

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
der Klinik für Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

**Szintigraphische Untersuchungen zum Technetium-99m-Per technetat-
Uptake der Schilddrüse in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und
circadianem Rhythmus bei der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Annika Bartelheimer, geb. Brönnner

Tierärztin

aus Marburg

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4086

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Winfried Brenner
Dritter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Kerstin Borchers

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, thyroid gland, scintigraphy, radioactive tracers

Tag der Promotion: 13.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Literaturübersicht	4
2.1. Physiologische Parameter der Maus	4
2.1.1. Geschlechtsreife und Sexualzyklus	4
2.1.2. Altersstufen	7
2.1.3. Circadianer Rhythmus	8
2.2. Die Schilddrüse der Maus	10
2.2.1. Anatomie	11
2.2.2. Regulation und Funktion	15
2.2.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede	20
2.2.4. Altersbedingte Veränderungen	21
2.2.5. Circadianer Rhythmus	24
2.3. Schilddrüsenszintigraphie in der Nuklearmedizin	25
2.3.1. Historie	25
2.3.2. Tracer für die Schilddrüsendiagnostik	27
2.3.3. Nuklearmedizinische Bildgebung beim Mensch	31
2.3.4. Nuklearmedizinische Bildgebung bei der Maus	35
3 Material und Methoden	39
3.1. Tiere und Tierhaltung	39
3.2. Untersuchungsschema	40
3.3. Narkose und Tracerinjektion	43
3.4. SPECT/CT Bildgebung	47
3.5. Bildrekonstruktion und -quantifizierung	50
3.6. Statistische Auswertung	53
4 Ergebnisse	54
4.1. Zeitpunkt des maximalen Schilddrüsenuptakes	54
4.2. Der Schilddrüsenuptake	60

4.2.1. Der Schilddrüsenuptake in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter	62
4.2.2. Der Schilddrüsenuptake in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus	64
4.3. Szintigraphisches Schilddrüsenvolumen	68
4.4. Längenmessung von Femur und Tibia	69
5 Diskussion	72
6 Zusammenfassung	85
7 Summary	87
Literaturverzeichnis	89
Anhang	107
Publikationsverzeichnis	122
Danksagung	124
Selbstständigkeitserklärung	125

Abkürzungsverzeichnis

%ID	Prozent der injizierten Aktivität
⁹⁹ Mo	Molybdän-99
⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc	Molybdän-99/metastabiles Technetium-99m
^{99m} Tc	metastabiles Technetium-99m
^{99m} TcO ₄	^{99m} Technetium-Perotechnetat
BERIC	Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center, Charité
CT	Computertomographie
DIT	Diiodtyrosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
engl.	Englisch
et al.	et alii
FEM	Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin, Charité
FWHM	Full Width at Half Maximum
G	Gauge
HWZ	Halbwertszeit
I ⁻	Iodion
i. v.	intravenös
IQR	Interquartilsabstand
lat.	lateinisch
Ltd.	Limited
m	metastabil
Max.	Maximum
Min.	Minimum
MIT	Monoiodtyrosin
mRNA	messenger RNA
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
Na ⁺	Natriumion
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
Ø	Durchmesser
OSEM	Ordered Subset Expectation Maximization
ROI	Region-of-Interest
SCN	Nucleus suprachiasmaticus

SP	Schlafphase
SPECT	Single-Photon-Emission-Computed-Tomography
SSC	submandibular-sublingual complex
T ₃	3,5,3'-Triiodthyronin
T ₄	3,5,3',5'-Tetraiodthyronin
Tc	Technetium
Tg	Thyreoglobulin
TRH	Thyrotropin-releasing hormone/ Thyreoliberin
TSH	Thyroid-stimulating hormone/ Thyreotropin
VOI	Volume-of-Interest
WP	Wachphase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der ventralen Halsregion der Maus	12
Abbildung 2: Histologischer Querschnitt der Schilddrüsenregion einer gesunden Maus	13
Abbildung 3: Hormonsynthese in der Schilddrüse	17
Abbildung 4: Prinzip der Gammakamera	33
Abbildung 5: Vorbereitung der Maus vor der Injektion	45
Abbildung 6: Punktion der Schwanzvene bei der Maus und Injektion des Tracers	46
Abbildung 7: NanoSPECT/CTplus	48
Abbildung 8: Multipinhole-Kollimator	49
Abbildung 9: Maus im Untersuchungsbett	49
Abbildung 10: Atemfrequenzerfassung	50
Abbildung 11: SPECT- und CT-Aufnahmen der Schilddrüse und Speicheldrüsen bei der Maus	52
Abbildung 12: Volume-of-Interest	53
Abbildung 13: Charakteristische Zeit-Aktivitäts-Kurven des Schilddrüsenuptakes bei der Maus	55
Abbildung 14: Zeitpunkt des maximalen Uptakes	57
Abbildung 15: Zeitpunkt des maximalen Uptakes in Bezug zum circadianen Rhythmus bei weiblichen Mäusen	58
Abbildung 16: Zeitpunkt des maximalen Uptakes in Bezug zum circadianen Rhythmus bei männlichen Mäusen	59
Abbildung 17: Schilddrüsenuptake in Bezug zum Geschlecht	63
Abbildung 18: Schilddrüsenuptake im Altersverlauf	64
Abbildung 19: Schilddrüsenuptake in Bezug zum circadianen Rhythmus	65
Abbildung 20: Schilddrüsenuptake in Bezug zum circadianen Rhythmus bei weiblichen Mäusen	66

Abbildung 21: Schilddrüsenuptake in Bezug zum circadianen Rhythmus bei männlichen Mäusen

67

Abbildung 22: Längenwachstum von Femur und Tibia und Körpergewicht

71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Das Alter der C57BL/6N Mäuse zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten	41
Tabelle 2: Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake in Bezug zum Geschlecht, Alter und circadianen Rhythmus von C57BL/6N Mäusen	61

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) ist ein essentielles Organ im endokrinen System von Wirbeltieren. Die von ihr synthetisierten Hormone sind in die Regulation zahlreicher Stoffwechselfvorgänge einbezogen. Ihre Morphologie, Funktion im Organismus und pathologischen Veränderungen sind schon lange Gegenstand der klinischen und präklinischen Forschung.

Mit der Etablierung bildgebender funktioneller Verfahren in der Nuklearmedizin, wie der Szintigraphie, ergaben sich neue Möglichkeiten der Schilddrüsenuntersuchung in lebenden Objekten. Sie erlauben die bildliche Darstellung der Schilddrüse sowie die Quantifizierung der Organfunktion durch die Aufnahme und Verstoffwechslung radioaktiver Nuklide. Im Gegensatz zur klinischen Bildgebung fand die Szintigraphie in der präklinischen Forschung im Tiermodell weniger Anwendung. Dieser Umstand war auf die unzureichende Auflösung der Geräte für die Bildgebung im Kleintier zurückzuführen. Lange Zeit basierte die Analyse von radioaktivem Schilddrüsengewebe daher auf Untersuchungen nach Euthanasie des Tieres. Doch das Interesse an molekularen Untersuchungsverfahren im Kleintier für die Grundlagen- sowie Krankheitsforschung wuchs. Mit dem Fortschritt auf technischer Ebene kam es zur Entwicklung spezialisierter Gerätesysteme, die in Analogie zur klinischen Diagnostik in der Kleintierbildgebung angewendet werden können. Mit dem szintigraphischen Verfahren der Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) steht eine Untersuchungsmöglichkeit zur Verfügung, die eine dreidimensionale und nicht invasive Bildgebung ermöglicht. Hochauflösende präklinische Gerätesysteme erlauben die Untersuchung von kleinsten Objekten wie der Schilddrüse in der Maus. Zur Anwendung kommt bei der Schilddrüsenuntersuchung vorwiegend Technetium^{99m}-Pertechnetat (^{99m}TcO₄), das in der klinischen sowie präklinischen Bildgebung als gebräuchlicher Ersatz für radioaktive Iodisotope dient. Dabei ist der Uptake von ^{99m}TcO₄ in der Schilddrüse der nuklearmedizinische Standardparameter zur Beurteilung der regionalen und globalen Schilddrüsenfunktion.

1 Einleitung und Zielsetzung

In der klinischen Diagnostik stehen etablierte Daten zum humanen Schilddrüsenuptake bei physiologischer Organfunktion sowie bei einer Vielzahl von Schilddrüsenerkrankungen zur Verfügung. Für die Maus sind jedoch nur wenige Daten bezüglich des Schilddrüsenuptakes verfügbar. Zudem stehen keine etablierten Untersuchungsabläufe für die Schilddrüsenszintigraphie in Studien an Mäusen zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer longitudinalen Studie an gesunden C57BL/6N Mäusen ein Untersuchungsprotokoll für die SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit $^{99m}\text{TcO}_4$ entwickelt werden. Das weitere Ziel war die Etablierung eines systematischen Datenbestandes zum $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake bei der Maus. Diese Daten sind eine notwendige Grundlage für zukünftige präklinische Studien an Mäusen, da nur mit Hilfe von vergleichbaren Untersuchungsabläufen sowie standardisierten Uptake-Werten die individuelle Organfunktion charakterisiert, im Verlauf beurteilt und mit anderen Individuen verglichen werden kann. Darüber hinaus war das Ziel, physiologische Faktoren zu untersuchen, die einen signifikanten Einfluss auf den $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake haben könnten. Einen dieser Faktoren stellt das Geschlecht der Mäuse dar. Häufig werden in präklinischen Studien im Tiermodell nur männliche Tiere untersucht. Zurückzuführen ist dieser Umstand auf Konvention in der Forschung und der Sorge vor einer möglichen Beeinflussung der Daten durch den weiblichen Zyklus. Im Hinblick auf den thyreotropen Regelkreis ist eine vielfältige Verknüpfung mit dem Reproduktionssystem nachgewiesen. Daher wurden in dieser Studie beide Geschlechter eingeschlossen und ein möglicher geschlechtsspezifischer Einfluss auf den Schilddrüsenuptake untersucht. Ein weiterer Faktor ist das Alter der Tiere. Nicht nur das Reproduktionssystem unterliegt Veränderungen im Alterungsprozess, sondern auch die Schilddrüse selbst verändert sich im Verlauf der Ontogenese. Das Organ unterliegt Veränderungen auf histologischer Ebene und durchläuft verschiedene Phasen der Aktivität. Um altersassoziierte Unterschiede im Schilddrüsenuptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ zu ermitteln, erfolgte in dieser Studie eine wiederholte Untersuchung der Mäuse bis zu einem Alter von 24 Monaten. Des Weiteren sollte der Einfluss des circadianen Rhythmus auf den

1 Einleitung und Zielsetzung

Schilddrüsenuptake durch die systematische Untersuchung der Tiere zu unterschiedlichen Tageszeiten bestimmt werden. Dieser biologische Rhythmus hat einen großen Einfluss auf das Verhalten sowie auf zahlreiche physiologische Prozesse im Körper bei Mensch und Tier. Auch der thyreotrope Regelkreis im endokrinen System folgt einem circadianen Verlauf, jedoch in unterschiedlicher Weise für Mensch und nachtaktive Arten wie der Maus. Trotzdem werden tierexperimentelle Untersuchungen meist am Tage durchgeführt in der Hauptzeit von Ruhe- und Schlafphasen der Mäuse ohne Berücksichtigung der circadianen Rhythmik. Zudem sollte in der aktuellen Studie die Volumetrie der murinen Schilddrüsen anhand der szintigraphischen Organaufnahmen erfolgen, um geschlechts- und altersspezifische Unterschiede zu untersuchen sowie das Organvolumen in Bezug zum Körpergewicht setzen zu können. Weiterhin sollte die Knochenlänge von Femur und Tibia im Alter von 1 bis 12 Monaten bestimmt und in Bezug zum Körpergewicht der Mäuse gesetzt werden, um das Körperwachstum der Tiere und somit die im Vorfeld der Studie vorgenommene Wahl der Altersgruppen retrospektiv beurteilen zu können.

Zusammenfassend waren die Hauptziele dieser Arbeit:

1. Erarbeitung eines standardisierten Untersuchungsablaufs für die SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit $^{99m}\text{TcO}_4$ in gesunden C57BL/6N Mäusen.
2. Etablierung eines systematischen Datenbestandes zum normalen $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake bei der C57BL/6N Maus.
3. Erfassung von alters- und geschlechtsabhängigen Unterschieden im $^{99m}\text{TcO}_4$ -Uptake sowie Beurteilung der Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus.

2 Literaturübersicht

2.1. Physiologische Parameter der Maus

Der Abschnitt über die physiologischen Parameter umfasst die in dieser Arbeit relevanten Themen der Geschlechtsreife bei der Maus und des Sexualzyklus bei weiblichen Tieren. Auch die Altersstufen von Mäusen sowie deren Benennung in der Literatur werden hier aufgeführt. Des Weiteren werden der circadiane Rhythmus und seine Entwicklung im Verlauf der Ontogenese beschrieben.

2.1.1. Geschlechtsreife und Sexualzyklus

Der Eintritt in die Geschlechtsreife beginnt im zentralen Nervensystem. Es kommt zu einer gesteigerten Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormon im Hypothalamus des Gehirns, was eine Stimulation der Hypophysen-Gonaden-Achse bewirkt mit einhergehender Synthese von Steroidhormonen sowie Reifung der Keimzellen (Mayer et al. 2010).

Zum Eintritt der Geschlechtsreife bei der Maus findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. Visser et al. (2015) gaben den Beginn der Geschlechtsreife für die weibliche und männliche Maus zwischen dem 28. und 49. Lebenstag an. Weiss et al. (2014) beschrieben das gleiche Zeitfenster für das Öffnen der Vagina bei der weiblichen Maus, was zu den äußeren Anzeichen für den Eintritt in die Geschlechtsreife zählt. Die erste Brunst erfolgte 1 bis 2 Tage später. Den Eintritt in die Pubertät beim männlichen Tier gaben die Autoren zwischen dem 28. bis 35. Lebenstag an. Whary et al. (2015) beschrieben bei der weiblichen Maus ab einem Alter von 3 Wochen ansteigende Gonadotropinspiegel im Blut sowie die voranschreitende Follikel-

2 Literaturübersicht

reifung im Eierstock. Östrogenbedingte Veränderungen wie eine Verhornung des vaginalen Epithels können mit 24 bis 28 Tagen eintreten. Der Beginn der Pubertät bei der männlichen Maus wurde, im Vergleich zum Weibchen, mit bis zu 2 Wochen später angegeben. Anhand der Parameter von Vaginalöffnung und dem Einsetzen der ersten Brunst untersuchten Smidt und Monzavifar (1970) unterschiedliche Mausstämme. Es zeigte sich eine Öffnung der Vagina mit ungefähr 24 bis maximal 33 Tagen. Die erste Brunst setzte mit ca. 31 bis spätestens 42 Tagen ein. Caligioni (2009) konnte einen ähnlichen Zeitpunkt der Vaginalöffnung nachweisen. Sie erfolgte um den 26. Lebenstag. Bis zu 10 Tage konnte es daraufhin dauern bis der erste Zyklus einsetzte. Monteiro und Falconer (1966) gaben mit 31 Lebenstagen und einem Körpergewicht der Tiere von 16,3 g durchschnittliche Werte für den Eintritt der sexuellen Reife an.

Der Beginn der Geschlechtsreife kann je nach Mausstamm variieren und beeinflusst werden von äußeren Umweltbedingungen wie saisonalen Einflüssen (Whary et al. 2015). Auch das soziale Umfeld der Tiere kann sich auf den Eintritt der Pubertät auswirken. So kann die Anwesenheit eines Männchens durch Pheromone im männlichen Urin den Beginn der Geschlechtsreife bei der weiblichen Maus beschleunigen (Drickamer und Mikesic 1990; Pritchett und Taft 2007).

Der Sexualzyklus der weiblichen Maus ist ganzjährig polyöstrisch und gliedert sich in vier Phasen: den Proöstrus, gefolgt vom Östrus mit der spontanen Ovulation, dem Metöstrus und Diöstrus. Die Zykluslänge beträgt 4 bis 5 Tage (Wood et al. 2007; Byers et al. 2012). In seiner Länge und Regelmäßigkeit unterliegt der Zyklus individuellen Unterschieden und ist beeinflussbar durch die Genetik des Tieres und durch äußere Umweltbedingungen (Pritchett und Taft 2007). Stressoren, die das Befinden des Tieres beeinflussen, können sich auf den Zyklus der weiblichen Maus auswirken. Besonders vulnerabel sind hierbei die Phasen der Follikelreifung im Ovar und die anschließende Ovulation (Moberg 1991). Im Alltag der Labortiere wird ihr Befinden u. a. durch die Betreuung durch den Menschen beeinflusst. Schon der normale Laboralltag mit der Käfigreinigung oder dem Umsetzen der Tiere kann Stress induzieren. Die

2 Literaturübersicht

Tiere reagieren u. a. mit Veränderungen im Verhalten, Steigerung der Herzfrequenz und der Glucocorticoidwerte im Blut. Diese Reaktionen der Tiere können zeitlich auch über das akute Stresserlebnis hinaus andauern (Balcombe et al. 2004). Auch die Haltung der Mäuse kann auf den weiblichen Zyklus Einfluss nehmen. Eine Gruppenhaltung mit ausschließlich weiblichen Tieren kann den Zyklus hemmen, währenddessen die Anwesenheit eines Männchens über Pheromone im Urin den Östrus in einer Gruppe weiblicher Tiere induzieren und synchronisieren kann (Jemiolo et al. 1986). Andere Umweltbedingungen wie die Außentemperatur können bei der Maus auch Einfluss nehmen auf den Zyklus (Garrard et al. 1974) und führen in der Natur zu einer jahreszeitlichen Abhängigkeit.

Im Alterungsprozess treten bei der Maus ähnliche Veränderungen im weiblichen Sexualzyklus wie bei der Frau auf. Es kommt zu einer Abnahme der Ovarialfollikel, Schwankungen im Hormonhaushalt und Veränderungen im Zyklusverlauf. Dem Pendant zur Perimenopause bei der Frau nähert sich die Maus in einem Alter von ungefähr 9 Monaten (Diaz Brinton 2012). In diesem Alter beginnt eine charakteristische Abnahme der Zyklusfrequenz bei C57B/6N Mäusen (Nelson et al. 1982). Auch eine zunehmende Variabilität im Zyklus tritt auf (Finch et al. 1984). Das Alter variiert, in dem die weibliche Maus in einen azyklischen Zustand eintritt. Es beginnt ungefähr zwischen dem 11. und 16. Lebensmonat (Felicio et al. 1984). In dieser Phase treten auch anovulatorische polyfollikuläre Eierstöcke und eine persistierende vaginale Verhornung auf (Finch et al. 1984). Der zirkulierende Plasmaöstrogenwert sinkt und der Wert des luteinisierenden Hormons steigt auf das Niveau von ovariectomierten Tieren (Gee et al. 1983). Laut Diaz Brinton (2012) traten 30 bis 40 % der alternden Ratten und Mäuse nach einer unregelmäßigen Zyklusphase in den Status des persistierenden Anöstrus mit gleichbleibend niedrigen Steroidhormonspiegeln über. Der größere Teil der weiblichen Tiere kam spontan in einen polyfollikulären anovulatorischen Zustand des konstanten Östrus, welcher für bis zu 100 Tage mit einem gleichbleibendem Plasmaspiegel von Östradiol und niedrigem Progesteronspiegel an-

2 Literaturübersicht

dauerte. Bei männlichen Mäusen gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben bezüglich des Testosteronlevels im Blut und dem Alterungsprozess der Tiere. Finch et al. (1984) beschrieben keine automatische Rückbildung der Gonaden im Alter bei der männlichen Maus und Finch et al. (1977) konnten einen stabilen Plasmatestosteronwert bei C57BL/6 Mäusen im Verlauf des Lebens nachweisen. Andere Autoren beschrieben dagegen einen absinkenden Testosteronwert im Altersverlauf bei unterschiedlichen Mausstämmen (Machida et al. 1981; vom Steeg et al. 2016).

2.1.2. Altersstufen

Die durchschnittliche Lebenserwartung der Maus wird in der Literatur mit ungefähr 1 bis 3 Jahren angegeben (Baumans 2010; Danneman et al. 2012).

Bei der Einteilung der Mäuse in Altersgruppen sowie deren Benennung bestehen jedoch in der Literatur erhebliche Unterschiede. Auch die verwendete Zeiteinheit bei der Altersangabe variiert zwischen den Autoren. Weinert und Weiss (1997) bezeichneten Tiere aus ihrem eigenen Inzuchtstamm (Haz:ICR) bis zur 13. Lebenswoche als juvenil. Ab der 23. Woche ihres Lebens galten sie als adult und ab der 72. Woche als senil. Dabei orientierte sich die Einteilung primär an der Entwicklung des circadianen Systems. Ähnliche Angaben machten Valentinuzzi et al. (1997) für ihre C57BL/6 Mäuse. Sie bezeichneten Tiere ab dem Alter von 6 Monaten (26 Wochen) als adult. Ab 19 Monaten (82 Wochen) galten die Mäuse als alt. Bei Possidente et al. (1995) galten C57BL/6J Mäuse bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von ca. 2,3 Jahren mit 215 Tagen (ca. 30 Wochen) bereits als alt. Als jung wurden die Tiere von den Autoren mit 50 Tagen (ca. 7 Wochen) bezeichnet. Eine andere Klassifizierung wählten Lamason et al. (2006) für ihre

C57BL/6 Mäuse. Sie benannten 3 bis 4 Wochen alte Mäuse als präpubertär. In einem Alter von 6 bis 9 Wochen wurden sie als pubertär und mit 24 bis 28 Wochen als postpubertär bezeichnet.

2.1.3. Circadianer Rhythmus

In der Biologie basieren viele Prozesse auf wiederkehrenden Rhythmen. Sie können als Anpassung an die Umwelt verstanden werden und unterscheiden sich in ihrer Periodendauer. Zu den biologischen Rhythmen zählen u. a. der Rhythmus der Jahreszeiten und der Tag/Nacht-Rhythmus. Sie gehen einher mit geophysikalischen Zyklen und stellen eine Anpassung an unser Leben auf der Erde dar. Einzeller, Pflanzen und Tiere reagieren nicht nur passiv auf Veränderungen ihrer Umweltbedingungen, wovon man ursprünglich ausging, sondern sie können sich durch innere Uhren auf wiederkehrende Bedingungen einstellen. Zunächst wurde eine innere Uhr für die Tagesperiodik entdeckt. Ihre Periodendauer beträgt ungefähr 24 Stunden und trägt daher den Namen des circadianen Rhythmus (von lat. *circa* für „um“; *dies* „Tag“) (Heldmaier et al. 2013). Dieser Rhythmus beschreibt eine biologische Dynamik, die auf genetischer Basis gesteuert und vom Metabolismus realisiert wird.

Als übergeordneter Schrittmacher fungiert bei Säugetieren der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus, der eng mit dem optischen Sinnessystem verknüpft ist (Saper 2013; Müller et al. 2015). Inzwischen weiß man, dass es darüber hinaus periphere Schrittmacher bzw. Oszillatoren in unterschiedlichen Geweben gibt. Diese sind untereinander verbunden, können aber auch relativ eigenständig schwingen (Balsalobre 2002). Die innere Uhr ermöglicht eine gewisse Unabhängigkeit von der äußeren Zeit. Dennoch erfolgt eine tägliche Synchronisation mit der Umwelt, was nötig ist, um sich äußeren Bedingungen anpassen zu können.

2 Literaturübersicht

Der bedeutendste äußere Zeitgeber für Tiere ist das Licht bzw. der Hell-Dunkel-Wechsel unserer Umwelt, was auch die anatomische Lage des circadianen Zentrums verdeutlicht. Bei Säugetieren stellt die Netzhaut das einzige Lichtsinnesorgan dar, über welches das circadiane System verfügt. Somit dient als Sinnesorgan alleine das Auge für die Synchronisation der Rhythmik. Dabei ist der retinohypothalamische Trakt die Verbindung zum SCN (Heldmaier et al. 2013). Regulierte Laborbedingungen mit einem konstanten Lichtregime sind daher in circadianen Experimenten von Bedeutung.

Der circadiane Rhythmus beeinflusst den Organismus auf vielfältige Weise. Neben Verhaltensweisen wie körperlicher Aktivität oder Schlafphasen wirkt er sich auf zahlreiche physiologische Prozesse im Körper aus. So folgen z. B. Schwankungen in der Körperkerntemperatur oder im Herz-Kreislaufsystem einem tageszeitlichem Verlauf (Weinert und Waterhouse 1998; Arraj und Lemmer 2006; Steinlechner 2012). Im endokrinen System zeigt u. a. die Aktivität des thyreotropen Regelkreises eine circadiane Rhythmik (Haus 2007; Russell et al. 2008; Philippe und Dibner 2015).

Im Laufe des Lebens unterliegt das circadiane System eines Individuums Veränderungen, besonders in der frühen Entwicklung und im Alter (Weinert 2000; Weinert 2010). Postnatal sind circadiane Rhythmen nur schwach ausgeprägt. Innerhalb der ersten Wochen und Monate entwickeln sie sich dann allmählich (Weinert et al. 1994). Bei den Nagern zählen neugeborene Mäuse zu den Nesthockern (Visser et al. 2015). Zwar ist postnatal die Projektion von der Netzhaut zum SCN schon früh ausgeprägt und eine Wahrnehmung von Lichtreizen erfolgt schon vor dem Öffnen der Augenlider, jedoch fungiert zunächst das Muttertier als externer Zeitgeber. Ihr circadianer Rhythmus koordiniert die Jungtiere in der ersten Zeit nach der Geburt. Auch unter Laborbedingungen ist die Mutter als nachtaktives Tier während der Dunkelphase aktiv und die Jungtiere werden durch An- und Abwesenheit des Muttertieres synchronisiert. Darüber hinaus erfolgt die Synchronisierung auch durch die Fütterungszeiten, die hauptsächlich

während der Hellphase bzw. der Ruhephase der Mutter erfolgen. Je älter die Jungtiere werden, desto mehr sinkt die Valenz der Mutter als Zeitgeber und die Relevanz des Lichts bzw. des Hell-Dunkel-Zyklus steigt. Mit der Entwöhnung der jungen Mäuse von der Milchnahrung gehen Veränderungen im Stoffwechsel sowie eine Reorganisation der zeitlichen Ordnung einher (Viswanathan 1999; Weinert 2005). Adulte Mäuse sind nachtaktiv. In der Dunkelphase zeigen sie die höchste körperliche Aktivität bestehend u. a. aus der Nahrungsaufnahme oder dem Erkundungsverhalten. Unter einem konstanten Hell-Dunkel-Zyklus, wie es in der Labortierhaltung üblich ist, zeigt sich ein stabiles Aktivitätsmuster bei adulten Tieren.

In der Forschung werden tierexperimentelle Untersuchungen meist am Tag durchgeführt, in der Arbeitszeit der Wissenschaftler und der Zeit von Ruhe- und Schlafphasen bei den nachtaktiven Arten, ohne Berücksichtigung des circadianen Rhythmus der Tiere (Steinlechner 2012).

Auch in späteren Lebensphasen beeinflusst das Alter der Tiere das circadiane System (Valentinuzzi et al. 1997). Es wurden Veränderungen in der körperlichen Aktivität bezüglich verschiedener Parameter zuerst bei alternden Ratten bestimmt. Zu gleichen Ergebnissen kamen spätere Studien auch beim Hamster und bei der Maus. Es zeigten sich bei alten Mäusen eine Abnahme der Fähigkeit zur Synchronisation mit inneren und äußeren Veränderungen und eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Aktivitätsrhythmen (Weinert 2000).

2.2. Die Schilddrüse der Maus

Embryonal ist die Schilddrüse die erste angelegte endokrine Drüse bei der Maus (Taylor 2014). Sie ist als inkretorische Drüse im Organismus von Wirbeltieren an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen beteiligt. Als wichtiger Bestandteil des endokrinen Systems steht sie in In-

teraktion mit anderen Organsystemen im Körper. Das endokrine System kommuniziert über Hormone als Botenstoffe und kann sich auf verändernde innere und äußere Umstände einstellen.

2.2.1. Anatomie

Die Schilddrüse der Maus besteht aus zwei Seitenlappen (Lobi) von eher plump ovaler Form. Der Lobus dexter und Lobus sinister liegen der Luftröhre peritracheal an. Eine Schildform, wie der Name des Organs andeutet, findet sich nur beim Schwein und Menschen. Bei vielen anderen Säugetieren ist der Mittellappen, welcher dem Organ eine schildartige Form verleiht zu einer Parenchymbrücke (Isthmus) zurückgebildet (Schmidt und Dahme 2007). Bei Nagern gibt es bezüglich dieser Verbindung in der Literatur unterschiedliche Angaben. Ein Isthmus zwischen den Schilddrüsenlappen kann vorhanden sein (Nilsson und Fagman 2017) oder auch fehlen, so dass die Schilddrüse aus zwei unabhängigen Schilddrüsenlappen besteht (Bianco et al. 2014). Umgeben ist das Organ von einer fibrösen Kapsel, welche die Nebenschilddrüsen (*Glandulae parathyreoideae*) mit einschließt (Taylor 2014).

Neben zahlreichen kleinen Speicheldrüsen besitzt die Maus drei paarig angelegte große Speicheldrüsen (s. Abbildung 1): die *Glandula parotidea*, *Glandula sublingualis* und *Glandula submandibularis (submaxillaris)*, welche die größte Speicheldrüse bei der Maus darstellt (Hukkanen et al. 2017). Sie ist mandelförmig und liegt mittig in der ventralen Halsregion. Die linsenförmige *Glandula sublingualis* liegt der submandibulären Speicheldrüse im rostralen Drittel seitlich an. Getrennt sind sie durch eine dünne bindegewebige Schicht (Boschi et al. 2013). Beide Speicheldrüsen bilden zusammen den Submandibular-Sublingual-Komplex (submandi-

2 Literaturübersicht

bular-sublingual complex; SSC) (Cecchini et al. 2014). Der Abstand zwischen der murinen Schilddrüse und den Speicheldrüsen beträgt ca. 1 bis 3 mm (Brandt et al. 2012).

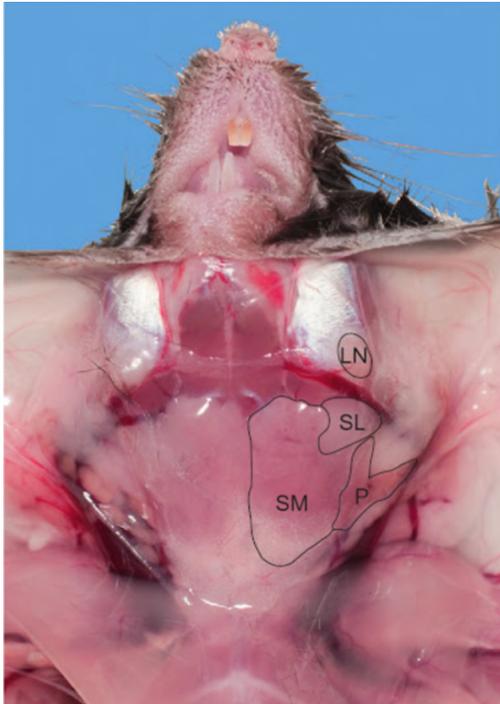


Abbildung 1: Anatomie der ventralen Halsregion der Maus

Die ventrale Halsregion der Maus nach Eröffnung der Haut. Die abgebildeten Speicheldrüsen sowie ein Lymphknoten sind schwarz umrandet: *Glandula submandibularis* (SM) mit angrenzender *Glandula lingualis* (SL) sowie die *Glandula parotidea* (P) und Lymphknoten (LN). (Abb. 8.1 aus: Hukkanen et al. (2017))

2 Literaturübersicht

Bedeckt ist die Schilddrüse von Haut, den Speicheldrüsen sowie Muskulatur (s. Abbildung 2). Typischerweise liegt die Schilddrüse unter den *Musculi sternohyoideus* und *sternothyroideus* sowie unter der Prominenz des Kehlkopfes und in der Nähe seines Ringknorpels. Die Schilddrüse erstreckt sich vom Kehlkopf entlang der ersten drei bis vier Knorpelspangen der Trachea (Mancini et al. 2009; DuBray La Perle und Dintzis 2017).



