

Aus der Klinik für Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Ermittlung von Normwerten des Uptakes von ^{99m}Tc -
Pertechnetat in der Schilddrüse, Parotis und in dem Submandibularen-
Sublingualen-Speicheldrüsen-Komplex sowie des Uptakes von ^{99m}Tc -
Mercaptoacetyltriglycin in der Niere bei Mäusen in Abhängigkeit von
Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eleonore Christiana Anne-Luise Huang

aus Berlin

Datum der Promotion: 13.12.2019

INHALTSVERZEICHNIS

1. Abstract deutsch	3
2. Abstract englisch	5
3. Zusammenfassung	6
3.1 Einführung	6
3.2 Materialien und Methodik	11
3.3 Ergebnisse	14
3.4 Diskussion	27
3.5 Literaturverzeichnis	37
4. Anteilserklärung und eidesstattliche Versicherung	44
4.1 Eidesstattliche Versicherung	44
4.2 Anteilserklärung	45
5. Druckexemplare der Publikationen	46
6. Lebenslauf	76
7. Publikationsliste	78
8. Danksagung	79

1. Abstract deutsch

Ziel: Ziel dieser Studien war die systematische Erhebung von Normwerten für den ^{99m}Tc -Pertechnetat ($^{99m}\text{TcO}_4$)-Uptake der Parotiden (PG), des Submandibular-Sublingualen-Speicheldrüsenkomplexes (SSC) und der Schilddrüse (SD) sowie für den ^{99m}Tc -Mercaptoacetyltriglycin (^{99m}Tc -MAG3)-Uptake als Maß für die Nierenfunktion in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus bei der Maus.

Methoden: Um Normwerte zu erstellen und Einflüsse durch o.g. Faktoren auf den Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in SD und Speicheldrüsen nachzuweisen, wurden bei zwölf weiblichen (F) und zwölf männlichen (M) C57BL/6N Mäusen Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT)-Aufnahmen 5 min nach intravenöser Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$ durchgeführt. Jede Maus wurde mit 1, 3, 6, 12 und 24 Monaten untersucht. Ebenfalls wurden an weiteren zwölf männlichen und zwölf weiblichen C57BL/6N Mäusen SPECT-Aufnahmen im Alter von 1, 3, 6, 12 und 22 Monaten direkt vor Injektion von ^{99m}Tc -MAG3 begonnen. Um Veränderungen aufgrund des circadianen Rhythmus zu erfassen, erfolgten jeweils Untersuchungen während der Hellphase (Schlafphase) sowie der Dunkelphase (Wachphase). Bei PG, SSC und SD sind neben dem Zeitpunkt des maximalen Uptakes (T_{\max}) auch der prozentuale Tracer-Uptake (%ID der injizierten Aktivität) angegeben.

Ergebnisse: Der maximale $^{99m}\text{TcO}_4$ -Uptake wird bei der PG nach 11 min und damit deutlich früher als beim SSC mit 79 min ($p < 0,001$) erreicht und ähnelt der Uptakekinetik der Schilddrüse (T_{\max} zwischen 8 und 45 min; Median 26,9). Weder PG ($p = 0,64$), noch SSC ($p = 0,27$) zeigen einen signifikanten Unterschied in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus. Ebenso können in der SD keine wesentlichen circadianen Unterschiede gefunden werden. Mit dem Alter fällt der $^{99m}\text{TcO}_4$ -Uptake der PG signifikant ab ($p < 0,001$), während er im SSC ($p < 0,001$) ansteigt. Ähnlich wie die PG zeigt die Schilddrüse bei weiblichen Tieren einen Abfall von T_{\max} mit zunehmendem Alter ($p = 0,048$). Bei der Nierenfunktionsszintigraphie wird T_{\max} bereits sehr früh erreicht (Median 1,9 min). Dabei gibt es bezüglich der Untersuchungstageszeit einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0019$) mit einem früheren Erreichen von T_{\max} in der Wachphase im Vergleich zur Schlafphase. Dagegen wird im Laufe des Alterns T_{\max} bei beiden Geschlechtern zunehmend später erreicht ($p < 0,001$). Ebenso gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern, wobei weibliche Mäuse T_{\max} signifikant später erreichen als männliche Tiere ($p < 0,001$).

Schlussfolgerung: PG, SSC, SD und Niere zeigen jeweils Unterschiede im Uptake in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht. Nur bei der Niere besteht auch eine signifikante

Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus mit jedoch absoluten Unterschieden von nur wenigen Sekunden. Folglich sollten Alter und Geschlecht bei der Planung von szintigraphischen Studien der PG, SSC, SD und Nieren an Mäusen als wichtige Einflussfaktoren berücksichtigt werden, während der Untersuchungszeitpunkt eine untergeordnete Rolle spielt.

2. Abstract englisch

Aim: The aim of these studies was to systematically establish normal values for parotid gland (PG), submandibular sublingular salivary gland complex (SSC) and thyroid gland (SD) uptake of ^{99m}Tc pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4$) and ^{99m}Tc -mercaptoacetyltriglycin (^{99m}Tc -MAG3) kidney uptake as a function of age, sex and circadian rhythm in mice.

Methods: To establish normal values of PG, SSC and SD, in twelve female (F) and twelve male (M) C57BL/6N mice, single photon emission computed tomography (SPECT) images as dynamic acquisitions starting 5 min after intravenous injection of $^{99m}\text{TcO}_4$ were acquired. Each mouse was imaged in follow-up studies at 1, 3, 6, 12 and 24 months of age. In another 24 mice (12 M, 12 F) at the age of 1, 3, 6, 12 and 22 months, SPECT examinations of the kidneys were started directly before ^{99m}Tc -MAG3 injection. In order to assess physiologic changes related to circadian rhythm, animals were imaged during light (sleeping phase) as well as during night conditions (awake phase). For PG, SSC and SD the percentage tracer uptake of the injected activity (expressed as median %ID) was calculated as well.

