

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Frau Prof. Heidrun Potschka

Angefertigt in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern
(Mentorin: Dr. med. vet. Roswitha Beck)

**Pharmakologische Einflüsse
auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen
nach einseitigem peripheren Schaden:
 μ PET – und Verhaltensanalysen
in einem Rattenmodell**

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

von
Lisa Katharina Maria Günther
aus Sigmaringen

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meinen Eltern und Jakob

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Schwindel	3
1.1	Definition und Epidemiologie	3
1.2	Vestibuläres System	4
1.2.1	Peripher: Anatomie und Funktion	4
1.2.2	Zentral: Vestibuläre Projektionen	6
1.3	Schwindelformen	9
1.3.1	Vestibulärer Schwindel	10
1.3.1.1	Allgemein	10
1.3.1.2	Peripher-vestibuläre Dysfunktion in der Veterinärmedizin	10
1.3.1.3	Peripherer vestibulärer Schwindel in der Humanmedizin	11
1.3.1.3.1	Benigne paroxysmale Lagerungsschwindel	12
1.3.1.3.2	Morbus Menière	13
1.3.1.3.3	Neuritis vestibularis	13
1.3.2	Nicht-vestibulärer Schwindel	14
2.	Vestibuläre Kompensation	16
2.1	Definition	16
2.2	Therapieansätze	17
2.2.1	Allgemein	17
2.2.2	N-Acetyl-DL-leucin	19
2.2.3	4-Aminopyridin	20
3.	Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	23
3.1	Funktionsprinzip und Aufbau	23
3.2	Signalverarbeitung	23
3.3	Herstellung von Radiopharmakon und Radionuklid	27
3.3.1	Das Radiopharmakon 2-Desoxy-2[¹⁸ F]fluor-D-glucose	28
3.3.2	Anreicherungsmechanismus von 2-Desoxy-2[¹⁸ F]fluor-D-glucose	29
3.4	μ-Positronen-Emissions-Tomographie – Translationale Wissenschaft	30
3.5	2-Desoxy-2[¹⁸ F]fluor-D-glucose in der Neurologie	31
4.	Tiermodell - unilaterale Labyrinthektomie	33
5.	Arbeitshypothese	35

III.	MATERIAL UND METHODEN	36
1.	Material	36
1.1	Chemikalien	36
1.2	Geräte	37
1.3	Programme	38
1.4	Lösungen	38
2.	Tiermodell	40
2.1	Versuchstiere und Haltung	40
2.2	Anästhesie und Analgesie	41
2.3	Chemische unilaterale Labyrinthektomie	41
2.3	Tötung und Gewebeentnahme	43
3.	Verhaltensanalyse	44
4.	Positronen-Emissions-Tomographie	46
4.1	PET-Scanner	46
4.2	Radiopharmakon	47
4.3	Durchführung	47
4.4	PET-Datenanalyse	48
4.4.1	Aufnahme der PET-Signale	48
4.4.2	Bildrekonstruktion	48
4.4.3	Coregistrierung und Normalisierung	49
5.	Herstellung der pharmakologischen Lösungen	53
5.1	N-Acetylleucin	53
5.2	4-Aminopyridin	53
6.	Versuchsaufbau der pharmakologischen Studien	54
6.1	Versuchsaufbau: N-Acetylleucin	54
6.2	Versuchsaufbau: 4-Aminopyridin	57
7.	Histologische Aufarbeitung	59
7.1	Herstellung von Gefrierschnitten	59
7.2	Kresylviolett-Färbung	59
8.	Statistische Auswertung	61
IV.	ERGEBNISSE	63
1.	Pharmakologisch unbeeinflusste vestibuläre Kompensation	64
1.1	Haltungstestung: Kompensation von posturaler Asymmetrie, Nystagmus, Torticollis und Elevation-Tail-Rotation	64

1.2	Cerebraler Glucosestoffwechsel während vestibulärer Kompensation	67
2.	Einfluss von N-Acetylleucin auf die vestibuläre Kompensation – Vergleich: Racemat und Enantiomere	70
2.1	Beschleunigte posturale Kompensation durch N-Acetyl-DL-leucin und N-Acetyl-L-leucin	70
2.2	Dosis-Wirkungs-Untersuchung von N-Acetyl-L-leucin	74
2.3	μ PET-Scan: Beeinflussung des cerebralen Glucosestoffwechsels durch N-Acetyl-L-leucin	77
3.	Einfluss von 4-Aminopyridin auf die vestibuläre Kompensation	83
3.1	Akuteffekt von 4-Aminopyridin auf posturale Asymmetrie	85
3.2	μ PET-Scan: Akuteffekt von 4-Aminopyridin auf den cerebralen Glucosestoffwechsel	86
3.3	Langzeiteffekt des 4-Aminopyridin auf die posturale Asymmetrie	87
3.4	μ PET-Scan: Langzeiteffekt von 4-Aminopyridin auf den cerebralen Glucosestoffwechsel	88
4.	Histologische Korrelation	89
V.	DISKUSSION	90
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	106
VII.	SUMMARY	109
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	111
IX.	ANHANG	131
X.	DANKSAGUNG	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[¹⁸ F]FDG	2-Desoxy-2[¹⁸ F]-Fluor-D-Glucose, Radiopharmakon
°C	Grad Celcius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
4-AP	4-Aminopyridin
Abb.	Abbildung
Aqua ad inject.	Aqua ad injectabilia
Aqua dest.	Aqua destillata
bpm	beats per minute, Schläge in der Minute
ca.	circa
d	day, Tag
D	N-Acetyl-D-leucin, D-Enantiomer von N-Acetyl-DL-leucin
d.h.	das heißt
DL	N-Acetyl-DL-leucin, Racemat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ETT	„Elevation-Tail-Rotation“-Test, Testverfahren zur Überprüfung propriozeptiver Einflüsse
EX	Emissionsmessung
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations, Vereinigung europäischer versuchstierkundlichen Gesellschaften
g	Gramm
h	hour, Stunde
HC	Healthy Controls, neutrale Vergleichsgruppe
HWZ	physikalische Halbwertszeit
i.c.	intrakardial
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
IQR	Interquartil Range, Interquartilsabstand, Begriff der Statistik
keV	Kilo-Elektronenvolt
kg	Kilogramm
L	N-Acetyl-L-leucin, L-Enantiomer von N-Acetyl-DL-leucin
log	logarithmisch
LOR	Line of response, Koinzidenzlinie
M	Molar
max.	maximal
MBq	Megabequerel
MD	Median
MeV	Mega-Elektronenvolt
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl der Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
OP	Operation
p	p-Wert, statistisches Signifikanzniveau
p.o.	per os
PBS	phosphat buffered saline, Phosphatpuffer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
rCMR _{glu}	regionale cerebrale Glucosemetabolismusrate
RH	relative Luftfeuchtigkeit
RT	Raumtemperatur
s.c.	sub cutan
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SPM	Statistical parametric mapping

T	Treshold, Schwellenwert
Tab.	Tabelle
TX	Transmissionsmessung
u.a.	unter anderem
UL	unilaterale Labyrinthektomie
v.a.	vor allem
VH	Verhalten
vs.	versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Schwindel in Folge einer vestibulären Läsion ist ein häufig beschriebenes Symptom in der Veterinär- und Humanmedizin. Unmittelbar nach dem akuten Ausfall eines Gleichgewichtsorgans wie bei der Neuritis vestibularis kommt es zu Drehschwindel, Gleichgewichtsstörungen, Nystagmus und vegetativen Begleitsymptomen. Fallneigung und unstimmmige Sinneswahrnehmungen hindern den Patienten daran, die alltäglichen Abläufe zu bewältigen. Bemerkenswerterweise reduziert sich die Schwindelsymptomatik allmählich innerhalb von Tagen bis Wochen. Dies resultiert teilweise aus der Rückbildung des peripheren Schadens, überwiegend jedoch aus zentralen vestibulären Kompensationsmechanismen.

Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Kompensation sind komplex und bislang unvollständig verstanden. Somatosensorische, vestibuläre, okulomotorische und cerebelläre Systeme sind in diesen dynamischen Prozess integriert. Das Verständnis dieser neurobiologischen Vorgänge stellt die Voraussetzung für eine zielgerichtete Therapie von Patienten mit vestibulärem Defiziten dar. Therapeutisch soll der natürliche Kompensationsmechanismus gefördert werden, damit möglichst schnell die Symmetrie im Gleichgewichtssystem wieder hergestellt wird. Zum aktuellen Zeitpunkt ist kein Medikament bekannt, welches in kontrollierten klinischen Studien nachweislich den natürlichen Mechanismus der Kompensation fördert.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen Erkenntnisse über die neurobiologischen Vorgänge der vestibulären Kompensation und deren medikamentöse Beeinflussung gewonnen werden. Das Modell der chemischen unilateralen Labyrinthektomie bei der Ratte bildet in dieser Arbeit die Grundlage für die Untersuchung klinischer, biochemischer und neurophysiologischer Folgen des Ausfalls eines Gleichgewichtsorgans und die Überprüfung pharmakologischer Therapien bei vestibulärem Defizit. Bei den zu untersuchenden Medikamenten handelt es sich um N-Acetylleucin (N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin, N-Acetyl-D-leucin) und 4-Aminopyridin. Zur Erforschung von Wirksamkeit und Wirkmechanismus wurden Verhaltensanalysen und hochauflösende μ -Positronen-Emissions-Tomographie in vivo kombiniert. Nach Injektion des Radiopharmakons 2-Desoxy-2[18F]fluor-D-glucose konnte anhand der cerebralen Glucosemetabolismusrate die Hirnaktivität der Ratte visualisiert und untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es den dynamischen Prozess der vestibulären Kompensation

longitudinal in vivo zu visualisieren und mit dem Verhalten zu korrelieren, den Einfluss von Pharmaka auf die vestibuläre Kompensation zu eruieren und deren möglichen Wirkmechanismus anhand von Hirnaktivierungsmustern zu beschreiben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Schwindel

1.1 Definition und Epidemiologie

Schwindel (lat. Vertigo) ist ein häufig beschriebenes Symptom in der Veterinär- und Humanmedizin (Lempert and Neuhauser, 2009, Kent et al., 2010). Die Bedeutung der subjektiven Empfindung des Schwindelgefühls und die Möglichkeit zur Gefühlsäußerung führen dazu, dass der Terminus „Schwindel“ überwiegend in der Humanmedizin Verwendung findet. In der Veterinärmedizin spricht man von der „vestibulären Erkrankung“ (Thomas, 2000).

Schwindel zählt zu den häufigsten Leitsymptomen in der klinischen humanmedizinischen Praxis und ist neben Kopfschmerzen das meist genannte neurologische Symptom (Neuhauser, 2009). Die 12-Monatsprävalenz besagt, dass jeder fünfte Erwachsene von einer Schwindelsymptomatik betroffen ist (Neuhauser, 2007). Die Lebensprävalenz liegt bei 20-30% (Strupp and Brandt, 2009). Schwindelbeschwerden nehmen mit dem Alter zu und zählen zu den häufigsten Leiden älterer Menschen (Davis, 1994).

Etymologisch lässt sich das Wort „Schwindel“ von „Schwinden“ ableiten – dem Schwinden der Sinne während eines ohnmachtsartigen Gefühls und dem damit verbundenen Verlust der Körpersicherheit im Raum (Füsgen, 2010).

Dieses vielgestaltige Symptom beschreibt prekäre Störungen der räumlichen Orientierung sowie irrtümliche Bewegungswahrnehmungen des Körpers oder der Umgebung (Brandt, 1999). Der Begriff „Schwindel“ summiert unterschiedliche Missempfindungen, von objektiven Gleichgewichtsstörungen bis hin zur subjektiven Beeinträchtigung der sonst harmonischen räumlich-dynamischen Relation zur Umwelt (Füsgen, 2010). Die gesundheitsbezogene Lebensqualität der betroffenen Personen ist erniedrigt (Neuhauser et al., 2006, Wersinger et al., 2013). Schwindelattacken wie Dreh-, Schwank- und Benommenheitsschwindel, Nystagmus, Fallneigung und/oder vegetative Begleitsymptome können Sekunden bis Minuten oder Stunden, sogar Tage bis Wochen andauern (Vignaux et al., 2012).

Den normalen Tagesablauf alleine zu bewältigen, ist in vielen Fällen kaum noch möglich (Lempert and Neuhauser, 2009).

Dabei stellt Schwindel keine einheitliche Krankheit dar, sondern ist Ausdruck multisensorischer und sensomotorischer Syndrome (Brandt and Daroff, 1980, Dieterich and Brandt, 2010). Die Symptomatik ist zurückzuführen auf widersprüchliche Informationen des vestibulären, cerebellären, oder okulomotorischen Organsystem, bzw. Kombination dieser und deren Abgleich mit der Motorik (Brandt et al., 2007). Hinzu kommen primär oder sekundär auftretende somatoforme Leiden (Best et al., 2006).

1.2 Vestibuläres System

1.2.1 Peripher: Anatomie und Funktion

Das Gleichgewichtsorgan der Säugetiere, auch Vestibularorgan oder Vestibularapparat genannt stellt den sechsten Sinn dar. Es ist als Teil des Innenohrs bilateral in den Felsenbeinpyramiden lokalisiert (Vignaux et al., 2012). Dieses Sinnesorgan ist zuständig für die Orientierung im Raum, Regulation der Körperhaltung und Stabilisierung des Blickes sowie die Wahrnehmung von Beschleunigung (Angelaki and Cullen, 2008).

Das Vestibularorgan ist ein kompliziert strukturiertes Hohlraumsystem (Dieterich and Brandt, 2001). Dieses wird von einer knöchernen Kapsel, dem knöchernen Labyrinth, umgrenzt. Darin befindet sich ein membranöses Schlauchsystem, das häutige Labyrinth, welches mit einer viskösen kaliumreichen Flüssigkeit, der Endolymphe, gefüllt ist. Dessen Fixierung erfolgt durch Bindegewebsfasern an der knöchernen Kapsel. Den Raum zwischen knöchernem und membranösem Labyrinth füllt die Perilymphe, eine kaliumarme, dem Liquor cerebrospinalis, ähnliche Flüssigkeit (Benninghoff and Drenckhahn, 2012).

Das Labyrinthsystem lässt sich funktionell in zwei Abschnitte gliedern: 1. den Vorhof (Vestibulum) zusammen mit den drei Bogengängen (Canales semicirculares), welche Sinnesepithelien für den Gleichgewichtssinn besitzen. 2. die Schnecke (Cochlea), welche dem auditiven System zugehörig ist und der Hörwahrnehmung dient (Angelaki and Cullen, 2008) (Abb.1).

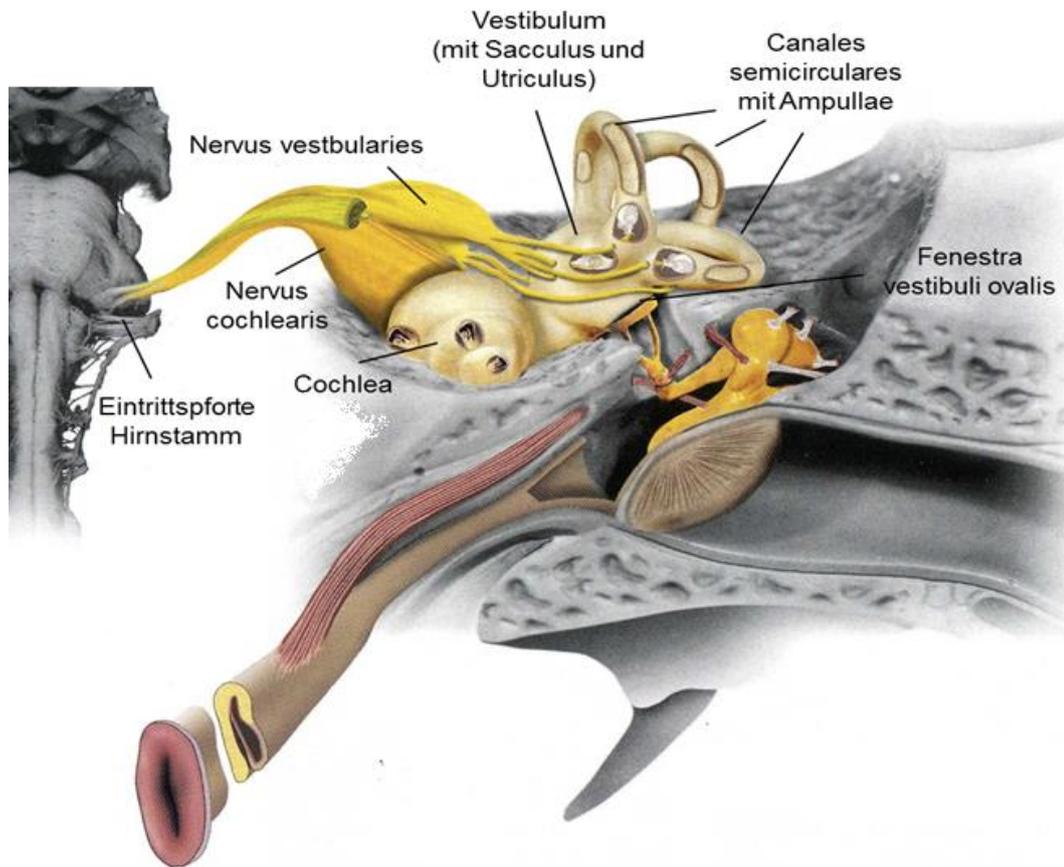


Abb. 1: Peripheres vestibuläres System: Hör- und Gleichgewichtsorgan (Leblanc, 1998)

Das knöcherne Labyrinth steht an seinem Vestibulum durch das ovale Fenster mit dem Mittelohr in Verbindung. Drei knöcherne Gangsysteme stehen orthogonal zueinander, den drei Raumebenen entsprechend (Leblanc, 1998). Das membranöse Labyrinth beinhaltet das eigentliche Sinnesorgan. Innerhalb des Vestibulums befinden sich nahezu senkrecht zueinander stehende sackartige Ausbuchtungen, der Utriculus und der Sacculus. Diese besitzen spezifische Rezeptoren, sogenannte Maculaorgane, welche lineare Beschleunigungen und Schwerkraft wahrnehmen. Dabei registriert der Utriculus die horizontale, der Sacculus die vertikale Beschleunigung (Purves et al., 2001). Die Macula ist eine Gallertmasse, in der die Sinneshaare eingebettet sind. Dieser aufgelagert sind mikroskopisch kleine Steinchen aus kristallinem Kalziumkarbonat, welche auch als Otholiten bezeichnet werden. Bei Beschleunigung bewegen diese durch ihre Massenträgheit die gallertige Masse und reizen dadurch die dort eingelagerten Sinneshaarzellen (Platt and Popper, 1981).

Die drei orthogonalen membranösen Bogengänge münden in den Utriculus und besitzen jeweils an ihrer Mündungsstelle eine als Ampulle bezeichnete Erweiterung. In dieser befindet sich die Cupula mit den Haarsinneszellen, zur Perzeption von Rotationsbewegungen (Angelaki and Cullen, 2008). Die Massenträgheit der Endolymphe führt durch Drehbewegungen zu einer Auslenkung der Haarzellen, welche sich in der Cupula befinden. Durch die mechanische Reizung der Haarzellen wird die Reizinformation an den Nervus vestibularis weitergeleitet (Ernst and Basta, 2011).

1.2.2 Zentral: Vestibuläre Projektionen

Der Nervus vestibularis ist der Gleichgewichtsanteil des VIII. Hirnnerven (Nervus vestibulocochlearis). Er tritt am Kleinhirnbrückenwinkel in den Hirnstamm ein. Seine bipolaren Nervenzellkörper befinden sich im Ganglion vestibulare, am Boden des inneren Gehörgangs. Seine Primärafferenzen erhält der Nervus vestibularis von den Sinneszellen des Sacculus, Utriculus und der Bogengänge. Über diese zentralen Fortsätze wird die Reizinformation ipsilateral in ein Kerngebiet vestibulärer Neurone (Nuclei vestibulares) weitergeleitet. Dieses befindet sich ventral des IV. Ventrikels in der Pons (Benninghoff and Drenckhahn, 2012). Ein kleiner Teil der vestibulären Projektion verläuft direkt in das Vestibulocerebellum, den Gleichgewichtsanteil des Kleinhirns (Abb. 2) (Trepel, 1999).

Ein bedeutender Teil der vestibulären Verschaltung ist die Kontrolle der Augenbewegung, die Okulomotorik. Projektionen gelangen über okulomotorische Hirnstammkerne ohne Beteiligung des Cortex zu den Augenmuskelkernen und kontrollieren die Blickstabilisierung (Cullen and Sadeghi, 2008). Dieser vestibulo-okuläre Reflex ermöglicht es, mit dem Auge Gegenstände zu verfolgen, indem mit den Augen die dem Körper entgegengesetzte Bewegung durchgeführt wird (Buttner and Buttner-Ennever, 1988).

Sowohl von den Vestibulariskernen als auch direkt vom Labyrinth ziehen Afferenzen zum Kleinhirn, zum Vestibulocerebellum. Dieses besteht aus den Strukturen Nodulus, zentrale Uvula, Flocculus und Paraflocculus. Vom Vestibulocerebellum verlaufen wiederum Projektionen zum vestibulären Kernkomplex (Meng et al., 2014). Die Fasern bilden einen äußerst präzisen Regelkreislauf motorischer Bewegungsabläufe (Kammermeier et al., 2009). Dieser stetige Informationsaustausch ist für die Stützmotorik, die Körperhaltung betreffend sowie für richtungsorientierte Zielbewegungen essentiell. Das Kleinhirn reguliert vor allem die Feinmotorik und hemmt die Grobmotorik. Dessen direkte Verbindung zum Vestibularapparat hat für das Gleichgewicht eine besondere Bedeutung (Cullen and Sadeghi, 2008).

Durch die Verbindungen ins Rückenmark werden visuelle und vestibuläre Informationen in der Motorik umgesetzt. Die speziellen überwiegend afferenten Nervenfasern verlaufen in drei separaten Bahnen, den Trunci vestibulospinales. Die Innervation der Motoneurone des Bewegungsapparates dient der Aufrechterhaltung des Körpers. Sie aktivieren die Flexoren und hemmen die Extensoren des Bewegungsapparates. So wird z.B. durch Kippen der Standunterlage der vestibuläre Apparat gereizt, was zu den zweckmäßigen Korrekturbewegungen, der Streckung von Arm und Oberschenkel auf der Tal- und Beugung der Extremitäten auf der Bergseite, führt. (Stoll et al., 2004, Benninghoff and Drenckhahn, 2012).

Die vestibulären Nuclei beider Hemisphären stehen, mit Ausnahme des lateralen Areals, über Hirnstammkommissuren miteinander in Verbindung. Durch hemmende und erregende Einflüsse fungieren sie selbstregulierend und sind in der Lage, bilaterale Informationen in Übereinstimmung zu bringen (Smith and Curthoys, 1989, Bergquist et al., 2008).

Des Weiteren gelangen vestibuläre Informationen zum Thalamus, welche von dort weiter in spezifische Cortexareale geleitet werden. Der Thalamus ist das

Relaiszentrum vestibulärer Bahnen (Zwergal et al., 2009), wobei der posterolaterale Anteil des Thalamus eine Schlüsselrolle der funktionellen Verarbeitung vestibulärer Informationen darstellt (Dieterich and Brandt, 2008). Zugleich erhält das Relaiszentrum cerebellär-vestibuläre Informationen und dient letztlich der Bewusstwerdung der Körperlage und Bewegung. Er ist der sensorische Anteil des vestibulären Systems (Trepel, 1999).

Da vestibuläre Reflexe schnell und plötzlich, ohne Verzögerung durch Überlegung ablaufen müssen, projizieren die Vestibulariskerne direkt in die genannten Regionen, ohne eine vorherige Umschaltung in Großhirnarealen zu durchlaufen. Dies erklärt, warum vestibuläre Reaktionen des Körpers unbewusst geschehen und erst bei einem inhaltlichen Konflikt der Informationsverarbeitung multisensorischer Afferenzen die Gleichgewichtsregulierung unzureichend ist (Ernst and Basta, 2011).

Auf Grund der stark konvergierenden und multimodalen zentralen Verarbeitung von Informationen unterscheidet sich das vestibuläre System erheblich von anderen Organsystemen. Seine tägliche Funktion reicht von einfachen Reflexen bis hin zur Wahrnehmungs- und Bewusstseinssebene (Angelaki and Cullen, 2008).

1.3 Schwindelformen

Hinter der unspezifischen, subjektiven Empfindung „Schwindel“ verbergen sich unterschiedliche Syndrome und Erkrankungen. Eine ätiologische Klärung ist für eine adäquate Therapie sowohl beim Tier als auch beim Menschen unerlässlich (Brandt and Daroff, 1980, Brandt et al., 2009, Kent et al., 2010). Eine Gruppierung nach anatomischen Gesichtspunkten ist ebenso sinnvoll wie eine Unterteilung nach der Art, Dauer und Auslösbarkeit des Schwindels.

Im Rahmen dieser Arbeit ist der Fokus auf vestibuläre Läsionen gelegt, daher wurde eine Unterteilung in vestibuläre, das Gleichgewichtsorgan betreffend und nicht-vestibuläre Schwindelerkrankungen vorgenommen.

1.3.1 Vestibulärer Schwindel

1.3.1.1 Allgemein

Vestibulärer Schwindel zählt zu den häufigsten Schwindelformen und hängt mit einer direkten oder indirekten Störung des Gleichgewichtsorgans zusammen (Neuhauser, 2009). Vestibuläre, visuelle und propriozeptive Afferenzen korrelieren nicht adäquat miteinander. Eine Störung der Raumorientierung, Blickstabilisierung und Körperhaltung ist die Folge (Brandt et al., 2013). Die Ursache des gerichteten Schwindels liegt entweder im Bereich des Labyrinths, des N. vestibularis oder in zentral-vestibulären Bahnen. Diese erstrecken sich von den Vestibulariskernen des kaudalen Hirnstamms bis hin zum Cerebellum, Thalamus und zur vestibulären Cortex. Sie sind zuständig für Informationsverarbeitung der Sinneseindrücke (Dieterich and Brandt, 2008, Rossmesl, 2010).

Befindet sich die Läsion im Labyrinth oder im Nervus vestibularis, spricht man von einem „peripher-vestibulären“ Schwindel. Vestibuläre Störungen, welche den Verarbeitungsprozess betreffen, also zentrale neurologische Bahnen, werden als „zentral-vestibuläre“ Syndrome klassifiziert (Stoll, 2001, Grätzel von Grätz, 2011).

1.3.1.2 Peripher-vestibuläre Dysfunktion in der Veterinärmedizin

Die einseitige vestibuläre Erkrankung führt bei Caniden und Feliden zu einer typischen Symptomatik, gekennzeichnet durch eine gerichtete schiefe Kopfhaltung (Torticollis), Nystagmus sowie Fallen, Rollen und Zirkulieren zur betroffenen Seite (Rossmesl, 2010). Dabei kann die Ausprägung motorischer Imbalancen und posturaler Asymmetrien unterschiedliche Ausmaße annehmen. Eine Differenzierung zwischen peripherem und zentralem Schaden hat prognostischen Wert, wobei bei peripheren Schäden eine günstigere Prognose in Hinblick auf den Therapieerfolg besteht (Kent et al., 2010).

Die häufigste Erkrankung mit unilateraler peripherer vestibulärer Symptomatik ist die Otitis Media und/oder Otitis Interna, welche bei Caniden fast 50% der klinisch vorgestellten vestibulären Störungen ausmacht (Chrisman, 1980). In 50 bis 80% der Fälle ist die Otitis Media Folge der chronischen Otitis Externa. Therapeutisches Mittel der Wahl ist die Langzeitantibiose in Kombination mit einer vorhergehenden Ohrspülung. Eventuell ist die Bulla-Osteotomie oder die totale Ohrkanalresektion vonnöten (Rossmesl, 2010).

Das idiopathische vestibuläre Syndrom gilt als die zweithäufigste Ursache peripherer vestibulärer Erkrankungen des Hundes (Kent et al., 2010). Es tritt jedoch auch bei Katzen auf. Kennzeichnend ist das akute Einsetzen der Schwindelsymptomatik. Obwohl Hunde jeden Alters betroffen sein können, gelten Hunde über 5 Jahren als prädisponiert. Bei Katzen ist die Erkrankung altersunabhängig, tritt dafür gehäuft bei Freigängern auf (Rossmeisl, 2010). Die Diagnose erfolgt durch den Ausschluss anderer möglicher Erkrankungen derselben Symptomatik. Die ätiologische Ähnlichkeit zum klinischen Bild der humanen Neuritis vestibularis lässt als Ursache eine virale Infektion vermuten. Nach drei bis fünf Tagen wird eine Besserung der Symptomatik beobachtet, nach zwei bis drei Wochen tritt die Gesundung ein (vgl. II.2). Das therapeutische Ziel ist neben der anfänglich symptomatischen Therapie die Förderung der zentralen Kompensation. Studien belegen, dass Tiere, die sich viel bewegen, schneller kompensieren (Brandt et al., 1999, Rossmeisl, 2010).

1.3.1.3 Peripherer vestibulärer Schwindel in der Humanmedizin

Fünf von Hundert Erwachsenen erkranken jährlich an der typischen Schwindelsymptomatik (Neuhauser, 2009). Diese ist geprägt von akutem, über mehrere Tage andauernden Dreh- und Lagerungsschwindel, rezidivierendem Schwindel mit Übelkeit und Erbrechen, Gang- und Standunsicherheit mit Fallneigung sowie visuellen Scheinbewegungen und Nystagmus (Strupp et al., 2001a).

Periphere vestibuläre Schwindelsyndrome werden in der Humanmedizin unterteilt in 1. eine inadäquate einseitige paroxysmale Reizung des Labyrinths oder des Nervus vestibularis im Sinne einer Hemmung oder Erregung und 2. in eine ein- oder beidseitige Läsion bis hin zum totalen Ausfall des peripheren vestibulären Systems (Brandt et al., 2008). Die drei häufigsten peripher-vestibulären Schwindelformen sind der benigne paroxysmale Lagerungsschwindel, die Menière'sche Krankheit und die Neuritis vestibularis. Klinische Daten der Schwindelambulanz der Ludwig-Maximilians-Universität und des Deutschen Zentrums für Schwindel und Gleichgewichtsstörungen (DZSG) belegen relative Häufigkeiten der genannten drei Syndrome von 17%, 10% und 8% aller peripheren Schwindeldiagnosen (Strupp et al., 2013a).

1.3.1.3.1 Benigne paroxysmale Lagerungsschwindel

Der benigne paroxysmale Lagerungsschwindel ist die häufigste Ursache rezidivierender vestibulärer Schwindelanfälle (von Brevern et al., 2007). Das Syndrom kann in jedem Alter auftreten, wobei das Hauptmanifestationsalter über 50 Jahren liegt. 30% der Bevölkerung über 70 haben bereits mindestens einen Anfall erlebt (Neuhauser, 2007).

Charakteristisch sind anhaltende Drehschwindelattacken von 20 bis 30 Sekunden verbunden mit visuellen Scheinbewegungen, Oszillopsien sowie Nystagmus, teilweise vergesellschaftet mit Übelkeit und Erbrechen (Brandt et al., 2006). Ausgelöst wird der Schwindel durch Kopf- und Körperlageänderung und schnelle Liege-Sitz-Manöver. Als Grundlage des gutartigen Lagerungsschwindels wird, der Kanalthiasistheorie zufolge, die pathologische Ablagerung frei beweglicher Steinchen in der Endolymphe der Bogengänge im Innenohr gesehen. Die Kanalthiasis stellt die Bildung von Kalziumkarbonkristallen abgesprengter Otolithenpartikel dar, welche sich im Lumen des Bogengangs bewegen und dieses fast vollständig ausfüllen können (Brandt and Steddin, 1993, Hain et al., 2005). Durch schnelle Kopf-, Hinlege- oder Bückbewegungen werden diese Partikel in Bewegung versetzt und erzeugen einen Sog der Endolymphe, welcher die Bogengangsrezeptoren reizt. Irreführende Informationen, welche nicht mit der visuellen Wahrnehmung übereinstimmen und zu einem vestibulären *missmatch* führen, werden an das Gehirn weitergeleitet und bedingen den Lagerungsschwindel. 90% der Attacken sind idiopathischer Natur, können jedoch auch sekundär auf vorangegangene Schädel-Hirn-Traumata, Neuritis vestibularis, Morbus Menière, Operationen oder eine längere Bettruhe zurückgeführt werden (Karlberg et al., 2000).

Dieses gutartige, aber äußerst unangenehme Schwindelsyndrom verschwindet oftmals spontan innerhalb von Tagen bis Wochen, teilweise können sich die Attacken jedoch auch über Jahre erstrecken. Die Behandlung ist unproblematisch und erfolgt durch spezielle physikalisch-medizinische Befreiungsmanöver, wobei gezielte Kopf- und Lagerungsrotationen die Bogengänge von den Otolithen befreien (von Brevern et al., 2004, Strupp, 2008). Die Rezidivrate liegt bei 50%, wobei diese im ersten Jahr am größten ist (Neuhauser, 2007).

1.3.1.3.2 Morbus Menière

Die Menière'sche Krankheit ist gekennzeichnet durch rezidivierende Schwindelattacken von 20 Minuten Dauer oder länger, verbunden mit einer Hörsymptomatik, welche einen Tinnitus, Hörminderung und Druckgefühl auf einem Ohr beinhaltet. Die Erkrankung beginnt meist einseitig. 50% der Betroffenen entwickeln jedoch im Krankheitsverlauf einen beidseitigen Morbus Menière (Schaaf, 2012). Auch nach Abklingen der Akutsymptomatik bleibt das geminderte Hörvermögen oftmals bestehen (Strupp and Brandt, 2008).

Die Ursache ist eine Produktions-, oder Resorptionsstörung der Endolymphe des häutigen Labyrinths. Durch den erhöhten Druck kommt es zu einem endolymphatischen Hydrops, welcher zu periodisch auftretenden Rupturen der endolymphatischen Membran führt (Gurkov et al., 2013b). Dies bedingt einen ungerichteten Austausch kaliumreicher Endo- und kaliumarmer Perilymphe. Die Folge ist eine inadäquate Reizung des Gleichgewichtsnerven und führt somit zur charakteristischen anfallsartigen Schwindelsymptomatik (Minor et al., 2004, Strupp and Brandt, 2008, Brandt et al., 2013).

Das primäre Ziel der Therapie ist - neben der symptomatischen Behandlung - die Senkung der Frequenz der Schwindelattacken, um somit progrediente vestibulocochleäre Defizite aufzuhalten (Minor et al., 2004). Transtympanale Instillation von Gentamicin, Steroiden und eine Langzeitgabe von Betahistinhydrochloriden werden diskutiert (Strupp et al., 2008, Gurkov et al., 2013a). Andererseits soll der Endolymphhydrops prophylaktisch verhindert werden, zum Beispiel durch salzarme Ernährung (Brandt et al., 2013). Trotz der hohen Prävalenz und vieler publizierter Studien konnte bislang hierzu keine effektive Therapie nachgewiesen werden (Minor et al., 2004).

1.3.1.3.3 Neuritis vestibularis

Der akute einseitige Ausfall des Gleichgewichtsorgans, auch als Neuritis vestibularis oder unilaterale periphere Vestibulopathie bezeichnet, ist die dritt häufigste Form des peripher-vestibulären Schwindels und tritt meist im Alter von 30-60 Jahren auf. Die Inzidenz liegt bei 3,5 pro 100.000 (Sekitani et al., 1993).

Die Betroffenen leiden an heftigem, akut einsetzendem und über mehrere Tage bis Wochen anhaltenden Drehschwindel mit Oszillopsien. Vergesellschaftet sind Gang-

und Standunsicherheiten mit Fallneigung zur läsierten Seite, vegetative Begleitsymptomatik wie Übelkeit und Erbrechen und horizontaler rotierender Spontannystagmus zur gesunden Seite (Walker, 2009).

Als pathologische Grundlage der Neuritis vestibularis wird eine virale Infektion mit dem Herpes-simplex-Typ-1-Virus vermutet (Yasushi Furuta et al., 1993). Autoptische Studien belegen diese Theorie durch den Nachweis viraler DNA in vestibulären Ganglien mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Schulz et al., 1998).

Die einseitige, periphere vestibuläre Schädigung führt zu einer Tonusimbalance, einem Ungleichgewicht zwischen dem intakten und läsierten Labyrinth der Gleichgewichtsorgane, was den Schwindel bedingt (Strupp et al., 2001a). Die anfänglich heftige Symptomatik bessert sich jedoch innerhalb weniger Tage und verschwindet im weiteren zeitlichen Verlauf fast vollständig (Hamann, 2009). Dieses Phänomen ist zurückzuführen auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen (Hamann, 2009, Dutia, 2010). Das Verständnis dieser Mechanismen ist von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche Therapie (siehe II.2.2).

Zusätzlich agieren das kontralaterale vestibuläre System, somatosensorische sowie visuelle Afferenzen, um den Funktionsausfall zu substituieren (Brandt et al., 2013).

Als wichtigstes Therapieprinzip wird die Förderung der zentralen vestibulären Kompensation propagiert. Um den natürlichen Kompensationsdruck nicht zu unterdrücken, soll die symptomatische Therapie der akuten Phase nicht länger als drei Tage erfolgen (Strupp, 2008).

1.3.2 Nicht-vestibulärer Schwindel

Zu den Schwindelerkrankungen nicht-vestibulärer Genese gehören physiologische Schwindelsyndrome wie der Höhenschwindel und die Bewegungskrankheit bedingt durch gerichtete oder ungerichtete Beschleunigung (Bles et al., 1980). Des Weiteren existieren psychogene Schwindelformen (Eckhardt-Henn et al., 1997). Die häufigste psychogene Störung ist der phobische Schwankschwindel, der in psychosomatischer Ausprägung als Ausdruck depressiven Verhaltens bekannt ist (Nedzelski et al., 1986). Pathologische Veränderungen anderer organischer Strukturen wie visueller oder somatosensorischer Systeme sowie metabolische Veränderungen und deren Beeinflussung durch Pharmaka, können sich in

uncharakteristischer Symptomatik der Gleichgewichtsstörung manifestieren (Brandt et al., 2013). Als weitere häufige Ursache von Schwindelsyndromen nicht-vestibulärer Genese gelten kardiovaskuläre Erkrankungen (Jeon et al., 2013).

2. Vestibuläre Kompensation

2.1 Definition

Im medizinischen Verständnis beschreibt der Begriff „Kompensation“ das Ausgleichen oder Substituieren einer teilweise oder vollständig verlorengegangenen Organfunktion. Die „vestibuläre Kompensation“ ist ein Phänomen der cerebralen Plastizität als Antwort auf die vestibuläre Störung und dient der funktionellen Kompensation trotz persistierendem peripher-vestibulären Defizit (Darlington et al., 1991). Das Kompensationsvermögen ist ein repräsentatives Beispiel für neuronale Plastizität (Vidal et al., 1998, Straka et al., 2005, Dutheil et al., 2013).

