunterschiede traten an den Tagen 1, 3, 5, 8, 17 und 31 auf. Die UL-Gruppe zeigte eine signifikante Zunahme der beendeten Trials von Tag 1 auf Tag 29. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.4.3. Richtungspräferenz

Zur Überprüfung einer möglichen Richtungspräferenz durch äußere Einflüsse bei gesunden Tieren wurde für jeden Trial dokumentiert, in welche Richtung die Ratte bei ihrem ersten Trial pro Testtag lief. Außerdem wurden die Richtungen aller Trials für alle Testtage gemittelt. In ihrem jeweils ersten Trial pro Testtag entschieden sich 54,5% der Tiere für den linken Zielarm; die anderen Tiere für den rechten. Insgesamt lag über alle Trials die Verteilung der Richtungen für links versus rechts bei 47,5% zu 52,5%. In der UL-Gruppe dienten die richtungsbezogenen Analysen der Überprüfung, ob die Tiere aufgrund ihrer ipsiläsionalen

Kopfschiefhaltung und Fallneigung eine bestimmte Seite als Ziel präferierten. Im ersten Trial liefen 47,7% der Ratten nach links und 52,3% nach rechts. Insgesamt erfolgten 51,4% aller gelaufenen Trials in den linken Zielarm (versus 48,6% in den rechten) (Abbildung 33).

T-Maze: Gewählte Richtungen der UL-Gruppe

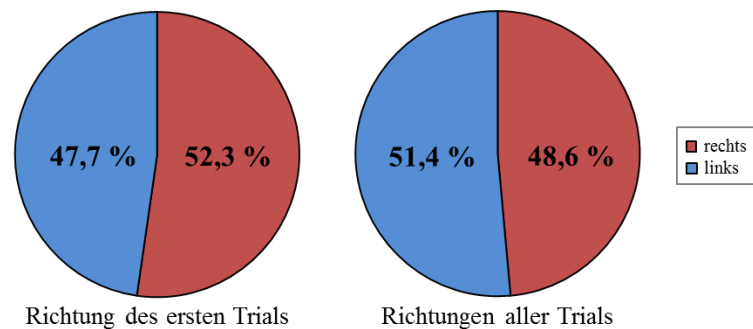


Abbildung 33: Richtungsverteilungen der Zielarme im T-Maze in der UL-Gruppe. Im ersten Trial eines Testtages liefen 47,7% der Tiere nach links und 52,3% nach rechts. Insgesamt entschieden sich 51,4% für den linken Zielarm und 48,6% für den rechten.

1.4.4. Dauer pro Trial

Die Tiere der UL-Gruppe benötigten an jedem Testtag, exklusive an den Tagen 17 und 31, mehr Zeit als die Kontroll-Gruppe um ein Trial abzuschließen (Abbildung 34). Die längsten Trials wurden an Tag 5 post UL gelaufen (Mittelwert 72,3 s). In den folgenden Tagen verringerte sich die benötigte Dauer bis zu einem Mittelwert von 17,8 s an Tag 31. Im Intertagesvergleich benötigten die Tiere der UL-Gruppe an Tag 26 signifikant weniger Zeit als an den Tagen 1 ($p = 0,007$), 3 ($p \leq 0,001$), 5 ($p = 0,005$), 10 ($p = 0,023$) und 12 ($p = 0,028$). Weitere signifikante Veränderungen traten von Tag 1 ($p = 0,031$), 3 ($p \leq 0,001$) und 5 ($p = 0,021$) zu Tag 17 und zwischen Tag 3 und Tag 31 ($p = 0,006$) auf.

In der Kontroll-Gruppe fand die längste Dauer für ein Trial an Tag 1 mit einem Mittelwert von 31,0 s statt. Die kürzeste benötigte Zeit betrug 12,3 s an Tag 26. Im Intertagesvergleich trat von den Tagen 1 ($p = 0,011$), 3 ($p = 0,004$), 8 ($p = 0,011$) und 10 ($p = 0,004$) zu Tag 26 eine signifikante Verringerung der Dauer auf.

Im Gruppenvergleich benötigten die Tiere der Kontroll-Gruppe an den Tagen 1

($p = 0,029$), 3 ($p \leq 0,001$), 5 ($p \leq 0,001$), 8 ($p \leq 0,001$), 10 ($p = 0,001$), 12 ($p = 0,028$) und 19 ($p = 0,029$) signifikant weniger Zeit, um ein Trial abzuschließen, als die UL-Gruppe.

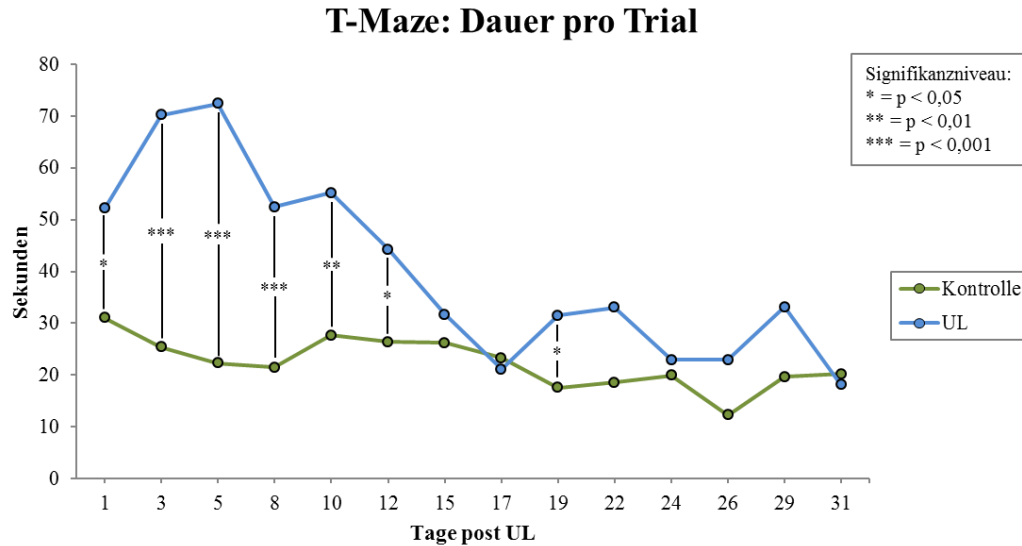


Abbildung 34: Mittelwerte der Dauer pro Trial im T-Maze. Die Tiere der UL-Gruppe benötigten an fast allen Tagen mehr Zeit als die Kontroll-Gruppe. Die Gruppenunterschiede waren an den Tagen 1, 3, 5, 8, 10, 12 und 19 signifikant. Die Signifikanzen im Intertagesvergleich sind aufgrund besserer Übersicht in dieser Grafik nicht dargestellt. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.4.5. Geschwindigkeit

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere durch das T-Maze bewegten, nahm in beiden Gruppen longitudinal zu (Abbildung 35). An den Tagen 1 bis 12 lief die UL-Gruppe langsamer als die Kontroll-Gruppe. Ab Tag 15 passten sich die Geschwindigkeiten beider Gruppen aneinander an. Die Kontroll-Gruppe war im Gruppenvergleich an den Tagen 1 ($p = 0,002$), 3 ($p \leq 0,001$), 5 ($p \leq 0,001$), 8 ($p \leq 0,001$), 10 ($p = 0,001$) und 19 ($p = 0,018$) signifikant schneller als die UL-Gruppe. An den Tagen 17 ($p = 0,004$) und 31 ($p = 0,005$) war die UL-Gruppe signifikant schneller als die Kontrolle. Die maximalen Geschwindigkeiten wurden in beiden Gruppen an Tag 26 erreicht (UL-Gruppe durchschnittlich 14,9 cm/s; Kontroll-Gruppe 15,2 cm/s).

Die ersten signifikant erhöhten Geschwindigkeiten traten in der UL-Gruppe von den Tagen 1 ($p \leq 0,001$), 3 ($p \leq 0,001$), 5 ($p = 0,002$), 10 ($p = 0,007$) und 12 ($p = 0,019$) zu Tag 17 auf. In der Kontroll-Gruppe erhöhte sich die

Geschwindigkeit signifikant von den Tagen 1 ($p = 0,010$), 3 ($p = 0,002$), 5 ($p = 0,041$), 10 ($p = 0,002$) und 17 ($p = 0,019$) auf Tag 26.

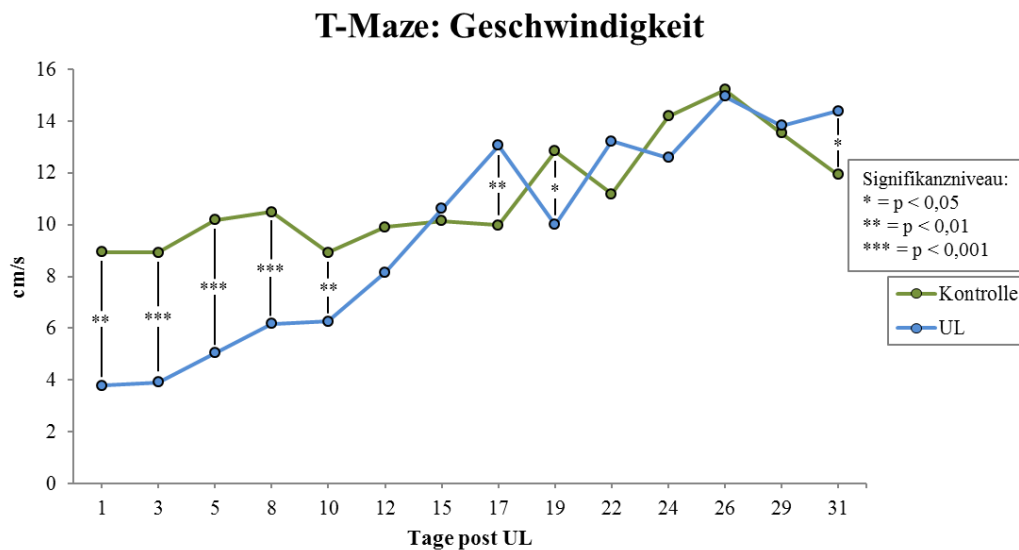


Abbildung 35: Mittelwerte der Geschwindigkeit im T-Maze. Die Tiere der UL-Gruppe liefen an den Tagen 1, 3, 5, 8, 10 und 19 signifikant langsamer als die Kontroll-Gruppe. An den Tagen 17 und 31 war die UL-Gruppe signifikant schneller als die Kontroll-Gruppe. Die Signifikanzen im Intertagesvergleich sind aufgrund besserer Übersicht in dieser Grafik nicht dargestellt. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.4.6. Zurückgelegte Distanz

An Tag 1 legte die UL-Gruppe weniger Distanz zurück als die Kontroll-Gruppe. Ab Tag 3 nahm die Distanz in der UL-Gruppe zu und erreichte einen Höchstwert an Tag 5 (277,5 cm). Die UL-Gruppe legte an den Tagen 3 ($p = 0,009$), 5 ($p \leq 0,001$), 8 ($p = 0,001$), 10 ($p = 0,001$), 12 ($p = 0,007$), 17 ($p = 0,024$), 19 ($p = 0,019$), 24 ($p = 0,035$), 26 ($p \leq 0,001$), 29 ($p = 0,002$) und 31 ($p = 0,025$) signifikant längere Distanzen zurück als die Kontroll-Gruppe. Im Intertagesvergleich traten in der UL-Gruppe keine Signifikanzen auf. In der Kontroll-Gruppe nahm die zurückgelegte Distanz im Intertagesvergleich ab. Die Veränderungen waren zwischen den Tagen 1 ($p = 0,005$), 3 ($p = 0,009$) und 10 ($p = 0,008$) zu Tag 31 signifikant.

1.4.7. Immobilitätsphasen

Die UL-Gruppe zeigte an Tag 5 mit 63,3 s die längste Immobilitätsdauer im T-Maze. Ab Tag 8 bewegten sich die Tiere wieder mehr (Abbildung 36). Die ersten

Signifikanzen traten im Intertagesverlauf von den Tagen 1 ($p = 0,016$), 3 ($p \leq 0,001$) und 5 ($p = 0,009$) auf Tag 17 auf. Die Reduktion der Immobilität war außerdem von den Tagen 1 ($p = 0,007$), 3 ($p \leq 0,001$), 5 ($p = 0,004$) und 10 ($p = 0,028$) auf Tag 26, sowie von Tag 3 auf 31 ($p = 0,005$) signifikant.

In der Kontroll-Gruppe dauerte die längste Immobilitätsphase 25,9 s an Tag 1. Signifikante Verringerungen lagen in der Kontroll-Gruppe von den Tagen 1 ($p = 0,015$), 3 ($p = 0,008$), 8 ($p = 0,030$) und 10 ($p = 0,002$) auf Tag 26 vor. Von Tag 10 auf Tag 31 nahm die Immobilität ebenfalls signifikant ab ($p = 0,048$). Die UL-Gruppe zeigte exklusive Tag 17 und Tag 31 stets längere Immobilitätsphasen als die Kontroll-Gruppe. Die Unterschiede im Gruppenvergleich waren an den Tagen 1 ($p = 0,022$), 3 ($p \leq 0,001$), 5 ($p \leq 0,001$), 8 ($p \leq 0,001$), 10 ($p = 0,001$) und 12 ($p = 0,041$) signifikant.

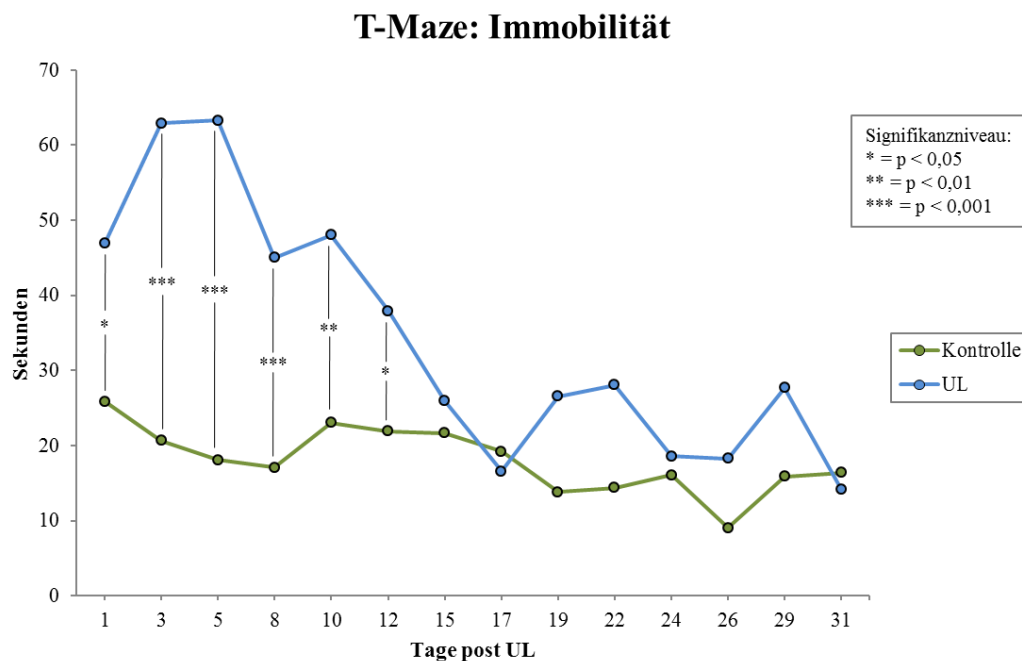


Abbildung 36: Mittelwerte der Immobilitätsdauer im T-Maze. Die UL-Gruppe zeigte an den Tagen 1, 3, 5, 8, 10 und 12 signifikant längere Phasen der Immobilität als die Kontroll-Gruppe. Die Signifikanzen im Intertagesvergleich sind aufgrund besserer Übersicht in dieser Grafik nicht dargestellt. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

1.5. Korrelationsanalysen

Zur Ermittlung eines statistisch signifikanten Zusammenhangs zwischen der Mikrogliaaktivierung bzw. der Neurogenese und dem symptomatischen Verhalten

wurde der Korrelationskoeffizient Kendall-Tau-b (τ) berechnet. Des Weiteren wurden Korrelationsanalysen zwischen der posturalen Asymmetrie und den Ergebnissen im T-Maze durchgeführt.

1.5.1. Verhalten und Mikrogliaaktivierung

Die Mikrogliaaktivierung im Hippocampus korrelierte über alle Tage schwach negativ mit der posturalen Asymmetrie ($\tau = -0,222$; $p = 0,032$). An den Tagen 1 und 8 post UL war die posturale Asymmetrie erhöht; ab Tag 15 verringerte sie sich stetig. Der [^{18}F]GE180-Uptake nahm ab Tag 15 post UL zu.

Die Performance der Tiere im T-Maze korrelierte negativ mit der Mikrogliaaktivierung im rechten vestibulären Kern ($\tau = -0,317$; $p = 0,023$). Während die Anzahl der richtig gelaufenen Trials ab Tag 1 post UL anstieg, verringerte sich die [^{18}F]GE180-Konzentration ab Tag 8.

1.5.2. Verhalten und Neurogenese

Es lag über den gesamten Versuchszeitraum eine schwache positive Korrelation zwischen der posturalen Asymmetrie und der Neurogeneserate im linken vestibulären Kerngebiet vor ($\tau = 0,208$; $p = 0,03$). Die posturale Asymmetrie und der [^{18}F]FLT-Uptake verringerten sich im longitudinalen Verlauf (Abbildung 37).

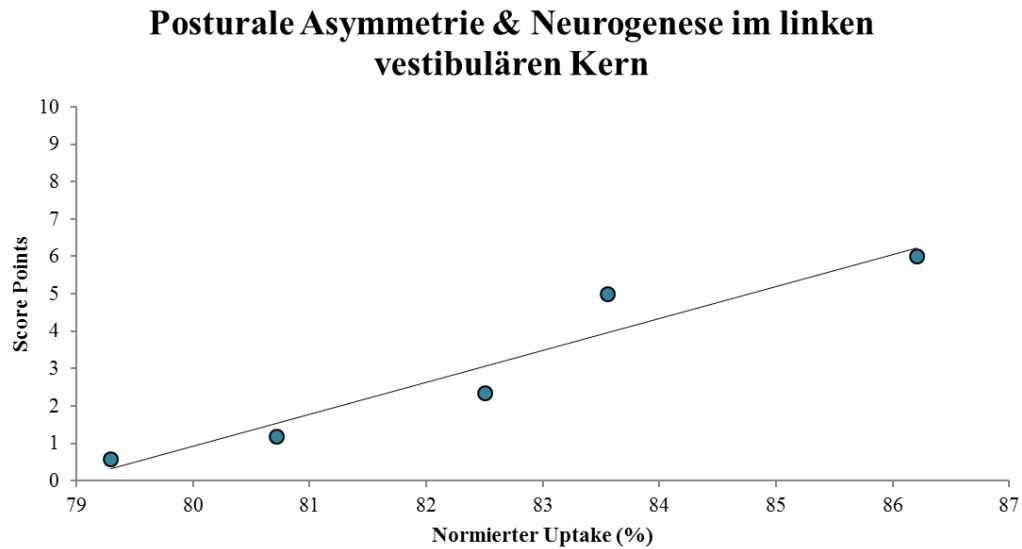


Abbildung 37: Positive Korrelation zwischen der posturalen Asymmetrie und der Neurogenese im linken vestibulären Kern. Je größer der [¹⁸F]FLT-Uptake war, umso höher lagen die Punktzahlen der posturalen Asymmetrie. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Score Points und des normierten Uptakes im linken VN über die Gesamtgruppe der Tiere (n = 12) an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (n = 5, d.h. Tag 1, 8, 15, 22, 29).