Results: Maximum $^{99m}\text{TcO}_4$ uptake occurs earlier in PG at 11 min compared to SSC at 79 min ($p < 0.001$), but similar to SD (between 8 and 45 min; median 26.9). No significant effect of circadian rhythm is observed in PG ($p = 0.64$), SSC ($p = 0.27$), and SD uptake ($p = 0,4272$). With aging, $^{99m}\text{TcO}_4$ uptake decreases for PG ($p < 0.001$) while it increases for SSC ($p < 0.001$). Like in PG, female mice show a decrease of uptake in SD ($p = 0,048$). In renal scintigraphy, T_{max} is reached very early (median 1.9 min). Kidney show a significant effect of circadian rhythm ($p = 0.0019$) with an earlier T_{max} during the awake phase. With increasing age, a later T_{max} is observed in mice of both sexes ($p < 0.001$). Furthermore, significant sex-related differences were found with T_{max} occurring later in females compared to male mice ($p < 0.001$).

Conclusion: Uptake patterns among PG, SSC, SD and kidney revealed significant differences between sexes and with respect to age. Significant effects of circadian rhythm could be observed only for the kidneys, but the absolute differences amounted to only a few seconds. Therefore, design of scintigraphic studies in mice using $^{99m}\text{TcO}_4$ and ^{99m}Tc -MAG3 should consider age and sex as relevant factors while circadian rhythms seems to be of minor importance.

3. Zusammenfassung

3.1 Einführung

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war die Erhebung szintigraphischer Normwerte für die Speicheldrüsen, Schilddrüse und Nieren von C57BL/6N Mäusen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus. Im Folgenden wird zunächst auf die Physiologie der Organe eingegangen und anschließend deren Bedeutung und Untersuchung in der Szintigraphie beschrieben. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit bei der Speicheldrüsenzintigraphie liegt, wird auf diese im Folgenden vertieft eingegangen.

Die Hauptaufgabe der Speicheldrüsen ist die Produktion des Speichels, welcher nötig ist für die Verdauung, Geschmack sowie Gesundheit der Zähne und enoralen Strukturen (1, 2). Der Mensch produziert im Schnitt 1,5 l Speichel am Tag. Dieser besteht zu 99,5 % aus Wasser (3). Der Rest sind Muzine, Elektrolyte und Verdauungsenzyme, wie die Amylase, welche für die Spaltung von Polysacchariden verantwortlich ist. Es gibt drei paarig angelegte Speicheldrüsen. Die Glandula (Gl.) parotis produziert hauptsächlich serösen Speichel, welcher vor allem die Mundschleimhäute feucht hält. Die Parotiden (PG) liegen beidseits hinter dem Ramus mandibulae (4, 5). Die Gl. sublingualis und Gl. submandibularis produzieren vornehmlich muköses Sekret, welches durch die Amylase Anteil an der Kohlenhydratverdauung hat (6). Beide befinden sich in anatomischer Nähe zur Schilddrüse (4). Histologisch bestehen Speicheldrüsen aus Drüsenepithel. Das Sekret wird als Primärsekret in den Azinuszellen gebildet und in den Drüsengang abgegeben (3). Das duktales Epithel der nach den Azini folgenden Schaltstücke ist hauptsächlich zum Transport des Sekrets verantwortlich. Die Zellen der nun folgenden Streifenstücke verändern durch Resorption – vor allem Resorption von Natrium – und Sekretion – vor allem Sekretion von Kalium – den Primärspeichel (6). Es gibt systemische Erkrankungen, welche mit Störungen der Speicheldrüsenfunktion einhergehen. Hierzu zählen einige Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis, wie zum Beispiel das Sjögren-Syndrom. Ebenso können Bestrahlungen im Halsbereich – wie beim Larynxkarzinom – und Radiojodtherapien Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit hervorrufen. Aufgrund des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in den Speicheldrüsen wird das radioaktive Jod auch in den Speicheldrüsen aufgenommen und bewirkt eine lokale Destruktion. Xerostomie wird ebenfalls bei 8,7 % der Patienten nach Therapie mit ¹⁷⁷Lutetium prostataspezifischem Membranantigen (PSMA) beobachtet (7, 8). Die Speicheldrüsenzintigraphie mit ^{99m}TcO₄ spielt daher in der Tumorthherapie bei Verfahren mit potentieller Speicheldrüsenbeschädigung sowohl klinisch, als auch in der Forschung eine große Rolle, um die Funktion der

Speicheldrüsen zu überprüfen und protektive Faktoren zu eruieren. Um physiologisch auftretende Unterschiede in Abhängigkeit von der Tageszeit, dem Geschlecht oder dem Alter von echten Funktionsstörungen differenzieren zu können, ist es notwendig, zuerst Normwerte und Abhängigkeiten zu erfassen (9).

Wesentliche Funktion der Schilddrüse ist die Produktion von Schilddrüsenhormonen – dem Triiodthyronin (T3) und dem Tetraiodthyronin (T4). Die Hormone der Schilddrüse, für deren Synthese Jod zwingend erforderlich ist, spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation des Stoffwechsels, der Stimmung, der kardiopulmonalen Leistung und des Wachstums. Reguliert wird die Hormonexkretion über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Durch Thyreoliberin (TRH), welches im Hypothalamus gebildet wird, wird im Hypophysenvorderlappen die Produktion von Thyreotropin (TSH) angeregt, welches wiederum in der Schilddrüse Wachstum, Jodaufnahme und die Produktion von Schilddrüsenhormon anregt. Das Schilddrüsenhormon selbst wirkt anschließend durch negative Rückkopplung hemmend auf die Produktion von TSH und TRH (10).

Die Niere spielt eine wesentliche Rolle bei der Entgiftung des Körpers. Hierbei spielen die Tubuluszellen in der Niere eine zentrale Rolle. Durch das Glomerulum werden Stoffe aus dem Blut gefiltert beziehungsweise über die Tubuluszellen aktiv aus dem Blut aufgenommen. Von diesen werden sie entlang eines Konzentrationsgradienten in das Tubuluslumen abgegeben, verbleiben vorerst in den Zellen oder können auch ins Blut zurückgegeben werden. Durch diese Filterfunktion spielt die Niere ebenso eine Rolle in der Regulation des pH-Wertes im Blut, der Elektrolytkonzentrationen und der Osmolarität. Weitere Funktionen der Niere sind durch Bildung von Erythropoetin die Blutbildung, ebenso wie die Regulation des Blutdruckes über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder die Vitamin-D-Produktion (11).