Die Voraussetzung für ein funktionsfähiges vestibuläres System besteht in einem Tonusgleichgewicht zwischen dem linken und dem rechten vestibulären Kerngebiet im Hirnstamm sowie deren Afferenzen (Abb. 3 a) (Ris and Godaux, 1998). Dabei stehen die Vestibulariskerne direkt über Typ-I-Neurone und indirekt über Interneurone in einem sich gegenseitig hemmenden und aktivierenden Verhältnis (Hamann, 2009).

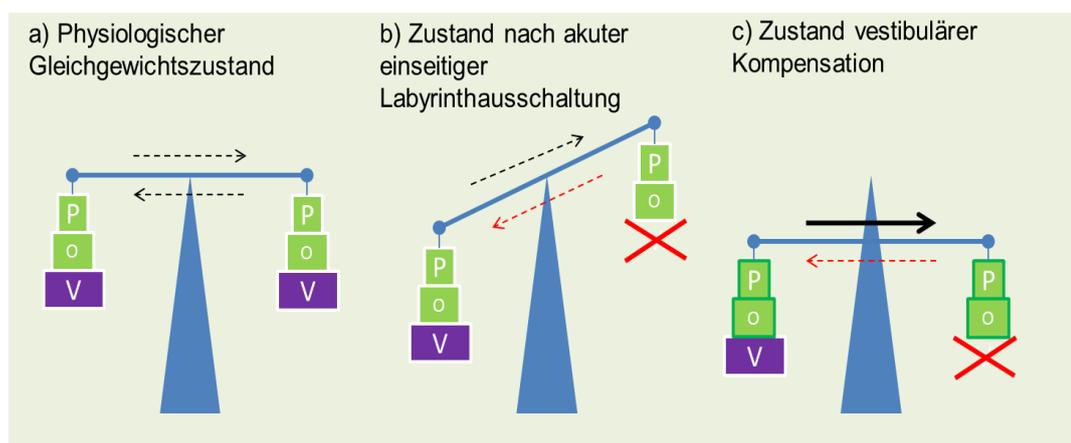


Abb. 3: Waagemodell zur vestibulären Kompensation (in Anlehnung an Hamann, 2009), *P* propriozeptive Afferenzen, *O* Optische Afferenzen, *V* Vestibuläre Afferenzen

Die akute einseitige Schädigung eines Vestibularorgans führt zu einer heftigen Schwindelsymptomatik (Precht et al., 1966). Diese weitreichenden neurobiologischen Anzeichen sind Folge eines Ungleichgewichts zwischen intaktem und läsiertem Labyrinth der Gleichgewichtsorgane (Abb. 3 b). Die sensorische Multimodalität ist nicht mehr stimmig (Trepel, 1999). Innerhalb der ersten zwei Wochen nach einseitiger Funktionseinbuße reduziert sich die Intensität der Beschwerden bis hin zur vollständigen Reduktion der Ausfallsymptome (Peusner et al., 2009). Diese Regeneration ist nur teilweise auf die Wiederherstellung der peripheren Läsion zurückzuführen. Überwiegend basiert dies auf dem Ausgleichen der vestibulären Tonusimbalance, dem Mechanismus der zentralen vestibulären Kompensation (Strupp et al., 2001a). Das kontralaterale gesunde Vestibularorgan hat die Fähigkeit, die Funktion des ausgefallenen Organs teilweise zu übernehmen. Entsprechend der Balance zwischen linkem und rechtem Labyrinth im gesunden physiologischen Zustand stellt sich während der Kompensation ein neues Tonusgleichgewicht, aber auf niedrigerem Niveau ein (Abb. 3 c). Der Hirnstamm ist gefordert, zu lernen mit der Information lediglich eines Vestibularorgans auszukommen. Die Kompensation stellt einen dynamischen Prozess dar, welcher nicht isoliert im vestibulären System abläuft, sondern durch visuelle und propriozeptive Systeme beeinflusst wird (Kitahara et al., 2007, Hamann, 2009). Die Grundlagen der neurobiologischen Abläufe sind bislang nur unvollständig verstanden, aber essentiell für zielgerichtete Therapieansätze (Dutia, 2010, Dutheil et al., 2011, Lacour, 2013).

2.2 Therapieansätze

2.2.1 Allgemein

Ziel einer Therapie des unilateralen peripher-vestibulären Schadens ist es beim Tier und beim Menschen, das physiologische Gleichgewichts-Orientierungs-System des Körpers möglichst schnell wieder herzustellen. Dabei liegt der Fokus auf der Förderung des natürlichen Vorgangs der zentralen Adaptation (Lacour et al., 2009, Horak, 2010).

Die zu Beginn heftige Schwindelsymptomatik wird in der Humanmedizin als unangenehm und lebensqualitätsmindernd beschrieben, wirkt jedoch durch den hohen Symptomdruck kompensationsfördernd. Aus diesem Prinzip heraus erfolgt

eine symptomatische Therapie mit Antivertiginosa und Antiemetika nur bei schwerer Übelkeit und Erbrechen lediglich innerhalb der ersten drei Tage (Brandt et al., 2013). Die erzielte Symptomlinderung reduziert den Kompensationsdruck und mindert somit den natürlichen Mechanismus der zentralen vestibulären Kompensation. So zeigten Hunde, die zum Gassi-Gehen aufgefordert wurden, eine beschleunigte vestibuläre Kompensation im Gegensatz zu ruhenden Hunden (Rossmesl, 2010). Das bisher effektivste Behandlungsprinzip beim Mensch ist die Förderung der natürlichen Kompensation mittels physikalisch-medizinischer Therapie. Tägliches gezieltes Gleichgewichts- und Blickstabilisationstraining fördert die natürlichen zentralen Adaptationsmechanismen (Igarashi et al., 1981, Horak, 2010).

Aus tierexperimentellen Studien, welche sich der unilateralen Labyrinthektomie als Modell der akuten einseitigen Vestibulopathie bedienten, gingen verschiedene mögliche Therapieeinflüsse auf zentrale vestibuläre Kompensation hervor. Alkohol und Medikamente wie Antiepileptika, Ca^{2+} -Kanallocker und Glucocorticoidrezeptorblocker verzögern die Kompensation. Hingegen wird ACTH-Fragmenten, Glucocorticoiden, Opiat-Antagonisten, Betahistin, GM1-Gangliosiden, Coffein und Amphetaminen eine positive Wirkung auf vestibuläre Kompensationsmechanismen zugeschrieben (Strupp et al., 2001a, Dutheil et al., 2013). Diese vermuteten pharmakologischen Effekte sind bislang noch nicht hinreichend und systematisch in prospektiven klinischen Studien untersucht (Strupp, 2008).

Die therapeutische Anforderung an ein Pharmakon ist es, akut symptomlindernd und gleichzeitig kompensationsfördernd zu wirken. Bis heute ist kein Medikament bekannt, welches nachweislich die vestibuläre Kompensation verbessert (Strupp et al., 2013b, Wersinger et al., 2013).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss zweier Wirkstoffe auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen mittels nuklearmedizinischer und neurologischer Methoden im Modell der unilateralen Labyrinthektomie bei der Ratte untersucht.

2.2.2 N-Acetyl-DL-leucin

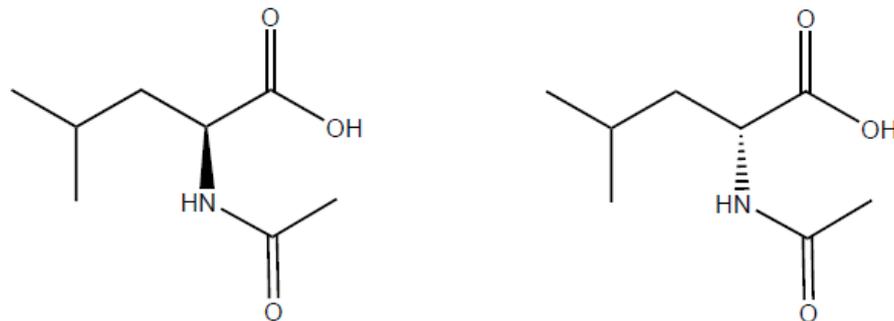


Abb. 4: Strukturformel N-Acetyl-L-leucin (links), N-Acetyl-D-leucin (rechts)

Seit 1957 wird das Racemat N-Acetyl-DL-leucin vor allem in Frankreich (Tanganil®) bei akuter Schwindelsymptomatik und Gleichgewichtsstörung in der Humanmedizin eingesetzt. Das Medikament hat sich als gut verträgliches Therapeutikum erwiesen (Ferber-Viart et al., 2009). Es wird in oraler oder intravenöser Form appliziert. Dabei handelt es sich um ein acetyliertes Derivat der natürlichen Aminosäure Leucin. Neueste klinische Studien von 2013 bestätigen einen positiven Effekt der Racematform des Wirkstoffes auf die Reduktion akuter Schwindelsymptomatik beim Menschen (Strupp et al., 2013b).

Basierend auf einer Meerschweinchenstudie von 2001 (Vibert and Vidal, 2001) wird vermutet, dass N-Acetyl-DL-leucin eine stabilisierende Wirkung auf das Membranpotential von Nervenzellen ausübt. Das Resultat eines einseitigen Funktionsausfalls des Gleichgewichtsorgans ist eine Tonusimbalance zwischen den vestibulären Kerngebieten im Sinne einer Hyper- und Depolarisierung. Elektrophysiologische in vitro Messungen zeigten, dass das Racemat einen Effekt auf das Membranpotential vestibulärer Neurone ausübt. Dabei normalisiert und stabilisiert es den Wert zwischen -65mV und 60mV.

Das Racemat eines Wirkstoffes bezeichnet ein optisch inaktives 1:1-Gemisch zweier optisch aktiver Enantiomere. Enantiomere sind Moleküle, welche die gleichen chemischen Summenformeln und Konstitutionen besitzen und chemisch identische Eigenschaften zeigen. Diese unterscheiden sich jedoch in der räumlichen Anordnung ihrer Moleküle, der Konfiguration. Enantiomere sind chiral, was bedeutet, dass durch Drehung keine Selbstabbildung erzielt werden kann. Sie besitzen optische Aktivität, so dass sie die Polarisationsrichtung des Lichtes drehen.

Links-drehende Enantiomere werden mit L, rechts-drehende mit D bezeichnet. Obwohl die chemischen Eigenschaften identisch sind, können Enantiomere auf biochemischer Ebene unterschiedlich reagieren (Roth et al., 1998).

Obwohl sich das Racemat des Acetylleucins seit über 50 Jahren auf dem Markt befindet, ist der genaue Wirkmechanismus nicht geklärt (Strupp et al., 2013b). Ob ein direkter Einfluss auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen besteht und ob bzw. in welchem Maße das N-acetyl-L-leucin oder das N-Acetyl-D-leucin (Abb. 4) spezifische pharmakologische Effekte aufweisen, ist bislang unzureichend untersucht. Eine klinische Studie im Modell der unilateralen Labyrinthektomie bei der Katze aus dem Jahr 2008 bestätigt einen positiven Effekt des N-Acetyl-L-leucins (Fabre, 2008).

2.2.3 4-Aminopyridin

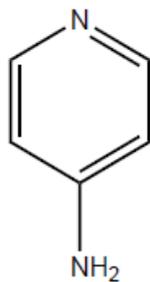


Abb. 5: Strukturformel 4-Aminopyridin

4-Aminopyridin (4-AP, Abb.5) gehört in die chemische Gruppe der organischen Verbindungen und ist ein Pyridinderivat, welches am C4-Atom mit einer Aminogruppe substituiert ist. Der Wirkstoff ist als unspezifischer reversibler Kaliumkanalblocker bekannt (Judge and Bever, 2006, Dunn and Blight, 2011). Es handelt sich um eine basische Substanz, deren Chloridsalz wasserlöslich ist und sich deshalb zur oralen Applikation eignet. In der nichtionisierten Form ist das 4-AP lipidlöslich, kann durch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren und im zentralen Nervensystem mit Kaliumkanälen interagieren.

Durch die Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanäle an präsynaptischen Terminalen können K^+ -Ionen die Zellmembran nicht mehr passieren. Somit wird die Repolarisationsphase, in welcher ausströmende K^+ -Ionen das Membranpotential nach erfolgter Nervenzellerregung wieder auf den Ruhewert stabilisieren, verzögert. Das Resultat ist eine verlängerte Depolarisation sowie eine erhöhte Freisetzung von Neurotransmittern, was die neuronale Funktion fördert (Alvina and Khodakhah, 2010, Hussein et al., 2010).

Seit den 80er Jahren wird 4-AP als mögliches Therapeutikum neurologischer Erkrankungen gesehen, welche mit neuromuskulären oder axonalen Erregungsleitungsstörungen einhergehen. Dazu zählt z.B. das Lambert-Eaton-Syndrom, eine Muskelschwäche bedingt durch gestörte Übermittlung elektrischer Impulse von Nerven an Muskeln (Mariani et al., 2001). Ebenso die Myasthenia Gravis, eine autoimmunbedingte Muskelkrankheit (Smith et al., 2000) sowie die Botulinusintoxikation (Strupp et al., 2001b).

Unter dem Namen Fampridin (Fampyra®) wird 4-AP seit 2011 unter bedingter Marktzulassung der Europäischen Kommission (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) bei Multipler Sklerose, einer chronisch-entzündlichen Entmarkungserkrankung des zentralen Nervensystems, zur Verbesserung der Gehfähigkeit eingesetzt (Sedehizadeh et al., 2012). Der klinisch positive Effekt wurde auf die Wiederherstellung der Leitfähigkeit demyelinisierter Nervenfasern zurückgeführt (Shi and Sun, 2011), was sich jedoch in experimentellen Studien nicht bestätigte (Smith et al., 2000).

In klinischen Studien wurde der therapeutische Effekt nach oraler Applikation von 4-AP bei der Episodischen Ataxie Typ 2 (EA-2) untersucht. Bei der EA-2 handelt es sich um eine genetisch bedingte zerebelläre Dysfunktion, welche motorische Imbalancen und Schwindel zur Folge hat. Es konnte gezeigt werden, dass 4-AP einen positiven Effekt auf die Purkinjezellen ausübt, indem es die Entladungsrate präzisiert (Strupp et al., 2004). Die Applikation führte zu einer Reduktion der Schwindelattacken um ein Drittel, bei zwei Probanden konnte sogar eine vollständige Anfallsfreiheit erzielt werden. Eine tierexperimentelle Studie von 2010 bestätigte diese Ergebnisse (Alvina and Khodakhah, 2010).

Purkinjezellen sind die wichtigsten Neurone im Kleinhirn, der Kontrollinstanz für Feinabstimmung und Koordination von Bewegungsabläufen. Die Purkinjezellen

des Vestibulocerebellums projizieren direkt auf die Vestibulariskerne. Es wird vermutet, dass 4-AP die beeinträchtigte und gestörte Funktion der Purkinjezellen auch nach einseitigem vestibulärem Schaden verbessere (Brandt et al., 2009).

Derzeit wird 4-AP zur Behandlung der episodischen Ataxie Typ 2, zur Verbesserung zerebellärer Dysfunktionen und Nystagmus eingesetzt (Kalla et al., 2004, Strupp et al., 2004, Schniepp et al., 2012, Kremmyda et al., 2013, Shaikh et al., 2013).

4-AP weist eine geringe therapeutische Breite auf. Die niedrige Spezifität führt zu einem weitreichenden Spektrum von Nebenwirkungen; angefangen bei Übelkeit, Schwindel, Schlafstörungen, bis hin zu Konvulsionen, Ataxien, Ophistotonus und Angstzuständen (van Diemen et al., 1992, Hussein et al., 2010). In den USA wird 4-AP als Avizid unter dem Namen Avitrol® gehandelt. Aufgrund seiner hohen toxischen Potenz ist es lediglich eingeschränkt zur Verwendung zugelassen.

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob 4-Aminopyridin durch seine Wirkung auf Purkinjezellen einen positiven Effekt auf die zentrale vestibuläre Kompensation nach einseitiger vestibulärer Läsion ausübt.

3. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

3.1 Funktionsprinzip und Aufbau

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Verfahren in der Nuklearmedizin, bei welchem funktionelle physiologische und biochemische Vorgänge minimal-invasiv im lebenden Organismus von außen erfasst werden können (Phelps, 2000). Der Begriff setzt sich zusammen aus dem Lateinischen Positron (= positiv geladenes Elementarteilchen; Emission = emittieren, aussenden) und dem Altgriechischen Tomographie (= τομή, *tome*, „Schnitt“ und γράφειν, *grafëin*, „schreiben“).

Bei der funktionellen Bildgebung bedient man sich organischer Verbindungen und deren natürlicher biologischer Eigenschaften und Stoffwechselwege im Körper. Einzelne Atomkerne dieser Molekülverbände werden durch radioaktive, also strahlenemittierende Isotope, sog. Radionuklide, ersetzt und in minimalen Mengen (piko- bis mikromolar) dem lebenden Organismus appliziert (Wienhard et al., 1989). Diese werden als Radiopharmaka oder Tracer bezeichnet. Sie reichern sich spezifisch in bestimmten durch das Molekül vorgegebenen Regionen an oder nehmen an Stoffwechselwegen teil. Das nuklearmedizinisch bildgebende Verfahren basiert auf der externen Messung (Akquisition) der emittierten Strahlung dieser inkorporierten Radionuklide mittels geeigneter Detektoren. Ziel der Untersuchung ist es, die physiologische von der pathologischen Aktivitätsverteilung im Gewebe abzugrenzen und zu interpretieren (Gewoski et al., 2005).

3.2 Signalverarbeitung

Radionuklide sind instabil und zerfallen nach einer charakteristischen Halbwertszeit (HWZ) unter Aussendung von Strahlung. In der PET-Messung erfolgt ein β^+ -Zerfall des Radionuklids unter Emission eines Positrons (β^+) und eines Neutrinos (ν) (Abb. 6) (Götte and Kloss, 1973). Das Neutrino tritt in keinerlei Wechselwirkung mit der Materie und wird im Rahmen der PET-Messung vernachlässigt. Das emittierte Positron stellt mit seiner positiven Ladung das Gegenstück zum negativ geladenen Elektron (e^-) dar. Sie besitzen die gleiche Ruhemasse und werden als Teilchen und Anti-teilchen bezeichnet. Bei seiner Diffusion durch den Organismus wird das hochenergetische Positron durch die Materie abgebremst, bis es niederenergetische genug ist, um mit dem Elektron ein

Positronium zu bilden. Dieses zerfällt sofort; man spricht von der sogenannten Vernichtung (Annihilation) der Teilchen. Ihre Masse wird in Energie umgewandelt. Es entsteht ein Paar hochenergetischer Gamma (γ) - Quanten (511 keV), welche gleichzeitig emittiert und zueinander diametral entgegengerichtet ausgestrahlt werden (Boening, 2002).

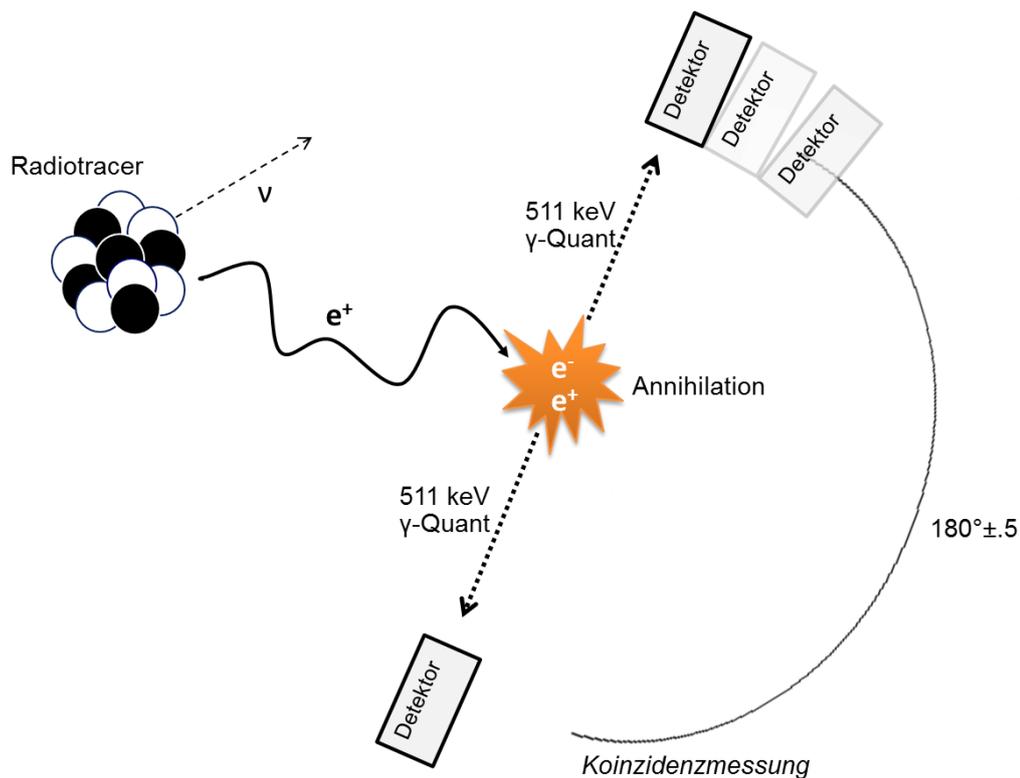


Abb. 6: Entstehung und Detektion der Vernichtungsstrahlung nach β^+ -Zerfall

Die Energie der γ -Quanten wird mit Hilfe geeigneter Detektorsysteme, welche ringförmig um den Probanden angeordnet sind, aufgenommen (Bailey et al., 2005). Die in der PET hauptsächlich verwendeten Detektoren bestehen aus Szintillationskristallen, welche für die gebräuchliche Energie von 511keV die größte Lichtausbeute aufweisen. Daran unmittelbar anschließend befinden sich Lichtsensoren, welche aus Photoelektronenvervielfachern (engl: Photomultiplier tube) bestehen. Bei der Wechselwirkung der γ -Quanten mit den Kristallen

entstehen Impulse, welche von den Lichtsensoren aufgefangen und - proportional zu der im Kristall absorbierten Energie - in ein elektrisches Signal überführt werden (Boening, 2002, Gewoski et al., 2005).

Im Gegensatz zu einer planaren Akquisition, erlaubt die ringförmige Anordnung der Detektoren eine Messung der Aktivitätsverteilung im Volumen aus verschiedenen Aufnahmewinkeln (Abb. 7a). Mathematische Rekonstruktionsalgorithmen erzeugen überlagerungsfreie Schnittbilder, welche senkrecht zur Symmetrieachse des Tomographen stehen. Das transversale Zusammenführen ergibt das dreidimensionale Bild (Wienhard et al., 1989).

Die tomographische Eigenschaft der PET beruht auf dem gleichzeitigen Nachweis eines γ -Quantenpaares. Dabei ist die gleichzeitige (koinzidente) Entstehung der γ -Quanten aus der Annihilation ausschlaggebend (Kim and Jackson, 1999). Auf Grund der koinzidenten Detektion lässt sich der Strahlungsweg der γ -Quanten auf einer Verbindungslinie zwischen den beiden Detektoren bestimmen (LOR: *Line of Response* Abb. 7 b) (Baert and Sartor, 2006).

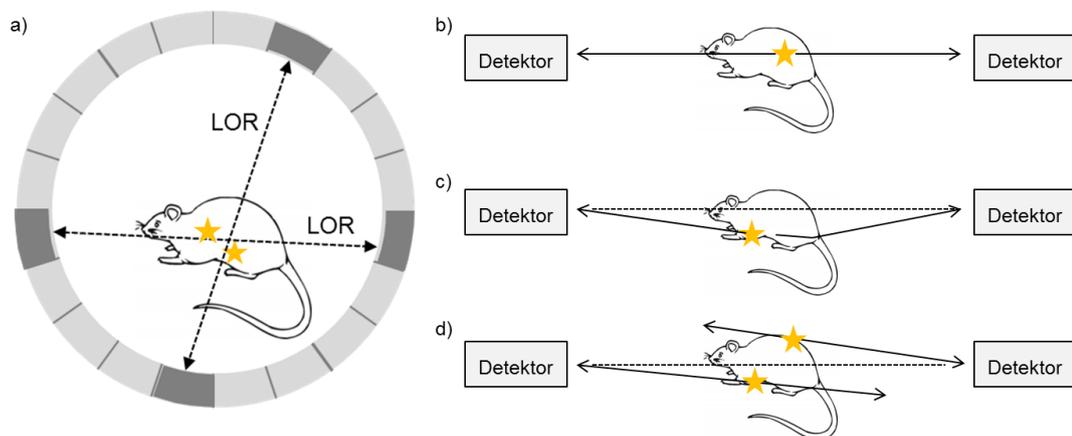


Abb. 7: a) Ringdetektor mit "lines of response" LOR, Koinzidenzen: b) trues, c) scattered, d) randoms

Die Wegstrecke der γ -Quanten in Richtung Detektoren kann, trotz Lichtgeschwindigkeit, je nach Emissionsort Laufzeitunterschiede mit sich bringen. Dies setzt äußerst sensitive Detektoren voraus. Es existieren Zeitfenster von wenigen Nanosekunden, in welchen man noch von Koinzidenzen (counts) spricht. Zu große Zeitintervalle erhöhen die Wahrscheinlichkeit auf zufällig registrierte Koinzidenzen; ein zu kleines Fenster reduziert die Ausbeute und damit die Nachweiswahrscheinlichkeit (Gewoski et al., 2005). Bei der erwünschten wahren Koinzidenzmessung diffundieren die γ -Quanten kollinear und ohne Beeinträchtigung durch den Organismus. Diese werden als sog. *true*s bezeichnet (Abb. 7 b). Tritt eines oder beide γ -Quanten in Wechselwirkung mit der Materie, können diese vollständig absorbiert oder gestreut werden. Im Falle der Absorption oder Streuung kommt es zum Verlust der Koinzidenz und somit zur Schwächung des summierten Signals, was als Attenuation bezeichnet wird. Ebenso kann es zur „Ein“-streuung von γ -Quanten kommen, wodurch es zur Detektion falscher Signale durch fehlerhaft angenommene LORs kommt, sog. *scattered* (Abb.7 c). Werden zwei γ -Quanten, welche nicht aus einem Positronenzerfall stammen, zufällig gleichzeitig registriert und fälschlicherweise auf eine LOR zurückgeführt, spricht man von zufälligen, unerwünschten Koinzidenzereignissen, sog. *randoms* (Abb. 7 d).

Für eine quantitative Analyse des Bildes müssen Abschwächungseffekte sowie Streuungs- und Zufallsereignisse bei der Bildrekonstruktion berücksichtigt und mittels geeigneter Korrekturmaßnahmen von wahren Koinzidenzereignissen unterschieden werden (Gewoski et al., 2005). Die Schwächungskorrektur erfolgt dabei durch einen Transmissionsscan, welcher sich unmittelbar vor oder nach der Emission anschließt. Dabei befindet sich im Scanner eine um das Objekt rotierende externe Co^{57} -Strahlenquelle, deren Energie differenzierbar zu der Energie der γ -Quanten aus der Emissionsmessung ist (Karp et al., 1995).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Streukorrektur im Bildrekonstruktionsprogramm Inveon acquisition workplace (Siemens Medical Solutions, München) nach Watson durchgeführt (Watson et al., 1996). Die Korrektur der Zufallsereignisse erfolgte nach der Methode von Hoffman EJ (Hoffman et al., 1981). Der Abschwächungseffekt wurde durch einen

Transmissionsscan, welcher unmittelbar an die Emissionsmessung anschloss, korrigiert (Baert and Sartor, 2006).

3.3 Herstellung von Radiopharmakon und Radionuklid

Ein Prinzip der Herstellung von Radiopharmaka ist, dass stabile Atome in organischen Verbindungen durch instabile, radioaktive Isotope, auch bezeichnet als Radionuklide, ersetzt werden. Dabei werden die biochemischen Eigenschaften sowie die Stoffwechselwege der Moleküle nicht verändert. Radiopharmaka können ebenfalls aus einem einzelnen Radioisotop bestehen wie z.B. ^{131}I (Götte and Kloss, 1973).

Radionuklide, welche für den nuklearmedizinischen Gebrauch geeignet sind, werden ausschließlich künstlich im Kernreaktor oder im Zyklotron hergestellt. Bei einem Zyklotron handelt es sich um einen Teilchenbeschleuniger, in welchem stabile Kerne mit alpha-Teilchen und Protonen beschossen werden. Das am häufigsten in der nuklearmedizinischen Bildgebung genutzte Repertoire an β^+ -Strahlern ist in Tabelle 1 gelistet (Pimlott and Sutherland, 2011).

Radionuklid	HWZ (min)	Hauptsächliche verwendete Tracer: Beispiel der Anwendung (vor allem)
^{11}C Kohlenstoff (C)	20.3	^{11}C -Methionin: Messung des Aminosäurestoffwechsels (Onkologie)
^{13}N Stickstoff (N)	10	^{13}N - NH_3 : Messung der Perfusion (Kardiologie)
^{15}O Sauerstoff (O)	2	^{15}O - H_2O : Blutfluss
^{18}F Fluor (F)	110	^{18}F -FDG: Messung des Glucosemetabolismus (Onkologie, Neurologie, Kardiologie)

Tab. 1: Auswahl häufig verwendeter Radionuklide (nach Pimlott und Sutherland, 2011). Die Herstellung dieser Radionuklide erfolgt im Zyklotron.

Die entstehenden Isotope sind instabil, d.h. sie zerfallen innerhalb einer charakteristischen Zeit unter Emission von Strahlung. Die Halbwertszeit (HWZ) beschreibt die Zeit, nach der die anfangs vorhandene Aktivität auf die Hälfte abgefallen ist. Generell sollte diese lang genug sein, um den Kopplungsprozess des

Positronenemitters an den Tracer zu ermöglichen und gleichzeitig eine ausreichende Bioverteilung im Organismus zu gewährleisten. Andererseits sollte die HWZ so kurz wie möglich sein, um die Strahlenexposition auf den Patienten zu minimieren. Die adäquate Wahl des Tracers hängt von der zu untersuchenden Zielstruktur bzw. dem Stoffwechselvorgang, ab (Tab. 1). Anschließend erfolgt eine Qualitäts- und Verwendbarkeitskontrolle des Radiopharmakons, welche die Prüfung der Toxizität, Sterilität, Pyrogenfreiheit, des pH-Wertes, der Radionuklidreinheit und radiochemischen Reinheit des Radiopharmakons mittels High Performance Liquid Chromatographie, Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie umfasst (Schicha and Schober, 2013).

3.3.1 Das Radiopharmakon 2-Desoxy-2[¹⁸F]fluor-D-glucose

2-Desoxy-2[¹⁸F]fluor-D-glucose ([¹⁸F]FDG) ist ein D-Glucose-Analogon (Abb. 8). Der radioaktiv markierte Zucker gilt als eines der bedeutendsten Radiopharmaka der funktionellen Bildgebung (Leung, 2004). Es findet seit 1976 Anwendung in der Humanmedizin (Reivich et al., 1979).

Das Radiopharmakon wird überwiegend eingesetzt in der Onkologie, zur diagnostischen Differenzierung maligner und benignen Tumoren, zum „Staging“ sowie zur Verlaufskontrolle bei Therapien. Weitere Hauptindikationsbereiche sind die Kardiologie zur Beurteilung der Herzvitalität und die Neurologie, worauf unter 2.3.6 näher eingegangen wird (Alavi et al., 2004).

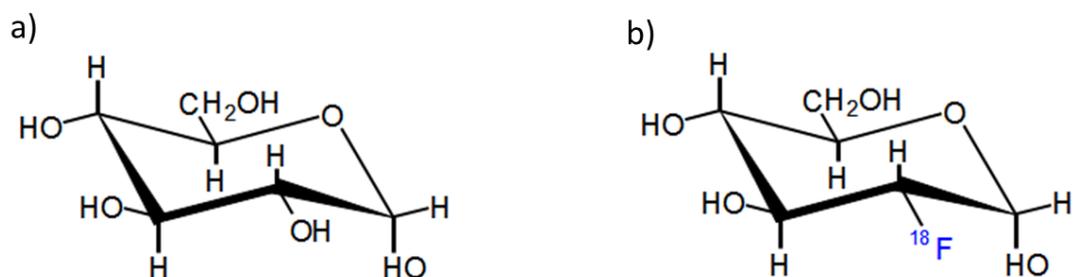


Abb. 8: a) D-Glucose und b) 2-Desoxy-2[¹⁸F]fluor-D-glucose, Radiopharmakon

3.3.2 Anreicherungsmechanismus von 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glucose

Die Glucose ist der Energielieferant der Zelle und wird bei erhöhtem Energiebedarf vermehrt benötigt. Die intrazelluläre Aufnahme der [¹⁸F]FDG aus der Blutbahn verläuft analog zu der natürlicher D-Glucose durch ein Glucose-Transporter-Protein (GLUT) (Abb. 9) (Avril, 2004). In der Zelle erfolgt die Phosphorylierung durch das Enzym Hexokinase (Smith, 2000). Im Gegensatz zu dem natürlichen D-Glucose-6-phosphat stellt die phosphorylierte [¹⁸F]FDG kein Substrat für die Glykolyse dar und wird nicht weiter katabolisiert. Die rückläufige Dephosphorylierung ist - mit Ausnahme in der Leber - vernachlässigbar. Dadurch kommt es zum „*metabolic trapping*“, einer Anreicherung des phosphorylierten Radiopharmakons in den Zellen (Gallagher et al., 1978).

Mit dem Verfahren der PET kann anhand des Zerfalls des Radionuklids die Anreicherung von [¹⁸F]FDG lokalisiert werden. Dies erlaubt Rückschlüsse auf den Glukosebedarf einer Zelle und somit auch auf erhöhte Glucosestoffwechselraten verschiedener Gewebe. Beispiele hierfür sind Tumorgewebe, Entzündungsreaktionen und neurologische Veränderungen wie Anomalien im Gehirn z.B. der Alzheimer Krankheit (Boening, 2002).

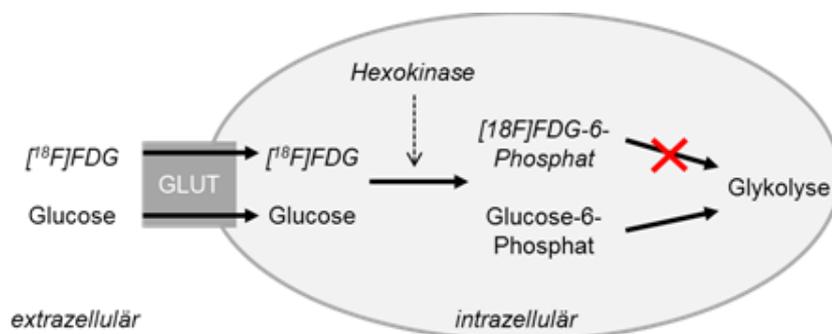


Abb. 9: intrazellulärer Anreicherungsmechanismus von [¹⁸F]FDG

3.4 μ -Positronen-Emissions-Tomographie – Translationale Wissenschaft

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist in der medizinischen Forschung als wichtige bildgebende Modalität etabliert. Diese Technologie der minimalinvasiven funktionellen Bildgebung wurde in den 60er Jahren entwickelt und seitdem stetig in Bezug auf Signaldetektion, Bildauflösung und Bildqualität verbessert (Hoffman et al., 1981). Die Möglichkeit, biologische Prozesse sowie Krankheitsverläufe minimalinvasiv in Langzeituntersuchungen zu analysieren, zu verfolgen und zu visualisieren, rückte die PET bei Versuchstieren in den Fokus der Wissenschaft (Cunha et al., 2013). Perspektivisch kann das zu einer auf Bildgebung basierten Medikamentenentwicklung führen.

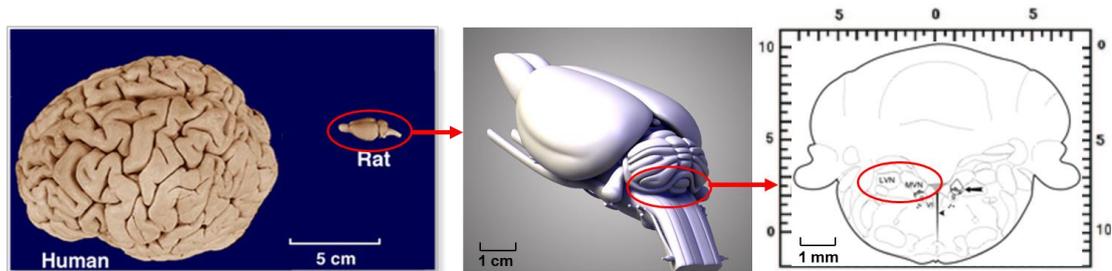


Abb. 10: Größenrelation des Gehirns Mensch-Ratte (nach freundlicher Genehmigung von la Fougère, C.)

Aufgrund der Größenunterschiede zwischen Mensch und Nagetier (Abb. 10) fordert das PET für Labortiere, sog. μ PETs oder small-animal-PETs, eine höhere räumliche Auflösung. Cherry und Kollegen beschrieben 1997 einen der ersten μ -Positronen-Emissions-Tomographen (Cherry, 1997). Durch die Entwicklung dieser hochauflösenden μ PETs und deren Einsatz in der präklinischen und Grundlagenforschung ergibt sich eine Form der bidirektionalen translationalen Wissenschaft (Abb. 11). Die Expertise und das physikalische Knowhow über konventionelle PETs werden auf das μ PET transferiert. Dem gegenüber steht der Erkenntnisgewinn auf molekularbiologischer Ebene durch μ PETs, was zu einer Implementierung neuer Ansätze in Diagnostik und/oder Therapie führt (Hutchins, 2008).

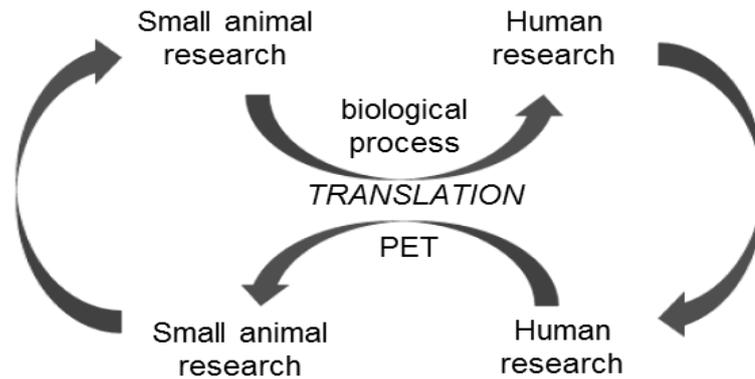


Abb. 11: Prinzip der bidirektionalen translationalen Wissenschaft (Hutchins et al., 2008)

μ PET-Messdaten können zu verschiedenen Zeitpunkten im selben Individuum akquiriert werden. Mittels einer „Baseline“-Messung, welche vor einer Intervention – wie zum Beispiel einem chirurgischen Eingriff oder der Applikation eines Pharmakons – erfolgt, können nachfolgende Messungen desselben Tieres mit dieser verglichen werden. Dadurch dass jedes Individuum seine eigene Kontrolle darstellt (Cherry 2001), kann die Versuchstierzahl entscheidend reduziert werden (Cunha et al., 2013).