1.5.3. Posturale Asymmetrie und T-Maze

Es lagen negative Korrelationen zwischen der posturalen Asymmetrie und der Performance ($\tau = -0,249$; $p = 0,004$) und zwischen der posturalen Asymmetrie und der Geschwindigkeit ($\tau = -0,441$; $p \leq 0,001$) im T-Maze vor. Die Geschwindigkeit und die Performance wiesen eine schwache positive Korrelation auf ($\tau = 0,251$; $p = 0,002$). Je geringer die Punktzahlen der posturalen Asymmetrie waren, umso schneller bewegten sich die Tiere und umso mehr richtige Entscheidungen wurden getroffen. Eine positive Korrelation trat außerdem zwischen der posturalen Asymmetrie und der zurückgelegten Distanz auf ($\tau = 0,323$; $p \leq 0,001$). Beide Parameter nahmen im Intertagesverlauf ab. Die Performance korrelierte negativ mit der zurückgelegten Distanz ($\tau = -0,300$; $p \leq 0,001$). Während die Distanz im Intertagesverlauf abnahm, stieg die Anzahl der richtigen Entscheidungen im T-Maze.

2. Therapiestudie Etifoxin

Ziel dieses Experimentes war die Untersuchung der Wirkung von Etifoxin auf die zentrale vestibuläre Kompensation. Der TSPO-Agonist kann die Mikroglia-aktivierung modulieren und den Kompensationsverlauf möglicherweise positiv beeinflussen. Die Tiere der Etifoxin-Gruppe erhielten post UL eine intra-peritoneale Injektion von 25 mg/kg Etifoxin über sieben Tage. Zum Vergleich wurde einer Sham-Gruppe die äquivalente Menge NaCl-Lösung verabreicht. Das Verhalten der Tiere wurde mit dem klinischen Scoring und dem Open Field-Test analysiert. Für die in vivo-Darstellung der aktivierten Mikroglia erfolgten μ PET-Scans mit dem [18 F]-markierten TSPO-Liganden GE180.

2.1. Klinisches Scoring

2.1.1. Nystagmus

In beiden Gruppen war der spontane Nystagmus an Tag 1 am stärksten ausgeprägt (Mittelwert 8,6). An den folgenden Tagen sank die Intensität stetig, bis an Tag 8 kein Nystagmus mehr vorlag. Die Punktzahlen der Etifoxin-Gruppe waren zu jedem bewerteten Zeitpunkt geringer als die der Sham-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wiesen keine Signifikanzen auf. Im Intertagesvergleich war die erste signifikante Verbesserung in der Etifoxin-Gruppe von Tag 1 auf Tag 5 zu erkennen ($p = 0,031$). In der Sham-Gruppe trat die erste Signifikanz von Tag 1 zu Tag 8 auf ($p \leq 0,001$) (Abbildung 38).

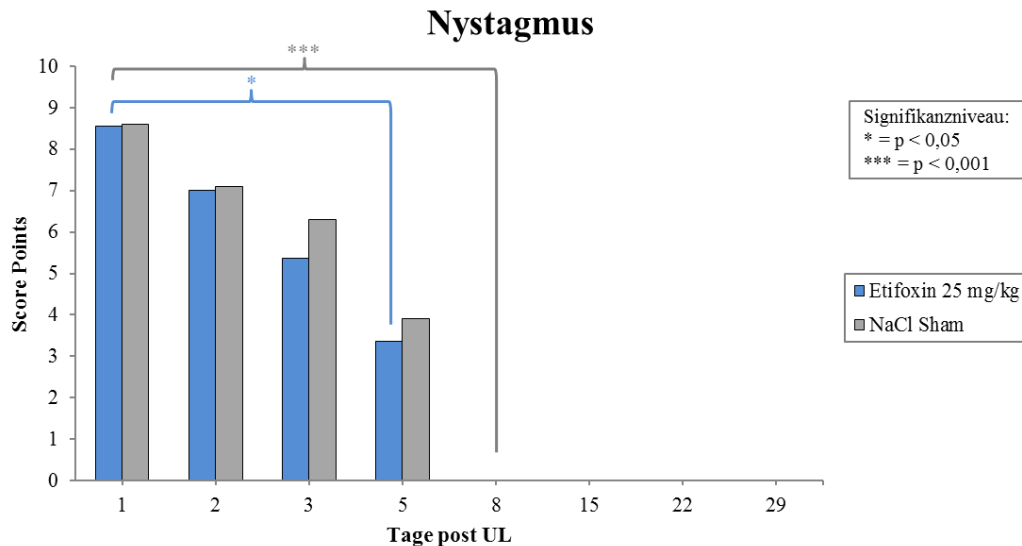


Abbildung 38: Nystagmusverlauf in der Etifoxin- und Sham-Gruppe. Der Nystagmus war an Tag 1 post UL in beiden Gruppen am stärksten ausgeprägt und verringerte sich an den folgenden Tagen. Die Verbesserung war in der Etifoxin-Gruppe von Tag 1 auf Tag 5 signifikant, in der Sham-Gruppe von Tag 1 auf Tag 8. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

2.1.2. Kopfschiefhaltung

Die Kopfschiefhaltung war in beiden Gruppen ab Tag 1 erkennbar und stieg bis Tag 5 zu einem mittleren Wert von 9,6 an. Im longitudinalen Verlauf verringerte sie sich bis Tag 29 auf durchschnittlich 6,6 Punkte. Im Gruppenvergleich lagen keine signifikanten Unterschiede vor. In der Etifoxin-Gruppe traten signifikante Reduktionen der Kopfschiefhaltung von Tag 5 auf Tag 22 ($p = 0,016$) und 29 ($p = 0,007$), sowie von Tag 8 auf Tag 29 ($p = 0,029$) auf. In der Sham-Gruppe war die Verringerung der Kopfschiefhaltung nicht signifikant.

2.1.3. Posturale Asymmetrie

Die Symptome der posturalen Asymmetrie erreichten ihren Höhepunkt in beiden Gruppen an Tag 5 (Mittelwert 7,2). Die erste signifikante Verringerung der Score Points war im Intertagesvergleich der Etifoxin-Gruppe von Tag 3 auf Tag 15 vorhanden ($p = 0,036$). In der Sham-Gruppe trat eine signifikante Verringerung erstmals zwischen Tag 3 und Tag 22 auf ($p = 0,001$). Im Gruppenvergleich zeigten die Tiere der Etifoxin-Gruppe eine signifikante Reduktion der posturalen Asymmetrie im Vergleich zur Sham-Gruppe an Tag 15 ($p = 0,036$), Tag 22 ($p = 0,002$) und Tag 29 ($p = 0,029$) (Abbildung 39). Bei einem globalen Gruppenvergleich ohne eine Aufteilung nach Tagen war die posturale

Asymmetrie der einzige Parameter im klinischen Scoring, der einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen für den gesamten getesteten Zeitraum zeigte ($p = 0,033$).

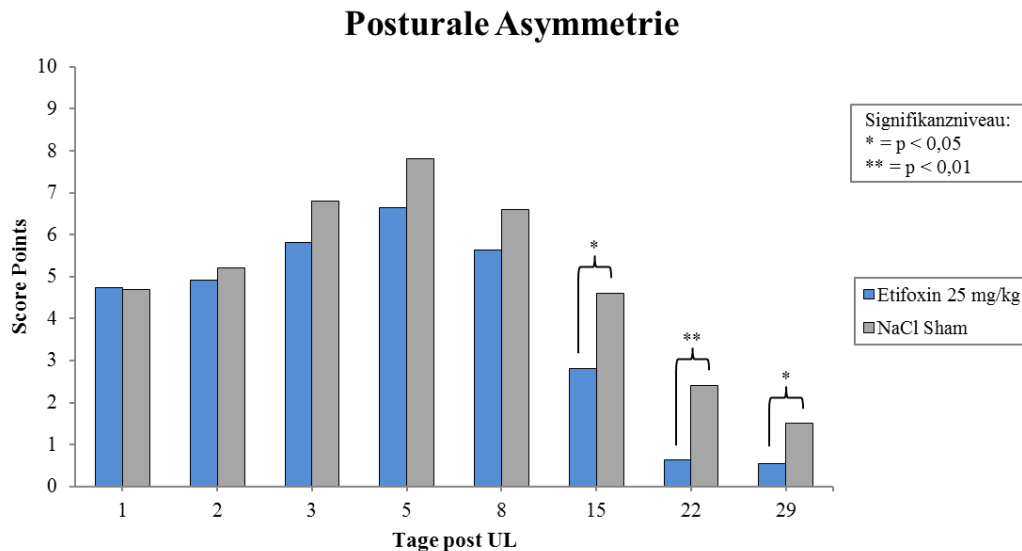


Abbildung 39: Gruppenvergleich der posturalen Asymmetrie. Die Score Points erreichten ihren Höchstwert an Tag 5 und nahmen danach in beiden Gruppen stetig ab. In der Etifoxin-Gruppe zeigten sich signifikante Verbesserungen an den Tagen 15, 22 und 29 im Vergleich zur Sham-Gruppe. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

2.1.4. Elevation Tail Rotation Test

Ab dem ersten Tag nach UL zeigten die Tiere beider Gruppen eine starke Umdrehung der Körperachse beim Anheben am Schwanz. Die erste signifikante Verbesserung erfolgte in der Etifoxin-Gruppe von Tag 2 auf Tag 15 ($p = 0,042$). Die Tiere der Sham-Gruppe zeigten leichte Verbesserungen nach Tag 5, jedoch ohne Signifikanzen.

2.2. Open Field

2.2.1. Lokomotionsgeschwindigkeit

Beim Baseline-Lauf bewegten sich die gesunden Tiere beider Gruppen im Open Field mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 5,2 cm/s. Am ersten Tag post UL nahm die Geschwindigkeit deutlich ab (Mittelwert 1,1 cm/s). In der Etifoxin-Gruppe war die verminderte Geschwindigkeit von der Baseline auf Tag 1 signifikant ($p = 0,026$). An den folgenden Tagen liefen die Tiere wieder schneller

und kamen an Tag 8 zurück auf das Baseline-Niveau. Ab Tag 15 liefen die Tiere mit einer höheren Geschwindigkeit als in gesundem Zustand. Die Geschwindigkeitszunahme war in beiden Gruppen das erste Mal von Tag 1 auf Tag 15 signifikant ($p \leq 0,001$). Im Gruppenvergleich traten keine Unterschiede auf.

2.2.2. Aufenthaltsdauer im Zentrum und am Rand

In beiden Gruppen hielten sich die Tiere beim Baseline-Lauf überwiegend am Rand des Open Fields auf (mittlere kumulative Dauer im Zentrum 35,8 s; am Rand 556,5 s). Der Randbereich blieb an allen Tagen post UL die bevorzugte Aufenthaltszone. Die relative Aufenthaltsdauer im Zentrum verringerte sich an Tag 1 post UL in beiden Gruppen. Die Tiere der Etifoxin-Gruppe zeigten ab Tag 3 einen längeren Aufenthalt im Zentrum im Vergleich zur Baseline. Der erhöhte Aufenthalt im Zentrum war von Tag 1 ($p = 0,014$) und 2 ($p = 0,019$) auf Tag 8 signifikant. Die Sham-Gruppe lief ab Tag 8 mehr im Zentrum als beim Baseline-Lauf. Die Veränderungen waren von den Tagen 1 ($p \leq 0,001$), 2 ($p = 0,004$) und 3 ($p = 0,001$) auf Tag 15, sowie von Tag 1 auf Tag 8 ($p = 0,033$) und 22 ($p = 0,033$) signifikant. Die Tiere der Sham-Gruppe hielten sich ab Tag 8 länger im Zentrum auf, als die Etifoxin-Gruppe. Der größte Unterschied war an Tag 15 zu verzeichnen, an dem die Sham-Tiere sich annähernd doppelt so lange im Zentrum befanden (Sham 93,5 s, Etifoxin 50,7 s) (Abbildung 40). Es lagen keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich vor.

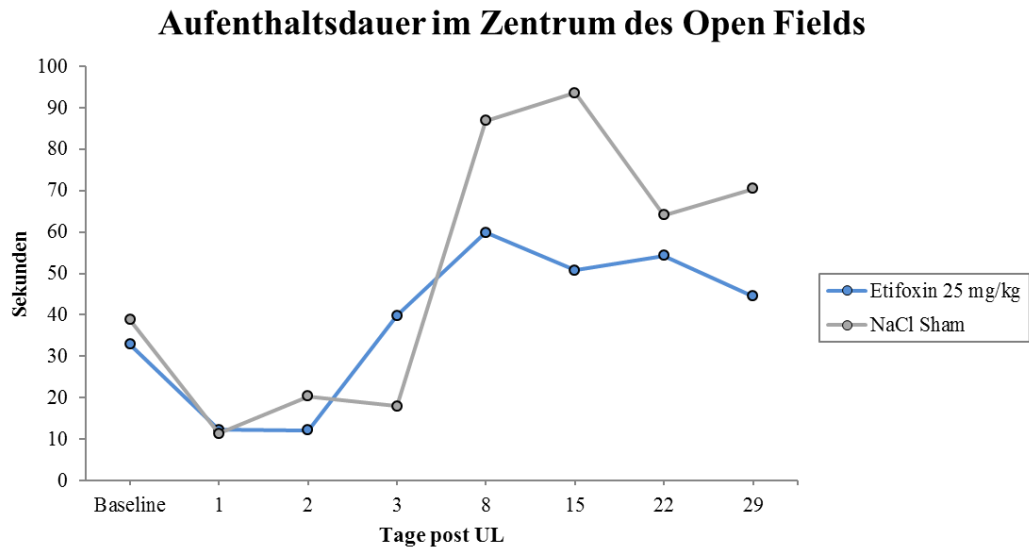


Abbildung 40: Gruppenvergleich der Aufenthaltsdauer im Zentrum des Open Fields. In den ersten Tagen post UL hielten sich die Tiere beider Gruppen weniger im Zentrum auf, als bei ihrem Baseline-Lauf. Ab Tag 8 nahm der Aufenthalt im Zentrum wieder zu; in der Sham-Gruppe mehr als in der Etifoxin-Gruppe. Die Signifikanzen im Intertagesvergleich sind aufgrund besserer Übersicht in dieser Grafik nicht dargestellt. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

2.2.3. Heatmaps

In Abbildung 41 sind die Aktivitätsmuster bezüglich Aufenthaltsdauer und -ort im Open Field aller Tiere einer Gruppe an den verschiedenen Zeitpunkten post UL visuell dargestellt. In jedem Trial waren die Randzone und die Eckpunkte als häufigste Lokalisationen zu identifizieren. An den Tagen 1 bis 3 post UL hielten sich die Tiere nur am Rand des Open Fields auf. Ab Tag 8 wurde die Position häufiger gewechselt und die Tiere liefen wieder durch das Zentrum. Die Etifoxin-Gruppe hielt sich im Vergleich zur Sham-Gruppe ab Tag 8 mehr am Rand und in den Ecken auf.

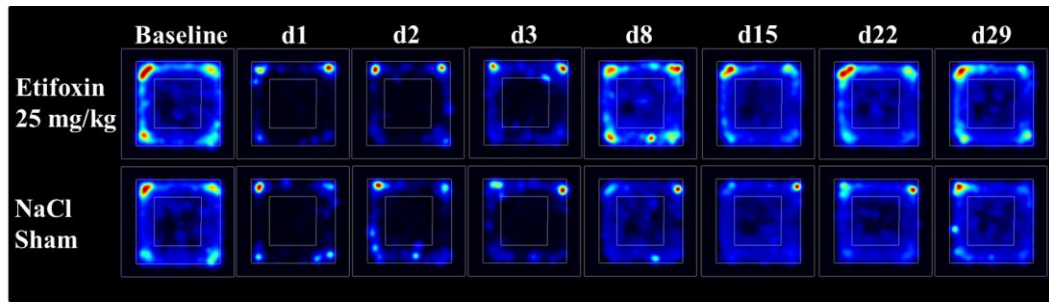


Abbildung 41: Heatmaps der Etifoxin- und der Sham-Gruppe. In beiden Gruppen hielten sich die Tiere vermehrt im Randbereich und in den Ecken des Open Fields auf. An den Tagen 1-3 post UL war kein Aufenthalt im Zentrum zu erkennen. Ab Tag 8 näherte sich das Muster wieder dem der Baseline an. d: Tag post UL.

2.2.4. Bewegungsphasen

Beim Baseline-Lauf beider Gruppen betrug das Verhältnis zwischen Bewegungsdauer und Immobilität ungefähr 1:1 (Bewegung 46,4%, Immobilität 53,6%) (Abbildung 42). Ab Tag 1 post UL nahm die Dauer der Bewegungsphasen in beiden Gruppen stark ab (12,8%) und stieg an den folgenden Tagen wieder an. In der Etifoxin-Gruppe war die verringerte Bewegungsdauer von der Baseline auf Tag 1 ($p = 0,044$) und auf Tag 2 ($p = 0,048$) signifikant. Das Baseline-Niveau wurde ab Tag 8 wiedererlangt. Ab Tag 15 bewegten sich die Tiere etwas mehr als beim Baseline-Lauf. Zwischen den Gruppen lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Im Intertagesvergleich trat die erste signifikante Erhöhung der Bewegungsaktivität in der Etifoxin-Gruppe von Tag 1 auf Tag 8 auf ($p = 0,014$). In der Sham-Gruppe erhöhte sich die Bewegungsdauer erstmalig von Tag 1 auf Tag 15 ($p = 0,001$) signifikant.

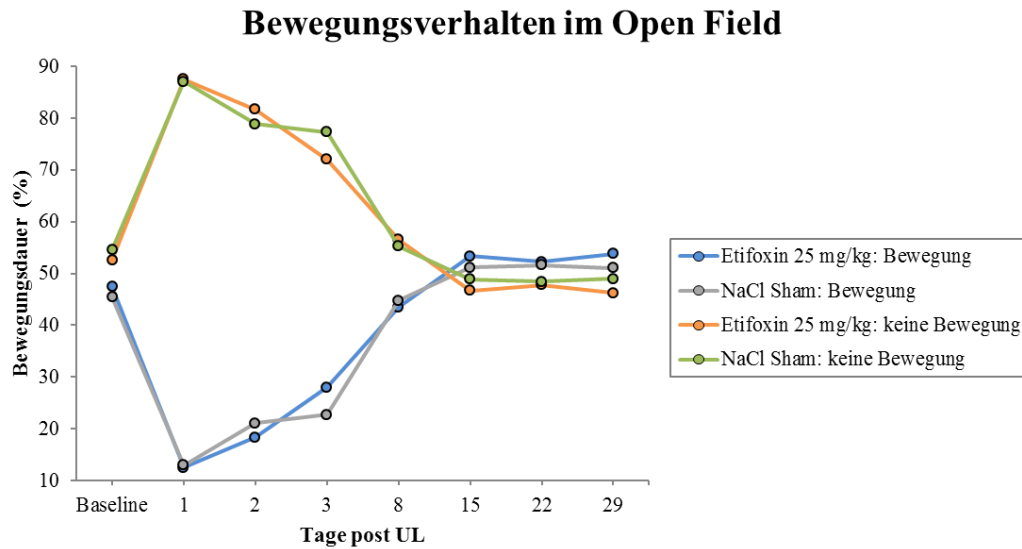


Abbildung 42: Gruppenvergleich des Bewegungsverhaltens im Open Field. Beim Baseline-Lauf war das Verhältnis zwischen Bewegung und Immobilität ausgeglichen. Ab Tag 1 post UL zeigten beide Gruppen eine starke Reduktion ihrer Bewegungsdauer. Ab Tag 15 bewegten sich die Tiere etwas mehr als beim Baseline-Lauf. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

2.3. Mikrogliaaktivierung: [¹⁸F]GE180-μPET

2.3.1. VOI-Analyse

Die [¹⁸F]GE180-Anreicherung wurde im Hippocampus und in den vestibulären Kernen als prozentualer Anteil der Aktivitätskonzentration im gesamten Gehirn quantifiziert (normierter Uptake in %).