Die Szintigraphie als bildgebende Diagnostik in der Medizin ist etabliert seit Mitte der 40er Jahre des letzten Jahrhunderts (12). Eine große Bedeutung im medizinischen Alltag zur Darstellung der Organfunktion hat sie vor allem in Organen wie Schilddrüse und Niere. Wesentlich für den Nutzen von Nukliden in der Medizin ist die Kenntnis über die physikalische Halbwertszeit, die Reichweite ihrer Strahlung im Gewebe sowie die Kopplung an einen organspezifischen Liganden. In der Diagnostik wird als Nuklid am Häufigsten ^{99m}Technetium (^{99m}Tc) verwendet. Gekoppelt an einen organspezifischen Liganden erfolgt die intravenöse Applikation und anschließende Detektion der Strahlung durch eine Gamma-Kamera. Nach Abrechnung des Effektes durch den Zerfall kann in einem Diagramm in Abhängigkeit von der Zeit die Funktion des Organes bestimmt werden.

Bei der Schilddrüse, genauso wie bei Untersuchungen an den Speicheldrüsen, basieren diese auf dem Vorhandensein des NIS. In der Schilddrüse dient der NIS hauptsächlich für die aktive Aufnahme von Iodid aus der Blutbahn, welches für die Synthese von Schilddrüsenhormon benötigt wird (13, 14). Hierbei werden entlang des Konzentrationsgradienten von Natrium, welcher durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird (15), zwei Natrium-Ionen mit einem Iod-Ion in die Thyreozyten transportiert. Das Iodid-Ion kann bei diesem Prozess auch durch andere Anionen ausgetauscht werden, wie zum Beispiel das $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertheneat $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, welches zur Szintigraphie benötigt wird (16, 17). Der NIS kommt auch in anderen Organen vor, wie zum Beispiel den Speicheldrüsen, dem Magen und dem Ovar (18-20). Bei den Speicheldrüsen der Menschen ist der NIS in den Gangepithelzellen nachgewiesen. Am häufigsten ist der NIS in der Gl. parotis und der Gl. submandibularis vertreten. In der Gl. sublingualis wird der NIS nicht so stark exprimiert, weshalb sich diese auch nicht so deutlich durch $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ darstellen lässt (21). Auch bei Tieren ist eine Aufnahme von Iodid sowie $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ in den Speicheldrüsen nachgewiesen. Cohen et al. beschreibt bereits 1955 eine Aktivität in Speicheldrüsenzellen nach Gabe von ^{131}I bei Hamstern (22). Hierbei zeigt sich die Intensität der Strahlung in den Azinus-Zellen gleich dem Uptake in den Blutgefäßen; die Aktivität in den Ausführungsgängen war jedoch höher (22). Dieser Effekt wird durch die Konzentration des Iods in den Streifenstücken erreicht. Ebenso wurde bei Untersuchungen an der Schilddrüse mit $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ die gleichzeitige Aufnahme des Nuklids in den Speicheldrüsen beobachtet (23, 24).

Die Darstellung des Nukliduptakes mittels Szintigraphie über die Aufnahme von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ durch den NIS erlaubt einzelne statische Aufnahmen der Schilddrüse oder der Speicheldrüsen zu einem gegebenen Zeitpunkt. Eine bessere Möglichkeit, um die Organfunktion darzustellen, sind dynamische Aufnahmen. Hier erfolgen mehrere statische Aufnahmen mit der Gamma-Kamera nacheinander, um so ein Abbild von der Aufnahme des Nuklids und der Exkretion im Organ über die Zeit zu gewinnen. Durch die Darstellung von dem Zeitpunkt des maximalen Uptakes (T_{max}) und der Exkretion bis zum Abfall auf die Hälfte des Nuklids (T_{50}) und auf ein Viertel (T_{25}), entstehen Zeit-Aktivitäts-Kurven (Time-Activity Curve, TAC), welche bei Veränderung von der Normalkurve Organfunktionsstörungen darstellen. Eine sehr häufige dynamische Untersuchung ist die Nierenszintigraphie. Hier erfolgt die Kopplung des Nuklids an einen organspezifischen Liganden, der tubulär aufgenommen und sezerniert wird. Bei gesunden Nieren erfolgt eine schnelle und nahezu vollständige Aufnahme des Tracers $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyltriglycin ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3) mit Sekretion. Durch die Entwicklung der multipinhole Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) ist seit den 2000er Jahren

durch höhere Auflösung die tierexperimentelle hochaufgelöste und quantitative Forschung an Mäusen und Ratten möglich (25). Beim Menschen sind die Normwerte des Uptakes in die Schilddrüse oder Speicheldrüsen sowie die normale TAC der Niere hinreichend bekannt. Für die tierexperimentelle Forschung sind jedoch ebenso Normwerte der Maus für szintigraphische Untersuchungen nötig, welche bisher nicht ermittelt und systematisch zusammengestellt wurden.

Der circadiane Rhythmus spielt eine wesentliche Rolle in vielen Vorgängen im menschlichen und tierischen Körper. Der biologische Rhythmus entsteht durch endogene sowie exogene Faktoren – wie zum Beispiel Licht und Dunkelheit oder äußere Stimuli wie zum Beispiel die Nahrungsaufnahme. Endogene Faktoren werden vor allem im Hypothalamus durch den Nucleus suprachiasmaticus reguliert. Dieser ist wiederum lichtsensibel und wird durch Licht und Dunkelheit beeinflusst. Die Regulation der Prozesse geschieht auf genetischer Ebene, v.a. über Transkriptions-Translations-Rückkopplungs-Wege. Durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse hat der circadiane Rhythmus einen Einfluss auf die meisten Drüsen des Menschen und somit der Stoffwechsellage (11).

Unterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht werden in vielen Organen beobachtet. Den hauptsächlichsten Einfluss bilden hier die Sexualhormone, die nicht nur auf Wachstumsfaktoren, sondern auch auf den Stoffwechsel des Organismus einen Einfluss haben (11).

Ebenso wie Veränderungen in Abhängigkeit von Geschlecht und circadianem Rhythmus sind auch altersabhängige Veränderungen in den einzelnen Organen bekannt. So kommt es mit zunehmenden Alter hauptsächlich zu einer Abnahme des Wachstums, der Regeneration, der Zellteilung und der Fähigkeit des Gewebes, Schäden zu reparieren (11).