Abbildung 2: Histologischer Querschnitt der Schilddrüsenregion einer gesunden Maus

Trachealring (1), Speicheldrüse (2), *Musculus sternohyoideus* und *Musculus sternothyroideus* (3), *Musculus sternomastoideus* (4), Schilddrüsenlappen (5), *Arteria carotis communis* (6), *Musculus scalenus* und *Musculus longus colli* (7) und Haut (Dermis) (8). (Abb. 1.B aus: Mancini et al. (2009))

In der Literatur finden sich unterschiedliche Größenangaben zur Schilddrüse bei der Maus. Beekman et al. (2005) beschrieben die charakteristische Größe des Organs mit 1 x 1 mm.

2 Literaturübersicht

Franken et al. (2010) bemaßen einen Schilddrüsenlappen mit ca. 1 x 0,3 mm und laut DuBray La Perle und Dintzis (2017) hat ein Lappen in der adulten Maus eine Größe von 2 x 1 x 0,5 mm. Mancini et al. (2009) bestimmten die Schilddrüsengröße in adulten lebenden Mäusen per Sonographie. Die maximale Länge des Organs betrug 3,34 mm und die maximale Breite 1,44 mm. Das absolute Schilddrüsenvolumen lag zwischen 2,1 und 4,9 μ l.

Die Organgröße kann innerhalb einer Art variieren und wird von inneren und äußeren Faktoren beeinflusst. Zu den exogenen Faktoren zählt das Klima. Zu den endogenen Einflüssen zählen das Geschlecht und Alter des Tieres (Böhme 2004). Die Beziehung der Schilddrüsengröße zum Körpergewicht eines Individuums wurde schon bei unterschiedlichen Spezies untersucht. Dabei muss der Unterschied zwischen dem absoluten und relativen Schilddrüsenvolumen beachtet werden. Das absolute Volumen gibt das tatsächliche Volumen des Organs an, währenddessen das relative Volumen in Bezug zum Körpergewicht steht. Beim Menschen wurde wiederholt eine positive Korrelation zwischen dem Körpergewicht und dem Organvolumen der Schilddrüse beschrieben (Hegedus et al. 1983; Hegedus 1990; Gomez et al. 2000; Sari et al. 2003). Auch in der Veterinärmedizin zeigten Studien an Hund und Ratte eine positive Korrelation (Schmidt 1998; Reese 2002; Bailey et al. 2004; Brömel et al. 2006). Mit steigendem Körpergewicht stieg das absolute Organvolumen, während das relative Volumen der Schilddrüse sank. Somit zeigten das absolute und relative Schilddrüsenvolumen eine gegenläufige Tendenz (Schmidt 1998; Reese 2002).

2.2.2. Regulation und Funktion

Die zwei Lappen der Schilddrüse werden von Septen der Organkapsel in Läppchen unterteilt. Jedes Läppchen besteht aus zahlreichen sogenannten Schilddrüsenfollikeln. Sie sind histologisch ein Strukturmerkmal der Schilddrüse und variieren in Größe und Form. Die Schilddrüse enthält zwei endokrine Zelltypen. Zum einen die parafollikulären C-Zellen, welche einzeln oder in Gruppen im Bindegewebe lokalisiert sind und das Mineralstoffwechselhormon Calcitonin produzieren. Zum anderen die Schilddrüsenzellen, auch Thyreozyten genannt. Sie bilden ein einschichtiges Epithel, welches das eosinophile Kolloid im Lumen der Follikel umgibt.

Die Thyreozyten produzieren die Peptidhormone 3,5,3'-Triiodthyronin (T_3) und 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin bzw. Thyroxin (T_4). Hierbei handelt es sich um jodierte Tyrosinderivate, die in mehreren Stoffwechselschritten synthetisiert und im Schilddrüsenkolloid gespeichert werden. Das hierfür benötigte Iod wird mittels Natrium-Iodid-Symporter (NIS) aktiv aus der Blutbahn aufgenommen (Iodination) (Grünwald und Derwahl 2017). Als integrales Membranprotein vermittelt der NIS den Cotransport von zwei Natriumionen (Na^+) und einem Iodidion (I^-) oder einem anderen monovalenten Anion wie z. B. $^{99m}TcO_4^-$ (Bizhanova und Kopp 2009). Das Anion gelangt über den basolateral gelegenen Symporter in die Follikelepithelzelle (s. Abbildung 3). Der Transport verläuft entlang des Natriumgradienten, der von der Na^+/K^+ -ATPase generiert wird (Köhrle et al. 2014). Im Schilddrüsenstoffwechsel nimmt der NIS eine Schlüsselposition ein (Spitzweg und Morris 2002) und stellt die Grundlage für die Schilddrüsenszintigraphie dar. Im Vergleich zum Menschen kommt der NIS bei Maus und Ratte in allen Thyreozyten vor (Josefsson et al. 2002). Neben der Schilddrüse findet man den NIS auch in anderen Organen des Körpers wie dem Ovar, Magen oder den Speicheldrüsen (Zuckier et al. 2004; Brandt et al. 2012; Boschi et al. 2013). Nach der Aufnahme von Iodid diffundiert dieses von der basalen zur apikalen Zellmembran. Dort gelangt es über den Ionenkanal Pendrin in das Kolloid des Follikels und wird mittels des Enzyms Thyreoperoxidase zu elementarem Iod oxidiert. Im Kolloid wird das

2 Literaturübersicht

Iod an Thyrosinanteile des Thyreoglobulins (Tg) gebunden (Grünwald und Derwahl 2017). Das Tg ist ein Glykoprotein der Schilddrüse, was als Hauptbestandteil des Kolloids in den Thyreozyten gebildet und mittels Exozytose in das Schilddrüsenkolloid abgegeben wird. Durch die Iodierung entstehen Mono- und Diodtyrosinverbindungen (MIT, DIT) im Kolloid der Schilddrüse. Durch eine Kopplung der Iodthyrosine entstehen hier die an Tg gebundenen Hormone T_3 und T_4 (Lang 2017). Im Schilddrüsenkolloid werden die synthetisierten Hormone gespeichert. Bei Bedarf erfolgt die Aufnahme der Hormone über Endozytose und ihre Aktivierung in der Schilddrüsenzelle. Dabei erfolgt eine enzymatische Deiodierung der Iodthyrosine und das abgespaltene Iod steht zur Neusynthese wieder zur Verfügung. Anschließend können die Hormone in den Blutkreislauf sezerniert werden.

Hauptsächlich wird das biologisch inaktive T_4 von der Schilddrüse abgegeben. T_3 wird nur im geringen Maße sezerniert (Köhrle et al. 2014). Im Blutkreislauf liegen die Schilddrüsenhormone zum größten Teil proteingebunden vor. Dabei spielen die Transportproteine thyroxinbindendes Globulin, Albumin und thyroxinbindendes Präalbumin eine bedeutende Rolle (Greco und Stabenfeldt 2013). Extrathyroidal wird durch gewebespezifische Deiodasen in den Zielzellen aus T_4 das biologisch wirksame T_3 gebildet, welches 85 bis 90 % der Hormonwirkungen vermittelt (Köhrle et al. 2014). Von den nicht proteingebundenen zirkulierenden Schilddrüsenhormonen liegen nur ca. 0,3 % von T_3 und ca. 0,02 % von T_4 als freie, aktive Hormone vor (Russell et al. 2008).

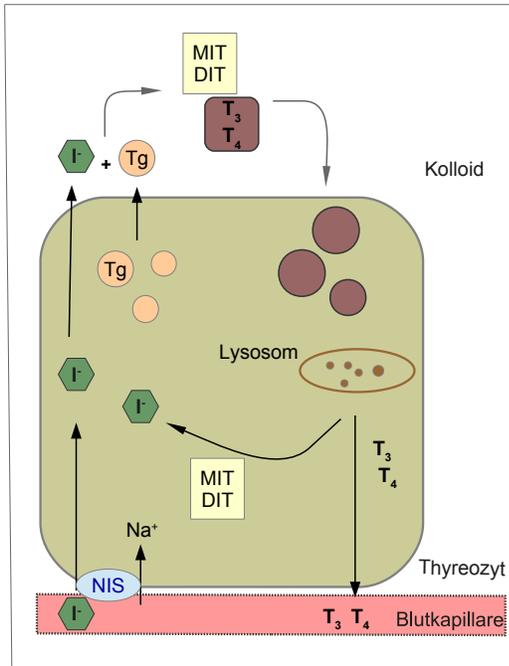


Abbildung 3: Hormonsynthese in der Schilddrüse

Die Abbildung zeigt den Transport von einem Iodidion (I⁻) und von Natriumionen (Na⁺) mittels Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in die Schilddrüsenzelle sowie den Transport von Thyroglobulin (Tg) in sekretorischen Vesikeln zur apikalen Zellmembran. Im Kolloid entstehen Mono- und Diiodtyrosinverbindungen (MIT, DIT) sowie die Schilddrüsenhormone T₃ und T₄. Die Hormone bleiben im Lumen bis zur Aufnahme in die Zelle. Im Thyreozyten erfolgt der lysosomale Abbau. MIT und DIT werden deiodiert und die Schilddrüsenhormone werden in den Blutkreislauf abgegeben. (modifiziert nach Abb. 14.34: Paschke (2018))

Die Regulierung der Schilddrüse unterliegt dem hypothalamisch-hypophysären System im zentralen Nervensystem. Das Hormon Thyrotropin-releasing hormone (TRH) bzw. Thyreoliberin aus dem Hypothalamus regt die Biosynthese und Sekretion des glandotropen Glykoproteinohormons Thyroid-stimulating hormone (TSH) bzw. Thyreotropin an. TSH wird in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse gebildet (Paschke 2018) und bindet nach Freisetzung in den Blutkreislauf

2 Literaturübersicht

an den G-Protein gekoppelten TSH-Rezeptor der Schilddrüse (Szkudlinski et al. 2002), der basolateral in der Membran des Thyreozyten liegt. TSH beeinflusst wesentlich die Funktion und Morphologie der Schilddrüse. Es bestimmt das Wachstum des Organs und erhöht die Blutversorgung. TSH stimuliert die Expression sowie Aktivität des Ionenkanals Pendrin und des NIS in der Schilddrüse und bestimmt die Biosynthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 (Bianco et al. 2014; Paschke 2018). Zudem schützt es die Schilddrüsenzellen vor dem programmierten Zelltod (Szkudlinski et al. 2002). Die Steuerung des thyreotropen Regelkreises unterliegt einem komplexen System, was dafür sorgt, dass die Konzentration der Schilddrüsenhormone den physiologischen Bedingungen im Körper angepasst wird. Auf hypophysärer Ebene bindet freies T_3 , was v. a. aus T_4 gebildet wird, an Rezeptoren der thyreotropen Zellen und bewirkt dort eine Reduktion der hypophysären TRH-Rezeptoren. Über einen direkten Einfluss hemmt es zudem die Sekretion von TRH im Hypothalamus (Janssen et al. 2001). Fastenperioden oder Stress haben eine inhibierende Wirkung. Stress hemmt die TSH-Sekretion durch den Einfluss von Glucocorticoiden auf das zentrale Nervensystem und somit die Schilddrüsenfunktion (Ranabir und Reetu 2011). Dagegen kann eine niedrige Außentemperatur die Bildung von TRH und TSH anregen (Deutzmann 2017). Neben der zentralen Regulation verfügt die Schilddrüse unter physiologischen Bedingungen zudem über eine Autoregulation, die auf der Iodidkonzentration im Blut basiert und v. a. der Ökonomie von Iod dient. So kann die Iodaufnahme nach Bedarf gesteigert oder vermindert werden (Paschke 2018).

Die biologischen Einflüsse der Schilddrüsenhormone auf den Organismus sind vielfältig. Sie nehmen Einfluss auf Wachstums- und Reifungsprozesse u. a. beim Knochenwachstum und der Entwicklung des Gehirns. Auch im Erwachsenenalter haben sie Einfluss auf das Nervensystem. Bei einem Mangel an Schilddrüsenhormonen kann es zu Abgeschlagenheit kommen. Auf der anderen Seite kann eine Hyperthyreose zur Übererregbarkeit führen (Deutzmann 2017). Des Weiteren haben sie Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System. Ihre sympathomimetische Wirkung führt zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens und zur Senkung des peripheren Ge-

2 Literaturübersicht

fäßwiderstands. Durch Aktivierung des Atemzentrums kommt es zudem zu einer erhöhten Lungenventilation. Auf Stoffwechselebene haben die Schilddrüsenhormone eine stimulierende Wirkung auf den Grundumsatz (Lang 2017). In fast allen Geweben, mit Ausnahme von Gehirn, Milz und Gonaden, führen sie zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und zu einem Anstieg der Körperkerntemperatur (Paschke 2018). Auch auf den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel haben die Hormone eine stimulierende Wirkung. Kohlenhydrate werden verstärkt aus dem Darm resorbiert und die Gluconeogenese sowie die Glykogensynthese in der Leber aktiviert. Auch die Lipogenese in der Leber wird angeregt. Zudem fördern sie auch katabole Reaktionen wie die Lipolyse und Glykogenolyse (Deutzmann 20017).

Auf unterschiedlichen Ebenen ist der thyreotrope Regelkreis mit dem Reproduktionssystem verknüpft. Die Schilddrüsenfunktion beeinflusst die Fertilität bei beiden Geschlechtern. Die Schilddrüsenhormone stimulieren bei männlichen Tieren die Entwicklung des testikulären Gewebes. Sie beeinflussen die Entwicklung und Funktion der Sertoli-Zellen sowie der Leydig-Zellen im Interstitium des Hodens (Choksi et al. 2003; Krajewska-Kulak und Sengupta 2013). Im weiblichen Organismus bestehen vielfältige Verbindungen auf unterschiedlichen Ebenen. Auf hypophysärer Ebene im Gehirn wird die Sekretion von TSH sowie Prolaktin durch TRH aus dem Hypothalamus stimuliert. Effekte vom Schilddrüsenhormon T_4 auf Prolaktin, auf das luteinisierende Hormon und das sexualhormonbindende Transportglobulin sind bei der Frau bekannt (Bullmann 2013). Über die Variation dieses Transportglobulins wird der Östrogenspiegel beeinflusst. Andererseits haben auch Östrogene dosisabhängig einen Einfluss auf das zirkulierende Transportprotein der Schilddrüsenhormone (Raue 1994). Die Schilddrüsenhormone selbst sind auf unterschiedlichen Ebenen Teil des Reproduktionssystems. Und auch die weiblichen Sexualhormone nehmen Einfluss auf den Schilddrüsenstoffwechsel.

2.2.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1. aufgeführt, beschreiben Studien aus der Human- sowie Veterinärmedizin das Verhältnis zwischen Schilddrüsenvolumen und Körpergewicht. Die Autoren bestätigten eine positive Korrelation zwischen dem absoluten Organvolumen und dem Körpergewicht und gaben beim Mann das Schilddrüsenvolumen als signifikant höher an im Vergleich zur Frau. Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bestanden im Vergleich der relativen Volumina, so dass das höhere absolute Schilddrüsenvolumen mit der größeren Körpermasse des Mannes erklärt werden konnte (Hegedus et al. 1983; Gomez et al. 2000). Russfield (1967) erwähnte für die Schilddrüse bei der Maus auch ein absolut, aber nicht relativ größeres Volumen bei männlichen Tieren.

Im Hinblick auf den thyreotropen Regelkreis konnten Fukuda et al. (1975) bei der weiblichen Ratte einen niedrigeren TSH- und T_4 -Wert verbunden mit einem höheren T_3 -Wert im Plasma feststellen. Marassi et al. (2007) zeigten in einer Studie ähnliche Ergebnisse. Ein höherer T_3 -Wert konnte auch hier bei weiblichen Tieren nachgewiesen werden, allerdings nur bei adulten Tieren. Im T_4 -Wert lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern vor. Die höchsten TSH-Werte zeigten adulte männliche Tiere. Das bestätigten auch Choksi et al. (2003). Auch bei männlichen C57BL/6 Mäusen konnte ein höherer TSH-Wert im Vergleich zu weiblichen Tieren nachgewiesen werden (Pohlentz et al. 1999).

Bei weiblichen Tieren beschrieb Slebodzinski (1994) eine divergierende Schilddrüsenaktivität innerhalb des sexuellen Zyklus mit einer gesteigerten Aktivität in den Phasen des Proöstrus und Östrus bei der Sau, Kuh und weiblichen Labortieren. In euthyreoten weiblichen Ratten konnten Ayala et al. (2013) mit dem Zyklusverlauf schwankende TSH-Werte nachweisen. Die höchsten Werte zeigten sich während des Proöstrus mit $3,51 \pm 0,26$ ng/ml (Mittelwert \pm Standardabweichung). Im Östrus lagen die TSH-Werte bei $2,74 \pm 0,18$ ng/ml und im Diöstrus bei

2 Literaturübersicht

$2,35 \pm 0,15$ ng/ml. Während des Proöstrus waren bei der Ratte auch die höchsten Östradiolwerte nachweisbar. Nach Wood et al. (2007) zeigte sich bei C57BL/6 Mäusen der signifikant höchste zirkulierende Östradiolwert vor der Ovulation im Östrus (ca. 65 pg/ml) im Vergleich zu den anderen Zyklusphasen. Ein gleichbleibender Wert bestand vom Met- bis zum Proöstrus (ca. 50 pg/ml). Die Progesteronwerte im Serum zeigten eine größere Schwankung während des weiblichen Zyklus. Sie waren signifikant höher im Diöstrus (ca. 18 ng/ml) und signifikant niedriger im Östrus (ca. 2 ng/ml) im Vergleich zu den anderen Zyklusphasen.

2.2.4. Altersbedingte Veränderungen

Die Schilddrüse der Maus unterliegt Veränderungen mit fortschreitendem Alter und ihre Aktivität variiert mit verschiedenen physiologischen Umständen im Verlauf des Lebens.

Schon in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts untersuchte van Heyningen (1961) den Beginn der Schilddrüsenfunktion im Mäuseembryo. Der Autor zeigte, dass dieser bereits im Mutterleib erfolgt. Die Fähigkeiten Iod aus dem Blutkreislauf aufzunehmen und organisch zu binden sowie die Formation von Kolloid in der fetalen Schilddrüse erfolgten zwischen dem 15. und 16. Tag. Die Entstehung von Follikeln in der Schilddrüse sowie die Bildung von T_4 konnten ungefähr einen Tag später beobachtet werden. Nur wenige Jahre später beschrieb Eickhoff (1965) das Lebensalter als endogenen Faktor, der sich auf die Aktivierung der Schilddrüse bei den verschiedenen Tierspezies postnatal unterschiedlich auswirkt. Mäuse werden relativ unreif geboren, und der thyreotrope Regelkreis muss sich nach der Geburt erst vollständig entwickeln (Fisher und Polk 1989), im Vergleich zum Menschen. Bei der Maus ist der Regelkreis ungefähr

2 Literaturübersicht

zwei Wochen nach der Geburt ausgebildet. Die T_3 - und T_4 - Werte im Blut steigen postnatal schrittweise an mit einem deutlichen Anstieg ca. 12 bis 15 Tage nach der Geburt (Li et al. 2014).

Bei älteren Mäusen kommt es zu histologischen Veränderungen der Schilddrüse. Es handelt sich u. a. um eine zunehmende Variabilität in der Follikelgröße sowie eine allgemeine Zunahme im Follikeldurchmesser (Hardisty und Boorman 1999). Die Vergrößerung betrifft nach Blumenthal (1955) die zentralen Follikel einhergehend mit einer Atrophie des Epithels. Auch eine fortschreitende interstitielle Fibrose ab einem Alter von 9 bis 12 Monaten wurde vom Autor beschrieben. Russfield (1967) vermutete eine starke Zunahme von fibrösem Bindegewebe ab dem Alter von zwei Jahren. Studer et al. (1978) beschrieben beginnend ab einem Alter von 5 Monaten die Bildung von Schilddrüsenfollikeln, die sich histologisch und in ihrer Funktion veränderten. Morphologisch zeichneten sich diese Follikel durch ein vergrößertes Lumen und ein vergleichsweise flaches Epithel aus. Mit ca. 13 Monaten waren 80 % der Schilddrüsenfollikel von diesem Typ. Auch eine Größenzunahme der Schilddrüse mit dem Alter der Tiere wurde beschrieben. Chai et al. (1964) konnten bei weiblichen und männlichen Mäusen unterschiedlicher Mausstämme ab dem Alter von 7,5 bis 9,5 Monaten einen Rückgang in der Aufnahme von radioaktivem Iod zeigen.

Im Hinblick auf pathologische Veränderungen der Mäuseschilddrüse lassen sich neoplastische Veränderungen wie in der Humanmedizin in Anlehnung an die Klassifizierung der Weltgesundheitsorganisation unterteilen in Hyperplasie, benigne und maligne Schilddrüsentumore. Jedoch ist eine klare Abgrenzung der histologischen Organveränderungen nicht immer möglich. Im Allgemeinen zeigen sich bei der Labormaus eher selten neoplastische Veränderungen der Schilddrüse, und sie werden mit weniger als 1 % angegeben (Brayton 2007; Taylor 2014). Frith und Heath (1984) konnten eine Abhängigkeit vom Auftreten von Spontantumoren der Schilddrüse zum Geschlecht und zur Mauslinie beobachten. Sie ermittelten die Inzidenz für Tumore je nach Mausstamm von 0,13 bis zu 8,6 %. Weibliche Tiere zeigten generell ein höheres

2 Literaturübersicht

Auftreten von spontanen Tumoren. Haines et al. (2001) bezifferten in alternden B6;129 Mäusen das Auftreten von Adenomen oder Karzinomen mit 2 % für männliche und 8 % für weibliche Tiere. Häufiger als maligne Schilddrüsenkarzinome treten bei der Maus Adenome auf, wobei follikuläre Adenome überwiegen (Brayton 2007). Ward et al. (1979) beschrieben auch bei dieser Form des Adenoms ein vermehrtes Auftreten bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Mäusen. Auch bei entzündlichen Organveränderungen der Schilddrüse besteht bei alternden Mäusen eine höhere Inzidenz für weibliche Tiere (Haines et al. 2001).

Zu einer Induktion von neoplastischen Veränderungen der Schilddrüse kann es auch durch exogene Einflüsse wie Strahlung kommen. Gammastrahlen haben eine karzinogene Wirkung auf alle Spezies, die in experimentellen Studien untersucht wurden. Sie induzieren u. a. Mutationen und Strangbrüche der DNA in somatischen Zellen (Jameson et al. 2003). Die Induktion von Schilddrüsentumoren durch interne und externe Bestrahlung wurde bei der Maus v. a. seit den 1960er Jahren untersucht. Walinder (1972) fasste in seiner Arbeit die Ergebnisse von vorangegangenen Studien an Mensch und Tier zusammen. Er beschrieb das vermehrte Auftreten von neoplastischen Veränderungen der Schilddrüse bei der Anwendung von radioaktivem Iod im Vergleich zum Einsatz von externer Strahlung in Form von Röntgenstrahlung. Dabei waren junge Individuen besonders sensibel für die karzinogene Wirkung. Eine höhere Inzidenz für Schilddrüsenkrebs konnte auch bei Kindern nach externer Bestrahlung u. a. als Folge der Nuklearkatastrophe von Tschernobyl festgestellt werden (Reiners et al. 2008). Walinder (1972) untersuchte die Wirkung von Radioiod auf die Schilddrüse von CBA-Mäusen. Hier stellte er fest, dass die Strahlung einen initialen Zelltod induzierte und die epitheliale Regeneration verhinderte. Dies ging einher mit einer erhöhten TSH-Produktion sowie der teilweisen Entstehung von neoplastischen Veränderungen.

2.2.5. Circadianer Rhythmus

Wie bereits erwähnt, beeinflusst der circadiane Rhythmus den Organismus auf vielfältige Weise. Im endokrinen System zeigt u. a. die Aktivität des thyreotropen Regelkreises eine circadiane Rhythmik bei Mensch und Tier. Die Sekretion von TSH aus dem Hypophysenvorderlappen erfolgt pulsatil in einem circadianen Rhythmus (Fisher 1996). Beim Mensch ist die Konzentration von TSH im Blut tagsüber niedrig mit dem tiefsten Wert am Nachmittag. Zum Abend hin steigt die Konzentration wieder an und erreicht den Höhepunkt in der Nacht. Es besteht beim Mensch auch ein circadianer Rhythmus von T_3 . Ungefähr 90 min nach dem Höhepunkt von TSH zeigt T_3 sein Maximum. Keine Korrelation besteht dagegen zwischen TSH und T_4 (Russell et al. 2008; Philippe und Dibner 2015).

Bei nachtaktiven Arten unterscheidet sich der Rhythmus von dem des Menschen. Martino et al. (1985) konnten bei weiblichen Ratten abhängig vom Hell-Dunkel-Rhythmus einen circadianen Verlauf des TRH-Wertes nachweisen. Unter dem gängigen Lichtregime von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit zeigte sich der höchste Gehalt von TRH gegen 12.00 Uhr im Hypothalamus. Der niedrigste Gehalt war messbar gegen 24.00 Uhr. Jordan et al. (1980) beschrieben bei männlichen Ratten, die unter dem gleichen Lichtregime aus 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit lebten, einen circadianen Rhythmus von TSH im Blut. Der Serumwert war abends zu Beginn der Dunkelperiode am niedrigsten. Seinen Höhepunkt erreichte er um die Mittagszeit (11.30 Uhr \pm 01.05 Stunden). Auch die Schilddrüsenhormone zeigten einen circadianen Verlauf mit maximalen Serumkonzentrationen 1,5 und 2,2 Stunden nach dem Höhepunkt von TSH. Ottenweller und Hedge (1982) beschrieben auch einen tageszeitlichen Verlauf bei weiblichen Ratten. Unter dem gleichen Lichtregime von 12 : 12 Stunden lag in ihren Versuchen der maximale TSH-Wert kurz nach dem Einschalten des Lichts. Die höchste Konzentration der Schilddrüsenhormone zeigte sich 3 bis 4 Stunden später.

2.3. Schilddrüsenszintigraphie in der Nuklearmedizin

Die Nuklearmedizin basiert auf der Verwendung radioaktiver Substanzen und kernphysikalischer Verfahren in der klinischen und präklinischen Diagnostik sowie zu therapeutischen Zwecken. Als Feld der modernen Medizin ist die Nuklearmedizin maßgeblich beeinflusst von Entwicklungen unterschiedlicher Fachbereiche auf naturwissenschaftlicher sowie technischer Ebene. Der stetige Fortschritt in diesen Bereichen ermöglicht eine medizinische Bildgebung beim Menschen bis hin zur molekularen Bildgebung im Kleintiermodell. Zur Anwendung in der Diagnostik kommen Tracer bzw. radioaktiv markierte Substanzen, die am Stoffwechsel teilnehmen und eine Detektion der emittierenden Strahlung außerhalb des Organismus erlauben. In der klinischen Diagnostik stellt die Szintigraphie der Schilddrüse seit Jahrzehnten eine anerkannte Methode dar (Franken et al. 2010). Sie erlaubt die bildliche Darstellung des Organs und bei speziellen szintigraphischen Verfahren die Quantifizierung der Organfunktion durch die Aufnahme und Verstoffwechslung spezieller Radiopharmaka.

In der Bundesrepublik Deutschland wurden zwischen 2008 und 2012 ungefähr 2,8 Millionen Untersuchungen in der Nuklearmedizin durchgeführt. Die Szintigraphie der Schilddrüse war mit 42 % die am häufigsten durchgeführte Untersuchung (Trugenberg-Schnabel et al. 2016).

2.3.1. Historie

Historisch ist die Nuklearmedizin geprägt durch Erkenntnisse aus verschiedenen Bereichen der Wissenschaft. Nach grundlegenden kernphysikalischen Entdeckungen ab Ende des 19. Jahr-

2 Literaturübersicht

hundreds rückten die radiopharmakologischen und apparativen Entwicklungen zunehmend in den Vordergrund der Forschung und der klinischen Anwendung.

Begründet ist die Geschichte auf der Entdeckung der Radioaktivität durch den französischen Physiker Antoine Henri Becquerel im Jahr 1896 (Becquerel 1896). Die erste biologische Untersuchung mit einer radioaktiven Markierung erfolgte 1923 durch den Nobelpreisträger Georg Charles de Hevesy. Er erforschte die Bleiaufnahme in Pflanzen (Hevesy 1923). Im tierischen Organismus von Ratten untersuchte er zudem den Weg von radioaktivem Phosphor (Chievitz und Hevesy 1975). Es folgten sowohl die ersten diagnostischen Untersuchungen als auch therapeutischen Behandlungen am Menschen, zunächst 1936 mit radioaktivem Phosphor bei einem Patienten mit Leukämie (Lawrence 1954).

Im Jahr 1934 wurde das Iodisotop I^{128} mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 24,99 min hergestellt. Es fiel in Versuchen an Kaninchen auf, dass eine erhöhte Aufnahme in der Schilddrüse nachweisbar war. Durch die kurze HWZ des Iodisotops war der medizinische Einsatz jedoch beschränkt. In den folgenden Jahren kam es zur Herstellung der Iodisotope I^{130} (HWZ 12,37 Stunden) und I^{131} (HWZ 8,02 Tage) sowie zur ersten diagnostischen Anwendung von Radioiod am Menschen. Zum ersten therapeutischen Einsatz kam es 1942. Ein Patient mit Hyperthyreose wurde mit I^{131} behandelt (Hamilton und Lawrence 1942). Kurz darauf kam es zum ersten erfolgreichen Einsatz von Radioiod bei einem Schilddrüsenkarzinom. Die erste Behandlung eines metastasierenden Schilddrüsenkarzinoms in Deutschland erfolgte 1949 mit I^{131} (Winkler 1950).

Der unumstrittene Nachweis des chemischen Elements Technetium (Tc) erfolgte 1937 durch die Chemiker Emilio Segrè und Carlo Perrier (Perrier und Segrè 1937). Sie benannten das erste künstlich hergestellte Element nach dem altgriechischen Wort *technētós* für „künstlich“. Der Umstand, dass alle 34 bekannten Isotope von Technetium radioaktiv sind, hat die Erforschung dieses Elements lange Zeit erschwert. Es existieren zudem einige metastabile Zustände, die neben der Massenzahl durch den oberen Index „m“ gekennzeichnet sind. Die Radiochemie des

2 Literaturübersicht

Elements Technetium entwickelte sich schnell und die Bedeutung dieses Nuklids in der Nuklearmedizin wuchs seit einer Veröffentlichung im Jahre 1960 durch Powell Richards (Richards 1960). Er erkannte das Potential des metastabilen Kernisomers ^{99m}Tc und forschte an seiner potentiellen medizinischen Nutzung. Noch vor Ende des Zweiten Weltkrieges bot sich durch die Entwicklung des ersten Kernreaktors in Amerika die Möglichkeit kostengünstiger und in größeren Mengen reaktorhergestellte Radioisotope zu produzieren. Auf messtechnischer Ebene kam es zur Entwicklung von Kristalldetektoren, zur ersten bildlichen Darstellung einer Aktivitätsverteilung mittels rektilearem Scanner sowie zur Einführung der ersten Szintillationskamera. Sie wurde nach ihrem Entdecker Hal O. Anger auch als Anger-Kamera bezeichnet (Anger 1958). Anfang der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben David E. Kuhl und Roy Q. Edwards die sogenannte SPECT-Technik (Single-Photon-Emission-Computed-Tomography) bzw. Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (Kuhl und Edwards 1963), ein Verfahren zur dreidimensionalen Darstellung der Aktivitätsverteilung im lebenden Organismus unter Verwendung von einfachen Gammastrahlern (Single-Photon Emitter). Seit den späten 80er und frühen 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden verschiedene Prototypen von SPECT/CT-Hybridssystemen entwickelt. Sie ergänzen zur primär funktionalen Darstellung der SPECT-Technik die morphologischen Informationen der Computertomographie. Das erste System war 1999 kommerziell erhältlich (Hasegawa et al. 2002).