In beiden Behandlungsgruppen nahm der [¹⁸F]GE180-Uptake von der Baseline zu Tag 1 post UL in den VN leicht ab; auf der rechten Seite war die Abnahme größer als ipsiläsional. In der Etifoxin-Gruppe war der [¹⁸F]GE180-Uptake ab Tag 8 in beiden VN höher als bei der Baseline-Messung. Die Mikrogliaaktivierung stieg im linken VN an den Tagen 22 und 29 weiter an, während sie kontraläsional wieder abnahm, jedoch über dem Baseline-Level verblieb. Der Peak wurde im ipsiläsionalen VN an Tag 29 erreicht (108,5%). Im Intertagesvergleich traten in der Etifoxin-Gruppe im rechten VN signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 und den Tagen 8 ($p = 0,009$), 15 ($p = 0,031$) und 29 ($p = 0,021$) auf. Die Veränderungen zwischen den Tagen im linken VN waren nicht signifikant. Im Seitenvergleich zwischen dem linken und dem rechten VN lagen ebenfalls keine Signifikanzen vor.

In der Sham-Gruppe war die [^{18}F]GE180-Aufnahme ab Tag 8 im VN beidseits im Vergleich zur Baseline erhöht. Dieser Effekt war stärker auf der linken als auf der rechten Seite zu erkennen (links 1,17-fach höher). Der Höchstwert wurde mit einer 1,1-fachen Erhöhung im linken VN an Tag 15 erreicht. Die erhöhte [^{18}F]GE180-Anreicherung war ipsiläsional zwischen Tag 1 und Tag 15 signifikant ($p = 0,008$). Die Mikrogliaaktivierung war im linken VN stets höher als kontraläsional. Die Unterschiede im Seitenvergleich waren an den Tagen 8 ($p = 0,049$), 15 ($p = 0,01$) und 29 ($p = 0,019$) signifikant.

Im Gruppenvergleich war die [^{18}F]GE180-Aufnahme im ipsiläsionalen VN in der Sham-Gruppe an allen Tagen post UL höher als in der Etifoxin-Gruppe (Abbildung 43). Dieser Unterschied war an Tag 15 signifikant ($p = 0,014$).

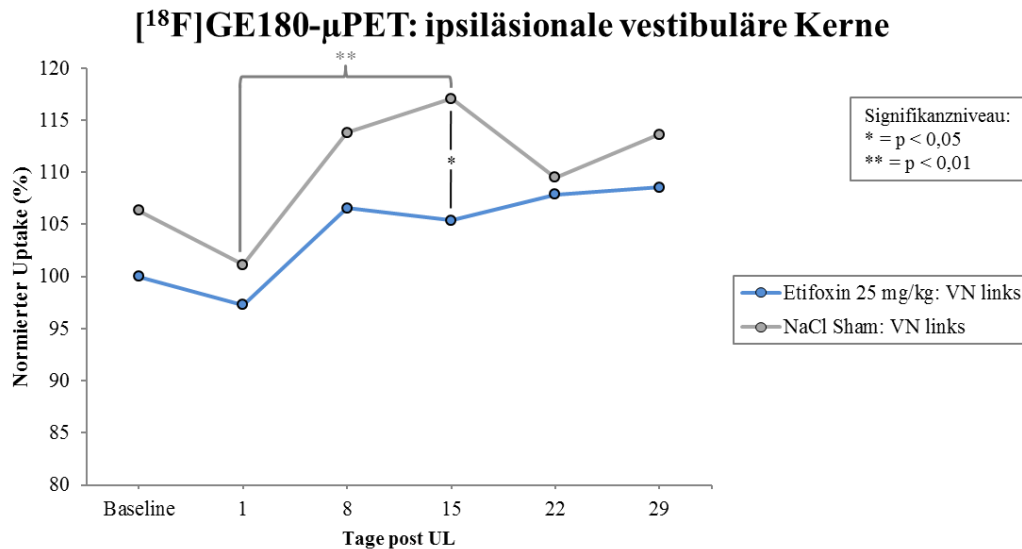


Abbildung 43: Normierter [^{18}F]GE180-Uptake in den linken vestibulären Kernen. In der Sham-Gruppe war die Mikrogliaaktivierung an allen Tagen post UL höher als in der Etifoxin-Gruppe. Dieser Unterschied war an Tag 15 signifikant. Im Intertagesvergleich trat eine signifikante Erhöhung der Mikrogliaaktivierung von Tag 1 auf Tag 15 post UL in der Sham-Gruppe auf. VN: vestibulärer Nucleus, UL: unilaterale Labyrinthektomie.

Im Hippocampus stieg der [^{18}F]GE180-Uptake von der Baseline-Messung auf Tag 1 in beiden Gruppen signifikant an (Etifoxin $p = 0,014$; Sham $p = 0,028$) (Abbildung 44). In der Etifoxin-Gruppe wurde der Höchstwert an Tag 1 erreicht (1,13-fach höher als Baseline). Ab Tag 8 verringerte sich die Mikrogliaaktivierung, blieb jedoch bis einschließlich Tag 29 über dem Baseline-Level. In

der Sham-Gruppe nahm die Mikrogliaaktivierung an Tag 8 ab und stieg daraufhin stetig an. Die erhöhte [^{18}F]GE180-Anreicherung war von der Baseline auf Tag 1 ($p = 0,028$), 22 ($p = 0,005$) und 29 ($p = 0,003$) signifikant. Der Höchstwert wurde in der Sham-Gruppe an Tag 29 mit einer 1,16-fachen Erhöhung erreicht.

In der Etifoxin-Gruppe waren die Aktivitätskonzentrationen an den Tagen 1 und 8 höher als in der Sham-Gruppe. Ab Tag 15 post UL war die Mikrogliaaktivierung in der Sham-Gruppe höher als in der Etifoxin-Gruppe. Der Unterschied im Gruppenvergleich war an Tag 29 signifikant ($p = 0,024$).

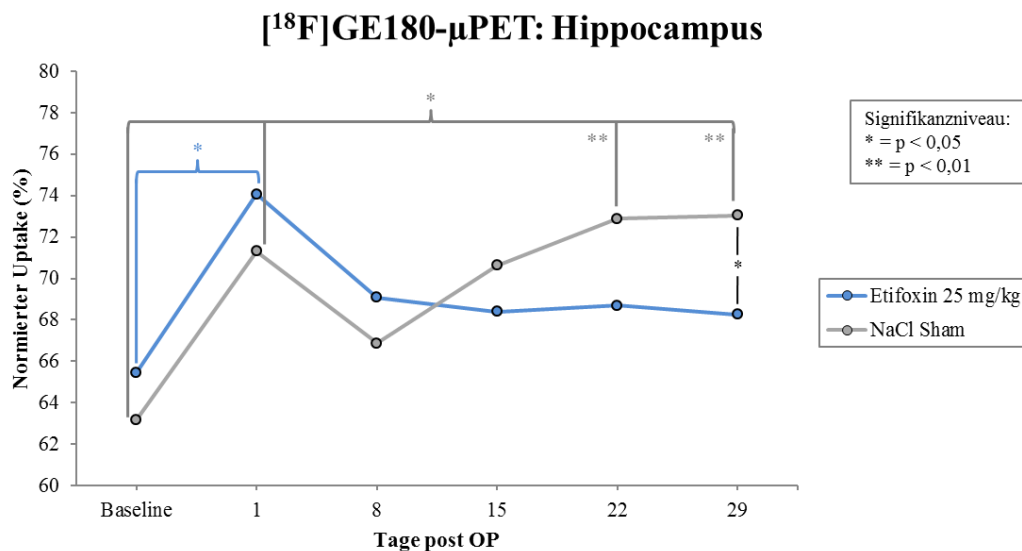


Abbildung 44: Normierter [^{18}F]GE180-Uptake im Hippocampus. In der Etifoxin-Gruppe war die Mikrogliaaktivierung an Tag 1 signifikant erhöht und nahm im Verlauf stetig ab. In der Sham-Gruppe war die erhöhte [^{18}F]GE180-Anreicherung von der Baseline auf die Tage 1, 22 und 29 signifikant. An Tag 29 war die Mikrogliaaktivierung in der Sham-Gruppe signifikant höher als in der Etifoxin-Gruppe. UL: unilaterale Labyrinthektomie.

2.3.2. SPM-Analyse

Die Ergebnisse der wöchentlichen Scans post UL wurden für beide Gruppen mit ihren Baseline-Messungen verglichen. Die statistische Analyse erfolgte durch SPM mit einem Paardifferenztest. Zwischen den Gruppen wurde der [^{18}F]GE180-Uptake mit einem Zweistichproben- t -Test untersucht. Signifikante Unterschiede ($p < 0,005$) wurden auf einem Ratten-MRT-Gehirnatlas farblich dargestellt.

Im ipsiläsionalen VN war eine signifikant erhöhte Mikrogliaaktivierung in der Etifoxin-Gruppe ab Tag 1, in der Sham-Gruppe ab Tag 8 post UL zu erkennen (Abbildung 45). Die vermehrte [^{18}F]GE180-Anreicherung blieb bis einschließlich

Tag 29 bestehen. Die erhöhte Tracer-Aufnahme erreichte in der Sham-Gruppe an Tag 8 und in der Etifoxin-Gruppe an Tag 22 post UL ihr Maximum.

Im Hippocampus trat in beiden Gruppen eine signifikante Mikrogliaaktivierung an den Tagen 1 bis 29 post UL auf. Die Höchstwerte lagen in der Etifoxin-Gruppe an Tag 22 und in der Sham-Gruppe an Tag 29 vor (Abbildung 46).

Im Gruppenvergleich war die Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen VN von Tag 8 bis 29 post UL in der Etifoxin-Gruppe signifikant geringer als in der Sham-Gruppe (Abbildung 47). Im Hippocampus war ab Tag 8 eine relative Deaktivierung in der Etifoxin-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe zu erkennen, die ebenfalls bis Tag 29 bestehen blieb (Abbildung 48).

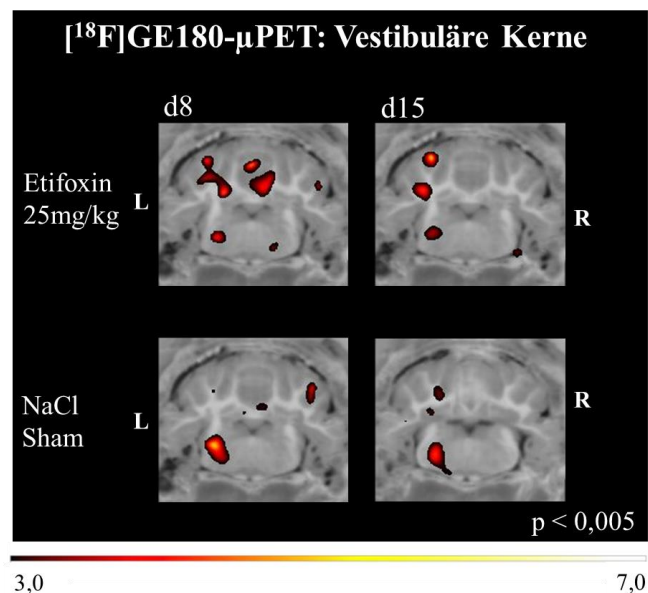


Abbildung 45: Mikrogliaaktivierung in den vestibulären Kernen im [¹⁸F]GE180-μPET an Tag 8 und Tag 15 post UL in der Etifoxin- und Sham-Gruppe. In beiden Gruppen war die [¹⁸F]GE180-Anreicherung erhöht. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im rot-gelb-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7. Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Transversalebene; L: links; R: rechts; d: Tag post UL.

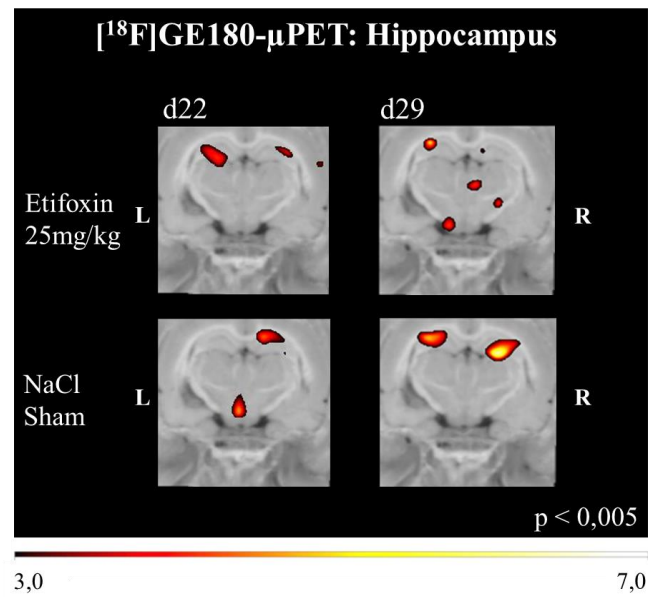


Abbildung 46: Mikrogliaaktivierung im Hippocampus im [¹⁸F]GE180-μPET an Tag 22 und Tag 29 post UL in der Etifoxin- und Sham-Gruppe. In beiden Gruppen war die [¹⁸F]GE180-Anreicherung erhöht. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im rot-gelb-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7. Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Koronarebene; L: links; R: rechts; d: Tag post UL.

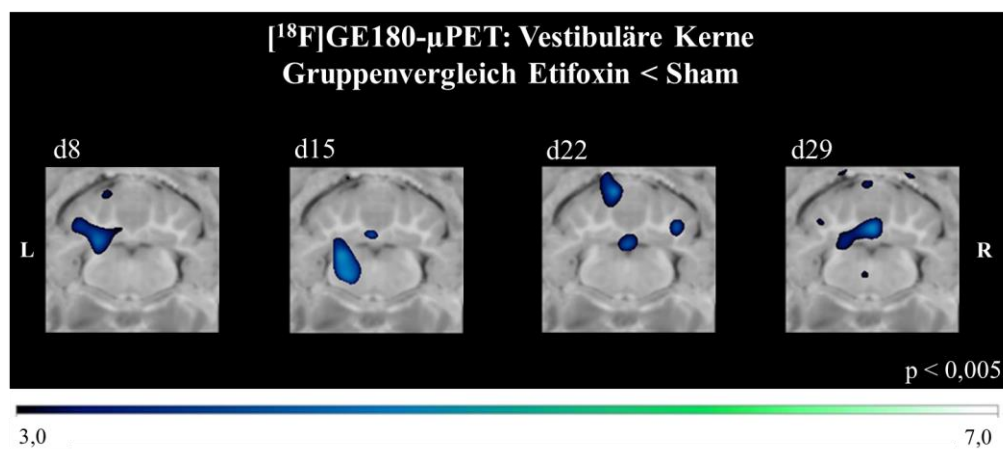


Abbildung 47: Gruppenvergleich der Mikrogliaaktivierung in den vestibulären Kernen im [¹⁸F]GE180-μPET post UL. In der Etifoxin-Gruppe zeigte sich eine signifikant geringere [¹⁸F]GE180-Anreicherung im Vergleich zur Sham-Gruppe. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im blau-grün-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7. Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Transversalebene; L: links; R: rechts; d: Tag post UL.

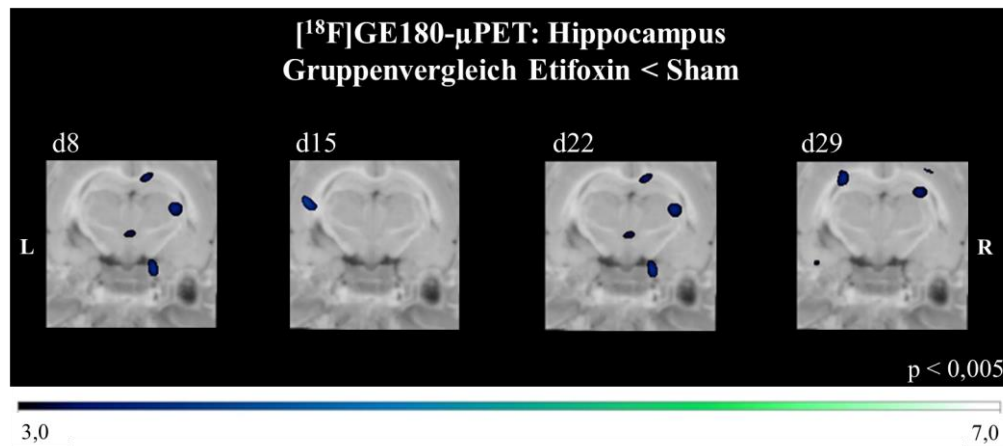


Abbildung 48: Gruppenvergleich der Mikrogliaaktivierung im Hippocampus im $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}\mu\text{PET}$ post UL. Es zeigte sich eine signifikant geringere $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}$ Anreicherung der Etifoxin-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe. Farbliche Kodierung entsprechend zunehmender Signifikanz im blau-grün-Farbspektrum durch z-Werte zwischen 3 und 7. Projektion auf ein Ratten-MRT-Template in der Koronarebene; L: links; R: rechts; d: Tag post UL.

2.4. Korrelationsanalysen

Zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen dem symptomatischen Verhalten und der Mikrogliaaktivierung wurden Korrelationsanalysen nach Kendall-Tau-b (τ) für beide Gruppen durchgeführt.

2.4.1. Verhalten und Mikrogliaaktivierung

In der Etifoxin-Gruppe traten keine globalen signifikanten Korrelationen zwischen den Verhaltensparametern und der Mikrogliaaktivierung auf. In der Sham-Gruppe lag eine signifikante schwach negative Korrelation zwischen der $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}$ Anreicherung im Hippocampus und der posturalen Asymmetrie vor ($\tau = -0,266$; $p = 0,009$). Die posturale Asymmetrie wies geringere Score Points auf, wenn die Mikrogliaaktivierung höher war.

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Tage ergaben in der Etifoxin-Gruppe eine negative Korrelation an Tag 8 zwischen der $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}$ Anreicherung im ipsiläsionalen VN mit der Lokomotionsgeschwindigkeit ($\tau = -0,527$; $p = 0,024$) und der Bewegungsdauer im Open Field ($\tau = -0,491$; $p = 0,036$). Außerdem korrelierte die Mikrogliaaktivierung an Tag 8 positiv mit der posturalen Asymmetrie ($\tau = 0,663$; $p = 0,007$) (Abbildung 49).

In der Sham-Gruppe lagen negative Korrelationen zwischen der $[^{18}\text{F}]\text{GE180-}$ Aufnahme in den ipsiläsionalen VN und der Lokomotionsgeschwindigkeit

($\tau = -0,511$; $p = 0,040$) und der Bewegungsdauer im Open Field ($\tau = -0,511$; $p = 0,040$) an Tag 29 vor.