3.5 2-Desoxy-2[^{18}F]fluor-D-glucose in der Neurologie

Generell wird in der klinischen Neurologie die funktionelle Bildgebung des PET zur Ergänzung diagnostischer und prognostischer Aussagen bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie z.B. bei cerebrovaskulären Krankheiten, fokaler Epilepsie, Demenz, Depression, Schizophrenie, Alzheimer, M. Parkinson oder Hirntumoren eingesetzt (Newberg et al., 2002). Das Resultat ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularbiologischen Prozesse sowie der verbesserten Diagnosemöglichkeiten und dadurch die Etablierung geeigneter Therapiestrategien (Schaller, 2003). Neuronale Prozesse korrelieren mit regionaler neuronaler Aktivitätsänderung. Für die Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität benötigen die Zellen im Gehirn Energie, welche zu 95% durch Oxidation von Glucose bereitgestellt wird (Boening, 2002). Die PET bedient sich der Wechselbeziehung von erhöhter neuronaler Aktivität und Energiebedarf, wobei das Radiopharmakon [^{18}F]FDG zur Darstellung des cerebralen Glucosemetabolismus

verwendet wird (Schaller, 2003). Die Forschung profitiert von der uneingeschränkten Tiefenpenetration der Radiopharmaka. Verschiedene Gehirnstrukturen der Ratte wie Neocortex, Thalamus, Neostriatum, Colliculus inferior, Pons und Cerebellum können dank hochauflösender mittels μ PET unterschieden werden (Jacobs et al., 2003).

4. Tiermodell - unilaterale Labyrinthektomie

Gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz von 2013 §7 ist vor der Durchführung von Tierversuchen deren Unerlässlichkeit am Stand der wissenschaftlichen Kenntnis zu prüfen.

Der Ausschluss repräsentativer *in vitro*-Modelle und die Auswahl geeigneter Tiermodelle in Analogie zum Krankheitsbild sind Voraussetzungen für die Versuchsplanung (Jacobs et al., 2003).

Es sei zu beachten, dass Zellkulturen die *in vivo* Bedingungen der parallel ablaufenden neurobiologischen Prozesse nach vestibulärer Läsion wie z.B. die vestibuläre Kompensation und Neurogenese nicht widerspiegeln können. Die Vorgänge nach einer vestibulären Läsion laufen nicht isoliert im vestibulären System ab, sondern sind in einem systembiologischen Zusammenhang zu sehen. Zwischen dem vestibulären System, okulomotorischen, posturalen, multisensorischen Zentren sowie Zentren der räumlichen Orientierung bestehen enge neuroanatomische Verbindungen (Brandt and Daroff, 1980). Für die Interaktion dieser Systeme spielt die multisensorische Modulation eine besondere Rolle, welche nicht *in vitro* dargestellt werden kann. Ebenso wenig lässt sich die Effizienz von Pharmaka auf diese multiplen neurobiologischen Abläufe in Zellkulturen darstellen, weshalb *in vivo* Untersuchungen unumgänglich sind.

Grundsätzlich sollte das Tiermodell drei fundamentale Ansprüche erfüllen: 1. Die Symptomatik im Tiermodell sollte der des klinischen Erscheinungsbildes der Krankheit ähneln. 2. Beiden Krankheitsleiden sollte ein vergleichbarer Pathomechanismus zu Grunde liegen. 3. Prädiktive Schlussfolgerungen angewandter Medikamente im Modell sollten Aussagen auf klinische Effekte zulassen.

Bei der chemischen unilateralen Labyrinthektomie (UL) der Ratte wird durch transtympanale Injektion einer Natriumhydrogen-4-aminophenylarsonat (Atoxyl) - Lösung der einseitige Ausfall des Gleichgewichtssinnes hervorgerufen (Vignaux et al., 2012). Die Wirkung beruht auf der irreversiblen Deafferentierung der Sinneshärchen im Innenohr. Diesem Prinzip, durch Schädigung der Haarsinneszellen einen Ausfall der Gleichgewichtsfunktion hervorzurufen, bedient man sich ebenfalls bei der Therapie des Morbus Menière (Brandt et al., 2013).

Dabei erfolgt eine transtympanale Instillation von Gentamicin und Steroiden, was zu einer direkten Schädigung der Typ-I-Haarzellen führt (Selimoglu, 2007). In den meisten Fällen erreicht man dadurch eine Attackenfreiheit, verursacht jedoch auch bei 50% der Patienten eine Innenohrschwerhörigkeit. Das Kriterium der Ursache ist insoweit nicht erfüllt, da es sich um keine pathologische Ätiologie, sondern um eine provozierte Läsion des einseitigen Gleichgewichtsschadens handelt.

Die Instillation der toxischen Lösung führt bei den Ratten zu einer typischen Schwindelsymptomatik, gekennzeichnet durch Nystagmus, Torticollis und posturaler Asymmetrie. Dies ähnelt dem klinischen Bild des idiopathischen vestibulären Syndroms und der Otitis Media bei Hund und Katze (Rossmeisl, 2010). Das humane Korrelat stellt die Neuritis vestibularis dar. Damit ist das Kriterium der Symptomatik erfüllt.

Das ablative Operationsverfahren zur Schwindelinduktion ist seit vielen Jahren in der Literatur bei unterschiedlichen Spezies etabliert (Dieringer, 1995, Vignaux et al., 2012, Newlands and Wei, 2013). Ebenso ist bekannt, dass es nach UL zu vestibulären Kompensationsmechanismen kommt und es zusätzlich ein gutes Model neuronaler Plastizität darstellt (Cass and Goshgarian, 1991, Cullen et al., 2009). Da die zugrunde liegenden neurobiologischen Vorgänge dieser zentralen Adaptation noch nicht komplett verstanden sind, bedienen sich viele Forschergruppen dieses Tiermodells. Es besteht eine hohe Speziesvariabilität von Fröschen, Katzen bis hin zu Primaten, welche für die Untersuchung vestibulärer Kompensationsmechanismen nach UL herangezogen werden (Cass and Goshgarian, 1991, Dieringer, 1995). Bereits 1988 untersuchten Smith und Mitarbeiter die neuronale Aktivität des medialen vestibulären Kerns nach UL im Meerschwein (Smith and Curthoys, 1988). 2013 interessierte die Neurowissenschaftler Newlands und Wei der Mechanismus der Achsenabweichung des Kopfes, wobei sie Makaken einer UL unterzogen und die Kompensationsmechanismen analysierten (Newlands and Wei, 2013).

5. Arbeitshypothese

Die neurobiologischen Vorgänge, welche sich während der zentralen vestibulären Kompensation in Folge der einseitigen vestibulären Läsion abspielen, sind nur unvollständig verstanden. Das Verständnis dieser Mechanismen ist die Voraussetzung für eine zielgerichtete Therapie von Patienten mit vestibulären Defiziten. In kontrollierten Tierstudien wurde für einzelne Substanzen eine symptomatische Verbesserung der vestibulären Symptome beschrieben. Bislang konnte allerdings für kein Medikament in prospektiven klinischen Studien ein positiver Einfluss auf die vestibuläre Kompensation nachgewiesen werden. Die anfangs symptomlindernden Pharmaka führen zu einer konsekutiven Minderung des Kompensationsdrucks, was eine nachhaltige Beeinträchtigung der natürlichen Kompensation bewirkt. Aus diesem Grund wird deren Anwendung lediglich in den ersten drei Tagen bei heftigem Erbrechen und Übelkeit empfohlen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen Erkenntnisse über die therapeutische Beeinflussung der vestibulären Kompensation am Tiermodell der chemischen unilateralen Labyrinthektomie gewonnen werden. Dies erfolgt durch die Kombination der bildgebenden Darstellung der neurobiologischen Vorgänge im Gehirn mittels Positronen-Emissions-Tomographie und der Verhaltensanalyse nach Bergquist (2008). Bei den zu untersuchenden Medikamenten handelt es sich um N-Acetylleucin (N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin, N-Acetyl-D-leucin) und 4-Aminopyridin. Die Vergleichsgrundlage stellt die unilaterale Labyrinthektomie bei der Ratte bzw. die daraus resultierenden Kompensationsmechanismen dar. Es ergaben sich folgende im Rahmen dieser Arbeit zu klärende Fragestellungen:

- Wie wirkt sich die Behandlung mit N-Acetylleucin bzw. 4-Aminopyridin auf vestibuläre Kompensationsmechanismen der Ratten in der Verhaltensanalyse aus? Kann der natürliche Mechanismus der Kompensation beschleunigt werden?
- Inwieweit kommt es zu Veränderungen der cerebralen Glucosestoffwechselrate und neuronalen Plastizität nach Applikation der Medikamente? Unterscheiden sich diese von den Tieren, welche keinen Wirkstoff erhalten haben?
- Lassen sich Rückschlüsse auf den Wirkort der Medikamente ziehen?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien

4-Aminopyridin	Sigma-Aldrich, München
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Bupivacainhydrochlorid , Carbostesin® 0,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bupivacainhydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich, München
Chloralhydrat	E. Merck AG, Darmstadt
Dexpanthenol , Bepanthen® 5%, Augensalbe	Bayer-Vital, Leverkusen
Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, München
Eindeckmedium, Entellan®	E. Merck AG, Darmstadt
Essigsäure 99%, Eisessig	Sigma-Aldrich, München
Ethanol 96%	Roth, KarlsruheIngelheim
Isofluran, Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf
Kresylviolett, Oxazin-Farbstoff	Chroma/Waldeck, Münster
Marbofloxacin , Marbocyl®	Vétoquinol, Ravensburg
Meloxicam, Metacam®	Boehringer Ingelheim,
N-Acetyl-D-leucin, VO148	Pierre Fabre, Toulouse
N-Acetyl-DL-leucin, L0014	Pierre Fabre, Toulouse
N-Acetyl-L-leucine, VO251	Pierre Fabre, Toulouse
Natriumchloridlösung, NaCl, isoton 0,9%	Braun, Melsungen
Natriumhydrogen-4-aminophenylarsonat, Atoxyl	TCI Europe n.v., Zwijndrecht
Natriumhydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid, NaOH	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure, HCl	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek® Cryomold Intermediate	Sakra, CA. USA

Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, München
Xylazinhydrochlorid, Rompun® 2%	Bayer, Leverkusen
Xylol	Merck, Darmstadt

1.2 Geräte

µPET-Scanner, Inveon P120	Siemens, München
Adhäsionsträger, Super Premium	VWR, Leuven
Analysenwaage, Typ CP 224S	Sartorius, Göttingen
Dosimeter-Ring	AWST, Helmholtz Zentrum München
Durchlicht Mikroskop, Leica Leitz DMRB	Leica, München
Filmdosimeter	AWST, Helmholtz Zentrum München
Gefriermikrotom, Kryostat Typ CM1510	Leica, Nussloch
Kaltlichtquelle	
Nahtmaterial, Ethicon 0,5 metric	Henry Schein Vet, Stuttgart
Narkosegerät, Isofluran Vet. Med. Vapor	Drägerwerk, Lübeck
Operationsmikroskop, Typ Stemi DV4 Spot mit	Zeiss, Jena
pH-Messer, inoLab® pH 730	WTW, Weilheim
Präzisionswaage, Typ 440-49N	Kern, Balingen
Ultraschallreiniger, Bandelin Sonorex RK52H	PCE, Meschede

1.3 Programme

GraphPad Prism®	Version 5.06, für Windows 2010
Inveon acquisition workplace	Version 1.5.0.28 (Bildakquisitionsprogramm) Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN USA
SPM5	„statistical parametric mapping“ Software Version 5, Wellcome Departement of Cognitive Neurology, London (Selimoglu, 2007)
VINCI	Visualisierungsprogramm, Volume Imaging in Neurological Research, Co-Registration and ROIs included (Vollmar et al., 2004)

1.4 Lösungen

Phosphatpuffer 0,4 M	5,7% Na ₂ HPO ₄ 1,2% NaH ₂ PO ₄ In 1 l Aqua dest. Mit 0,1 M NaOH auf pH-Wert: 7,4 einstellen
Paraformaldehyd, PFA 8%	800 ml Aqua dest. auf 50°C erwärmen 80 g Paraformaldehyd dazugeben 6 N NaOH tropfenweise: bis Lösung aufklart Abkühlen Mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen Filtrieren mit 0,2 M Phosphatpuffer auf 4% PFA verdünnen
Phosphatgepufferte Salzlösung,	100 ml 0,2 M Phosphatpuffer 18 g NaCl
PBS 0,01 M	Mit Aqua dest. bis auf 2 l auffüllen
Chloralhydratlösung 10%	1 g Chloralhydrat In 10 ml NaCl
Atoxyllösung 10%	100 mg Natriumhydrogen-4-aminophenylarsonat In 1 ml Aqua ad inject.

Bupivacain-Lösung 20%	20 mg Bupivacainhydrochlorid Monohydrat In 100 µl 3:1 96% Ethanol: Aqua ad inject. In Ultraschallreiniger: bis Lösung aufklart
Zuckerlösung	6 g Zucker Mit 0,1 M Phosphatpuffer bis auf 20 g
Kresylviolettfarblösung	0,1% Kresylviolett in 0,5 ml Eisessig In 1 l Aqua dest pH-Wert: 7,40 einstellen

2. Tiermodell

Alle Tierexperimente dieser Studie wurden im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchs mit dem Aktenzeichen 55.2.-1-54-2531-73-10 durchgeführt.

2.1 Versuchstiere und Haltung

Männliche Albinoratten des Stammes Sprague-Dawley wurden aus einer spezifisch pathogen freien Zucht (Charles River, Sulzfeld) bezogen und in IVC-Systemen (Individually Ventilated Cages) (Typ GR 1800 Doppel Decker, Tecniplast) zu je zwei Tieren gehalten.

In IVCs stellt jeder Käfig eine individuell ventilierte geschlossene Einheit dar, welche mit HEPA-gefilterter, konditionierter Raumluft versorgt wird. Das System führt zu einer mikrobiellen Abschirmung der Tiere. Die geschlossene Einheit stellt einen Schutz der Tiere vor akustischen und olfaktorischen Reizen der Außenwelt dar. Die Luftfeuchtigkeit betrug 40-70% rH und die Temperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Eine tiergerechte Luftgeschwindigkeit von weniger als 0,2 m/s sowie eine 50-fach stündliche Käfigluftwechselrate wurden eingestellt. Alle Parameter wurden täglich überprüft. Die zirkadiane Rhythmik wurde durch einen fixen 12h-hell/12h-dunkel Wechsel eingehalten. Das Alter der Ratten betrug bei Ankunft zehn Wochen mit einem Eingangsgewicht von 300-400 g. Als Einstreu diente Weichholzgranulat (Ssniff FS14). Die Tiere hatten stetigen Zugang zu standardisiertem Alleinfutter (Ssniff R/M Haltung, Spezialdiäten GmbH) sowie Leitungswasser ad libitum. Zusätzlich befand sich ein Pappmachéegehäuse (10 x 10 x 7 cm) als Enrichment in jedem Käfig. Neben der wöchentlichen Reinigung und Desinfektion des Tierstalls nach FELASA-Empfehlungen wurden die Ratten einmal in der Woche in frische Käfige umgesetzt, wobei das Wasser erneuert und das Futter je nach Bedarf aufgefüllt wurde. Zusätzlich wurden Sentinels gehalten und nach FELASA-Richtlinien ¼-jährlich zur Hygienekontrolle eingesendet. Die Ratten erhielten nach Anlieferung eine einwöchige Adaptationszeit an die neue Umgebung vor Versuchsbeginn.

2.2 Anästhesie und Analgesie

Die Narkose wurde durch Isofluraninhalation bewerkstelligt. Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in eine Plexiglasröhre (20 cm Länge, 10 cm Durchmesser) gesetzt, welche mit 3%iger Isofluran-Konzentration im Sauerstoff vorgeflutet war. Die Sauerstoff-Durchflussrate betrug 2 l/min. Durch Rollen der Plexiglasröhre wurde der Verlust der Stellreflexe detektiert, als Indikator für das Erreichen eines sedierten Zustands. Die Erhaltung wurde mittels Nasenkammer mit 1,5%iger Isofluran-Konzentration und einem Sauerstofffluss von 2 l/min sichergestellt. Der Zwischenzehenreflex sowie eine regelmäßige und gleichmäßige Atmung dienten während der Anästhesie der Überwachung der Narkosetiefe. Um einer Auskühlung der Tierkörper bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel entgegenzuwirken, wurden die Ratten für den operativen Eingriff auf einer Wärmeplatte platziert. Um ein Austrocknen der Cornea zu vermeiden, wurde Dexpanthenol (Bepanthen®5%, Bayer-Vital) lokal aufgetragen.

Um eine perioperativ ausreichende Analgesie zu gewährleisten, wurde den Tieren dreißig Minuten vor chirurgischer Intervention 1 mg/kg Meloxicam (Metacam®, Boehringer-Ingelheim) verabreicht. Vor der Hautinzision erfolgte eine subcutane (s.c.) Injektion des Lokalanästhetikums Bupivacainhydrochlorid (Carbostesin®0,5%, Sigma-Aldrich) in das Operationsfeld. Eine zusätzliche Meloxicam-Applikation erfolgte an den drei auf die Operation folgenden Tagen.

2.3 Chemische unilaterale Labyrinthektomie

Als etabliertes Tiermodell stellt die Labyrinthektomie bei der Ratte eine geeignete Methode zur Untersuchung biochemischer, neurophysiologischer und klinischer Folgen des unilateralen Ausfalls des Gleichgewichtsorgans dar (Dutia, 2010).

Die chemische unilaterale Labyrinthektomie (UL) führt zu einer irreversiblen Schädigung der Haarsinneszellen des Innenohrs, was einen Ausfall des betroffenen Gleichgewichtsorgans zur Folge hat. Provoziert wird eine Schwindelsymptomatik mit den Symptomen posturale Ataxie, Nystagmus und Torticollis. Dies ähnelt dem klinischen Erscheinungsbild des vestibulären Syndroms des Hundes sowie der Neuritis vestibularis beim Menschen (vgl. II.1.3.1). Mithilfe dieses Modells wurde der Einsatz pharmakologischer

Substanzen bei einseitigem vestibulärem Defizit auf Wirksamkeit und Effektivität überprüft. Die Operation erfolgt unter Isoflurannarkose und ausreichender Analgesie (siehe III.2.2).

Dorsal paramedian des linken Ohres der Ratte wurde eine ca.1cm lange Hautinzision gesetzt. Unter Schonung des Nervus facialis erfolgte eine stumpfe Tiefenpräparation zwischen dem Schläfenmuskel und dem seitlichen Nackenstrecker, bis der äußere Gehörgang als häutige Membran erkennbar wurde. Das weitere Vorgehen geschah unter Operationsmikroskopsicht (Typ Stemi DV4 Spot, Zeiss) bei zwanzigfacher Vergrößerung. Nach Eröffnung des häutigen Gehörgangs folgte die Perforation des ellipsoid-förmigen Trommelfells, welches eine Dicke von 5 µm besitzt. Um eine sofortige Deafferentierung der Haarzellen zu erreichen, wurde eine 20%ige Bupivacainlösung (200 µl, 1:3 Bupivacain: 96% Ethanol) transtympanal, kaudal des Hammerschafts mittels 24G-Kanüle, injiziert. Über einen Zeitraum von zwei Minuten wurde diese im stetigen Wechsel appliziert und aspiriert. Abschließend wurde diese vollständig aspiriert, um ein Versacken der Flüssigkeit in die Eustachische-Röhre zu vermeiden. Die Deafferentierung der Haarsinneszellen wurde anschließend mittels 10%iger chemischer Atoxyl-Lösung (200 µl, 1:10 Natriumhydrogen-4-aminophenylarsonat: Aqua ad inject.) (Vignaux et al., 2012) forciert, welche komplementär injiziert wurde. Danach wurde das Operationsfeld mit vier bis fünf Knopfheften (0,5 metric, Ethicon) verschlossen. Kreislaufunterstützend wurden s.c. in die linke und rechte Flanke je 2,5 ml körperwarmer 0,9%-isotonischer Natriumchlorid-Lösung injiziert. Prophylaktisch wurde post operativ 1 mg/kg des Antibiotikums Marbofloxacin (Marbocyl®, Vétoquinol) s.c. appliziert. Unter Beobachtungskontrolle erwachten die Tiere. Nach Erreichen des vollständigen Wachzustands wurden sie in ihre Heimatkäfige zurückgesetzt. Zur Erleichterung der Feuchtigkeitsaufnahme wurden Gelpads in die Käfige gelegt. An den folgenden drei Tagen wurde nochmals Marbofloxacin und Meloxicam s.c. einmal täglich in obengenannter Dosierung appliziert.

Bei Auftreten der folgenden gelisteten Symptome wurden die Tiere auf Grund tierschutzrelevanter Aspekte sowie mangelhafter Vergleichbarkeit vom Versuch ausgeschlossen:

- Körpergewichtsverlust von mehr als 15% nach UL
- Hornhautulcera, verursacht durch unbeabsichtigte Läsion des N. facialis während der UL
- Hämorrhagien aus dem cavum tympani bedingt durch unbeabsichtigte Perforation anliegender Gefäße. Die Diffusion des Bupivacains bzw. der Atoxyl-Lösung in den inneren Gehörgang wird verhindert, was zu einer unzureichenden Deafferentierung der Sinneshaarzellen führt.
- Ausbleiben der erwarteten Schwindelsymptomatik sowie Auftreten von Abnormalitäten wie z.B. Konvulsionen, Paresen, Hemiparesen.

2.3 Tötung und Gewebeentnahme

Die Tötung der Tiere, die nicht für eine Gewebeentnahme vorgesehen waren, erfolgte in tiefer Isoflurannarkose durch intrakardiale (i.c.) Injektion von 0,4 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun®, 2%, Bayer).

Bei den Tieren, deren Gehirne für Gewebeproben entnommen wurden, wurde die Methode der transkardialen Perfusionsfixierung gewählt. Dabei wurde das natürliche Gefäßsystem benutzt, um eine rasche Durchspülung aller Gewebe mit einem Fixans zu erzielen. Bei dem Fixans handelte es sich um ein 1:1 Gemisch aus 8%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,2 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2). Um einen blutfreien Gewebeschnitt zu erhalten, wurde vor Einsatz des eigentlichen Fixans eine 0,01 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH-Wert 7,6) zur Ausspülung der Blutbahn verwendet. Die Tiere wurden mit 500 mg/kg Chloralhydrat (E. Merck) intra peritoneal (i.p.) narkotisiert. Für eine ausreichende Analgesie wurde 30 min zuvor 1 mg/kg Meloxicam (Metacam®, Boehringer-Ingelheim) s.c. appliziert. Nach erfolgter Thorakotomie wurde eine stumpfe Kanüle vom linken Herzventrikel aus in die Aorta vorgeschoben. Um einen Abfluss für das Blut und die Perfusionslösung zu schaffen, wurde das rechte Herzohr aufgeschnitten. Mittels einer Tropfinfusion erfolgte die Durchspülung mit 250-300 ml 4%igem PFA. Anschließend wurde das Gehirn aus der Schädelkalotte präpariert und für weitere 24 h in 4%igem PFA aufbewahrt, bevor es für mindestens drei Tage in eine Zuckerlösung überführt wurde. Diese diente dem Gefrierschutz bis zur weiteren Aufbereitung der Gehirne.

3. Verhaltensanalyse

Das pathologische Verhalten nach unilateraler peripherer vestibulärer Läsion ist zurückzuführen auf ein Tonusungleichgewicht in den Labyrinthen beider Gleichgewichtsorgane.

Die Beobachtung der postoperativen Symptomatik richtete sich u.a. nach dem Score-System von Bergquist und Kollegen (2008). Der Fokus lag auf drei Hauptsymptomen: Nystagmus, posturale Asymmetrie und Torticollis. Zusätzlich wurden perzeptive somatosensorische Einflüsse während der vestibulären Kompensation mittels des "Elevation-Tail-Rotation"-Tests untersucht.

Die Verhaltensanalyse wurde separat für jede Ratte in ruhiger Umgebung auf einer ca. 50 x 50 cm großen planaren Fläche durchgeführt. Zur Vermeidung zirkadianer Einflüsse erfolgte die Testung der Tiere immer zwischen 9.00 und 11.00 Uhr. Um postnarkotische Einflüsse zu verhindern, wurden die Tiere vor den μ PET-Scans getestet.

Die Intensität des Spontannystagmus wurde gestaffelt mit 6-10 Punkten bewertet, wobei 1 Punkt 60 Schlägen pro Minute (beat per minute, bpm) entspricht. Falls im Ruhezustand kein Nystagmus erkennbar war, wurde eine Stresssituation durch Aufheben der Tiere simuliert. Ließ sich dadurch ein Nystagmus provozieren, wurde dieser mit 1-5 Punkten gewertet, wobei wieder 1 Punkt einem bpm entspricht.

Die Bewertung des Torticollis erfolgte durch Beurteilung des Winkels zwischen dem Unterkiefer der Ratte zur Horizontalen. Es wurde eine dreiteilige Abstufung von 45°, 60° und 90° gewählt, welche einem Punktescore von 5, 7 und 10 entspricht.

Haltungs- und Stelldefizite sowie Fallneigung und Koordination wurden nach Bergquist (2008) wie folgt bewertet (Tab. 3):

Points	Behaviour
10	spontaneous barrel rolling
9	barrel rolling evoked by light touch or airpuff
8	recumbent position on de- afferented side without leg support:
7	some ipsi-lesional leg support
6	circular walking
5	moving around with bilateral leg support
4	moving around with occasional falls to the ipsi-lesional side
3	moving around leaning towards the ipsi-lesional side
2	hardly noticeable asymmetry
1	only noticeable when picked up

Tab. 2: Haltungsanalyse nach Bergquist (2008)

Posturale Asymmetrien, welche zur läsierten Seite verliefen, wurden mit einem positiven Vorzeichen bewertet, solche zur rechten Seite mit einem negativen Vorzeichen.

Zur Untersuchung perzeptiver somatosensorischer Einflüsse wurden die Tiere an ihrer Schwanzwurzel für wenige Sekunden in die Luft gehoben und der Grad der Körperdrehung um die Längsachse beurteilt. Dabei entsprachen 10 Punkte einer persistierenden Rotation um die Längsachse, 8 Punkte einer Drehung bis zu 360° und 6 Punkte einer Drehung von weniger als 180°. Kein Versuch der Drehbewegung wurde mit 0 Punkten bewertet.

4. Positronen-Emissions-Tomographie

4.1 PET-Scanner

Für die Durchführung der in vivo PET-Untersuchung wurde der Siemens Inveon P120 μ PET Scanner (Siemens Medical Solutions, München) verwendet. Dieser besitzt eine zentrale Ortsauflösung von 1,2 mm. Durch die von uns verwendeten dreidimensionalen Rekonstruktionsmechanismen (OSEM3D) konnte diese Auflösung im gesamten Gesichtsfeld erreicht werden, was zu einer homogenen Bildauflösung führte.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die sequentielle μ PET-Messung an insgesamt 45 Tieren. Die Datenakquisition erfolgte nach einem Protokoll von 30 Minuten statischer Emissionsmessung, gefolgt von einer sieben-minütigen Transmissionsmessung zur Schwächungskorrektur (siehe II.3.2). Einzelne Ausfälle waren begründet durch paravenöse Injektion, Syntheseschwierigkeiten der Radioaktivität sowie technische Ausfälle des PET-Scanners.

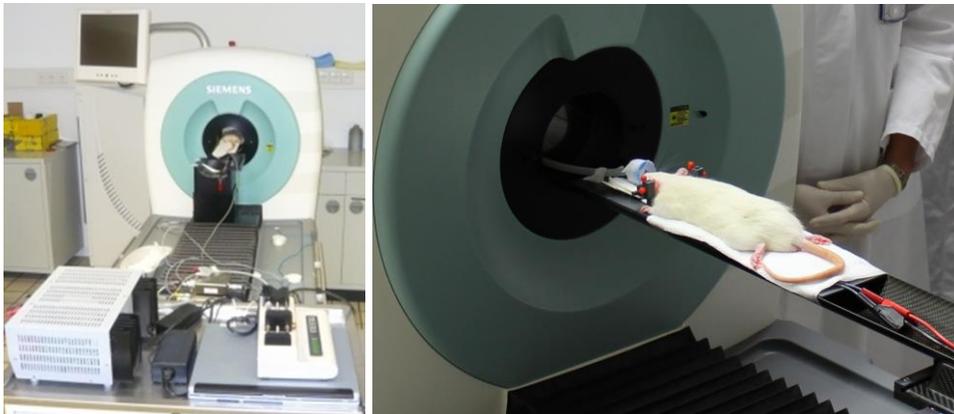


Abb. 12: Siemens Inveon P120 μ PET Scanner

4.2 Radiopharmakon

Künstliche Radionuklide werden überwiegend durch Kernreaktion im Kernreaktor (Neutronenbestrahlung) oder im Zyklotron hergestellt. Die relativ lange HWZ des ^{18}F von 110 Minuten erlaubte den Transport der Radioaktivität vom Herstellungsort zum Ort der Applikation.

Das in dieser Arbeit verwendete Radionuklid ^{18}F wurde von der Firma PET Net GmbH in Erlangen mittels 11MeV-Zyklotron, eines Ionen-Beschleunigers (Dual Beam mit max. 440 W pro Target) erzeugt. Der Tracer [^{18}F]FDG wurde synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Vor Ort fand eine Qualitäts- und Verwendbarkeitskontrolle nach „*Good Laboratory Practice*“ Vorschriften statt.

Bei jeglichem Umgang mit Radioaktivität wurden Nachweisgeräte für ionisierende Strahlung wie Film- und Ringdosimeter getragen.

4.3 Durchführung

Die Tiere gingen nach einer Akklimatisierungsphase von einer Woche nach Ankunft in den Versuch.

Dreißig Minuten vor Akquisitionsstart wurde den narkotisierten Ratten (Narkose siehe III.2.2) 50 ± 5 MBq des ^{18}F markierten Tracers FDG in eine der beiden lateralen Schwanzvenen mittels 24G-Braunüle appliziert. Diese relativ große Aktivitätsmenge ergab sich aus Erfahrungswerten (la Fougere et al., 2010, Xiong et al., 2012), um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis für neurologische Messungen zu erhalten. Das Volumen des Tracers wurde einheitlich mit isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung auf 500 μl aufgefüllt und nach Applikation mit 250 μl NaCl-Lösung nachgespült. Direkt nach Injektion erwachten die Ratten, um Kognition und Bewegung zu ermöglichen. Dies war für eine effektive cerebrale Anreicherung des Tracers von Bedeutung. Anschließend wurden die Ratten erneut narkotisiert und auf einer wärmenden (22°C) μPET -Liege in Bauchlage platziert (Abb. 12). An deren Ende befand sich eine Atemmaske zur Aufrechterhaltung der Narkose. Um Bewegungsartefakte zu minimieren und eine normierte Positionierung zu erreichen, erfolgte eine Fixierung der Rattenköpfe mittels eigens gebautem Stereotakten. Die Ratte wurde so platziert, dass sich das Gehirn im „*center field of view*“ (FOV) des Scanners befand. Dreißig Minuten nach Tracer-Injektion begann die Datenakquisition. Nach Beendigung der

Emission und Transmission wurden die Tiere, nach Erreichen des vollständigen Wachzustandes, in ihre Heimatkäfige zurückgesetzt. Im Anschluss an die Applikation wurden Spritze, Tupfer und Katheter mittels Aktivimeter rückgemessen, um die tatsächlich injizierte Aktivitätsmenge zu berechnen.

4.4 PET-Datenanalyse

4.4.1 Aufnahme der PET-Signale

Die Datenakquisition bestand aus einer Emissions- und einer anschließenden Transmissionsmessung. Bei der Datenerhebung im Rahmen des Emissionsscans wurden die Koinzidenzsignale aus der Annihilation des β^+ -Zerfalles detektiert. Für die Schwächungskorrektur der Emissionssignale wurde eine Transmissionsmessung durchgeführt, wobei eine im Scanner rotierende Co57-Quelle verwendet wurde. Beide Signale wurden in Datensätzen gespeichert (vgl. II.3.2).

4.4.2 Bildrekonstruktion

Die Bildrekonstruktion erfolgte mit der Software Inveon acquisition workplace (Siemens Medical Solutions, München). Für die dreidimensionale (3D) Rekonstruktion der PET-Bilder wurden die gespeicherten Datensätze zunächst in sog. Sinogramme umgeschrieben. Ein Sinogramm ist ein zweidimensionaler (2D) Datensatz aller Informationen der *lines of responses* (siehe II.3.2) aus Emissions- und Transmissionsscan einer Ebene, betrachtet aus verschiedenen Winkeln zum Objekt (Abb. 13). Mit Hilfe mathematischer Verfahren wurde anschließend aus diesen Sinogrammen ein 3D-Bild rekonstruiert. Von uns wurde die vom Hersteller empfohlene Kombination aus dem iterativen (engl.: *iteration* = Wiederholung) Algorithmus „Ordered Subsets Expectation Maximization“ (OSEM3D) und dem „3D Ordinary-Poisson Maximum a Priori“ (OP-MAP3D) Algorithmus zur Rekonstruktion verwendet. Die Bilddaten wurden mit vier Iterationen OSEM3D und 32 Iterationen OP-MAP3D, einer 128 x 128er Bildmatrix mit 159 Schichten und einem Zoom von 1,22 mm erstellt. Dies entsprach der effektiven Voxelgröße von 0,78 x 0,78 x 0,80 mm³ (Xiong et al., 2012). Ein Voxel ist ein volumetrisches Element und die kleinste Einheit im dreidimensionalen Bild.

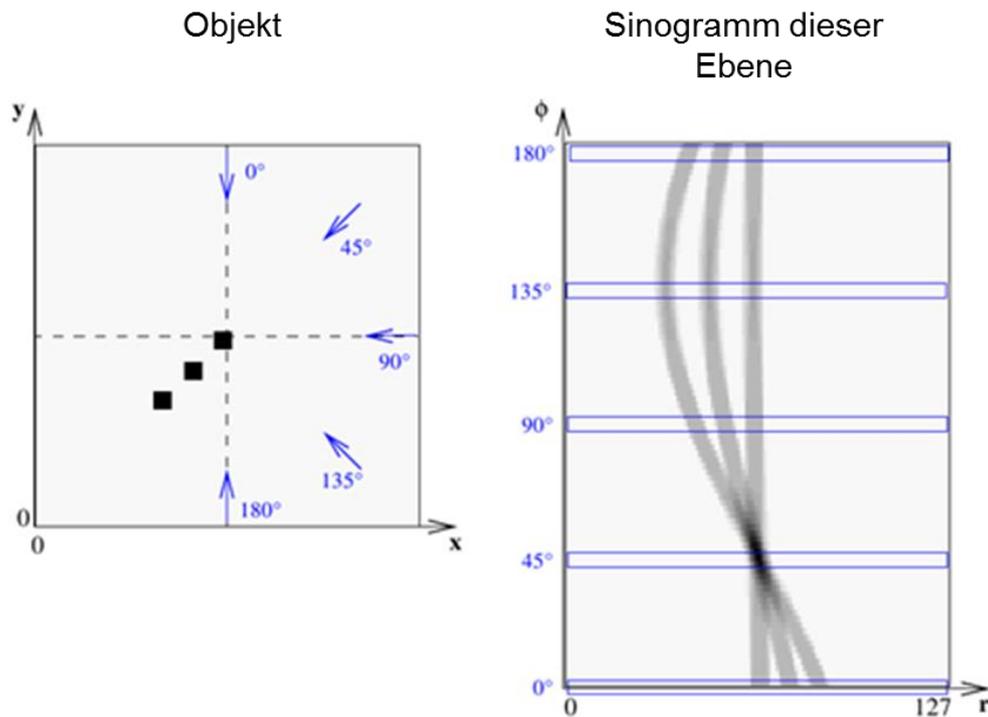


Abb. 13: Entstehung eines Sinogramms, links: Betrachtung des Objektes aus verschiedenen Winkeln, rechts: 2D-Darstellung der Information jeder Winkelprojektion (persönliche Mitteilung nach Boening, G.)

4.4.3 Coregistrierung und Normalisierung

Um eine aussagekräftige Vergleichbarkeit der Bilder untereinander bezüglich der Gehirnaktivität zu erreichen, wurden die Bilder im Anschluss an die Rekonstruktion stereotaktisch coregistriert und normalisiert (Abb. 14, 15). Zunächst wurden die Bilder in das Montreal Neurological Institute (Minc) Format konvertiert. Die Coregistrierung erfolgte auf ein 3D-implementiertes anatomisches FDG-Template mit den drei Freiheitsgraden der Rotation und Translation (Xiong et al., 2012). Das Template wurde aus einem Durchschnitts-Summationsbild der Gehirne zwanzig gesunder Ratten rekonstruiert (la Fougere et al., 2010) und auf einen histologischen Atlas des Rattengehirns gelegt. Dies erfolgte mithilfe der „statistical parametric mapping“ Software Version 5 (SPM5, Wellcome Department of Cognitive Neurology, London (Selimoglu, 2007)). Anschließend wurden die Bilder manuell auf ihre Größe normalisiert.