2.3.2. Tracer für die Schilddrüsendiagnostik

Das Tracer-Prinzip nach Hevesy basiert auf einer radioaktiv markierten Substanz, die in einen lebenden Organismus eingebracht wird, an Stoffwechselforgängen teilnimmt und sich in Zielstrukturen anreichert. Bei der *in vivo* Anwendung kommt es zur Aufnahme und Verteilung

2 Literaturübersicht

(Inkorporation) des Tracers. Dabei spielt der Raum eine Rolle, in der sich die Substanz befindet. Wenn sich die Substanz in extrazellulären Flüssigkeiten befindet wie bei der intravasalen Injektion, kommt dem Blut eine Transportfunktion zu (Hermann 2004a). Ein Tracer (engl. to trace für „aufspüren“) setzt sich typischerweise aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen besteht der Tracer aus einem Molekül, das als Trägerstoff fungiert und über die Verteilung und selektive Anreicherung im Körper entscheidet. Und zum anderen besteht der Tracer aus einem radioaktiven Isotop, was an dem entsprechenden Molekül gebunden ist und somit die Detektion außerhalb des Körpers erlaubt (Neumaier 2017). Für die diagnostische Anwendung eines Tracers werden besondere chemische, biochemische und pharmakologische Anforderungen gestellt. Das an ein Radionuklid gekoppelte Pharmakon muss an die gewünschte Zielstruktur gelangen und an Stoffwechselforgängen teilnehmen ohne diese zu beeinflussen. Mittels spezieller Kamerasysteme ist die Detektion emittierender Strahlung außerhalb des Körpers und die Abbildung der Tracerverteilung möglich. Die Darstellung eines Organsystems dient der visuellen Beurteilung und macht eine quantitative Auswertung möglich. Der hierfür ermittelte sogenannte Uptake stellt den Prozentsatz einer applizierten Radioaktivität dar, welche sich zu einem definierten Zeitpunkt in einem Gewebe befindet.

Im Reaktor oder Zyklotron lassen sich über tausend Radionuklide künstlich herstellen, die sich im Vergleich zu natürlich vorkommenden Nukliden meist durch eine kürzere HWZ und hohe Reinheit auszeichnen (Kötz und Botterweck 2014). Für die Anwendung im Bereich der Nuklearmedizin geeignet sind jedoch nur wenige (Hermann 2004b). Je nach Anwendungsgebiet innerhalb der Nuklearmedizin unterscheiden sich die Anforderungen an die radioaktiven Nuklide und der Einsatz wird durch chemische sowie physikalische Eigenschaften bestimmt. Charakteristika wie die Art der ionisierenden Strahlung, die Zerfallsenergie, die Größenordnung der Halbwertszeit und die biochemischen Eigenschaften, welche die Markierung beeinflussen, sind für die Wahl entscheidend. Aber auch der Preis und die Verfügbarkeit spielen eine zentrale Rolle (Kötz und Botterweck 2014). Bei wiederholter Anwendung eines Radionuklids muss der

2 Literaturübersicht

sogenannte Effekt des Stunnings berücksichtigt werden. Hierbei kann die initiale Gabe abhängig von der verabreichten Energiedosis den Uptake des Organs in nachfolgenden Untersuchungen beeinträchtigen (Brenner 2002; Lundh et al. 2009).

Auf dem medizinischen Fachgebiet der Nuklearmedizin zählt die szintigraphische Untersuchung der Schilddrüse zu den ältesten Untersuchungsformen. In der modernen Diagnostik ist eine funktionstopographische Untersuchung der Schilddrüse *in vivo* möglich, sowohl in der Klinik als auch in der präklinischen Forschung im Tiermodell. So kann die Lage, Form, Größe sowie das Speicherverhalten des Organs beurteilt werden. Zur Untersuchung stehen verschiedene Radiopharmaka zur Verfügung. Sie erlauben eine Darstellung des Iodstoffwechsels in direkter Form über Iodisotope, die eine natürliche Affinität zu diesem Organ aufweisen, oder in indirekter Form. Die unterschiedlichen Isotope des Iods weisen die selben chemischen Eigenschaften auf und unterliegen somit im Metabolismus der Schilddrüse identischen Stoffwechselprozessen. Der Körper unterscheidet dabei nicht zwischen dem stabilen Iod oder einem radioaktiven Isotop.

Unter den Iodisotopen spielt in der diagnostischen Bildgebung vorwiegend der reine Gammastrahler I^{123} mit einer HWZ von 13,22 Stunden eine Rolle. Jedoch ist die Herstellung mittels Zyklotron relativ aufwendig, was zu Lasten der Verfügbarkeit geht (Kötz und Botterweck 2014). Eine Indikation zur Szintigraphie beim Menschen besteht z. B. bei Verdacht auf ektopes Schilddrüsengewebe. Der Einsatz des Iodisotops I^{131} in der Diagnostik spielt nur eine Rolle in der Dosisabschätzung vor Beginn einer Radioiodtherapie bei benignen Schilddrüsenerkrankungen (Dietlein et al. 2014a). Das Iodisotop verfügt neben hochenergetischer Gammastrahlung auch über eine Betastrahlenkomponente und wird daher aus Strahlenschutzgründen vorwiegend in der Therapie eingesetzt. Der biologische Effekt der ausgesandten Betastrahlung im Gewebe und die ausreichend lange HWZ von 8,02 Tagen stehen hierbei im Vordergrund. Eine Indikation zum therapeutischen Einsatz besteht beim Menschen u. a. bei Morbus Basedow und Schilddrüsenautonomien (Dietlein et al. 2015). Auch in der Veterinär-

2 Literaturübersicht

medizin ist der therapeutische Einsatz bei einer Hyperthyreose der Katze in Betracht zu ziehen. Diese Funktionsstörung stellt die häufigste endokrine Erkrankung bei der Katze dar. Mit einer Radioiodtherapie ist nach einmaliger Anwendung die Wiederherstellung eines euthyreoten Zustandes möglich (Peterson 2006).

Die konventionelle szintigraphische Diagnostik der Schilddrüse basiert in der klinischen und präklinischen Anwendung jedoch auf der indirekten Darstellung des Iodstoffwechsels mittels Tc (Siegel et al. 1984; Boschi et al. 2013). Das bedeutenste Radioisotop stellt das metastabile ^{99m}Tc mit einer HWZ von 6,02 Stunden dar. Die Entwicklung vieler Radiopharmaka auf Basis von ^{99m}Tc beruhen auf den zahlreichen Vorteilen dieses Isotops. Es kann mittels Generatorsystem vor Ort produziert werden und besitzt somit eine gute Verfügbarkeit und ist relativ preisgünstig. Aus dem abgeschirmten Mutternuklid Molybdän (Mo) im Inneren des $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Isotopengenerators wird es als ^{99m}Tc -Pertechnetat ($^{99m}\text{TcO}_4$) durch radioaktiven Zerfall gewonnen. Das eluierte Tochternuklid ^{99m}Tc kann nach der Gewinnung direkt zu szintigraphischen Zwecken genutzt werden. Ein weiterer Vorteil für die szintigraphische Untersuchung ist der Umstand, dass $^{99m}\text{TcO}_4$ ein reiner Gammastrahler mit einer Gammaenergie in Höhe von 141 keV ist. Das ermöglicht eine Detektion außerhalb des Körpers mittels gängiger Gammakameras ohne das Risiko einer zu hohen Strahlenexposition im Vergleich zu Isotopen mit einer Betastrahlenkomponente.

$^{99m}\text{TcO}_4$ besitzt als einfach negativ geladenes Anion eine vergleichbare Molekülgröße und Molekülbeschaffenheit wie das Iodion. Über den NIS gelangt es analog zu Iod in die Thyrozyten (Bizhanova und Kopp 2009). Im Gegensatz zu den Iodisotopen durchläuft es jedoch nur die Iodination und wird nicht organisch gebunden d. h. nicht in die Thyrosinreste des Thyroglobulins eingebaut, sondern mit kurzer HWZ wieder ausgewaschen (Siegel et al. 1984). Die Anreicherung im Gewebe basiert bei $^{99m}\text{TcO}_4$ auf einem Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom. Im Vergleich dazu basiert die Anreicherung von Radioiod in der Schilddrüse zusätzlich

auf der Menge an organisch gebundenem Iod (Brandt et al. 2012). Korrekterweise handelt es sich bei der Aufnahme von $^{99m}\text{TcO}_4$ in die Schilddrüse um eine Akkumulation. Da jedoch international in der Nuklearmedizin der Begriff Uptake Verwendung findet, um die Anreicherung eines Tracers im Zielgewebe zu beschreiben, wird dieser Terminus auch in dieser Arbeit beibehalten.

Obwohl $^{99m}\text{TcO}_4$ nur passager angereichert wird, korreliert der relative thyreoidale Uptake ausreichend mit der Iodclearance des Organs (Dietlein 2017) und kann zur funktionellen Beurteilung der Schilddrüse herangezogen werden. Laut den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin sollte 5 bis 25 min nach intravenöser (i. v.) Injektion von ca. 70 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ die Schilddrüsenszintigraphie beim Menschen beginnen. In diesem Zeitraum ist die Variabilität des relativen thyreoidalen Uptakes gering. Der Einstrom in die Schilddrüse erfolgt ca. 5 bis 15 min nach Injektion. Anschließend stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom ein und eine Plateauphase wird ca. 15 bis 25 min nach Injektion erreicht (Dietlein et al. 2014b). Der Uptake für einen euthyreoten Menschen bei einer ausreichenden Iodversorgung liegt bei ungefähr 0,5 bis 2,0 % der applizierten Aktivität (Dietlein 2017).

Heutzutage ist die Nutzung von Radiopharmaka basierend auf ^{99m}Tc weit verbreitet und in schätzungsweise 85 % der nuklearmedizinischen Anwendungen werden sie verwendet (Eckelman 2009).

2.3.3. Nuklearmedizinische Bildgebung beim Mensch

Durch die Einführung der Anger-Kamera war erstmals eine bildliche Darstellung von dynamischen Prozessen im Körper möglich. Es folgte die Entwicklung von emissionstomo-

2 Literaturübersicht

graphischen Verfahren wie der SPECT, die eine Struktur in Form von Schnittbildern darstellen konnte. Im Vergleich zur planaren Szintigraphie machen die Schnittbildverfahren eine dreidimensionale Darstellung möglich. Sie sind nicht durch eine Tiefenbegrenzung limitiert und bieten die Möglichkeit zur Quantifizierung einer Organfunktion. Zahlreiche Techniken und Radioisotope zur Markierung für diese Verfahren stehen zur Verfügung und sind klinisch erprobt. Zudem erlaubt die hohe molekulare Sensitivität der Radiopharmaka den Einsatz einer geringen Substanzmenge und führt somit zur Reduktion der Strahlenbelastung. Da die bildgebenden Systeme in ihren Eigenschaften differieren, ist eine Wahl des geeigneten Verfahrens je nach spezifischer Fragestellung erforderlich.

In der klinischen Diagnostik der Humanmedizin zählen Untersuchungen mittels nuklearmedizinischer Verfahren zu den quantitativen Standarduntersuchungen. Zur Untersuchung der Schilddrüse stellt die SPECT ein bedeutendes Verfahren dar. Die Funktionsszintigraphie eines Organs macht die Erstellung einer Zeit-Aktivitätskurve möglich, welche die Stoffwechselfunktion verbildlicht. Eine wiederholte Untersuchung mit dieser nicht invasiven Methode stellt Patientendaten zur Verfügung, die als Grundlage für Verlaufsuntersuchungen dienen können. Die SPECT-Technik basiert auf dem Prinzip der Gammakamera und verfügt über einen nach Hal O. Anger konzipierten Messkopf (s. Abbildung 4).

Zur Untersuchung werden meist Kamerasysteme mit mehreren Köpfen verwendet, die gleichzeitig aus unterschiedlichen Positionen akquirieren, um die Zählrate zu steigern oder die Dauer der Aufnahme zu reduzieren. Bei der Untersuchung rotieren die Detektorköpfe um den Patienten und detektieren die emittierte Gammastrahlung aus unterschiedlichen Winkelrichtungen zum Objekt (Ritt et al. 2011).

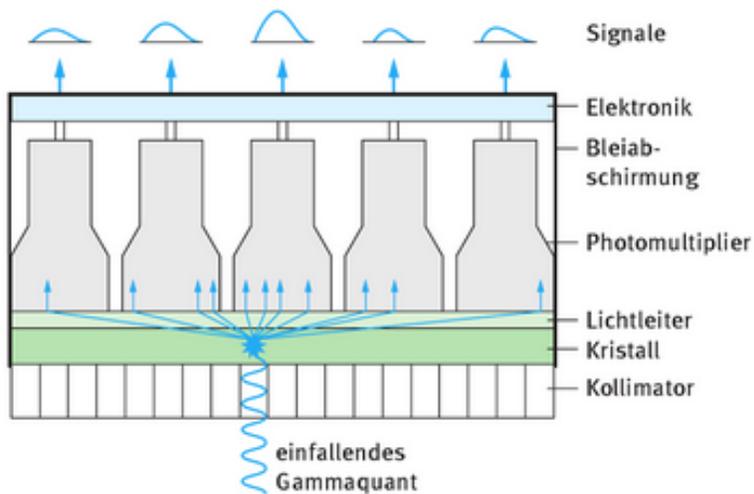


Abbildung 4: Prinzip der Gammakamera

Der Messkopf einer Gammakamera nach Hal O. Anger mit Kollimator, Kristall, Lichtleiter, Photomultiplier und nachgeschalteter Elektronik. (Abb. 5.1 aus: Kötz und Botterweck (2014))

Zunächst treffen die primär emittierten Gammaquanten auf Kollimatoren, die den Detektor der Gammakamera bedecken. Diese Bleiplatten bestehen aus Septen sowie kleinen Bohrungen und unterscheiden sich in ihrem Design (Newiger et al. 2003). Die Kollimatoren erlauben eine Filterung und Richtungsordnung der Gammaquanten durch eine mechanische Kollimation. Hierbei passieren nur die Quanten den Kollimator, die aus definierter, meist senkrechter Richtung einfallen. Zwischen dem Entstehungs- und Detektionsort treffen die Photonen auf Materie und treten mit ihr in Wechselwirkung. Dabei kommt es zum Energieverlust und zu Streuprozessen (Geworski 2004). Durch die Anwendung eines schmalen Energiefensters bei der SPECT-Technik wird der Anteil der gestreuten Photonen reduziert und somit die quantitative Beeinflussung der Streustrahlung begrenzt. Das Ausmaß der Streuung ist abhängig von der Pho-

2 Literaturübersicht

tonenenergie und von dem zu untersuchenden Objekt (Herzog und Rösch 2005). Die Wahl des geeigneten Kollimators richtet sich nach dem Anwendungsgebiet sowie dem eingesetzten Radioisotop und seiner Gammaenergie. Der Szintillationskristall der Gammakamera, der zumeist aus thalliumdotiertem Natriumiodid besteht, kann die einfallende Gammastrahlung gut absorbieren (Kötz und Botterweck 2014). Durch die einfallenden Quanten werden die Elektronen des Szintillationskristalls angeregt, und beim Übergang der Elektronen zurück in ihren Grundzustand wird die Energie in Form von Licht freigesetzt (Newiger et al. 2003). Die entstehenden Lichtblitze geben dem Vorgang der Szintillation (von lat. *scintillare* für „blitzen“; „flackern“) ihren Namen. Der Szintillator ist dicht bestückt mit sogenannten Photomultipliern. Sie messen das ausgesandte Licht und verstärken das Signal, welches in Form eines elektrischen Impulses weitergeleitet, von der nachgeschalteten Elektronik detektiert und weiterverarbeitet wird (Kötz und Botterweck 2014). Durch entsprechende Auswertverfahren können aus den akquirierten zweidimensionalen Bildern (Projektionen) bei der SPECT dreidimensionale Datensätze berechnet werden. Die visuelle Darstellung ist in unterschiedlichen Ebenen wie z. B. der transversalen Ebene oder auch in schräger Schnitfführung möglich. Der dreidimensionale Datensatz erlaubt die Volumendarstellung eines Organsystems und verhindert die Überlagerung der Aktivitätsverteilung, wie es bei einem planaren Szintigramm der Fall ist.

Lange bestand durch die eingeschränkte topographische Information des SPECT-Verfahrens eine Limitierung in der nuklearmedizinischen Bildgebung (Ritt et al. 2011). Mit der Entwicklung von Hybridsystemen, die die apparativen Vorteile unterschiedlicher Geräte kombinieren, wurde für dieses Problem eine Lösung gefunden und eine weitere Verbesserung in der medizinischen Diagnostik erreicht. Das multimodale SPECT/CT-System ergänzt zur SPECT-Bildgebung morphologische Informationen durch die Computertomographie. Die Emissions- und Transmissionseinheit befinden sich hintereinander im selben Gerät und verfügen über einen gemeinsamen Patiententisch, was eine Repositionierung des Patienten zwischen den Akquisitionen vermeidet. Zur Auswertung können die SPECT- und CT-Aufnahmen nach der Untersuchung fusioniert

werden. Die daraus resultierenden Fusionsbilder erlauben die gleichzeitige Datenanalyse am selben Computersystem und lagerungsbedingte Artefakte werden reduziert.

Zudem bietet die Kombination aus zwei Untersuchungsmodalitäten die Möglichkeit, das Problem der Absorption mittels einer Computertomographie-basierten Schwächungskorrektur zu lösen (Herzog und Rösch 2005; Ahmadzadehfar et al. 2015). Durch Absorptions- und Streuvorgänge bei der Szintigraphie kommt es zu einer Schwächung, die sich auf die Bildqualität sowie die quantitative Auswertung auswirkt. Sie muss mittels Schwächungskorrektur berichtigt werden.

Von zunehmender Bedeutung sind bildgebende Verfahren, die analog zum Menschen auch am Tier angewandt werden können, vor allem im Bereich der präklinischen Forschung, in der die molekulare Bildgebung ein aufstrebendes Feld darstellt (Auletta et al. 2017).

2.3.4. Nuklearmedizinische Bildgebung bei der Maus

Seit Jahrhunderten dienen Untersuchungen an Tieren der Analyse physiologischer Prozesse und stellen eine etablierte Methode zur Validierung von Diagnoseverfahren dar (Exner et al. 2004). Bereits im Corpus Hippocratum, dem medizinischen Handbuch des Abendlandes, fanden Tierversuche Erwähnung (Guerrini 1989). Zur Publikation der ersten wissenschaftlichen Untersuchung an Tieren kam es 1638 durch William Harvey (Streba et al. 2012). Im Jahr 1664 fand das erste Mal die Maus in wissenschaftlichen Versuchen Erwähnung. In England studierte Robert Hook die Konsequenzen für den Organismus bei einer Veränderung des Luftdrucks (Guenet et al. 2012).

2 Literaturübersicht

Seither wuchs die Bedeutung der Maus als Versuchstier und heutzutage kommt ihr eine gesonderte Stellung zu. Die Gründe liegen u. a. in der genetischen Ähnlichkeit zum Menschen und der relativ einfachen Haltungsmöglichkeit der kleinen Nager. Im Jahr 2016 waren laut dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2017) in Deutschland über 66 % der verwendeten Versuchstiere Mäuse. Auch innerhalb der Europäischen Union stellte die Maus mit ca. 61 % die am meisten verwendete Versuchstierspezies im Jahr 2011 dar (Europäische Kommission 2013). Die meisten Untersuchungen finden in der tierexperimentellen Forschung an männlichen Tieren statt (Beery und Zucker 2011). Das liegt u. a. an der Konvention in der Forschung (Clayton und Collins 2014). Ein anderer Grund ist die Sorge vor einer hormonellen Beeinflussung der Ergebnisse durch den weiblichen Zyklus (Prendergast et al. 2014). Eine Analyse von Studien aus unterschiedlichen Fachgebieten zeigte, dass selbst bei Inklusion beider Geschlechter häufig keine geschlechtsspezifische Auswertung erfolgt (Wald und Wu 2010).

Auch in der Nuklearmedizin kommt dem Tiermodell in der Forschung eine bedeutende Rolle zu. Neben der Grundlagenforschung an molekularen Prozessen ist auch die Übertragung von klinischen Fragestellungen in das Tiermodell und die Translation der Ergebnisse zurück in die Klinik von Interesse. In der Krankheitsforschung sind für das Verständnis von Krankheitsmechanismen die physiologischen Funktionszustände eines Organsystems von großer Bedeutung.

Über lange Zeit waren die Möglichkeiten der nuklearmedizinischen Untersuchung an Nagern *in vivo* limitiert und viele Verfahren fanden ihre Anwendung nach der Euthanasie des Tieres wie z. B. bei der Messung von radioaktiven Organproben (Beekman et al. 2002; Franc et al. 2008). Die ersten Bestrebungen an Kleintieren mittels SPECT Versuche durchzuführen, basierten auf der Anwendung von klinischen Gammakameras kombiniert mit sogenannten Pinhole-Kollimatoren (Meikle et al. 2005). Diese fokussierenden Kollimatoren funktionieren nach dem Prinzip einer Lochkamera und ermöglichen eine vergrößerte Abbildung des Objekts auf dem De-

tektor. Es bedurfte jedoch der Miniaturisierung und Weiterentwicklung von Kamerasystemen, um bildgebende Systeme speziell für die Untersuchung von Kleintieren nutzen zu können. Die Größe der zu untersuchenden Objekte sowie Unterschiede in physiologischen Abläufen im Vergleich zum Menschen, wie z. B. eine hohe Herzfrequenz bei der Maus, erschweren eine funktionale Bildgebung (Hasegawa et al. 2002). Das erste SPECT-System für Kleintiere bestand aus einer einzelnen Szintillationskamera in Kombination mit einem Pinhole-Kollimator mit einer Öffnung. Zur Untersuchung bedurfte es einer Aufnahmedauer von ca. einer Stunde sowie einer relativ hohen Dosis eines Radionuklids (Franc et al. 2008).

Im letzten Jahrzehnt wuchs das Interesse an der *in vivo* Bildgebung im Kleintier und mit ihm der weitere Fortschritt auf technischer Ebene. Heutzutage stehen für die tierexperimentelle Forschung hochauflösende und hochsensitive Modalitäten zur Verfügung wie dedizierte SPECT/CT-Systeme. Es sind verschiedene kommerzielle Geräte für Kleintiere erhältlich, die eine SPECT-Auflösung von unter 1 mm erreichen (Khalil et al. 2011). Nach wie vor werden Pinhole-Kollimatoren eingesetzt in Form von Multipinhole-Kollimatoren. Sie verfügen über Lochbohrungen in unterschiedlichen Richtungen, die verschiedene Projektionswinkel miteinschließen. Um einen Kompromiss zwischen einer hohen Auflösung und einer ausreichenden Sensitivität zu erhalten, werden mehrere Detektoren in Kombination mit Multipinhole-Kollimatoren eingesetzt (Behe et al. 2007; Franc et al. 2008). In Analogie zum Menschen eignet sich das Verfahren zur seriellen Diagnostik. Das ermöglicht Verlaufsuntersuchungen über einen großen Zeitraum und das einzelne Tier kann der eigenen Kontrolle dienen (Khalil et al. 2011; Koba et al. 2013). Aus ethischer und finanzieller Sicht ist dabei auch die Reduzierung der Versuchstierzahl von Bedeutung (Grimm und Wunder 2005; Behe et al. 2007). Erschwerend ist hierbei die Tatsache, dass im Vergleich zur Humanmedizin für die Kleintierbildgebung teilweise keine etablierten Untersuchungsabläufe zur Verfügung stehen. Aufgrund von Speziesunterschieden z. B. im Metabolismus ist die direkte Übertragung von Untersuchungsabläufen vom

2 Literaturübersicht

Mensch auf das Tier fraglich, so dass für die Versuchstierspezies Maus ein gesondertes Untersuchungsschema etabliert werden muss.

3 Material und Methoden

3.1. Tiere und Tierhaltung

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Genehmigungsnummer G0353/12) entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz zum Schutz von Versuchstieren genehmigt und durchgeführt. Als Versuchstiere wurden 12 gesunde weibliche und 12 gesunde männliche C57BL/6N Mäuse (*Mus musculus*) verwendet. Die Tiere wurden in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Universitätsmedizin Berlin, gezüchtet. Die 24 Versuchstiere wurden mit einem Absetzalter von 21 Tagen in die Tierhaltung des Berlin Experimental Radionuclide Imaging Centers (BERIC) verbracht, eine Core Facility der Fakultät und der Klinik für Nuklearmedizin der Charité.

Die Mäuse wurden nach Geschlechtern getrennt und in vier Gruppen zu je sechs Tieren eingeteilt. Jede Gruppe wurde in einem Makrolon Typ III Käfig (37 x 21 x 18 cm) mit Filtersystem gehalten. Zur Verbesserung der Haltungsbedingungen dienten ein rotes Plastikhaus, ein Plastiktunnel, Zellstoff als Nestbaumaterial sowie Nageholz. Die Käfige wurden wöchentlich gereinigt und mit neuer Einstreu (Lignocel, Rettenmaier und Söhne, Rosenberg, Deutschland) versehen. Die Tiere erhielten ein pelletiertes Alleinfuttermittel (SSNIF, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum. Die Haltungsbedingungen im Tierschrank (UniProtect, Bioscape, Schönwalde, Deutschland) mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 5 \%$ und einer Temperatur von $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ waren konstant. Auch das Lichtregime richtete sich nach einem konstanten Rhythmus. Der periodische Hell-Dunkel-Zyklus folgte einem 12-stündigen Rhythmus. Die Beleuchtung wurde in dem Zeitraum von 7.00 bis 19.00 Uhr automatisch eingeschaltet. Die Dunkelphase begann um 19.00 Uhr und endete um 7.00 Uhr zentraleruropäischer Zeit.

Unter den gegebenen Umständen der Versuchstierhaltung wurde auf eine Reduktion von äußeren Stressoren für die Mäuse geachtet, um mögliche negative Einflüsse auf den sexuellen

Zyklus zu reduzieren. Auch die Haltung von beiden Geschlechtern im selben Tierhaltungsschrank sollte durch Pheromone im männlichen Urin einen positiven Einfluss auf die Regelmäßigkeit des weiblichen Zyklus haben.

3.2. Untersuchungsschema

Die Mäuse wurden in einer longitudinalen Studie bis zu einem Alter von 24 Monaten wiederholt untersucht. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens 7 Tagen erfolgte die erste Untersuchung im Alter von 1 Monat in der Phase der Pubertät. Die zweite Untersuchung erfolgte an geschlechtsreifen, aber noch nicht ausgewachsenen Mäusen im Alter von 3 Monaten. Im Alter von 6 Monaten wurden die ausgewachsenen Mäuse untersucht. Die vierte Untersuchung fand an alten Tieren mit 12 Lebensmonaten statt. Eine letzte Untersuchung erfolgte mit 24 Monaten an senilen Mäusen.

Eine ausführliche Auflistung des Lebensalters der Mäuse zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Das Alter der C57BL/6N Mäuse zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten

	1. U	2. U	3. U	4. U	5. U
	Alter (Monat)				
weibliche Mäuse					
Median	1,0	2,7	5,8	12,2	23,6
IQR	0,9-1,1	2,5-3,0	5,6-6,0	12,0-12,4	23,4-23,7
Min-Max	0,9-1,1	2,4-3,9	5,5-7,3	11,8-12,6	23,3-23,8
männliche Mäuse					
Median	1,1	2,9	5,8	12,1	23,6
IQR	1,0-1,2	2,8-3,0	5,7-6,1	11,9-12,3	23,4-23,9
Min-Max	1,0-1,2	2,7-3,7	5,7-6,7	11,8-13,1	22,9-24,1

Alle Messwerte angegeben als %ID; U=Untersuchung

Aufgrund der unterschiedlichen Gruppierung von Mäusen in Altersstufen sowie Abweichungen in deren Benennung in der Literatur wurden an den Mäusen dieser Studie unabhängig von der Schilddrüsenuntersuchung eine Ganzkörper-CT-Aufnahme durchgeführt. Diese Untersuchung erfolgte wiederholt bei weiblichen und männlichen Tieren im Alter von 1 bis 12 Monaten. Anhand dieser CT-Aufnahmen konnte eine Vermessung der Femur- und Tibialänge durchgeführt werden, um das Körperwachstum der Mäuse bestimmen zu können. Die Längenmessung der zwei Röhrenknochen der Hinterextremität erfolgte mittels der Software PMOD 3.4 (PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz). Im CT-Bild wurde die Femurlänge vom proximalsten Punkt des Femurkopfes (*Caput femoris*) bis zur *Fossa intercondylaris* bestimmt. Die Länge der Tibia wurde

3 Material und Methoden

ausgehend von der *Articulatio femorotibialis* bis zur distalen Tibiagelenkfläche vermessen. Aufgrund dieser Messungen konnte retrospektiv die Einteilung der Tiere in Altersgruppen, die mit dem Wachstum korreliert, beurteilt werden. Das Knochenwachstum wurde in Millimetern als Median [Interquartilsabstand; IQR] sowie Minimum und Maximum angegeben.

Um den Einfluss des circadianen Rhythmus bestimmen zu können, wurden die Untersuchungen während der ersten Hälfte der Hellphase in den Stunden der höchsten körperlichen Ruhe (Schlafphase; SP) sowie während der ersten Hälfte der Dunkelphase in den Stunden der höchsten körperlichen Aktivität (Wachphase; WP) der Mäuse durchgeführt. Zur Schonung der juvenilen Tiere erfolgte im Alter von 1 Monat nur eine Untersuchung, entweder in der SP oder WP. Die einmalige Untersuchung der juvenilen Mäuse erklärt die geringe Tierzahl im Alter von 1 Monat von jeweils 6 Mäusen in der SP sowie WP bei beiden Geschlechtern. Die morgendliche Injektion des Tracers erfolgte von 7.30 bis maximal 14.40 Uhr. Die abendliche Injektion von frühestens 16.30 bis maximal 23.10 Uhr.

Im Studienverlauf mussten einige Tiere aufgrund von gesundheitlichen Problemen von den Versuchen ausgeschlossen werden. Daher reduzierte sich die anfängliche Tierzahl von insgesamt 24 Mäusen. Ausgeschlossene Tiere wurden nicht ersetzt, damit jede Maus als eigene Kontrolle dienen konnte. Im Alter von 3 Monaten wurden bei beiden Geschlechtern jeweils 11 Mäuse in der SP sowie WP untersucht. Im Alter von 6 Monaten wurden 10 weibliche Mäuse in der SP sowie WP untersucht. Bei den männlichen Tieren wurden 11 Mäuse in der SP und 10 Tiere in der WP untersucht. Im Alter von 12 Monaten wurden bei beiden Geschlechtern jeweils 10 Mäuse in der SP sowie WP untersucht. Bei den senilen Tieren im Alter von 24 Monaten wurden jeweils 4 weibliche Mäuse und 8 männliche Mäuse in der SP sowie WP untersucht.

Um eine eventuelle Beeinflussung der Narkose auf den circadianen Rhythmus ausschließen zu können, wurde eine Untersuchungspause von mindestens 72 Stunden eingehalten. Um einen möglichen Einfluss der vorangegangenen Narkose zusätzlich auszuschließen, wurde die Hälfte

3 Material und Methoden

einer Mausgruppe zunächst in der Hellphase bzw. SP und anschließend in der Dunkelphase bzw. WP untersucht, während die andere Hälfte der Gruppe in umgekehrter Reihenfolge untersucht wurde.