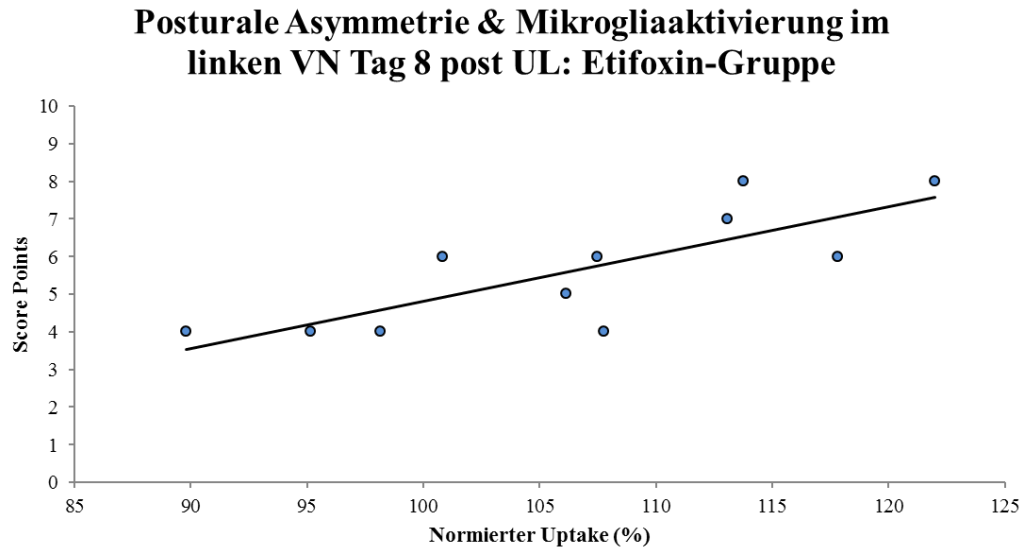


Abbildung 49: Positive Korrelation zwischen der Mikrogliaaktivierung in den linken vestibulären Kernen und der posturalen Asymmetrie an Tag 8 post UL in der Etifoxin-Gruppe. VN: vestibulärer Nucleus, UL: unilaterale Labyrinthektomie.

2.4.2. Posturale Asymmetrie und Open Field

In beiden Gruppen lagen signifikant negative Korrelationen zwischen der posturalen Asymmetrie und der Lokomotionsgeschwindigkeit vor (Etifoxin: $\tau = -0,335$; $p = 0,001$; Sham: $\tau = -0,266$; $p = 0,009$), d.h. je niedriger die Score Points der posturalen Asymmetrie waren, umso schneller bewegten sich die Tiere im Open Field. Die Bewegungsdauer korrelierte ebenfalls negativ mit der posturalen Asymmetrie (Etifoxin: $\tau = -0,277$; $p = 0,005$, Sham: $\tau = -0,212$; $p = 0,038$). Die Tiere zeigten eine höhere Bewegungsaktivität, wenn die posturale Asymmetrie weniger ausgeprägt war.

V. DISKUSSION

1. Mikrogliaaktivierung bei zentraler vestibulärer Kompensation

Aktivierte Mikrogliazellen werden bei einer Vielzahl von Erkrankungen im ZNS exprimiert. Durch Abgabe diverser Effektormoleküle können sie unter anderem Immunantworten und Entzündungsreaktionen modulieren, die synaptische Plastizität steuern oder die Aktivität von Neuronen und Astrozyten beeinflussen (BENARROCH, 2013).

Mikrogliale Reaktionen nach unilateralen peripheren vestibulären Läsionen konnten mehrfach nachgewiesen werden. Durch Immunhistologie mit dem Antikörper OX-42 wurde eine Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern nach funktioneller vestibulärer Deafferentierung von Ratten gezeigt, die nach 24 Stunden begann und nach 14 Tagen ihren Höhepunkt erreichte (CAMPOS TORRES et al., 1999). Daraufhin verringerte sich die Mikrogliaaktivierung, blieb jedoch bis zu sechs Wochen nach Läsion höher als bei gesunden Tieren. Mittels [¹⁸F]GE180- μ PET wurde eine Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern nach unilateraler Labyrinthektomie bei Ratten nachgewiesen (ZWERGAL et al., 2017). Die Veränderungen traten an den Tagen 7 und 15 post UL auf und waren ab Tag 30 nicht mehr zu erkennen. Die Ergebnisse des μ PET-Scans konnten mittels ex vivo-Autoradiographie und Histologie validiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich weitestgehend mit den vorherigen Analysen. Es konnte erneut bestätigt werden, dass es während der vestibulären Kompensation zu einer Mikrogliaaktivierung kommt, die im ipsiläsionalen vestibulären Kern bereits an Tag 1 nach der vestibulären Läsion begann, ihren Höhepunkt an Tag 8 post UL erreichte und bis Tag 29 persistierte. Dies deckt sich gut mit den histologischen Untersuchungen von CAMPOS TORRES et al. (1999) und weitgehend mit den vorherbeschriebenen [¹⁸F]GE180- μ PET-Ergebnissen (ZWERGAL et al., 2017).

In der aktuellen Forschungsarbeit konnte neben der ipsiläsionalen Mikrogliaaktivierung im vestibulären Kern auch eine mikrogliale Reaktion im Hippocampus gezeigt werden, die bilateral auftrat und vor allem an den späten

Untersuchungszeitpunkten (Tag 22 und 29 post UL) stark ausgeprägt war. Die Mikrogliaaktivierung nach UL ist demzufolge kein lokal begrenzter Prozess, der nur auf Ebene der vestibulären Kerne auftritt, sondern der sich auf verschiedene Gehirnareale ausweiten kann. Der Hippocampus stellt dabei ein tertiäres vestibuläres Projektionsareal dar, in dem vestibuläre Signale für die Raumorientierung genutzt werden.

[¹⁸F]GE180- μ PET erwies sich erneut als gut geeignete Methode, um Mikrogliaaktivierungen in vestibulären Modellen sensitiv in vivo abzubilden.

1.1. Mögliche Wirkungsmechanismen der Mikrogliaaktivierung bei der zentralen vestibulären Kompensation

Die auftretende adaptive Neuroinflammation stellt einen reaktiven Plastizitätsmechanismus dar, der den Kompensationsverlauf positiv oder negativ beeinflussen kann. Die Rolle der Mikrogliaaktivierung bei der zentralen Kompensation nach vestibulärer Läsion ist dabei noch weitestgehend unklar. Die initiale Neuroinflammation scheint die funktionelle Kompensation eher zu fördern, da Moleküle ausgeschüttet werden, die unter anderem die folgende Aktivierung von Astrozyten induzieren können (CAMPOS TORRES et al., 1999). Eine frühe Mikrogliaaktivierung stellt möglicherweise auch eine Voraussetzung für die Neurogenese in den vestibulären Kernen dar. Neuronale Stamm- und Progenitorzellen können nach Verletzungen in das betroffene Gebiet einwandern. Die Präsenz von TSPO könnte dort die Differenzierung der überlebenden Progenitor-Population regulieren (VARGA et al., 2009).

Durch Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration können Mikrogliazellen an einer Wiederherstellung des neuronalen Ruhepotenzials beteiligt sein. Mikroglia fördern außerdem plastische Veränderungen von Synapsen der visuellen und propriozeptiven Afferenzen, die durch Substitution die fehlenden vestibulären Informationen ersetzen können (DIERINGER, 1995; CAMPOS TORRES et al., 1999).

Als weitere positive Wirkung könnten Mikrogliazellen durch neuroprotektive Eigenschaften einer Degeneration der vestibulären Nervenzellen entgegenwirken. Mikroglia unterstützen endogene und regenerative Mechanismen des ZNS durch Steroid-Produktion, wodurch das neuronale Überleben gefördert wird. Neurosteroid-Produkte, die von Mikroglia produziert werden, regulieren die Entwicklung von

Neuronen und die Synapsen-Funktion. Einige Steroide sind selektive und potente Modulatoren am GABA_A-Rezeptor (GARCIA-SEGURA & MELCANGI, 2006). In der aktuellen Arbeit folgte die Dynamik der Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern tendenziell dem Kompensationsverlauf der vestibulären Symptome (z.B. Nystagmus, posturale Asymmetrie). Die mikrogliale Reaktion im vestibulären Kern scheint daher einen Surrogatmarker für die funktionelle Kompensation eines peripher-vestibulären Nerven- oder Endorganschadens darzustellen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an anderen Nervenläsionsmodellen, z.B. nach Ligatur des N. ischiadicus, gemacht (LACOR et al., 1999; KARCHEWSKI et al., 2004; MILLS et al., 2005). Nach Schädigung des N. ischiadicus konnte im ipsiläsionalen spinalen Hinterhorn nach zwei Wochen mittels μ PET eine TSPO-Expression gezeigt werden (IMAMOTO et al., 2013). Es wird daher vermutet, dass die frühe Mikrogliaaktivierung Teil einer Plastizitätskaskade ist, die zur funktionellen Verbesserung beiträgt (RUPPRECHT et al. 2010). In der vorliegenden Studie konnte jedoch durch Korrelationsanalysen kein konsistenter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern und den Verhaltensparametern der vestibulären Asymmetrie nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Mikrogliaaktivierung von anderen parallel ablaufenden Plastizitätsprozessen überlagert wird, zum anderen auch daran, dass die Prozesse der Mikrogliaaktivierung und Verhaltenskompensation sequentiell ablaufen, was durch eine Korrelation über einzelne Versuchszeitpunkte nicht abgebildet werden kann.

Interessanterweise nahm die hippocampale mikrogliale Aktivierung im Zeitverlauf trotz rückläufiger Symptomatik der vestibulären Asymmetrie zu. Die Mikrogliareaktion im Hippocampus stimmte allerdings gut mit persistierenden Auffälligkeiten in der räumlichen Orientierung im T-Maze überein (z.B. größere zurückgelegte Distanz nach UL im Vergleich zu Kontrollen). Dazu passend stieg die Mikrogliaaktivierung im Hippocampus mit schlechterer Performance im T-Maze an. Es kann daher vermutet werden, dass sich der Zeitverlauf in verschiedenen funktionellen vestibulären Netzwerken der Kompensationsdynamik des Defizits anpasst, d.h. der vestibuläre Kern dem Nystagmus und der posturalen Asymmetrie und der Hippocampus der räumlichen Orientierung. Da aus Korrelationen keine kausalen Zusammenhänge folgen, kann jedoch aus diesen Experimenten keine abschließende Aussage getroffen werden, ob die

Mikrogliaaktivierung zu einer funktionellen Verbesserung beiträgt, oder ob es sich um Pseudokorrelationen handelt, die nur denselben longitudinalen Kompensationsverlauf der verschiedenen Parameter widerspiegeln.

Denkbar wären auch negative Einflüsse einer längerfristigen Mikrogliaaktivierung auf die vestibuläre Kompensation, da dadurch maladaptive Vorgänge ausgelöst werden können. Während der Neuroinflammation verändern Mikroglia ihre Morphologie drastisch, migrieren an den Ort der Läsion, proliferieren und produzieren neurotoxische Faktoren wie pro-inflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoff-Spezies. Eine chronische Entzündung im ZNS durch aktivierte Mikroglia kann daher zu neuronaler Dysfunktion und Nervenzelldegeneration führen (STREIT et al., 2004). Eine mögliche Manipulation, um die potentiell schädlichen Effekte der Mikroglia zu minimieren, wurde bisher nicht gefunden (CHING et al., 2012).

Grundsätzlich scheint die akute Mikrogliaaktivierung jedoch eine physiologische Reaktion auf Verletzungen im ZNS, anstatt einen pathologischen Prozess darzustellen. Sowohl ruhende, als auch aktivierte Mikroglia üben Neuronen-unterstützende Effekte aus. Schädigende Wirkungen scheinen erst aufzutreten, wenn die Mikroglia bei chronischer Persistenz altern, erkranken oder sterben (STREIT et al., 2014).

1.2. Wirkung des TSPO-Agonisten Etifoxin bei unilateraler Vestibulopathie

1.2.1. Verhaltensanalysen

In früheren Studien konnte ein neuroprotektiver Effekt von TSPO-Liganden bei peripheren Nervenschädigungen nachgewiesen werden (FERZAZ et al., 2002; RUPPRECHT et al., 2010). Nach einer Läsion des N. facialis beschleunigte die Gabe des TSPO-Agonisten SSR180575 die funktionelle Regeneration durch ein verbessertes Überleben motorischer Nervenzellen (FERZAZ et al., 2002). Durch Etifoxin konnte bei einer Kälte-induzierten Läsion des N. ischiadicus die axonale Regeneration verbessert werden (GIRARD et al., 2008). In der aktuellen Studie konnten im Modell der unilateralen Vestibulopathie ebenfalls differentielle Verbesserungen des Symptomverlaufs durch Etifoxin nachgewiesen werden.

Der Haupteffekt der Etifoxin-Gabe zeigte sich dabei auf dem Verhaltensparameter

der posturalen Asymmetrie. Bei initial vergleichbarem posturalen Defizit an Tag 1 post UL hatten die Tiere der Etifoxin-Gruppe ab Tag 2 post UL kontinuierlich geringere Werte der posturalen Asymmetrie als die Sham-Gruppe. Die Unterschiede waren ab Tag 15 signifikant. Die Kompensation der posturalen Asymmetrie wurde ab Tag 15 um etwa sieben Tage beschleunigt und war an Tag 29 annähernd vollständig (Score < 1). Der Symptomverlauf der Sham-Gruppe deckte sich mit Ergebnissen früherer Studien, wobei an Tag 29 noch eine residuelle posturale Asymmetrie nachweisbar war (Score > 1) (Abbildung 40) (BECK et al., 2014; ZWERGAL et al., 2017; LINDNER et al., 2019).

Die Etifoxin-Effekte auf die Kopfschiefhaltung waren hingegen nur moderat. Die Kopfschiefhaltung wird nach den Ergebnissen früherer Studien weniger und nur unvollständig kompensiert. Sie kann bei Kleintieren nach unilateraler Vestibulopathie lebenslang bestehen bleiben (THOMAS, 2000). Im Rattenmodell ist die persistierende Seitneigung des Kopfes möglicherweise auf eine permanente Verkürzung der Nackenmuskulatur zurückzuführen. Die Kopfschiefhaltung wird daher als nur bedingt geeigneter Parameter gesehen, um vestibuläre Kompensation abzubilden. In der aktuellen Studie zeigten sich in Bezug auf die Kopfschiefhaltung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings erfolgte in der Etifoxin-Gruppe im Intertagesvergleich von den Tagen 5 und 8 post UL auf die Tage 22 und 29 eine signifikante Reduktion der Score Points, die in der Sham-Gruppe nicht auftrat. Dies könnte auf zumindest tendenziell positive Effekte von Etifoxin auf die Kopfschiefhaltung hinweisen.

Auch in Bezug auf die Haltungskontrolle im Elevated Tail Rotation Test konnte nur ein geringer positiver Effekt durch Etifoxin nachgewiesen werden. Während in der Etifoxin-Gruppe eine signifikante Verbesserung im Longitudinalverlauf nachgewiesen werden konnte, trat diese in der Sham-Gruppe nicht ein. Im Gruppenvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine Dekompensation der Haltungskontrolle durch das Fehlen der propriozeptiven Information über einen längeren Zeitraum bestehen bleiben kann und damit auch nur bedingt als früher oder intermediärer Kompensationsmarker gewertet werden kann (HAMANN et al., 1998).

Für den Parameter Nystagmus zeigte sich kein Effekt durch die Gabe von Etifoxin. In beiden Gruppen fiel der Nystagmus nach einem Maximum an Tag 1 post UL kontinuierlich ab und war ab Tag 8 nicht mehr nachweisbar. Es kann vermutet werden, dass in der frühen vestibulo-okulären Kompensation gliale

Mechanismen keine funktionelle Relevanz aufweisen, da sie erst verzögert wirksam werden.

Das Lokomotionsverhalten als Parameter der dynamischen vestibulären Kompensation wurde durch Etifoxin nicht signifikant beeinflusst. In beiden Gruppen kam es zu einer starken Reduktion von Geschwindigkeit und Bewegungsaktivität an Tag 1 post UL im Vergleich zum Baseline-Lauf. Korrelationsanalysen zeigten, dass die Tiere an diesem Tag langsamer liefen und sich weniger bewegten, wenn sie eine stärker ausgeprägte posturale Asymmetrie aufwiesen. Im Verlauf kam es an Tag 8 zu einer Zunahme der Lokomotionsgeschwindigkeit parallel zum Einsetzen der statischen vestibulären Kompensation. Ab Tag 15 liefen die Tiere schneller als beim Baseline-Lauf. Dies liegt vermutlich daran, dass sie sich an die Umgebung gewöhnt haben, weniger ängstlich sind und ihr Explorationsverhalten gesteigert ist.

Die Verteilung der Aufenthaltsorte im Open Field, die als Maß für das räumliche Explorations- und Angstverhalten gewertet werden kann, unterschied sich zwischen der Etifoxin- und Kontrollgruppe nur geringfügig. Im Baseline-Lauf und an den ersten drei Tagen post UL hielten sich die Tiere in beiden Gruppen überwiegend an den Randbereichen auf, anstatt freie Flächen zu überqueren (Thigmotaxis). Ab Tag 8 zeigte die Sham-Gruppe eine im Vergleich zur Etifoxin-Gruppe vermehrte Aufenthaltsdauer im Zentrum. Dies ist möglicherweise auf die geringere Kompensation der posturalen Asymmetrie im Vergleich zur Etifoxin-Gruppe zurückzuführen. Alternativ könnte auch ein stärker gestörtes räumliches Explorationsverhalten zugrunde liegen. Im Modell der bilateralen Vestibulopathie zeigten erkrankte Ratten eine reduzierte Thigmotaxis mit längerem Aufenthalt im Zentrum des Open Fields, was auf eine hochgradige Störung der räumlichen Orientierung hindeutete (EILLES, 2016; AITKEN et al., 2017).

Bei der Interpretation der Open Field-Ergebnisse sollte der bekannte anxiolytische Effekt von Etifoxin berücksichtigt werden (NGUYEN et al., 2006). Eine Anxiolyse würde zu einem gesteigerten Explorationsverhalten im Zentrum des Open Fields führen. Da in dieser Studie jedoch die Sham-Gruppe eine erhöhte Aufenthaltsdauer im Zentrum zeigte, scheint die Etifoxin-Dosis von 25 mg/kg keinen Einfluss auf das Angstverhalten der Tiere zu haben. Dieses Ergebnis stimmt mit Versuchen in einem Elevated Plus Maze überein, bei dem eine anxiolytische Wirkung von Etifoxin erst ab 50 mg/kg gezeigt werden konnte (UGALE et al., 2007).

Zusammenfassend verbesserte Etifoxin nach unilateraler Innenohrschädigung überwiegend die statische vestibulo-spinale Kompensation in einem Zeitfenster ab 15 Tagen post UL. Daraus kann geschlossen werden, dass die mikrogliale Aktivierung vor allem über indirekte Mechanismen (z.B. axonale Regeneration, synaptische Reokkupation) zur adaptiven Plastizität beiträgt. Ein verbessernder Effekt bei der Behandlung mit Etifoxin bei multipler Sklerose ist ebenfalls überwiegend im späteren Erkrankungsverlauf zu beobachten, nachdem die initiale entzündliche Phase abgeklungen ist und die Progression der Erkrankung hauptsächlich durch Neurodegeneration stattfindet (RAVIKUMAR et al., 2016).