Durch die simultane Expression des NIS in Speicheldrüsen und Schilddrüse sowie die dichte anatomische Lage sind nicht nur nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie, sondern auch die Forschung eng verwoben. Gerade bei der präklinischen Forschung an Labornagern sind aus diesem Grund in der bisherigen Grundlagenforschung diese Organe oft zusammengefasst (26). Aufgrund der o.g. bekannten physiologischen Unterschiede in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus ist zu erwarten, dass es ebenso Unterschiede bei Mäusen in den Normwerten der Szintigraphie von Schilddrüse, Speicheldrüsen und Niere gibt.

Das Ziel dieser Studien war es, Zeit-Aktivitätskurven und daraus abgeleitete Parameter wie T_{max} für Schilddrüse, Speicheldrüsen und Nieren an gesunden Mäusen erstmals systematisch zu erheben und daraus Normwerte in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem

Rhythmus abzuleiten. Ein weiteres wesentliches Ziel war es, für die einzelnen Untersuchungen optimierte und standardisierte Untersuchungsprotokolle zusammenzustellen.

3.2 Materialien und Methodik

Versuchstiere und Studiendesign

Um szintigraphische Normwerte von den verschiedenen Organen zu ermitteln, wurden zwei Gruppen mit Mäusen gebildet - eine für die Untersuchung der Speicheldrüsen und der Schilddrüse, die andere für die Untersuchung der Niere. Die Versuche erfolgten jeweils an zwölf gesunden männlichen und zwölf gesunden weiblichen C57BL/6N Mäusen. Gehalten wurden diese in Käfigen à sechs Mäusen getrennt nach Geschlecht. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center (BERIC) unter standardisierten Bedingungen gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus folgte einem 12-Stunden-Rhythmus mit Tageslichtbedingungen von 7:00 Uhr morgens bis 7:00 Uhr abends und Dunkelheit von 7:00 Uhr abends bis 7:00 Uhr morgens.

Jedes Tier wurde im Rahmen einer Longitudinalstudie bis zu einem Alter von 24 Monaten untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte in einem jugendlichen Alter von einem Monat, die zweite Untersuchung mit einem Alter von 3 Monaten (geschlechtsreif, jedoch nicht vollständig ausgewachsen), die dritte Untersuchung in einem Alter von 6 Monaten (vollständig ausgewachsen) sowie zwei weitere Untersuchungen im Alter von 12 und 24 Monaten – bzw. 22 Monaten bei der Niere (senile Mäuse). Um mögliche Unterschiede in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus feststellen zu können, erfolgten die Untersuchungen in jeder Altersgruppe jeweils in der ersten Hälfte des Tages, welche die Schlafphase der Mäuse ist, sowie in der ersten Hälfte der Nacht, welche der Wachphase der Mäuse entspricht. Um die Belastung der Untersuchungen für die jüngsten Mäuse (ein Monat alt) zu reduzieren, erfolgte nur eine Untersuchung, bei der einen Hälfte der Tiere nur während der Wachphase und bei der anderen Hälfte nur während der Schlafphase.

Während der Versuchsreihe wurden einige Mäuse aufgrund von Krankheit oder Tod aus der Studie ausgeschlossen. Es erfolgte kein Ersatz, da auf die longitudinale Untersuchungsfolge Wert gelegt wurde. Details zur Anzahl der Tiere in den einzelnen Altersabschnitten gibt es in Tabelle 1 und 2. Bei der Niere erfolgte auch ein retrospektiver Ausschluss von solchen Mäusen, welche in der TAC deutlich von den anderen abwichen und somit zur Ermittlung von Normwerten unbrauchbar waren (T_{\max} größer 5 min und / oder eine Abnahme der renalen Clearance auf 50 % oder weniger der injizierten Aktivität am Ende der Aufnahmen).

SPECT/CT Bildgebung

Für die Untersuchungen wurde ein Kleintier-SPECT/CT-Gerät der Firma Mediso (NanoSPECT/CTplus, Mediso, Hungary /Bioscan, France) genutzt. Die Mäuse wurden vor jedem Versuch mittels 1 - 2 % Isofluran in der Atemluft narkotisiert. Bereits in Narkose erfolgte – bei den Versuchstieren zur Untersuchung von Schild- und Speicheldrüsen – die Injektion von ca. 80 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 - 0,15 ml) entweder zwischen 7:30 Uhr morgens und 14:40 Uhr (Schlafphase) oder zwischen 16:30 Uhr bis 23:10 Uhr (Wachphase) in die Schwanzvene. Sofort nach der Injektion wurde die Untersuchung im SPECT/CT gestartet. Während des Versuches wurde die Narkose mit ca. 1,3 %igem Isofluran-Anteil im Beatmungsgas aufrechterhalten und mittels Überwachung der Atemfrequenz gesteuert. Die statischen Aufnahmen bei Schild- und Speicheldrüsen erfolgten mittels neun aufeinander folgenden Akquisitionen von jeweils 10 min Dauer, im Mittel gestartet ca. 5 min nach intravenöser Injektion. Aufgrund der Zeit, die für die Gantry-Rotation benötigt wird, beträgt die Dauer der gesamten SPECT-Bildgebung 97,5 min, entsprechend einer Gesamtzeit von 10,8 min pro Bild.

Bei sechs weiblichen und sechs männlichen Mäusen im Alter von einem und sechs Monaten erfolgte eine weitere 20 - minütige Untersuchung fünf bis neun Stunden nach Injektion, um den Langzeitverlauf von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse zu dokumentieren.

Der jeweilige Uptake der Schilddrüse und Speicheldrüsen wird durch manuelles Zeichnen einer volume-of-interest (VOI) mittels Software (PMOD 3.4; PMOD Technologies Ltd., Switzerland) ermittelt. Hierbei wurden die Schilddrüse sowie die Speicheldrüsen getrennt ausgewertet. Die PG wurden getrennt ermittelt, später jedoch bei der statistischen Auswertung zusammengefasst (siehe auch Abbildung 1). Aufgrund der engen Lage und morphologisch in der Bildgebung nicht voneinander zu unterscheidenden submandibularen und sublingualen Drüsen sind diese beim Zeichnen der VOI als submandibular-sublingualer-Speicheldrüsen-Komplex (SSC) zusammengefasst. Der prozentuale Anteil des Uptakes in den Speicheldrüsen und in der Schilddrüse ist zum Zeitpunkt des maximalen Uptakes in der jeweiligen VOI im Verhältnis zur gesamten injizierten Aktivität bestimmt.