Die Aktivitätsverteilung wurde anhand der regionalen Glucosemetabolismusrate (regional cerebral metabolic rate of glucose = rCMR(glc)) bestimmt. Die Normalisierung richtete sich nach der Aktivitätsverteilung auf den sog. „Global Mean“. Dieser beschreibt das Verhältnis der durchschnittlich gemessenen Aktivitätsmenge pro Voxel im Gehirn zur detektierten Gesamtaktivität im Gehirn:

$$\text{Global Mean} = \frac{\text{Aktivität eines Voxels im Gehirn}}{\text{Gesamte durchschnittliche Aktivität im Gehirn}}$$

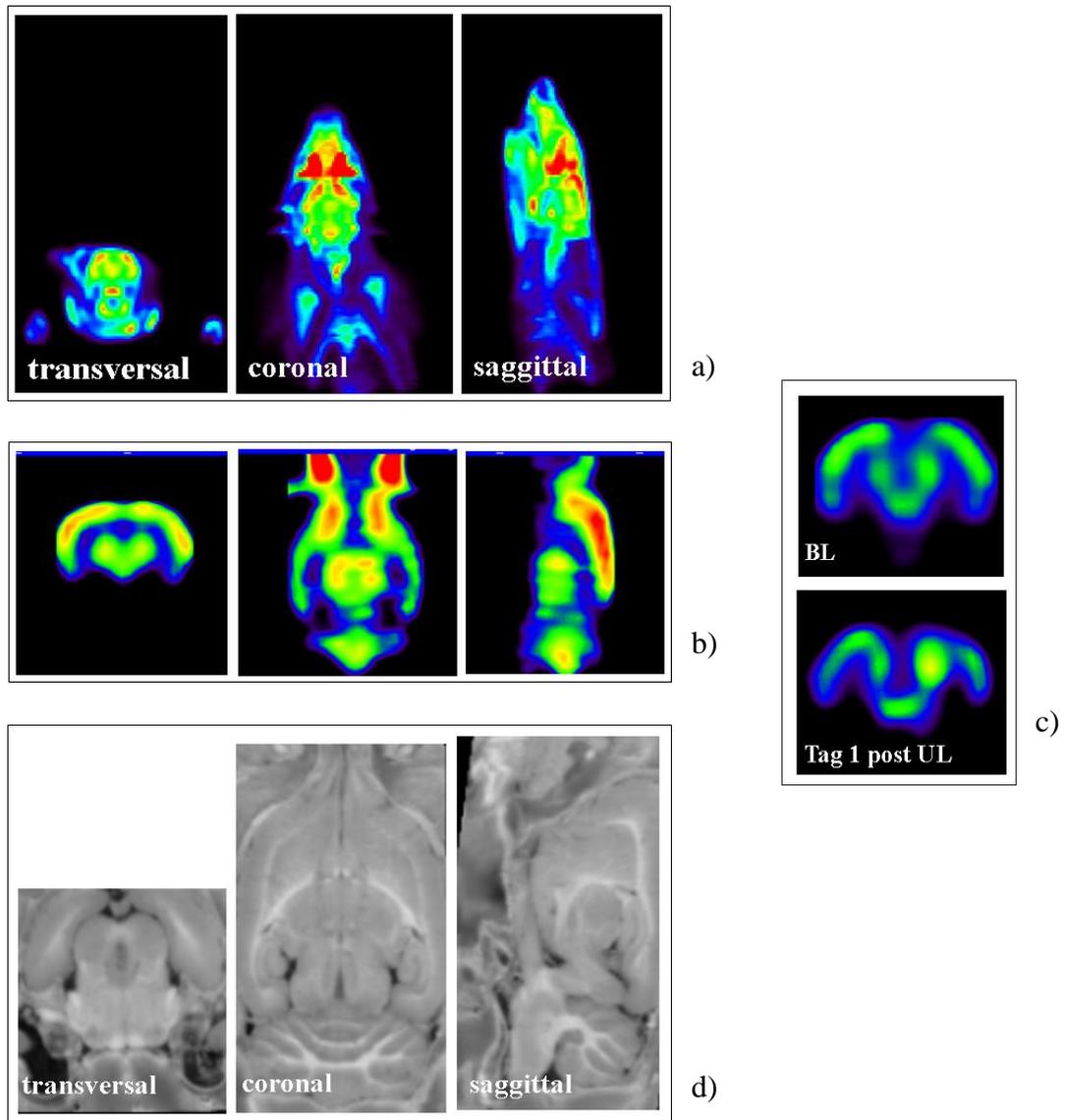


Abb. 14: a) rekonstruiertes μ PET-Bild einer Ratte: dargestellt in transversaler, coronaler und sagittaler Schnittführung b) μ PET-Bild: stereotaktisch coregistriert, normalisiert auf Größe + „Global Mean“. c) Transversale Ebene; anatomische Korrelationsebene: Colliculus inferioris (Oben BL-Scan: symmetrische Aktivitätsverteilung der $rCMR_{glu}$. Unten: Day 1 Scan post UL: Asymmetrische Aktivitätsverteilung der $rCMR_{glu}$ im Bereich des Colliculus inferioris) d) Histologisches Rattentemplate.

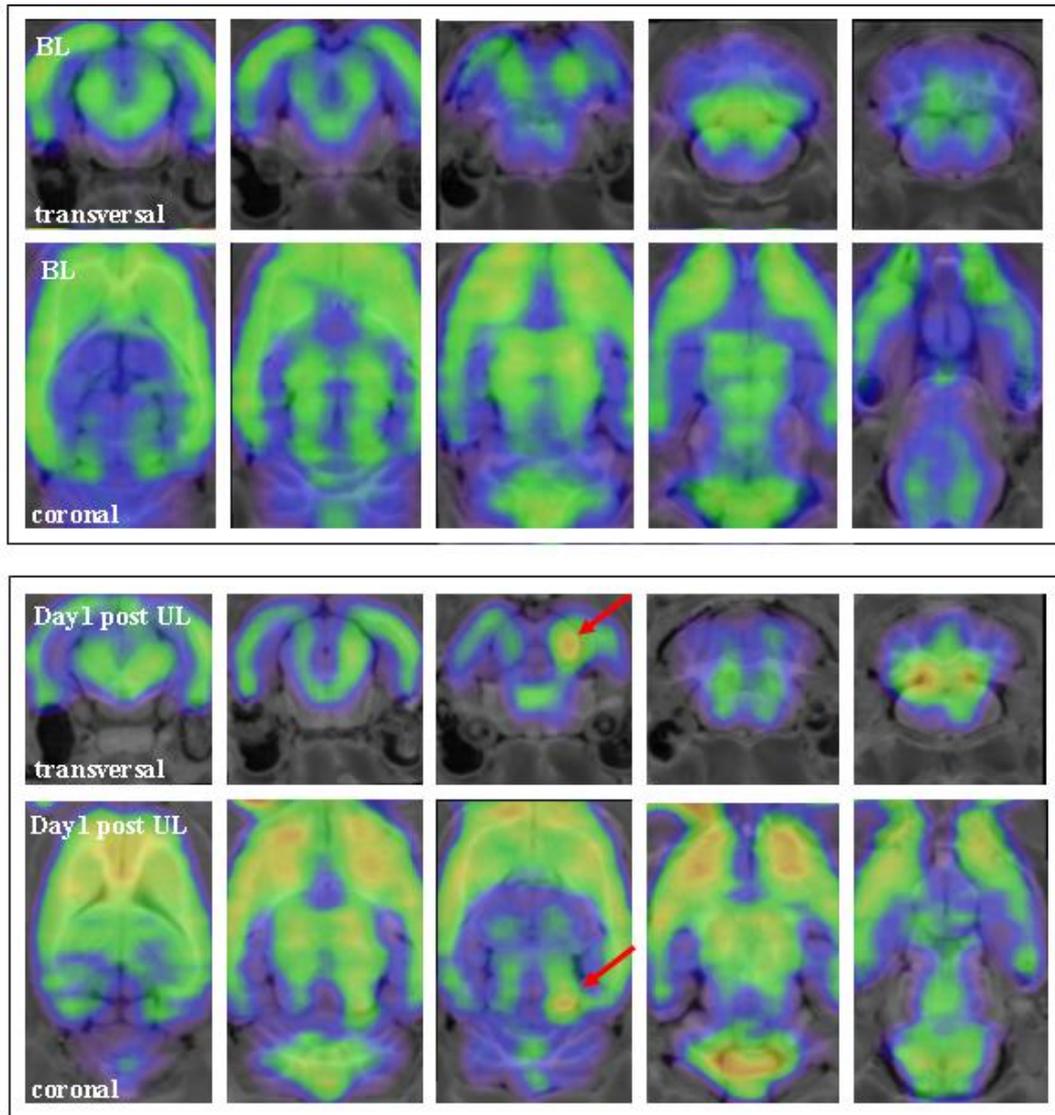


Abb. 15: Bildfusion: Template und μ PET-Bild. Darstellung in VINCI. oben: Baseline-Messung *BL* transversale und coronale Ebene, unten: Tag 1 nach UL transversale und coronale Ebene, Roter Pfeil markiert seitenbetonte Asymmetrie der $rCMR_{glc}$ im Bereich des Colliculus inferioris.

5. Herstellung der pharmakologischen Lösungen

5.1 N-Acetylleucin

Die zu untersuchenden Substanzen der N-Acetylleucine: VO251 – N-Acetyl-L-leucin, VO148 - N-Acetyl-D-leucin, L0014 – N-Acetyl-DL-leucin wurden von der Firma Pierre Fabre (Institut de Recherche, Toulouse, Frankreich) in kristalliner Form zur Verfügung gestellt. Die Dosierung von 60 mg/kg/d in einem Volumen von 2,5 ml NaCl appliziert an drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde von der Firma festgelegt. Sie basierte auf firmeninternen Daten früherer präklinischer Studien zur Wirksamkeit und Verträglichkeit bei der Ratte. Am Tag vor Therapiebeginn wurde eine Stocklösung der jeweiligen Substanz hergestellt. Das Solvens entstand durch eine 1:2-Mischung von 20%iger NaOH- mit 0,9%iger NaCl-Lösung, wobei sich ein stark basischer pH-Wert von ~13,4 ergab. Dieser pH-Wert erwies sich als essentiell für die vollständige Löslichkeit der Wirkstoffe. Um eine sterile Lösung für i.v. Injektion zu erhalten, wurde steril filtriert (Acrodisc® Syringe Filter, 0,2 µm). Anschließend wurde die Lösung mit 6 M HCl auf den physiologischen pH-Wert von 7.5 ± 0.5 eingestellt und mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf das Endvolumen von 30 ml aufgefüllt. Für den Behandlungszeitraum von drei Tagen wurde diese Lösung bei +4°C kühl gelagert. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert für jede Ratte.

5.1. 4-Aminopyridin

Die Reinsubstanz 4-Aminopyridin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) wurde für orale Applikationsanwendung in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und auf ein Volumen von 0,5 ml/Ratte adjustiert. Eine Dosierung von 1 mg/kg/d wurde aus Erfahrungswerten eines zuvor durchgeführten Pilotversuches gewählt und erfolgte gewichtsadaptiert.

6. Versuchsaufbau der pharmakologischen Studien

Alle Tiere wurden einer chemischen unilateralen Labyrinthektomie (UL) unterzogen. Dieser Eingriff stellte während aller Versuchsprotokolle die Ausgangssituation für cerebrale Veränderungen sowie neuronale Plastizität und Kompensationsmechanismen während und nach chemischer einseitiger Labyrinthektomie dar. Mittels Verhaltens-, gefolgt von nuklearmedizinischen Untersuchungen wurde der Effekt verschiedener Pharmaka auf die zentrale vestibuläre Kompensation longitudinal an mehreren Tagen untersucht.

Parallel zu jeder Therapiegruppe wurden pharmakologisch unbehandelte, labyrinthektomierte Tiere untersucht, welchen anstatt des Wirkstoffes lediglich die jeweilige Trägersubstanz (= Vehikel-Kontroll-Tiere, kurz: Vehikel-Tiere, V) appliziert wurde.

6.1. Versuchsaufbau: N-Acetylleucin

Das Versuchsdesign zur Untersuchung der Acetylleucinformen: L0014 – N-Acetyl-DL-leucin = Racemat DL, VO251 – N-Acetyl-L-leucin = L, VO148 - N-Acetyl-D-leucin = D teilte sich in zwei Abschnitte (Tab. 3). Der erste Abschnitt basierte auf Verhaltensanalysen. Im Zweiten wurden in Korrelation mit der Verhaltensuntersuchung longitudinale μ PET-Scans durchgeführt.

Abschnitt 1:

Zunächst interessierte die Fragestellung, ob einer der genannten Wirkstoffe einen Effekt auf zentrale vestibuläre kompensatorische Mechanismen ausübt. Die Beurteilung erfolgte auf der Ebene der neurologischen Verhaltensuntersuchung nach Bergquist und Mitarbeiter (Bergquist et al., 2008).

28 Tiere wurden einer UL unterzogen und randomisiert in vier Gruppen (DL, D, L, V) aufgeteilt. Während der ersten drei Tage nach UL erhielten die Tiere täglich zwischen 9.00 und 11.00 Uhr eine i.v. Applikation des jeweiligen Wirkstoffs bzw. Vehikels (60 mg/kg/d, für eine 400 g Ratte in 1 ml). Parallel hierzu wurde post UL an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 9 und 15 die Verhaltensuntersuchung durchgeführt. Aufgrund narkosebedingter Einflüsse auf die Kompensation wurde das Verhalten stets vor der Medikamentenapplikation untersucht. Aus einem Pilotversuch ging hervor, dass kein Akuteffekt innerhalb der ersten zwei Stunden nach Applikation des Medikaments auf die vestibuläre Kompensation auftritt.

Nach einem signifikanten Verhaltensunterschied widmete sich der Folgeversuch der Dosis-Wirkungs-Studie des wirksamen Pharmakons. Dazu erfolgte im analogen Versuchsaufbau die verhaltensbasierte Analyse nach Applikation des Wirkstoffs N-Acetyl-L-leucin in drei unterschiedlichen Dosierungen (60 mg/kg, 15 mg/kg, 3,75 mg/kg) und des Vehikels. Dafür wurden 30 Ratten unilateral labyrinthektomiert.

Im Anschluss an die Applikation wurden Proben der hergestellten Lösungen zur Analyse eingeschickt.

Abschnitt 2:

Anschließend wurden mittels funktioneller μ PET-Bildgebung neuronale Veränderungen anhand der relativen cerebralen Glucosemetabolismusrate im ZNS bei der N-Acetyl-L-leucin, N-acetyl- D-leucin- sowie einer Vehikel-Gruppe longitudinal untersucht. 21 Tiere wurden einer UL unterzogen und randomisiert in drei Gruppen (D, L, V) aufgeteilt. An den Tagen 1, 3, 7 und 15 nach UL wurde ein [18 F]-FDG- μ PET-Scan durchgeführt. Zusätzlich fand an den aufgeführten Tagen die Verhaltensanalyse statt.

Abschnitt I <u>Verhaltens-</u> <u>untersuchung</u>	Effekt von N-Acetyl-DL-leucin und den Enantiomeren (60 mg/kg) auf das Kompensationsverhalten nach UL
	4 Gruppen (je 6±1 Ratten) DL: N-Acetyl-DL-leucin D: N-Acetyl-D-leucin L: N-Acetyl-L-leucin V: Vehikel
	Dosis-Wirkung von N-Acetyl-L-leucin auf das Kompensationsverhalten nach UL
	4 Gruppen (je 6±1 Ratten) 60: N-Acetyl-L-leucin (60,00 mg/kg) 15: N-Acetyl-L-leucin (15,00 mg/kg) 3,75: N-Acetyl-L-leucin (3,75 mg/kg) V: Vehikel
Abschnitt II <u>Verhaltens-</u> <u>untersuchung +</u> <u>[18F]FDG-μPET</u>	Effekt der Wirkstoffe (60 mg/kg) auf cerebrale Kompensationsmechanismen nach UL
	3 Gruppen (je 6 Ratten) D: N-Acetyl-D-leucin L: N-Acetyl-L-leucin V: Vehikel

Tab. 3: Übersicht über den Versuchsaufbau: N-Acetylleucin (Abschnitt I und II)

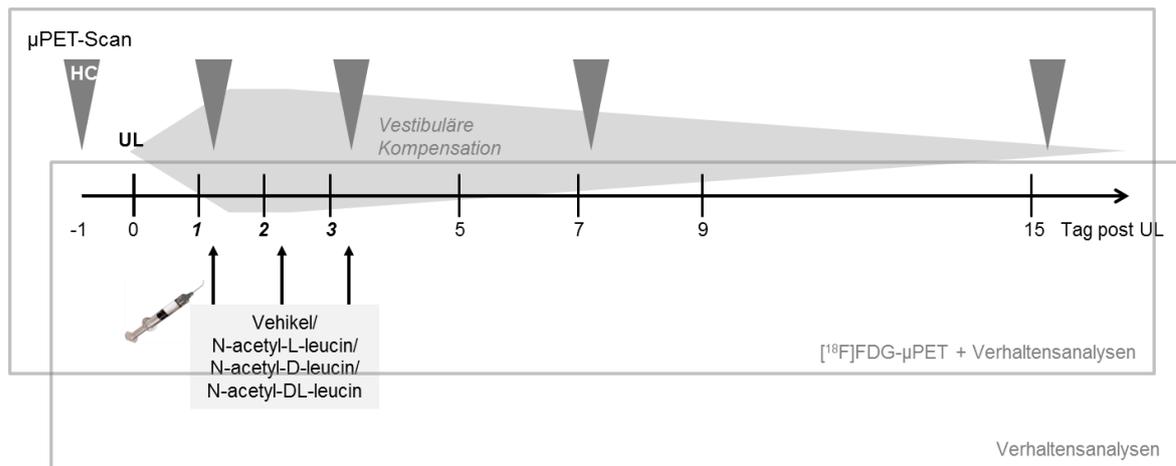


Abb. 16: Longitudinaler Versuchsaufbau N-aceytlleucine. An den Tagen 1, 2 und 3 erfolgte die Applikation. Auf der Zeitleiste wurde an den markierten Tagen post UL die Verhaltensanalysen durchgeführt. Die Dreiecke symbolisieren die μ PET-Scans. *UL* unilaterale Labyrinthektomie, *HC* Healthy Control.

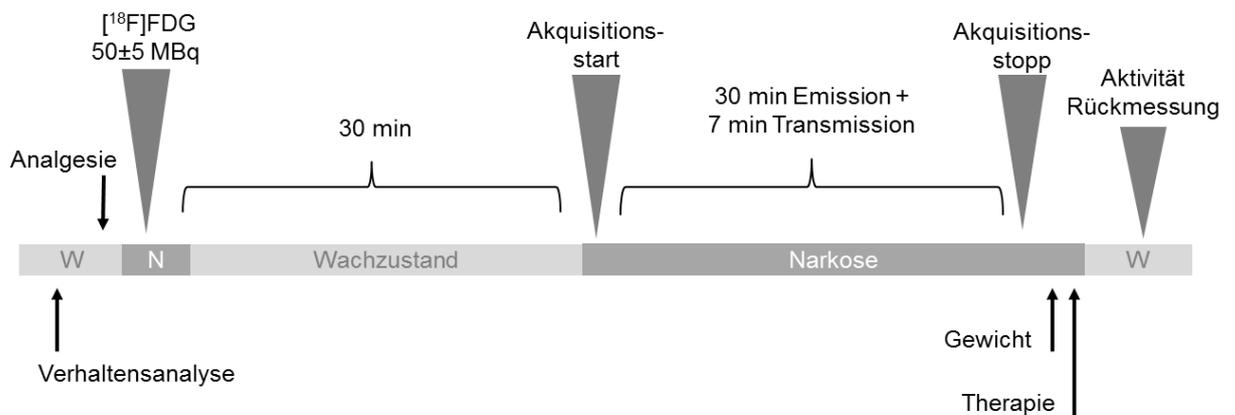


Abb. 17: μ PET-Messprotokoll, Detailansicht: Tag 1 und 3. Die $[^{18}\text{F}]$ -FDG Injektion erfolgte unter Isoflurannarkose (N). Anschließend erwachten die Tiere (W) und bewegten sich frei. Nach 30 Minuten erfolgte der μ PET-Scan: 30 min. Emission, gefolgt von 7 min. Transmission. Die Verhaltensanalysen erfolgten auf Grund narkosebedingter Einflüsse vor dem μ PET-Scan. Die Therapie erfolgte danach.

6.2. Versuchsaufbau: 4-Aminopyridin

Basierend auf einem zuvor durchgeführten Pilotversuch wurde eine wirksame und verträgliche Dosierung von 1 mg/kg/d in einem Volumen von 500 µl pro Ratte festgelegt. Die Applikation erfolgte oral an den ersten drei Tagen nach UL. Es wurde ein Akuteffekt (zwei Stunden post UL) des Wirkstoffs auf die vestibuläre Kompensation anhand neurologischer Verhaltensanalysen festgestellt. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde die Verhaltensuntersuchung vor sowie 1,5 Stunden nach oraler Applikation des 4-Aminopyridins an den Tagen 1, 2, 3 sowie an den Tagen 5, 7, 9, 15, 21 analog zu N-Acetylleucin durchgeführt (Abb. 18). Parallel hierzu erfolgten µPET-Scans an Tag 1 zwei Stunden nach 4-AP sowie am Tag 3 direkt vor der Applikation (Abb. 19). Weitere [¹⁸F]-FDG-µPET-Scans erfolgten an den Tagen 7 und 15 nach UL. Parallel wurde eine Vehikel-Gruppe, welche die Trägersubstanz per os erhielt, untersucht.

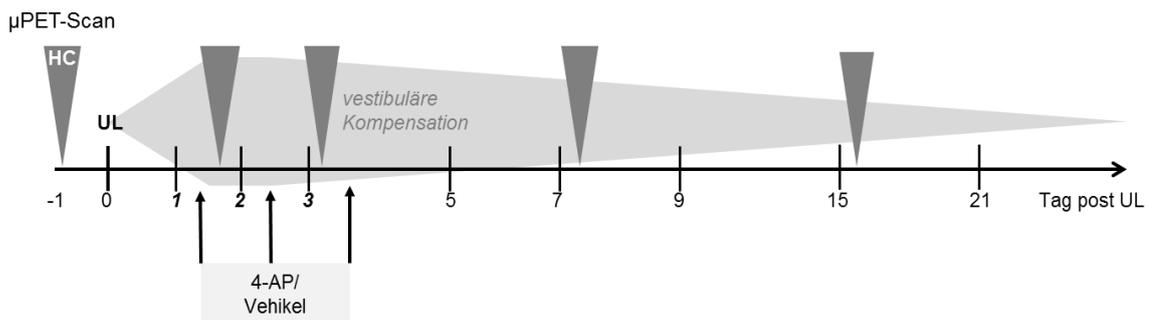


Abb. 18: Longitudinaler Versuchsaufbau 4-Aminopyridin 4-AP. An den Tagen 1, 2 und 3 erfolgte die Applikation. Auf der Zeitleiste wurde an den markierten Tagen post UL die Verhaltensanalysen durchgeführt. Die Dreiecke symbolisieren die µPET-Scans. *UL* unilaterale Labyrinthektomie, *HC* Healthy Control.

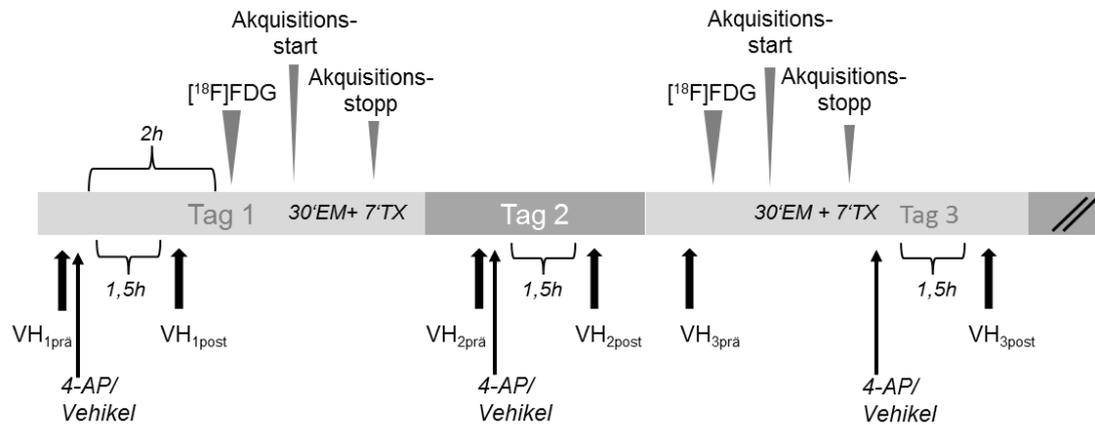


Abb. 19: μPET -Messprotokoll, Detailansicht für Tag 1-3. *VH* Verhaltensuntersuchung. $[^{18}\text{F}]\text{-FDG-}\mu\text{PET}$ erfolgte am Tag 1 vor und am Tag 3 nach Applikation von 4-AP/Vehikel . Nach $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ Injektion erwachten die Tiere aus der Narkose und bewegten sich frei. Nach 30 Minuten erfolgte der μPET -Scan ($30'\text{EM}+7'\text{TX}$). Die Verhaltensanalysen erfolgten an den Tagen 1, 2 und 3 jeweils vor und nach Applikation. *EM* Emissionscan, *TX* Transmissionscan.

Direkt im Anschluss an beide Experimentalserien wurden die Tiere perfundiert.

7. Histologische Aufarbeitung

Die histologische Aufarbeitung diente der Überprüfung von struktureller Integrität der Gehirnareale der unilateral labyrinthektomierten Ratten. Die Färbung diente der Orientierung, ob kompensationsrelevante Strukturen, wie die Nuclei vestibulares mit physiologisch anatomischen Strukturen integer sind.

7.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Mit Hilfe eines Kryostaten (Typ-CM1510, Leica, Nussloch) wurden Gefrierschnitte der perfusionsfixierten Gehirne (Abb. 20) hergestellt. Bei einer Messertemperatur von -19°C wurden Gehirnschnitte einer Dicke von $20\ \mu\text{m}$ erstellt und direkt mit Adhäsionsobjektträger (Super Premium, VWR, Leuven) aufgenommen. Kompensationsrelevante Gehirnareale befanden sich zwischen dem caudalen Ende des Cerebellums und reichten bis zur rostralen Begrenzung des Thalamus. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gefrierschnitte bei -80°C zwischengelagert.

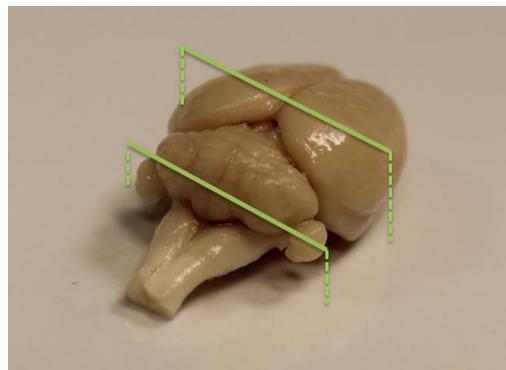


Abb. 20: Perfusionsfixiertes Rattengehirn. Grüne Linien markieren den kompensationsrelevanten Bereich: craniales Vestibulocerebellum bis caudaler Teil des Thalamus

7.2. Kresylviolett-Färbung

Die Kresylviolett-Färbung ist eine Übersichtsfärbung der Neurohistologie. Der Farbstoff Kresylviolett stammt aus der chemischen Familie der Oxacine und färbt Nissl-Schollen, eine Ansammlung von rauem endoplasmatischem Retikulum der Neurone, blau-violett. Die Färbung beruht auf einer spezifischen Adhäsion an basophile Verbindungen wie RNA und DNA. Nissl-Schollen befinden sich ausschließlich im Zellkörper, weshalb die Axone und Dendriten ungefärbt bleiben. Gliazellen besitzen keine Nissl-Schollen, wodurch eine eindeutig Differenzierung dieser Zelltypen gegeben ist.

Die auf dem Adhäsionsträger fixierten Gehirnschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Es folgte eine Waschung der Schnitte zur Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 90%, 95% und 100%) zu je fünf Minuten und anschließend zur Entparaffinisierung zweimal zu je 15 Minuten in Xylol (Xylol-1, Xylol-2). Um die Zellen der Gehirnschnitte letztens für den Farbstoff zu präparieren, wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe zu je fünf Minuten und weiterhin für zehn Minuten in destilliertes Wasser verbracht. Für acht Minuten wurden diese in frisch angesetzter Kresylviolett-Lösung (0,1% Cresylechtviolett + 0,5 ml Eisessig in 1 l Aqua dest., pH: 7,4) gefärbt. Nach einmaligem Waschen in destilliertem Wasser und anschließender Dehydrierung (70% Ethanol, 90%, 96%, 100% je 5 min, Xylol-1, Xylol-2 je fünfzehn Minuten) wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Entellan® fixiert.

8. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der Verhaltensdaten wurden mit der Software GraphPad Prism®, Version 5.06 für Windows 2010, durchgeführt. Bei den Verhaltensdaten, welche über ein Score-System ermittelt wurden, handelte es sich um ordinalskalierte Rangdaten. Die Scores wurden für jede Therapiegruppe als Median (MD) und dazugehörigem Interquartilsabstand (engl.: *interquartile range*, IQR) angegeben. Der IQR berechnet sich aus der Differenz der 25%- und 75%-Quartile der Verhaltensdaten. Innerhalb diesem befinden sich 50% der Messwerte. Longitudinale Vergleiche erfolgten mit dem Friedmann-Test, einem statistischen Test zur Untersuchung von drei oder mehr gepaarten nicht parametrischen Stichproben auf Gleichheit. Die Berechnung der Unterschiede zweier gepaarter Daten erfolgte mit dem Wilcoxon-Testverfahren.

Ein Intergruppenvergleich wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die falsche Annahme der Nullhypothese erfolgte bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Alle statistischen Berechnungen wurden zweiseitig durchgeführt.

Die μ PET-Datenanalyse erfolgte mittels der „statistical parametric mapping“ Software SPM5 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London (Selimoglu, 2007)). Voraussetzung dafür war die exakte Normalisierung und Coregistrierung (siehe III.4.4.3). Mittels der SPM-Analytik wurden Gruppenanalysen durchgeführt. Eine Gruppe setzte sich dabei jeweils aus der Anzahl der Tiere, welche die gleiche Behandlung erhalten haben, zusammen. Die Aktivitätsverteilung wurde voxel-weise von jedem Tier einer Gruppe mit dem Voxel jedes Tieres der anderen Gruppe verglichen. Dabei wurde ein multiples zwei Stichproben t-Testverfahren angewandt. Statistisch signifikante Unterschiede der relativen cerebralen Glucosemetabolismusrate, welche sich analog der Aktivitätsverteilung verhält, wurden berechnet und farblich dargestellt. Durch das multiple Testen steigt die Fehlerwahrscheinlichkeit, weshalb die Analysen bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ und einem Schwellenwert von 20 durchgeführt wurden. Der Schwellenwert wurde manuell gesetzt und beschreibt einen Wert, unter welchem Signale nicht detektiert werden, um ein Rauschen zu minimieren. Es wurden verschiedene SPM-Gruppenvergleiche angefertigt und analysiert: 1. Vergleiche einer Population von 20 gesunden Ratten, sog. *Healthy Controls* (HC), mit einer jeweiligen Therapie-Gruppe post UL (Abb. 21). 2. Intergruppenvergleiche der Tage post UL und nach Medikation

sowie 3. Vergleiche innerhalb einer Gruppe von μ PET-Messungen zu vorhergehenden Messzeitpunkten.

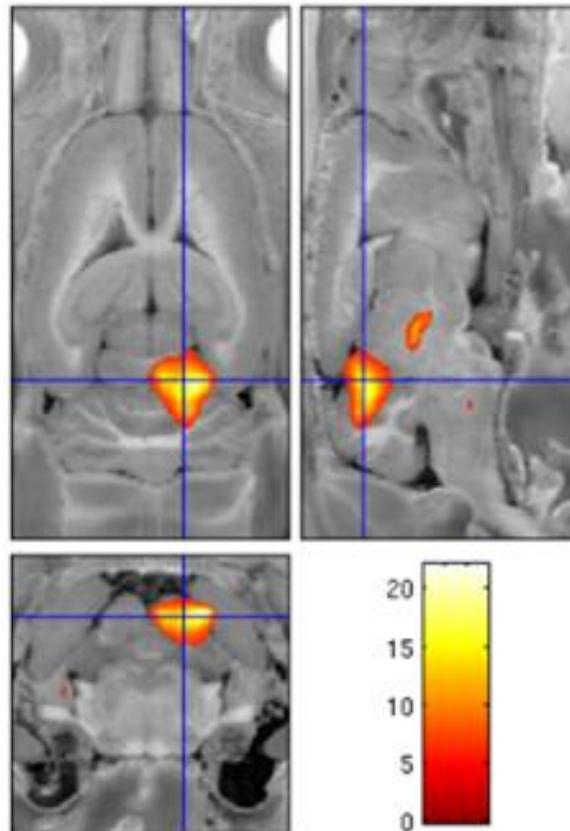


Abb. 21: statistical parametric mapping SPM5, Gruppenanalyse: HC (n=20) vs. Tag 1 post UL (n=6): Signifikante Asymmetrie der $rCMR_{glu}$ im contralateralen Colliculus inferioris. Farbskala definiert die Standardabweichung.

Anschließend wurden diese SPM-Gruppenvergleiche in ein Visualisierungsprogramm für neuronale Daten namens VINCI ("Volume Imaging in Neurological Research, Co-Registration and ROIs included"(Vollmar et al., 2004)) geladen und analysiert. Eine dargestellte Farbskala beschreibt die Standardabweichung der visualisierten Glucosemetabolismusrate von der Vergleichsgruppe. Dabei beschreibt rot eine Erhöhung der regionalen cerebralen Glucosemetabolismusrate, blau eine Verminderung.

Die histologischen Auswertungen erfolgten qualitativ.

IV. ERGEBNISSE

Darlegung pharmakologischer Effekte auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen nach einseitigem vestibulärem im Rattenmodell der chemischen UL

Die standardisierte Durchführung der chemischen unilateralen Labyrinthektomie (UL) bei der Ratte stellte die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche dar. Dieses Rattenmodell korreliert mit dem klinischen Bild des idiopathischen Vestibularsyndroms des Hundes und der Neuritis vestibularis des Menschen. Insgesamt wurden 104 Ratten der chemischen unilateralen Labyrinthektomie unterzogen. Die transtympanale Applikation der Bupivacain- und Atoxyl-Lösung führte bei 90 von 104 operierten Ratten zu einer Schädigung des linken Gleichgewichtsorgans. Dies hatte eine Schwindelsymptomatik, gekennzeichnet durch posturale Asymmetrie, Nystagmus und Torticollis zur Folge. 12 Tiere verstarben während des Eingriffes und zwei wurden wegen mangelnder Schwindelsymptomatik vom Versuch ausgeschlossen. Die Ausfallrate betrug somit 13%.

Versuch		Anzahl Ratten: UL	Ausfall: verstorben/ Blutung während UL	Ausfall: keine Symptome post UL	Ausfall -rate ~ (%)	Anzahl Ratten im Versuch
Einfluss von N-acetyl-leucin	Vergleich N-Acetyl-DL-leucin und Enantiomere	28	3	1	14	24
	Dosis-Wirkung	30	3	1	13	26
	Cerebraler Glucosestoffwechsel	21	3	0	14	18
4-Aminopyridin		25	3	0	12	22
INSGESAMT		104	12	2	13	90

Tab. 4: Übersicht über die Anzahl der in dieser Arbeit verwendeten Ratten

Die Verhaltenstestung basierte auf einem Score nach Bergquist et al. (2008). Die maximale Symptomausprägung wurde mit zehn Punkten bewertet. Null Punkte spiegelten das physiologische Verhalten wider (siehe III.3). Bei den Symptom-Scores handelt es sich um ordinalskalierte Rangdaten. Diese wurden gemittelt und

für jede Gruppe als Median und Interquartilsabstand (MD, IQR) beschrieben sowie longitudinal in Abhängigkeit der zu untersuchenden Tage graphisch dargestellt.

1. Pharmakologisch unbeeinflusste vestibuläre Kompensation

Die Mechanismen der vestibulären Kompensation nach peripherem vestibulären Schaden werden zunächst an einer Gruppe von Tieren beschrieben, welche die Trägersubstanz der zu testenden Medikamente appliziert wurde (Vehikel-Kontroll-Gruppe = Vehikel-Gruppe). Um die statistische Aussagekraft zu maximieren, wurden die Vehikel-Gruppen aus den Experimentalserien des N-Acetylleucin-Versuchs zu einer Gruppe von 17 Tieren zusammengefasst. Voraussetzung war eine Testung der Verhaltensdaten auf Gleichheit nach Versuchsende, die positiv ausfiel.

1.1 Haltungstestung: Kompensation von posturaler Asymmetrie, Nystagmus, Torticollis und Elevation-Tail-Rotation

Direkt nach der UL in der postnarkotischen Phase entwickelten alle Ratten eine akute Schwindelsymptomatik, gekennzeichnet durch Spontannystagmus, posturale Asymmetrie, Torticollis und einen positiven Elevation-Tail-Rotation-Test. Nach Erreichen des völligen Wachzustandes war bis auf den Nystagmus keine Schwindelsymptomatik mehr feststellbar. Diese baute sich progredient auf, bis sie um den zweiten Tag post UL die maximale Ausprägung erreichte.

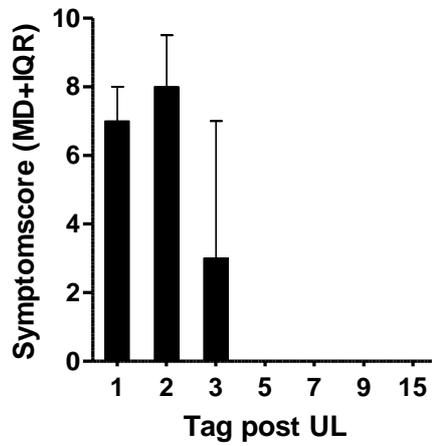
Die Intensität des Spontannystagmus war am Tag 1 mit einem MD von 7 (IQR: 2) und am Tag 2 mit einem MD von 8 (IQR: 3,5) post UL ausnahmslos am stärksten ausgeprägt. Diese Symptomatik verschwand kontinuierlich bis Tag 5 bei allen Tieren (Abb. 22 a).

Die Ausprägung der posturalen Asymmetrie steigerte sich progredient über Tag 1 (MD: 5, IQR: 3,5) zu Tag 2 (MD: 8, IQR: 4) bis zu einem Maximum am Tag 3 (MD: 9, IQR 2,5). 8 Tiere zeigten innerhalb der ersten 3 Tage nach UL die maximale Symptomausprägung „Barrel rolling“. Nach Tag 3 trat eine sukzessive Besserung der Symptomatik bis Tag 15 (MD: 5, IQR: 3) ein. Dies entspricht einer relativen Reduktion der Symptomatik zum Tag 3 von 44% (Abb. 22 b).

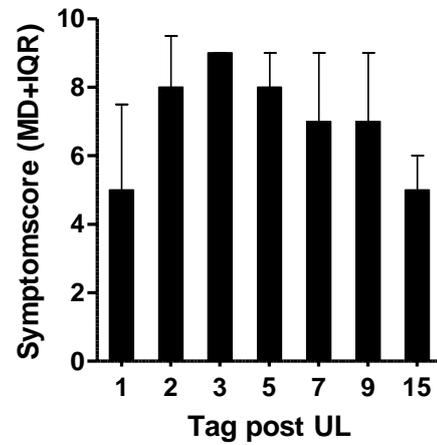
Der gerichtete Torticollis zur läsierten Seite persistierte einheitlich bis Tag 15

(MD: 7, IQR: 5). Am Tag 2 wiesen 82%, am Tag 3 94% der Tiere eine ipsilaterale Kippung von 90° auf. Am Tag 15 zeigten 6 Tiere eine Abweichung von der senkrechten Kopfhaltung von 90°, 6 Tiere von 60° und 4 Tiere korrigierten ihre Körper-Kopf-Achse bis auf 45° (Abb. 22 c). Der Score des Elevation-Tail-Rotation-Tests steigerte sich ebenfalls bis Tag 2 und persistierte bis Tag 9 auf dem maximalen, medianen Score von 10 (IQR: 2). Am Tag 15 war der Elevation-Tail-Rotation-Test immer noch mit einem MD von 8 (IQR: 3) auslösbar (Abb. 22 d).