1.2.2. Mikrogliaaktivierung

Mittels [^{18}F]GE180- μPET konnten Unterschiede in der Tracer-Anreicherung zwischen den Behandlungsgruppen visualisiert werden. Somit ist die μPET eine geeignete und sensitive Methode, medikamentös induzierte Veränderungen der Mikrogliaaktivierung abzubilden. Durch die Quantifizierung der TSPO-Dichte können Therapieversuche im zeitlichen Verlauf evaluiert werden. Die in vivo-Analyse im μPET besitzt bei Behandlungsstudien viele Vorteile zu ex vivo-Methoden, da dieselben Tiere longitudinal beobachtet werden können und Korrelationen zum Verhalten möglich sind (ZWERGAL et al., 2017). Weiterhin besteht Translationspotential für die Anwendung als bildgebender Surrogatmarker in Studien mit humanen Patienten.

Die mit Etifoxin behandelten Tiere zeigten ab Tag 8 und vor allem an Tag 15 post UL im Vergleich zur Sham-Gruppe eine geringere Mikrogliaaktivierung. Dieser Effekt geht damit einer Verringerung der posturalen Asymmetrie in der Etifoxin-Gruppe ab Tag 15 post UL voraus. Über mögliche Ursachen einer verminderten Mikrogliaaktivierung durch Etifoxin kann nur spekuliert werden. Es ist denkbar, dass Etifoxin zunächst durch eine Stimulation neuroinflammatorischer plastizitätsfördernder Prozesse in den ersten sieben Tagen nach UL zu einer Beschleunigung der Kompensation im Verlauf beiträgt. Eine verminderte Mikrogliaaktivierung zu späteren Zeitpunkten könnte dann als Surrogatmarker für eine verbesserte Funktion gewertet werden.

Alternativ könnte Etifoxin auch bereits in den ersten Tagen nach UL zu einer verminderten neuroinflammatorischen Reaktion führen. Eine reduzierte Anzahl aktivierter Mikroglia durch Etifoxin konnte auch im Tiermodell der multiplen

Sklerose nachgewiesen werden und mit positiven klinischen Effekten in Verbindung gebracht werden (DAUGHERTY et al., 2013). Bei zerebraler Ischämie führte die Behandlung mit Etifoxin zu einer reduzierten Neuroinflammation und geringeren Mikrogliaaktivierung (LI et al., 2017). Es wurde vermutet, dass eine Verringerung inflammatorischer Zytokine und neurotoxischer Substanzen unter Behandlung mit Etifoxin einen progressiven Zellverlust und eine konsekutive funktionelle Beeinträchtigung partiell verhindern können (SIMON-O'BRIEN et al., 2016). Weiterhin könnte die Etifoxin-induzierte Ausschüttung von Neurosteroiden zu einer Modulation der Mikrogliaaktivierung durch Autoregulationsprozesse beitragen (GARCIA-SEGURA & MELCANGI, 2006). Mikroglia besitzen Rezeptoren für Steroidhormone, deren Expression sich je nach Zustand der Mikroglia (aktiviert oder ruhend) verändert. Die mikrogliale Proliferation kann durch Neurosteroiden herunterreguliert werden (GARCIA-SEGURA & MELCANGI, 2006). TSPO-Liganden reduzieren daher aktivierte Mikroglia und Makrophagen und die Produktion inflammatorischer Zytokine. Diese Regulation der neuroinflammatorischen Antwort spielt eine entscheidende Rolle für die Neuroprotektion (RUPPRECHT et al., 2010).

Für die Etifoxin-Gruppe konnte durch Korrelationsanalysen gezeigt werden, dass an Tag 8 post UL eine niedrigere Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern mit einer geringeren posturalen Asymmetrie einhergeht. Weiterhin zeigte sich eine verminderte Geschwindigkeit und Bewegungsaktivität mit abnehmender Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen vestibulären Kern an Tag 8 post UL. Die Sham-Gruppe zeigte dieselben Korrelationen zwischen der Mikrogliaaktivierung im ipsiläsionalen Kerngebiet und der Geschwindigkeit bzw. Bewegungsdauer zu einem späteren Messzeitpunkt (Tag 29 post UL). Die hippocampale Mikrogliaaktivierung war durch Etifoxin im Vergleich zur Sham-Behandlung vor allem an den späteren Untersuchungszeitpunkten herunterreguliert.

Zusammenfassend scheint die Mikrogliaaktivierung bei unilateraler Vestibulopathie in der akuten Phase einen kompensationsfördernden Einfluss zu haben, der dazu führt, dass die Anzahl der reaktiven Mikroglia im späteren Verlauf reduziert wird. Bei der Behandlung mit Etifoxin könnte die Reduktion der Mikrogliaaktivierung auch auf dem Mechanismus einer gesteigerten Neurosteroidsynthese beruhen. Beim Vergleich mit den TSPO-Liganden XBD173 und Diazepam zeigte Etifoxin die höchste Steigerung der Neurosteroidsynthese,

bei der geringsten Bindungsaffinität am TSPO-Rezeptor. Die pharmakologische Potenz von Etifoxin scheint daher nicht von seiner Bindungsaffinität, sondern vom Potential zur Regulation neuroinflammatorischer Mediatoren abzuhängen (WOLF et al., 2015).

1.2.3. Ausblick für die therapeutischen Implikationen von Etifoxin

Vor einer möglichen weiteren Anwendung bei humanen Patienten müssen noch folgende weitere Fragen präklinisch geklärt werden:

Etifoxin-Wirkung in der akuten Phase der vestibulären Kompensation:

Inwieweit Etifoxin die Mikrogliaaktivierung in den ersten Tagen nach UL verändern kann, muss in weiteren Studien untersucht werden. Ein engmaschigeres Scan-Protokoll könnte dabei weitere hilfreiche Aufschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Mikrogliaaktivierung und deren Wirkung geben.

Dosierung von Etifoxin und Behandlungsdauer:

In den meisten tierexperimentellen Studien mit Etifoxin wurde eine Dosierung von 50 mg/kg gewählt. Eine präventive Wirkung gegen die Bildung von Gehirnödemen konnte ab einer Dosis von zweimal täglich 25 mg/kg erreicht werden, während ein kurativer Effekt erst ab 50 mg/kg einsetzte (GIRARD et al., 2009). Die Reduktion neuropathischer Schmerzen wurde ebenfalls bei einer Behandlung mit 50 mg/kg Etifoxin erreicht (AOUAD et al., 2009). Bei traumatischen Gehirnverletzungen führten 50 mg/kg Etifoxin zu einer Reduktion von Mikrogliaaktivierung, neuronaler Degeneration und Neuroinflammation, wodurch die senso-motorischen Defizite verbessert wurden (SIMON-O'BRIEN et al., 2016). LIERE et al. (2017) konnten einen zeit- und dosisabhängigen Einfluss von Etifoxin auf die Neurosteroid-Synthese nachweisen, bei dem 50 mg/kg die effizienteste Dosierung darstellte. Die Verhaltensanalysen dieser Studie zeigten eine positive Wirkung von 25 mg/kg Etifoxin auf die statische Kompensation der posturalen Asymmetrie, sowie eine reduzierte Mikrogliaaktivierung im späteren Krankheitsverlauf. Möglicherweise könnte eine Erhöhung der Dosis auf 50 mg/kg die Effekte steigern und dadurch auch die dynamische vestibuläre Kompensation positiv beeinflussen. Eine weitere Testung von Dosis-Wirkungs-Effekten im Rattenmodell der UL ist daher nötig. Weiterhin muss untersucht werden, ob ein Behandlungszeitraum von sieben Tagen post UL ausreicht, oder andere Behandlungsfenster optimal sind.

Nebenwirkungen einer Etifoxin-Behandlung:

Bei der Behandlung mit Etifoxin scheinen keine negativen Effekte auf die vestibuläre Kompensation aufzutreten. Insbesondere wurden keine sedierenden Effekte beobachtet, die zu potentiellen Beeinträchtigungen der vestibulären Kompensation führen könnten. Die bekannte anxiolytische Wirkung von Etifoxin könnte eher einen Vorteil in der akuten Symptomphase darstellen, die häufig von einer ausgeprägten Angstreaktion bei betroffenen Patienten begleitet wird. Etifoxin hatte keinen akuten Einfluss auf die Symptome der vestibulären Asymmetrie, sondern förderte die spätere Regeneration. Für frühe symptomwirksame pharmakologische Ansätze, z.B. mit dem Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin, konnte in der Vergangenheit eine paradoxe Verzögerung der späteren Kompensation durch eine persistierende Asymmetrie im Bereich der vestibulären Kerne nachgewiesen werden (BECK et al., 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie indizieren ein großes translationales Potential für eine mögliche Anwendung bei Patienten mit unilateraler Vestibulopathie. Dennoch müssen weitere Untersuchungen, insbesondere Dosis-Wirkungsstudien, mit Etifoxin durchgeführt werden.

2. Neurogenese bei zentraler vestibulärer Kompensation

2.1. Neurogenese im ipsiläsionalen vestibulären Kern nach UL

Periphere Nervenschädigungen können eine reaktive Neurogenese in den betreffenden Kerngebieten im Hirnstamm induzieren. Nach unilateraler vestibulärer Neurektomie (UVN) konnte eine erhöhte Zellproliferation im ipsiläsionalen vestibulären Kern ab Tag 1 post OP immunhistologisch nachgewiesen werden. Diese erreichte ihren Höhepunkt an Tag 3 und verschwand bis Tag 30 (TIGHILET et al., 2007). Die Neurogenese nach unilateraler Labyrinthektomie wurde in der aktuellen Studie in vivo mit dem [¹⁸F]-markierten Zellproliferationsmarker FLT im μ PET untersucht.

Im ipsiläsionalen vestibulären Kerngebiet erreichte die [¹⁸F]FLT-Anreicherung am frühesten gemessenen Zeitpunkt ihren Höchstwert (Tag 3 post UL). Daraufhin sank die Neurogeneserate wieder und war an Tag 31 post UL zurück auf dem Baseline-Niveau. Der zeitliche Verlauf der Neurogenese stimmte daher gut mit den Ergebnissen von TIGHILET et al. (2007) überein.

In der Immunhistologie war ebenfalls ein Anstieg proliferierender Zellen an Tag 3 post UL im ipsiläsionalen vestibulären Kern zu erkennen. Auf der Läsionsseite war die Neurogeneserate in der UL-Gruppe stets höher als in der Sham-Gruppe, was auf einen spezifischen Effekt der unilateralen peripheren vestibulären Schädigung hinweist. Die Neurogenese nach UL sank an den Tagen 10 und 17 post UL und stieg mit einem zweiten Höchstwert an Tag 24 wieder an. Die erhöhte Zellzahl an Tag 24 trat allerdings sowohl ipsi-, als auch kontraläsional auf. Diese Ergebnisse sprechen für eine reaktive Antwort der kommissuralen vestibulären Verbindungen im Hirnstamm. In einer früheren Studie konnte eine kontraläsionale Neurogenese ebenfalls im dorsalen Vagusnerv-Komplex nach zervikaler Vagotomie ausgelöst werden. Diese war geringer als auf der ipsiläsionalen Seite ausgeprägt, jedoch im Vergleich zu einer gesunden Kontroll-Gruppe deutlich erhöht (BAUER et al., 2005). Es kann nur spekuliert werden, warum der intermediäre Anstieg der Zellproliferation im μ PET nicht abgebildet werden konnte. Denkbar wäre eine unvollständige Erfassung durch die definierte VN-VOI. Insgesamt ist das Ausmaß der Zellproliferation in den vestibulären Kernen nur sehr gering, was zu einer Anfälligkeit gegenüber Hintergrundeffekten führt (siehe V.4).

Die neugeborenen Zellen im Hirnstamm differenzieren sich vor allem in Mikroglia, Astrozyten und GABAerge Neuronen (TIGHILET et al., 2007). Inwiefern die gesteigerte Neurogeneserate den Kompensationsverlauf steuert, ist bislang unklar. Das GABAerge System beeinflusst die vestibuläre Kompensation, indem es zur Wiedererlangung des Gleichgewichts der elektrischen Aktivität zwischen den vestibulären Kernen beiträgt (DARLINGTON & SMITH, 2000). Die Infusion von Gabazin, einem selektiven allosterischen GABA_A-Antagonisten, führte nach UVN in der Katze zu einer beschleunigten und verbesserten posturalen und lokomotorischen Kompensation, sowie zu einer Reduktion des Nystagmus. Die Gabe des GABA_A-Agonisten Muscimol verzögerte hingegen den Heilungsverlauf, was auf einen positiven Einfluss der GABAergen Neuronen hindeutet (DUTHEIL et al., 2013). Die neugebildeten ipsiläsionalen GABAergen Neuronen könnten inhibitorisch auf die bestehenden exzitatorischen Neuronen der kontraläsionalen Seite wirken. Ein weiterer möglicher Wirkungsmechanismus der neugeborenen Zellen ist eine Verstärkung der inhibitorischen Interneuronen im ipsiläsionalen Kern, die funktionell zu einer Disinhibition führen (Dutheil 2009).

In der vorliegenden Studie ergaben die Korrelationsanalysen einen schwachen Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate im ipsiläsionalen vestibulären Kern und der Verringerung der posturalen Asymmetrie. Es kann daher kein eindeutiger Hinweis auf eine kompensationsfördernde Wirkung der Neurogenese gefunden werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass eine Korrelation an einzelnen Tagen, die komplexe Sequenz zwischen Neurogenese und möglichen konsekutiven Effekten schwer abbilden kann.

2.2. Veränderung der Neurogeneserate im Hippocampus

Die Neurogenese im Hippocampus und in der subventrikulären Zone ist ein kontinuierlicher Prozess, der auch bei erwachsenen Individuen lebenslänglich bestehen bleibt. Verschiedene Umwelteinflüsse, Substanzen, Erkrankungen oder Läsionen können die Neurogeneserate im Gyrus dentatus entweder erhöhen oder hemmen (KEMPERMANN, 2005). Die Verringerung der neugebildeten Nervenzellen scheint mit Beeinträchtigungen im Lernverhalten einherzugehen (AIZAWA et al., 2009).

In der aktuellen Studie zeigten die immunhistologischen Untersuchungen eine Abnahme der Anzahl BrdU-positiver Zellen im Hippocampus post UL. Allerdings wurde eine Abnahme auch bei den Sham-operierten Tieren beobachtet, was darauf hinweist, dass die Reduktion der Neurogeneserate nicht alleinig und spezifisch auf die vestibuläre Schädigung zurückzuführen sein muss. Auch der chirurgische Eingriff, der postoperative Stress oder die begleitende unilaterale auditorische Beeinträchtigung könnten unspezifische Auslöser für eine Reduktion der Neurogeneserate sein. Bei der differenzierten Betrachtung ist zu erkennen, dass im ipsiläsionalen Hippocampus ein zusätzlicher spezifischer Effekt in der UL-Gruppe auftritt, da dort an Tag 10 eine signifikante Verringerung der Zellproliferation im Vergleich zur Sham-Gruppe zu erkennen ist. Auf der kontraläsionalen Seite zeigte sich eine andere Dynamik, da dort im späteren Verlauf an Tag 24 und 31 die Zellzahl der UL-Gruppe erhöht war. Diese Ergebnisse weisen auf eine spezifische Abnahme der hippocampalen Neurogenese auf der Läsionsseite an Tag 10 nach UL und eine unspezifische Abnahme auf beiden Seiten durch Operationseffekte hin.

In der vorliegenden Studie konnte mittels [¹⁸F]FLT-μPET keine verringerte Proliferationsrate im Hippocampus nachgewiesen werden. An den späteren Tagen post UL (Tag 24 und 31) trat sogar eine beidseitig erhöhte Tracer-Anreicherung

im Hippocampus auf. Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der μ PET und Immunhistochemie könnte erneut methodisch bedingt sein, da aufgrund der sehr geringen Proliferationsrate im Gyrus dentatus im μ PET eine Anfälligkeit zur Überlagerung mit unspezifischen Effekten entsteht (siehe V.4).

Inwieweit die moderate Abnahme der Neurogenese im Hippocampus funktionell relevant ist, muss in weiteren Studien geprüft werden. Bei Patienten mit unilateraler Vestibulopathie zeigten sich keine persistierenden Beeinträchtigungen der räumlichen Orientierung und kein Volumenverlust im Hippocampus (HÜFNER et al., 2007). Hingegen führte eine bilaterale vestibuläre Schädigung zu einer persistierenden Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses, die von einer Reduktion des Hippocampusvolumens begleitet wird (BRANDT et al., 2005). Es erscheint daher aufgrund der bilateralen Organisation der aufsteigenden vestibulären Projektionen in den Hippocampus ein gewisses Potential zur funktionellen hippocampalen Kompensation zu bestehen.

3. Räumliche Orientierung nach unilateraler Labyrinthektomie

Natürlicherweise besitzen Ratten im T-Maze die Tendenz, die beiden Zielarme abwechselnd zu betreten (DEMBER & FOWLER, 1958). Dabei wird das Arbeitsgedächtnis angewandt, da ihre nächste Aktion auf der vorherigen beruht. Ratten können bei der Wahl des richtigen Zielarmes verschiedene Strategien anwenden. Hierzu gehören z.B. örtliche Hinweise außer- oder innerhalb des T-Maze, an denen sie sich orientieren können. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass sie sich an ihre motorischen Sequenzen und die Richtung, in die sie vorher gegangen sind, erinnern (WENK, 2001).

Nach bilateraler vestibulärer Deafferentierung von Ratten konnten mit Tests im T-Maze schwere persistierende Defizite der Leistung des Arbeitsgedächtnisses und der Navigation nachgewiesen werden, was für eine hippocampale Dysfunktion durch den fehlenden vestibulären Inputs spricht (SMITH et al., 2015). Das vestibuläre System ist durch direkte oder indirekte Verbindungen zum Hippocampus an der räumlichen Navigation beteiligt. Die eingehenden vestibulären Informationen über Kopfbewegungen werden im Hippocampus für die Detektion der räumlichen Position eines Tieres genutzt. In diversen Studien

konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des vestibulären Systems die Reaktion der hippocampalen Ortszellen modulieren kann (SMITH et al., 2005).

In der aktuellen Studie lag der prozentuale Anteil der richtigen Entscheidungen in der Kontroll-Gruppe mit ca. 70% leicht unter den erwarteten Werten aus Literaturangaben. Gesunde Tiere sollten eine Alternationsrate von ca. 75% zeigen (DEMBER & FOWLER, 1958). Tiere mit hippocampalen Läsionen erreichen meist nicht über 60% richtige Entscheidungen bei der Wahl des Zielarmes (DEACON & RAWLINS, 2006). Dieser Wert stimmt mit den Erfolgsraten in der aktuellen Studie in der UL-Gruppe (60%) überein, was für eine gewisse funktionelle Beeinträchtigung des Hippocampus spricht. Die Unterschiede in den Erfolgsraten waren jedoch nicht zwischen den Gruppen signifikant. Zu beachten ist aber, dass die UL-Gruppe vor allem innerhalb der ersten Woche post OP eine signifikant höhere Anzahl abgebrochener Trials zeigte. Die gewerteten Trials der UL-Gruppe wurden daher vermutlich von Tieren, die besser kompensieren konnten, gelaufen, da die abgebrochenen Trials nicht gewertet wurden.