An 6 weiblichen und 6 männlichen Mäusen wurden im Alter von 1 Monat und 6 Monaten eine zusätzliche Aufnahme 5 bis 9 Stunden (Median 6,3 Stunden) nach Injektion durchgeführt, um die verbleibende Aktivität in der Schilddrüse nach dieser Zeitspanne zu bestimmen. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich eine nur geringere Restaktivität in der Schilddrüse, was zerfallsbedingt sowie auf der Elimination des Radiopharmakons in der Schilddrüse zurückzuführen ist. Daher wurde die Aufnahmedauer von 10 min auf einmalig 20 min erhöht, um eine ausreichende Bildqualität zu erzielen.

3.3. Narkose und Tracerinjektion

Die Maus wurde vor dem Versuch zunächst auf ihren Gesundheitszustand und somit auf ihre Versuchsfähigkeit hin untersucht und gewogen. Für die anschließende Inhalationsnarkose wurde das Tier in eine 60 ml Spritze verbracht, welche mit einem Gasgemisch aus 1-2 Vol.-% Isofluran und 0,5 l/min medizinischem Sauerstoff geflutet wurde. Die narkotisierte Maus wurde auf eine beheizte Wärmematte verbracht und erhielt zum Schutz der Cornea Bepanthen-Augensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) (s. Abbildung 5). Nach der Desinfektion der Haut im Schwanzbereich (SoftaseptN, B. Braun, Melsungen, Deutschland) führte ein Infrarotstrahler zur Erwärmung und somit zur Hyperämisierung und Vasodilatation im Punktionsbereich. Anschließend erfolgte die i.v. Injektion von durchschnittlich 80 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ in die Schwanzvene (lat. *Vena caudalis mediana*) der Maus (s. Abbildung 6).

3 Material und Methoden

Unter Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften wurde das mittels Generator (Tekcis-20, CIS Bio, Berlin, Deutschland) der Klinik für Nuklearmedizin gewonnene $^{99m}\text{TcO}_4$ bei Bedarf mit 0,9 %iger physiologischer Natriumchloridlösung verdünnt und auf ein Volumen von maximal 0,15 ml für die Injektion gebracht. Zur Vermeidung von Totvolumen wurde das Radiopharmakon in einer speziellen Insulinspritze ohne Restvolumen im Konus (Micro-Fine U-100 Insulin, 0,33 mm (29 G) x 12,7 mm, BD Medical, Franklin Lakes, U.S.A.) aufgezogen und aus Strahlenschutzgründen in eine Spritzenabschirmung (MiE medical imaging electronics, Elk Grove Village, U.S.A.) verbracht. Die Injektion wurde durchgeführt mittels selbsthergestelltem Katheter aus einer Kanülenspitze (30 G) und einem Katheterschlauch mit einem Durchmesser von 0,28 x 0,61 mm (Portex, A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland). Vor Punktion der Schwanzvene wurde der Katheter mit 0,9 %iger physiologischer Natriumchloridlösung luftblasenfrei gespült.

Mittels Aktivimeter (ISOMED 2010, MED Nuklear-Medizintechnik, Dresden, Deutschland) erfolgte die Messung der vollen Spritze vor der Injektion sowie die Messung der leeren Spritze und des verwendeten Katheters nach der Injektion. Zur Bestimmung der injizierten Aktivität wurde vor jeder arbeitstäglichen Messung eine Qualitätskontrolle durchgeführt durch Kalibrierung des Aktivimeters mit dem langlebigen Prüfstrahler $^{137}\text{Caesium}$. Bei der HWZ von $^{99m}\text{TcO}_4$ von 6,02 Stunden wurde zur genauen Ermittlung der injizierten Aktivität die Zeit der Aktivitätsmessung der vollen Spritze sowie der leeren Spritze auf die Injektionszeit zerfallskorrigiert.

3 Material und Methoden

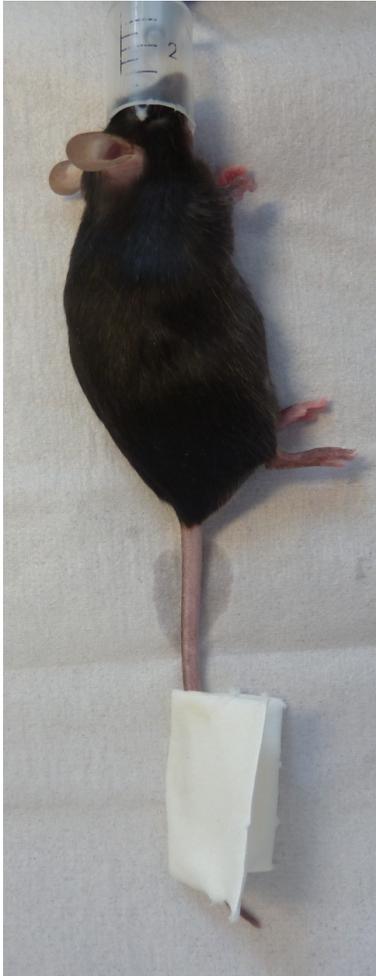


Abbildung 5: Vorbereitung der Maus vor der Injektion

Eine narkotisierte C57BL/6N Maus in Seitenlage mit desinfizierter Haut im Schwanzbereich vor der Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$. (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (2014))

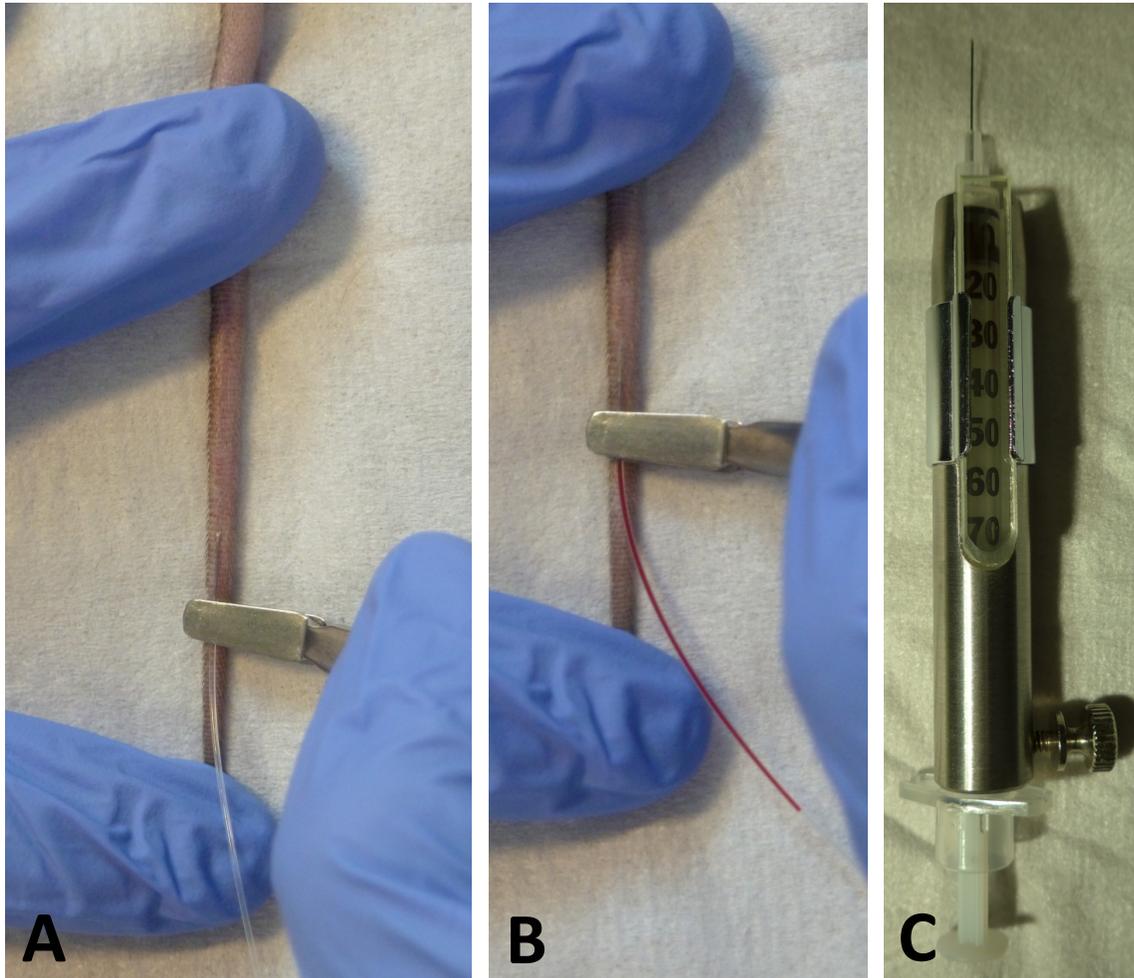


Abbildung 6: Punktion der Schwanzvene bei der Maus und Injektion des Tracers

Punktion der Schwanzvene mit der Kanülenspitze (A). Die Überprüfung der intravenösen Lage des Katheters erfolgte anhand des Rückflusses von venösem Blut in den Katheterschlauch aufgrund der wirkenden Kapillarkraft. Anschließend erfolgte die Injektion des Tracers (B). Spritze in der Spritzenabschirmung aus Wolfram mit Bleiglassichtfenster (C). (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (2014))

3.4. SPECT/CT Bildgebung

Umgehend nach der Injektion wurde die narkotisierte Maus in das in dieser Studie verwendete Gerätesystem NanoSPECT/CTplus für Kleintiere (Mediso, Budapest, Ungarn; Bioscan, Wahington, U.S.A.) verbracht (s. Abbildung 7).

Die CT-Einheit des NanoSPECT/CTplus verfügt über eine Röntgenröhre mit 8 Watt und einer Auflösung von 48 μm . Das Sichtfeld (Field of View) beträgt 70 \varnothing x 45 mm. Die SPECT-Einheit verfügt über vier Detektoren. Sie werden mit austauschbaren Pinhole-Kollimatoren ausgestattet. In dieser Studie wurden Multipinhole-Kollimatoren mit 9 Löchern (APT 106) und einem Lochdurchmesser von 1,0 mm verwendet (s. Abbildung 8). Sie verfügten über ein Sichtfeld von 36 \varnothing x 20 mm und eine Auflösung von 0,7 mm FWHM (Full Width at Half Maximum) für $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$.

Beide Untersuchungsmodalitäten befanden sich hintereinander in derselben rotierenden Gantry. Sie verfügten über einen gemeinsamen beweglichen Untersuchungstisch, was die sequenzielle Anwendung beider Untersuchungseinheiten ohne eine Repositionierung des narkotisierten Tieres erlaubte. Die Maus befand sich während der Untersuchung in einem beheizbaren Untersuchungsbett (Equipement Vétérinaire Minerve, Esternay, Frankreich), welches die Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur während der Untersuchung ermöglichte. Der Erhalt der Narkose war über eine von außen regulierbare Inhalationsnarkose möglich. Die Narkoseüberwachung während der Untersuchung konnte mittels Elektrokardiogramm oder durch Überwachung der Atemfrequenz erfolgen. Die narkotisierte Maus wurde nach Injektion im vorgeheiztem Mausbett (37 °C) in Bauchlage gelagert (s. Abbildung 9). Die Überwachung der Maus und die Steuerung der Narkosetiefe erfolgte während der Untersuchungszeit mit Hilfe der Atemfrequenz erfassung. Ein Atemkissen wurde hierfür thorakoabdominal unter der liegenden Maus platziert (s. Abbildung 10). Zur genauen Positionierung des 20 mm großen Scanbereichs wurde zunächst ein CT-Übersichtsbild vom Halsbereich erstellt. Die anschließende SPECT-

3 Material und Methoden

Untersuchung startete durchschnittlich 5 min nach Injektion. Das Energiefenster für $^{99m}\text{TcO}_4$ wurde bei $140 \text{ keV} \pm 10 \%$ eingestellt. Die dynamische Untersuchung bestand aus 9 aufeinanderfolgenden SPECT-Aufnahmen mit einer Dauer von je 10 min. Jede Aufnahme bestand aus 20 Projektionen bzw. aus 5 Winkelschritten mit 4 Detektoren um je 18 Grad versetzt. Da zu jeder Aufnahmedauer eine Zeitspanne als Totzeit hinzukam, in der sich die Gantry drehte, ergab sich insgesamt für jede Untersuchung eine Aufnahmedauer von 97,5 min. Jede der 9 Aufnahmen hatte somit eine Dauer von 10,8 min. Der SPECT-Untersuchung schloss sich eine erneute CT-Aufnahme des Halsbereiches an. Bis zur Rückkehr in die Gruppenhaltung konnte sich die untersuchte Maus in einer bleiummantelten Wärmebox ($35 \text{ }^\circ\text{C}$; MediHeat, Peco Services, Cumbria, England) von der Narkose erholen.



Abbildung 7: NanoSPECT/CTplus

Das NanoSPECT/CTplus für Kleintiere. (Darstellung mit Dank an Mediso Kft.)

3 Material und Methoden



Abbildung 8: Multipinhole-Kollimator

Einer von vier Multipinhole-Kollimatoren (APT 106) mit 9 Pinholes (D1.0) für das NanoSPECT/CTplus. (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (2017))



Abbildung 9: Maus im Untersuchungsbett

Eine narkotisierte Maus in Bauchlage im Mausbett des NanoSPECT/CTplus. (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (2014))

3 Material und Methoden

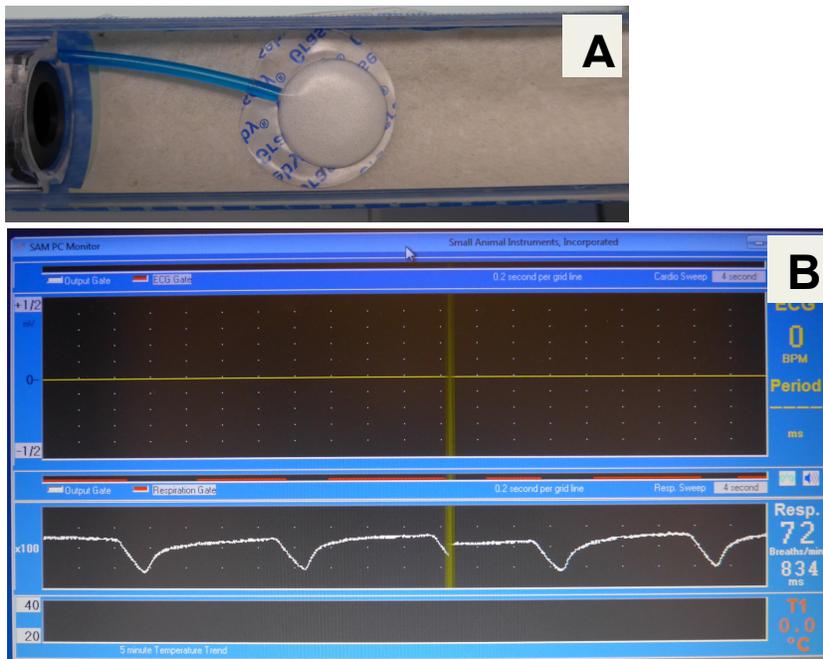


Abbildung 10: Atemfrequenzmessung

Das Atemkissen zur Überwachung der Atemtätigkeit während der Narkose im Mausbett (A). Der Monitor mit abgebildeter Atemfrequenz von 72/min einer narkotisierten Maus (B). (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (2014))

3.5. Bildrekonstruktion und -quantifizierung

Die Rekonstruktion der SPECT/CT-Bilder erfolgte mit der System-Software HiSPECT (Bioscan, Washington, U.S.A.). Die Bildrekonstruktion erfolgte iterativ mithilfe des OSEM-Algorithmus (Ordered Subset Expectation Maximization) und den Standardparametern (3 x 3 Iterationen, 35 % Postfilter, 0.3 x 0.3 x 0.3 mm³ isotrope Auflösung).

3 Material und Methoden

Die rekonstruierten Bilder wurden mit der Software PMOD 3.4 ausgewertet. Um einen dynamischen Bildverlauf zu erzeugen, wurden die 9 aufeinanderfolgenden SPECT-Aufnahmen fusioniert. Abbildung 11 zeigt die Lage von Schilddrüse und Speicheldrüsen in der Halsregion bei der Maus. In transversaler Projektion (s. Abbildung 11A) war eine klare Abgrenzung der Organe voneinander möglich.

Im fusionierten Bildverlauf wurde die Schilddrüse mittels ROI-Technik (Region-of-Interest) ausgewertet. Im Schnittbild mit dem höchsten Schilddrüsenuptake wurde eine dreidimensionale VOI (Volume-of-Interest) über das Organ gelegt (s. Abbildung 12). Die 5 % Isokontur bezogen auf die Maximalaktivität wurde anschließend in jedem Bild manuell korrigiert, um den quantitativen Fehler durch die Speicheldrüsen (Spill-over) zu minimieren. Durch Regulation des Schwellenwertes war eine visuell definierte Unterscheidung von Schilddrüse, Speicheldrüsen und Hintergrund möglich, um eine quantitative Beeinflussung durch Einstrahlung von extrathyroidalen Bereichen (Spill-over) auf die Auswertung ausschließen zu können. Die erhaltenen Zeit-Aktivitäts-Kurven wurden im Hinblick auf den radioaktiven Zerfall zum Injektionszeitpunkt korrigiert sowie die zeitliche Angabe berichtigt im Hinblick auf die verstrichene Zeit zwischen Injektion des Radiopharmakons und dem Start der Untersuchung. Der Uptake wurde angegeben in %ID. Die Angabe steht in der Literatur für Prozent der injizierten Dosis. Da es sich beim Schilddrüsenuptake nicht um eine Dosis im pharmakologischen Sinn handelt, steht in dieser Arbeit die in der internationalen Literatur verwendete Einheit %ID für den Uptake in Prozent der injizierten Aktivität.

Bezüglich der Volumetrie der Mäuseschilddrüse war eine Vermessung mittels Computertomographie aufgrund der geringen Organgröße und dem geringen Weichteilkontrast nicht möglich. Daher wurde das Volumen der Schilddrüse anhand der SPECT-Aufnahmen szintigraphisch abgeschätzt (PMOD 3.4). Diese Methode führt durch den Partialvolumeneffekt zu einer Überschätzung der Volumina, was nur relative und keine absoluten Rückschlüsse über das Or-

3 Material und Methoden

ganvolumen (mm^3) zulässt. Auch die Bestimmung des Schilddrüsenvolumens in Bezug zum Körpergewicht lässt nur relative Rückschlüsse zu. Da die Masse der Mausschilddrüse unbekannt war und somit keine prozentuale Angabe erfolgte, wurde die Einheit in mm^3/g beibehalten.

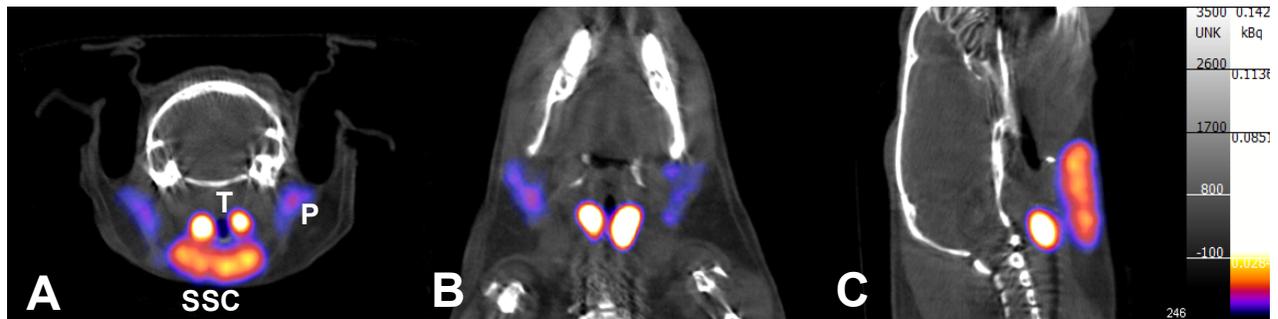


Abbildung 11: SPECT- und CT-Aufnahmen der Schilddrüse und der Speicheldrüsen bei der Maus

Die *in vivo* SPECT- und CT-Aufnahmen des Halsbereiches einer 6 Monate alten weiblichen Maus 30 min nach Injektion von $65 \text{ MBq } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4$. Die Aufnahme zeigt das 3. von 9 konsekutiven SPECT-Bildern in transversaler (A), coronaler (B) und sagittaler Ebene (C). Deutlich zeigen sich die zwei Schilddrüsenlappen (*Glandula thyroidea*, T), der submandibular-sublingual-Komplex (SSC) sowie die *Glandula parotidea* (P).

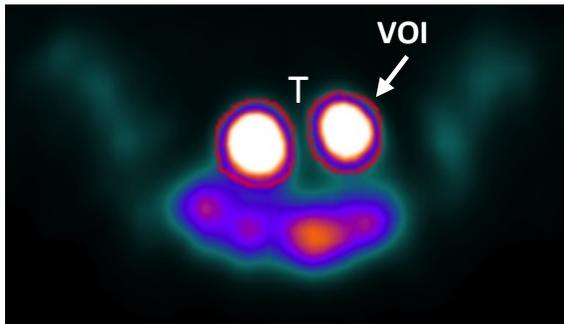


Abbildung 12: Volume-of-Interest

Der Schilddrüsenuptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ wurde mittels manuell eingezeichneter VOI (Volume-of-Interest) über beiden Lappen der Schilddrüse (*Glandula thyroidea*, T) bestimmt. Hier eine Abbildung in transversaler Projektion (PMOD 3.4).

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software R in der Version 3.1.3 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich). Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde eine nicht parametrische Verteilung der Daten angenommen. Der Uptake der Schilddrüse wurde angegeben in %ID. Die deskriptive Statistik wurde aufgeführt als Median [Interquartilsabstand; IQR] sowie Minimum und Maximum und mit Hilfe von Boxplots grafisch dargestellt. Die verbundenen Daten mit mehr als zwei Stichproben wurden mittels Friedman- sowie Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Holm-Adjustierung ausgewertet. Die Gegenüberstellung unverbundener Daten erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test). Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Ein p-Wert < 0,1 wurde als Tendenz zur Signifikanz gewertet. Mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's Rho) für nicht-parametrische Daten wurde der Zusammenhang zweier metrischer Parameter analysiert.

4 Ergebnisse

Wie im Untersuchungsablauf beschrieben, wurden bei weiblichen und männlichen C57BL/6N Mäusen wiederholt eine SPECT- sowie CT-Aufnahme des Halsbereiches akquiriert nach i. v. Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$. Die Untersuchungen erfolgten in unterschiedlichen Altersstufen sowie in der Schlafphase (SP) und in der Wachphase (WP) der Mäuse. Bei einigen Tieren erfolgte eine zweite Untersuchung 5 bis 9 Stunden nach Injektion, um den verbleibenden Uptake in der Schilddrüse zu bestimmen.

Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in 4 Abschnitte. Er umfasst die statistische Auswertung vom Zeitpunkt des Auftretens des maximalen Schilddrüsenuptakes (t_{\max}) sowie von der Höhe des Schilddrüsenuptakes (%ID) in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und circadianem Rhythmus der Mäuse. Zudem umfasst der Ergebnisteil die Ergebnisse der szintigraphischen Volumetrie der Schilddrüse sowie der Längenmessung von Femur und Tibia bei den Mäusen. Die Einzeldaten zu den Abbildungen des Ergebnisteils befinden sich im Anhang (Tab. A1-A9).

4.1. Zeitpunkt des maximalen Schilddrüsenuptakes

Der Verlauf des $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptakes bei Mäusen zeigte einen steilen Anstieg nach i.v. Injektion bis zum Erreichen vom Zeitpunkt des maximalen Schilddrüsenuptakes (t_{\max}). Dieser trat frühestens 8 min bis spätestens 43 min (26,9 min [22,2-31,4] 8,4-43,3) nach Injektion ein. Der anschließende Abfall des Schilddrüsenuptakes erfolgte langsamer als der Anstieg, aber stetig.

Der Zeitpunkt, wann der Uptake noch 75 % vom maximalen Schilddrüsenuptake betrug, lag bei 75,8 min ([65,7-85,9] 37,5-97,6). Der Zeitpunkt, wann sich noch 50 % vom maximalen Uptake

4 Ergebnisse

in der Schilddrüse befand, lag bei 138,5 min ([125,6-174,9] 100,3-215,1).

Die Abbildung 13 veranschaulicht den Verlauf des Schilddrüsenuptakes von $^{99m}\text{TcO}_4$ innerhalb der ersten 100 min sowie 6 bis 8 Stunden nach Injektion beispielhaft anhand der charakteristischen Zeit-Aktivitäts-Kurven von zwei Mäusen.

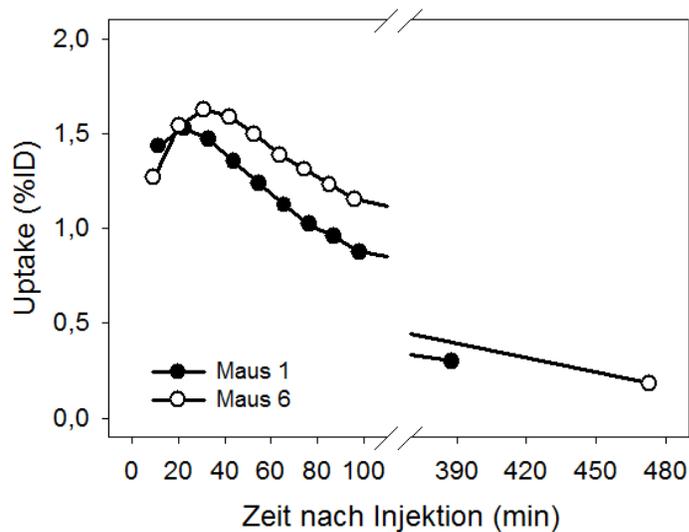


Abbildung 13: Charakteristische Zeit-Aktivitäts-Kurven des Schilddrüsenuptakes bei der Maus

Dargestellt sind 9 konsekutive SPECT-Aufnahmen ca. 5 min nach Injektion von ca. 70 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ sowie weitere Untersuchungen 6 bis 8 Stunden nach Injektion bei zwei weiblichen Mäusen im Alter von 1 Monat (Maus 1 und Maus 6). Nach der Injektion zeigte sich ein steiler Anstieg im Uptake bis zum Erreichen von t_{\max} nach 22 min bei Maus 1 bzw. nach 31 min bei Maus 6. Es folgte ein stetiger Abfall des Uptakes. Zum Zeitpunkt der zweiten Untersuchung bis zu 8 Stunden nach Injektion war der Uptake in der Schilddrüse noch messbar.

4 Ergebnisse

Das Alter der Mäuse hatte keinen signifikanten Einfluss auf t_{\max} . Jedoch zeigte sich eine Tendenz ($p = 0,063$) zu einem späteren t_{\max} mit zunehmendem Alter (s. Abbildung 14A). Der Zeitpunkt des maximalen Schilddrüsenuptakes von allen Tieren zusammengefasst lag bei 23,5 min sowohl im Alter von 1 Monat ([20,5-28,5] 9,4-40,5) als auch im Alter von 3 Monaten ([20-27,7] 8,4-41,4). Im Alter von 6 Monaten lag t_{\max} bei 27,3 min ([25,7-30,5] 14,5-33,3). Bei 12 Monate alten Mäusen lag t_{\max} bei 29,6 min ([24,7-31,7] 8,4-42,2) und bei 24 Monate alten Tieren bei 31,9 min ([25,3-33,7] 19,1-43,3).

Getrennt nach Geschlecht zeigte sich weder bei weiblichen noch bei männlichen Mäusen ein signifikanter Einfluss des Alters auf t_{\max} (s. Abbildung 14B und 14C). Eine Tendenz zum später eintretenden Zeitpunkt des maximalen Uptakes mit zunehmendem Alter zeigte sich nur bei männlichen Mäusen ($p = 0,059$), aber nicht weiblichen Tieren ($p = 0,463$).

In Bezug auf den circadianen Rhythmus zeigten weibliche Mäuse nur im Alter von 1 Monat einen signifikant späteren t_{\max} ($p = 0,015$) während der Schlafphase (30,6 min [27,3-33,3] 23,1-40,5) im Vergleich zur Wachphase (21,1 min [19,3-24,6] 14,7-27,7) (s. Abbildung 15). Bei männlichen Mäusen war in keiner Altersstufe ein signifikanter Einfluss des circadianen Rhythmus auf t_{\max} zu erkennen (s. Abbildung 16).

4 Ergebnisse

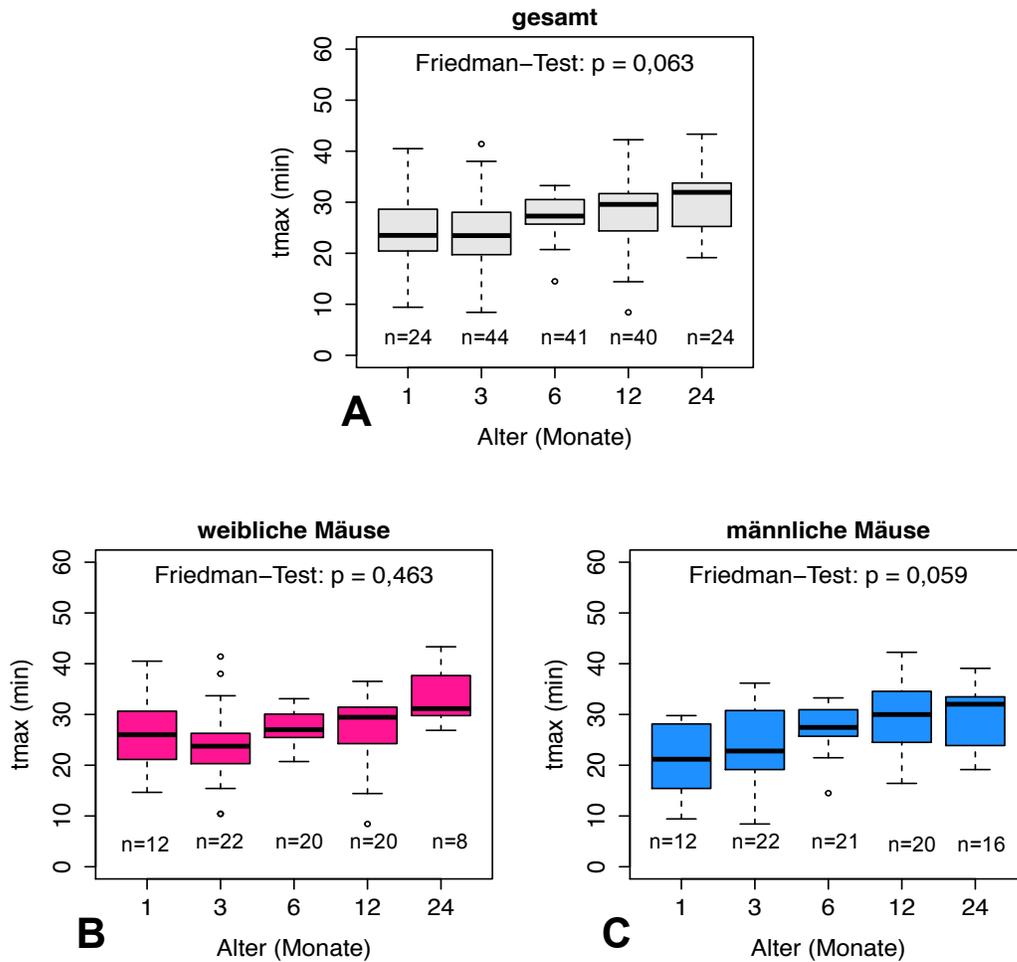


Abbildung 14: Zeitpunkt des maximalen Uptakes

Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake aller Mäuse in Bezug zum Alter der Tiere angegeben als Zeitpunkt des maximalen Uptakes (t_{max}) in Minuten (**A**). Der Zeitpunkt des maximalen Uptakes (t_{max}) getrennt nach weiblichen (**B**) und männlichen Mäusen (**C**).