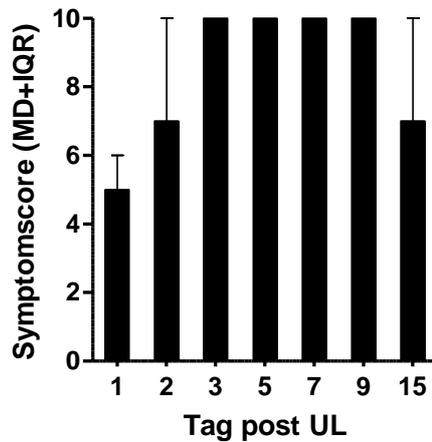
a) **Nystagmus**



b) **Posturale Asymmetrie**



c) **Torticollis**



d) **"Elevation Tail Rotation"**

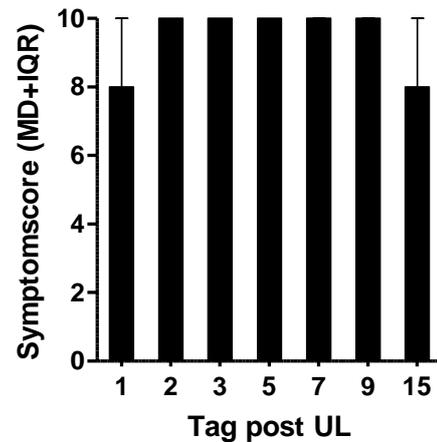


Abb. 22: Kompensationsdynamik nach UL. Dargestellt ist der Verhaltens-Score im Median *MD* + Interquartilsabstand *IQR* der Vehikel-Tiere ($n = 17$) im Zeitverlauf nach UL. a) Nystagmus: absolute Reduktion bis Tag 5, b) Posturale Asymmetrie: relative Reduktion der Symptomatik von Tag 2 bis Tag 15 um 38% ($p < 0,005$) und von Tag 3 bis Tag 15 um 44% ($p < 0,001$). Persistierend hoher Torticollis- c) und „Elevation Tail Rotation“-Score d) bis Tag 15.

Trotz der Schädigung des linken Gleichgewichtsorgans durch UL wurde bei allen Tieren eine stufenförmige Besserung des Nystagmus und der posturalen Asymmetrie beobachtet. Der Nystagmus verschwand dauerhaft einheitlich innerhalb der ersten 5 Tage. Die motorischen Imbalancen verringerten sich signifikant bis Tag 15. Der Torticollis sowie ein auslösbarer „Elevation-Tail-Rotation“-Test persistierten bis zum Versuchsende am Tag 15.

1.2 Cerebraler Glucosestoffwechsel während vestibulärer Kompensation

Bei 6 von den 17 Kontrolltieren wurde zusätzlich die relative Glucosemetabolismusrate im Gehirn ($rCMR_{glu}$) mittels [^{18}F]FDG- μ PET untersucht. Die μ PET-Messung erfolgte 4h nach UL sowie an den Tagen 1, 3, 7 und 15 nach UL.

Im Anschluss an die Bildprozessierung der Normalisierung und Coregistrierung wurden mittels SPM5 (“statistical parametric mapping“) Gruppenanalysen angefertigt. Dabei wurde ein multipler 2-Stichproben t-Test durchgeführt, welcher voxel-weise die *Counts* zwischen der *Healthy Control* (HC)-Gruppe (n=20) und der UL-Gruppe (n=6) verglich. Statistisch signifikante Unterschiede in der $rCMR_{glu}$ wurden bei einem Signifikanzniveau von 0,001 und einem Schwellenwert von 20 visualisiert. Rot leuchtende Areale visualisiert eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$, blaue eine Verminderung.

Es ließen sich folgende Effekte in der SPM-Analyse beobachten:

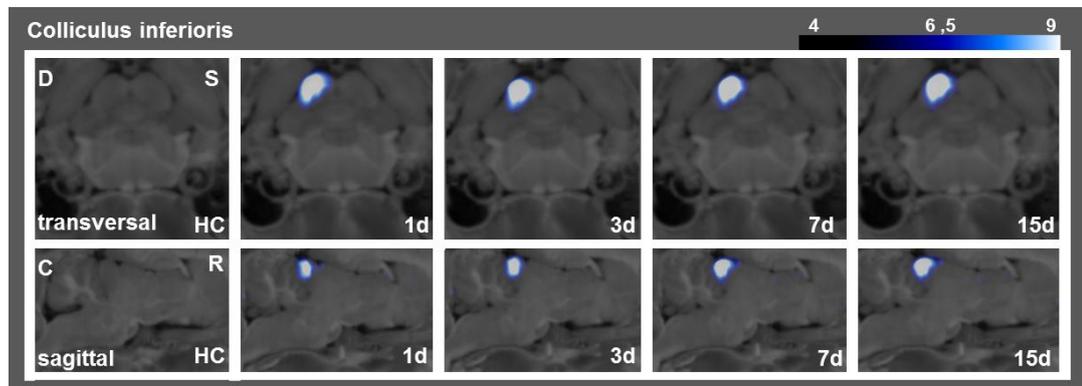
4h nach UL zeigten die Tiere im Vergleich zur HC-Population eine signifikant verminderte $rCMR_{glu}$ im contralateralen Colliculus inferioris sowie im auditiven Cortex der läsierten Seite (Abb. 23 a und b). Diese Minderaktivierung war zu jedem Messzeitpunkt reproduzierbar und unverändert darstellbar.

Im Cerebellum konnte 4h nach UL eine dynamische Zunahme der $rCMR_{glu}$ visualisiert werden. Diese Dynamik zeigte am Tag 7 ein Maximum ipsilateral (Abb. 23 c).

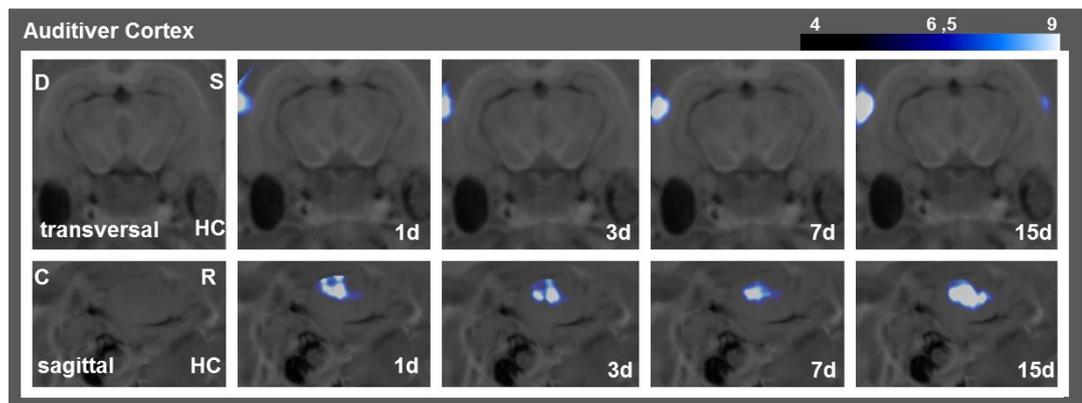
Der Vergleich des Glucosestoffwechsels im Vergleich zweier aufeinander folgender Messzeitpunkte zeigte im ipsilateralen vestibulären Kerngebiet 4h nach UL im Vergleich zur HC-Gruppe eine verminderte $rCMR_{glu}$. Diesem Effekt folgte eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im contralateralen vestibulären Kerngebiet am Tag 1 versus 4h post UL und eine Verminderung am Tag 3 versus Tag 1 post UL. An

den weiteren Tagen war keine Veränderung der Asymmetrie mehr zwischen den beiden Kerngebieten nachzuweisen (Abb. 24).

a)



b)



c)

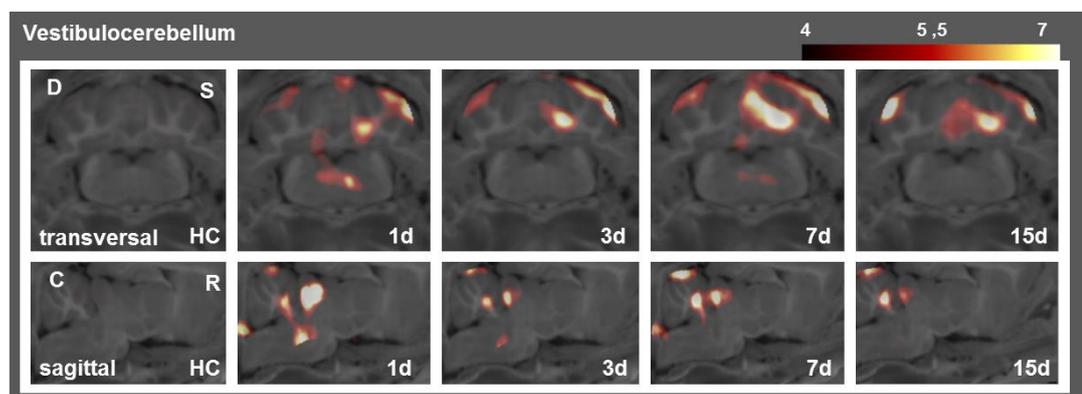


Abb. 23: Sequentielle [^{18}F]-FDG- μPET -Scans verschiedener Hirnareale vor und nach unilateraler Labyrinthektomie der Ratte. SPM-Analyse: UL-Gruppe versus gesunder Tiere (*HC*). a) und b) Signifikant verminderte $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ im contralateralen Colliculus inferioris und im auditiven Cortex an den Tagen 1, 3, 7 und 15 post UL darstellbar. c) Tag 1-15 post UL ipsilateral-betont erhöhte $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ im Cerebellum, zunehmend mit max. am Tag 7. Die Farbskalen visualisieren die Standardabweichung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ der UL-Gruppe im Vergleich zur HC-Gruppe. Rot visualisiert eine Erhöhung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$, blau eine Verminderung. *D* dexter *S* sinister *C* caudal *R* rostral *d* day post UL. UL-Gruppe $n=6$, *HC*-Gruppe $n=20$.

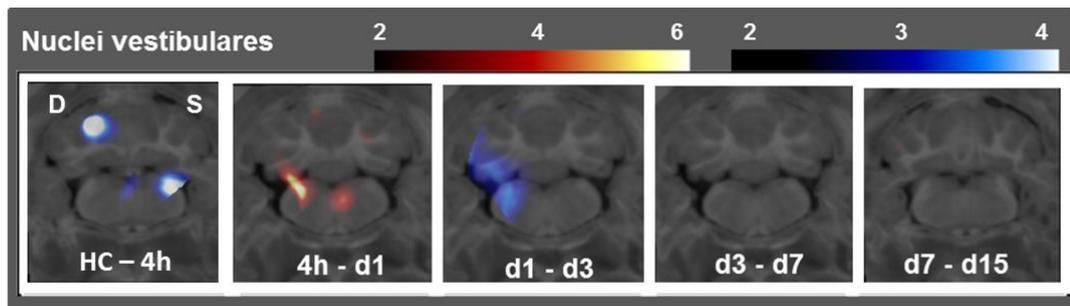


Abb. 24: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans vor und nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Analyse: Vergleich der UL-Gruppe zum jeweils vorhergehenden μ PET-Scan: 4h nach UL signifikant verminderte rCMR_{glu} der ipsilateralen Nuclei vestibulares (VN) und des contralateralen Cerebellums im Vergleich zur HC-Gruppe. 4h versus Tag 1 post UL: Erhöhung der rCMR_{glu} der contralateralen VN. Tag 1 versus Tag 3 post UL: Verminderung der rCMR_{glu} der contralateralen VN. *HC* Healthy Controls, *d* Tag post UL.

2. Einfluss von N-Acetylleucin auf die vestibuläre Kompensation – Vergleich: Racemat und Enantiomere

Die i.v. Applikation der Wirkstoffe erfolgte zwischen 9.00 Uhr und 11.00 Uhr an den ersten drei Tagen post UL. In einem Pilotversuch wurde das Verhalten direkt vor und eine Stunde nach Applikation getestet. Ein Akuteffekt wurde nicht festgestellt. Die Dosierung des N-Acetylleucins betrug 60 mg/kg, bzw. 15 mg/kg und 3,75 mg/kg. Diese Dosierungen wurden basierend auf internen präklinischen Firmendaten von Pierre Fabre (Institut de Recherche, Toulouse, Frankreich) zur Verträglichkeit und Wirksamkeit der Substanz gewählt.

2.1 Beschleunigte posturale Kompensation durch N-Acetyl-DL-leucin und N-Acetyl-L-leucin

Die Testungen erfolgten im Zeitverlauf wie in III.6.1 beschrieben.

Im ersten Schritt wurde untersucht, ob ein genereller Effekt der Wirkstoffe auf die vestibuläre Kompensation detektierbar ist. 28 Ratten wurden einer UL unterzogen und randomisiert auf vier Gruppen aufgeteilt. Die Gruppenstärke betrug: N-Acetyl-DL-leucin (DL): n = 6, N-Acetyl-L-leucin (L): n = 7, N-Acetyl-D-leucin (D): n = 6 und Vehikel (V): n = 5.

Nach UL zeigten alle Tiere die typischen Schwindelsymptome, Nystagmus, posturale Asymmetrie, Torticollis und einen positiven Elevation-Tail Rotation (ETT)-Test. Der Nystagmus-Score reduzierte sich in allen Gruppen innerhalb der ersten 5 Tage nach UL. Am Tag 7 war der Nystagmus bei 26 von 28 Tieren verschwunden. Der Torticollis sowie eine positive Testung des ETT persistierte einheitlich bis Tag 15. Bezüglich des Scores von Nystagmus, Torticollis und ETT zeigten die mit N-Acetylleucin therapierten Gruppen keinen signifikanten Unterschied zu den Scores der Vehikel-Tiere (Abb. 25).

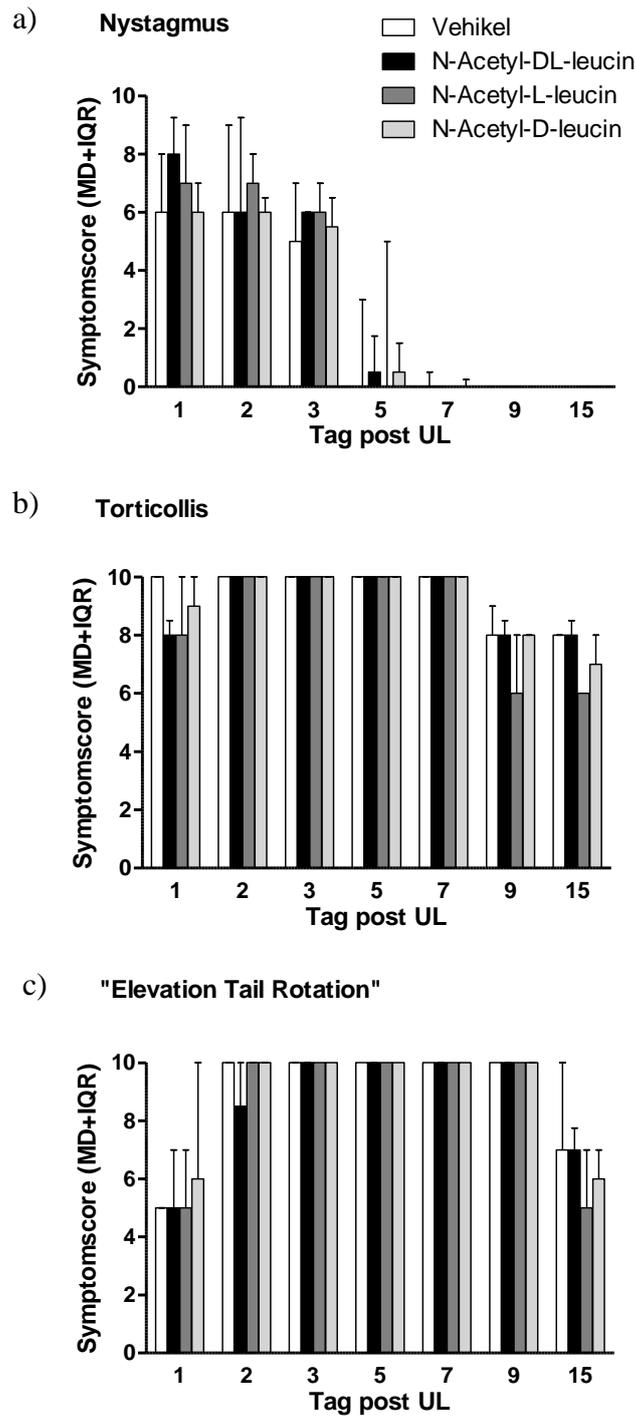


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der vestibulären Kompensation nach UL. Medianer (*MD*) Symptomscore und dazugehöriger Interquartilsabstand (*IQR*) dargestellt für die Vehikel-Gruppe sowie für die unterschiedlichen Therapiegruppen: N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin, N-Acetyl-D-leucin in den Symptomen a) Nystagmus, b) Torticollis und c) „Elevation-Tail-Rotation“. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Scores der therapierten und den Vehikel Tieren messbar.

Die posturale Asymmetrie baute sich in allen Gruppen kontinuierlich bis Tag 2 auf (Abb. 26 a)¹. Die Ausprägung der Symptomatik am Tag 2 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (N-Acetyl-DL-leucin: MD: 7, IQR: 6,25; N-Acetyl-L-leucin: MD: 9, IQR: 3; N-Acetyl-D-leucin: MD: 6, IQR: 7; Vehikel: MD: 9, IQR: 5). Die mit N-Acetyl-D-leucin behandelte Gruppe zeigte am Tag 7 die maximale Symptomausprägung mit MD: 9,5 (IQR: 6,25). Am Tag 15 zeigten alle Gruppen den gleichen MD von 3 (IQR_{DL}: 2,5, IQR_L: 3, IQR_D: 0,5, IQR_{Vehikel}: 2,5). In der Vehikel-Gruppe reduzierte sich der Score signifikant vom Tag 2 bis Tag 15 mit einer relativen Reduktion von 67%. Im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe zeigten die N-Acetyl-DL-leucin-Tiere bereits am Tag 7 im Vergleich zum Tag 2 eine stärkere Tendenz zur posturalen Stabilisierung als die Vehikel-Tiere. Diese Besserung steigerte sich sukzessiv bis Tag 15. Die Tiere, welche mit dem N-Acetyl-L-leucin therapiert wurden, zeigten am Tag 7 eine signifikante relative Reduktion im Vergleich zu Tag 2 der posturalen Asymmetrie von 56% ($p < 0,042$). Dieser Effekt steigerte sich bis Tag 9 (relative Reduktion zu Tag 2 von 67%; $p < 0,034$).

Am Tag 7 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 26 b): Im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (MD: 8, IQR: 2,5) war der Symptomscore der N-acetyl-DL-Tiere (MD: 5,5, IQR: 4,25) am Tag 7 signifikant reduziert ($p < 0,042$). Die N-Acetyl-L-leucin-Gruppe zeigte im Vergleich zur Vehikel-Gruppe ebenfalls eine signifikante Reduktion des posturalen Asymmetrie-Scores mit $p < 0,013$. Der Prozess der Kompensation wurde im Vergleich zur Vehikel-Gruppe um 6 Tage beschleunigt. Die Tiere, welche mit dem N-Acetyl-D-leucin therapiert wurden, zeigten einen Score, welcher nicht signifikant von der Vehikel-Gruppe abwich ($p < 0,778$). Die N-Acetyl-D-leucin-Tiere zeigten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede der posturalen Asymmetrie im Vergleich zu der N-acetyl-DL- ($p < 0,164$) und N-Acetyl-L-leucin-Gruppe ($p < 0,165$).

¹ (Rohdaten (MD+IQR) der posturalen Asymmetrie der N-Acetylleucin-Experimentalserie siehe Anhang)

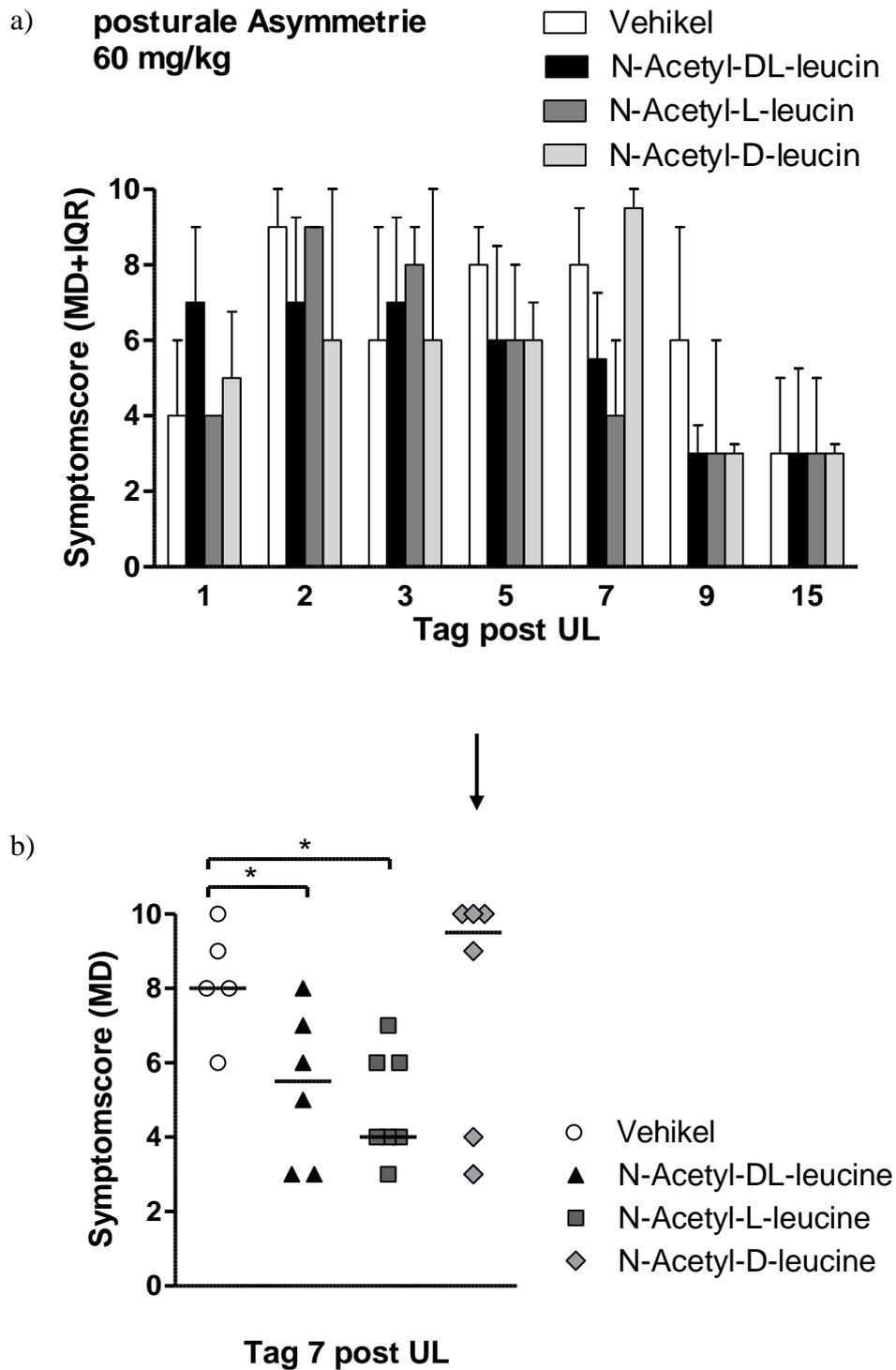


Abb. 26: a) Zeitlicher Verlauf der posturalen Kompensation nach UL. Dargestellt ist der mediane (*MD*) Verhaltens-Scores und entsprechender Interquartilsabstand (*IQR*) der Vehikel-Gruppe sowie der einzelnen Therapiegruppen: N-Acetyl-DL-leucin, N-acetyl-L-leucin und N-acetyl-D-leucin. b) Signifikanter Unterschied des posturalen Asymmetrie-Scores der mit N-Acetyl-DL-leucin und N-acetyl-L-leucin therapierten Tiere am Tag 7 im Vergleich zu den unbehandelten Vehikel-Tieren ($p < 0,042$, $p < 0,013$). * signifikantes Ereignis.

2.2 Dosis-Wirkungs-Untersuchung von N-Acetyl-L-leucin

Aus den in IV.2.1 beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass die Substanz N-Acetyl-L-leucin einen beschleunigenden Effekt auf die posturale Kompensation ausübt. Um die dosisabhängige Wirkung zu eruieren, wurden 30 Ratten einer UL unterzogen und in vier Gruppen randomisiert. N-Acetyl-L-leucin wurde in einer Dosierung von 60 mg/kg/d (n = 6), 15 mg/kg/d (n = 7), 3,75 mg/kg/d (n = 7) und 0 mg/kg/d = Vehikel (n = 6) an den Tagen 1 bis 3 post UL i.v. verabreicht (siehe III.6.1). Die Ratten wurden analog zu der vorherigen Experimentalserie auf Nystagmus, posturale Asymmetrie, Torticollis und den Elevation-Tail-Rotation-Test untersucht.

Wie zuvor beschrieben zeigten post UL alle Tiere die charakteristische Schwindelsymptomatik. Die unterschiedlichen Dosierungen zeigten keinen signifikant unterschiedlichen Effekt auf Nystagmus, Torticollis und die Elevation-Tail-Rotation-Testung zu sämtlichen Messzeitpunkten im Vergleich zur Vehikel-Gruppe und der therapierten Gruppen untereinander (Daten nicht abgebildet).

Das Symptommaximum der posturalen Asymmetrie wurde in allen Gruppen an den Tagen 2 oder 3 beobachtet: N-Acetyl-L-leucin 60 mg/kg MD: 8 (IQR: 4,75) am Tag 2, 15 mg/kg MD: 8 (IQR: 3) am Tag 3, 3,75 mg/kg MD: 8 (IQR: 2) am Tag 3 und Vehikel MD: 9 (IQR: 2,5) am Tag 3. Die Vehikel-Gruppe zeigte eine relative Symptomreduktion vom Tag 3 bis Tag 7 von 22%. Hingegen wies die 60 mg/kg-Gruppe vom Tag 2 bis Tag 7 bereits eine relative Reduktion von 44% auf (Abb. 27 a). Die Datenanalyse ergab einen signifikanten Unterschied der Scores am Tag 7 zwischen der Vehikel- und der 60 mg/kg-Gruppe. Die Tiere, welche mit 15 mg/kg und 3,75 mg/kg therapiert wurden, unterschieden sich von der Vehikel-Gruppe zu keinem untersuchten Messzeitpunkt signifikant (Abb. 27 b).

Die graphische Darstellung der posturalen Asymmetrie-Scores (1/Score) in Abhängigkeit der Dosierung (log) von N-Acetyl-L-leucin am Tag 7 ergab eine mittlere wirksame Dosis von 18,75 mg/kg. Die Dosierung von 15 mg/kg entsprach einem Drittel und von 3,75 mg/kg einem Achtel der Maximaldosis von 60 mg/kg (Abb. 28).

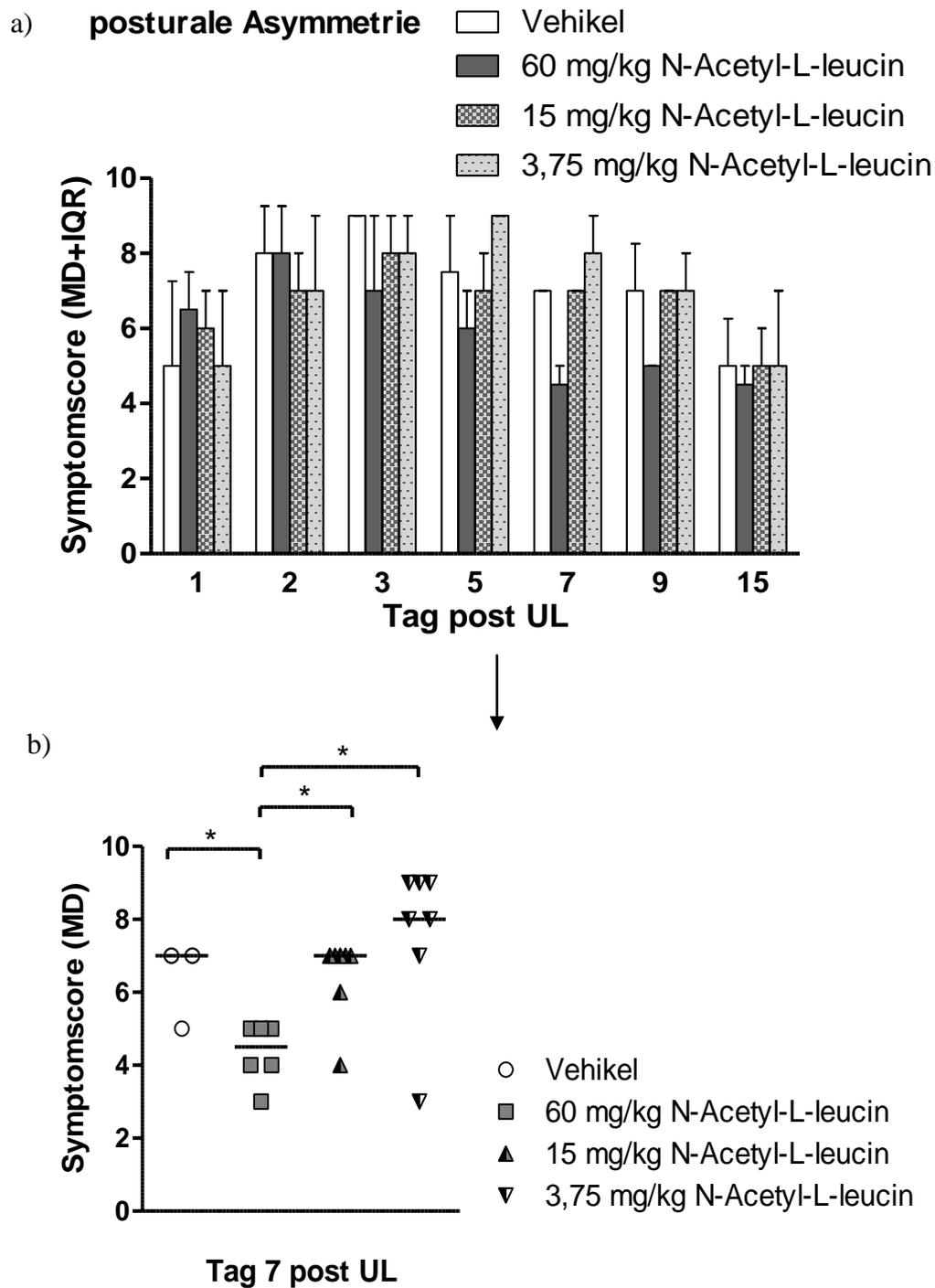


Abb. 27: a) Zeitlicher Verlauf der posturalen Kompensation nach UL. Dargestellt ist der mediane Verhaltens-Score (*MD*) und entsprechender Interquartilsabstand (*IQR*) der Vehikel-Gruppe sowie der N-acetyl-L-leucin-Gruppe in den unterschiedlichen Dosierungen. b) Signifikanter Unterschied des posturalen Asymmetrie-Scores am Tag 7 post UL von N-acetyl-L-leucin (60 mg/kg) im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe ($p < 0,0126$) sowie im Vergleich zu 15 mg/kg ($p < 0,0142$) und 3,75 mg/kg ($p < 0,0296$). * signifikantes Ereignis.

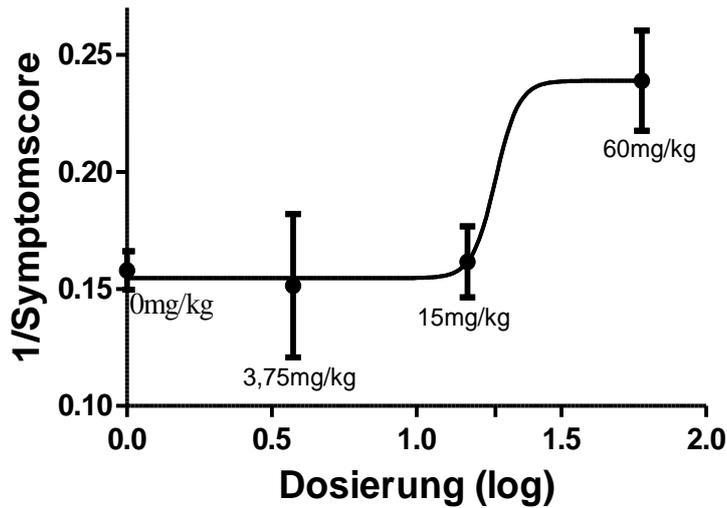


Abb. 28: Symptomscore der posturalen Asymmetrie (1/Symptomscore von PA) dargestellt in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dosierungen in logarithmischer Darstellung von N-Acetyl-L-leucin am Tag 7 post UL; geschätzte mittlere wirksame Dosis: 18,75 mg/kg.

Im Anschluss erfolgte eine Analyse der applizierten Lösung auf die tatsächlich enthaltene Wirkstoffmenge (Tab. 5). Die enthaltene Wirkstoffmenge zeigte Abweichungen von der gewünschten Menge um maximal 16% bei der Zielkonzentration von 3,75 mg/kg, 10% bei 15 mg/kg und 2,85% bei 60 mg/kg.

Intendierte Wirkstoffmenge (mg / 2,5ml)	Tag der Probenentnahme: Nach Applikation	Enthaltene Wirkstoffmenge (mg / 2,5ml)	Prozentuale Abweichung (in %)
3,75	1	3,18	-15,20
	2	3,16	-15,73
	3	3,15	-16,00
15	1	13,50	-10,00
	2	13,51	-9,93
	3	13,70	-8,67
60	1	61,71	2,85
	2	60,40	0,67
	3	60,60	1,00

Tab. 5: Konzentrationsbestimmung: N-Acetyl-L-leucin (3,75 mg/kg, 15 mg/kg, 60 mg/kg)

2.3 μ PET-Scan: Beeinflussung des cerebralen Glucosestoffwechsels durch N-Acetyl-L-leucin

Weiterhin untersuchten wir die cerebralen Veränderungen der Glucosemetabolismusrate während der vestibulären Kompensation unter Einfluss der L- und D-Enantiomere von N-Acetylleucin mittels [18 F]FDG- μ PET.

18 Tiere wurden zu je sechs Tieren zufällig auf drei Gruppen aufgeteilt und mit dem N-Acetyl-L-leucin, N-Acetyl-D-leucin und der Trägersubstanz (Vehikel) an drei aufeinander folgenden Tagen post UL therapiert (siehe III.6.1).

Die SPM-Analysen, im Vergleich zur HC-Gruppe, zeigten bei allen Gruppen zu sämtlichen Messzeitpunkten post UL eine signifikant reduzierte $rCMR_{glu}$ in den Bereichen des contralateralen Colliculus Inferioris sowie im auditiven Cortex. (SPM-Analysen nicht abgebildet). Dies impliziert eine korrekt durchgeführte UL sowie eine adäquate Bildakquisition und -rekonstruktion. Die folgenden Intergruppen-Vergleiche sind durch die Erhebung der $rCMR_{glu}$ beschrieben.

Im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zeigte die N-Acetyl-L-leucin-Gruppe folgende signifikante Unterschiede in der SPM-Analyse:

Am Tag 3 war ipsilateral und am Tag 7 ipsilateral prominenter als contralateral eine signifikant verminderte $rCMR_{glu}$ im posterolateralen Thalamus sowie in subthalamischen Regionen erkennbar. Am Tag 15 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im centromedialen Thalamus und subthalamischen Regionen (Abb. 29).

Am 3. Tag post UL war die $rCMR_{glu}$ der N-Acetyl-L-leucin-Tiere spezifisch im ipsilateralen Vestibulocerebellum signifikant erhöht. Am Tag 7 war dieser Effekt bilateral im Vestibulocerebellum darstellbar (Abb. 30).

Im vestibulären Nucleus sowie in anderen Gehirnarealen ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Vehikel-Gruppe visualisieren.

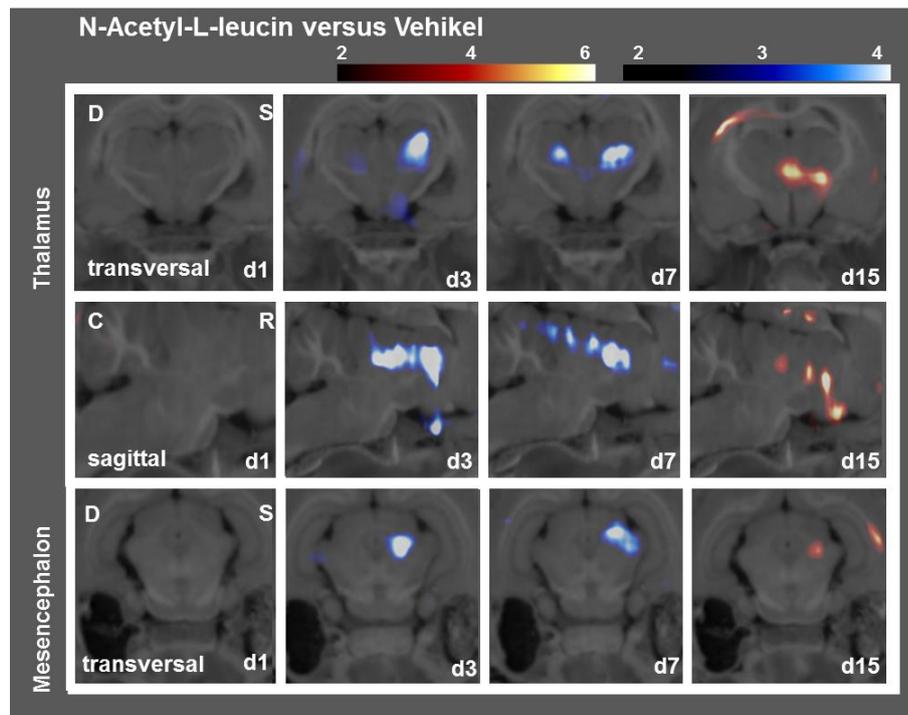


Abb. 29: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans an Tag 1, 3, 7 und 15 nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Gruppen-Analyse: N-Acetyl-L-leucin versus Vehikel: Verminderung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Thalamus und im Mesencephalon am Tag 3 ipsilateral, am Tag 7 bilateral. Tag 15: Erhöhte thalamische $r\text{CMR}_{\text{glu}}$. Die Farbskalen visualisieren die Standardabweichung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Rot visualisiert eine Erhöhung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$, blau eine Verminderung. *D* dexter *S* sinister *C* caudal *R* rostral *d* Tag post UL

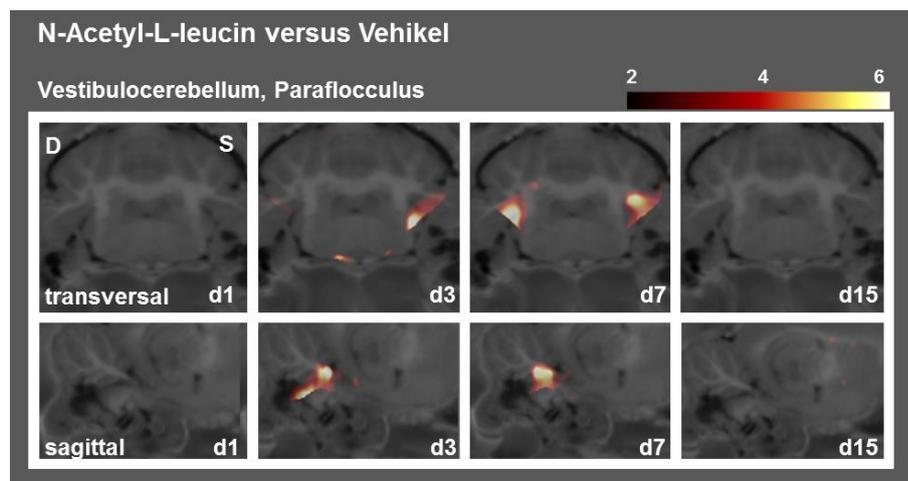


Abb. 30: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Gruppen-Analyse: N-acetyl-L-leucin versus Vehikel: Am Tag 3 ipsilateral und am Tag 7 bilaterale Erhöhung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ im Bereich des Vestibulocerebellums. . *D* dexter *S* sinister *d* Tag post UL.