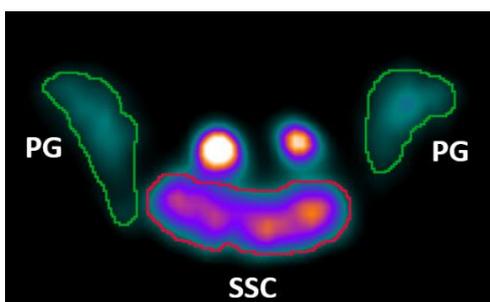


Abbildung 1: Lage der manuell eingezeichneten VOIs in der Gl. parotis (PG) und dem submandibular-sublingualen-Speicheldrüsen-Komplex (SSC).

Durch die CT-Bilder gab es auf Grund eines nicht ausreichenden Weichteilkontrastes keine Möglichkeit, die Schild- und Speicheldrüsen präzise vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden. Deshalb wurden die SPECT-Bilder genutzt, um das Volumen der Speichel- und Schilddrüse zu bestimmen, auch wenn die SPECT-Bildgebung methodenbedingt keine akkurate Grundlage darstellt, die absolute Größe eines Organs zu bestimmen. Um innerhalb der Untersuchungen möglichst vergleichbare Ergebnisse zu schaffen, wurden die Volumenbestimmungen jeweils bei der gleichen Kontrasteinstellung durchgeführt.

Anders als bei der Schilddrüse und den Speicheldrüsen ist die Niere mittels schneller dynamischer Aufnahmen untersucht. Aufgrund des schnellen Anflutens in der Niere erfolgte die intravenöse Injektion des Tracers ^{99m}Tc -MAG3, kurz bevor die Akquisition gestartet wurde. Der Scan hatte hier eine Dauer von 35 min, während insgesamt 68 Bilder aufgenommen wurden. Die anschließende Bildauswertung erfolgte hier mit VivoQuant 1.22 (inviCRO LCC., USA). Zusätzlich zum maximalen Uptake der Nieren in Abhängigkeit von der Zeit erfolgte die Dokumentation der Exkretion des Tracers sowohl aus den Nieren (T_{50} und T_{25}) als auch aus dem Blut, indem der Abfall der Aktivität aus der Aorta (T_{50}) bestimmt wurde.

Statistik

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit R 3.4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Die Ergebnisse sind in Median, Interquartilabstand [IQR, 25. - 75. Perzentile] und Minimum und Maximum angegeben. Diese wurden anschließend mittels Boxplots dargestellt. Gepaarte Daten mit mehr als zwei Gruppen wurden mittels Friedman Test analysiert. Um den Alphafehler zu korrigieren, wurde die Bonferroni-Methode genutzt. Um ungepaarte Daten zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U (MWU) Tests eingesetzt. Signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen. Der Zusammenhang von zwei metrischen Parametern wurde mittels Spearman's rho Korrelationskoeffizient analysiert.

3.3 Ergebnisse

Speicheldrüsen

Die Lokalisation der paarigen PG sowie der Schilddrüse in der SPECT-Untersuchung ist in Abbildung 2 dargestellt. Wie bereits im Methodikabschnitt beschrieben, sind die paarigen submandibularen und sublingualen Speicheldrüsen als submandibularer-sublingualer-Speicheldrüsenkomplex (SSC) aufgrund der großen anatomischen Nähe gemeinsam dargestellt.

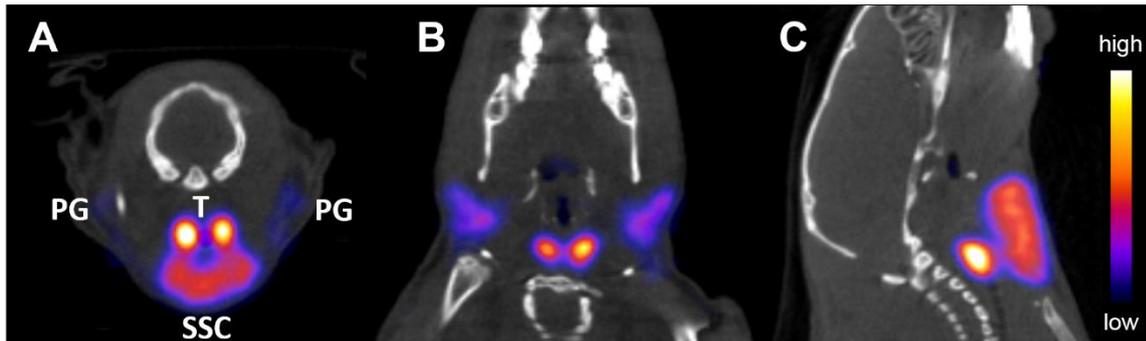


Abbildung 2: Fusionierte SPECT/CT Aufnahmen der Kopf-Hals-Region von einer 3-Monate alten Maus mit einem normalen Schilddrüsen- und Speicheldrüsen-Uptake 25 min nach intravenöser Injektion von 36 MBq $^{99m}\text{TcO}_4$ in transversaler (A), koronarer (B) und sagittaler (C) Projektion. Markiert sind die Schilddrüse (T), der SSC und die PG.

Kinetik

Abbildung 3 zeigt einen typischen Verlauf des Uptakes in den Speicheldrüsen in Abhängigkeit von der Zeit innerhalb der ersten 100 min nach Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$. Die linke und rechte Parotis zeigen das gleiche Verhalten im Uptake, wobei der Uptake im zeitlichen Verlauf zwischen SSC und PG einen deutlichen Unterschied aufweist. Der maximale Uptake wird bei den PG bereits kurz nach Injektion erreicht, nämlich ab der 7. Minute nach Injektion (11,4 [9,4 - 20,5] 7,4 - 45,0). Die Exkretion gemessen als T_{75} (25 % Clearance) erfolgte zwischen der 23. und 91. Minute nach Injektion des Tracers (48,6 [38,6 - 60,1] 23,4 - 90,6). Die Kinetik des Uptakes des SSC unterscheidet sich deutlich von dem der PG. Das Maximum wird hier sehr viel später erreicht, nämlich zwischen 14 und 103 min (78,8 [54,2 - 96,1] 13,9 - 103,1; $p < 0,001$) nach Injektion. Ebenso lag der maximale Uptake deutlich höher als bei den PG. Auch die Exkretionsrate ist beim SSC im Vergleich deutlich verlangsamt. T_{75} ist bei der gewählten Untersuchungsdauer nicht ermittelbar, da sie bei den meisten Mäusen im Untersuchungszeitraum nicht erreicht wird.