In den ersten zwei Wochen post UL liefen die Tiere der UL-Gruppe deutlich langsamer und bewegten sich weniger als die Kontroll-Gruppe. Die Tiere benötigten mehr Zeit, um sich für eine Seite zu entscheiden und legten mehr Distanz zurück. Die Verbesserung im zeitlichen Verlauf deutet an, dass diese Defizite passager sind.

Es kann spekuliert werden, ob die moderaten und passageren Veränderungen im Navigationsverhalten tatsächlich Defizite des räumlichen Gedächtnisses widerspiegeln oder ob die okulo-motorischen und posturalen Symptome dazu führen, dass die Tiere nicht in der Lage sind, die geforderten Aufgaben zu lösen (SMITH et al., 2005). Korrelationsanalysen in der aktuellen Studie zeigen, dass in der UL-Gruppe die schlechtere Performance im T-Maze mit einer erhöhten posturalen Asymmetrie einhergeht. Allerdings könnte es sich dabei auch um eine Pseudokorrelation handeln. Bei Menschen mit unilateraler vestibulärer Dysfunktion konnte gezeigt werden, dass die Defizite der räumlichen Orientierung früher vollständig kompensiert wurden, als die posturo-lokomotorischen Beeinträchtigungen. Dies zeigt, dass die Stand- und Gangunsicherheiten nicht allein für eine eingeschränkte Navigation verantwortlich sind (PERUCH et al., 1999). Patienten mit unilateraler vestibulärer Dysfunktion entwickeln Kompensationsmechanismen, die vermutlich auf der Nutzung von somatosensorischen Hinweisen (visuell und propriozeptiv) beruhen. Die initial

beeinträchtigte räumliche Orientierung nach vestibulärer Neurektomie entspricht nach einem Monat wieder der Navigationsfähigkeit von gesunden Menschen. Die Kombination aus Informationen des intakten Vestibularorgans und den visuellen Reizen erlaubt die progressive Kompensation des einseitigen Labyrinthausfalls (PERUCH et al., 1999).

Frühere Studien zeigen, dass Ratten nach unilateraler vestibulärer Deafferentierung nur Defizite zeigten, wenn sie die Aufgaben bei Dunkelheit erfüllen mussten. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Tiere ihren vestibulären Ausfall durch visuelle Substitution ausgleichen können. Nach sechs Monaten unterschied sich ihre Fehlerquote nicht mehr von der von gesunden Kontroll-Tieren. Sie schienen kompensatorische Strategien entwickelt zu haben, mit denen sie die einseitigen vestibulären Informationen trotz fehlender visueller Hinweise verarbeiten und optimal nutzen können (ZHENG et al., 2006). Auch Ratten mit bilateralen vestibulären Läsionen benötigen für die räumliche Navigation visuelle Hinweise in der Umgebung (STACKMAN & HERBERT, 2002). Blinde Tiere mit intaktem Vestibularapparat zeigen physiologische Alternationsraten (DEACON & RAWLINS, 2006). Daraus lässt sich schließen, dass mindestens ein vestibulärer oder ein visueller Input vorliegen muss, damit die Tiere sich räumlich orientieren können.

Tiere, denen der Hippocampus komplett entfernt wurde, zeigen Seitenpräferenzen und betreten oft nur noch einen bevorzugten Arm des T-Maze (DEACON & RAWLINS, 2006). Dies war bei den unilateral labyrinthektomierten Tieren im vorliegenden Versuch nicht der Fall. Trotz Kopfschiefhaltung und Fallneigung auf die ipsiläsionale Seite, lag die durchschnittliche Seitenverteilung des gewählten Zielarms in einem ausgeglichenen Verhältnis. Der einseitig fehlende vestibuläre Input scheint keinen wesentlichen Einfluss auf eine Richtungspräferenz im T-Maze zu haben. Dies wird durch Ergebnisse gestützt, bei denen die elektrische Stimulation eines Labyrinthes, die Feldpotentiale im Hippocampus beidseits beeinflusste (CUTHBERT et al., 2000). Es scheint, dass die Transmission der vestibulären Information von den vestibulären Kernen zum Hippocampus beidseits erfolgt. Dafür spricht außerdem, dass es nach unilateraler vestibulärer Deafferentierung zu einer bilateralen Verringerung der Erregbarkeit von hippocampalen Ortszellen kommt (ZHENG et al., 2003).

4. Nachweis proliferierender Zellen mittels [¹⁸F]FLT- μ PET und Immunhistologie

Die Immunhistologie mittels BrdU ist der Goldstandard, an dem alle anderen Marker für Neurogenese gemessen werden (WOJTOWICZ & KEE, 2006). In dieser Studie wurde sie durchgeführt, um die Eignung des Radiotracers [¹⁸F]FLT für den Neurogenese-Nachweis im Modell der unilateralen peripheren Vestibulopathie zu erforschen. [¹⁸F]FLT und BrdU sind Thymidin-Analoga, die sich in die DNA proliferierender Zellen einbauen. Ihre intrazelluläre Anreicherung beruht auf demselben Wirkungsprinzip, was eine gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden ermöglichen sollte. In Studien an menschlichen Gliom-Patienten erwies sich [¹⁸F]FLT als geeigneter Proliferationsmarker mit einer hohen Detektionsrate. Die Ergebnisse korrelierten signifikant mit dem immunhistologischen Proliferationsmarker Ki-67 (CHEN et al., 2005).

In der aktuellen Studie konnte an Tag 3 post UL sowohl im [¹⁸F]FLT- μ PET, als auch in der Immunhistologie in den ipsiläsionalen Kerngebieten eine erhöhte Zellproliferation nachgewiesen werden. Während die [¹⁸F]FLT-Anreicherung im weiteren Kompensationsverlauf abnahm, trat in der Immunhistologie ein weiterer Höchstwert an Tag 24 auf. Auch in der SPM-Analyse des [¹⁸F]FLT-Signals zeigte sich die erhöhte Neurogeneserate an intermediären und späten Zeitpunkten, allerdings war sie nicht spezifisch im linken vestibulären Kern, sondern mittig im Hirnstamm nachzuweisen. Die Ergebnisse der hippocampalen Neurogenese im [¹⁸F]FLT- μ PET stimmen ebenfalls nur partiell mit denen der Immunhistologie überein. Während mittels BrdU eine deutlich verringerte Neurogenese im Hippocampus ab Tag 3 post UL gezeigt werden konnte, war im μ PET eine leicht erhöhte Anreicherung zu erkennen.

Es kann daher konkludiert werden, dass die BrdU- und [¹⁸F]FLT-Signale tendenziell im vestibulären Kern eine ähnliche frühe Dynamik nach UL aufwiesen. Dennoch bestanden Unterschiede zwischen den Methoden, die folgendermaßen erklärt werden könnten:

Das μ PET weist eine limitierte räumliche Auflösung von 1-2 mm auf. Gerade im tegmentalen Hirnstamm und Gyrus dentatus ist daher eine Überlagerung mit Hintergrundsignalen angrenzender Gefäße (z.B. Plexus choroideus) denkbar. Aufgrund der sehr geringen spezifischen Zellproliferation ist dieser Aspekt relevant. Die exakte anatomische Lokalisation ist in kleinen Kernstrukturen im

Hirnstamm oder komplexen hippocampalen Strukturen der Ratte besonders schwierig.

Des Weiteren ist der Thymidin-Spiegel im Blut bei Nagetieren ca. zehnmal so hoch wie beim Menschen. Somit konkurriert das endogene Thymidin mit [^{18}F]FLT um die Bindungsstellen, wodurch die Tracer-Anreicherung limitiert wird (MANKOFF et al., 2005). Generell werden nur weniger als 2% des applizierten Tracers in die DNA inkorporiert, was auf den chemischen Aufbau von [^{18}F]FLT zurückzuführen ist (SHIELDS, 2003; MANKOFF et al., 2005).

Ein exakter Vergleich zwischen der Anreicherung von [^{18}F]FLT und BrdU ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit von [^{18}F]FLT nicht möglich. Dies zeigte die direkte Durchführung beider Methoden in einer Zellkultur, bei der deutlich mehr BrdU als [^{18}F]FLT in die Zelle aufgenommen wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass BrdU für sechs Stunden inkubiert wurde und [^{18}F]FLT aufgrund der geringen Halbwertszeit nur für anderthalb Stunden (RUEGER et al., 2010).

Das aktuelle Protokoll wurde gewählt, um die Methoden [^{18}F]FLT- μ PET und Immunhistologie besser vergleichen zu können. Ein Vorteil des kurzen Inkubationszeitraums zwischen BrdU-Applikation und Perfusion ist, dass sich die Zellen an der dargestellten anatomischen Lokalisation tatsächlich geteilt haben und noch nicht migriert sein können. In vivo besitzt BrdU eine relativ kurze Bioverfügbarkeit von ca. zwei Stunden, wodurch nur Zellen direkt markiert werden, die sich genau in diesem Zeitraum in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Eine Dosis von 50 mg/kg markiert alle proliferierenden Zellen in der SVZ in einem Zeitraum von 15 Minuten bis zu zwei Stunden (TAKAHASHI et al., 1992). Im Hippocampus markiert eine einmalige Dosis von 25 mg/kg BrdU ca. 45% der Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befinden (CAMERON & MCKAY, 2001). Allerdings ist bei kurzer Inkubation mit BrdU ähnlich wie bei [^{18}F]FLT nur ein sehr geringes spezifisches Signal sichtbar.

Zusammenfassend eignet sich [^{18}F]FLT- μ PET nur bedingt, um Veränderungen der Zellproliferation nach vestibulärer Schädigung zu visualisieren, da die Signalunterschiede zwischen den neurogenen Nischen und anderen Gehirnregionen nur sehr gering sind. Auch eine Augmentation durch Probenecid, das die Penetrationsraten von [^{18}F]FLT ins Gehirnparenchym durch die Blut-Hirn-Schranke erhöhen kann (TAMURA et al. 2016), führte nicht zu einer verbesserten Detektion.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass [¹⁸F]FLT und BrdU keine spezifischen Marker für Neurogenese, sondern für proliferierende Zellen sind. Die erhöhte [¹⁸F]FLT-Anreicherung im ipsiläsionalen Innenohr beruht möglicherweise auf der Regeneration des geschädigten Gewebes und Epithelneubildung anstatt auf neugeborenen Neuronen. Weitere Erklärungen für die dort gesteigerte Zellproliferation könnten Inflammationsprozesse oder eine erhöhte Durchblutung als Reaktion auf den toxischen Schaden nach UL sein. Der longitudinal abnehmende Verlauf des Heilungsprozesses ist sehr deutlich zu erkennen und könnte eine mögliche Proliferation von Nervenzellen überdecken.

Bei den mit [¹⁸F]FLT und BrdU markierten Zellen im Hippocampus und im Hirnstamm könnte es sich ebenfalls um unterschiedliche Zellpopulationen handeln. Verschiedene Phänotypen der Zellen könnten eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den beiden Untersuchungsmethoden sein. In folgenden Studien könnten Doppelfärbungen mit BrdU und neuronalen Markern Aufschluss über die Überlebensrate und die Differenzierung der neugeborenen Zellen geben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit unilateralen vestibulären Läsionen leiden an Drehschwindel, Übelkeit, Nystagmus, Kopfschiefhaltung und Haltungsinstabilität. Obwohl die meisten Symptome durch den Prozess der zentralen vestibulären Kompensation innerhalb weniger Wochen abklingen, stellen Schwindelerkrankungen in der Bevölkerung eine große Belastung dar. Viele Medikamente, die in der Akutphase gegen Schwindel und Übelkeit eingesetzt werden, verzögern und/oder verschlechtern den folgenden Kompensationsverlauf. Die Entwicklung geeigneter Therapiestrategien erfordert ein tiefgründiges Verständnis der zentralen Plastizitätsmechanismen, die an der vestibulären Kompensation beteiligt sind. In dieser präklinischen Forschungsarbeit wurden daher die Mikrogliaaktivierung und die reaktive Neurogenese im Rattenmodell nach unilateraler Labyrinthektomie (UL) untersucht. Die adaptiven neuronalen Veränderungen während der vestibulären Kompensation wurden in vivo mittels μ PET bildgebend dargestellt. Für den Nachweis der Mikrogliaaktivierung diente der etablierte Radiotracer [18 F]GE180. Zur Visualisierung der zellulären Proliferationsrate wurde der neuere Tracer [18 F]FLT angewandt. Um die Ergebnisse des [18 F]FLT- μ PETs zu evaluieren, wurde außerdem im selben Zeitintervall eine Immunhistologie mit BrdU, dem Goldstandard zum Nachweis von Neurogenese, durchgeführt. Zur Analyse der funktionellen Beteiligung der Plastizitätsmechanismen wurden die Symptome Nystagmus, posturale Asymmetrie, Kopfschiefhaltung und Haltungsdekompensation an den korrelierenden Tagen mittels klinischem Scoring beurteilt. Zur Feststellung einer Schädigung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses und eines veränderten Lokomotionsverhaltens wurden die Ratten nach UL zusätzlich dreimal wöchentlich in einem T-Maze untersucht.

Als Therapieversuch wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der TSPO-Agonist Etifoxin zur Modulation der Mikrogliaaktivierung eingesetzt. Ab Tag 1 post UL erhielten die Ratten eine tägliche intraperitoneale Injektion von 25 mg/kg Etifoxin über sieben Tage. Zum Vergleich bekamen die Tiere der Sham-Gruppe dieselbe Menge NaCl-Lösung. Für die Visualisierung einer Veränderung des zeitlichen Verlaufs der Mikrogliaaktivierung wurden für beide Gruppen wöchentliche μ PET-Scans mit [18 F]GE180 durchgeführt. Die vestibulo-okulomotorischen, vestibulo-spinalen und lokomotorischen Symptome wurden im klinischen Scoring

und im Open Field-Test evaluiert.

In der Plastizitätsstudie konnte eine Mikrogliaaktivierung ab Tag 1 post UL im ipsiläsionalen vestibulären Kern gezeigt werden. Die Anzahl aktivierter Mikroglia erreichte ihren Höchstwert an Tag 8 post UL und blieb bis einschließlich Tag 29 über dem Baseline-Level. Im Hippocampus stieg die Mikrogliaaktivierung beidseits longitudinal an und erreichte an Tag 22 ihren Höhepunkt.

Die Untersuchungen im [¹⁸F]FLT- μ PET ergaben einen Anstieg der zellulären Proliferationsrate im ipsiläsionalen vestibulären Kerngebiet an Tag 3 post UL. Während des Kompensationsverlaufs nahm die Neurogeneserate ab und erreichte innerhalb des untersuchten Zeitraumes wieder das Baseline-Niveau. Auch immunhistologisch konnte eine reaktive Neurogenese an Tag 3 post UL im ipsiläsionalen Kerngebiet nachgewiesen werden. An Tag 24 trat ein weiterer Anstieg der Neurogeneserate sowohl ipsi- als auch kontraläsional auf, der im μ PET nicht visualisiert werden konnte. Die Tiere der Sham-Gruppe zeigten keine Neurogenese in den ipsiläsionalen Kernen, was auf einen spezifischen Effekt durch UL hinweist.

Im [¹⁸F]FLT- μ PET schien die Neurogeneserate im Hippocampus, vor allem kontraläsional, longitudinal anzusteigen. Immunhistologisch zeigte sich mit einer reduzierten Zellproliferationsrate der gegenteilige Effekt. Die Neurogeneserate nahm beidseits in der UL- und in der Sham-Gruppe ab. Dabei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Reaktion nach dem chirurgischen Eingriff.

Im T-Maze zeigten die Ratten der UL-Gruppe niedrigere Alternationsraten und eine höhere Abbruchquote als die gesunde Kontroll-Gruppe. Die nahezu zufällige Auswahl des Zielarmes spricht für eine Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung. Da die Tiere keinerlei Seitenpräferenzen bei der Wahl des Zielarmes zeigten, scheinen die posturalen Symptome keinen Einfluss auf die gewählte Richtung zu haben. Die Defizite des räumlichen Gedächtnisses wurden von den Tieren im späteren Verlauf partiell kompensiert.

In der Therapiestudie wurde der Nystagmus bis Tag 8 post UL in beiden Gruppen gleichermaßen vollständig kompensiert. Die vestibulo-okulomotorische Symptomatik wurde also durch die Etifoxin-Behandlung aufgrund der früh abgeschlossenen Kompensation nicht beeinflusst. An den Tagen 15, 22, und 29 post UL zeigten die Tiere der Etifoxin-Gruppe eine signifikante Verbesserung der posturalen Asymmetrie. Die vestibulo-spinale Kompensation konnte durch Etifoxin vor allem im späteren Krankheitsverlauf verbessert werden. Die Untersuchung der Lokomotionsgeschwindigkeit und der Bewegungsphasen im

Open Field zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Daher übte Etifoxin vermutlich keinen Effekt auf die lokomotorischen Defizite bei unilateraler Vestibulopathie aus. Nach dem Einsetzen der vestibulären Kompensation ab Tag 8 hielten sich die Tiere der Etifoxin-Gruppe deutlich weniger im Zentrum des Open Fields auf als die Tiere der Sham-Gruppe, was für ein physiologisches Verhalten (Thigmotaxis) spricht.

Die Anzahl aktivierter Mikroglia war im vestibulären Kern im gesamten Kompensationsverlauf und im Hippocampus an den späteren Untersuchungszeitpunkten in der Sham-Gruppe stärker erhöht als in der Etifoxin-Gruppe. Dies bestätigt die Annahme, dass die Wirkung von Etifoxin durch eine Modulation der Mikrogliaaktivierung in den ersten ein bis zwei Wochen einsetzt, wodurch die Kompensation im späteren Verlauf verbessert wird. Das Wirkungsprinzip beruht möglicherweise auf einer initial erhöhten Mikrogliaaktivierung, wodurch Plastizitätsmechanismen gefördert werden, die zur funktionellen Kompensation beitragen. Mikroglia könnten durch neuroprotektive Wirkung, Unterstützung von Astrogliose und Neurogenese, sowie einer erhöhten Neurosteroidsynthese einen positiven Effekt auf die vestibuläre Kompensation besitzen. Eine persistierende Mikrogliaaktivierung, die im späteren Krankheitsverlauf zu pathologischen Prozessen führen könnte, kann durch die initial gesteigerte Mikrogliaaktivierung von Etifoxin verhindert werden.

In dieser Studie konnten eine adaptive Neuroinflammation durch aktivierte Mikroglia, sowie eine reaktive Neurogenese im vestibulären Kern bei der zentralen vestibulären Kompensation eines unilateralen vestibulären Defizits nachgewiesen werden. Die unilaterale periphere vestibuläre Läsion induzierte eine Reduktion der hippocampalen Neurogeneserate, die von passageren Defiziten der räumlichen Orientierung begleitet wurde. Aufgrund von Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Immunhistologie und des μ PETs scheint [^{18}F]FLT nicht sensitiv genug zu sein, um eine veränderte Neurogeneserate im Modell der unilateralen Vestibulopathie konsistent zu visualisieren. [^{18}F]GE180 hat sich als sensitiver Surrogatmarker für Neuroinflammation erwiesen. Die therapeutische Modulation der Mikrogliaaktivierung durch den TSPO-Agonisten Etifoxin konnte im μ PET visualisiert werden. Etifoxin hat im späteren Kompensationsverlauf einen positiven Effekt auf vestibulo-spinale Symptome. Es besitzt somit ein therapeutisches Potential für die Unterstützung der funktionellen Erholung nach unilateralen peripheren Läsionen.