Die SPM-Gruppen-Analyse ergab bei der N-Acetyl-D-leucin-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe am Tag 7 eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ in centromedial thalamischen Regionen (Abb. 31). Weder im Vestibulocerebellum (Abb. 32) noch in anderen Gehirnregionen waren signifikante Unterschiede sichtbar.

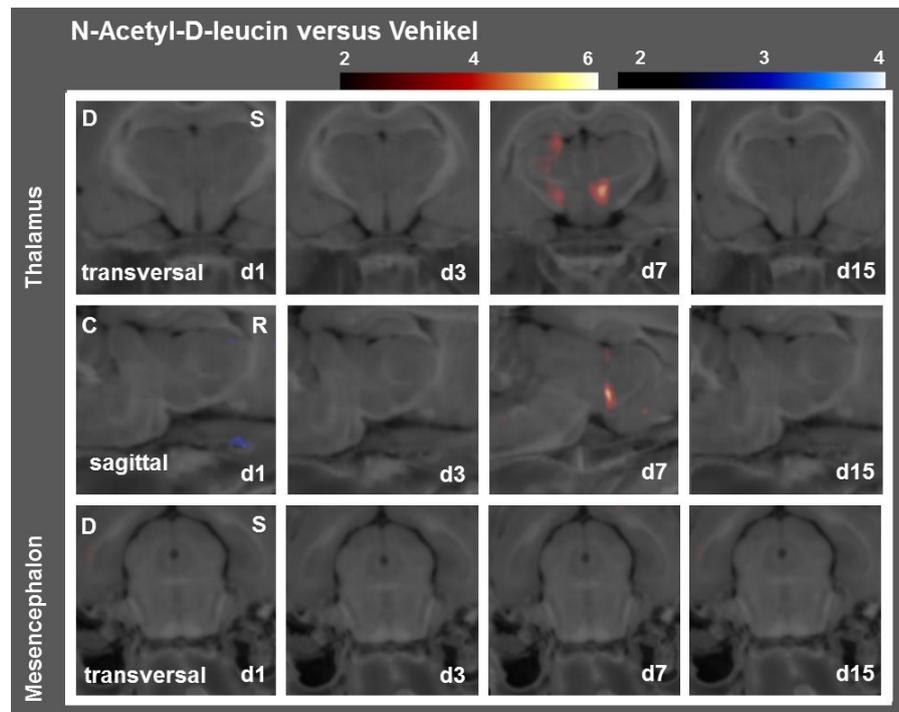


Abb. 31: Sequentielle $[^{18}F]$ -FDG- μ PET-Scans an Tag 1, 3, 7 und 15 nach unilateraler Labyrinthektomie. SPMGruppen-Analyse: N-Acetyl-D-leucin versus Vehikel: Erhöhte $rCMR_{glu}$ im Bereich des Thalamus am Tag 7 post UL. Die Farbskalen visualisieren die Standardabweichung der $rCMR_{glu}$ der N-Acetyl-D-leucin-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Rot visualisiert eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$, blau eine Verminderung. . *D* dexter *S* sinister *C* caudal *R* rostral *d* Tag post UL.

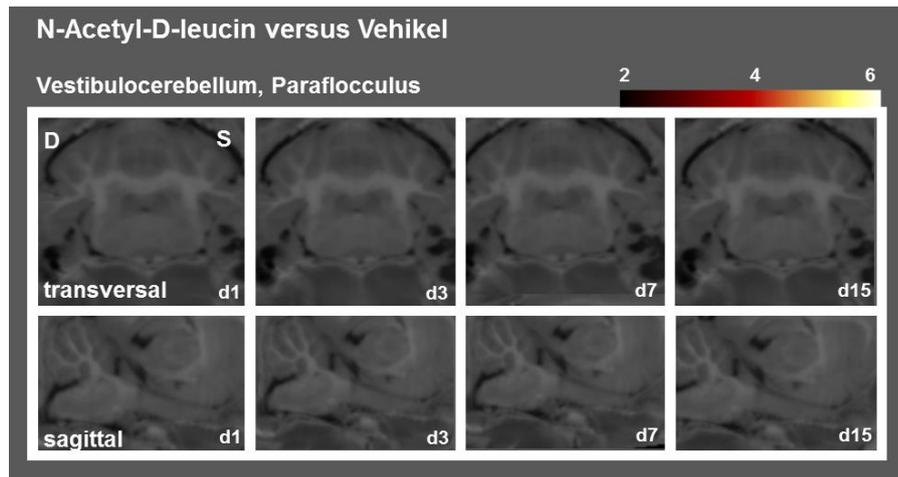


Abb. 32: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Gruppen-Analyse: N-acetyl-D-leucin versus Vehikel: Zu keinem Messzeitpunkt nach UL signifikante Unterschiede der rCMR_{glu} im Bereich des Vestibulocerebellums feststellbar. *D* dexter *S* sinister *d* Tag post UL

Die SPM-Analyse der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Vergleich zu der N-Acetyl-D-leucin-Gruppe zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede der rCMR_{glu} in den zuvor beschriebenen Gehirnregionen des Thalamus und Vestibulocerebellums:

Eine signifikant verminderte thalamische rCMR_{glu} der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Vergleich zur N-Acetyl-D-leucin-Gruppe war am Tag 3 contralateral visualisierbar. Dieser Effekt verstärkte und breitet sich bilateral am Tag 7 aus (Abb.33).

Am Tag 3 und am Tag 7 war die rCMR_{glu} bilateral im Vestibulocerebellum signifikant erhöht (Abb. 34).

Es wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede in anderen Gehirnregionen detektiert.

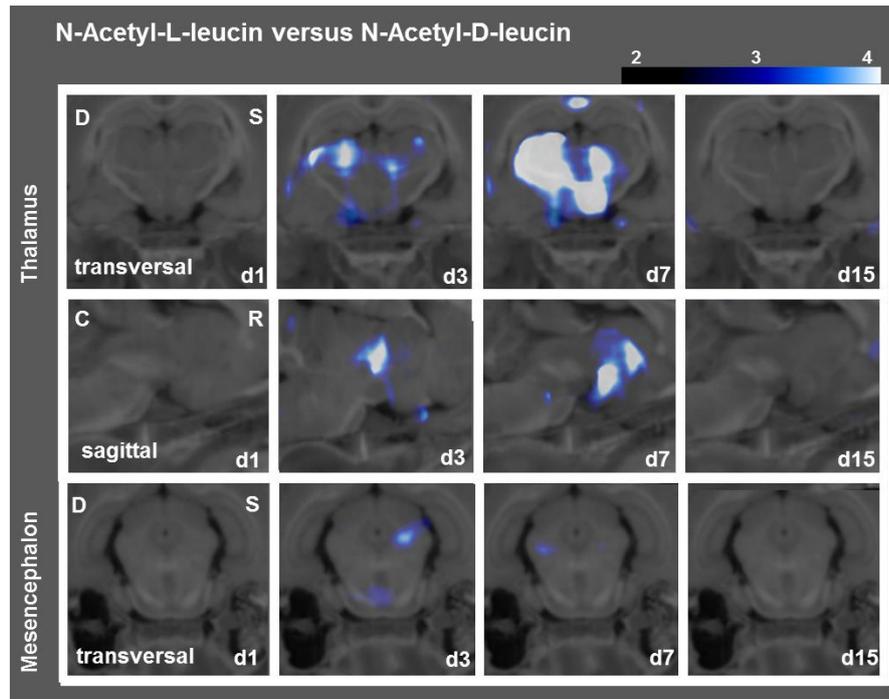


Abb. 33: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans an Tag 1, 3, 7 und 15 nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Gruppen-Analyse: N-Acetyl-L-leucin versus N-Acetyl-D-leucin: Signifikant verminderte $r\text{CMG}_{\text{glu}}$ der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Thalamus und im Mesencephalon am Tag 3 und am Tag 7. Die Farbskala visualisiert die Standardabweichung der $r\text{CMG}_{\text{glu}}$ der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Blau visualisiert eine Verminderung der $r\text{CMG}_{\text{glu}}$. *D* dexter *S* sinister *C* caudal *R* rostral *d* Tag post UL.

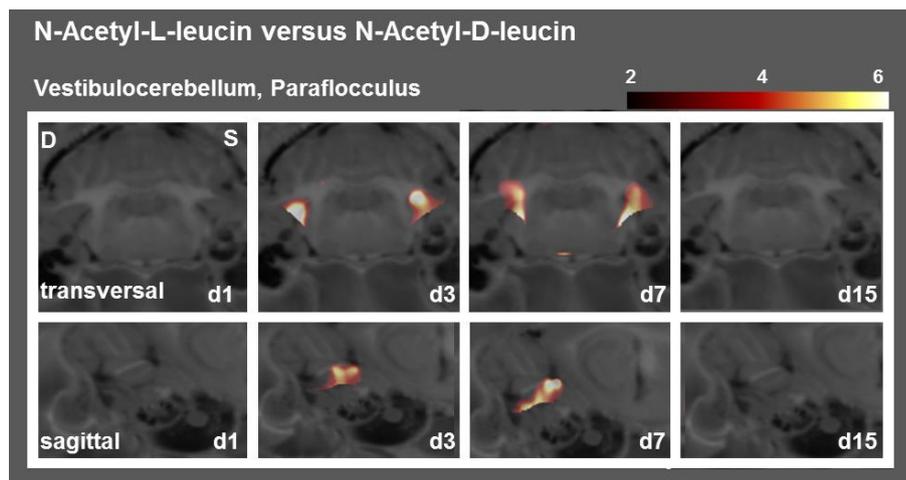


Abb. 334: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Gruppen-Analyse: N-acetyl-L-leucin versus N-Acetyl-D-leucin: Am Tag 3 und am Tag 7 bilaterale Erhöhung der $r\text{CMG}_{\text{glu}}$ in der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Bereich des Vestibulocerebellums. *D* dexter *S* sinister *d* Tag post UL.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tiere, welchen das N-acetyl-DL-leucin oder N-Acetyl-L-leucin mit einer Dosierung von 60mg/kg appliziert wurde, in der Verhaltensanalyse an Tag 7 eine signifikante Besserung posturaler Asymmetrien im Vergleich zur Vehikel-Gruppe aufwiesen. Im Gegensatz dazu hatte die Applikation von N-Acetyl-D-leucin keinen Effekt auf das Verhalten. Die SPM-Analyse der μ PET-Scans ergab, dass die Tiere, welche mit dem N-Acetyl-L-leucin therapiert wurden, am Tag 3 und Tag 7 im Vergleich zur Vehikel- und N-Acetyl-D-leucin-Gruppe eine thalamische verminderte $rCMR_{glu}$ zeigten. Zusätzlich war an den Tagen 3 und 7 eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im Vestibulocerebellum im Vergleich zur Vehikel- und N-Acetyl-D-leucin-Gruppe darstellbar. Die SPM-Analyse der N-Acetyl-D-leucin-Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Vehikel-Gruppe.

3. Einfluss von 4-Aminopyridin auf die vestibuläre Kompensation

Die Dosierung der 4-Aminopyridin (4-AP) Applikation bei der Ratte betrug 1 mg/kg/d per os und basierte auf einer zuvor von uns durchgeführten Pilotstudie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit der Substanz. Die biologische HWZ von 4-AP liegt bei zwei Stunden (Capacio et al., 1996). Bei diesem Pilotversuch wurde in der Verhaltensanalyse ein Akuteffekt, zwei Stunden nach Applikation der Substanz, auf posturale Asymmetrien beobachtet. Daraufhin erfolgte die Verhaltensanalyse an den ersten drei Tagen vor sowie 1,5 Stunden nach Applikation. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen mittels μ PET am Tag 1 zwei Stunden nach und am Tag 3 vor Applikation. Weitere μ PET-Scans folgten an den Tagen 7 und 15 nach UL (siehe III.6.2).

22 Ratten wurden einer UL unterzogen und randomisiert in eine Vehikel- (n=9) und eine 4-AP-Gruppe (n=13) aufgeteilt. Alle Ratten zeigten post UL die typische Schwindelsymptomatik: Nystagmus, posturale Asymmetrie, Torticollis und einen positiven Elevation-Tail-Rotation (ETT) -Test. Im Vergleich zur Vehikel-Gruppe hatte die Applikation von 4-AP zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf den Nystagmus, den Torticollis und den Elevation-Tail-Rotation-Test im Vergleich zu den Vehikel-Tieren (Abb. 35).

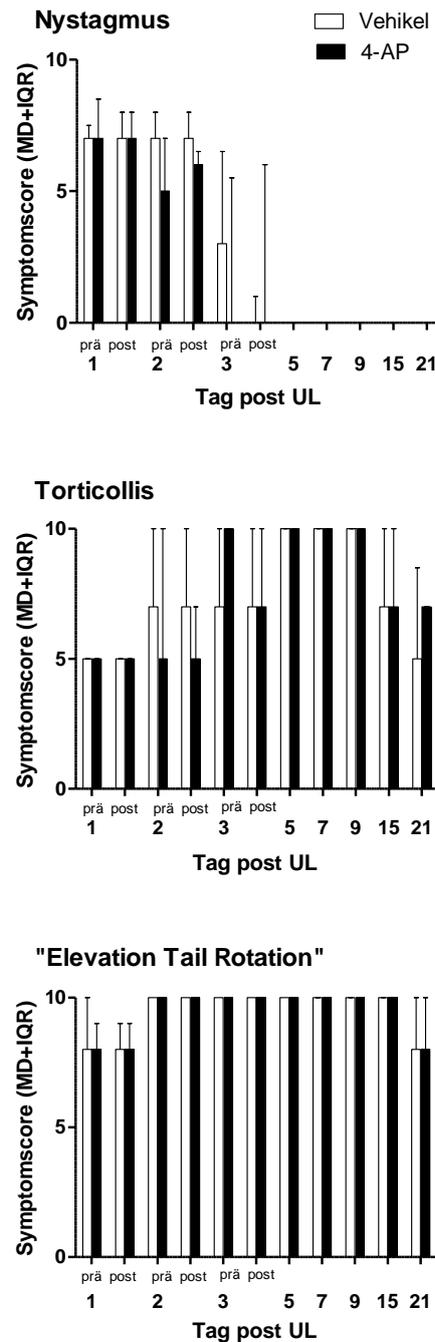


Abb. 345: Zeitverlauf der vestibulären Kompensation nach UL. Medianer Symptomscore und entsprechender Interquartilsabstand ($MD+IQR$) dargestellt für die Vehikel- sowie 4-AP-Gruppe in den unterschiedlichen Symptomen. Zu keinem Beobachtungszeitpunkt war ein signifikanter Unterschied zwischen den Scores der Vehikel- und 4-AP-Tieren feststellbar. Vehikel-Gruppe $n=9$, 4-AP-Gruppe $n=13$.

3.1 Akuteffekt von 4-Aminopyridin auf posturale Asymmetrie

In der 4-AP-Gruppe ließ sich folgender Effekt auf die posturale Asymmetrie nach UL beobachten (Abb. 36)²: Nach Applikation am ersten Tag zeigten die 4-AP-Tiere im Vergleich zur Vehikel-Gruppe einen signifikant niedrigeren medianen Verhaltens-Score (4-AP MD:3, IQR: 4; Vehikel MD:4, IQR; 2,5; $p < 0,011$). An den ersten drei Tagen zeigte sich vor der Applikation ein vergleichbarer posturaler medianer Verhaltens-Score in der 4-AP- und Vehikel-Gruppe. Diese Disparität des posturalen Asymmetrie-Scores nach erfolgter Applikation war an den Tagen 2 und 3 reproduzierbar (Tag 2: $p < 0,009$, Tag 3 $p < 0,036$). Innerhalb der 4-AP-Gruppe zeigte sich nach Applikation ein signifikanter relativer Abfall des medianen Scores am Tag 2 von 34% ($p < 0,005$) sowie am Tag 3 von 57% ($p < 0,003$). Die Vehikel-Tiere zeigten den in IV.1.1 beschriebenen Verlauf der posturalen Kompensation.

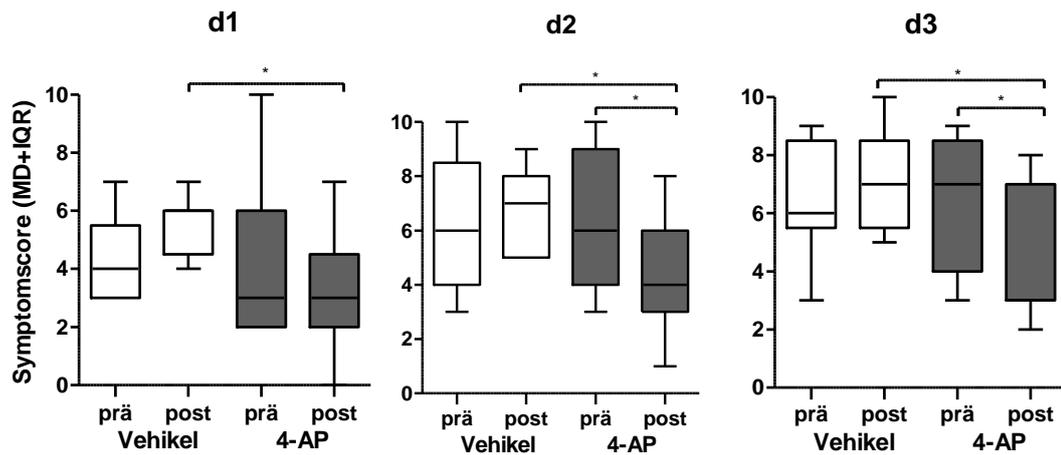


Abb. 356: Boxplot der Verhalten-Scores der posturalen Asymmetrie dargestellt an den Tagen 1, 2 und 3 nach unilateraler Labyrinthektomie; jeder Tag zeigt den Score vor (*prä*) und nach (*post*) Applikation des Vehikels und 4-Aminopyridin. Jeweils vergleichbarer Score der Gruppen vor der Applikation. Signifikanter Unterschied des Scores an den Tagen 1 ($p < 0,011$), 2 ($p < 0,009$) und 3 ($p < 0,036$) nach Applikation zwischen der Vehikel- und 4-AP-Gruppe. Zusätzlicher signifikante Reduktion des Scores innerhalb der 4-AP-Gruppe an den Tagen 2 ($p < 0,005$) und 3 ($p < 0,003$) nach 4-AP Applikation. Vehikel-Gruppe $n=9$, 4-AP-Gruppe $n=13$. * signifikantes Ereignis, *d* Tag post UL.

² (Rohdaten (MD+IQR) der posturalen Asymmetrie der 4-Aminopyridin-Experimentalserie siehe Anhang)

3.2 μ PET-Scan: Akuteffekt von 4-Aminopyridin auf den cerebralen Glucosstoffwechsels

Ebenso wie in der N-Acetylleucin-Experimentalserie wurde zunächst der SPM-Gruppen-Vergleich zu der nicht operierten (HC) Gruppe durchgeführt und analysiert.

In der Vehikel- sowie der 4-AP-Gruppenanalyse zeigte sich zu allen Messzeitpunkten nach UL eine signifikant reduzierte $rCMR_{glu}$ in den Bereichen des contralateralen Colliculus inferioris und des auditiven Cortex im Vergleich zu den HC-Tieren (SPM-Analysen nicht abgebildet). Diese Effekte belegen eine korrekt durchgeführte UL sowie eine adäquate Bildakquisition und –rekonstruktion.

Die folgenden SPM-Vergleiche zeichnen sich aus durch signifikante Unterschiede der $rCMR_{glu}$ zwischen der Vehikel- und 4-AP-Gruppe.

Am Tag 1 ließ sich bei den 4-AP-Tieren eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ spezifisch im Bereich des ipsilateralen Vestibulocerebellums/Paraflocculus zwei Stunden nach Applikation im Vergleich zu den Vehikel-Tieren visualisieren (Abb. 37). In anderen Regionen des Gehirns konnten zu diesem Messzeitpunkt keine weiteren Änderungen der $rCMR_{glu}$ visualisiert werden.

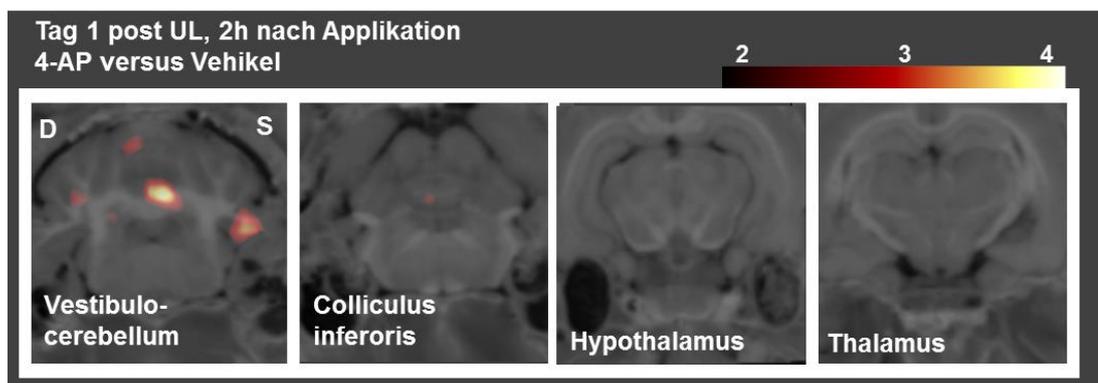


Abb. 36: [18 F]-FDG μ PET-Scan zwei Stunden nach Applikation am Tag 1 nach UL. SPM-Analyse: 4-AP versus Vehikel-Gruppe: Signifikante Erhöhung der $rCMR_{glu}$ ipsilateral im Vestibulocerebellum/Paraflocculus. Andere Gehirnregionen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der $rCMR_{glu}$. Die Farbskala visualisiert die Standardabweichung der $rCMR_{glu}$ der 4-AP-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Rot visualisiert eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$. *D* dexter *S* sinister.

3.3 Langzeiteffekt des 4-Aminopyridin auf die posturale Asymmetrie

Von Tag 5 zu Tag 9 zeigte der Verhaltens-Score der posturalen Asymmetrie der 4-AP-Tiere keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Vehikel-Tieren. Jedoch divergierte der mediane Verhaltens-Score ab dem 15. Tag zwischen den beiden Gruppen. Die 4-AP-Tiere zeigten am Tag 21 post UL einen geringgradig schlechteren Grad der posturalen Kompensation (4-AP: MD: 4 IQR: 3; Vehikel: MD 3, IQR: 3,5; $p < 0,052$) (Abb. 38).

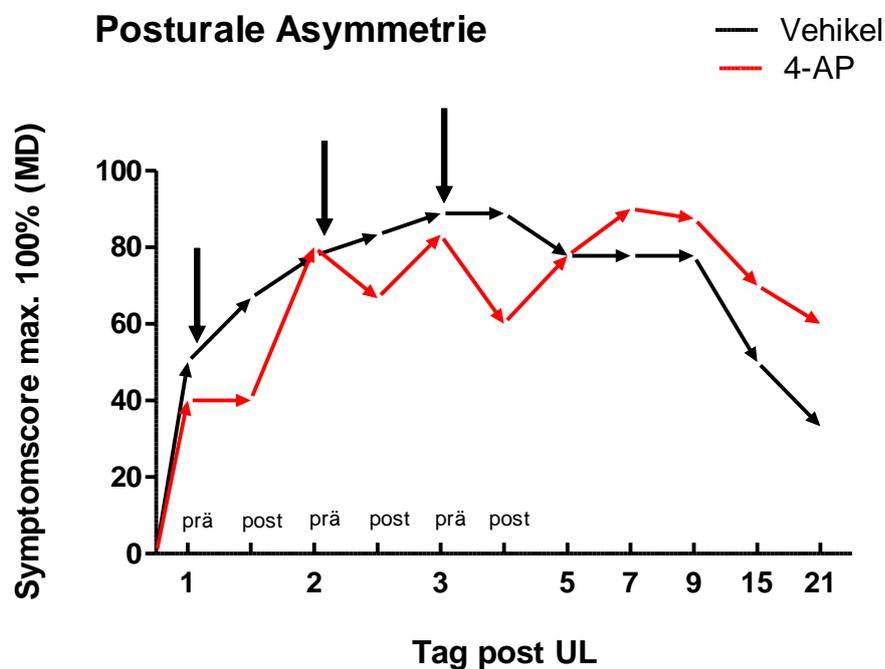


Abb. 38: Longitudinaler Verlauf des medianen Verhaltens-Score (MD) der posturalen Asymmetrie nach unilateraler Labyrinthektomie UL (Symptommaximum der ersten drei Tage nach UL: 100%). Schwarz: Vehikel-Gruppe (n=9), rot: 4-AP-Gruppe (n=13), senkrechte schwarze Pfeile: Applikation von 4-AP oder Vehikel. Longitudinaler Verlauf der posturalen Kompensation, sichtbarer Abfall des Scores nach 4-AP-Applikation. Ab dem Tag 7 höherer Verhaltens-Score der 4-AP-Tiere im Vergleich zur Vehikel-Gruppe.

3.4 μ PET-Scan: Langzeiteffekt von 4-Aminopyridin auf den cerebralen Glucosstoffwechsel

Die SPM-Analysen der μ PET-Scans visualisierten an Tag 7 eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im Bereich des contralateralen Nucleus vestibularis. Dieser Effekt verstärkte sich am Tag 15. Zusätzlich war eine erhöhte $rCMR_{glu}$ im Cerebellum sichtbar. Ergänzend zeigten die 4-AP-Tiere im Vergleich zur Vehikel-Gruppe eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im contralateralen posterolateralen Thalamus an den Tagen 3 und 7 (Abb.39). Es wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede in der cerebralen Hirnaktivität detektiert.

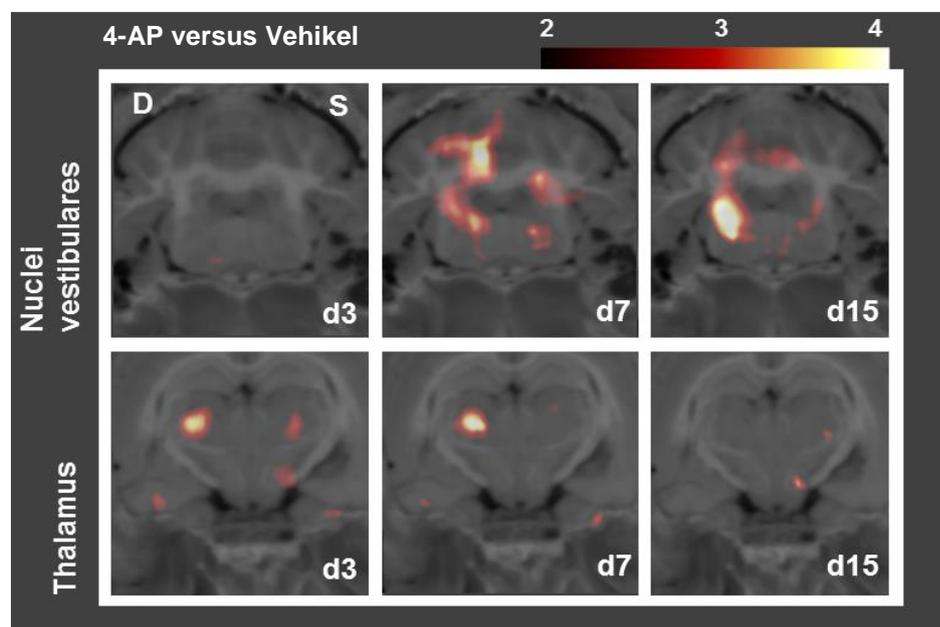


Abb. 37: Sequentielle $[^{18}\text{F}]$ -FDG- μ PET-Scans nach unilateraler Labyrinthektomie. SPM-Gruppen-Analyse: 4-AP versus Vehikel. Oben: d7, d15 Erhöhung der $rCMG_{glu}$ im contralateralen vestibulären Nuclei und im Cerebellum. Unten d3, d7: erhöhte thalamische $rCMG_{glu}$. Die Farbskala visualisiert die Standardabweichung der $rCMG_{glu}$ der 4-AP-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Rot visualisiert eine Erhöhung der $rCMG_{glu}$. *D* dexter *S* sinister, *d* Tag post UL

4. Histologische Korrelation

Die strukturelle Integrität der vestibulären Kernareale nach UL wurde stichprobenartig mit der Nissl-Färbung der Gehirnschnitte überprüft. Die unterschiedlichen Nuclei vestibulares waren gut darstellbar und differenzierbar. Diese kompensatorisch relevanten Strukturen der unilateral labyrinthektomierten Tiere waren integer mit dem schematisch anatomischen Rattenatlas nach Paxinos und Watson (Paxinos and Watson, 2005) (Abb. 40). Die einzelnen Therapiegruppen wiesen im Vergleich zu den Vehikel-Tieren weder makroskopische noch histologische Unterschiede auf.



Abb. 40: histologischer Kryogehirnschnitt der Ratte, 40 µm Dicke, Nissl-Färbung. Transversale Schnittführung, linke Hirnstammhälfte auf Höhe der vestibulären Kerngebiete, bei fünffacher Vergrößerung.

V. DISKUSSION

Für eine zielgerichtete Therapie von Patienten mit vestibulärem Defizit ist es von besonderer Wichtigkeit, die Abläufe, welche während der vestibulären Kompensation stattfinden, zu verstehen (Brandt and Daroff, 1980, Deveze et al., 2014). Aus bisherigen Studien wird klar, dass es sich bei zentralen vestibulären Kompensationsmechanismen um einen dynamischen und empfindlichen Prozess handelt (de Waele et al., 1990, Darlington et al., 1991, Curthoys, 2000). Dieser spielt sich nicht nur im vestibulären System ab, sondern steht in einem systembiologischen Zusammenhang. Es bestehen enge neuroanatomische Verbindungen des vestibulären Systems mit okulomotorischen, posturalen und multisensorischen Zentren sowie Zentren der räumlichen Orientierung (Dutia, 2010). Um die Interaktionen dieser Systeme zu erfassen, sind *in vivo* Untersuchungen unerlässlich. Das Tiermodell der unilateralen Labyrinthektomie stellt dafür ein geeignetes Modell zur Untersuchung der vestibulären Kompensation und deren therapeutische Beeinflussung dar, wie zahlreiche Studien in verschiedenen Spezies zeigen (Cass and Goshgarian, 1991, Dieringer, 1995, Newlands and Wei, 2013, Park et al., 2013, Zhou et al., 2013).

Validierung des Modells zur chemischen unilateralen Labyrinthektomie

Zur Untersuchung der zentralen vestibulären Kompensation wurden alle Ratten einer chemischen unilateralen Labyrinthektomie (UL) unterzogen. Das Natriumhydrogen-4-aminophenylarsonat, auch Atoxyl genannt, ist eine der meist verwendeten Substanzen zur Induktion einer irreversiblen vestibulären Läsion (Vignaux et al., 2012). Die Untersuchung des Zeitverlaufs der zentralen vestibulären Kompensation setzt eine dauerhafte Schädigung der peripheren vestibulären Sinneszellen voraus. Vignaux und Kollegen untersuchten die Toxizität einer Atoxyl-Lösung im Modell der unilateralen Labyrinthektomie bei der Ratte. Sie konnten anhand histologischer Schnitte den vernichtenden und irreversiblen Effekt der Substanz auf die vestibulären Sinneszellen darstellen. Das Atoxyl provoziert im zeitlichen Verlauf eine Atrophy des sensorischen Epithels.

Obwohl die herbeigeführte Schwindelsymptomatik, gekennzeichnet durch Nystagmus, posturale Asymmetrie und Torticollis ad hoc nach UL auftrat, war

eine Minderung der Symptomausprägung bis zum Folgetag feststellbar. Das Symptommaximum der posturalen Asymmetrie und des Torticollis wurden verspätet zwei Tage nach UL erreicht. Die Wirkung toxischer Deafferentierungsmodelle von Nervenzellen wie die der chemischen UL tritt bekanntlich mit Verzögerung ein (Magnusson et al., 1991, Vignaux et al., 2012). Um die Zeitspanne bis zum Wirkungseintritt der Atoxyl-Lösung zu überbrücken, bedienten wir uns einer transtympanalen Instillation des Lokalanästhetikums Bupivacain. Seine relativ kurze Wirkdauer von wenigen Stunden (Feldman and Covino, 1988) schien jedoch den verzögerten Eintritt der toxischen Wirkung nicht vollends zu überbrücken, was die Symptomminderung am ersten Tag nach UL begründet. Indes war die Symptomatik des Nystagmus bereits am ersten Tag voll ausgeprägt. Bedingt durch die enge funktionelle Beziehung zwischen okulomotorischem und vestibulärem System stellt die Okulomotorik ein äußerst sensibles Glied des multimodalen Netzwerks dar (Angelaki and Cullen, 2008, Hamann, 2009). Diese scheint im Gegensatz zu vestibulo-spinalen Ausfallserscheinungen besonders sensibel für die Deafferenzierung zu sein, da bereits die Instillation des Lokalanästhetikums zu einer maximalen Symptomausprägung führte.

Erörterung der Verhaltensanalysen am Beispiel der vestibulären Kompensationsmechanismen bei den unbehandelten Tieren

Die Verhaltensanalysen, welche bei allen Ratten im Zeitverlauf post UL durchgeführt wurden, basierten auf den Verhaltens-Scores nach Bergquist (Bergquist et al., 2008). Zusätzlich erfolgte die „Elevation Tail Rotation“-Testung.

Nach UL konnte bei allen Tieren ein Spontannystagmusverhalten beobachtet werden. Das Vorhandensein dieser okulomotorischen Störung ist ein deutliches Zeichen der vestibulären Tonusimbalance. Es signalisiert den Zustand der Dekompensation nach einseitigem vestibulären Schaden (Hamann, 2009). Der Nystagmus war außer bei zwei Ratten innerhalb von fünf Tagen vollständig abgeklungen. Dieser Verlauf entsprach annähernd einer zeitlich vergleichbaren Kompensationsdynamik des Menschen von einer Woche (Curthoys and Halmagyi, 1992).

Der Verhaltens-Score der posturalen Asymmetrie der Vehikel-Tiere am Tag 15 post UL beschrieb eine 44%ige Reduktion der Symptomatik, was das Phänomen

der vestibulären Kompensation widerspiegelte. Die Dauer der Kompensation posturaler Asymmetrien in der dargelegten Studie korrelierte mit der beschriebenen Kompensationsdynamik bei Tier und Mensch (Rossmeisl, 2010, Zwergal and Schniepp, 2010, Brandt et al., 2013).

Es konnte beobachtet werden, dass einige Ratten, welche in den ersten Tagen nach UL eine geringe Bewegungsdynamik zeigten, eine verzögerte posturale Kompensation aufwiesen. Die Wiedererlangung der posturalen Stabilität stellt aus klinischer Sicht bei Tier und Mensch eine Schlüsselrolle in der funktionellen Wiederherstellung der physiologischen Haltung nach vestibulärer Schädigung dar. Die Stabilisierung führt zu einer erhöhten Bewegungsdynamik (Brandt et al., 1999). Die natürliche Kompensation wird bei Tier und Mensch durch Mobilisierung gefördert (Igarashi et al., 1981, Horak, 2010, Rossmeisl, 2010).

Im Gegensatz dazu persistierte der Torticollis bei allen Tieren in einem 60°-90° Winkel bis zum Versuchsende. Es wurde keine Wiederherstellung der physiologischen Kopf-Haltung beobachtet. Durch die chemische Instillation der Atoxyl-Lösung wurden vor allem die Haarsinneszellen im Utriculus geschädigt, welche der Perforationsstelle im Tympanum am nächsten sind. Sie dienen primär der Schwerkraftwahrnehmung. Die Einstellung eines toxischen Gradienten der Atoxyl-Lösung im ventralen Teil des Gleichgewichtsorgans wäre denkbar, welcher im Utriculus aus anatomischen Gründen am größten wäre. Die dadurch vorherrschende permanente Schädigung der Haarsinneszellen könnte für die persistierende schiefe Kopfhaltung verantwortlich sein.

Der „Elevation-Tail-Rotation“-Test diente der Untersuchung perzeptiver somatosensorischer Einflüsse. Während des kurzen Anhebens der Ratte an ihrer Schwanzwurzel rotierte der Körper (>360°, 180-360°, <180°) um die Längsachse durch den prompten Entzug der somatosensorischen Information von den Extremitäten. Nach dem Absenken auf die Unterlage fielen die Tiere in einen kurzzeitigen Zustand der akuten Schwindelsymptomatik zurück. Dabei zeigte sich ein ausgeprägter Torticollis von 90° und eine posturale Imbalance mit „Barrel rolling“ oder flachem Drücken des Körpers auf die Unterlage. Diese temporäre Haltung spiegelte jedoch nicht den aktuell erreichten Kompensationszustand nach UL wider. Die Ergebnisse dieser dynamischen Kompensation zeigten während der Verhaltensanalysen nach UL keine relevanten Veränderungen. Durch die Manipulation des Anhebens an der Schwanzwurzel war die Rotation bis zu späteren Messzeitpunkten auslösbar. Der „Elevation-Tail-rotation“-Test ist meiner

Meinung nach nicht sensitiv genug, um den tatsächlichen Grad dieser dynamischen Kompensation zu untersuchen. Für einen an vestibulärem Schwindel leidenden Menschen haben Erkenntnis über propriozeptive Einflüsse insofern klinische Bedeutung, da ohne diese eine vestibuläre Kompensation unmöglich wäre (Hamann, 2009).