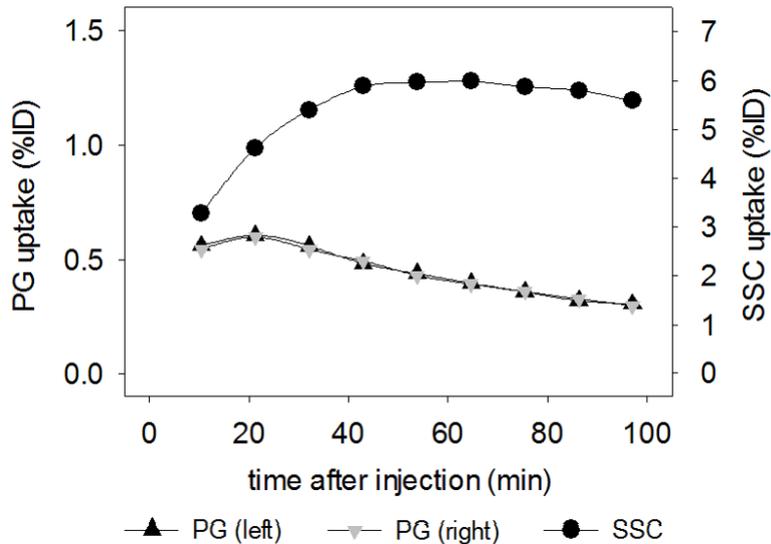


Abbildung 3: Zeit-Aktivitäts-Kurven der Speicheldrüsen einer 3 Monate alten Maus. Dargestellt ist der Uptake des SSC und der linken und rechten PG.

Circadianer Rhythmus – T_{max}

PG und SSC zeigen keinen signifikanten Unterschied beim Erreichen von T_{max} in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus, wie in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst. Signifikante Unterschiede ergaben sich nur bei den jüngsten weiblichen Mäusen für den SSC (Schlafphase: 75,6 min [69,3 - 79,0] 64,9 - 95,1; Wachphase: 53,7 min [50,8 - 60,5] 46,1 - 65,4; $p = 0,004$).

Alter – T_{max}

Während des Alterns erfolgt der Zeitpunkt des maximalen Uptakes bei den PG der weiblichen Mäuse zunehmend früher ($p = 0,03$). Bei den männlichen Mäusen ist derselbe Effekt zu beobachten, jedoch nicht statistisch signifikant, sondern als Tendenz ($p = 0,06$) (Abbildung 4). Im Gegensatz hierzu ist beim SSC ein zunehmend späterer Zeitpunkt des maximalen Uptakes beim Älterwerden zu beobachten. Diese Verzögerung ist bei den weiblichen Mäusen signifikant ($p = 0,05$), bei den männlichen ist nur eine Tendenz ($p = 0,08$) festzustellen (Abb. 5).

Geschlecht – T_{max}

In den über alle Altersgruppen gepoolten Daten der PG aller weiblichen und männlichen Mäuse lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern bei T_{max} finden. Dabei ist der maximale Uptake bei den weiblichen Mäusen im Vergleich zu den männlichen später (weibliche Mäuse: 18,3 min [12,4 - 25,7] 7,4 - 45,0; männliche Mäuse: 10,4 min [9,4 - 11,4] 7,4 - 29,8; $p < 0,001$). Beim SSC sind ebenfalls signifikante Unterschiede beim Erreichen des maximalen Uptakes zwischen weiblichen und männlichen Mäusen zu finden, jedoch nur bis zu

einem Alter von 3 Monaten. Danach findet sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Geschlechtern (Abbildung 4). Auch bei gepoolten Daten ist kein signifikanter Unterschied zu finden (weibliche Mäuse 73,0 [56,9 - 95,1] 21,5 - 101,1; männliche Mäuse 95,1 [48,2 - 97,1] 13,9 - 103,1; $p = 0.31$).

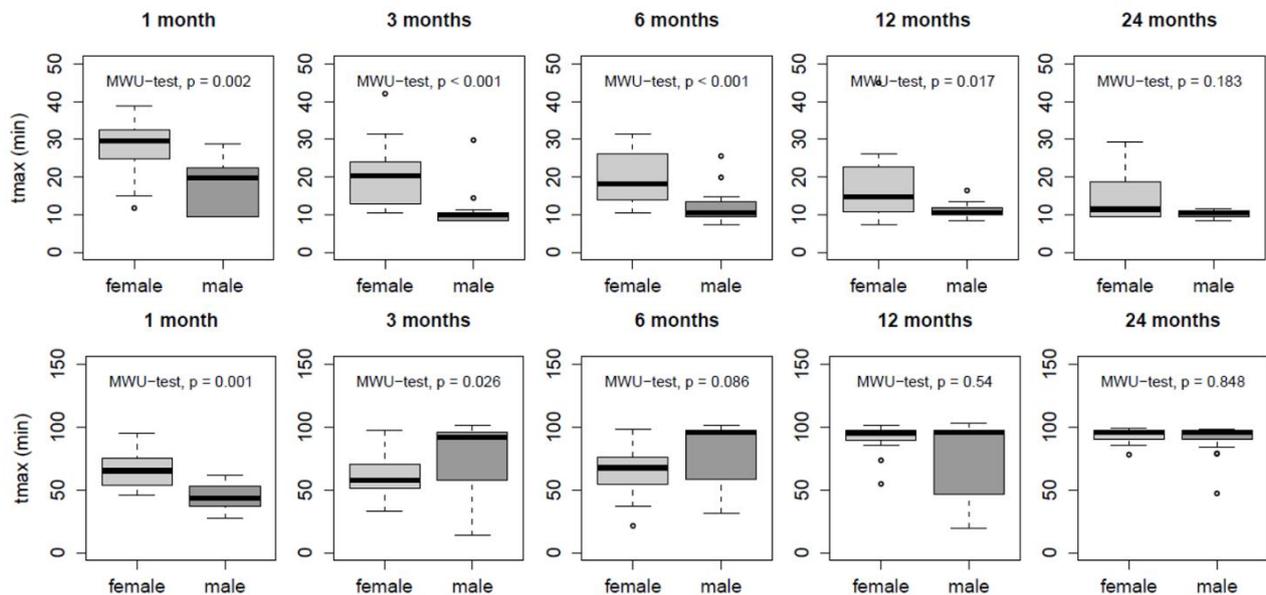


Abbildung 4: Unterschiede von T_{max} des $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptakes in den PG (obere Reihe) und im SSC (untere Reihe) in Abhängigkeit vom Geschlecht in den verschiedenen Altersstufen.