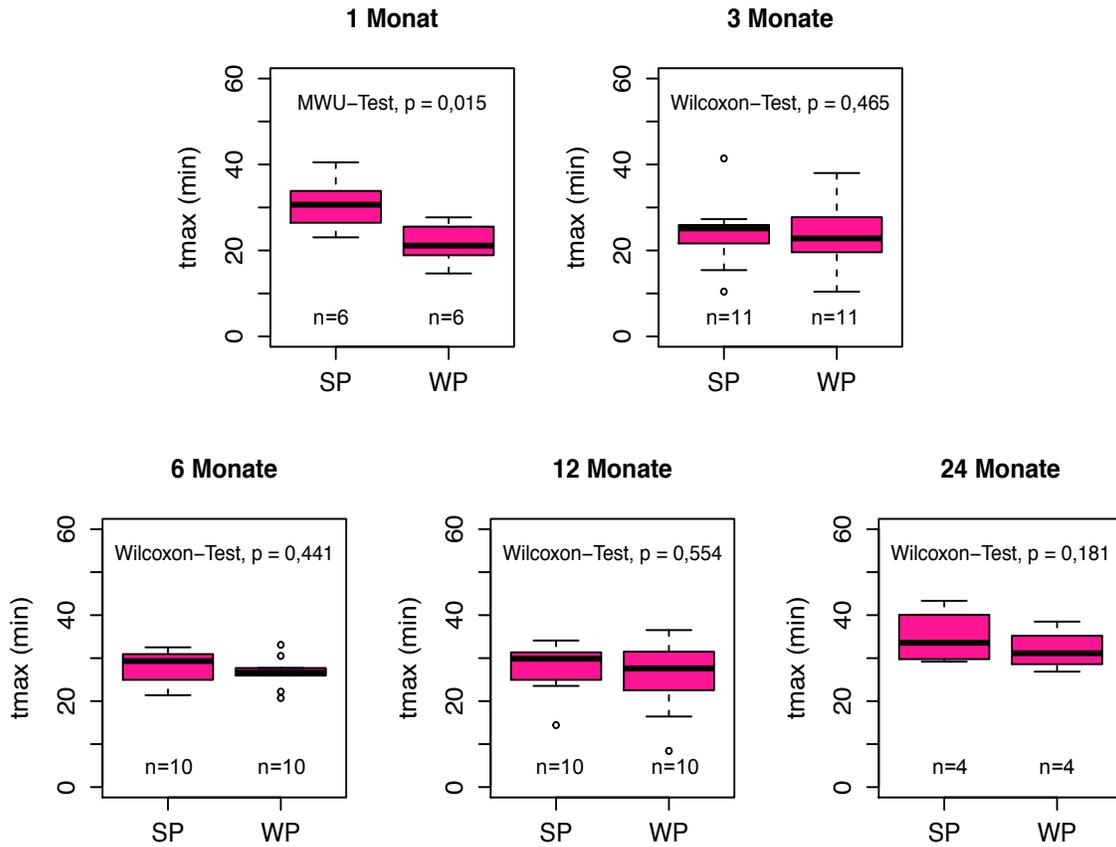


Abbildung 15: Zeitpunkt des maximalen Uptakes in Bezug zum circadianen Rhythmus bei weiblichen Mäusen

Der Zeitpunkt des maximalen Uptakes (t_{max}) in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus bei weiblichen Mäusen in unterschiedlichen Altersstufen (SP=Schlafphase; WP=Wachphase).

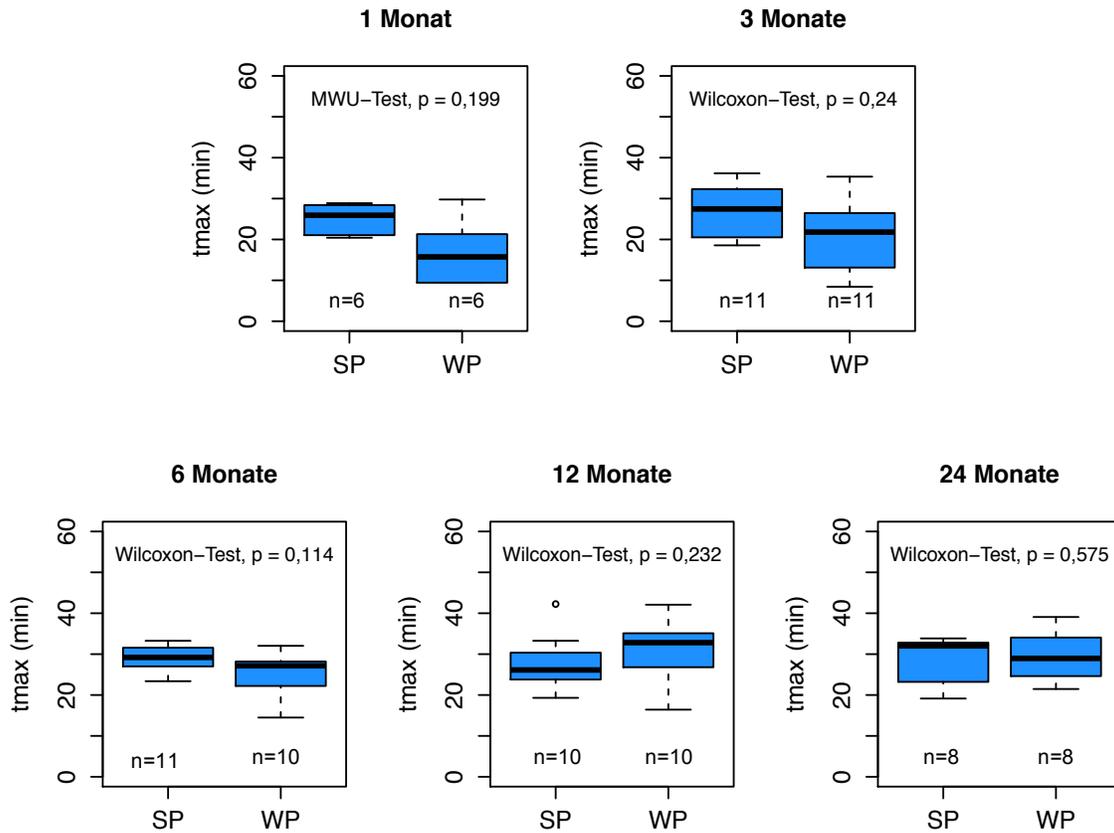


Abbildung 16: Zeitpunkt des maximalen Uptakes in Bezug zum circadianen Rhythmus bei männlichen Mäusen

Der Zeitpunkt des maximalen Uptakes (t_{max}) in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus bei männlichen Mäusen in unterschiedlichen Altersstufen (SP=Schlafphase; WP=Wachphase).

4.2. Der Schilddrüsenuptake

Der maximale Schilddrüsenuptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ bei C57BL/6N Mäusen lag bei 1,3 %ID ([1,1-1,6] 0,7-2,3) zum Zeitpunkt t_{max} . Anschließend erfolgte ein stetiger Abfall des Uptakes.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung 5 bis 9 Stunden nach Injektion zeigte sich ein noch verbleibender Uptake in der Schilddrüse von 0,2 %ID ([0,1-0,3] 0,1-0,5). Dies entsprach 16,1 % ([13,9-19,6] 6,9-27,9) des maximalen Schilddrüsenuptakes.

Eine detaillierte Übersicht des maximalen $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptakes gibt Tabelle 2. Aufgeführt ist der Schilddrüsenuptake in den Altersstufen von 1 bis 24 Monaten in Bezug zum Geschlecht und circadianen Rhythmus der Mäuse.

Tabelle 2: Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake in Bezug zum Geschlecht, Alter und circadianen Rhythmus von C57BL/6N Mäusen

	Alter (Monate)									
	1 Mo		3 Mo		6 Mo		12 Mo		24 Mo	
	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP
weibliche Mäuse										
Median	1,6	1,6	1,5	1,8	1,8	1,8	1,6	1,5	1,1	1,1
IQR	1,5-1,7	1,4-1,6	1,4-1,7	1,7-1,9	1,7-2,0	1,7-2,0	1,6-1,7	1,4-1,7	1,0-1,3	1,1-1,2
Min-Max	0,9-2,1	1,4-1,7	1,2-1,9	1,4-2,0	1,5-2,3	1,1-2,2	1,4-1,7	1,2-1,9	0,8-1,7	1,0-1,5
männliche Mäuse										
Median	1,1	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1
IQR	1,0-1,2	1,1-1,2	1,1-1,2	0,9-1,1	1,1-1,3	1,0-1,2	1,1-1,3	1,0-1,2	1,1-1,3	1,0-1,2
Min-Max	0,9-1,3	1,0-1,3	0,9-1,4	0,8-1,3	1,0-1,4	0,9-1,5	1,0-1,3	0,8-1,3	0,7-1,7	0,9-1,3

Alle Messwerte angegeben als %ID; Schlafphase=SP, Wachphase=WP

4.2.1. Der Schilddrüsenuptake in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter

Generell zeigten weibliche Mäuse mit 1,6 %ID ([1,5-1,8] 0,8-2,3) einen signifikant höheren $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake ($p < 0,001$) als männliche Tiere mit 1,1 %ID ([1,1-1,2] 0,7-1,7).

Dieser geschlechtsbezogene Unterschied war in fast allen Altersstufen der Mäuse sichtbar (s. Abbildung 17). Es zeigte sich ein signifikant höherer Uptake der weiblichen Mäuse im Vergleich zu den männlichen Tieren im Alter von 1 bis 12 Monaten ($p < 0,001$). Im Alter von 1 Monat war der Uptake von weiblichen Mäusen mit 1,6 %ID ([1,5-1,6] 0,9-2,1) höher als bei den männlichen Tieren mit 1,1 %ID ([1,1-1,3] 0,9-1,3). Im Alter von 3 Monaten zeigten weibliche Mäuse einen Uptake von 1,7 %ID ([1,4-1,8] 1,2-2,0) und männliche Tiere von 1,1 %ID ([1,0-1,2] 0,8-1,4). Weibliche Mäuse im Alter von 6 Monaten wiesen einen Schilddrüsenuptake von 1,8 %ID ([1,7-2,0] 1,1-2,3), männliche Tiere einen Schilddrüsenuptake von 1,2 %ID ([1,1-1,3] 0,9-1,5) auf. Im Alter von 12 Monaten lag der Uptake bei 1,6 %ID ([1,5-1,7] 1,2-1,9) bei weiblichen Mäusen und bei 1,2 %ID ([1,1-1,2] 0,8-1,3) bei männlichen Tieren. Danach fiel der Schilddrüsenuptake der weiblichen Mäuse auf das Niveau der männlichen Tiere ab. Im Alter von 24 Monaten zeigten weibliche Mäuse (1,1 %ID [1,1-1,3] 0,8-1,7) keinen signifikant höheren Uptake mehr ($p = 0,928$) im Vergleich zu den männlichen Tieren (1,1 %ID [1,1-1,2] 0,7-1,7).

Die Veränderung des Schilddrüsenuptakes im Altersverlauf getrennt nach Geschlecht der Mäuse wird nochmals in Abbildung 18 verdeutlicht. Weibliche Mäuse zeigten im Verlauf von 1 bis 24 Monaten eine Tendenz zu einem variierenden Uptake mit dem Alter ($p = 0,056$). Mit 6 Monaten war bei weiblichen Mäusen der höchste Uptake von 1,8 %ID erreicht. Im weiteren Altersverlauf verringerte sich ihr Schilddrüsenuptake signifikant bis zum Alter von 12 Monaten ($p = 0,02$) und fiel weiter auf das Niveau der männlichen Mäuse im Alter von 24 Monaten ($p = 0,048$). Im Vergleich zu den weiblichen Tieren war bei den männlichen Mäusen kein relevanter Einfluss des Alters auf den Schilddrüsenuptake sichtbar ($p = 0,267$).

4 Ergebnisse

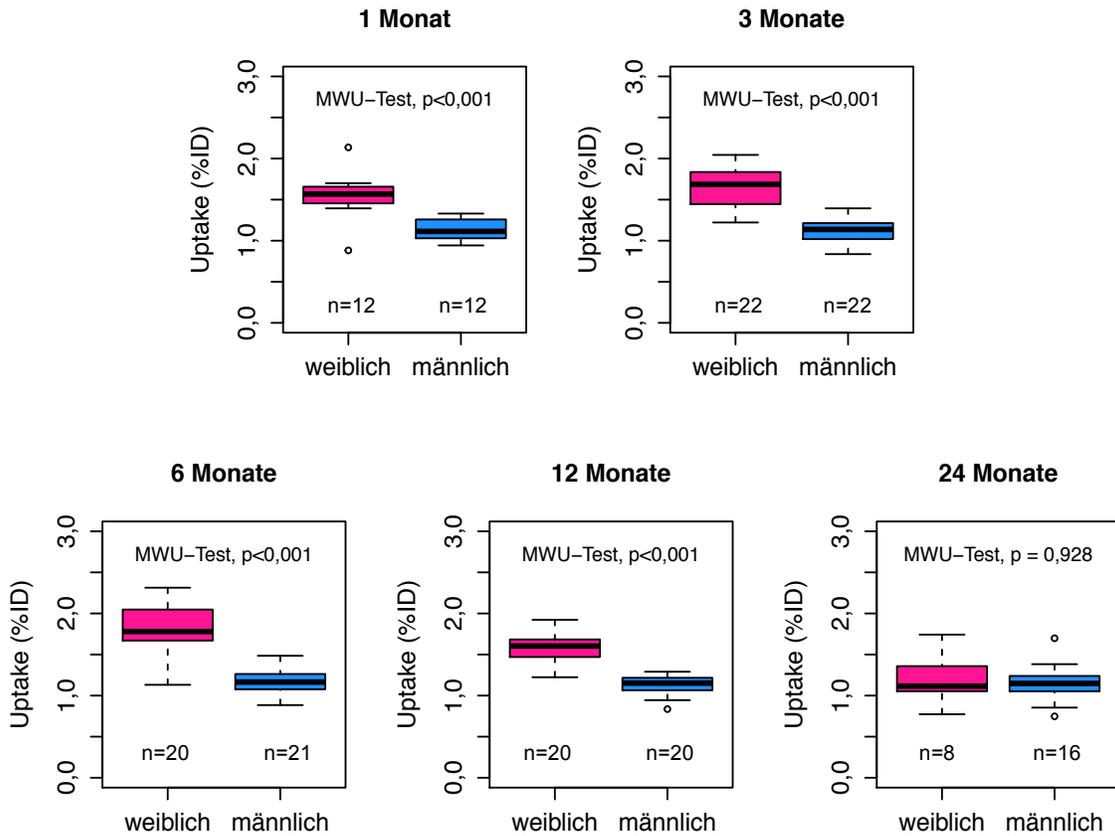


Abbildung 17: Schilddrüsenuptake in Bezug zum Geschlecht

Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake von weiblichen und männlichen Mäusen im Vergleich. Im Alter von 1, 3, 6, 12 und 24 Monaten.

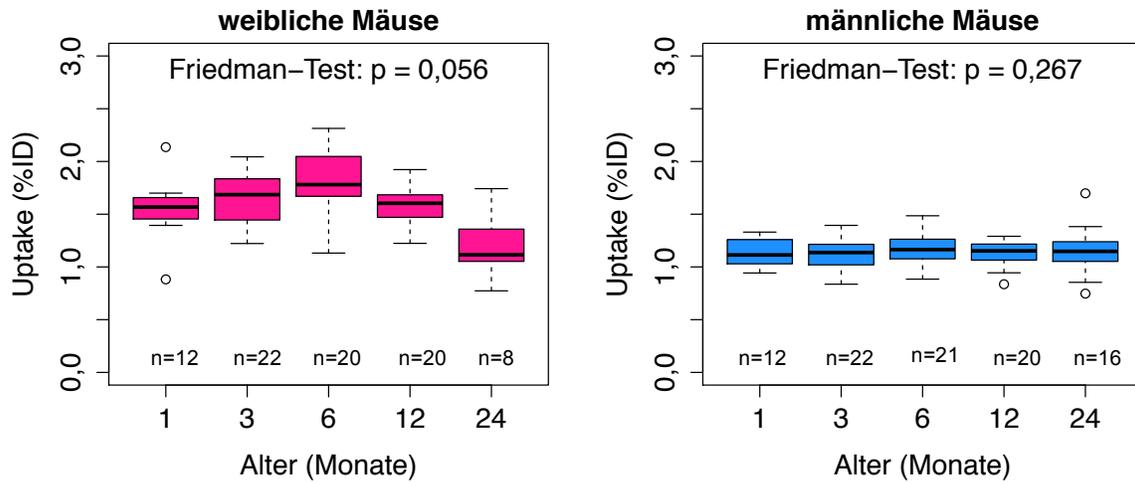


Abbildung 18: Schilddrüsenuptake im Altersverlauf

Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake im Altersverlauf von 1 bis 24 Monaten getrennt nach Geschlecht der Mäuse.

4.2.2. Der Schilddrüsenuptake in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus

Wurden die jeweiligen Werte der weiblichen sowie männlichen Mäuse der gesamten Untersuchungszeit von 24 Monaten zusammengefasst, zeigte sich ein geschlechtsabhängiger Effekt des circadianen Rhythmus (s. Abbildung 19). Bei den altersgepoolten Daten der weiblichen Mäusen zeigte der circadiane Rhythmus keinen signifikanten Effekt auf den $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake ($p = 0,651$). In der Schlafphase (SP) hatten weibliche Mäuse einen maximalen Schilddrüsenuptake von 1,6 %ID ([1,5-1,7] 0,8-2,3). In der Wachphase (WP) zeigten sie

4 Ergebnisse

einen Uptake von 1,7 %ID ([1,4-1,8] 1,0-2,2). Bei den männlichen Mäusen dahingegen zeigte der circadiane Rhythmus einen signifikanten Einfluss auf den Schilddrüsenuptake ($p = 0,02$). Jedoch lag die Differenz zwischen der SP mit 1,2 %ID ([1,1-1,3] 0,7-1,7) und der WP mit 1,1 %ID ([1,0-1,2] 0,8-1,5) bei nur 0,1 %ID.

Die in Tabelle 2 aufgeführten maximalen Werte des $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptakes zeigten jedoch in keiner Altersstufe einen signifikanten Einfluss des circadianen Rhythmus auf den Schilddrüsenuptake, weder bei weiblichen noch bei männlichen Mäusen. Grafisch wird dies in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt.

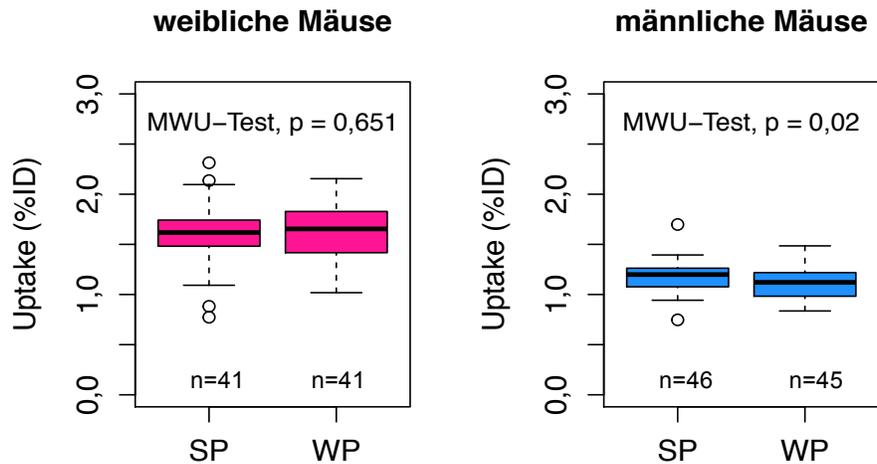


Abbildung 19: Schilddrüsenuptake in Bezug zum circadianen Rhythmus

Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake aller Altersstufen zusammengefasst in Bezug zum circadianen Rhythmus bei weiblichen und männlichen Mäusen (Schlafphase=SP; Wachphase=WP).

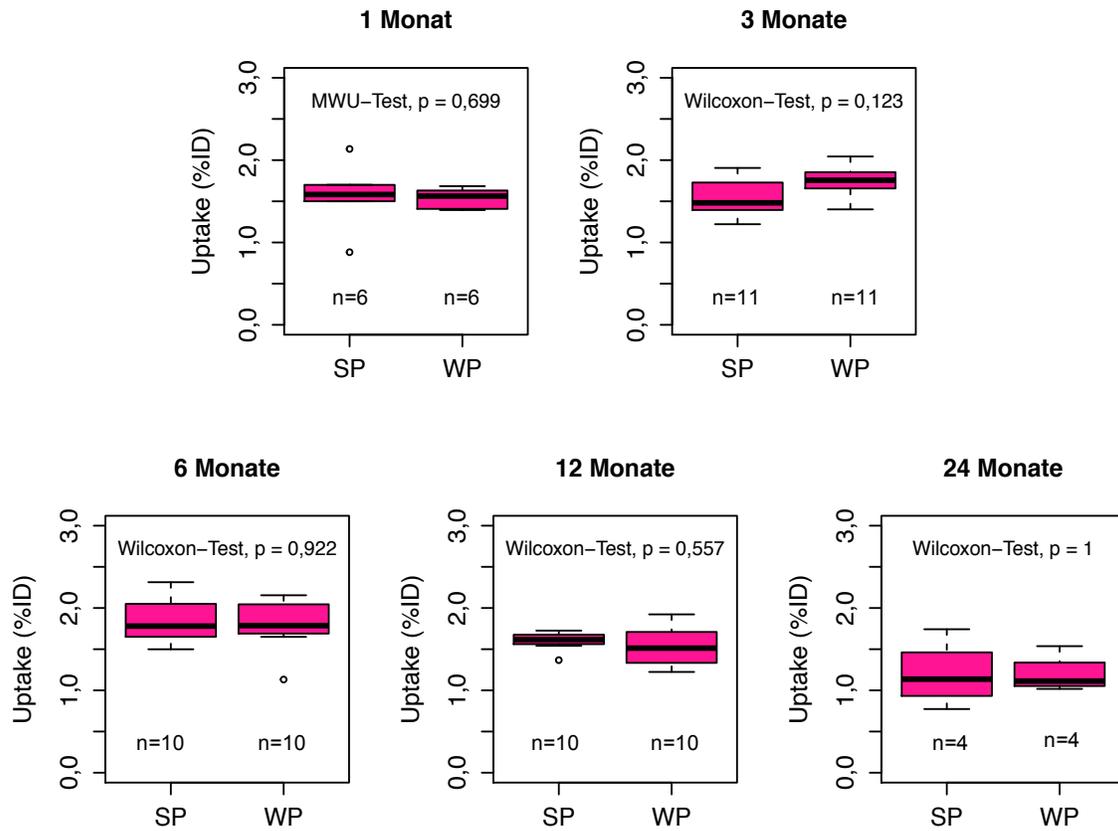


Abbildung 20: Schilddrüsenuptake in Bezug zum circadianen Rhythmus bei weiblichen Mäusen

Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus bei weiblichen Mäusen in unterschiedlichen Altersstufen (SP=Schlafphase; WP=Wachphase).

4 Ergebnisse

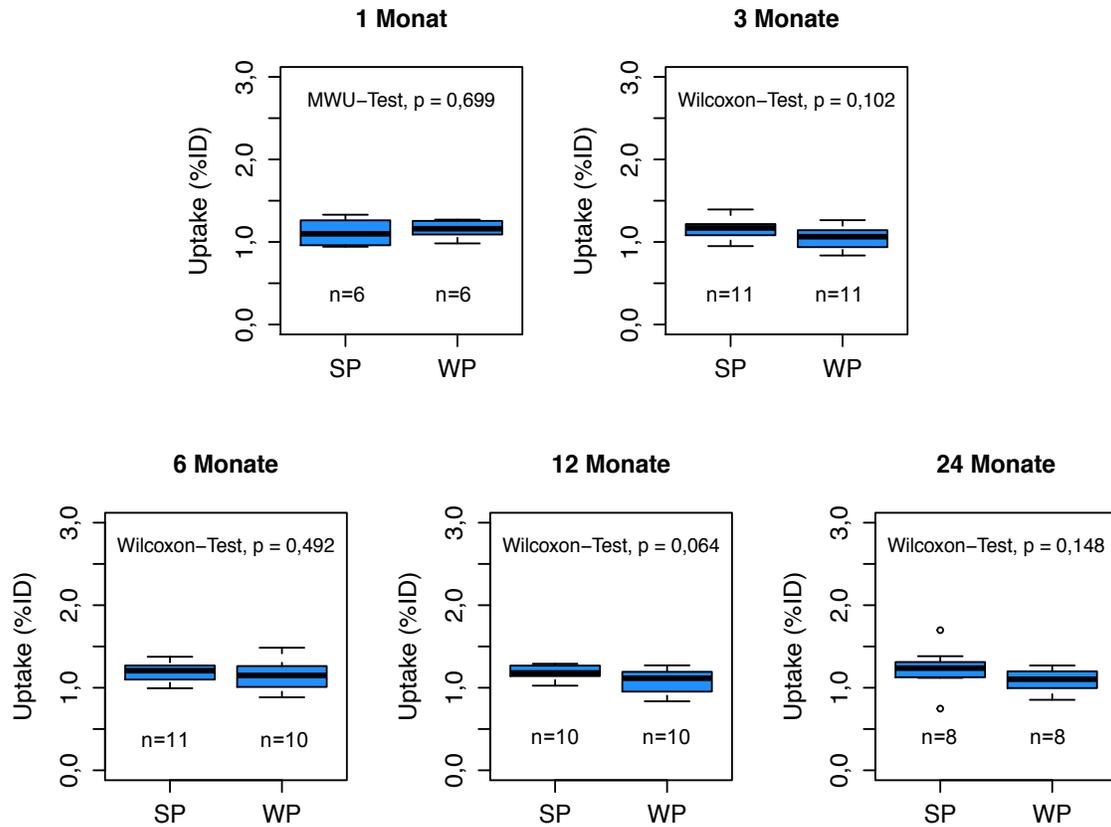


Abbildung 21: Schilddrüsenuptake in Bezug zum circadianen Rhythmus bei männlichen Mäusen

Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus bei männlichen Mäusen in unterschiedlichen Altersstufen (SP=Schlafphase; WP=Wachphase).

4.3. Szintigraphisches Schilddrüsenvolumen

Das szintigraphische Organvolumen der Schilddrüse zeigte geschlechtsspezifische Unterschiede bei den C57BL/6N Mäusen. Generell zeigten männliche Mäuse mit $13,9 \text{ mm}^3$ ([12,7-15,2] 10,4-21,0) ein signifikant höheres Organvolumen ($p < 0,001$) als weibliche Mäuse mit $12,7 \text{ mm}^3$ ([11,8-13,5] 10,2-14,9).

Unter Einbeziehung des Körpergewichts hatten weibliche Mäuse mit $0,51 \text{ mm}^3/\text{g}$ ([0,40-0,62] 0,29-0,99) ein signifikant höheres relatives Organvolumen ($p < 0,01$) im Vergleich zu männlichen Mäusen mit $0,45 \text{ mm}^3/\text{g}$ ([0,39-0,50] 0,29-0,75).

Im Alter von 1 bis 3 Monaten stieg das Schilddrüsenvolumen bei weiblichen Tieren signifikant an ($p = 0,04$), von $11,8 \text{ mm}^3$ ([11,4-12,6] 10,3-14,0) auf $12,8 \text{ mm}^3$ ([12,0-13,8] 10,2-14,9). Anschließend waren bis zum Alter von 24 Monaten keine relevanten Veränderungen im Volumen der weiblichen Mäuseschilddrüse messbar ($12,9 \text{ mm}^3$ ([11,7-13,9] 11,0-14,7; $p = 0,8$). Im Hinblick auf das Organvolumen in Bezug zum Körpergewicht zeigte sich bei weiblichen Mäusen ein signifikanter Abfall ($p < 0,001$) von $0,76 \text{ mm}^3/\text{g}$ ([0,71-0,83] 0,64-0,99) im Alter von 1 Monat auf $0,35 \text{ mm}^3/\text{g}$ ([0,34-0,41] 0,29-0,52) im Alter von 12 Monaten. Danach lag bis zum Alter von 24 Monaten keine signifikante Veränderung des Schilddrüsenvolumens vor ($p = 0,5$). Im Altersverlauf zeigte das Schilddrüsenvolumen bei den weiblichen Mäusen keine signifikante Korrelation mit dem Körpergewicht ($\rho = 0,15$; $p = 0,17$).

Auch die Schilddrüsen von männlichen Tieren unterlagen einer signifikanten Zunahme des Volumens ($p < 0,01$) zwischen dem 1. Lebensmonat ($11,1 \text{ mm}^3$ [10,9-12,4] 10,4-13,4) und dem 3. Lebensmonat ($13,1 \text{ mm}^3$ [12,7-14,1] 11,8-16,7). Im Vergleich zu weiblichen Mäusen stieg das Schilddrüsenvolumen bei männlichen Tieren ab dem Alter von 3 Monaten weiter signifikant an ($p = 0,046$) bis es im Alter von 12 Monaten das maximale Organvolumen von $14,8 \text{ mm}^3$ ([14,2-15,6] 11,9-18,3) erreichte. Bis zum Alter von 24 Monaten fand keine weitere

4 Ergebnisse

Volumenänderung statt ($14,8 \text{ mm}^3$ [$13,4-17,7$] $12,2-21,0$; $p = 0,77$). Im Hinblick auf das Schilddrüsenvolumen in Bezug zum Körpergewicht bei männlichen Mäusen zeigte sich ein signifikanter Abfall ($p < 0,001$) von $0,61 \text{ mm}^3/\text{g}$ ($[0,59-0,68]$ $0,52-0,75$) im Alter von 1 Monat auf $0,42 \text{ mm}^3/\text{g}$ ($[0,39-0,45]$ $0,36-0,51$) im Alter von 6 Monaten. Bis zum Alter von 24 Monaten fand keine signifikante relative Volumenänderung statt ($p = 0,88$). Im Gegensatz zu den weiblichen Mäusen zeigten männliche Tiere im Altersverlauf eine signifikante Korrelation zwischen Schilddrüsenvolumen und Körpergewicht ($\rho = 0,59$; $p < 0,001$).

Da weibliche Mäuse einen generell höheren Schilddrüsenuptake sowie ein vergleichsweise kleineres Schilddrüsenvolumen aufwiesen, verfügten sie über einen signifikant ($p < 0,001$) höheren Uptake pro mm^3 Schilddrüsengewebe ($0,13 \text{ \%ID/mm}^3$ [$0,12-0,14$] $0,05-0,18$) im Vergleich zu männlichen Tieren ($0,08 \text{ \%ID/mm}^3$ [$0,07-0,09$] $0,04-0,13$).

4.4. Längenmessung von Femur und Tibia

Bei den weiblichen Mäusen zeigte der Femur eine Länge von $11,9 \text{ mm}$ ($[11,9-12,2]$ $10,8-12,6$) im Alter von 1 Monat. Die Femurlänge stieg auf $13,6 \text{ mm}$ ($[13,3-13,7]$ $13,0-14,2$) im Alter von 3 Lebensmonaten. Bei der Messung im Alter von 6 Monaten zeigte der Röhrenknochen eine Länge von $13,8 \text{ mm}$ ($[13,6-14,0]$ $13,2-14,2$) und im Alter von 9 Monaten von $13,8 \text{ mm}$ ($[13,7-14,0]$ $13,3-14,2$). Im Alter von 12 Monaten betrug die Knochenlänge ebenfalls $13,8 \text{ mm}$ ($[13,6-13,9]$ $13,5-14,3$). Die Länge der Tibia war im Alter von 1 Monat bei $15,2 \text{ mm}$ ($[15,1-15,8]$ $14,7-16,1$). Sie stieg im Alter von 3 Monaten auf eine Länge von $16,6 \text{ mm}$ ($[16,5-16,7]$ $16,2-16,8$) an. Mit 6 Monaten betrug die Tibialänge $17,0 \text{ mm}$ ($[16,9-17,1]$ $16,4-17,4$).