VII. SUMMARY

Microglial activation and neurogenesis during vestibular compensation: μ PET-analyses, immunohistochemistry, behavioural testing and therapy after unilateral labyrinthectomy

Patients with unilateral vestibular lesions are suffering from rotatory vertigo, nausea, nystagmus, head tilt and postural imbalance. Although most of the symptoms ameliorate over a couple of weeks due to the process of central vestibular compensation, vertigo syndromes resemble a huge burden in the community. Many drugs which are given in the acute phase against vertigo and nausea might lead to an impaired and prolonged vestibular compensation. The development of applicable therapeutic strategies requires a profound understanding of the mechanisms of structural central plasticity which contribute to vestibular compensation. This preclinical research project investigated microglial activation and reactive neurogenesis in a rat model after unilateral labyrinthectomy (UL). The adaptive neuronal changes during vestibular compensation were visualised *in vivo* by μ PET. Microglial activation was detected by the radio tracer [^{18}F]GE180. The new tracer [^{18}F]FLT was used to depict cerebral cellular proliferation rates. To evaluate the results of [^{18}F]FLT- μ PET, BrdU immunohistochemistry, the gold standard as marker of neurogenesis, was done on the matching time points. To analyse the functional contribution of the plasticity mechanisms, the symptoms nystagmus, postural asymmetry, head tilt and postural decompensation were determined in a clinical scoring on the correlating days. To assess a disturbance of the spatial working memory and locomotor behaviour, rats additionally underwent a behavioural test in a T-Maze three times a week.

In the second part of this study the TSPO-agonist etifoxine was used as therapeutic intervention to modulate microglial activation. From day 1 post UL rats received a daily intraperitoneal injection of 25 mg/kg etifoxine on seven consecutive days. As a comparison, animals of a sham-group obtained an equal amount of sodium chloride solution. To visualise changes in the longitudinal progression of microglial activation, both groups underwent weekly μ PET-Scans with [^{18}F]GE180. Vestibulo-ocular, vestibulo-spinal and locomotor symptoms

were evaluated by clinical scoring and an open field task.

In the study of plasticity, microglial activation was shown from day 1 post UL in the ipsilesional vestibular nucleus. The number of activated microglia reached a maximum on day 8 post UL and remained above baseline level until day 29. In the hippocampus, microglial activation increased bilaterally and reached a peak on day 22.

The acquisition by [¹⁸F]FLT- μ PET showed an increase in the cellular proliferation rate in the ipsilesional vestibular nucleus on day 3 post UL. During further compensation, neurogenesis declined and reached baseline standard within the examined timescale. Immunohistochemistry also assessed a reactive neurogenesis on day 3 post UL in the ipsilesional nuclei. There was an additional increase of neurogenesis rates on day 24, which was not detected by [¹⁸F]FLT- μ PET. The effect appeared on the ipsilesional side as well as contralesional. Animals of the sham-group did not show any neurogenesis in the ipsilesional nucleus, implicating a specific effect due to UL.

Findings in the [¹⁸F]FLT- μ PET suggested a longitudinal increase of hippocampal neurogenesis, particularly on the contralesional side. However, immunohistochemistry revealed a converse effect, showing a reduced cell proliferation rate. Hippocampal neurogenesis decreased in the UL- and in the sham-group. Presumably this was due to an unspecific reaction following surgical intervention.

In the T-Maze, rats of the UL-group had lower alternation rates and a higher amount of aborted trials. The almost random choice of the goal arm indicates an impaired spatial orientation. As the animals did not show any preferences concerning the side of the elected goal arm, the postural symptoms do not seem to have any impact on the chosen direction. The deficits of the spatial memory were partially compensated in the further course of vestibular compensation.

In the study of therapeutic intervention, nystagmus was completely compensated until day 8 post UL in both groups. The vestibular ocular motor symptoms are due to the early enclosed compensation not altered by a treatment with etifoxine. On days 15, 22 and 29 post UL, animals in the etifoxine-group significantly improved their postural asymmetry. Etifoxine ameliorated and accelerated the vestibulo-spinal compensation, especially in the subsequent course of disease. The investigation of locomotion and moving behaviour in the open field did not show any differences between groups, so etifoxine seems not to have an impact on the

locomotor deficits after unilateral vestibulopathy. After the onset of vestibular compensation on day 8, animals in the etifoxine-group stayed distinctly less in the centre of the open field than animals in the sham-group, which speaks for a more physiological behaviour (thigmotaxis).

The amount of activated microglia is strikingly increased in the sham-group compared to the etifoxine-group. Microglial activation was higher in the vestibular nuclei at all investigated points in time and for the hippocampus during later time points after UL in the sham-group. This confirms the hypothesis that the modulation of microglial activation by etifoxine starts during the first two weeks and further improves vestibular compensation. The effects could be due to an initially increased microglial activation, which leads to plasticity mechanisms which contribute to functional compensation. Microglia might have a positive effect on vestibular compensation by neuroprotective properties, supporting astrogliosis and neurogenesis or increasing neurosteroid synthesis. Persisting microglial activation can lead to pathological processes in the further course of disease. This could be prevented by an early initial increased activation of microglia through treatment with etifoxine.

In conclusion, this study demonstrates an adaptive neuroinflammation characterised by activated microglia and a reactive neurogenesis in the vestibular nuclei during central vestibular compensation of a unilateral vestibular deficit. Unilateral peripheral vestibular lesion induced a reduction of hippocampal neurogenesis, which was accompanied by transient deficits in spatial orientation. Because of discrepancies between the outcome of immunohistochemistry and μ PET, [^{18}F]FLT does not seem to be sensitive enough to visualise changes in neurogenesis rates in the model of unilateral vestibulopathy consistently. [^{18}F]GE180 was a sensitive surrogate marker for neuroinflammation. Therapeutic modulation of microglial activation through the TSPO-agonist etifoxine was depicted in μ PET. Etifoxine had positive effects on the vestibulo-spinal symptoms during the subsequent progression of vestibular compensation. It therefore possesses a therapeutic potential to support the functional recovery after unilateral peripheral lesions.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aitken P, Zheng Y, Smith PF. Ethovision™ analysis of open field behaviour in rats following bilateral vestibular loss. *J Vestib Res* 2017; 27: 89-101.

Aizawa K, Ageyama N, Yokoyama C, Hisatsune T. Age-Dependent Alteration in Hippocampal Neurogenesis Correlates with Learning Performance of Macaque Monkeys. *Exp Anim* 2009; 58: 403-7.

Aouad M, Charlet A, Rodeau JL, Poisbeau P. Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3 α -reduced neurosteroids. *Pain* 2009; 147: 54-9.

Arbusow V, Schulz P, Strupp M, Dieterich M, von Reinhardtstoettner A, Rauch E, Brandt T. Distribution of Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Geniculate and Vestibular Ganglia: Implications for Vestibular Neuritis. *Ann Neurol* 1999; 46: 416-9.

Arbusow V, Strupp M, Wasicky R, Horn AK, Schulz P, Brandt T. Detection of herpes simplex virus type 1 in human vestibular nuclei. *Neurology* 2000; 55: 880-2.

Arbusow V, Theil D, Strupp M, Mascolo A, Brandt T. HSV-1 Not Only in Human Vestibular Ganglia but Also in the Vestibular Labyrinth. *Audiology and Neurotology* 2001; 6: 259-62.

Bailey DL, Maisey MN, Townsend DW, Valk PE (2005) Positron emission tomography. Springer. 1-7; 19-23

Banati RB. Visualising Microglial Activation In Vivo. *Glia* 2002; 40: 206-17.

Bannwarth H, Kremer BP, Schulz A. Basiswissen Physik, Chemie und

Biochemie: Springer 2007: 150-47.

Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moysé E. In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 2005; 130: 75-90.

Beck R, Gunther L, Xiong G, Potschka H, Boning G, Bartenstein P, Brandt T, Jahn K, Dieterich M, Strupp M, la Fougere C, Zwergal A. The mixed blessing of treating symptoms in acute vestibular failure - evidence from a 4-aminopyridine experiment. *Exp Neurol* 2014; 261: 638-45.

Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* 2013; 81: 1079-88.

Bergquist F, Ludwig M, Dutia MB. Role of the commissural inhibitory system in vestibular compensation in the rat. *J Physiol* 2008; 586: 4441-52.

Berlit P. *Klinische Neurologie*: Springer 2011: 8-9.

Bouillot C, Bonnefoi F, Liger F, Zimmer L. A microPET comparison of the effects of etifoxine and diazepam on [¹¹C]flumazenil uptake in rat brains. *Neurosci Lett* 2016; 612: 74-9.

Boutin H, Murray K, Pradillo J, Maroy R, Smigova A, Gerhard A, Jones PA, Trigg W. ¹⁸F-GE-180: a novel TSPO radiotracer compared to ¹¹C-R-PK11195 in a preclinical model of stroke. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015; 42: 503-11.

Brandt T, Daroff RB. The Multisensory Physiological and Pathological Vertigo Syndromes. *Ann Neurol* 1980; 7: 195-203.

Brandt T, Steddin S. Current view of the mechanism of benign paroxysmal positioning vertigo: cupulolithiasis or canalolithiasis? *J Vestib Res* 1993; 3: 373-82.

Brandt T, Schautzer F, Hamilton DA, Bruning R, Markowitsch HJ, Kalla R, Darlington C, Smith P, Strupp M. Vestibular loss causes hippocampal atrophy and impaired spatial memory in humans. *Brain* 2005; 128: 2732-41.

Brandt T, Huppert D, Hecht J, Karch C, Strupp M. Benign paroxysmal positioning vertigo: a long-term follow-up (6-17 years) of 125 patients. *Acta Otolaryngol* 2006; 126: 160-3.

Brandt T, Dieterich M, Strupp M (2012) *Vertigo: Leitsymptom Schwindel*. Springer-Verlag GmbH

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2042-6.

Cameron HA, McKay RD. Adult Neurogenesis Produces a Large Pool of New Granule Cells in the Dentate Gyrus. *J Comp Neurol* 2001; 435: 406-17.

Campos-Torres A, Touret M, Vidal PP, Barnum S, de Waele C. The differential response of astrocytes within the vestibular and cochlear nuclei following unilateral labyrinthectomy or vestibular afferent activity blockade by transtympanic tetrodotoxin injection in the rat. *Neuroscience* 2005; 130: 853-65.

Campos Torres A, Vidal PP, de Waele C. Evidence for a microglial reaction within the vestibular and cochlear nuclei following inner ear lesion in the rat. *Neuroscience* 1999; 92: 1475-90.

Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Dolle F, Tavitian B. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [¹¹C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35: 2304-19.

Chen W, Cloughesy T, Kamdar N, Satyamurthy N, Bergsneider M, Liao L, Mischel P, Czernin J, Phelps ME, Silverman DH. Imaging Proliferation in Brain

Tumors with ^{18}F -FLT PET: Comparison with ^{18}F -FDG. *J Nucl Med* 2005; 46: 945-52.

Ching AS, Kuhnast B, Damont A, Roeda D, Tavitian B, Dolle F. Current paradigm of the 18-kDa translocator protein (TSPO) as a molecular target for PET imaging in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Insights Imaging* 2012; 3: 111-9.

Choi SH, Veeraraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, Sisodia SS. Non-Cell-Autonomous Effects of Presenilin 1 Variants on Enrichment-Mediated Hippocampal Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. *Neuron* 2008; 59: 568-80.

Choi SY, Kim HJ, Kim JS. Chasing dizzy chimera: Diagnosis of combined peripheral and central vestibulopathy. *J Neurol Sci* 2016; 371: 69-78.

Cnyrim CD, Newman-Toker D, Karch C, Brandt T, Strupp M. Bedside differentiation of vestibular neuritis from central "vestibular pseudoneuritis". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 458-60.

Courjon JH, Jeannerod M, Ossuzio I, Schmid R. The Role of Vision in Compensation of Vestibulo Ocular Reflex after Hemilabyrinthectomy in the Cat. *Exp Brain Res* 1977; 28: 235-48.

Curthoys IS, Halmagyi GM. Vestibular compensation. *Adv Otorhinolaryngol* 1999; 55: 82-110.

Cuthbert PC, Gilchrist DP, Hicks SL, MacDougall HG, Curthoys IS. Electrophysiological evidence for vestibular activation of the guinea pig hippocampus. *Neuroreport* 2000; 11: 1443-7.

Darlington CL, Smith PF. Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 313-25.

Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva OV, Liu XB, Pleasure DE, Deng W. A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 891-903.

De Lahunta A, Glass E. Vestibular System: Special Proprioception. In: *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*: Saunders Elsevier 2009: 324-8.

de Waele C, Campos Torres A, Josset P, Vidal PP. Evidence for reactive astrocytes in rat vestibular and cochlear nuclei following unilateral inner ear lesion. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 2006-18.

Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* 2006; 1: 7-12.

Dember WN, Fowler H. Spontaneous alternation behavior. *Psychol Bull* 1958; 55: 412-28.

Dickens AM, Vainio S, Marjamaki P, Johansson J, Lehtiniemi P, Rokka J, Rinne J, Solin O, Haaparanta-Solin M, Jones PA, Trigg W, Anthony DC, Airas L. Detection of Microglial Activation in an Acute Model of Neuroinflammation Using PET and radiotracers ¹¹C-(R)-PK11195 and ¹⁸F-GE-180. *J Nucl Med* 2014; 55: 466-72.

Dieringer N. 'Vestibular compensation': neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 97-129.

Dieterich M, Brandt T. Episodic vertigo related to migraine (90 cases): vestibular migraine? *J Neurol* 1999; 246: 883-92.

Dutheil S, Brezun JM, Leonard J, Lacour M, Tighilet B. Neurogenesis and astrogenesis contribution to recovery of vestibular functions in the adult cat following unilateral vestibular neurectomy: cellular and behavioral evidence.

Neuroscience 2009; 164: 1444-56.

Dutheil S, Escoffier G, Gharbi A, Watabe I, Tighilet B. GABA_A Receptor Agonist and Antagonist Alter Vestibular Compensation and Different Steps of Reactive Neurogenesis in Deafferented Vestibular Nuclei of Adult Cats. *The Journal of Neuroscience* 2013; 33: 15555-66.

Dutia MB. Mechanisms of vestibular compensation: recent advances. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 18: 420-4.

Eilles E (2016) Darstellung und therapeutische Modulation der zerebralen Plastizität nach bilateraler audio-vestibulärer Schädigung im Rattenmodell: Eine vergleichende [¹⁸F]FDG-μPET-Verhaltensuntersuchung

Ergorul C, Eichenbaum H. The Hippocampus and Memory for "What," "Where," and "When". *Learn Mem* 2004; 11: 397-405.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-7.

Etienne AS, Jeffery KJ. Path Integration in Mammals. *Hippocampus* 2004; 14: 180-92.

Fan Z, Calsolaro V, Atkinson RA, Femminella GD, Waldman A, Buckley C, Trigg W, Brooks DJ, Hinz R, Edison P. Flutriciclamide (¹⁸F-GE180) PET: First-in-Human PET Study of Novel Third-Generation In Vivo Marker of Human Translocator Protein. *J Nucl Med* 2016; 57: 1753-9.

Feil K, Böttcher N, Kremmyda O, Muth C, Teufel J, Zwergal A, Brandt T, Strupp M. Medikamentöse Therapiemöglichkeiten bei vestibulären Störungen, Nystagmus und zerebellären Ataxien. *Laryngo-Rhino-Otologie* 2018; 97: 14-23.

Ferzaz B, Brault E, Bourliaud G, Robert J-P, Poughon G, Claustre Y, Marguet F, Liere P, Schumacher M, Nowicki J-P, Fournier J, Marabout B, Sevrin M, George P, Soubrie P, Benavides J, Scatton B. SSR180575 (7-Chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand, Promotes Neuronal Survival and Repair. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 301: 1067-78.

Gacek RR, Khetarpal U, Schoonmaker J. Morphological and neurochemical correlates of vestibular compensation. *Auris Nasus Larynx* 1998; 25: 193-201.

Galle H, Haagen AVV. Ototoxicity of the antiseptic combination. *Veterinary Quarterly* 1986; 8: 56-60.

Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Steroids and Glial Cell Function. *Glia* 2006; 54: 485-98.

Girard C, Liu S, Cadepond F, Adams D, Lacroix C, Verleye M, Gillardin JM, Baulieu EE, Schumacher M, Schweizer-Groyer G. Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20505-10.

Girard P, Pansart Y, Gillardin JM. Preventive and curative effects of etifoxine in a rat model of brain oedema. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 655-61.

Glass EN, Cometta AM, DeLahunta A, Center SA, Kent M. Clinical and Clinicopathologic Features in 11 Cats with Cuterebra Larvae Myiasis of the Central Nervous System. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 365-8.

Goycoolea MV, Lundman L. Round Window Membrane. Structure Function and Permeability: A Review. *Microscopy research and technique* 1997; 36: 201-11.

Gratzner HG. Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science* 1982; 218: 474-5.

Gürkov R, Flatz W, Louza J, Strupp M, Krause E. In vivo visualization of endolymphatic hydrops in patients with Menière's disease: correlation with audiovestibular function. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011; 268: 1743-8.

Hall C, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology 1932; 6: 1-12.

Halmagyi GM, Curthoys IS. A clinical sign of canal paresis. *Arch Neurol* 1988; 45: 737-9.

Hamann KF, Lannou J. Dynamic Characteristics of Vestibular Nuclear Neurons Responses to Vestibular and Optokinetic Stimulation during Vestibular Compensation in the Rat. *Acta Otolaryngol Suppl* 1987; 445: 1-19.

Hamann KF, Reber A, Hess BJ, Dieringer N. Long-term deficits in otolith, canal and optokinetic ocular reflexes of pigmented rats after unilateral vestibular nerve section. *Exp Brain Res* 1998; 118: 331-40.

Hamann KF. Vestibuläre Kompensation: Grundlagen und klinische Bedeutung. *Hno* 2009; 57: 487-502.

Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1387-94.

Hannaford PC, Simpson JA, Bisset AF, Davis A, McKerrow W, Mills R. The prevalence of ear, nose and throat problems in the community: results from a national cross-sectional postal survey in Scotland. *Fam Pract* 2005; 22: 227-33.

Harten H-U. Physik für Mediziner: Springer 1985: 332-3.

Harvey RG, Harari J, Delauche AJ. Ohrkrankheiten bei Hund und Katze: Schattauer Verlag 2003: 145-6; 88-94; 206-10.

Heide T, Stachel G. Basics Physik: Elsevier, Urban&FischerVerlag 2009: 88-9.

Hirata Y, Gyo K, Yanagihara N. Herpetic Vestibular Neuritis: an Experimental Study. *Acta Otolaryngol* 1995; 519: 93-6.

Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab* 2010; 7: 47.

Hüfner K, Hamilton DA, Kalla R, Stephan T, Glasauer S, Ma J, Bruning R, Markowitsch HJ, Labudda K, Schichor C, Strupp M, Brandt T. Spatial Memory and Hippocampal Volume in Humans with Unilateral Vestibular Deafferentation. *Hippocampus* 2007; 17: 471-85.

Imamoto N, Momosaki S, Fujita M, Omachi S, Yamato H, Kimura M, Kanegawa N, Shinohara S, Abe K. [¹¹C]PK11195 PET imaging of spinal glial activation after nerve injury in rats. *NeuroImage* 2013; 79: 121-8.

Jaggy A. Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie: Schlütersche 2010: 372-83.