Uptake (%ID)

Als Uptake der Speicheldrüsen (%ID) wurde in der Studie der maximale Uptake zu T_{max} während der 97-minütigen SPECT-Aufnahme genutzt. Der maximale Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in den PG liegt im Median bei 0,4 %ID ([0,3 - 0,6] 0,1 - 1,2). Beim SSC liegt der Uptake signifikant höher und beträgt im Median 6,7 %ID ([4,9 - 10,2] 0,6 - 20,7; $p < 0.001$).

Die Tabellen 1 und 2 fassen die ermittelten Normwerte im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in % ID in den Speicheldrüsen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus bei der Maus zusammen.

Tabelle 1: $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptake (%ID) der PG in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus.

Sex	Age (months)	1 month		3 months		6 months		12 months		24 months	
		sleep	awake								
females	median	0.8	0.9	0.6	0.5	0.6	0.6	0.4	0.4	0.3	0.3
	[IQR]	[0.7-0.9]	[0.8-0.9]	[0.5-0.6]	[0.4-0.6]	[0.6-0.6]	[0.5-0.6]	[0.4-0.5]	[0.4-0.5]	[0.3-0.4]	[0.3-0.3]
	min – max	0.7-1.1	0.7-1.2	0.3-0.9	0.4-0.6	0.5-0.7	0.2-0.7	0.3-0.5	0.3-0.6	0.2-0.4	0.3-0.3
	no. of animals	6	6	11	11	10	10	10	10	4	4
males	median	0.4	0.7	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2
	[IQR]	[0.4-0.5]	[0.6-0.7]	[0.3-0.4]	[0.3-0.4]	[0.2-0.3]	[0.2-0.4]	[0.2-0.3]	[0.2-0.3]	[0.1-0.2]	[0.2-0.3]
	min – max	0.3-0.6	0.6-0.9	0.2-0.7	0.2-0.5	0.2-0.4	0.2-0.5	0.1-0.5	0.2-0.4	0.1-0.3	0.1-0.3
	no. of animals	6	6	11	11	11	10	10	10	8	8

Tabelle 2: $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptake (%ID) des SSC in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus.

Sex	Age (months)	1 month		3 months		6 months		12 months		24 months	
		sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake
females	median	4.6	4.6	4.7	5.1	5.3	5.5	8.5	7.8	6.7	5.7
	[IQR]	[4.5-5.4]	[4.5-4.7]	[4.1-5.0]	[4.5-6.0]	[5.1-5.7]	[5.3-5.6]	[8.0-9.3]	[6.9-8.8]	[5.4-9.1]	[5.3-6.6]
	min – max	3.4-11.9	4.0-4.9	3.1-6.3	3.5-14.7	4.3-6.2	0.6-6.6	5.9-10.8	6.0-10.9	4.8-12.8	5.2-7.9
	no. of animals	6	6	11	11	10	10	10	10	4	4
males	median	3.7	4.0	7.9	8.4	12.2	7.9	16.0	8.2	10.5	11.3
	[IQR]	[3.5-4.5]	[3.7-4.1]	[6.6-13.1]	[5.8-12.8]	[9.0-14.8]	[6.3-10.7]	[13.4-18.4]	[7.3-14.7]	[9.7-11.2]	[9.3-13.8]
	min – max	3.1-5.6	2.8-4.2	4.8-16.9	3.3-13.9	5.2-17.8	4.3-16.8	6.9-19.5	4.8-20.7	6.0-11.5	8.2-14.8
	no. of animals	6	6	11	11	11	10	10	10	8	8

Uptake (%ID) – circadianer Rhythmus

Bis auf die drei Monate alten weiblichen Mäuse und die einen Monat alten männlichen Mäuse (3 Monate, weiblich: Schlafphase 0,6 %ID [0,5 - 0,6] 0,3 - 0,9; Wachphase 0,5 %ID [0,4 - 0,6] 0,4 - 0,6; $p = 0,034$); 1 Monat, männlich: Schlafphase 0,4 %ID [0,4 - 0,5] 0,3 - 0,6; Wachphase 0,7 %ID [0,6 - 0,7] 0,6 - 0,9; $p = 0,009$) zeigen alle Altersgruppen beider Geschlechter keinen signifikanten Unterschied im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in den PG in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus. Beim SSC gibt es zu keiner Altersgruppe und weder bei männlichen, noch bei weiblichen Mäusen einen relevanten tageszeitabhängigen Unterschied beim Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$.

Uptake (%ID) – Alter

Das Alter hat bei beiden Geschlechtern einen signifikanten Einfluss auf den Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in den PG (siehe Abbildung 5). Beide Geschlechter zeigen einen signifikanten Abfall des Uptakes in den PG während des Alterns (weibliche Mäuse: $p = 0,011$, männliche Mäuse: $p < 0,001$). Der SSC verhält sich entgegengesetzt zu den PG. Während des Alterns ist hier ein Anstieg des Uptakes zu beobachten. Dieser ist jedoch bei weiblichen Mäusen nur ab einem Alter von sechs Monaten (6 Monate: 5,4 %ID [5,1 - 5,7] 0,6 - 6,6; 12 Monate: 8,2 %ID [7,1 - 9,0] 5,9 - 10,9; $p < 0,001$) und bei männlichen Mäusen nur bis zu einem Alter von drei Monaten zu beobachten (1 Monat: 3,8 %ID [3,6 - 4,1] 2,8 - 5,6; 3 Monate: 7,9 %ID [6,1 - 13,3] 3,3 - 16,9; $p < 0,001$).