4 Ergebnisse

Bei den letzten Messungen betrug die Knochenlänge 17,0 mm ([16,9-17,2] 16,8-17,7) im Alter von 9 Monaten und 17,2 mm ([17,1-17,4] 16,8-17,7) im Alter von 12 Monaten.

Bei den männlichen Mäusen stieg der Längenwert des Femurs von 11,8 mm ([11,5-12,0] 11,2-12,1) im Alter von 1 Monat auf 14,0 mm ([13,7-14,3] 13,2-14,5) im Alter von 3 Monaten. Mit 6 Monaten betrug die Knochenlänge 14,0 mm ([13,8-14,6] 13,2-14,7), mit 9 Monaten 14,1 mm ([13,9-14,5] 13,4-14,6) und im Alter von 12 Monaten lag sie bei 14,2 mm ([13,9-14,5] 13,4-14,8). Die Länge der Tibia stieg von 15,4 mm ([15,3-15,6] 15,0-16,1) im Alter von 1 Monat auf 17,0 mm ([17,0-17,1] 16,8-17,6) im Alter von 3 Monaten. Im weiteren Verlauf betrug die Knochenlänge 17,1 mm ([17,1-17,5] 17,0-18,0) im Alter von 6 Monaten, 17,6 mm ([17,2-17,7] 17,0-17,8) im Alter von 9 Monaten und 17,6 mm ([17,4-17,9] 17,2-18,1) bei der letzten Messung im Alter von 12 Monaten.

Das Körpergewicht der Tiere lag bei der Einstellung im Alter von 21 Tagen bei 7,0 g ([7,0-7,8] 7,0-8,0) bei den weiblichen und bei 9,9 g ([9,5-10,4] 9,2-10,5) bei den männlichen Mäusen. Bei weiblichen Mäusen stieg das Gewicht im Altersverlauf an und erreichte sein Maximum im Alter von 18 Monaten mit 35,3 g ([31,6-41,3] 30,8-42,3). Bei den männlichen Mäusen zeigte sich das Maximalgewicht auch im Alter von 18 Monaten mit 41,6 g ([39,8-46,3] 37,9-51,2).

Die Medianwerte der Femur- und Tibialängen sowie der Körpergewichte der Mäuse sind in Abbildung 22 noch einmal grafisch wiedergegeben.

4 Ergebnisse

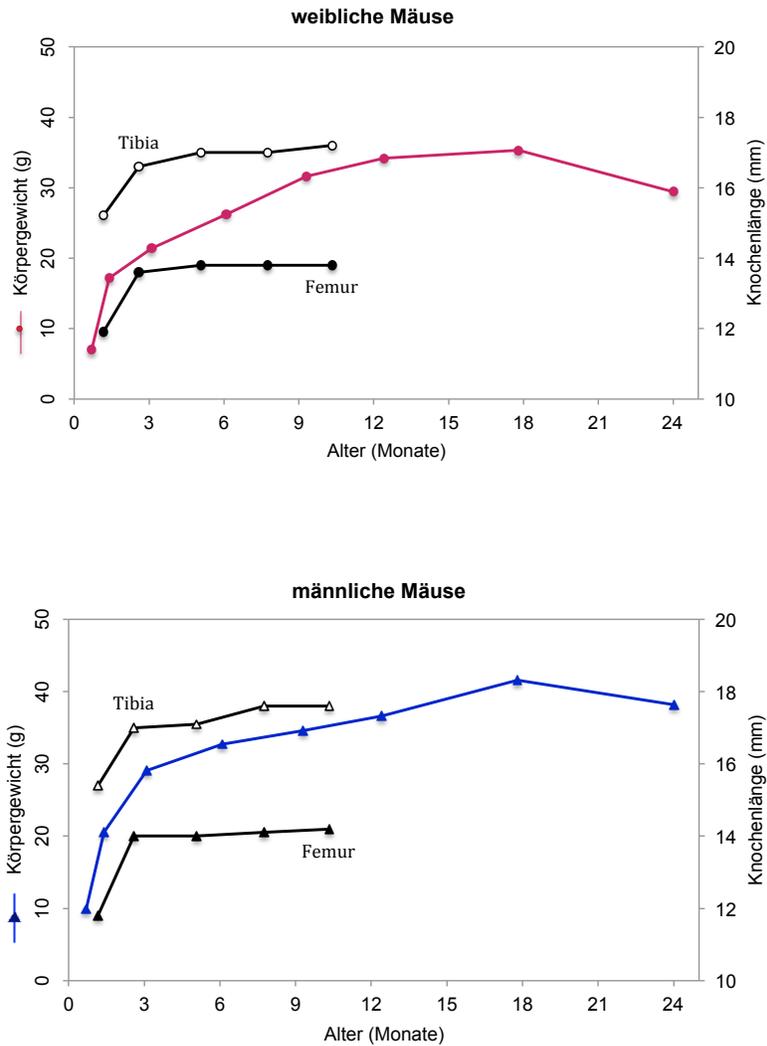


Abbildung 22: Längenwachstum von Femur und Tibia und Körpergewicht

Das Längenwachstum der zwei Röhrenknochen Femur und Tibia bei C57BL/6N-Mäusen im Altersverlauf bei weiblichen und männlichen Tieren. Des Weiteren ist das Körpergewicht der Mäuse im Absetzalter mit 21 Tagen sowie mit 1, 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten getrennt nach Geschlecht abgebildet. Alle Werte sind angegeben als Median.

5 Diskussion

Die Schilddrüse ist ein essentielles Organ im endokrinen System und ihre Morphologie, Funktion im Organismus und pathologischen Veränderungen sind schon lange Gegenstand der klinischen und präklinischen Forschung. Die Etablierung nicht invasiver, bildgebender Verfahren in der Nuklearmedizin, wie der SPECT-Bildgebung, ergaben neue Möglichkeiten der Schilddrüsenuntersuchung in lebenden Objekten. Im Gegensatz zur präklinischen Forschung stehen für die klinische Diagnostik am Menschen etablierte Untersuchungsabläufe und Normwerte zur Verfügung, die eine Charakterisierung der Schilddrüsenfunktion mittels $^{99m}\text{TcO}_4$ anhand der bildlichen Darstellung sowie der Quantifizierung der Organfunktion erlauben. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gab es nur wenige Studien, die sich mit der SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit $^{99m}\text{TcO}_4$ in gesunden Mäusen auseinandersetzten. Und es existiert keine vergleichbare longitudinale Studie, die Daten in diesem Umfang bereitstellt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein umfassender Datenbestand für den $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake bei gesunden C57BL/6N Mäusen über einen Zeitraum von 24 Monaten im Hinblick auf das Geschlecht, das Alter und den circadianen Rhythmus der Tiere erhoben werden. Zudem konnte mit dieser Arbeit ein reproduzierbarer Untersuchungsablauf für die SPECT-Bildgebung der Mausschilddrüse für zukünftige, weiterführende Studien erarbeitet werden.

Bisherige Studien bezüglich des Schilddrüsenuptakes bei Mäusen zeigten sehr heterogene Versuchsanordnungen. Daten wurden gewonnen mittels unterschiedlicher Untersuchungsmethoden, entweder durch *in vivo* Verfahren oder nach Euthanasie des Tieres. Abweichungen zwischen den Studien bestanden auch in der Injektionsart des Radiopharmakons und im folgenden Untersuchungsablauf nach Injektion. Die Anzahl der untersuchten Mäuse variierte und teilweise wurde nur eine geringe Tierzahl untersucht wie in der Arbeit von Zuckier et al. (2004), in der die Zeit-Aktivitätskurve von einer Maus bestimmt wurde. Weiterhin bestanden Unterschiede bezüglich Geschlecht und Alter der Mäuse oder es fehlten betreffende Angaben

(Zuckier et al. 2004; Franken et al. 2010; Brandt et al. 2012; Boschi et al. 2013; Cambien et al. 2014).

In der aktuellen Studie wurden weibliche und männliche Mäuse wiederholt untersucht im Alter von 1 Monat bis zu 24 Monaten sowie in jeder Altersstufe zu zwei unterschiedlichen Tageszeiten. Die Untersuchung erfolgte mit dem NanoSPECT/CTplus für Kleintiere, welches in Kombination mit den verwendeten Multipinhole-Kollimatoren eine Auflösung von 0,7 mm erreicht (Lange et al. 2013). In Bezug auf die Bildauswertung zeigte sich in der aktuellen Arbeit, dass eine quantitative Auswertung der Mausschilddrüse mittels ROI-Technik möglich ist. Trotz der kleinen Organgröße bei der Maus von ca. 1 mm³ (Beekman et al. 2005) und der anatomischen Nähe zu den ^{99m}TcO₄ akkumulierenden Speicheldrüsen in der Halsregion (Brandt et al. 2012) war eine separate Bestimmung des Schilddrüsenuptakes möglich. Die Auswahl der dreidimensionalen VOI im fusionierten Bildverlauf erfolgte bei allen Tieren und allen Einzeluntersuchungen manuell durch eine Person, um den untersucherabhängigen Fehler zu reduzieren. Sowohl eine geringgradige Überschätzung des Organuptakes durch Überlappung der Signale von Schilddrüse und Speicheldrüsen (sogenanntes Spill-over) als auch eine Unterschätzung des Uptakes, der auf mögliche Absorptions- und auflösungsbedingte Streuvorgänge (sogenannte Partialvolumeneffekte) basiert, können nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Deren eventueller Einfluss auf die statistischen Ergebnisse wird aber bei einer Größe der Schilddrüse über der Auflösung als gering angenommen.

Anhand der dynamischen Funktionsszintigraphie der Schilddrüse über eine Aufnahmedauer von 90 min war eine Generierung von Zeit-Aktivitätskurven nach der i. v. Injektion von ^{99m}TcO₄ und somit die Darstellung der Stoffwechselfunktion des Organs bei jeder Maus möglich. Mittels Katheter erfolgte die Injektion in die Schwanzvene der Maus unter Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften. Durch Überprüfung der intravenösen Lage der Kanülenspitze anhand des Rückflusses von venösem Blut in den Katheterschlauch konnte die paravenöse Injektion als

Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Die Injektion von durchschnittlich 80 MBq pro Tier richtete sich einerseits nach der Referenzaktivität in der klinischen Schilddrüsendiagnostik am Menschen (Dietlein et al. 2014b), andererseits nach der niedrigen Sensitivität der hochauflösenden Multipinhole-Kollimatoren. Eine Veröffentlichung von Cambien et al. (2014) zeigte keinen Zusammenhang des Schilddrüsenuptakes (%ID) in Bezug zur injizierten Aktivität von $^{99m}\text{TcO}_4$ bei Mäusen. So lag bei der Injektion von 10 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ der Uptake bei 2,84 %ID und bei der Injektion von 150 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ bei 2,63 %ID. Bezüglich des Stunningeffekts von $^{99m}\text{TcO}_4$ bei wiederholter Schilddrüsenszintigraphie konnte von Cambien et al. (2014) nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit des Organs zur $^{99m}\text{TcO}_4$ -Akkumulation bei der Maus ungestört ist bei Einhaltung einer 4-tägigen Pause zwischen den Untersuchungen. Abhängig ist der Stunningeffekt von der verabreichten Energiedosis. Bei Verwendung von $^{99m}\text{TcO}_4$ lag ein Stunningeffekt bei einer absorbierten Aktivitätsdosis von über 20 Gray vor, was der Injektion von ca. 150 MBq entspricht. Daher ist abgesehen von der anzustrebenden Reduktion der injizierten Aktivität aus Strahlenschutzgründen auch die Vermeidung des möglichen Stunningeffekts und somit eines reduzierten Uptakes bei einer wiederholten Schilddrüsenszintigraphie bei der Maus mit $^{99m}\text{TcO}_4$ ratsam.

Die ermittelten Zeit-Aktivitätskurven in dieser Arbeit bildeten einen raschen Anstieg im Schilddrüsenuptake nach i. v. Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$ ab. Der Zeitpunkt des maximalen Uptakes (t_{\max}) trat 8 bis spätestens 43 min nach Injektion ein. Daran wird deutlich, dass die Injektion vor der Positionierung der Maus im SPECT/CT-Gerät erfolgen kann. Die breite Streuung des Zeitpunkts des maximalen Uptakes empfiehlt eine Untersuchung der Maus beginnend ca. 5 min nach Injektion sowie eine Aufnahmedauer von 60 min bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden SPECT-Aufnahmen von je 10 min Dauer. Dieser Untersuchungsablauf erlaubt eine zuverlässige Bestimmung des maximalen Schilddrüsenuptakes bei jeder Maus, ungeachtet von Geschlecht, Alter oder circadianem Rhythmus. Eine weitere Verkürzung der Untersuchungszeit könnte zur Folge haben, dass der maximale Schilddrüsenuptake nicht bei jeder Maus erfasst

werden würde und somit ein intra- sowie interindividueller Vergleich des Uptakes nicht möglich wäre. Bisher liegen nur wenige Veröffentlichungen vor, die Zeit-Aktivitätskurven bei der Maus dokumentierten. Zuckier et al. (2004) zeigten nach intravenöser Injektion von 18 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ anhand einer Zeit-Aktivitätskurve einen stetig ansteigenden Schilddrüsenuptake über 60 min. Jedoch wurde der weitere Verlauf nicht dokumentiert und es wurde lediglich eine Maus untersucht. Dagegen konnten Franken et al. (2010) an 9 Mäusen nach intraperitonealer Injektion von 250-300 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ nachweisen, dass der maximale Uptake innerhalb der ersten 20 bis 40 min nach Injektion erreicht wurde. Dieser schnelle Anstieg im Schilddrüsenuptake entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auch Cambien et al. (2014) konnten einen ähnlichen Verlauf mit dem Erreichen des maximalen Uptakes innerhalb der ersten 60 min nach intraperitonealer Injektion von 150 MBq nachweisen, obwohl davon auszugehen ist, dass die intraperitoneale Injektion im Vergleich zur intravenösen Injektion eine langsamere Verteilungsgeschwindigkeit im Organismus bewirkt (Dülsner et al. 2017a).

Die Auswertung des maximalen Schilddrüsenuptakes in dieser Studie ergab geschlechtsunabhängig einen Uptake von 1,3 %ID ([1,1-1,6] 0,7-2,3) bei der C57BL/6N Maus. Dieser Uptake ist vergleichbar zu anderen *in vivo* Studien an Mäusen. Franken et al. (2010) bestimmte einen Schilddrüsenuptake von $1,9 \pm 0,6$ %ID und die Messungen von Brandt et al. (2012) ergaben schätzungsweise einen Uptake von 1 bis 3 %ID. Auch dem $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake von klinisch euthyreoten Menschen mit 0,5 bis 2,0 %ID ähnelt das Ergebnis der aktuellen Studie (Dietlein 2017). Cambien et al. (2014) bestimmten mit $2,6 \pm 0,35$ %ID bis $2,84 \pm 0,63$ %ID einen höheren Schilddrüsenuptake bei Mäusen. Wie in der aktuellen Studie erfolgte eine Auswertung der SPECT-Aufnahmen mittels ROI-Technik, jedoch ist keine Abbildung einer positionierten ROI einsehbar. Eine mögliche Überschätzung des Schilddrüsenuptakes durch eine Überlappung der Signale mit den umliegenden Speicheldrüsen kann somit für die Studie von Cambien et al. (2014) nicht ausgeschlossen werden.

Im Hinblick auf das Geschlecht zeigte sich in der vorliegenden Studie bei weiblichen Mäusen ein signifikant höherer Schilddrüsenuptake. Männliche Mäuse zeigten einen geringeren Uptake ungeachtet von dem in der Literatur beschriebenen höheren TSH-Wert bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Tieren (Pohlenz et al. 1999; Choksi et al. 2003; Marassi et al. 2007). Brandt et al. (2012) konnten keinen signifikanten Einfluss des Geschlechts auf den Schilddrüsenuptake bei der SPECT-Untersuchung von FVB/N Mäusen feststellen. Jedoch basierte diese Bewertung auf der Untersuchung einer geringen Stichprobengröße, die maximal drei Mäuse des gleichen Geschlechts pro Untersuchungszeitpunkt umfasste. In anderen Studien wurde lediglich ein Geschlecht untersucht oder es fehlte die Geschlechtsangabe bei den Mäusen (Zuckier et al. 2004; Franken et al. 2010; Boschi et al. 2013; Cambien et al. 2014).

Verantwortlich für den gemessenen geschlechtsspezifischen Unterschied im Schilddrüsenuptake ist vermutlich der Einfluss der weiblichen Sexualhormone. Schon im Alter von 1 Monat zeigte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Schilddrüsenuptake. In dieser Altersphase werden die Mäuse geschlechtsreif und bei weiblichen Tieren führt die gesteigerte Freisetzung des Gonadotropin-Releasing-Hormons zu einer Stimulation der Hypophysen-Gonaden-Achse mit einhergehender Steigerung der Sexualhormone (Mayer et al. 2010). Bei adulten Tieren und dem Mensch besteht eine vielfältige Verknüpfung zwischen dem thyreotropen Regelkreis und dem weiblichen Reproduktionssystem. Das Ovar ist, wie die Schilddrüse, im Stande Iod aus dem Blutkreislauf aufzunehmen. Die Iodkonzentration im Eierstock ist höher als in allen anderen Organen im Körper, mit Ausnahme der Schilddrüse. Die Konzentration kann schwanken und ist höher im Stadium des Follikelwachstums im Vergleich zur präpubertären Phase oder der Postmenopause. Beim Mensch und der Maus konnte bereits die Expression der NIS mRNA im Ovar nachgewiesen werden (Slebodzinski 2005). Der NIS kommt bei der Frau im Oberflächenepithel des Ovars und dem Eileiter vor. Bei der Ratte konnte eine gesteigerte Radioiodaufnahme im Ovar und dem Eileiter vom Metöstrus bis zum frühen Proöstrus nachgewiesen werden. Eine abfallende Aufnahme von Radioiod zeigte sich im späten Proöstrus bis zum

Östrus (Riesco-Eizaguirre et al. 2014). Die zunehmende Aufnahme von Radioiod geht einher mit einem steigenden Östradiolwert im Proöstrus, den Ayala et al. (2013) bei der weiblichen Ratte nachweisen konnten. Der NIS vermittelt die Iodaufnahme im Reproduktionssystem und seine Expression befindet sich, wie der Sexualzyklus auch, unter hormonaler Regulation. So steigert Östrogen über den Östrogenrezeptor-alpha die Transkription des NIS im Ovar. Die Regulation der NIS Expression im Zyklusverlauf könnte auch von Bedeutung sein für seine Expression in anderen Geweben wie der Schilddrüse (Riesco-Eizaguirre et al. 2014). Eine weitere Verknüpfung zwischen der Schilddrüse und dem Ovar besteht durch den Nachweis von Schilddrüsenhormonen in der Follikelflüssigkeit des Ovars bei der Frau in gleicher Konzentration wie im Serum. Zudem konnte in Granulosazellen von präovulatorischen Follikeln und in Stromazellen des Ovars die Expression von alpha- und beta-mRNA des Schilddrüsenhormonrezeptors nachgewiesen werden, was eine zentrale Rolle der Schilddrüsenhormone in der Physiologie des Ovars erkennen lässt (Wakim et al. 1993; Wakim et al. 1994). Slobodzinski (2005) fanden das Enzym 5'-Deiodinase in der Follikelflüssigkeit von Hasen, Stuten und Sauen. Dieses Enzym ist in der Lage, im Ovar das Schilddrüsenhormon T_3 (ovary-born T_3) durch Außenringdeiodierung aus T_4 zu generieren. Somit könnte das ovary-born T_3 anteilig zu dem gemessenen T_3 -Wert im Ovar beitragen. In Stuten konnte zudem eine mit dem Zyklus schwankende Enzymaktivität und schwankende T_3 -Spiegel in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Sie waren in der Phase der Ovulation höher gegenüber anderen Zyklusphasen. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass das ovary-born T_3 möglicherweise Einfluss nimmt auf die Follikelreifung im Ovar. Aghajanova et al. (2009) konnten in den Granulosazellen der Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien den TSH-Rezeptor in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisen. Dies deutet auf eine variierende Ansprechbarkeit der Follikel in verschiedenen Stadien der Follikelreifung hin. Monteleone et al. (2017) konnten zum ersten Mal das Enzym Thyreoperoxidase aus den Cumuluszellen des humanen Ovars isolieren. Das Enzym spielt eine wichtige Rolle für den Einbau von Iod in Thyreoglobulin und somit für die Synthese der Schilddrüsenhormone. Die

Expression des Enzyms wird durch TSH gesteigert, für das auch die Granulosazellen sensibel sind. Durch Anfärben der Zellen zeigte sich ein Thyreoperoxidasevorkommen in über 80 % des Cytoplasmas, was die bedeutende Rolle des Enzyms im Ovar aufzeigt. Auf Ebene der Schilddrüse gingen Lima et al. (2006) davon aus, dass Östradiol einen Einfluss auf das Organ nimmt und eine direkt modulierende Wirkung auf die Schilddrüsenfunktion hat. Die Existenz von Östrogenrezeptoren in der Schilddrüse konnten bei der Frau und der Ratte nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten einen Einfluss von Östradiol auf die Expression von Genen, die wichtige Proteine in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone kodieren. Zum einen vom NIS und zum anderen von dem Enzym Thyreoperoxidase.

Diese sich gegenseitig verstärkenden Interaktionen zwischen Ovar und Schilddrüse würden den in dieser Arbeit nachgewiesenen, signifikant höheren Schilddrüsenuptake bei weiblichen Mäusen gegenüber männlichen Tieren bis zu einem Alter von 12 Monaten erklären. Bei Mäusen mit 24 Monaten zeigte sich kein geschlechtsspezifischer Einfluss mehr und der Schilddrüsenuptake der weiblichen Mäuse sank auf das Niveau der männlichen Tiere. Zudem zeigte sich im Altersverlauf bei weiblichen Mäusen ein signifikant sinkender Uptake bereits ab dem Alter von 6 Monaten. Zu erklären sind diese Ergebnisse mit den physiologischen Veränderungen im Reproduktionssystem der weiblichen Maus im Alterungsprozess. Es kommt zu einer Abnahme der Ovarialfollikel und zu Veränderungen im Zyklusverlauf (Diaz Brinton 2012). Mit ca. 9 Monaten beginnt die charakteristische Abnahme der Zyklusfrequenz bei C57B/6N Mäusen (Nelson et al. 1982). Ungefähr zwischen dem 11. und 16. Lebensmonat treten die Mäuse in einen azyklischen Zustand ein (Felicio et al. 1984). Der zirkulierende Östrogenwert sinkt und der Wert des luteinisierenden Hormons steigt auf das Niveau von ovariectomierten Tieren (Gee et al. 1983).

Ob und inwieweit der sinkende Schilddrüsenuptake bei weiblichen Mäusen auch in Zusammenhang mit histologischen Veränderungen des Organs steht, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Studer et al. (1978) beschreiben den Beginn einer histologischen und funk-

tionalen Veränderung der Schilddrüsenfollikel bei der weiblichen Maus ab dem Alter von 5 Monaten. Und Chai et al. (1964) konnten im Alter von 7,5 bis 9,5 Monaten einen Rückgang in der Schilddrüsenaufnahme von Radioiod bei der Maus feststellen. Jedoch erfolgte leider keine geschlechtsspezifische Auswertung der Ergebnisse. In der Humanmedizin treten bekanntlich Schilddrüsenerkrankungen wie Schilddrüsenkrebs häufiger bei der Frau als beim Mann auf und das vorwiegend in der Lebensphase zwischen Pubertät und Menopause. Das vermehrte Auftreten beim weiblichen Geschlecht in diesem Lebensabschnitt legt den Einfluss von Östrogenen auf die Entstehung von Schilddrüsenpathologien nahe. Beide Östrogenrezeptoren (alpha und beta) konnten sowohl in normalem als auch in verändertem Schilddrüsengewebe sowie in den meisten Krebszelllinien bei der Frau nachgewiesen werden (Santin und Weber Furlanetto 2011). Auch bei der Maus wurden Pathologien der Schilddrüse wie inflammatorische und neoplastische Veränderungen vermehrt bei weiblichen Tieren beobachtet (Ward et al. 1979; Frith und Heath 1984; Haines et al. 2001). Interessant wäre vor diesem Hintergrund in weiterführenden Studien eine mit dem Versuchsende einhergehende histopathologische Untersuchung der Schilddrüse.

Neben dem höheren Schilddrüsenuptake bei weiblichen Mäusen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auch eine größere Streubreite des Uptakes in vergleichbaren Altersgruppen im Gegensatz zu männlichen Tieren. Dieses Ergebnis kann wahrscheinlich auch auf den Einfluss des weiblichen Zyklus zurückgeführt werden. Bei der Sau, Kuh und weiblichen Labortieren beschreibt Slebodzinski (1994) eine divergierende Schilddrüsenaktivität innerhalb des sexuellen Zyklus. Bei euthyreoten Ratten wurden neben einem variierenden Östradiolwert auch schwankende TSH-Werte mit dem Zyklusverlauf beobachtet (Ayala et al. 2013). TSH wiederum regt die Expression sowie Aktivität des Ionenkanals Pendrin und des NIS in der Schilddrüse an, dem eine Schlüsselrolle im Schilddrüsenstoffwechsel zukommt (Spitzweg und Morris 2002) und der die Grundlage für die Schilddrüsenszintigraphie darstellt. Um Schwankungen im Schilddrüsenuptake bei der Maus mit dem weiblichen Zyklus näher bestimmen zu können, wäre es

von Interesse in weiterführenden Arbeiten eine Zyklusbestimmung durchzuführen, um die Untersuchungen entsprechend zuordnen zu können. Aufgrund des geringen Blutvolumens der Maus von ca. 6,6 % des Körpergewichts ist eine regelmäßige Blutabnahme in ausreichender Menge zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen nicht möglich (Dülsner et al. 2017b). Alternativ wäre als Verfahren zur Bestimmung des murinen Zyklusstandes die Vaginalzytologie geeignet (McLean et al. 2012).

Im Vergleich zu den weiblichen Mäusen zeigten die männlichen Tiere einen signifikant niedrigeren Schilddrüsenuptake. Neben dem fehlenden Einfluss der weiblichen Sexualhormone könnte ein möglicher weiterer Grund dafür erhöhter Stress bei männlichen Mäusen sein. Stress hemmt die TSH-Sekretion durch den Einfluss von Glucocorticoiden auf das zentrale Nervensystem und somit die Schilddrüsenfunktion (Ranabir und Reetu 2011). Die Gruppenhaltung der männlichen Mäuse, die in der Natur territorial leben, kann zu Rangauseinandersetzungen und zu chronisch psychosozialen Stress führen (Busch et al. 2014). Zudem zeigte sich bei männlichen Mäusen im Gegensatz zu weiblichen Tieren ein stabiler Schilddrüsenuptake, ohne signifikante Schwankungen zwischen den Altersstufen. Auch im senilen Alter von 24 Monaten waren keine Veränderungen im Uptake messbar. Zurückzuführen ist dieser Umstand womöglich auf den stabilen Plasmawert von Testosteron im Verlauf des Lebens und der nicht zwangsläufigen Rückbildung der Gonaden im Alter (Finch et al. 1977; Finch et al. 1984).

Im Hinblick auf den circadianen Rhythmus der Mäuse zeigte sich nur bei männlichen Tieren ein signifikanter Einfluss auf den Schilddrüsenuptake. In der Schlafphase bestand ein geringgradig höherer Uptake gegenüber der Wachphase. Dieser Unterschied stimmt überein mit dem circadianen Verlauf von TSH, den Jordan et al. (1980) an männlichen Ratten nachweisen konnte. Der Höhepunkt der gemessenen TSH-Werte lag in der Mittagszeit gefolgt von einem Maximum der Schilddrüsenhormone 1,5 bis 2,2 Stunden später. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Differenz im Schilddrüsenuptake bei männlichen Mäusen betrug lediglich 0,1 %ID und somit

weniger als 10 % des totalen Uptakes. Wahrscheinlich besteht durch die geringe Differenz nur eine begrenzte Relevanz für die Interpretation der Daten. Interessanterweise konnte bei weiblichen Mäusen kein signifikanter Einfluss des circadianen Rhythmus nachgewiesen werden. Vermutlich lässt sich diese Beobachtung auf die größeren Schwankungen im individuellen Uptake zurückführen, die einen evtl. geringen Einfluss des circadianen Rhythmus auf den Schilddrüsenuptake unentdeckt lassen. Obwohl ein circadianer Einfluss bei weiblichen Mäusen im Vergleich zu dem beobachteten Effekt bei männlichen Tieren nicht wahrscheinlich oder nur sehr gering scheint, kann dieser nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Im Hinblick auf den Untersuchungsablauf bei Mäusen kann der circadiane Rhythmus jedoch als einflussnehmender Faktor vernachlässigt werden.

Die Ergebnisse der szintigraphischen Volumetrie zeigten einen geschlechtsbezogenen Unterschied im Volumen der Schilddrüse. Männliche Mäuse hatten ein signifikant größeres Volumen im Vergleich zu weiblichen Tieren, wohingegen unter Einbeziehung des Körpergewichts die weiblichen Mäuse allgemein ein höheres relatives Volumen der Schilddrüse aufwiesen. Beide Volumina zeigten somit eine gegenläufige Tendenz. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien aus der Human- und Veterinärmedizin überein, die einen Zusammenhang zwischen dem Organvolumen und dem Körpergewicht sowie dem Geschlecht bei unterschiedlichen Spezies herstellen konnten (Hegedus et al. 1983; Hegedus 1990; Schmidt 1998; Gomez et al. 2000; Reese 2002; Sari et al. 2003; Bailey et al. 2004; Brömel et al. 2006). Während bei den männlichen Mäusen das Schilddrüsenvolumen mit dem Alter zunahm, blieb der Schilddrüsenuptake konstant. Umgekehrt lag eine Tendenz zum schwankenden Schilddrüsenuptake bei weiblichen Mäusen in unterschiedlichen Altersstufen vor, während das Schilddrüsenvolumen ab dem 3. Lebensmonat nahezu unverändert blieb. Insofern ließ sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Schilddrüsenuptake und dem Organvolumen feststellen. Das bekräftigt Russfield (1967), der keinen Zusammenhang zwischen Organvolumen und Schilddrüsenfunktion bei der Maus vermutete. Da die Volumetrie der Schilddrüse in der aktuellen Studie szintigraphisch erfolgte,

führte die Volumenbestimmung aufgrund des Partialvolumeneffekts zu einer Überschätzung der Volumina. Mancini et al. (2009) ermittelten das Schilddrüsenvolumen in lebenden C57B/6N Mäusen mittels Sonographie. Das Volumen bei einer adulten Maus lag zwischen 2,1 und 4,9 μl und war somit wesentlich geringer als das in der vorliegenden Studie bestimmte Organvolumen von durchschnittlich 10 bis 15 μl . Dennoch lässt die Auswertung der aktuellen Arbeit Rückschlüsse auf Änderungen des Schilddrüsenvolumens zu und ermöglicht einen Vergleich zwischen den Geschlechtern und den unterschiedlichen Altersstufen, da es sich um einen methodenbedingten systematischen Fehler handelt, der alle Volumina gleichermaßen betrifft. In weiterführenden Studien wäre es ratsam in Bezug auf die Volumetrie der Schilddrüse und der Bestimmung des Uptakes pro mm^3 Schilddrüsenewebe die Größe des Organs mit einer Untersuchungsmethode zu erfassen, die über eine größere Genauigkeit verfügt. Als geeignete bildgebende Verfahren kommen die Sonographie oder die Magnetresonanztomographie in Frage (Schlogl et al. 2001; van Isselt et al. 2003).