Hirnaktivierung nach unilateraler Labyrinthektomie

Zur Untersuchung zeitdynamischer cerebraler Veränderungen der Hirnaktivität während vestibulärer Kompensationsmechanismen gemessen an der cerebralen Glucosemetabolismusrate ($rCMR_{glu}$) erfolgten longitudinale [^{18}F]FDG- μ PET-Scans. Als Erstes diente die μ PET-Bildgebung bei jeder Ratte als Kontrolle einer adäquat und komparabel durchgeführten UL. Die Referenzregionen im Gehirn stellten intraindividuell der contralaterale Colliculus inferior und der auditive Cortex dar. Diese Bereiche zeigten eine konstant verminderte $rCMR_{glu}$. Dieser Effekt war reproduzierbar zu allen Messzeitpunkten bei jeder operierten Ratte darstellbar und implizierte eine Schädigung hervorgerufen durch UL. Es zeigte sich keine Dynamik im Sinne einer Veränderung der $rCMR_{glu}$. Die Colliculi inferiores bilden den unteren Teil der Vierhügelplatte im Mittelhirn. Sie stellen die Schaltstelle akustischer Signale dar. Die Fasern der Hörbahn verlaufen zu einem großen Teil gekreuzt. Dies erklärt die contralaterale Deaktivierung nach linksseitiger transtympanaler Injektion der Atoxylverbindung.

Cerebelläre Strukturen zeigten post UL eine stetig erhöhte $rCMR_{glu}$. Diese Erhöhung unterlag einer Dynamik durch welche am siebten Tag ein Maximum cerebraler Aktivität erreichte wurde. Das Cerebellum spielt eine bedeutende Rolle bei den Mechanismen der vestibulären Kompensation. Eine Studie an transgenen Mäusen, welche an einer cerebellärer Dysfunktion leiden, zeigte, dass in der subakuten Phase nach einseitiger Labyrinthektomie keine weitere Kompensation erfolgte. Die Wiederherstellung des vestibulo-okulären Reflexes stagnierte (Beraneck et al., 2008). Weiterhin konnte bei humanen Patienten mit einer medullären vestibulären Läsion in der späten Phase der vestibulären Kompensation eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ des Cerebellums im [^{18}F]FDG-PET beobachtet werden (Becker-Bense et al., 2013).

Die SPM-Analyse der μ PET-Scans der Vehikel-Tiere im Vergleich zu jeweils vorhergehenden Messungen visualisierte direkt nach UL eine deutliche Asymmetrie der $rCMR_{glu}$ im Bereich des ipsilateralen vestibulären Kerngebietes.

Nach dem dritten Tag waren keine weiteren Änderungen des Glucosestoffwechsels mehr erkennbar. Ein physiologisches Gleichgewicht zwischen den vestibulären Kernen schien wieder hergestellt. Dieser dynamische Prozess der ipsilateralen Verminderung, gefolgt von einer contralateralen Erhöhung der $rCMR_{glu}$, visualisiert eine cerebrale Plastizität nach unilateralem vestibulären Schaden. Dies steht - mit einer Zeitverzögerung von zwei Tagen - mit der Kompensationsdynamik des Nystagmus in Verbindung. So zeigten 88% der Ratten am fünften Tag keinen Nystagmus mehr, was zeitlich versetzt mit der Wiederherstellung der Symmetrie zwischen den vestibulären Kerngebieten übereinstimmt. Die okulomotorische Störung spiegelt indirekt den Zustand der Dekompensation wider (Hamann, 2009). Der im μ PET visualisierte dynamische Prozess der Kompensation bestätigt die Tatsache, dass das Modell der unilateralen Labyrinthektomie ein Beispiel für neuronale Plastizitätsmechanismen ist (Cullen et al., 2009).

In Vivo Untersuchung mittels μ PET- Bedeutung und Limitation

Die μ PET-Bildgebung ist als funktionelle Modalität in der neurologischen Forschung etabliert (siehe II.3.4). Durch den Einsatz des μ PETs können molekularbiologische Veränderungen sowie zeitdynamische Aspekte der zentralen vestibulären Kompensation visualisiert, besser verstanden und analysiert werden (Phelps, 2000). Dabei spielt die Integrität der sensorischen Eingänge und des Gehirns eine bedeutende Rolle, welche bei *in vitro* Untersuchungen nicht gegeben ist. Aus diesem Grund sind longitudinale *in vivo* Untersuchungen mittels μ PET als relevant zu erachten. Darüber hinaus stehen repetitive Datenerhebungen an ein und demselben Tier in Übereinstimmung mit den Leitlinien des 3R-Prinzips: Replacement/Ersetzen, Reduction/Reduzieren und Refinement/Verminderung der Belastung der Tiere (Flecknell, 2002). Diese drei Kriterien sind im Sinne des Tierschutzes international für die Verwendung von Tieren für Forschungs- und Testzwecke gefordert. Die longitudinale Bildgebung ermöglicht es vergleichbare Informationen weniger Tiere oder mehr Informationen von derselben Anzahl von Tieren zu erhalten, wodurch der Einsatz von Tieren reduziert wird (Cunha et al., 2013). Die Erhebung intraindividuelle Daten lässt durch herabgesetzte Variabilität eine geringe Streuung erwarten was die Tierendzahl ebenfalls vermindert. Neben dem Informationsgewinn ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse cerebraler Hirnaktivierungsmuster auf höhere

Lebewesen essentiell. Eine Studie von 1980 beschreibt bereits vergleichbare cerebrale Glucosestoffwechselraten von [^{18}F]FDG im Menschen und in der Ratte (Huang et al., 1980).

Allerdings existieren auch Grenzen dieser funktionellen Bildgebung im Kleintier, welche bei der Ergebnisvalidierung berücksichtigt werden müssen. Die räumliche Bildauflösung stellt einen entscheidenden Faktor dar. Der von uns verwendete OSEM/MAP3D-Rekonstruktionsalgorithmus ermöglichte eine Bildauflösung von 1,2 mm nicht nur zentral, sondern entlang des gesamten Gesichtsfeldes. Dennoch können Effekte mit einem Durchmesser von Mikro- bis Millimeter nur bei exakter Überlagerung in der SPM-Analyse visualisiert werden. Dies setzt eine exakte Vergleichbarkeit der Bilder untereinander in Bezug auf Größe, Kippung und Aktivitätsverteilung voraus. Um dies zu erreichen bedienten wir uns der Größennormalisierung und stereotaktischen Coregistrierung auf ein implementiertes Rattentemplate sowie der intraindividuellen Aktivitätsnormalisierung auf den „Global Mean“ des Gehirns (vgl. III.4.4) (Xiong et al., 2012). Zusätzlich wurden nach Versuchsende stichprobenartig histologische Schnitte der Rattenhirne angefertigt und mit der Kresylviolett-Färbemethode bearbeitet, um eine strukturelle Integrität kompensationsrelevanter Strukturen zu überprüfen. Eine weitere Option der Benennung aktiver Areale wäre die Methode der Autoradiographie. Diese bezeichnet ein photographisches Verfahren zum Nachweis und zur Lokalisierung radioaktiver Stoffe in histologischen Schnittpräparaten. Die Gewebeschnitte werden dafür auf einen strahlungssensitiven Film aufgelegt und für eine bestimmte Zeit, basierend auf der HWZ des Radionuklids, im Dunkeln exponiert. Dabei werden die Areale mit Anreicherung radioaktiver Isotope detektiert. Bei der Autoradiographie handelt es sich um eine Methode bei welcher das Versuchstier getötet wird. Die Möglichkeit der Durchführung weiterer longitudinaler Untersuchungen der cerebralen Veränderungen ist somit nicht mehr gegeben. Eine zusätzliche computertomographische Komponente wäre ein weiteres sicheres Hilfsmittel, um die aktivierten Bereiche direkt mit anatomischen Arealen zu korrelieren, bedeutet aber einen hohen finanziellen Aufwand.

Aussagen über Effekte zwischen den Gruppen wurden anhand der Veränderungen der relativen cerebralen Glucosemetabolismusrate (rCMR_{glu}) getroffen. Eine Änderung der rCMR_{glu} erlaubt allerdings keinen direkten Rückschluss auf den zugrunde liegenden Wirkmechanismus wie z.B. eine erhöhte „Feuerrate“ von

Neurotransmittern eines Pharmakons oder die strukturelle Plastizität des Gehirns welche ein Pharmakon beeinflussen kann. Dennoch liegt die Stärke des PETs bei pharmakologischen Studien darin, zu untersuchen, ob ein gegebenes Präparat mit dem Stoffwechsel interagiert und diesen beeinflusst (Borsook et al., 2011). Die Lokalisierung, in welcher das Pharmakon einen direkten oder indirekten Einfluss ausübt, kann *in vivo* im Gehirn bestimmt werden. Die Änderungen z.B. der Glucosestoffwechselaktivität gestatten Hinweise auf einen zugrunde liegenden Wirkmechanismus im Sinne einer erhöhten oder verminderten Aktivität (Schaller, 2003). Das ist von besonderem Interesse bei ungewissem bzw. spekulativem cerebralen Wirkmechanismus, wie das bei N-Acetylleucin oder bei 4-Aminopyridin der Fall ist (Vibert and Vidal, 2001, Hussein et al., 2010).

Erörterung pharmakologischer Einflüsse auf die Mechanismen der zentralen vestibulären Kompensation

Als bislang wirksamste und effektivste therapeutische Maßnahme zur Förderung vestibulärer Kompensation gilt das physikalisch-medizinische Training wie z.B. gezielte Bewegungs- und Blickstabilisationsübungen (Igarashi et al., 1981, Horak, 2010). Eine symptomatische Therapie mit Antivertiginosa und Sedativa wird lediglich für die ersten drei Tage propagiert. Die herbeigeführte Symptominderung führt zu der konsekutiven Senkung des Kompensationsdruckes. Dieser ist jedoch essentiell für die Auslösung des natürlichen Mechanismus der zentralen Kompensation. Bisher ist kein Medikament bekannt, welches symptomlindernd und gleichzeitig kompensationsfördernd wirkt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Medikamente, zum einen N-Acetylleucin sowie dessen Enantiomere und zum anderen 4-Aminopyridin, auf ihre Wirksamkeit bzw. deren Einfluss auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen nach unilateralem vestibulären Schaden untersucht.

Effekte von N-Acetylleucin auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen

Die Ergebnisse der neurologischen Verhaltensanalyse haben gezeigt, dass N-Acetyl-DL-leucin die posturalen Kompensationsmechanismen nach erfolgter UL beschleunigt. Indes war kein Effekt in Bezug auf den Nystagmus, Torticollis sowie auf die „Elevation-Tail-Rotation“ erkennbar. Die Applikation des Pharmakons zeigte am siebten Tag eine relative Reduktion des Scores der

posturalen Kompensation im Vergleich zur Vehikel-Gruppe um 50%. Diese Daten korrelieren mit einer klinischen Studie, welche ebenfalls die positive Wirkung von N-Acetyl-DL-leucins auf Haltungs-, Lagerungs- und Stellungsdefizite beschrieb (Ferber-Viart et al., 2009).

Die Testung von N-acetyl-L- und N-Acetyl-D-leucin zeigte, dass das N-Acetyl-L-leucin die aktive Komponente von N-Acetyl-DL-leucin darstellt. Der verzögerte Wirkzeitpunkt am siebten Tag, vier Tage nach der letzten Applikation sowie die stereospezifische Selektivität der Wirkung lassen einen Enzym-vermittelten Wirkmechanismus vermuten.

Hirnaktivierung nach Applikation von N-Acetyl-L-leucin

Der Besserung der posturalen Asymmetrie ging eine Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im Vestibulocerebellum sowie eine Reduzierung im posterolateralen Thalamus an den Tagen drei und sieben nach UL voraus. Es sei zu beachten, dass sich diese cerebralen Veränderungen zeitlich nach der Applikation des Medikaments (Tag eine bis drei), aber noch vor der symptomatischen Besserung (ab Tag sieben), visualisieren ließen. Dies lässt vermuten, dass N-Acetyl-L-leucin cerebrale Plastizitätsmechanismen, die der Verhaltenskompensation vorausgehen, vorantreibt. Dies geschieht augenscheinlich nicht direkt, sondern wahrscheinlich über verzögerte und molekulare Veränderungen, welche sekundär die zentrale Kompensation fördern. Die zeitliche Wechselbeziehung zwischen erhöhter vestibulocerebellärer $rCMR_{glu}$ und verminderter thalamischer $rCMR_{glu}$ ist auffallend und könnte einen Zusammenhang der beiden Effekte implizieren.

Vestibulocerebellum

Die essentielle Bedeutung des Vestibulocerebellums in der subakuten Phase nach unilateralem vestibulären Schaden auf die vestibuläre Kompensation ist bekannt (Darlington and Smith, 2000, Johnston et al., 2002, Dutia, 2010). Durch vestibuläre Fasern besteht eine direkte Verbindung mit dem vestibulären Kerngebiet. Zusätzlich ist das Vestibulocerebellum maßgeblich an der motorischen Lernfähigkeit beteiligt (Boyden et al., 2004). Die Entfernung des Vestibulocerebellums sowie die Durchtrennung aufsteigender Vestibularisbahnen in der ersten Woche post UL führen zu einer gravierenden Störung der Kompensation (Kitahara et al., 1997).

Durch die in dieser Studie durchgeführten sequentiellen [^{18}F]FDG- μ PET-Scans der Tiere, welche das N-Acetyl-L-leucin erhalten haben, konnte an den Tagen drei und sieben eine gesteigerte vestibulocerebrale $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ visualisiert werden. Das entspricht einer erhöhten Aktivität im Vestibulocerebellum. Dieser Effekt war spezifisch für das N-Acetyl-L-leucin. In der N-Acetyl-D-leucin- sowie in der Vehikel-Gruppe zeigten sich keine Veränderungen in dieser Region. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine beschleunigte Kompensation kongruent mit einer Erhöhung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ im Vestibulocerebellum verläuft.

Thalamus

Die Region des posterolateralen Thalamus erhält vestibuläre, propriozeptive und visuelle Afferenzen. Diese Informationen werden verschaltet, verarbeitet und an den sensorischen und motorischen Cortex weitergeleitet (Benninghoff and Drenckhahn, 2012). In einer klinischen Studie wurden Patienten, die an einer Neuritis vestibularis leiden, in der akuten Phase mittels [^{18}F]FDG-PET untersucht. Dabei wurde eine signifikante Erhöhung der thalamischen $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ beobachtet (Bense et al., 2004). Es wird vermutet, dass die Unstimmigkeit (*missmatch*) zwischen vestibulärer und sensorischer Informationen nach einem einseitigen Gleichgewichtsschaden zu einer erhöhten Aktivität u.a. im posterolateralen Thalamus sowie im multisensorischen vestibulären Cortex führt (Meng et al., 2007).

Die SPM-Analyse der N-Acetyl-L-leucin-Gruppe im Vergleich zur Vehikel- und N-Acetyl-D-leucin-Gruppe zeigte eine signifikante Minderung der $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ im Bereich des posterolateralen Thalamus an den Tagen drei und sieben post UL. Dies war nicht der Fall bei der N-Acetyl-D-leucin-Gruppe im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe. Über die funktionelle Relevanz der Änderung thalamischer Glucosemetabolismusraten kann lediglich spekuliert werden. Eine mögliche These könnte sein, dass die Herunterregulierung der thalamischen Aktivität durch N-Acetyl-L-leucin den *missmatch* reduziert und somit eine Stabilisierung posturaler Asymmetrien die Konsequenz ist. Während der akuten Phase der vestibulären Tonusimbalance ist die multisensorische Integration gestört. Der Thalamus erhält unstimulierte Informationen unterschiedlicher Sinnessysteme. Dies entspricht der von Bense und Mitarbeitern (2004) gemessenen erhöhten thalamischen $r\text{CMR}_{\text{glu}}$ bei Patienten mit akuter Neuritis vestibularis. Durch die

aktive Herunterregulierung wird der Cortex und damit das Bewusstsein weniger mit inkongruenten Sinnesinformationen konfrontiert.

Weiterhin wäre denkbar, dass N-Acetyl-L-leucin vielleicht an anderer Stelle wirkt, von welcher aus Afferenzen zum Thalamus ziehen. Dieser Informationsfluss wird unterbrochen oder gehemmt. Dadurch wäre der Thalamus im Vergleich zur Vehikel-Gruppe nach vestibulärer Läsion minder aktiv, was einer verminderten $rCMR_{glu}$ entsprechen würde.

Mutmaßlicher Wirkmechanismus von N-Acetyl-DL-leucin und N-Acetyl-L-leucin auf die vestibuläre Kompensation

Bislang wurde vermutet, dass N-Acetyl-DL-leucin das Membranpotential von hyper- und depolarisierten Nervenzellen im medialen vestibulären Kern nach vestibulärer Läsion stabilisiert (Vibert and Vidal, 2001). Der Effekt könnte durch eine Modulation der Ionenkanäle zustande kommen. Solch ein direkter pharmakologischer Wirkmechanismus sollte jedoch einen sofortigen oder leicht verzögerten Effekt nach Applikation mit sich bringen. In Bezug auf die posturale Asymmetrie konnte dies weder in der dargelegten noch in einer anderen Studie bestätigt werden (Ferber-Viart et al., 2009). Im Rahmen dieser Dissertation konnten keine Änderungen der $rCMR_{glu}$ in den vestibulären Kernen nach Applikation von N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin und N-Acetyl-D-leucin im Vergleich zur Vehikel-Gruppe festgestellt werden. Die Wiederherstellung und Stabilisierung des Membranpotentials scheint daher für eine Erklärung des positiven Effekts von N-Acetyl-DL-leucin auf posturale Kompensationsmechanismen nicht ausreichend zu sein.

Vestibuläre und cerebelläre Neurone stehen in phylogenetischer und anatomischer Nähe zueinander und bilden funktionell ein anatomisches Netzwerk (Meng et al., 2014). Man kann mutmaßen, dass N-Acetyl-L-leucin einen Effekt auf cerebelläre Neurone ausübt. In einer aktuellen Studie wurden Patienten, die an einer cerebellären Ataxie leiden, mit N-Acetyl-DL-leucin therapiert (Strupp et al., 2013b). Es wurde ein positiver Effekt auf die motorische Lernfähigkeit beobachtet. Komplementär dazu zeigen die μ PET-Analysen im Rahmen dieser Dissertation, dass die Hirnaktivität im Vestibulocerebellum an den Tagen drei bilateral und sieben ipsilateral stärker als contralateral erhöht ist. Der siebte Tag ist derjenige, an welchem die Tiere nach Applikation von N-Acetyl-L-leucin eine

signifikante Besserung in der posturalen Asymmetrie im Vergleich zur Vehikel- und N-Acetyl-D-leucin-Gruppe aufwiesen.

Folgende Hypothese wäre denkbar: Verzweigte proteinogene Aminosäuren wie Leucin oder Isoleucin fungieren bei fast 30% der *de novo* Glutamatsynthese im Rattenhirn als Stickstoff(N)-Donator (Hull et al., 2012). Das Enzym, welches diesen Vorgang katalysiert, ist die verzweigt-kettige-Aminosäuretransferase (engl: *branched chain-aminotransferase*, BCAT). Diese besitzt eine Spezifität für die L-Konfiguration von Molekülen (Yennawar et al., 2002). Diese BCATs sind in der Körnerzellschicht des cerebellären Cortex und in den Purkinjezellen exprimiert. Ihre wesentliche Aufgabe besteht in der Bereitstellung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat in einer adäquaten Menge (Hull et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass verzweigte Aminosäuren bei einer Dosierung von 1,5 bis 6 g pro Tag einen symptomlindernden Effekt auf Patienten mit cerebellärer Ataxie ausüben (Mori et al., 2002). N-Acetyl-L-leucin könnte möglicherweise als Substrat für die BCAT im Cerebellum fungieren. Dies könnte nach einer gewissen Latenzzeit zu einer erhöhten Glutamatkonzentration im cerebellären Cortex führen. Die Voraussetzung für die cerebelläre Plastizität während der Kompensationsmechanismen ist die Funktionalität und Aktivität der metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Smith and Darlington, 1991, Darlington et al., 2002, Gliddon et al., 2005). Dadurch wird indirekt die intrinsische Exzitabilität der vestibulären Neurone erhöht (Johnston et al., 2002, Murai et al., 2004, Aleisa et al., 2007). Die in dieser Studie visualisierte Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im Vestibulocerebellum könnte das Pendant zur erhöhten Aktivität der Neurone darstellen. Die These der L-stereospezifischen BCAT würde auch die fehlende Wirksamkeit des N-Acetyl-D-leucins erklären.

Um diesen möglichen Wirkmechanismus genauer zu untersuchen, wäre ein paralleler Ansatz von N-Acetyl-L-leucin und einer Substanz, welche die BCAT blockiert, denkbar. Folgt man dieser Hypothese, so dürfte nach der Applikation der blockierenden Substanz das N-Acetyl-L-leucin keine Wirkung mehr auf posturale Kompensationsmechanismen ausüben. Ebenso sollten sich die N-Acetyl-L-leucin spezifischen cerebralen Hirnaktivierungsmuster verändert darstellen.

Klinische Anwendung von N-Acetylleucin

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass N-Acetyl-L-leucin dosisabhängig die posturale Kompensation beschleunigt und somit die aktive Komponente von N-Acetyl-DL-leucin darstellt. Das Racemat wird seit über 40 Jahren in Frankreich unter dem Handelsnamen Tanganil® zur Therapie akuter Schwindelsymptomatik eingesetzt und hat sich als gut verträgliches Therapeutikum erwiesen. Die therapeutische Konsequenz wäre eine Darreichungsform, welche ausschließlich das N-Acetyl-L-leucin enthält. Dies könnte von erheblichem pharmakologischen und wissenschaftlichen Interesse sein. Im Racemat befinden sich lediglich 50% der aktiven Substanz. Die restlichen 50% von Tanganil® enthalten das D-Enantiomer. Dieses Enantiomer erreichte zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede auf die Symptome im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Ob das N-Acetyl-D-leucin lediglich eine inaktive Komponente darstellt oder möglicherweise sogar hemmend auf das N-Acetyl-L-leucin wirkt, sollte aus therapeutischem und ökonomischem Interesse weiter abgeklärt werden.

Effekte von 4-Aminopyridin auf posturale Kompensationsmechanismen

Nach der oralen Applikation von 4-Aminopyridin wurde im Gegensatz zu der Gabe von N-Acetylleucin ein akuter Effekt auf die posturale Kompensation nach UL beobachtet. An den ersten drei Tagen post UL wurde bei den 4-AP-Tieren nach Applikation ein relativer Effekt im Vergleich zur Vehikel-Gruppe festgehalten. Dabei war der Verhaltens-Score der 4-AP-Tiere stets signifikant besser. Dieser Effekt war transient und am Folgetag nicht mehr feststellbar. Zusätzlich war der posturale Verhaltens-Score innerhalb der 4-AP-Gruppen im Intergruppenvergleich vor und nach Applikation an den Tagen zwei und drei signifikant vermindert. Dieser signifikante Effekt zeigte sich nicht am ersten Tag nach UL. Möglich wäre, dass am ersten Tag nach UL der Effekt des noch zunehmenden vestibulären Syndroms durch die verzögerte Toxizität der Atoxyl-Lösung dominanter ist als die Wirkung des 4-APs. Der korrespondierende μ PET-Scan am ersten Tag, zwei Stunden nach 4-AP-Applikation, visualisierte im ipsiläsionalen Vestibulocerebellum eine spezifisch erhöhte $rCMR_{glu}$ im Vergleich zu den Vehikel-Tieren.

In der elektrophysiologischen Grundlagenforschung ist das lipophile Pyridinderivat 4-AP als Substanz zur Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanäle, die über eine direkte Interaktion mit einem Kanalprotein zustande kommt, bekannt (Husseini et al., 2010). Der lipophile Charakter von 4-AP bedingt eine problemlose Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke, was eine direkte Wirksamkeit an den Kaliumkanälen ermöglicht. Aktuelle Studien beschrieben, dass 4-AP einen positiven Effekt auf Purkinjezellen ausüben könnte, indem es durch die Blockierung der Kaliumkanäle die Entladungsrate präzisiert, was zu einer Reduktion der Schwindelsymptomatik führt (Goudarzi et al., 2010, Strupp et al., 2011). Es kann vermutet werden, dass sich 4-AP nach vestibulärer Schädigung symptomlindernd auswirkt, indem es die Rhythmizität der Purkinjezellen im Vestibulocerebellum verbessert (Alvina and Khodakhah, 2010). Die Purkinjezellen des Vestibulocerebellums besitzen reziproke Verbindungen zu den Vestibulariskernen. Durch die Erhöhung der intrinsischen Exzitabilität ipsiläsionaler neuronaler Kerne spielt das Vestibulocerebellum eine entscheidende Rolle in der Vermittlung zentraler neuronaler Plastizität nach akuter einseitiger vestibulärer Schädigung (Llinas, 1975, Kitahara et al., 1997, Darlington et al.,

2002, Johnston et al., 2002). Demgemäß wäre ein früher Effekt des 4-APs auf die Schwindelsymptomatik zu erwarten.

Tatsächlich wurde am ersten Tag unmittelbar nach Applikation von 4-AP im μ PET eine erhöhte Stoffwechselaktivität im Vestibulocerebellum beobachtet, was für die posturale Stabilisierung an den ersten drei Tagen verantwortlich sein könnte. Dieser Akuteffekt würde der Pharmakokinetik von 4-AP, welches eine biologische HWZ von zwei Stunden besitzt, entsprechen (Capacio et al., 1996).

Ein vergleichbarer Effekt von 4-AP auf den vestibulocerebellären Glucosemetabolismus wurde in Patienten, welche an der pathologischen zentralen Nystagmusform, dem Downbeatnystagmus, leiden beobachtet (Bense et al., 2006, Kremmyda et al., 2013). Diese Nystagmusform beruht meist auf einer Störung des Kleinhirns, zum Beispiel einer neurodegenerativen Erkrankung (Strupp et al., 2011a). Bei dieser Pathologie wurde eine bilaterale Änderung der cerebellären Hirnaktivität durch 4-AP beobachtet. Im Gegensatz dazu, war der Effekt in der hier dargelegten Studie bei den 4-AP-Tieren spezifisch im ipsilateralen Vestibulocerebellum/Flocculus sichtbar. Eine Erklärung könnte folgendermaßen lauten: 4-AP sorgt vor allem in cerebellären Gehirnregionen mit gestörter Exzitabilität für eine gleichmäßige und regelmäßige Entladungsraten der Neurone. Die Exzitabilität ist nach einseitiger vestibulärer Läsion im Flocculus gestört (Kitahara et al., 1997, Johnston et al., 2002). Das könnte die seitenbetonte Aktivitätsänderung erklären.

Die SPM-Analysen der μ PET-Scans an den Tagen sieben und 15 post UL visualisierten eine signifikante Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im contralateralen vestibulären Kerngebiet der mit 4-AP therapierten Tiere. Diese Asymmetrie suggeriert ein erneut aufgetretenes vestibuläres Tonusungleichgewicht. Die Vestibulariskerne stehen über interkommissurale Verbindungen in einem sich gegenseitig hemmenden Verhältnis (Ris and Godaux, 1998, Olabi et al., 2009). Das Vestibulocerebellum spielt wie zuvor beschrieben eine entscheidende Rolle in der zentralen Plastizität nach unilateraler vestibulärer Schädigung. Der plötzlich unterbrochene Einfluss von 4-AP ab dem dritten Tag nach UL könnte zu einer veränderten oder gestörten Kommunikationsfähigkeit des ipsilateralen vestibulären Kernes führen, wodurch der contralaterale Kern kompensatorisch überreagiert. Das erneut entstandene Tonusungleichgewicht zwischen den beiden Kerngebieten bedingt eine posturale Asymmetrie, was mit dem schlechteren

Verhaltens-Score der 4-AP- im Vergleich zu den Vehikel-Tieren ab Tag sieben übereinstimmt. Die Erhöhung der posturalen Asymmetrie ist nicht signifikant (Tag 21: $p < 0,052$), zeigt jedoch die Tendenz einer protrahierten Kompensation der 4-AP-Tiere. Demzufolge könnte die frühe 4-AP-Aplikation die Interaktion der vestibulären Nuclei beeinflussen und dadurch langfristig die zentrale vestibuläre Kompensation der subakuten Phase stören. Diese Feststellung stimmt mit der Beobachtung von Lacour überein. Diese besagt, dass der Symptomdruck in der akuten Phase des vestibulären Syndroms ausschlaggebend für ein adäquates Funktionieren der vestibulären Kompensation ist (Lacour, 2006).

Im Bereich des posterolateralen Thalamus wird an den Tagen drei und sieben post UL eine gesteigerte $rCMR_{glu}$ gegenüber den Vehikel-Tieren sichtbar. Im Thalamus laufen vestibuläre, propriozeptive und visuelle Information sowie Efferenzen des Kleinhirns zusammen und werden verarbeitet (Meng et al., 2007). Die durch 4-AP-Gabe sichtbare Erhöhung thalamischer Hirnaktivität könnte den sensorischen *missmatch* wie zuvor beschrieben zwischen vestibulärer und sensorischer Information vermitteln, was den tendenziell schlechter kompensierten Grad der posturalen Asymmetrie bei den 4-AP-Tieren erklären würde.

Klinische Anwendung von 4-Aminopyridin

Die Ergebnisse dieser 4-Aminopyridin-Studie erlauben folgende prädiktive Aussage: Die aktivierende Wirkung auf das Vestibulocerebellum während der Akutphase des vestibulären Syndroms führt zu einer akuten posturalen Besserung. Die Symptomminderung ist transient und bedingt konsekutiv eine Reduzierung des Kompensationsdrucks was langfristig zu einer Beeinträchtigung der natürlichen zentralen vestibulären Kompensation führt. Diese Tatsache lässt 4-AP als beschränkt geeignet für die Behandlung von Patienten mit einseitigem Gleichgewichtsausfall erscheinen. Eine grundsätzliche Aussage bezüglich der Behandlungsstrategie von Patienten mit einseitigem vestibulären Defizit konnte bestätigt werden: Der Einsatz von Pharmaka zur Behandlung der heftigen Schwindelsymptomatik in der akuten Phase sollte nur wenn notwendig und so kurz wie möglich erfolgen (Brandt et al., 2013). Eine Symptomsenkung mindert den Kompensationsdruckes und bedingt eine Beeinträchtigung der natürlichen zentralen vestibulären Kompensation (Rascol et al., 1995, Baloh, 2003, Lacour,

2006), was den Ergebnissen der vorliegenden 4-AP Studie entspricht. Die vorliegende 4-Aminopyridin-Studie stellt eine interessante Grundlage dar, um die Vorgänge und Einflüsse einer frühwirksamen Therapie auf die cerebrale Plastizität nach akuter vestibulärer Läsion genauer zu beleuchten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Pharmakologische Einflüsse auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen nach einseitigem peripheren Schaden: μ PET – und Verhaltensanalysen in einem Rattenmodell

Schwindel ist ein häufiges Symptom der Veterinär- und Humanmedizin. Mit einer jährlichen Inzidenz von 3,5/100.000 stellt der einseitige Gleichgewichtsschaden die zweithäufigste Ursache einer peripheren Schwindelerkrankung in der Humanmedizin dar. In der Akutphase besteht ein massives Tonusungleichgewicht zwischen den Vestibularorganen, was Drehschwindel, Fallneigung, Spontannystagmus sowie vegetative Begleitsymptome auslöst. Im Zeitverlauf kommt es zu einer Rückbildung der Symptome. Dies ist überwiegend auf zentrale vestibuläre Kompensationsmechanismen zurückzuführen. Zugrunde liegende neurobiologische und molekulare Mechanismen sind bislang unvollständig verstanden. Vielversprechende therapeutische Ansätze zielen auf die Förderung der natürlichen zentralen Adaptation nach akuter einseitiger vestibulärer Läsion.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten Erkenntnisse über den pharmakologischen Einfluss der Wirkstoffe N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin und N-Acetyl-D-leucin sowie 4-Aminopyridin auf den Vorgang der zentralen vestibulären Kompensation gewonnen werden.

Wir bedienten uns des etablierten Modells der chemischen unilateralen Labyrinthektomie (UL) bei der Ratte. An den ersten drei Tagen nach UL wurden die Tiere mit N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin, N-Acetyl-D-leucin oder 4-Aminopyridin therapiert. Um den pharmakologischen Einfluss auf vestibuläre Kompensationsmechanismen zu untersuchen, erfolgten longitudinale verhaltensphysiologische Analysen und Hirnaktivierungsmessungen mittels [18 F]-Fluorodesoxyglucose- μ PET-Scans. Die Hirnaktivität wurde anhand der cerebralen Glucosestoffwechselrate ($rCMR_{glu}$) detektiert.

Als Vergleichsgrundlage wurde eine Vehikel-Kontroll-Gruppe (Vehikel-Gruppe) von Tieren, welche lediglich die Trägersubstanz nach UL appliziert bekam, untersucht. Diese zeigten von Tag 3 bis Tag 15 eine Besserung posturaler Asymmetrien um 44% sowie ein vollständiges Abklingen des Nystagmus bis zum fünften Tag nach UL. Der Torticollis persistierte hingegen bis Versuchsende an

Tag 15. Die μ PET-Analysen der Vehikel-Tiere visualisierten folgende Veränderungen der $rCMR_{glu}$: 1. Eine persistierend verminderte $rCMR_{glu}$ im contralateralen Colliculus inferior und auditiven Cortex; 2. Eine dynamisch zunehmende $rCMR_{glu}$ im Cerebellum, mit einem Maximum an Tag sieben; 3. Eine verminderte $rCMR_{glu}$ im ipsilateralen vestibulären Kerngebiet direkt nach UL, gefolgt von einer kompensatorisch erhöhten $rCMR_{glu}$ contralateral an Tag eins und einer erniedrigten $rCMR_{glu}$ an Tag drei. Diese dynamische Hirnaktivitätsänderung spiegelt den Prozess der zentralen vestibulären Kompensation wider.

Die Tiere, welche mit N-Acetyl-DL-leucin und N-Acetyl-L-leucin therapiert wurden, zeigten am siebten Tag eine signifikante Besserung posturaler Asymmetrien im Vergleich zu der Vehikel- und N-Acetyl-D-leucin-Gruppe. N-Acetyl-D-leucin hatte zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf das kompensatorische Verhalten. Die Ergebnisse der μ PET-Analysen der N-Acetyl-L-leucin-Tiere im Vergleich zu den Vehikel- und N-Acetyl-D-leucin-Tieren zeigten eine signifikante Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im Vestibulocerebellum sowie eine Verminderung im posterolateralen Thalamus an den Tagen drei und sieben nach UL.

Entsprechend der Resultate dieser Dissertation eignet sich der Wirkstoff N-Acetyl-L-leucin als viel versprechendes Therapeutikum der einseitigen peripheren vestibulären Läsion und stellt die wirksame Komponente von N-Acetyl-DL-leucin dar. Die therapeutische Effizienz liegt einerseits in der Erhöhung der Hirnaktivität im Vestibulocerebellums und andererseits in der Verminderung im posterolateralen Thalamus als Zeichen der Förderung zentraler vestibulärer Kompensation.

Die orale Applikation von 4-Aminopyridin führte zu einer signifikanten Besserung posturaler Asymmetrien zwei Stunden nach Applikation im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Dieser Akuteffekt war transient und am Folgetag nicht mehr darstellbar. Bemerkenswerterweise zeigten die Tiere zu späteren Messzeitpunkten einen zeitlich geminderten und protrahierten Verlauf der posturalen Kompensation im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe. Die μ PET-Analysen zeigten eine signifikante Erhöhung der $rCMR_{glu}$ im ipsilateralen Vestibulocerebellum und dem Paraflocculus direkt nach 4-AP-Applikation. Demgegenüber zeigte sich bei den 4-AP-Tieren im Vergleich zu den Vehikel-Tieren eine persistierende

Asymmetrie der $rCMR_{glu}$ zwischen den vestibulären Kernen sowie eine Erhöhung der thalamischen $rCMR_{glu}$ bis Tag 15.

Die Tatsache, dass 4-AP nach einer kurzfristigen posturalen Stabilisierung zu einer konsekutiven Beeinträchtigung der natürlichen Kompensationsmechanismen führt, lässt 4-AP als beschränkt geeignet für die Behandlung des einseitigen Gleichgewichtsausfalls erscheinen.

Im Rahmen dieser Studie konnte der differenzielle Effekt von Pharmaka auf cerebrale vestibuläre Kompensationsmechanismen mit Hilfe eines kombinierten Einsatzes von Verhaltenstestung und μ PET-Analysen gezeigt werden. Dieser methodische Ansatz scheint vielversprechend für eine generelle Untersuchung der Plastizität des adulten Gehirns zu sein.

VII. SUMMARY

Investigation of pharmacological effects on central vestibular compensation following unilateral vestibular loss by behavioural scoring and μ PET-imaging - a rat study

Vertigo is a common disease in veterinary and human medicine. An acute unilateral vestibular lesion is the second most prevalent reason for vertigo of peripheral origin in humans. Annual incidence rate reaches about 3,5 per 100,000 inhabitants. Unilateral failure leads to a vestibular tone imbalance with nystagmus, postural imbalance, head roll tilt, nausea, and vomiting. Remarkably, these initial deficits gradually decrease over days to weeks attributed to central vestibular compensation. The underlying molecular and cellular mechanism still remain to be elucidated. A promising therapeutic strategy for acute unilateral vestibular disorders is to improve and accelerate central vestibular compensation by medication.

This study aimed to investigate the pharmacological effect of N-Acetyl-DL-leucin, N-Acetyl-L-leucin and N-Acetyl-D-leucine as well as 4-Aminopyridin (4-AP) on central vestibular compensation.

We performed left-sided chemical unilateral labyrinthectomy in rats, which is a well established model to investigate clinical and neurophysiological consequences due to unilateral vestibular ablation. Treatment of N-Acetylleucine and 4-Aminopyridin (4-AP) was performed on the first three days after UL. To investigate the pharmacological effect on vestibular symptoms in early acute vestibulopathy and its long-term consequences for vestibular compensation, sequential behavioural scoring and [18 F]-Fluoro-desoxyglucose- μ PET was performed. μ PET-imaging was done to examine brain plasticity via regional cerebral metabolic rate for glucose ($rCMR_{glu}$).

A group of nontreated animals (vehicle) was observed as basis for defining pharmacological effects on mechanism of vestibular compensation. Score of postural asymmetry reduced from day three until day 15 by 44%. Nystagmus disappeared in all animals until day five. Head roll tilt persisted until day 15. μ PET-analysis revealed the following effects: 1. persistent decrease of $rCMR_{glu}$ in the contralesional colliculus inferior and auditory cortex; 2. dynamic increase of

rCMR_{glu} in the cerebellum with an maximum on day seven; 3. decrease of rCMR_{glu} in the ipsilesional vestibular nucleus four hours post UL, following contralesional increase on day one and decrease on day three, representing dynamic vestibular compensation.

In the group of animals treated with N-Acetyl-DL-leucine and N-Acetyl-L-leucine a significant reduction of postural imbalance scores was identified on day seven compared to vehicle and N-Acetyl-D-leucine-group. Application of N-Acetyl-D-leucine had no significant effect on compensation at any timepoint. μ PET analysis revealed that N-Acetyl-L-leucine-group caused a significant increase of rCMR_{glu} in the vestibulocerebellum and a decrease in the posterolateral thalamus and subthalamic region at day three and seven compared to vehicle- and N-Acetyl-D-leucine-group.