Karchewski LA, Bloechlinger S, Woolf CJ. Axonal injury-dependent induction of the peripheral benzodiazepine receptor in small-diameter adult rat primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 671-83.

Karlberg M, Hall K, Quickert N, Hinson J, Halmagyi GM. What Inner Ear Diseases Cause Benign Paroxysmal Positional Vertigo? *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 380-5.

Kattah JC, Talkad AV, Wang DZ, Hsieh YH, Newman-Toker DE. HINTS to Diagnose Stroke in the Acute Vestibular Syndrome. *Stroke* 2009; 40: 3504-10.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10409-14.

Kempermann G, Kuhn HG, Winkler J, Gage FH. Neue Nervenzellen für das erwachsene Gehirn. *Nervenarzt* 1998; 69: 851-7.

Kempermann G. Stem cells and neuronal development in the adult brain. Oxford, UK: Oxford University Press. in ES, et al.(2007) Ge the adult mouse brain. *Nature* 2005; 445: 3-17.

Kempermann G. *Adult Neurogenesis*: Oxford University Press, USA 2006: 3-17.

Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 127-32.

Kroenke K, Mangelsdorff AD. Common Symptoms in Ambulatory Care: Incidence, Evaluation, Therapy, and Outcome. *Am J Med* 1989; 86: 262-6.

Kruisz C, Hitzenberger R. *Physik verstehen: ein Lehrbuch für Mediziner und Naturwissenschaftler*: UTB 2011: 30.

Kuhn HG, Toda T, Gage FH. Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-of-Age Story. *J Neurosci* 2018; 38: 10401-10.

Lacor P, Gandolfo P, Tonon MC, Brault E, Dalibert I, Schumacher M, Benavides J, Ferzaz B. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res* 1999; 815: 70-80.

Lacour M, Dutheil S, Tighilet B, Lopez C, Borel L. Tell Me Your Vestibular Deficit, and I'll Tell You How You'll Compensate. *Annals of the N.Y. Academy of Sciences* 2009; 1164: 268-78.

Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 411-7.

Lee H, Sohn SI, Cho YW, Lee SR, Ahn BH, Park BR, Baloh RW. Cerebellar infarction presenting isolated vertigo: frequency and vascular topographical patterns. *Neurology* 2006; 67: 1178-83.

Lempert T, Neuhauser H. Epidemiology of vertigo, migraine and vestibular migraine. *Journal of Neurology* 2009; 256: 333-8.

Lenarz T, Boenninghaus H-G. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: Springer-Verlag 2012: 18-9.

Li HD, Li M, Shi E, Jin WN, Wood K, Gonzales R, Liu Q. A translocator protein 18 kDa agonist protects against cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 151.

Liere P, Pianos A, Oudinet J-P, Schumacher M, Akwa Y. Differential effects of the 18-kDa translocator protein (TSPO) ligand etifoxine on steroidogenesis in rat brain, plasma and steroidogenic glands: Pharmacodynamic studies. *Psychoneuroendocrinology* 2017; 83: 122-34.

Lindner M, Gosewisch A, Eilles E, Branner C, Krämer A, Oos R, Wolf E, Ziegler S, Bartenstein P, Brandt T, Dieterich M, Zwergal A. Ginkgo biloba Extract EGb 761 Improves Vestibular Compensation and Modulates Cerebral Vestibular Networks in the Rat. *Frontiers in Neurology* 2019; 10: 1-19.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 179-93.

Lorenz MD, Coates J, Kent M. Handbook of Veterinary Neurology-E-Book: Elsevier Health Sciences 2010: 39-45.

Lowrie M. Vestibular Disease: Anatomy, Physiology, and Clinical Signs. *Compendium (Yardley, PA)* 2012; 34: E1-E5.

Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 2000; 405: 951-5.

Mankoff DA, Shields AF, Krohn KA. PET imaging of cellular proliferation. *Radiol Clin North Am* 2005; 43: 153-67.

Mansfield PD. Ototoxicity in dogs and cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1990; 12: 331-7.

Merchant SN, Adams JC, Nadol JB, Jr. Pathophysiology of Menière's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol Neurotol* 2005; 26: 74-81.

Miller PW, Long NJ, Vilar R, Gee AD. Synthese von ^{11}C -, ^{18}F -, ^{15}O -und ^{13}N -Radiotracer für die Positronenemissionstomographie. *Angewandte Chemie* 2008; 120: 9136-72.

Mills CD, Bitler JL, Woolf CJ. Role of the peripheral benzodiazepine receptor in sensory neuron regeneration. *Mol Cell Neurosci* 2005; 30: 228-37.

Minor LB, Schessel DA, Carey JP. Menière's disease. *Curr Opin Neurol* 2004; 17: 9-16.

Nadol JB, Jr. Vestibular neuritis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 162-72.

Neuhauser HK. Epidemiology of vertigo. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 40-6.

Nguyen N, Fakra E, Pradel V, Jouve E, Alquier C, Le Guern ME, Micallef J, Blin O. Efficacy of etifoxine compared to lorazepam monotherapy in the treatment of patients with adjustment disorders with anxiety: a double-blind controlled study in general practice. *Hum Psychopharmacol* 2006; 21: 139-49.

Obermann M. Chronischer Schwindel aus neurologischer Sicht. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2013; 138: 269-74.

Oishi N, Talaska AE, Schacht J. Ototoxicity in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2012; 42: 1259-71.

Ollinger JM, Fessler JA. Positron-Emission Tomography. *IEEE Signal Processing Magazine* 1997; 14: 43-55.

Packard MG, McGaugh JL. Inactivation of Hippocampus or Caudate Nucleus with Lidocaine Differentially Affects Expression of Place and Response Learning. *Neurobiol Learn Mem* 1996; 65: 65-72.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 402-9.

Paterson JM, Short D, Flatman PW, Seckl JR, Aitken A, Dutia MB. Changes in protein expression in the rat medial vestibular nuclei during vestibular compensation. *J Physiol* 2006; 575: 777-88.

Penny WD, Friston KJ, Ashburner JT, Kiebel SJ, Nichols TE (2011) *Statistical parametric mapping: the analysis of functional brain images*. Elsevier

Peruch P, Borel L, Gaunet F, Thinus-Blanc G, Magnan J, Lacour M. Spatial performance of unilateral vestibular defective patients in nonvisual versus visual navigation. *J Vestib Res* 1999; 9: 37-47.

Platel JC, Stamboulian S, Nguyen I, Bordey A. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev* 2010; 63: 60-71.

Ravikumar B, Crawford D, Dellovade T, Savinainen A, Graham D, Liere P, Oudinet J-P, Webb M, Hering H. Differential efficacy of the TSPO ligands etifoxine and XBD-173 in two rodent models of Multiple Sclerosis.

Neuropharmacology 2016; 108: 229-37.

Reiß M. Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie: Springer Science & Business Media 2009: 155-8.

Rossmeisl JH. Vestibular Disease in Dogs and Cats. Veterinary Clinics: Small Animal Practice 2010; 40: 81-100.

Rueger MA, Backes H, Walberer M, Neumaier B, Ullrich R, Simard ML, Emig B, Fink GR, Hoehn M, Graf R, Schroeter M. Noninvasive Imaging of Endogenous Neural Stem Cell Mobilization *In Vivo* Using Positron Emission Tomography. J Neurosci 2010; 30: 6454-60.

Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 971-88.

Salomon F-V, Geyer H, Gille U. Anatomie für die Tiermedizin: Enke-Verlag in MVS Medizinverl. 2005: 624-7.

Schaefer K-P, Wehner H. Zur pharmakologischen Beeinflussung zentralnervöser Kompensationsvorgänge nach einseitiger Labyrinthausschaltung durch Krampfgifte und andere erregende Substanzen. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 1966; 254: 1-17.

Schaefer K, Meyer D. Compensation of vestibular lesions. In: Vestibular System Part 2: Psychophysics, Applied Aspects and General Interpretations: Springer 1974: 463-90.

Schicha H, Schober O. Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung: Schattauer Verlag 2013: 96-9.

Schlichter R, Rybalchenko V, Poisbeau P, Verleye M, Gillardin J. Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1523-35.

Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*: Springer-Verlag 2011: 716-7.

Schuknecht HF, Kitamura K. Second Louis H. Clerf Lecture. Vestibular neuritis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1981; 90: 1-19.

Schunk K, Averill JD. Peripheral vestibular syndrome in the dog: a review of 83 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983; 182: 1354-7.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1957; 20: 11-21.

Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancedda L. GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front Cell Neurosci* 2010; 4: 1-11.

Sherley JL, Kelly TJ. Regulation of Human Thymidine Kinase during the Cell Cycle. *J Biol Chem* 1988; 263: 8350-8.

Shields AF, Grierson JR, Dohmen BM, Machulla HJ, Stayanoff JC, Lawhorn-Crews JM, Obradovich JE, Muzik O, Mangner TJ. Imaging proliferation *in vivo* with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat Med* 1998; 4: 1334-6.

Shields AF. PET Imaging with ¹⁸F-FLT and Thymidine Analogs: Promise and Pitfalls. *J Nucl Med* 2003; 44: 1432-4.

Simon-O'Brien E, Gauthier D, Riban V, Verleye M. Etifoxine improves sensorimotor deficits and reduces glial activation, neuronal degeneration, and

neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation* 2016; 13: 203.

Smith PF, Curthoys IS. Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 1989; 14: 155-80.

Smith PF. Vestibular-hippocampal interactions. *Hippocampus* 1997; 7: 465-71.

Smith PF, Horii A, Russell N, Bilkey DK, Zheng Y, Liu P, Kerr DS, Darlington CL. The effects of vestibular lesions on hippocampal function in rats. *Prog Neurobiol* 2005; 75: 391-405.

Smith PF, Darlington CL, Zhen Y. The Effects of Complete Vestibular Deafferentation on Spatial Memory and the Hippocampus in the Rat: The Dunedin Experience. *Multisens Res* 2015; 28: 461-85.

Stackman RW, Herbert AM. Rats with lesions of the vestibular system require a visual landmark for spatial navigation. *Behav Brain Res* 2002; 128: 27-40.

Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 2004; 1: 14.

Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I. Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 142.

Strupp M, Arbusow V, Maag KP, Gall C, Brandt T. Vestibular exercises improve central vestibulospinal compensation after vestibular neuritis. *Neurology* 1998; 51: 838-44.

Strupp M, Arbusow V, Brandt T. Exercise and Drug Therapy Alter Recovery from Labyrinth Lesion in Humans. *Ann NY Acad Sci* 2001; 942: 79-94.

Strupp M, Zingler VC, Arbusow V, Niklas D, Maag KP, Dieterich M, Bense S,

Theil D, Jahn K, Brandt T. Methylprednisolone, Valacyclovir, or the Combination for Vestibular Neuritis. *N Engl J Med* 2004; 351: 354-61.

Strupp M, Brandt T. Leitsymptom Schwindel: Diagnose und Therapie. *Dtsch Arztebl* 2008; 105: 173-80.

Strupp M, Dieterich M, Brandt T. Periphere und zentrale vestibuläre Schwindelformen: Therapie und Verlauf. *Dtsch Arztebl* 2013; 110: 505-16.

Strupp M, Dieterich M, Zwergal A, Brandt T. Diagnosestellung und Therapieoptionen bei Schwindelsyndromen. *Nervenarzt* 2015; 86: 1277-90.

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J Neurocytol* 1992; 21: 185-97.

Tamura Y, Takahashi K, Takata K, Eguchi A, Yamato M, Kume S, Nakano M, Watanabe Y, Kataoka Y. Noninvasive Evaluation of Cellular Proliferative Activity in Brain Neurogenic Regions in Rats under Depression and Treatment by Enhanced [¹⁸F]FLT-PET Imaging. *J Neurosci* 2016; 36: 8123-31.

Theil D, Arbusow V, Derfuss T, Strupp M, Pfeiffer M, Mascolo A, Brandt T. Prevalence of HSV-1 LAT in Human Trigeminal, Genuate, and Vestibular Ganglia and Its Implication for Cranial Nerve Syndromes. *Brain Pathol* 2001; 11: 408-13.

Thomas WB. Vestibular Dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2000; 30: 227-49.

Tighilet B, Brezun JM, Sylvie GD, Gaubert C, Lacour M. New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 47-58.

Tritthart HA, DeVaney T. Physik und Biophysik für Mediziner: Schattauer 2011: 78-9.

Ugale RR, Sharma AN, Kokare DM, Hirani K, Subhedar NK, Chopde CT. Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats. *Brain Res* 2007; 1184: 193-201.

Varga B, Marko K, Hadinger N, Jelitai M, Demeter K, Tihanyi K, Vas A, Madarasz E. Translocator protein (TSPO 18kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells. *Neurosci Lett* 2009; 462: 257-62.

Venker-van Haagen A. HNO bei Hund und Katze: Hals, Nase, Ohren, Trachea und Bronchien: Schlütersche 2010: 8-9; 37; 45-6.

Verleye M, Schlichter R, Gillardin JM. Interactions of etifoxine with the chloride channel coupled to the GABA_A receptor complex. *Neuroreport* 1999; 10: 3207-10.

Verleye M, Pansart Y, Gillardin J. Effects of etifoxine on ligand binding to GABA_A receptors in rodents. *Neurosci Res* 2002; 44: 167-72.

Verleye M, Akwa Y, Liere P, Ladurelle N, Pianos A, Eychenne B, Schumacher M, Gillardin JM. The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82: 712-20.

Wadsworth H, Jones PA, Chau WF, Durrant C, Fouladi N, Passmore J, O'Shea D, Wynn D, Morisson-Iveson V, Ewan A, Thaning M, Mantzilas D, Gausemel I, Khan I, Black A, Avory M, Trigg W. [¹⁸F]GE-180: a novel fluorine-18 labelled PET tracer for imaging Translocator protein 18 kDa (TSPO). *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 1308-13.

Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychol Bull* 1976; 83: 482-504.

Wenk GL. Assessment of Spatial Memory Using the T maze. *Curr Protoc Neurosci* 2001; 8: 8.5B.1-7.

Wojtowicz JM, Kee N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 2006; 1: 1399-405.

Wolf L, Bauer A, Melchner D, Hallof-Buestrich H, Stoertebecker P, Haen E, Kreutz M, Sarubin N, Milenkovic VM, Wetzel CH, Rupprecht R, Nothdurfter C. Enhancing Neurosteroid Synthesis - Relationship to the Pharmacology of Translocator Protein (18 kDa) (TSPO) Ligands and Benzodiazepines. *Pharmacopsychiatry* 2015; 48: 72-7.

Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol* 2015; 36: 605-13.

Yeh TH, Herman P, Tsai MC, Tran Ba Huy P, Van den Abbeele T. A cationic nonselective stretch-activated channel in the Reissner's membrane of the guinea pig cochlea. *Am J Physiol* 1998; 274: C566-76.

Zenner HP. Gleichgewicht. In: *Neuro- und Sinnesphysiologie*. Schmidt F, Schaible HG, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2006: 312-27.

Zheng Y, Kerr DS, Darlington CL, Smith PF. Unilateral Inner Ear Damage Results in Lasting Changes in Hippocampal CA1 Field Potentials In Vitro. *Hippocampus* 2003; 13: 873-8.

Zheng Y, Darlington CL, Smith PF. Impairment and Recovery on a Food Foraging Task Following Unilateral Vestibular Deafferentation in Rats. *Hippocampus* 2006; 16: 368-78.

Zingler VC, Cnyrim C, Jahn K, Weintz E, Fernbacher J, Frenzel C, Brandt T, Strupp M. Causative Factors and Epidemiology of Bilateral Vestibulopathy in 255

Patients. *Ann Neurol* 2007; 61: 524-32.

Zwergal A, Schniepp R. Vestibuläre Kompensation. *Nervenheilkunde* 2010; 29: 648-53.

Zwergal A, Günther L, Brendel M, Beck R, Lindner S, Xiong G, Eilles E, Unterrainer M, Albert NL, Becker-Bense S, Brandt T, Ziegler S, la Fougère C, Dieterich M, Bartenstein P. *In Vivo* Imaging of Glial Activation after Unilateral Labyrinthectomy in the Rat: A [¹⁸F]GE180-PET Study. *Frontiers in Neurology* 2017; 8: 665.

Zwergal A, Kirsch V, Gerb J, Długaiczek J, Becker-Bense S, Dieterich M. Neurootologie: Grenzfälle zwischen Ohr und Gehirn. *Nervenarzt* 2018; 89: 1106-14.

IX. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Mentor, PD Dr. med. Andreas Zwergal, bedanken. Durch die gute Betreuung und seine klugen, konstruktiven und lehrreichen Ideen und Gespräche erlangte ich ein fundiertes Wissen über das Thema dieser Arbeit und wurde zur Weiterarbeit daran ermutigt.

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Betreuung und seine Vertretung an der tiermedizinischen Fakultät.

Ich danke Magdalena Lindner für die praktische und theoretische Einarbeitung, die für diese Arbeit nötig waren. Ebenfalls bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Versuchsplanung, sowie ihre Mitarbeit bei den Experimenten.

Ein großer Dank geht an meine Kollegin Christina Branner, die maßgeblich an der Versuchsplanung und -durchführung beteiligt war. Der fachliche Austausch und die gute Zusammenarbeit haben mich während dieser Arbeit sehr gestärkt.

Ich danke dem deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum für meine Anstellung und für die Finanzierung der Forschungsarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Bartenstein danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes in der Nuklearmedizin.

Ich danke unserer Tierhausleitung Dr. med. vet. Barbara Ungern-Sternberg für ihre Unterstützung und Organisation bei der Tierbetreuung, sowie für viele gute Ratschläge bezüglich der Versuchstiere.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Sibylle Ziegler für die klugen und hilfreichen Tipps und Ideen bei der μ PET-Datenauswertung, sowie für das Korrekturlesen.

Ein großer Dank geht an Rosel Oos für ihre Assistenz bei den μ PET-Scans, der Tierbetreuung und ihrer Hilfe bei den Arbeiten im Labor. Ebenfalls bedanke ich mich bei Karin Bormann-Giglmaier.

Ich bedanke mich bei Astrid Gosewisch und Maximilian Grosch für die Hilfe bei den Auswertungen der μ PET-Daten und ihre geduldige Beantwortung von interdisziplinären Fragen.

Für den wissenschaftlichen Austausch, die Unterstützung und das tolle Arbeitsklima bedanke ich mich bei Julia Brosch, Lena Kaiser, Henrike von Zimmermann, Alexandra Bläske, Mirjam Schleske und Karin Wind.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Jovica Ninkovic für die Gespräche und Ratschläge zu den Themen Neurogenese und BrdU. Ein besonderer Dank geht an Veronika Schwarz und ihre Kollegen im biomedizinischen Centrum für die praktische Anleitung und Hilfestellung bei der Immunhistologie.

Ich bedanke mich bei meiner Schwester Katrin Krämer, die diese Arbeit trotz mangelndem (tier-)medizinischen Fachwissens mit größter Mühe und Sorgfalt Korrektur gelesen hat. Ebenfalls geht ein Dank an Mareike Krämer.

Bei meinen Eltern, Ulrike und Helmut Krämer, bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Danke für den finanziellen Einsatz während des Studiums, wodurch mir diese Doktorarbeit ermöglicht wurde.

Ein besonderer, von Herzen kommender Dank geht an Thomas Becker, der in den letzten zwei Jahren immer für mich da war. Ohne die Unterstützung und aufmunternden Worte wäre das Schreiben dieser Arbeit kaum möglich gewesen.