Letzendlich konnte die Längenmessung der beiden Röhrenknochen Femur und Tibia der Hinterextremität der weiblichen und männlichen C57BL/6N Maus zeigen, dass das größte Wachstum zwischen dem 1. und 6. bzw. 9. Lebensmonat erfolgt. Das Körpergewicht der Mäuse zeigte zwischen der ersten Messung am 21. Lebenstag und dem 6. Lebensmonat einen ebenso starken Anstieg. Im weiteren Altersverlauf stieg das Körpergewicht, im Gegensatz zum Längenwachstum, weiter stark an und erreichte im Alter von 18 Monaten sein Maximum bei beiden Geschlechtern. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Mäuse ab ca. 6 Monaten ausgewachsen waren und im späteren Altersverlauf nur noch eine Gewichtszunahme erfolgte. Halloran et al. (2002) konnten bei männlichen C57BL/6J Mäusen einen ähnlichen Wachstumsverlauf der Tibia beobachten. Das Längenwachstum fand sein Maximum zwischen 3 und 5,5 Lebensmonaten und zeigte im weiteren Verlauf keine Veränderung. Das Körpergewicht der männlichen Mäuse stieg im folgenden Altersverlauf ebenfalls weiter an. Die Ergebnisse bezüglich der Längenmessung von Femur und Tibia der vorliegenden Arbeit konnten die im Vorfeld der Studie vorgenommene

Wahl der Altersgruppen für die C57BL/6N Maus im Alter von 3 und 6 Monaten retrospektiv als geeignet bestätigen.

Die Ziele dieser Arbeit waren die Erarbeitung eines Untersuchungsablaufs für die SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit $^{99m}\text{TcO}_4$ in gesunden C57BL/6N Mäusen sowie die Etablierung eines systematischen Datenbestandes zum normalen $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake unter Berücksichtigung von Geschlecht, Alter und circadianem Rhythmus der Tiere. Das erste Ziel wurde erreicht durch Erfassung der Schilddrüsenfunktion in einer Zeit-Aktivitätskurve über 90 min und Bestimmung des Zeitpunkts des maximalen Uptakes bei jeder Maus. Es wurde deutlich, dass die Positionierung der Maus nach der i. v. Injektion in aller Ruhe im Gerät erfolgen kann sowie eine Verkürzung der Untersuchungszeit auf 60 min ausreichend ist, um den maximalen Schilddrüsenuptake von jedem Tier sicher zu erfassen. Mit der Akquirierung und Analyse eines systematischen Datenbestandes zum $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake im Hinblick auf Geschlecht, Alter und circadianen Rhythmus der Mäuse wurden auch das zweite und dritte Ziel dieser Studie erreicht. Die Ergebnisse machten einen signifikanten Einfluss des Geschlechts auf den Schilddrüsenuptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ deutlich. Weibliche Mäuse zeigten einen signifikant höheren Schilddrüsenuptake sowie eine höhere Variabilität des Uptakes im Vergleich zu männlichen Tieren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Schilddrüsenuptake durch den weiblichen Zyklus beeinflusst wird. Das Geschlecht ist zudem ein bedeutender Faktor für altersbedingte Veränderungen im Uptake. Das konnte bei weiblichen, aber nicht bei männlichen Tieren beobachtet werden und ist wahrscheinlich auch auf den Einfluss der weiblichen Sexualhormone zurückzuführen. Im Gegensatz dazu hatte der circadiane Rhythmus keinen signifikanten Einfluss auf den $^{99m}\text{TcO}_4$ -Uptake bei weiblichen Mäusen. Bei männlichen Tieren war der Einfluss zwar signifikant, jedoch so gering, dass eine klinische Relevanz fraglich ist. Die geschlechtsbezogenen Unterschiede in dieser Studie bestätigen die Sorge vieler Wissenschaftler vor dem hormonellen Einfluss bei weiblichen Tieren auf die Untersuchungsergebnisse (Beery und Zucker 2011; Clayton und Collins 2014; Prendergast et al. 2014). Jedoch sollte dieser Ein-

fluss nicht zur Vermeidung der Inklusion von weiblichen Tieren in der tierexperimentellen Forschung führen, sondern wie in der aktuellen Studie zu einer Einbeziehung beider Geschlechter mit einhergehender geschlechtsspezifischer Auswertung der Daten. So sollten zukünftige Studien zur Schilddrüsenfunktion bei Mäusen das Geschlecht sowie in weiblichen Studiengruppen das Alter als bedeutende Faktoren berücksichtigen. Neben einer Charakterisierung der Schilddrüsenfunktion bei der Maus und einer Empfehlung für die SPECT-Bildgebung der Mäuseschilddrüse bietet die aktuelle Studie zudem einen kritischen Einblick in Untersuchungen im Mausmodell für die Grundlagen- sowie Krankheitsforschung. Der Funktionszustand der Schilddrüse ist auch für tierexperimentelle Krankheitsmodelle und somit für das Verständnis von Krankheitsmechanismen von entscheidender Bedeutung.

6 Zusammenfassung

Szintigraphische Untersuchungen zum Technetium-99m-Per technetat-Uptake der Schilddrüse in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und circadianem Rhythmus bei der Maus

In der klinischen Diagnostik zählt die Szintigraphie der Schilddrüse zu den quantitativen Standarduntersuchungen. Das szintigraphische Verfahren der Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) stellt eine nicht invasive Untersuchungsmöglichkeit dar, die eine dreidimensionale Bildgebung sowie die Quantifizierung der Organfunktion *in vivo* erlaubt. Durch den Fortschritt auf technischer Ebene stehen heutzutage präklinische SPECT/CT-Gerätesysteme zur Verfügung, die eine hochauflösende Bildgebung in kleinsten Objekten wie der Schilddrüse der Maus ermöglichen. Jedoch stehen im Vergleich zur Humanmedizin bisher keine standardisierten Untersuchungsabläufe für die SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit dem gebräulichen Radiopharmakon $^{99m}\text{TcO}_4$ zur Verfügung und bisherige Studien an Mäusen zeigten heterogene Versuchsanordnungen. Darüber hinaus sind für die Maus nur wenige Daten verfügbar bezüglich des Schilddrüsenuptakes von $^{99m}\text{TcO}_4$ bei physiologischer Organfunktion, im Vergleich zur Diagnostik am Menschen.

Vor diesem Hintergrund waren die Ziele dieser Arbeit, im Rahmen einer longitudinalen Studie an gesunden C57BL/6N Mäusen einen Untersuchungsablauf für die SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit $^{99m}\text{TcO}_4$ zu entwickeln sowie einen umfassenden Datenbestand zum $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake bei der Maus zu generieren. Mit der wiederholten Untersuchung von weiblichen und männlichen Mäusen bis zu einem Alter von 24 Monaten sowie zu jeweils unterschiedlichen Tageszeiten war es möglich, die Schilddrüsenfunktion in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und circadianem Rhythmus der Mäuse zu bestimmen und die Signifikanz dieser Einflussfaktoren zu evaluieren. Zudem erfolgte anhand der szintigraphischen Organaufnahmen die Volumetrie der Schilddrüsen, welche durch einen methodenbedingten Fehler relative

Rückschlüsse über geschlechts- und altersspezifische Unterschiede sowie das Organvolumen in Bezug zum Körpergewicht erlaubte. Weiterhin wurden in der aktuellen Studie das Längenwachstum von Femur und Tibia im Alter von 1 bis 12 Monaten sowie das Körpergewicht der Mäuse bestimmt, um das Wachstum der Tiere zu beurteilen und somit die im Vorfeld der Studie vorgenommene Wahl der Altersgruppen retrospektiv bestätigen zu können.

Diese Studie zeigte, dass ein signifikanter geschlechtsbezogener Einfluss auf den Schilddrüsenuptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ bei Mäusen besteht mit einem signifikant höheren Uptake bei weiblichen Tieren. Das Geschlecht nahm zudem einen signifikanten Einfluss als Faktor für altersbedingte Veränderungen im Uptake von weiblichen Mäusen, jedoch nicht bei männlichen Tieren. Im Gegensatz zum Geschlecht und Alter hatte der circadiane Rhythmus keinen signifikanten und relevanten Einfluss auf den $^{99m}\text{TcO}_4$ -Uptake. Daher sollten zukünftige Studien zur Schilddrüsenfunktion bei Mäusen das Geschlecht sowie in weiblichen Studiengruppen das Alter als bedeutende Faktoren berücksichtigen, wohingegen der circadiane Rhythmus vernachlässigt werden kann. Auch ein geeignetes Untersuchungsprotokoll für die SPECT-Bildgebung der Schilddrüse mit $^{99m}\text{TcO}_4$ konnte entwickelt werden. Eine Aufnahmedauer von 60 Minuten mit sechs konsekutiven 10 Minuten Akquisitionen nach intravenöser Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$ macht die zuverlässige Bestimmung des maximalen Schilddrüsenuptakes bei jeder Maus möglich, ungeachtet von Geschlecht, Alter oder circadianem Rhythmus.

Damit bietet die vorliegende Arbeit mit dem vorgestellten Untersuchungsprotokoll sowie den systematischen Daten zum Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse von gesunden Mäusen unter Berücksichtigung von Geschlecht, Alter und circadianer Rhythmik eine solide Grundlage für zukünftige Untersuchungen zur Schilddrüsenszintigraphie in der Grundlagen- und Krankheitsforschung im Mausmodell.

7 Summary

Scintigraphic investigations on the thyroid uptake of ^{99m}Tc -pertechnetate in mice with respect to age, sex, and circadian rhythm

Thyroid scintigraphy is one of the mainstays for evaluating thyroid function in clinical diagnostics. Single-photon emission computed tomography (SPECT) provides a non-invasive tool to generate three-dimensional imaging and quantification of thyroid radiopharmaceutical uptake. Recent developments in high-resolution multi-modality imaging devices such as small-animal SPECT/CT for dedicated rodent imaging offer the ability to analyze small objects like the thyroid gland in mice. Although there are well-established procedures for thyroid scintigraphy in humans, there are none for SPECT imaging in mice for the commonly used $^{99m}\text{TcO}_4$ so far. There are only few published references on thyroid uptake in mice with heterogeneous experimental setups. In addition, quantitative data for $^{99m}\text{TcO}_4$ thyroid uptake are well-established as scintigraphic parameters for the thyroid gland functional status in humans, but there are few data available in mice for research study purposes.

The aims of this longitudinal study were to develop a protocol for SPECT thyroid imaging in healthy C57BL/6N mice and to establish a systematic data base for normal $^{99m}\text{TcO}_4$ thyroid uptake values as reference for future studies. A further goal was to systematically investigate potential physiological factors that might have a significant impact on $^{99m}\text{TcO}_4$ thyroid uptake, i.e. sex and age of the mouse, and the time of day as a result of animal circadian rhythm. In addition, the volumetry of the thyroid glands was determined on the basis of thyroid scintigraphy, which allowed relative conclusions about sex- and age-related differences and about the thyroid volume in relation to body weight due to a method-related error. Furthermore, the bone growth of tibia and femur were determined at the age of 1 to 12 months as well as the body weights of

7 Summary

mice in order to assess the body growth of mice and retrospectively the choice of age groups made in advance of the study.

This thesis showed a significant influence of sex on thyroid $^{99m}\text{TcO}_4$ uptake in mice with a significantly higher uptake in females. Sex was also a significant factor affecting age-related changes in thyroid uptake in female mice but not in males. In contrast to sex and age, circadian rhythm had no relevant impact on thyroid $^{99m}\text{TcO}_4$ uptake. Therefore, the design of thyroid function studies in mice should consider animal sex and, in female mice, age as significant factors affecting uptake, whereas circadian rhythm has a negligible effect. A guideline for the use of $^{99m}\text{TcO}_4$ for murine thyroid SPECT imaging was developed as well. It was demonstrated that SPECT imaging after intravenous injection of $^{99m}\text{TcO}_4$ over 60 min with six consecutive acquisitions of 10 minutes each is sufficient to determine the maximal uptake in every mouse regardless of sex, age and circadian rhythm.

Thus, this thesis with the presented protocol for SPECT thyroid imaging and the systematic data collection on $^{99m}\text{TcO}_4$ thyroid uptake in healthy mice considering sex, age and circadian rhythm provides a solid basis for thyroid investigations in the murine model for basic and disease research.

Literaturverzeichnis

Aghajanova, L.; Lindeberg, M.; Carlsson, I. B.; Stavreus-Evers, A.; Zhang, P.; Scott, J. E.; Hovatta, O. und Skjöldebrand-Sparre, L. (2009): Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 18(3), 337-347.

Ahmadzadehfar, H.; Muckle, M.; Essler, M.; Biersack, H.-J. und von Mallek, D. (2015): SPECT/CT: Vorteile und Indikationen der Hybridbildgebung. *Dtsch med Wochenschr*. 140(06), 434-438.

Anger, H. O. (1958): Scintillation Camera. *Review of Scientific Instruments*. 29(1), 27-33.

Arraj, M. und Lemmer, B. (2006): Circadian rhythms in heart rate, motility, and body temperature of wild-type C57 and eNOS knock-out mice under light-dark, free-run, and after time zone transition. *Chronobiol Int*. 23(4), 795-812.

Auletta, L.; Gramanzini, M.; Gargiulo, S.; Albanese, S.; Salvatore, M. und Greco, A. (2017): Advances in multimodal molecular imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 61(1), 19-32.

Ayala, C.; Pennacchio, G. E.; Soaje, M.; Carreno, N. B.; Bittencourt, J. C.; Jahn, G. A.; Celis, M. E. und Valdez, S. R. (2013): Effects of thyroid status on NEI concentration in specific brain areas related to reproduction during the estrous cycle. *Peptides*. 49(2013), 74-80.

Bailey, S. A.; Zidell, R. H. und Perry, R. W. (2004): Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicol Pathol*. 32(4), 448-466.

Balcombe, J. P.; Barnard, N. D. und Sandusky, C. (2004): Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 43(6), 42-51.

Balsalobre, A. (2002): Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*. 309(1), 193-199.

- Baumans, V. (2010): The laboratory mouse. In: The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Hrsg. Hubrecht, R. und Kirkwood, J. - Ames: Wiley-Blackwell. 276-311.
- Becquerel, H. (1896): Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences. 122, 501–503.
- Beekman, F. J.; McElroy, D. P.; Berger, F.; Gambhir, S. S.; Hoffman, E. J. und Cherry, S. R. (2002): Towards in vivo nuclear microscopy: iodine-125 imaging in mice using micro-pinholes. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 29(7), 933-938.
- Beekman, F. J.; van der Have, F.; Vastenhouw, B.; van der Linden, A. J. A.; van Rijk, P. P.; Burbach, J. P. und Smidt, M. P. (2005): U-SPECT-I: a novel system for submillimeter-resolution tomography with radiolabeled molecules in mice. J Nucl Med. 46(7), 1194-1200.
- Beery, A. K. und Zucker, I. (2011): Sex bias in neuroscience and biomedical research. Neurosci Biobehav Rev. 35(3), 565-572.
- Behe, M.; Keil, B.; Alfke, H.; Böhm, I.; Kiessling, A.; Gotthardt, M. und Heverhagen, J. T. (2007): Kombinierte radiologische und nuklearmedizinische Bildgebung in Tierexperimenten: Ein Überblick über die aktuellen Möglichkeiten. Rofo. 179(8), 796-803.
- Bianco, A. C.; Anderson, G.; Forrest, D.; Galton, V. A.; Gereben, B.; Kim, B. W.; Kopp, P. A.; Liao, X. H.; Obregon, M. J.; Peeters, R. P.; Refetoff, S.; Sharlin, D. S.; Simonides, W. S.; Weiss, R. E. und Williams, G. R. (2014): American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. Thyroid. 24(1), 88-168.
- Bizhanova, A. und Kopp, P. (2009): Minireview: the sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. Endocrinology. 150(3), 1084-1090.
- Blumenthal, H. T. (1955): Aging processes in the endocrine glands of various strains of normal mice: relationship of hypophyseal activity to aging changes in other endocrine glands. J Gerontol. 10(3), 253-267.

- Böhme, G. (2004): Schilddrüse. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 4: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Stuttgart: Parey. 482-487.
- Boschi, F.; Pagliuzzi, M.; Rossi, B.; Cecchini, M. P.; Gorgoni, G.; Salgarello, M. und Spinelli, A. E. (2013): Small-animal radionuclide luminescence imaging of thyroid and salivary glands with Tc99m-pertechnetate. *J Biomed Opt.* 18(7), 0760051-0760054.
- Brandt, M. P.; Kloos, R. T.; Shen, D. H.; Zhang, X.; Liu, Y. und Jhiang, S. M. (2012): Micro-single-photon emission computed tomography image acquisition and quantification of sodium-iodide symporter-mediated radionuclide accumulation in mouse thyroid and salivary glands. *Thyroid.* 22(6), 617-624.
- Brayton, C. (2007): Spontaneous diseases in commonly used mouse strains. In: *The Mouse in Biomedical Research*, 2nd Edition. Diseases. Hrsg. Fox, J. G.; Barthold, S. W.; Davisson, M. T.; Newcomer, C. E.; Quimby, F. W. und Smith, A. L. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 623-719.
- Brenner, W. (2002): Is thyroid stunning a real phenomenon or just fiction? *J Nucl Med.* 43(6), 835-836.
- Brömel, C.; Pollard, R. E.; Kass, P. H.; Samii, V. F.; Davidson, A. P. und Nelson, R. W. (2006): Comparison of ultrasonographic characteristics of the thyroid gland in healthy small-, medium-, and large-breed dogs. *Am J Vet Res.* 67(1), 70-77.
- Bullmann, C. (2013): Schilddrüsenfunktionsstörungen. In: *Reproduktionsmedizin*. Hrsg. Diedrich, K.; Ludwig, M. und Griesinger, G. - Heidelberg: Springer. 37-45.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2017): Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2016. Abgerufen am: 05.01.2018, von https://http://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?notFirst=false&docId=10323474 - doc10323474bodyText11.
- Busch, M.; Chourbaji, S.; Dammann, P.; Gerold, S.; Haemisch, A.; Jirkof, P.; Oehlert, P.; Osterkamp, A.; Ott, S.; Peters, S.; Spekl, K.; Tsai, P. P. und Langen, B. (2014): Tiergerechte

Haltung von Labormäusen. Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS), 1-25.

Byers, S. L.; Wiles, M. V.; Dunn, S. L. und Taft, R. A. (2012): Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 7(4), 1-5.

Caligioni, C. (2009): Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. Appendix 4, 1-11.

Cambien, B.; Franken, P. R.; Lamit, A.; Mauxion, T.; Richard-Fiardo, P.; Guglielmi, J.; Crescence, L.; Mari, B.; Pourcher, T.; Darcourt, J.; Bardies, M. und Vassaux, G. (2014): ^{99m}TcO₄⁻, auger-mediated thyroid stunning: dosimetric requirements and associated molecular events. *PLoS One*. 9(3), 1-10.

Cecchini, M. P.; Parnigotto, M.; Merigo, F.; Marzola, P.; Daducci, A.; Tambalo, S.; Boschi, F.; Colombo, L. und Sbarbati, A. (2014): 3D printing of rat salivary glands: the submandibular-sublingual complex. *Anat Histol Embryol*. 43(3), 239-244.

Chai, C. K.; Morrison, J. L. und Lenz, J. L. (1964): Changes in thyroid gland during life-span of mice. Thyroid I-131 retention and turnover rate. *J Hered*. 55, 270-275.

Chievitz, O. und Hevesy, G. (1975): The first radioindicator study in the life sciences with a man-made radionuclide. *J Nucl Med*. 16(12), 1106-1108.

Choksi, N. Y.; Jahnke, G. D.; St Hilaire, C. und Shelby, M. (2003): Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth Defects Res (Part B)*. 68(6), 479-491.

Clayton, J. A. und Collins, F. S. (2014): NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*. 509(7500), 282-283.

Danneman, P. J.; Suckow, M. A. und Brayton, C. (2012): Important biological features. In: *The Laboratory Mouse, Second Edition*. Boca Raton (u.a): CRC Press. 1-21.

Deutzmann, R. (2017): Hormonelle Regulation. In: *Duale Reihe Physiologie*. Stuttgart: Thieme. 337-417.

- Diaz Brinton, R. (2012): Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*. 153(8), 3571-3578.
- Dietlein, M. (2017): Schilddrüse. In: *Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung*. Hrsg. Dietlein, M.; Kopka, K. und Schmidt, M. - Stuttgart: Schattauer. 175-207.
- Dietlein, M.; Eschner, W.; Lassmann, M.; Hänscheid, H.; Verburg, F. A. und Luster, M. (2014a): DGN-Handlungsempfehlung (S1-Leitlinie) Radioiodtest (Version 4). Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (DGN), 1-11.
- Dietlein, M.; Eschner, W.; Lassmann, M.; Verburg, F. A. und Luster, M. (2014b): DGN-Handlungsempfehlung (S1-Leitlinie) Schilddrüsenszintigraphie (Version 4). Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (DGN), 1-9.
- Dietlein, M.; Grünwald, F.; Schmidt, M.; Schneider, P.; Verburg, F. A. und Luster, M. (2015): DGN-Handlungsempfehlung (S1-Leitlinie) Radioiodtherapie bei benignen Schilddrüsenerkrankungen (Version 5). Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (DGN), 1-15.
- Drickamer, L. C. und Mikesic, D. G. (1990): Urinary chemosignals, reproduction, and population size for house mice (*mus domesticus*) living in field enclosures. *J Chem Ecol*. 16(10), 2955-2968.
- DuBray La Perle, K. M. und Dintzis, S. M. (2017): Endocrine system. In: *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. Hrsg. Treuting, P. M.; Dintzis, S. M. und Montine, K. S. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 251-275.
- Dülsner, A.; Hack, R.; Krüger, C.; Pils, M.; Scherer, K.; Schmelting, B.; Schmidt, M.; Weinert, H. und Jourdan, T. (2017a): Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS); Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz, 1-7.
- Dülsner, A.; Hack, R.; Krüger, C.; Pils, M.; Scherer, K.; Schmelting, B.; Schmidt, M.; Weinert, H. und Jourdan, T. (2017b): Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere

kleinen Versuchstieren. Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS); Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz, 1-20.

Eckelman, W. C. (2009): Unparalleled contribution of technetium-99m to medicine over 5 decades. *JACC cardiovasc imaging*. 2(3), 364-368.

Eickhoff, W. (1965): Morphokinese. In: *Die Schilddrüse: Morphologie, Funktion und Klinik*. Hrsg. Eickhoff, W. - München: Johann Ambrosius Barth. 31-55.

Europäische Kommission (2013): Siebenter Bericht über die statistischen Angaben zur Anzahl der in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. 1-14.

Exner, C.; Bode, H.-J.; Blumer, K. und Giese, C. (2004): Deutsche Forschungsgemeinschaft Tierversuche in der Forschung. Senatskommission für tierexperimentelle Forschung, 1-43.

Felicio, L. S.; Nelson, J. F. und Finch, C. E. (1984): Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol Reprod*. 31(3), 446-453.

Finch, C. E.; Felicio, L. S.; Mobbs, C. V. und Nelson, J. F. (1984): Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging processes in female rodents. *Endocr Rev*. 5(4), 467-497.

Finch, C. E.; Jonec, V.; Wisner, J. R., Jr.; Sinha, Y. N.; de Vellis, J. S. und Swerdloff, R. S. (1977): Hormone production by the pituitary and testes of male C57BL/6J mice during aging. *endocrinology*. 101(4), 1310-1317.

Fisher, D. A. (1996): Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations. *Clin Chem*. 42(1), 135-139.

Fisher, D. A. und Polk, D. H. (1989): Development of the thyroid. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 3(3), 627-657.

Franc, B. L.; Acton, P. D.; Mari, C. und Hasegawa, B. H. (2008): Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. *J Nucl Med*. 49(10), 1651-1663.

- Franken, P. R.; Guglielmi, J.; Vanhove, C.; Koulibaly, M.; Defrise, M.; Darcourt, J. und Pourcher, T. (2010): Distribution and dynamics of (99m)Tc-pertechnetate uptake in the thyroid and other organs assessed by single-photon emission computed tomography in living mice. *Thyroid*. 20(5), 519-526.
- Frith, C. H. und Heath, J. E. (1984): Morphological classification and incidence of thyroid tumors in untreated aged mice. *J Gerontol*. 39(1), 7-10.
- Fukuda, H.; Greer, M. A.; Roberts, L.; Allen, C. F.; Critchlow, V. und Wilson, M. (1975): Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine. *Endocrinology*. 97(6), 1424-1431.
- Garrard, G.; Harrison, G. A. und Weiner, J. S. (1974): Reproduction and survival of mice at 23 degrees and 32 degrees C. *J Reprod Fertil*. 37(2), 287-298.
- Gee, D. M.; Flurkey, K. und Finch, C. E. (1983): Aging and the regulation of luteinizing hormone in C57BL/6J mice: impaired elevations after ovariectomy and spontaneous elevations at advanced ages. *Biol Reprod*. 28(3), 598-607.
- Geworski, L. (2004): Voraussetzungen für die Quantifizierung in der Emissions-Tomographie. Berlin, Humboldt-Universität, Medizinische Fakultät, Habil., S. 39.
- Gomez, J. M.; Maravall, F. J.; Gomez, N.; Guma, A. und Soler, J. (2000): Determinants of thyroid volume as measured by ultrasonography in healthy adults randomly selected. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 53(5), 629-634.
- Greco, D. S. und Stabenfeldt, G. H. (2013): Endocrine glands and their function. In: *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*. Hrsg. Klein, G. K. - St. Louis: Elsevier/Saunders. 374-408.
- Grimm, J. und Wunder, A. (2005): Molekulare Bildgebung: Stand der Forschung. *Rofo*. 177(3), 326-337.

Literaturverzeichnis

- Grünwald, F. und Derwahl, K.- M. (2017): Grundlagen. In: Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen: Ein Leitfaden für Klinik und Praxis. Hrsg. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH - Berlin: Lehmanns Media. 13-19.
- Guenet, J.- L.; Orth, A. und Bonhomme, F. (2012): Origins and phylogenetic relationships of the laboratory mouse. In: The Laboratory Mouse. Hrsg. Hedrich, H. J. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 3-21.
- Guerrini, A. (1989): The ethics of animal experimentation in seventeenth-century england. *J Hist Ideas*. 50(3), 391-407.
- Haines, D. C.; Chattopadhyay, S. und Ward, J. M. (2001): Pathology of aging B6;129 mice. *Toxicol Pathol*. 29(6), 653-661.
- Halloran, B. P.; Ferguson, V. L.; Simske, S. J.; Burghardt, A.; Venton, L. L. und Majumdar, S. (2002): Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. *J Bone Miner Res*. 17(6), 1044-1050.
- Hamilton, J. G. und Lawrence, J. H. (1942): Recent clinical developments in the therapeutic application of radio-phosphorus and radio-iodine. Proceedings of the Thirty-Fourth Annual Meeting of the American Society for Clinical Investigation, Atlantic City, *Journal of Clinical Investigation*. 624.
- Hardisty, J. F. und Boorman, G. A. (1999): Thyroid and parathyroid glands. In: Pathology of the Mouse Reference and Atlas. Hrsg. Maronpot, R. R.; Boorman, G. A. und Gaul, B. W. - Vienna: Cache River Press. 537-555.
- Hasegawa, B. H.; Iwata, K.; Wong, K. H.; Wu, M. C.; Da Silva, A.; Tang, H. R.; Barber, W. C.; Hwang, A. B. und Sakdinawat, A. E. (2002): Dual-modality imaging of function and physiology. *Acad Radiol*. 9(11), 1305-1321.
- Haus, E. (2007): Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev*. 59(9-10), 985-1014.

- Hegedus, L. (1990): Thyroid size determined by ultrasound. Influence of physiological factors and non-thyroidal disease. *Dan Med Bull.* 37(3), 249-263.
- Hegedus, L.; Perrild, H.; Poulsen, L. R.; Andersen, J. R.; Holm, B.; Schnohr, P.; Jensen, G. und Hansen, J. M. (1983): The determination of thyroid volume by ultrasound and its relationship to body weight, age, and sex in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 56(2), 260-263.
- Heldmaier, G.; Neuweiler, G. und Rössler, W. (2013): Biologische Rhythmen In: *Vergleichende Tierphysiologie*. Berlin (u.a.): Springer. 425-459.
- Hermann, H. J. (2004a): Kinetik von Radioisotopen. In: *Nuklearmedizin*. München: Elsevier/Urban und Fischer. 35-93.
- Hermann, H. J. (2004b): Radioaktive Nuklide (Radiopharmaka) in der Nuklearmedizin. In: *Nuklearmedizin*. München: Elsevier/Urban und Fischer. 21-35.
- Herzog, H. und Rösch, F. (2005): Chemie und Physik der Bildgebung PET- und SPECT-Technik. *Pharm Unserer Zeit.* 34(6), 468-473.
- Hevesy, G. (1923): The absorption and translocation of lead by plants. A contribution to the application of the method of radioactive indicators in the investigation of the change of substance in plants. *Biochem J.* 17(4-5), 439-445.
- Hukkanen, R. R.; Treuting, P. M. und Dintzis, S. M. (2017): Salivary glands. In: *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. Hrsg. Treuting, P. M.; Dintzis, S. M. und Montine, K. S. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 135-147.
- Jameson, C. W.; Lunn, R. M.; Jeter, S. und Sabella, A. (2003): Report on carcinogens background document for X radiation & gamma radiation and neutrons. U.S. Department of Health and Human Services.
- Janssen, O. E.; Heufelder, A. E. und Mann, K. (2001): Schilddrüsenerkrankungen. In: *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*. Hrsg. Janssen, O. E. und Heufelder, A. E.. Berlin (u.a.): Springer. 45-111.

- Jemiolo, B.; Harvey, S. und Novotny, M. (1986): Promotion of the whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(12), 4576-4579.
- Jordan, D.; Rousset, B.; Perrin, F.; Fournier, M. und Orgiazzi, J. (1980): Evidence for circadian variations in serum thyrotropin, 3,5,3'-triiodothyronine, and thyroxine in the rat*. *Endocrinology.* 107(4), 1245-1248.
- Josefsson, M.; Grunditz, T.; Ohlsson, T. und Ekblad, E. (2002): Sodium/iodide-symporter: distribution in different mammals and role in entero-thyroid circulation of iodide. *Acta Physiol Scand.* 175(2), 129-137.
- Khalil, M. M.; Tremoleda, J. L.; Bayomy, T. B. und Gsell, W. (2011): Molecular SPECT imaging: an overview. *Int J Mol Imaging.* 2011(796025), 1-15.
- Koba, W.; Jelicks, L. A. und Fine, E. J. (2013): MicroPET/SPECT/CT imaging of small animal models of disease. *Am J Pathol.* 182(2), 319-324.
- Köhrle, J.; Schweizer, U. und Schomburg, L. (2014): Schilddrüsenhormone - Zentrale Regulatoren von Entwicklung, Wachstum, Grundumsatz, Stoffwechsel und Zelldifferenzierung. In: Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie.* Hrsg. Heinrich, P. C.; Müller, M. und Graeve, L. - Berlin (u.a.): Springer. 512-528.
- Kötz, K. und Botterweck, H. (2014): Szintigraphie und SPECT. In: *Biomedizinische Technik-Medizinische Bildgebung.* Hrsg. Dössel, O. und Buzug, T. M. - Berlin (u.a.): De Gruyter. 135-173.
- Krajewska-Kulak, E. und Sengupta, P. (2013): Thyroid function in male infertility. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4, 174.
- Kuhl, D. E. und Edwards, R. Q. (1963): Image separation radioisotope scanning. *Radiology* 80(4), 653-662.

Lamason, R.; Zhao, P.; Rawat, R.; Davis, A.; Hall, J. C.; Chae, J. J.; Agarwal, R.; Cohen, P.; Rosen, A.; Hoffman, E. P. und Nagaraju, K. (2006): Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol.* 7(2).