In conclusion, N-Acetyl-L-leucin seems to be a promising pharmacoon to affect extent and time course of central vestibular compensation. It is the effective enantiomer of N-Acetyl-DL-leucin by accelerating postural compensation after unilateral vestibular loss. This is likely due to an activation of the vestibulocerebellum and deactivation of the posterolateral thalamus.

Oral administration of 4-Aminopyridin at day one to three significantly improved postural imbalance two hours after treatment as compared to the control group. Remarkably animals in the 4-AP group showed a prolonged and impaired course of vestibular compensation. μ PET data revealed a significant increase of rCMR_{glu} in ipsilesional vestibulocerebellum after administration of 4-AP. However, asymmetry of rCMR_{glu} in the vestibular nuclei and thalamus persisted until day 15.

Finally, the therapeutic efficacy of this substance is based on a transient improvement of postural imbalance in acute unilateral vestibulopathy via activation of vestibulocerebellum. However, reduction of the symptoms burden during acute phase of the vestibular syndroms seems to hamper the course of vestibular compensation. Therefore, 4-AP exhibited only limited suitability for the treatment of unilateral vestibular loss.

In this study the differential pharmacological effects of N-acetylleucine and 4-Aminopyridin on central vestibular compensation were demonstrated based on behavioural scoring and μ PET analysis. This methodical approach of μ PET-imaging in combination with behavioral scoring seems to be promising to investigate cerebral plasticity in general.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ALAVI A., KUNG J.W., ZHUANG H. (2004): Implications of PET based molecular imaging on the current and future practice of medicine. *Seminars in nuclear medicine* 34, 56-69

ALEISA M., ZEITOUNI A.G., CULLEN K.E. (2007): Vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy: normal versus cerebellar dysfunctional mice. *The Journal of otolaryngology* 36, 315-321

ALVINA K., KHODAKHAH K. (2010): The therapeutic mode of action of 4-aminopyridine in cerebellar ataxia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 7258-7268

ANGELAKI D.E., CULLEN K.E. (2008): Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annual review of neuroscience* 31, 125-150

AVRIL N. (2004): GLUT1 expression in tissue and (18)F-FDG uptake. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 45, 930-932

BAERT A.L., SARTOR K. (2006): *Diagnostic Nuclear Medicine*. Berlin, Springer-Verlag

BAILEY D.L., TOWNSEND D.W., VALK P.E., MAISEY M.N. (2005): *Positron Emission Tomography: Basic Sciences*. New York, Springer-Verlag

BALOH R.W. (2003): Clinical practice. Vestibular neuritis. *The New England journal of medicine* 348, 1027-1032

BECKER-BENSE S., BUCHHOLZ H.G., BEST C., SCHRECKENBERGER M., BARTENSTEIN P., DIETERICH M. (2013): Vestibular compensation in acute unilateral medullary infarction: FDG-PET study. *Neurology* 80, 1103-1109

BENNINGHOFF A., DRENCKHAHN D. (2012): Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Urban & Fischer-Verlag

BENSE S., BARTENSTEIN P., LOCHMANN M., SCHLINDWEIN P., BRANDT T., DIETERICH M. (2004): Metabolic changes in vestibular and visual cortices in acute vestibular neuritis. *Annals of neurology* 56, 624-630

BERANECK M., MCKEE J.L., ALEISA M., CULLEN K.E. (2008): Asymmetric recovery in cerebellar-deficient mice following unilateral labyrinthectomy. *Journal of neurophysiology* 100, 945-958

BERGQUIST F., LUDWIG M., DUTIA M.B. (2008): Role of the commissural inhibitory system in vestibular compensation in the rat. *The Journal of physiology* 586, 4441-4452

BEST C., ECKHARDT-HENN A., DIENER G., BENSE S., BREUER P., DIETERICH M. (2006): Interaction of somatoform and vestibular disorders. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77, 658-664

BLES W., KAPTEYN T.S., BRANDT T., ARNOLD F. (1980): The mechanism of physiological height vertigo. II. Posturography. *Acta oto-laryngologica* 89, 534-540

BOENING G. (2002): Verbesserte statistische Bildrekonstruktion für die hochauflösende PET: Bestimmung der Systemmatrix aus Monte Carlo Simulation, Validierung und Anwendung auf Tiermessungen, sowie Erweiterung für einen Doppellagen-Tomographen. Technische Universität München, Fakultät für Physik, Dissertation

BORSOOK D., HARGREAVES R., BECERRA L. (2011): Can Functional Magnetic Resonance Imaging Improve Success Rates in CNS Drug Discovery? *Expert Opin Drug Discov* 6, 597-617

BOYDEN E.S., KATOH A., RAYMOND J.L. (2004): Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annual review of neuroscience* 27, 581-609

BRANDT T. (1999): *Vertigo: Its Multisensory Syndromes*. Springer-Verlag

BRANDT T., DAROFF R.B. (1980): The multisensory physiological and pathological vertigo syndromes. *Annals of neurology* 7, 195-203

BRANDT T., DIETERICH M., ECKHARDT-HENN A., HAMANN K.F., LEMPERT T., POEWE W., STRAUMANN D., STRUPP M. (2008): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie [online]. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 654-675

BRANDT T., DIETERICH M., STRUPP M. (2013): *Vertigo - Leitsymptom Schwindel*. Springer-Verlag

BRANDT T., DIETERICH M., STRUPP M. (2007): *Vertigo and Dizziness: Common Complaints*. Springer-Verlag

BRANDT T., HUPPERT D., HECHT J., KARCH C., STRUPP M. (2006): Benign paroxysmal positioning vertigo: a long-term follow-up (6-17 years) of 125 patients. *Acta oto-laryngologica* 126, 160-163

BRANDT T., STEDDIN S. (1993): Current view of the mechanism of benign paroxysmal positioning vertigo: cupulolithiasis or canalolithiasis? *Journal of vestibular research : equilibrium & orientation* 3, 373-382

BRANDT T., STRUPP M., BENSON J. (1999): You are better off running than walking with acute vestibulopathy. *Lancet* 354, 746

BRANDT T., ZWERGAL A., STRUPP M. (2009): Medical treatment of vestibular disorders. *Expert opinion on pharmacotherapy* 10, 1537-1548

BUTTNER U., BUTTNER-ENNEVER J.A. (1988): Present concepts of oculomotor organization. *Reviews of oculomotor research* 2, 3-32

CAPACIO B.R., BYERS C.E., MATTHEWS R.L., CHANG F.C. (1996): A method for determining 4-aminopyridine in plasma: pharmacokinetics in anaesthetized guinea pigs after intravenous administration. *Biomedical chromatography : BMC* 10, 111-116

CASS S.P., GOSHGARIAN H.G. (1991): Vestibular compensation after labyrinthectomy and vestibular neurectomy in cats. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 104, 14-19

CHRISMAN C.L. (1980): Vestibular diseases. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 10, 103-129

CULLEN K., SADEGHI S. (2008): Vestibular system. *Scholarpedia* 3, 3013

CULLEN K.E., MINOR L.B., BERANECK M., SADEGHI S.G. (2009): Neural substrates underlying vestibular compensation: contribution of peripheral versus central processing. *Journal of vestibular research : equilibrium & orientation* 19, 171-182

CUNHA L., HORVATH I., FERREIRA S., LEMOS J., COSTA P., VIEIRA D., VERES D.S., SZIGETI K., SUMMAVIELLE T., MATHE D., METELLO L.F. (2013): Preclinical Imaging: an Essential Ally in Modern Biosciences. *Molecular diagnosis & therapy*

CURTHOYS I.S. (2000): Vestibular compensation and substitution. *Current opinion in neurology* 13, 27-30

CURTHOYS I.S., HALMAGYI G.M. (1992): Behavioural and neural correlates of vestibular compensation. *Bailliere's clinical neurology* 1, 345-372

DARLINGTON C.L., DUTIA M.B., SMITH P.F. (2002): The contribution of the intrinsic excitability of vestibular nucleus neurons to recovery from vestibular damage. *The European journal of neuroscience* 15, 1719-1727

DARLINGTON C.L., FLOHR H., SMITH P.F. (1991): Molecular mechanisms of brainstem plasticity. The vestibular compensation model. *Molecular neurobiology* 5, 355-368

DARLINGTON C.L., SMITH P.F. (2000): Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances. *Progress in neurobiology* 62, 313-325

DAVIS L.E. (1994): Dizziness in elderly men. *Journal of the American Geriatrics Society* 42, 1184-1188

DE WAELE C., VIDAL P.P., TRAN BA HUY P., FREYSS G. (1990): [Vestibular compensation. Review of the literature and clinical applications]. *Annales d'oto-laryngologie et de chirurgie cervico faciale : bulletin de la Societe d'oto-laryngologie des hopitaux de Paris* 107, 285-298

DEVEZE A., BERNARD-DEMANZE L., XAVIER F., LAVIEILLE J.P., ELZIERE M. (2014): Vestibular compensation and vestibular rehabilitation. Current concepts and new trends. *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology* 44, 49-57

DIERINGER N. (1995): 'Vestibular compensation': neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Progress in neurobiology* 46, 97-129

DIETERICH M., BRANDT T. (2008): Functional brain imaging of peripheral and central vestibular disorders. *Brain : a journal of neurology* 131, 2538-2552

DIETERICH M., BRANDT T. (2010): Imaging cortical activity after vestibular lesions. *Restorative neurology and neuroscience* 28, 47-56

DIETERICH M., BRANDT T. (2001): Vestibular system: anatomy and functional magnetic resonance imaging. *Neuroimaging clinics of North America* 11, 263-273

DUNN J., BLIGHT A. (2011): Dalfampridine: a brief review of its mechanism of action and efficacy as a treatment to improve walking in patients with multiple sclerosis. *Current medical research and opinion* 27, 1415-1423

DUTHEIL S., ESCOFFIER G., GHARBI A., WATABE I., TIGHILET B. (2013): 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 : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 15555-15566

DUTHEIL S., LACOUR M., TIGHILET B. (2011): [Discovering a new functional neurogenic zone: the vestibular nuclei of the brainstem]. *Medecine sciences : M/S* 27, 605-613

DUTIA M.B. (2010): Mechanisms of vestibular compensation: recent advances. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 18, 420-424

ECKHARDT-HENN A., HOFFMANN S.O., TETTENBORN B., THOMALSKE C., HOPF H.C. (1997): Phobischer Schwankschwindel - Eine weitere Differenzierung psychogener Schwindelzustände erscheint erforderlich. *Der Nervenarzt*, 68, 806-812

ERNST A., BASTA D. (2011): Gleichgewichtsstörungen: Diagnostik und Therapie beim Leitsymptom Schwindel. Stuttgart, Thieme-Verlag

FABRE P. (2008): Treatment of vertigo with Acetyl-L-leucine. Patent cooperation treaty (PCT), WO 2008/032222 A2, France

FELDMAN H.S., COVINO B.G. (1988): Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. *Anesthesia and analgesia* 67, 1047-1052

FERBER-VIART C., DUBREUIL C., VIDAL P.P. (2009): Effects of acetyl-DL-leucine in vestibular patients: a clinical study following neurotomy and labyrinthectomy. *Audiology & neuro-otology* 14, 17-25

FLECKNELL P. (2002): Replacement, reduction and refinement. *Altex* 19, 73-78

FÜSGEN I. (2010): Vertigo, Schwindel - Symptomatik, Diagnostik und Therapie beim älteren Patienten. Urban & Vogel-Verlag

GALLAGHER B.M., FOWLER J.S., GUTTERSON N.I., MACGREGOR R.R., WAN C.N., WOLF A.P. (1978): Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of nuclear medicine* 19, 1154-1161

GEWOSKI L., KNOOP B., MUNZ D. (2005): Bildgebende Messtechnik in der Nuklearmedizin. München, W. Zuckschwerdt Verlag

GLIDDON C.M., DARLINGTON C.L., SMITH P.F. (2005): GABAergic systems in the vestibular nucleus and their contribution to vestibular compensation. *Progress in neurobiology* 75, 53-81

GÖTTE H., KLOSS G. (1973): Nuklearmedizin und Radiochemie. Angewandte Chemie, WILEY-VCH Verlag 85, 793-802

GOUDARZI I., KAFFASHIAN M., SHABANI M., HAGHDOOST-YAZDI H., BEHZADI G., JANAHMADI M. (2010): In vivo 4-aminopyridine treatment alters the neurotoxin 3-acetylpyridine-induced plastic changes in intrinsic electrophysiological properties of rat cerebellar Purkinje neurones. *European journal of pharmacology* 642, 56-65

GRÄTZEL VON GRÄTZ P. (2011): Der Schwindel. Forschung – Diagnose – Therapie. Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)

GURKOV R., FLATZ W., KEESER D., STRUPP M., ERTL-WAGNER B., KRAUSE E. (2013a): Effect of standard-dose Betahistine on endolymphatic hydrops: an MRI pilot study. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 270, 1231-1235

GURKOV R., KANTNER C., STRUPP M., FLATZ W., KRAUSE E., ERTL-WAGNER B. (2013b): Endolymphatic hydrops in patients with vestibular migraine and auditory symptoms. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*

HAIN T.C., SQUIRES T.M., STONE H.A. (2005): Clinical implications of a mathematical model of benign paroxysmal positional vertigo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1039, 384-394

HAMANN K.F. (2009): Vestibular compensation : basic principles and clinical significance. *Hno* 57, 487-502

HOFFMAN E.J., HUANG S.C., PHELPS M.E., KUHL D.E. (1981): Quantitation in positron emission computed tomography: 4. Effect of accidental coincidences. *Journal of computer assisted tomography* 5, 391-400

HORAK F.B. (2010): Postural compensation for vestibular loss and implications for rehabilitation. *Restorative neurology and neuroscience* 28, 57-68

HUANG S.C., PHELPS M.E., HOFFMAN E.J., SIDERIS K., SELIN C.J., KUHL D.E. (1980): Noninvasive determination of local cerebral metabolic rate of glucose in man. *The American journal of physiology* 238, E69-82

HULL J., HINDY M.E., KEHOE P.G., CHALMERS K., LOVE S., CONWAY M.E. (2012): Distribution of the branched chain aminotransferase proteins in the human brain and their role in glutamate regulation. *Journal of neurochemistry* 123, 997-1009

HUSSEINI L., LEUSSINK V.I., KIESEIER B.C., HARTUNG H.-P. (2010): 4-Aminopyridin (Fampridin) - Ein neuer Ansatz zur symptomatischen Therapie der Multiplen Sklerose. *Der Nervenarzt*, Springer-Verlag

HUTCHINS G.D., MILLER M.A., SOON V.C., RECEVEUR T. (2008): Small animal PET imaging. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 49, 54-65

IGARASHI M., T O.U., ALFORD B.R. (1981): Volumetric and dimensional measurements of vestibular structures in the squirrel monkey. *Acta otolaryngologica* 91, 437-444

JACOBS A.H., LI H., WINKELER A., HILKER R., KNOESS C., RUGER A., GALLDIKS N., SCHALLER B., SOBESKY J., KRACHT L., MONFARED P., KLEIN M., VOLLMAR S., BAUER B., WAGNER R., GRAF R., WIENHARD K., HERHOLZ K., HEISS W.D. (2003): PET-based molecular imaging in neuroscience. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30, 1051-1065

JEON E.J., PARK Y.S., PARK S.N., PARK K.H., KIM D.H., NAM I.C., CHANG K.H. (2013): Clinical significance of orthostatic dizziness in the diagnosis of benign paroxysmal positional vertigo and orthostatic intolerance. *American journal of otolaryngology* 34, 471-476

JOHNSTON A., SECKL J., DUTIA M. (2002): Role of the flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat. *The Journal of physiology* 545, 903-911

JOHNSTON A.R., SECKL J.R., DUTIA M.B. (2002): Role of the flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat. *The Journal of physiology* 545, 903-911

JUDGE S.I., BEVER C.T., JR. (2006): Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacology & therapeutics* 111, 224-259

KALLA R., GLASAUER S., SCHAUTZER F., LEHNEN N., BUTTNER U., STRUPP M., BRANDT T. (2004): 4-aminopyridine improves downbeat nystagmus, smooth pursuit, and VOR gain. *Neurology* 62, 1228-1229

KAMMERMEIER S., KLEINE J., BUTTNER U. (2009): Vestibular-neck interaction in cerebellar patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1164, 394-399

KARLBERG M., HALL K., QUICKERT N., HINSON J., HALMAGYI G.M. (2000): What inner ear diseases cause benign paroxysmal positional vertigo? *Acta oto-laryngologica* 120, 380-385

KARP J.S., MUEHLEHNER G., QU H., YAN X.H. (1995): Singles transmission in volume-imaging PET with a ¹³⁷Cs source. *Physics in medicine and biology* 40, 929-944

KENT M., PLATT S.R., SCHATZBERG S.J. (2010): The neurology of balance: function and dysfunction of the vestibular system in dogs and cats. *Veterinary journal* 185, 247-258

KIM E.E., JACKSON E.F. (1999): *Molecular Imaging in Oncology*. Berlin, Springer-Verlag

KITAHARA T., HORII A., KONDOH K., OKUMURA S., KUBO T. (2007): [Dynamic vestibular compensation in vestibular peripheral diseases]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho* 110, 720-727

KITAHARA T., TAKEDA N., SAIKA T., KUBO T., KIYAMA H. (1997): Role of the flocculus in the development of vestibular compensation: immunohistochemical studies with retrograde tracing and flocculectomy using Fos expression as a marker in the rat brainstem. *Neuroscience* 76, 571-580

KREMMYDA O., ZWERGAL A., LA FOUGERE C., BRANDT T., JAHN K., STRUPP M. (2013): 4-Aminopyridine suppresses positional nystagmus caused by cerebellar vermis lesion. *Journal of neurology* 260, 321-323

LA FOUGERE C., BONING G., BARTMANN H., WANGLER B., NOWAK S., JUST T., WAGNER E., WINTER P., ROMINGER A., FORSTER S., GILDEHAUS F.J., ROSA-NETO P., MINUZZI L., BARTENSTEIN P., POTSCHKA H., CUMMING P. (2010): Uptake and binding of the serotonin 5-HT_{1A} antagonist [18F]-MPPF in brain of rats: effects of the novel P-glycoprotein inhibitor tariquidar. *NeuroImage* 49, 1406-1415

LACOUR M. (2013): Betahistine treatment in managing vertigo and improving vestibular compensation: clarification. *Journal of vestibular research : equilibrium & orientation* 23, 139-151

LACOUR M. (2006): Restoration of vestibular function: basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Current medical research and opinion* 22, 1651-1659

LACOUR M., DUTHEIL S., TIGHILET B., LOPEZ C., BOREL L. (2009): Tell me your vestibular deficit, and i'll tell you how you'll compensate. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1164, 268-278

LEBLANC A. (1998): *Atlas of Hearing and Balance Organs* Springer-Verlag

LEMPERT T., NEUHAUSER H. (2009): Epidemiology of vertigo, migraine and vestibular migraine. *Journal of neurology* 256, 333-338

LEUNG K. (2004): [18F]Fluoro-2-deoxy-2-D-glucose. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. [online]

LLINAS R.R. (1975): The cortex of the cerebellum. *Scientific American* 232, 56-71

MAGNUSSON M., PADOAN S., KARLBERG M., JOHANSSON R. (1991): Delayed onset of ototoxic effects of gentamicin in treatment of Meniere's disease. *Acta oto-laryngologica Supplementum* 481, 610-612

MARIANI R., RASALA B.A., RUTTER G., WIEGERS K., BRANDT S.M., KRAUSSLICH H.G., LANDAU N.R. (2001): Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *Journal of virology* 75, 3141-3151

MENG H., BLAZQUEZ P.M., DICKMAN J.D., ANGELAKI D.E. (2014): Diversity of vestibular nuclei neurons targeted by cerebellar nodulus inhibition. *The Journal of physiology* 592, 171-188

MENG H., MAY P.J., DICKMAN J.D., ANGELAKI D.E. (2007): Vestibular signals in primate thalamus: properties and origins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 13590-13602

MINOR L.B., SCHELSEL D.A., CAREY J.P. (2004): Meniere's disease. *Current opinion in neurology* 17, 9-16

MORI M., ADACHI Y., MORI N., KURIHARA S., KASHIWAYA Y., KUSUMI M., TAKESHIMA T., NAKASHIMA K. (2002): Double-blind crossover study of branched-chain amino acid therapy in patients with spinocerebellar degeneration. *Journal of the neurological sciences* 195, 149-152

MURAI N., TSUJI J., ITO J., MISHINA M., HIRANO T. (2004): Vestibular compensation in glutamate receptor delta-2 subunit knockout mice: dynamic property of vestibulo-ocular reflex. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 261, 82-86

NEDZELSKI J.M., BARBER H.O., MCILMOYL L. (1986): Diagnoses in a dizziness unit. *The Journal of otolaryngology* 15, 101-104

NEUHAUSER H.K. (2009): [Epidemiology of dizziness and vertigo]. *Der Nervenarzt* 80, 887-894

NEUHAUSER H.K. (2007): Epidemiology of vertigo. *Current opinion in neurology* 20, 40-46

NEUHAUSER H.K., RADTKE A., VON BREVERN M., FELDMANN M., LEZIUS F., ZIESE T., LEMPERT T. (2006): Migrainous vertigo: prevalence and impact on quality of life. *Neurology* 67, 1028-1033

NEWBERG A., ALAVI A., REIVICH M. (2002): Determination of regional cerebral function with FDG-PET imaging in neuropsychiatric disorders. *Seminars in nuclear medicine* 32, 13-34

NEWLANDS S.D., WEI M. (2013): Responses of central vestibular neurons to sinusoidal yaw rotation in compensated macaques after unilateral labyrinthectomy. *Journal of neurophysiology* 110, 1822-1836

PARK B.R., CHOI M.A., HONG S.M. (2013): Temporal changes of calbindin expression in the nodulus following unilateral labyrinthectomy in rats. *Neuroscience letters* 555, 47-50

PAXINOS G., WATSON C. (2005): *The rat brain in stereotactic coordinates*. Academic Press Sydney

PEUSNER K., VIDAL P.P., MINOR L., CULLEN K., YATES B., SHAO M., DUTIA M. (2009): Vestibular compensation: new clinical and basic science perspectives. *Journal of vestibular research : equilibrium & orientation* 19, 143-146

PHELPS M.E. (2000): Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9226-9233

PIMLOTT S.L., SUTHERLAND A. (2011): Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chemical Society reviews* 40, 149-162

PLATT C., POPPER A.N. (1981): *Fine Structure and Function of the Ear*. New York, Springer-Verlag

PRECHT W., SHIMAZU H., MARKHAM C.H. (1966): A mechanism of central compensation of vestibular function following hemilabyrinthectomy. *Journal of neurophysiology* 29, 996-1010

PURVES D., AUGUSTINE G.J., FITZPATRICK D. (2001): *The Otolith Organs: The Utricle and Sacculus*. Neuroscience

RASCOL O., HAIN T.C., BREFEL C., BENAZET M., CLANET M., MONTASTRUC J.L. (1995): Antivertigo medications and drug-induced vertigo. A pharmacological review. *Drugs* 50, 777-791

REIVICH M., KUHL D., WOLF A., GREENBERG J., PHELPS M., IDO T., CASELLA V., FOWLER J., HOFFMAN E., ALAVI A., SOM P., SOKOLOFF L. (1979): The [¹⁸F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circulation research* 44, 127-137

RIS L., GODAUX E. (1998): Neuronal activity in the vestibular nuclei after contralateral or bilateral labyrinthectomy in the alert guinea pig. *Journal of neurophysiology* 80, 2352-2367

ROSSMEISL J.H., JR. (2010): Vestibular disease in dogs and cats. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 40, 81-100

ROTH H.J., MÜLLER E.C., FOLKERS G. (1998): *Stereochemie & Arzneistoffe*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft

SCHAAF H. (2012): *Morbus Menière. Schwindel - Hörverlust - Tinnitus - Eine psychosomatisch orientierte Darstellung*. Springer-Verlag

SCHALLER B. (2003): *Positronenemissions-Tomographie zur Darstellung der Pathophysiologie bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems*. *Schweiz Med Forum* 23, 545-546

SCHICHA H., SCHOBER O. (2013): *Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung*. Schattauer-Verlag

SCHNIEPP R., WUEHR M., NEUHAEUSSER M., BENECKE A.K., ADRION C., BRANDT T., STRUPP M., JAHN K. (2012): 4-aminopyridine and cerebellar gait: a retrospective case series. *Journal of neurology* 259, 2491-2493

SCHULZ P., ARBUSOW V., STRUPP M., DIETERICH M., RAUCH E., BRANDT T. (1998): Highly variable distribution of HSV-1-specific DNA in human geniculate, vestibular and spiral ganglia. *Neuroscience letters* 252, 139-142

SEDEHIZADEH S., KEOGH M., MADDISON P. (2012): The use of aminopyridines in neurological disorders. *Clinical neuropharmacology* 35, 191-200

SEKITANI T., IMATE Y., NOGUCHI T., INOKUMA T. (1993): Vestibular neuronitis: epidemiological survey by questionnaire in Japan. *Acta otolaryngologica Supplementum* 503, 9-12

SELIMOGLU E. (2007): Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Current pharmaceutical design* 13, 119-126

SHAIKH A.G., MARTI S., TARNUTZER A.A., PALLA A., CRAWFORD T.O., ZEE D.S., STRAUMANN D. (2013): Effects of 4-aminopyridine on nystagmus and vestibulo-ocular reflex in ataxia-telangiectasia. *Journal of neurology* 260, 2728-2735

SHI R., SUN W. (2011): Potassium channel blockers as an effective treatment to restore impulse conduction in injured axons. *Neuroscience bulletin* 27, 36-44

SMITH K.J., FELTS P.A., JOHN G.R. (2000): Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain : a journal of neurology* 123 (Pt 1), 171-184

SMITH P.F., CURTHOYS I.S. (1989): Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain research Brain research reviews* 14, 155-180

SMITH P.F., CURTHOYS I.S. (1988): Neuronal activity in the ipsilateral medial vestibular nucleus of the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Brain research* 444, 308-319

SMITH P.F., DARLINGTON C.L. (1991): Neurochemical mechanisms of recovery from peripheral vestibular lesions (vestibular compensation). *Brain research Brain research reviews* 16, 117-133

SMITH T.A. (2000): Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *British journal of biomedical science* 57, 170-178

STOLL W. (2001): Vestibuläre Erkrankung. Stuttgart, Thieme-Verlag

STOLL W., MATZ D.R., MOST E., RUDOLF G.A.E. (2004): Schwindel und Gleichgewichtsstörungen. Stuttgart, Thieme-Verlag

STRAKA H., VIBERT N., VIDAL P.P., MOORE L.E., DUTIA M.B. (2005): Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neurons: function, development and plasticity. *Progress in neurobiology* 76, 349-392

STRUPP M. (2008): Schwindel - Therapie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Georg-Thieme Verlag

STRUPP M., ARBUSOW V., BRANDT T. (2001a): Exercise and drug therapy alter recovery from labyrinth lesion in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 942, 79-94

STRUPP M., BRANDT T. (2009): Current treatment of vestibular, ocular motor disorders and nystagmus. *Therapeutic advances in neurological disorders* 2, 223-239

STRUPP M., BRANDT T. (2008): Diagnosis and treatment of vertigo and dizziness. *Deutsches Arzteblatt international* 105, 173-180

STRUPP M., DIETERICH M., BRANDT T. (2013a): The Treatment and Natural Course of Peripheral and Central Vertigo. *Deutsches Arzteblatt international*, 110, 505-516

STRUPP M., HUPERT D., FRENZEL C., WAGNER J., HAHN A., JAHN K., ZINGLER V.C., MANSMANN U., BRANDT T. (2008): Long-term prophylactic treatment of attacks of vertigo in Meniere's disease--comparison of a high with a low dosage of betahistine in an open trial. *Acta oto-laryngologica* 128, 520-524

STRUPP M., KALLA R., CLAASSEN J., ADRION C., MANSMANN U., KLOPSTOCK T., FREILINGER T., NEUGEBAUER H., SPIEGEL R., DICHGANS M., LEHMANN-HORN F., JURKAT-ROTT K., BRANDT T., JEN J.C., JAHN K. (2011): A randomized trial of 4-aminopyridine in EA2 and related familial episodic ataxias. *Neurology* 77, 269-275

STRUPP M., KALLA R., DICHGANS M., FREILINGER T., GLASAUER S., BRANDT T. (2004): Treatment of episodic ataxia type 2 with the potassium channel blocker 4-aminopyridine. *Neurology* 62, 1623-1625

STRUPP M., SCHUELER O., STRAUBE A., VON STUCKRAD-BARRE S., BRANDT T. (2001b): "Atraumatic" Sprotte needle reduces the incidence of post-lumbar puncture headaches. *Neurology* 57, 2310-2312

STRUPP M., TEUFEL J., HABS M., FEUERECKER R., MUTH C., VAN DE WARRENBURG B.P., KLOPSTOCK T., FEIL K. (2013b): Effects of acetyl-DL-leucine in patients with cerebellar ataxia: a case series. *Journal of neurology* 260, 2556-2561

THOMAS W.B. (2000): Vestibular dysfunction. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 30, 227-249, viii

TREPEL M. (1999): *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. München, Urban & Fischer Verlag

VAN DIEMEN H.A., POLMAN C.H., VAN DONGEN T.M., VAN LOENEN A.C., NAUTA J.J., TAPHOORN M.J., VAN WALBEEK H.K., KOETSIER J.C. (1992): The effect of 4-aminopyridine on clinical signs in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, cross-over study. *Annals of neurology* 32, 123-130

VIBERT N., VIDAL P.P. (2001): In vitro effects of acetyl-DL-leucine (tanganil) on central vestibular neurons and vestibulo-ocular networks of the guinea-pig. *The European journal of neuroscience* 13, 735-748

VIDAL P.P., DE WAELE C., VIBERT N., MUHLETHALER M. (1998): Vestibular compensation revisited. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 119, 34-42

VIGNAUX G., CHABBERT C., GABOYARD-NIAY S., TRAVO C., MACHADO M.L., DENISE P., COMOZ F., HITIER M., LANDEMORE G., PHILOXENE B., BESNARD S. (2012): Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsanilate in rats. *Toxicology and applied pharmacology* 258, 61-71

VOLLMAR S., CIZEK J., SUÉ M., KLEIN J., JACOBS A.H., HERHOLZ K. (2004): VINCI -Volume Imaging in Neurological Research, Co-Registration and ROIs included. 115-131

VON BREVERN M., LEZIUS F., TIEL-WILCK K., RADTKE A., LEMPERT T. (2004): Benign paroxysmal positional vertigo: current status of medical management. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 130, 381-382

VON BREVERN M., RADTKE A., LEZIUS F., FELDMANN M., ZIESE T., LEMPERT T., NEUHAUSER H. (2007): Epidemiology of benign paroxysmal positional vertigo: a population based study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78, 710-715

WALKER M.F. (2009): Treatment of vestibular neuritis. *Curr Treat Options Neurol* 11, 41-45

WATSON C.C., NEWPORT D., CASEY M.E. (1996): A Single Scatter Simulation Technique for Scatter Correction in 3D PET. In: *Three-Dimensional Image Reconstruction in Radiology and Nuclear Medicine*. Netherlands, Springer-Verlag

WERSINGER E., GABOYARD-NIAY S., TRAVO C., SOTO E., BAEZ A., VEGA R., BRUGEAUD A., CHABBERT C. (2013): Symptomatic treatment of vestibular deficits: therapeutic potential of histamine H4 receptors. *Journal of vestibular research : equilibrium & orientation* 23, 153-159

WIENHARD K., WAGNER R., HEISS W. (1989): PET: Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie. Berlin, Springer-Verlag

XIONG G., PAUL C., TODICA A., HACKER M., BARTENSTEIN P., BONING G. (2012): Noninvasive image derived heart input function for CMRglc measurements in small animal slow infusion FDG PET studies. *Physics in medicine and biology* 57, 8041-8059

YASUSHI FURUTA, TSUYOSHI TAKASU, NAGASHIMA K. (1993): Latent Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Vestibular Ganglia. *Acta otolaryngologica* 113, 85-89

YENNAWAR N.H., CONWAY M.E., YENNAWAR H.P., FARBER G.K., HUTSON S.M. (2002): Crystal structures of human mitochondrial branched chain aminotransferase reaction intermediates: ketimine and pyridoxamine phosphate forms. *Biochemistry* 41, 11592-11601

ZHOU W., ZHOU L.Q., ZHANG S.L., LIU B., LENG Y.M., ZHOU R.H., KONG W.J. (2013): The changes in mGluR2 and mGluR7 expression in rat medial vestibular nucleus and flocculus following unilateral labyrinthectomy. *International journal of molecular sciences* 14, 22857-22875

ZWERGAL A., SCHNIEPP R. (2010): Vestibuläre Kompensation. Klinische und wissenschaftliche Aspekte. *Nervenheilkunde* 29, 648-653

ZWERGAL A., STRUPP M., BRANDT T., BUTTNER-ENNEVER J.A. (2009): Parallel ascending vestibular pathways: anatomical localization and functional specialization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1164, 51-59

IX. ANHANG

Verhaltens-Scores der posturalen Asymmetrie im Zeitverlauf nach UL. Die Rohdaten sind gelistet als Median (50% Quartil), 25%- und 75%-Quartil.

Vehikel (n = 17)	d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil	4	5	4,5	4,5	7	3,5	2,5
Median	4	9	6	8	8	6	3
75% Quartil	6	10	9	9	9,5	9	5

Tab. 6: zu IV.1.1

Vehikel (n = 5)	d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil	4	5	4,5	4,5	7	3,5	2,5
Median	4	9	6	8	8	6	3
75% Quartil	6	10	9	9	9,5	9	5
N-Acetyl-DL-leucin (n = 6)	d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil	4	3	2,75	5,75	3	3	2,75
Median	7	7	7	6	5,5	3	3
75% Quartil	9	9,25	9,25	8,5	7,25	3,75	5,25
N-Acetyl-L-leucin (n = 7)	d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil	3	6	7	3	4	3	2
Median	4	9	8	6	4	3	3
75% Quartil	4	9	9	8	6	6	5
N-Acetyl-D-leucin (n = 6)	d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil	3	3	4	5,25	3,75	3	2,75
Median	5	6	6	6	9,5	3	3
75% Quartil	6,75	10	10	7	10	3,25	3,25

Tab. 7: zu IV.2.1

Vehikel (n = 6)		d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil		3,5	3,75	7,75	6,5	6,5	4,75	4,75
Median		5	8	9	7,5	7	7	5
75% Quartil		7,25	9,25	9	9	7	8,25	6,25
60 mg/kg N-Acetyl-L-leucin (n = 6)		d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil		4,5	4,5	6	4,75	3,75	3,75	3
Median		6,5	8	7	6	4,5	5	4,5
75% Quartil		7,5	9,25	9	7	5	5	5
15 mg/kg N-Acetyl-L-leucin (n = 7)		d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil		5	5	6	5	6	6	3
Median		6	7	8	7	7	7	5
75% Quartil		7	8	9	8	7	7	6
3,75 mg/kg N-Acetyl-L-leucin (n = 7)		d1	d2	d3	d5	d7	d9	d15
25% Quartil		3	5	7	7	7	7	3
Median		5	7	8	9	8	7	5
75% Quartil		7	9	9	9	9	8	7

Tab. 8: zu IV.2.2

Vehikel (n = 9)		d1 prä	post	d2 prä	post	d3 prä	post
25% Quartil		3	4,5	4	5	5,5	5,5
Median		4	6	6	7	6	7
75% Quartil		5,5	6	8,5	8	8,5	8,5
		d5	d7	d9	d15	d21	
25% Quartil		3,5	3,5	5	2,5	1	
Median		6	6	5	4	3	
75% Quartil		8	7,5	7,75	6,5	4,5	
4-Aminopyridine (n = 13)		d1 prä	post	d2 prä	post	d3 prä	post
[*] n = 11		2	2	4	3	4	3
25% Quartil		2	2	4	3	4	3
Median		3	3	6	4	7	3
75% Quartil		6	4,5	9	6	8,5	7
		d5	d7	d9	d15	d21 [*]	
25% Quartil		5,5	4,5	5	3	3	
Median		5	6	7	4	4	
75% Quartil		7,5	8	7	7	6	

Tab. 9: zu IV.3.1 und IV.3.3

X. DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Roswitha Beck für die uneingeschränkte kompetente Betreuung während meines Dissertationsvorhabens, die wissenschaftliche Anleitung bei der Planung und Durchführung der Versuche und das allzeit große persönliche Engagement. Vor allem bedanke ich mich für die einmalige und besondere Gabe stets fidel zu begeistern und zu motivieren, dem mir entgegen gebrachtem Vertrauen sowie der Förderung meiner beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Andreas Zwergal für die stets kompetente Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragen, sein Engagement und die besondere Fähigkeit komplizierte Sachverhalte faszinierend amüsant und karikierend widerzugeben.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Christian la Fougère für die Ermöglichung der Durchführung dieser Dissertation und die Überlassung des interessanten Themas.

Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka gilt mein besonderer Dank für die Betreuung der Doktorarbeit, die Bereitschaft jederzeit über wissenschaftliche Fragen zu diskutieren sowie ihrer Vertretung an der Tiermedizinischen Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Peter Bartenstein danke ich für die Bereitstellung eines gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Großhadern.

Frau Dr. Janette Carlsen danke ich herzlich für ihre kompetenten Richtungsweisungen im Tierschutz sowie für viele interessante und aufschlussreiche Gespräche.

Ein besonderer Dank gilt meinen Doktorandenkollegen Sarah Pfeiffer, Andreas Delker und Christina Michler für exzellente Hilfestellungen in molekularbiologischen und physikalischen Themengebieten sowie für viele

lustige und amüsante Momente und Gespräche im Doktorandenzimmer.

Frau Karin Bormann-Giglmaier und Frau Rosel Oos danke ich für exzellente technische Assistenz sowie Versorgung und Pflege der Versuchstiere. Herrn Georg Stark danke ich herzlich für allzeitige Bereitschaft zur Reparatur meines Fahrrads.

Bei Stephanie Leidner, Sabrina Niedermoser und Simon Lindner bedanke ich mich für die stetig freundliche Hilfestellung und Unterstützung bei chemischen Fragestellungen.

Der AG von Frau Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler, Institut für Anatomie, gilt mein Dank für die besonders freundliche Unterstützung histologischer Auswertungen und anregender Richtungsweisungen.

Ein unschätzbare Dank gilt meinen Eltern, die mich unentwegt in allen Lebenslagen unterstützen und ermutigen haben und immer für mich da sind.

Jakob, dir danke ich für deine unermüdliche Unterstützung in allen Momenten und Lebenslagen. Danke dass du immer für mich da bist. Ohne dich wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen Tiermedizinerkollegen und lieben Freunden, Caro, Theresa, Sophie und Eike danke ich für unersetzbare nasse, hohe, aufbauende und ausgelassene Momente während des Studiums und der Dissertation.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum, einer Institution des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), welches die Umsetzung dieser Arbeit ermöglicht hat.