Lang, F. (2017): Schilddrüsenhormone. In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Hrsg. Schmidt, R. F.; Lang, F. und Heckmann, M. - Heidelberg: Springer. 446-449.

Lange, C.; Apostolova, I.; Lukas, M.; Huang, K. P.; Hofheinz, F.; Gregor-Mamoudou, B.; Brenner, W. und Buchert, R. (2013): Performance evaluation of stationary and semi-stationary acquisition with a non-stationary small animal multi-pinhole SPECT system. *Mol Imaging Biol.* 16(3), 311-316.

Lawrence, J. H. (1954): The treatment of chronic leukemia. *Med Clin North Am.* 38(2), 525-540.

Li, M.; Siiri, E. L.; Naqvi, N.; Nicks, A.; Husain, A. und Graham, R. M. (2014): Thyroid hormone action in postnatal heart development. *Stem Cell Research.* 13(3, Part B), 582-591.

Lima, L. P.; Barros, I. A.; Lisboa, P. C.; Araujo, R. L.; Silva, A. C. M.; Rosenthal, D.; Ferreira, A. C. F. und Carvalho, D. P. (2006): Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids.* 71(8), 653-659.

Lundh, C.; Lindencrona, U.; Postgard, P.; Carlsson, T.; Nilsson, M. und Forssell-Aronsson, E. (2009): Radiation-induced thyroid stunning: differential effects of ¹²³I, ¹³¹I, ^{99m}Tc, and ²¹¹At on iodide transport and NIS mRNA expression in cultured thyroid cells. *J Nucl Med.* 50(7), 1161-1167.

Machida T.; Yonezawa, Y. und Noumura, T. (1981): Age-associated changes in plasma testosterone levels in male mice and their relation to social dominance or subordination. *Horm Behav.* 15(3), 238-245.

Mancini, M.; Vergara, E.; Salvatore, G.; Greco, A.; Troncone, G.; Affuso, A.; Liuzzi, R.; Salerno, P.; Scotto di Santolo, M.; Santoro, M.; Brunetti, A. und Salvatore, M. (2009): Morphological ultrasound microimaging of thyroid in living mice. *Endocrinology.* 150(10), 4810-4815.

- Marassi, M. P.; Fortunato, R. S.; Matos da Silva, A. C.; Pereira, V. S.; Carvalho, D. P.; Rosenthal, D. und Correa da Costa, V. M. (2007): Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats. *J Endocrinol.* 192(1), 121-130.
- Martino, E.; Bambini, G.; Vaudagna, G.; Breccia, M. und Baschieri, L. (1985): Effects of continuous light and dark exposure on hypothalamic thyrotropin-releasing hormone in rats. *J Endocrinol Invest.* 8(1), 31-33.
- Mayer, C.; Acosta-Martinez, M.; Dubois, S. L.; Wolfe, A.; Radovick, S.; Boehm, U. und Levine, J. E. (2010): Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor α -signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(52), 22693-22698.
- McLean, A. C.; Valenzuela, N.; Fai, S. und Bennett, S. A. L. (2012): Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp.* (67), 1-6.
- Meikle, S. R.; Kench, P.; Kassiou, M. und Banati, R. B. (2005): Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Phys Med Biol.* 50(22), R45-61.
- Moberg, G. P. (1991): How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J Dairy Sci.* 74(1), 304-311.
- Monteiro, L. S. und Falconer, D. S. (1966): Compensatory growth and sexual maturity in mice. *Animal Science.* 8(2), 179-192.
- Monteleone, P.; Faviana, P. und Artini, P. G. (2017): Thyroid peroxidase identified in human granulosa cells: another piece to the thyroid-ovary puzzle? *Gynecol Endocrinol.* 33(7), 574-576.
- Müller, W. A.; Frings, S. und Möhrlein, F. (2015): Biologische Rhythmen und innere Uhren. In: *Tier- und Humanphysiologie: Eine Einführung.* Berlin (u.a.): Springer. 713-743.

- Nelson, J. F.; Felicio, L. S.; Randall, P. K.; Sims, C. und Finch, C. E. (1982): A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod.* 27(2), 327-339.
- Neumaier, B. (2017): Molekulare Bildgebung. In: *Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung*. Hrsg. Dietlein, M.; Kopka, K. und Schmidt, M. - Stuttgart: Schattauer. 10-17.
- Newiger, H.; Sutter, M. und Ewen, K. (2003): Nuklearmedizin einschließlich PET. In: *Handbuch diagnostische Radiologie: Strahlenphysik, Strahlenbiologie, Strahlenschutz*. Hrsg. Schmidt, T. und Freyschmidt, J. - Berlin (u.a.): Springer. 117-136.
- Nilsson, M. und Fagman, H. (2017): Development of the thyroid gland. *Development.* 144(12), 2123-2140.
- Ottenweller, J. E. und Hedge, G. A. (1982): Diurnal variations of plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in female rats are phase shifted after inversion of the photoperiod. *Endocrinology.* 111(2), 509-514.
- Paschke, R. (2018): Endokrines System. In: *Physiologie*. Hrsg. Pape, H.-C.; Kurtz, A. und Silbernagl, S. - Stuttgart: Thieme. 586-636.
- Perrier, C. und Segrè, E. (1937): Some chemical properties of element 43. *The Journal of Chemical Physics.* 5(9), 712-716.
- Peterson, M. E. (2006): Radioiodine treatment of hyperthyroidism. *Clin Tech Small Anim Pract.* 21(1), 34-39.
- Philippe, J. und Dibner, C. (2015): Thyroid circadian timing: roles in physiology and thyroid malignancies. *J Biol Rhythms.* 30(2), 76-83.
- Pohlenz, J.; Maqueem, A.; Cua, K.; Weiss, R. E.; Van Sande, J. und Refetoff, S. (1999): Improved radioimmunoassay for measurement of mouse thyrotropin in serum: strain differences in thyrotropin concentration and thyrotroph sensitivity to thyroid hormone. *Thyroid.* 9(12), 1265-1271.

- Possidente, B.; McEldowney, S. und Pabon, A. (1995): Aging lengthens circadian period for wheel-running activity in C57BL mice. *Physiol Behav.* 57(3), 575-579.
- Prendergast, B. J.; Onishi, K. G. und Zucker, I. (2014): Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* 40, 1-5.
- Pritchett, K. R. und Taft, R. A. (2007): Reproductive biology of the laboratory mouse. In: *The Mouse in Biomedical Research, 2nd Edition. Normative Biology, Husbandry, and Models.* Hrsg. Fox, J. G.; Barthold, S. W.; Davisson, M. T.; Newcomer, C. E.; Quimby, F. W. und Smith, A. L. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 91-123.
- Ranabir, S. und Reetu, K. (2011): Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab.* 15(1), 18-22.
- Raue, F. (1994): Schilddrüse, menstrueller Zyklus und Schwangerschaft. In: *Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin. Band 2: Fortpflanzungsmedizin.* Hrsg. Runnebaum, B. - Berlin (u.a.): Springer. 183-189.
- Reese, S. (2002): Schilddrüsen-sonographie bei Hund und Katze. Eine angewandt anatomische Studie. München, Ludwig-Maximilians-Univ., Diss., S.132.
- Reiners, C.; Demidchik, Y. E.; Drozd, V. M. und Biko, J. (2008): Thyroid cancer in infants and adolescents after chernobyl. *Minerva Endocrinol.* 33(4), 381-395.
- Richards, P. (1960): A survey of the production at brookhaven national laboratory of radioisotopes for medical research. *VII Rassegna Internazionale Elettronica e Nucleare, Rom.* 223-244.
- Riesco-Eizaguirre, G.; Garcia Leoni, S.; Mendiola, M.; Estevez-Cebrero, M. A.; Gallego, M. I.; Redondo, A.; Hardisson, D.; Santisteban, P. und De la Vieja, A. (2014): NIS mediates iodide uptake in the female reproductive tract and is a poor prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 99(7), E1199-1208.

- Ritt, P.; Hornegger, J. und Kuwert, T. (2011): Technik und physikalische Aspekte der SPECT/CT. *Der Nuklearmediziner: Organ des Berufsverbandes Deutscher Nuklearmediziner.* 34(01), 9-20.
- Russell, W.; Harrison, R. F.; Smith, N.; Darzy, K.; Shalet, S.; Weetman, A. P. und Ross, R. J. (2008): Free triiodothyronine has a distinct circadian rhythm that is delayed but parallels thyrotropin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(6), 2300-2306.
- Russfield, A. B. (1967): Pathology of the endocrine glands, ovary and testis of rats and mice. In: *Pathology of Laboratory Rats and Mice.* Hrsg. Cotchin, E. und Roe, F. J. C. - Oxford (u.a.): Blackwell Scientific Publications. 391-469.
- Santin, A. P. und Weber Furlanetto, T. (2011): Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J Thyroid Res.* 2011(2011), 1-7.
- Saper, C. B. (2013): The central circadian timing system. *Curr Opin Neurobiol.* 23(5), 747-751.
- Sari, R.; Balci, M. K.; Altunbas, H. und Karayalcin, U. (2003): The effect of body weight and weight loss on thyroid volume and function in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 59(2), 258-262.
- Schlogl, S.; Werner, E.; Lassmann, M.; Terekhova, J.; Muffert, S.; Seybold, S. und Reiners, C. (2001): The use of three-dimensional ultrasound for thyroid volumetry. *Thyroid.* 11(6), 569-574.
- Schmidt, B. (1998): Sonographische Volumenbestimmung der Schilddrüse beim Hund, München, Ludwig-Maximilians-Univ., Diss., S.104.
- Schmidt, P. und Dahme, E. (2007): Schilddrüse. In: *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.* Hrsg. Dahme, E. und Weiss, E. - Stuttgart: Enke. 338-344.
- Siegel, J. A.; Harpen, M. D.; Lee, W. P.; Verma, R. C. und Greenfield, M. A. (1984): Quantitative differences between the thyroid uptake of ¹²³I and ^{99m}Tc. *Eur J Nucl Med.* 9(11), 494-498.
- Slebodzinski, A. (1994): Schilddrüse. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie.* Hrsg. Döcke, F. Stuttgart: Gustav Fischer. 228-269.

- Slebozinski, A. B. (2005): Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid. The enigma of the thyroid ovary interaction. *Domest Anim Endocrinol.* 29(1), 97-103.
- Smidt, D. und Monzavifar, H. (1970): Untersuchungen zur phänotypischen Ausprägung unterschiedlicher Fruchtbarkeitsveranlagung bei Mäusen. *Z Tierzucht Zuchtungsbiol.* 87(1-4), 69-80.
- Spitzweg, C. und Morris, J. C. (2002): The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol (Oxf).* 57(5), 559-574.
- Steinlechner, S. (2012): Biological rhythms of the mouse. In: *The Laboratory Mouse*. Hrsg. Hedrich, H. J. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 383-411.
- Streba, C. T.; Vere, C. C.; Miscu, C.; Gheonea, D. I.; Sandulescu, L.; Ciurea, T.; Rogoveanu, I. und Saftoiu, A. (2012): Of mice and ethics. *Curr Health Sci J.* 38(1), 5-8.
- Studer, H.; Forster, R.; Conti, A.; Kohler, H.; Haerberli, A. und Engler, H. (1978): Transformation of normal follicles into thyrotropin-refractory "cold" follicles in the aging mouse thyroid gland*. *Endocrinology.* 102(5), 1576-1586.
- Szkudlinski, M. W.; Fremont, V.; Ronin, C. und Weintraub, B. D. (2002): Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev.* 82(2), 473-502.
- Taylor, I. (2014): Endocrine system. In: *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. Hrsg. Scudamore, C. L. - Ames: Wiley-Blackwell. 109-123.
- Trugenberger-Schnabel, A.; Löbke-Reinl, A. und Peter, J. (2016): Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung Jahresbericht 2014. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB). 1-369.
- Valentinuzzi, V. S.; Scarbrough, K.; Takahashi, J. S. und Turek, F. W. (1997): Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol.* 273(6), R1957-1964.

van Heyningen, H. E. (1961): The initiation of thyroid function in the mouse. *Endocrinology*. 69, 720-727.

van Isselt, J. W.; de Klerk, J. M. H.; van Rijk, P. P.; van Gils, A. P. G.; Polman, L. J.; Kamphuis, C.; Meijer, R. und Beekman, F. J. (2003): Comparison of methods for thyroid volume estimation in patients with Graves' disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30(4), 525-531.

Visser, C. J. M.; Wijnbergen, A. und Bleich, A. (2015): Mäuse und Ratten. In: *Krankheiten der Heimtiere*. Hrsg. Fehr, M.; Sassenburg, L. und Zwart, P. - Hannover: Schlütersche. 129-183.

Viswanathan, N. (1999): Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J). *Physiol Behav*. 68(1-2), 157-162.

vom Steeg, L.G.; Vermillion, M. S.; Hall, O. J.; Alam, O.; McFarland, R.; Chen, H.; Zirkin, B. und Klein, S. B. (2016): Age and testosterone mediate influenza pathogenesis in male mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 311(6), L1234-L1244.

Wakim, A. N.; Paljug, W. R.; Jasnosz, K. M.; Alhakim, N.; Brown, A. B. und Burholt, D. R. (1994): Thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cells. *Fertil Steril*. 62(3), 531-534.

Wakim, A. N.; Polizotto, S. L.; Buffo, M. J.; Marrero, M. A. und Burholt, D. R. (1993): Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 59(6), 1187-1190.

Wald, C. und Wu, C. (2010): Biomedical research of mice and women: the bias in animal models. *Science*. 327(5973), 1571-1572.

Walinder, G. (1972): Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice: I. irradiation of adult mice. *Acta Radiol Ther Phys Biol*. 11(5), 433-451.

Ward, J. M.; Goodman, D. G.; Squire, R. A.; Chu, K. C. und Linhart, M. S. (1979): Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J Natl Cancer Inst*. 63(3), 849-854.

Weinert, D. (2000): Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol Int.* 17(3), 261-283.

Weinert, D. (2005): Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol Int.* 22(2), 179-205.

Weinert, D. (2010): Circadian temperature variation and ageing. *Ageing Res Rev.* 9(1), 51-60.

Weinert, D.; Sitka, U.; Minors, D. S. und Waterhouse, J. M. (1994): The development of circadian rhythmicity in neonates. *Early Hum Dev.* 36(2), 117-126.

Weinert, D. und Waterhouse, J. (1998): Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol Behav.* 63(5), 837-843.

Weinert, D. und Weiss, T. (1997): A nonlinear interrelationship between period length and the amount of activity-age-dependent changes. *Biological Rhythm Research.* 28(1), 105-120.

Weiss, J.; Becker, K.; Bernsmann, E.; Chourbaji, S. und Dietrich, H. (2014): Zucht. In: *Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik.* Stuttgart: Enke. 206-210.

Whary, M. T.; Baumgarth, N.; Fox, J. G. und Barthold, S. W. (2015): Biology and diseases of mice. In: *Laboratory Animal Medicine.* Hrsg. Fox, J. G.; Anderson, L. C.; Otto, G. M.; Prichett-Corning, K. R. und Whary, M. T. - London (u.a.): Elsevier/Academic Press. 43-151.

Winkler, C. (1950): Aussichten der Behandlung maligner Strumen mit radioaktivem Jod. *Dtsch med Wochenschr.* 75(43), 1438-1440.

Wood, G. A.; Fata, J. E.; Watson, K. L. und Khokha, R. (2007): Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction.* 133(5), 1035-1044.

Zuckier, L. S.; Dohan, O.; Li, Y.; Chang, C. J.; Carrasco, N. und Dadachova, E. (2004): Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by Nal symporter-expressing tissues in vivo. *J Nucl Med.* 45(3), 500-507.

Anhang

Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse:

Tabelle A1: Der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake von 9 konsekutiven SPECT-Aufnahmen sowie der Uptake 6 bis 8 Stunden nach Injektion bei 2 weiblichen C57BL/6N Mäusen im Alter von 1 Monat

SPECT-Aufnahme (Nr.)	Maus	
	1	6
1	1,4355818	1,267583
2	1,5288729	1,540921
3	1,4685979	1,626754
4	1,3521793	1,589017
5	1,2399193	1,498475
6	1,1251038	1,386587
7	1,0233899	1,312327
8	0,9569952	1,232595
9	0,8766435	1,154147
10	0,2994558	0,183160

Alle Messwerte angegeben als %ID; Nr.=Nummer

Tabelle A2: Zeitpunkt des maximalen $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptakes (t_{max}) von weiblichen C57BL/6N Mäusen (Maus 1-12)

Maus	Alter (Monate)									
	1 Mo		3 Mo		6 Mo		12 Mo		24 Mo	
	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP
1	23,05221	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	40,50054	-	27,28671	24,12349	29,19477	30,52121	14,42000	31,61315	-	-
3	26,44993	-	25,12349	26,28671	21,37866	20,72577	31,77638	36,52121	-	-
4	29,77638	-	10,42000	29,19477	29,61315	33,10282	23,54188	31,52121	30,35799	30,35799
5	31,52121	-	15,42000	33,68443	24,37866	27,70510	29,35799	8,42000	-	-
6	33,84765	-	41,40859	38,01087	32,52121	25,96027	24,96027	24,96027	29,19477	26,86832
7	-	27,70510	25,54188	22,79705	31,19477	27,28671	34,10282	22,54188	-	-

8	-	21,79705	20,30738	21,19852	-	-	-	-	-	-
9	-	25,54188	22,96027	10,42000	24,96027	26,54188	30,93960	29,54188	-	-
10	-	14,65450	23,37866	21,21544	30,93960	22,21544	28,19477	25,70510	43,33732	38,50054
11	-	18,88899	26,28671	17,98094	26,70510	26,70510	30,35799	29,61315	36,84765	31,93960
12	-	20,47060	25,37866	16,81772	29,44993	26,12349	31,35799	16,42000	-	-

Alle Messwerte angegeben in Minuten; Schlafphase=SP; Wachphase=WP; - = nicht untersuchte Tiere

Tabelle A3: Zeitpunkt des maximalen $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptakes (t_{max}) von männlichen C57BL/6N Mäusen (Maus 1-12)

Maus	Alter (Monate)										
	1 Mo		3 Mo		6 Mo		12 Mo		24 Mo		
	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	
1	28,39933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	20,42000	-	19,14416	14,81772	23,37866	-	-	-	-	-	-
3	21,05221	-	33,84765	9,42000	26,70510	27,28671	23,79705	29,61315	-	-	-
4	23,96027	-	27,44993	31,35799	25,70510	27,03154	26,70510	16,42000	-	-	-
5	27,86832	-	20,72577	35,35799	29,19477	28,35799	20,88899	26,79705	19,14416	21,47060	-
6	28,86832	-	36,01087	11,42000	30,93960	28,19477	25,54188	23,54188	32,35799	25,37866	-
7	-	21,05221	18,56255	21,79705	27,44993	28,03154	19,30738	31,35799	32,10282	39,08215	-

8	-	21,30738	30,77638	25,86832	27,28671	24,30738	30,35799	42,08215	23,63383	25,12349
9	-	9,42000	28,61315	27,03154	31,19477	32,03154	33,26604	34,84765	33,84765	24,12349
10	-	29,77638	36,17409	8,42000	33,26604	22,21544	25,21544	34,26604	31,93960	34,42926
11	-	9,42000	23,54188	21,05221	31,93960	14,49128	42,24537	35,10282	33,26604	32,52121
12	-	10,42000	20,30738	22,05221	31,93960	21,47060	30,35799	38,91893	22,79705	33,68443

Alle Messwerte angegeben in Minuten; Schlafphase=SP; Wachphase=WP; - = nicht untersuchte Tiere

Tabelle A4: $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake von weiblichen C57BL/6N Mäusen (Maus 1-12)

Maus	Alter (Monate)										
	1 Mo		3 Mo		6 Mo		12 Mo		24 Mo		
	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	
1	1,5004879	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2,1358213	-	1,249900	2,000932	2,313420	1,649867	1,541366	1,653909	-	-	-
3	1,5472960	-	1,501303	1,416755	1,499065	1,131394	1,367004	1,545849	-	-	-
4	1,6996906	-	1,221937	1,671392	2,050268	2,154869	1,628836	1,922669	1,7421680	1,536994	-
5	0,8818861	-	1,716717	1,641144	1,507861	1,689433	1,691737	1,223610	-	-	-
6	1,6175925	-	1,343985	1,755714	1,768519	1,738887	1,676067	1,333970	1,1798796	1,087466	-
7	-	1,631207	1,812310	1,699038	1,757914	1,746947	1,600565	1,460343	-	-	-

8	-	1,408275	1,444807	1,835926	-	-	-	-	-	-
9	-	1,683774	1,481523	1,402138	1,650339	1,824593	1,725717	1,263002	-	-
10	-	1,538715	1,739386	1,865872	1,832359	2,044733	1,561391	1,844922	0,7733957	1,018152
11	-	1,586883	1,905287	1,840197	1,791909	2,107715	1,605733	1,479353	1,0920356	1,137869
12	-	1,393857	1,449935	2,044237	2,096176	1,827940	1,674422	1,709183	-	-

Alle Messwerte angegeben als %ID; Schlafphase=SP; Wachphase=WP; - =nicht untersuchte Tiere

Tabelle A5: $^{99m}\text{TcO}_4$ -Schilddrüsenuptake von männlichen C57BL/6N Mäusen (Maus 1-12)

Maus	Alter (Monate)									
	1 Mo		3 Mo		6 Mo		12 Mo		24 Mo	
	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP	SP	WP
1	0,9604518	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1,2623187	-	1,3564135	1,1359002	1,3390775	-	-	-	-	-
3	0,9426167	-	1,0676932	0,8364537	0,9940166	0,8843678	1,025434	0,9533439	-	-
4	1,0759653	-	1,2199128	1,0639583	1,2067981	1,2628838	1,059557	0,8358269	-	-
5	1,3301857	-	1,0958897	1,2644009	1,2317251	1,4850513	1,141733	1,0698468	1,1199326	1,0849974
6	1,1232775	-	0,9497091	1,1376271	1,1925612	1,0996187	1,154821	1,1760188	0,7472072	1,1213671
7	-	1,2709402	1,0196575	1,0581468	1,3028411	0,9483775	1,290497	0,9442788	1,6979373	1,2372135

8	-	0,9829184	1,2074837	1,1487874	1,1231848	1,0097699	1,149539	1,2708257	1,1348378	0,9714060
9	-	1,1034245	1,2144154	0,9339525	1,0767048	1,1409994	1,268248	1,0870739	1,2378622	1,2698487
10	-	1,2182981	1,3940686	0,9415636	1,3753665	1,1576452	1,270935	1,2284575	1,3824320	0,8539583
11	-	1,0908609	1,1698419	1,2218339	1,2359183	1,1645445	1,204865	1,1930736	1,2376069	1,1603156
12	-	1,2555814	1,1522680	0,8529624	1,0617077	1,2902776	1,204888	1,1428140	1,2404273	1,0201087

Alle Messwerte angegeben als %ID; Schlafphase=SP; Wachphase=WP; - = nicht untersuchte Tiere

Tabelle A6: Körpergewichte der weiblichen C57BL/6N Mäuse (Maus 1-12)

Maus	Alter							
	21 Tage	1 Mo	3 Mo	6 Mo	9 Mo	12 Mo	18 Mo	24 Mo
1	7,00	-	-	-	-	-	-	-
2	7,00	19,48	22,18	26,78	30,26	29,23	-	-
3	7,00	16,40	19,82	22,32	24,72	30,29	-	-
4	7,00	17,20	22,12	24,21	26,62	29,11	35,30	25,08
5	7,00	19,77	22,11	24,00	28,84	32,33	31,30	-
6	7,00	18,18	21,10	24,97	29,16	24,33	31,80	29,80
7	7,78	18,72	22,52	31,47	40,05	41,20	30,80	-
8	7,23	17,42	20,95	-	-	-	-	-
9	8,04	16,89	21,40	26,47	33,32	36,14	42,30	-
10	6,95	16,48	20,35	30,99	35,70	37,80	41,50	29,02
11	7,89	16,92	23,74	27,75	32,85	36,80	41,10	30,60
12	7,76	15,85	20,30	29,00	36,98	38,30	-	-

Alle Messwerte sind angegeben in Gramm; Mo= Monate; - = nicht untersuchte Tiere

Tabelle A7: Körpergewichte der männlichen C57BL/6N Mäuse (Maus 1-12)

Maus	Alter							
	21 Tage	1 Mo	3 Mo	6 Mo	9 Mo	12 Mo	18 Mo	24 Mo
1	-	21,13	-	-	-	-	-	-
2	-	20,20	24,56	28,26	-	-	-	-
3	-	22,10	30,61	34,85	35,34	34,80	46,60	-
4	-	21,09	30,35	34,30	36,89	36,56	39,60	-
5	-	18,76	30,75	42,01	44,40	45,07	51,20	37,60
6	-	21,13	29,09	33,79	33,77	36,58	42,40	36,46
7	9,48	19,86	27,22	29,88	33,56	33,80	37,90	32,49
8	9,67	20,98	31,77	37,45	41,63	42,30	47,00	41,75
9	10,11	20,54	29,76	32,74	37,03	40,00	45,40	41,29
10	9,20	19,58	22,90	27,89	33,77	35,90	40,80	39,55
11	10,54	20,55	26,67	30,44	33,70	36,80	40,20	38,79
12	10,51	19,06	25,70	31,18	33,57	32,40	39,30	36,73

Alle Messwerte sind angegeben in Gramm; Mo= Monate; - = nicht untersuchte Tiere

Tabelle A8: Längenmessung von Femur und Tibia bei weiblichen C57BL/6N Mäusen (Maus 1-12)

Maus	Alter (Monate)									
	Femur					Tibia				
	1 Mo	3 Mo	6 Mo	9 Mo	12 Mo	1 Mo	3 Mo	6 Mo	12 Mo	24 Mo
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	12,440	14,220	14,230	14,210	14,285	16,080	16,690	16,975	17,715	17,190
3	11,940	13,650	13,545	13,850	13,860	15,175	16,205	16,390	16,925	16,840
4	11,900	13,570	13,970	13,790	13,805	15,830	16,645	17,345	17,045	17,665
5	12,090	13,805	14,130	14,050	14,315	15,805	16,770	16,965	17,045	17,110
6	12,570	13,660	13,915	13,310	13,570	15,775	16,610	16,855	17,195	17,160
7	11,900	13,610	13,955	13,515	13,775	15,425	16,745	16,995	16,980	17,505

8	11,905	-	-	-	-	14,715	-	-	-	-
9	11,815	13,450	13,710	13,800	13,570	14,990	16,330	17,095	17,505	17,055
10	11,490	13,305	13,715	14,030	13,835	15,155	16,490	17,180	16,950	17,215
11	10,795	13,015	13,510	13,725	13,495	15,130	16,570	17,160	16,810	17,440
12	12,380	13,055	13,215	13,625	13,760	15,100	16,505	16,725	16,850	17,080

Alle Messwerte sind angegeben in Zentimetern; - = nicht untersuchte Tiere

Tabelle A9: Längenmessung von Femur und Tibia bei männlichen C57BL/6N Mäusen (Maus 1-12)

120

Maus	Alter (Monate)									
	Femur					Tibia				
	1 Mo	3 Mo	6 Mo	9 Mo	12 Mo	1 Mo	3 Mo	6 Mo	12 Mo	24 Mo
1	11,785	-	-	-	-	15,780	-	-	-	-
2	11,755	13,680	13,995	-	-	15,380	16,975	16,960	-	-
3	11,475	14,530	14,585	14,550	14,540	15,780	17,055	17,805	17,705	18,090
4	12,090	14,255	14,605	14,445	14,530	15,470	16,810	17,565	17,510	17,530
5	12,120	14,185	14,580	14,535	14,745	16,045	17,610	17,970	17,765	17,925
6	11,770	14,265	14,665	14,495	14,675	15,235	17,410	17,495	17,710	17,725
7	12,110	13,225	13,215	13,365	13,415	15,345	17,005	17,095	17,400	17,365

8	11,710	14,240	14,020	14,250	14,265	15,250	17,215	17,455	17,600	17,870
9	11,450	13,605	13,560	13,830	13,845	15,550	16,915	17,010	17,100	17,190
10	11,420	13,950	13,875	13,935	14,065	14,960	16,775	17,075	17,030	17,555
11	11,235	13,675	13,745	13,625	14,040	15,390	17,025	17,115	17,095	17,285
12	11,955	13,695	13,770	13,950	13,770	15,430	17,060	17,120	17,710	17,895

Alle Messwerte sind angegeben in Zentimetern; - = nicht untersuchte Tiere

Publikationsverzeichnis

Brönner, A.; Lukas, M.; Huang K. P.; Heimann, U.; Steffen, I. G.; Brenner, W.; Beindorff, N. (2014): The influence of age, gender, and circadian rhythm on Tc-99m-pertechnetate thyroid uptake in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imag.* 41 (Suppl 2), 568.

Brönner, A.; Beindorff, N.; Lukas, M.; Heimann, U.; Huang, K. P.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2014): Tc-99m-MDP bone uptake in healthy mice with respect to age, gender, and circadian rhythm. *Eur J Nucl Med Mol Imag.* 41 (Suppl 2), 582-583.

Beindorff, N.; Brönner A.; Lukas, M.; Lange, C.; Heimann, U.; Huang, K. P.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2015): Significant impact of age, gender, and circadian rhythm on bone uptake in mice. *Nuklearmedizin.* 54, A115.

Beindorff, N.; Brönner, A.; Huang, K. P.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2015): Impact of age, sex, and circadian rhythm on relevant organ function measured by SPECT/CT in mice. *Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS)*, 53. Wissenschaftliche Tagung, Hannover, Deutschland. 172.

Beindorff, N.; Brönner, A.; Huang, E. L.; Huang, K. P.; Lukas, M.; Lange, C.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2016): Longitudinal SPECT studies on thyroid uptake in mice over a period of 24

months with respect to age, sex and circadian rhythm. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 43 (Suppl. 1), 476.

Beindorff, N.; Huang, E. L.; Brönner, A.; Huang, K. P.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2017): Longitudinal SPECT studies on submandibulary (SMG) and parotid gland (PG) uptake of Tc-99m-pertechnetate (Tc) in healthy mice with respect to age, sex and circadian rhythm. Nuklearmedizin. 56, A82.

Beindorff, N.; Bartelheimer, A.; Huang K.; Lukas, M.; Lange, C.; Huang, E. L.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2018): Tc-99m-pertechnetate thyroid uptake correlates with physiological changes in estrous cycle in mice. Nuklearmedizin. 57, A22.

Beindorff, N.; Bartelheimer, A.; Huang K.; Lukas, M.; Lange, C.; Huang, E. L.; Aschenbach, J. R.; Eary, J. F.; Steffen, I. G.; Brenner, W. (2018): Normal values of thyroid uptake of 99m technetium pertechnetate SPECT in mice with respect to age, sex and circadian rhythm. Nuklearmedizin. 57(5), 181-189.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Frau Dr. Nicola Beindorff und Herrn Univ.-Prof. Dr. Winfried Brenner bedanken für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft und Ihre Unterstützung sowie Beratung in der ganzen Zeit. Mein Dank gilt auch Dr. Ingo Steffen für die statistische Betreuung der Arbeit sowie Herrn Mathias Lukas für seine Unterstützung. Ebenso möchte ich mich herzlich bedanken bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach für die Betreuung am Fachbereich der Veterinärmedizin in kooperativer und freundlicher Zusammenarbeit.

Ich danke meinem Freund Spoky für seine Hilfe und meinem Freund Daniel für zahlreiche gemeinsame Tage in der Bibliothek.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, ohne die mein Studium und das Anfertigen dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke meinen lieben Geschwistern Jan und Nele und meinen Eltern für Ihre nicht endende Unterstützung.

Und ein besonderer Dank gilt meinem Mann für seine Liebe, Unterstützung und Geduld in all den Jahren. Ich liebe Dich!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 13.12.2018

Annika Bartelheimer, geb. Brönner