Uptake (%ID) – Geschlecht

Wie auch Abbildung 5 zeigt, ist bis zu einem Alter von zwei Jahren in den PG bei weiblichen Mäusen ein signifikant höherer Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ als bei männlichen Mäusen nachweisbar (weibliche Mäuse: 0,5 %ID [0,4 - 0,6] 0,2 - 1,2; männliche Mäuse: 0,3 %ID [0,2 - 0,4] 0,1 - 0,9; $p < 0,001$). Der SSC zeigt ebenso geschlechtsabhängige signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 5). Im SSC zeigen weibliche Mäuse in allen Altersgruppen bis auf die einen Monat alten Mäuse einen geringeren Uptake als die männlichen (weibliche Mäuse: 5,6 %ID [4,7 - 6,7] 0,6 - 14,7; männliche Mäuse: 9,2 %ID [6,1 - 13,7] 2,8 - 20,7; $p < 0,001$). Bei den jüngsten Mäusen hingegen haben genauso wie bei den PG die weiblichen Mäuse einen höheren Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ im SSC (weibliche Mäuse: 4,6 %ID [4,5 - 4,8] 3,4 - 11,9; männliche Mäuse: 3,8 %ID [3,6 - 4,1] 2,8 - 5,6; $p = 0,014$).

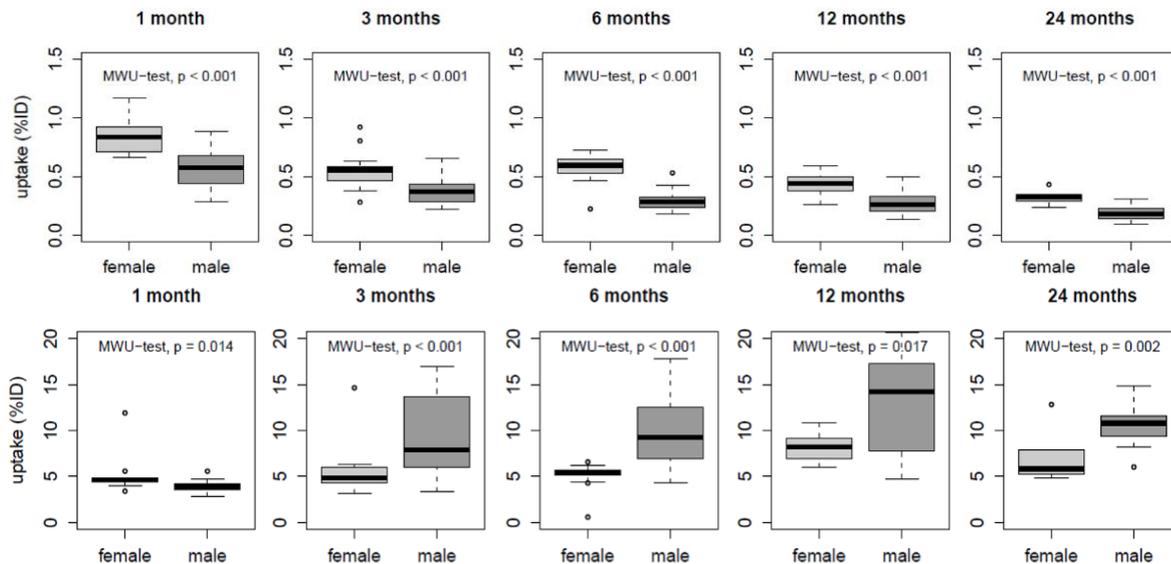


Abbildung 5: Unterschiede des $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptakes in den PG (obere Reihe) und im SSC (untere Reihe) in Abhängigkeit vom Geschlecht in den verschiedenen Altersstufen.

Volumen

Die SPECT-Bilder wurden genutzt, um das Volumen der Schild- und Speicheldrüsen abzuschätzen, damit der Uptake in Bezug zur Größe der Drüsen beurteilt werden kann. Das Volumen der PG zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied (weibliche Mäuse: $43,3 \text{ mm}^3$ [34,7 - 52,3] 20,3 - 96,3; männliche Mäuse: $41,4 \text{ mm}^3$ [31,5 - 56,7] 12,6 - 152,1; $p = 0,57$). Beim Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in den PG zeigen weibliche Mäuse einen höheren totalen Uptake ebenso wie einen höheren Uptake pro mm^3 als die männlichen Mäuse (weibliche Mäuse: $0,013 \text{ \%ID/mm}^3$ [0,011 - 0,014] 0,004 - 0,019; männliche Mäuse: $0,007 \text{ \%ID/mm}^3$ [0,006 - 0,008] 0,001 - 0,016; $p < 0,001$).

Bei dem SSC zeigen die männlichen Mäuse aller Altersgruppen ein signifikant höheres Volumen als die weiblichen Mäuse (männliche Mäuse: $131,9 \text{ mm}^3$ [109,6 - 161,8] 34,9 - 205,1; weibliche Mäuse: $50,4 \text{ mm}^3$ [45,2 - 66,0] 24,8 - 104,8; $p < 0,001$). Bezogen auf das Volumen ist der Uptake pro mm^3 bei weiblichen Mäusen höher als bei männlichen (weibliche Mäuse: $0,110 \text{ \%ID/mm}^3$ [0,097 - 0,119] 0,013 - 0,371; männliche Mäuse: $0,075 \text{ \%ID/mm}^3$ [0,060 - 0,088] 0,024 - 0,118; $p < 0,001$).

Schilddrüse

Kinetik

Die Zeit-Aktivitäts-Kurve des Uptakes von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse zeigt einen ähnlichen

Verlauf wie die PG (siehe Abbildung 6). Der maximale Uptake erfolgt zwischen 8 und 45 min nach Tracer-Injektion (Median 26,9 min [22,2 - 31,4] 8,4 - 43,3). Die Exkretionsrate ist jedoch etwas langsamer als die bei den PG. T_{75} ist im Median nach 75,8 min erreicht ([65,7 - 85,9] 37,5 - 97,6). Die T_{50} -Exkretion ist nur bei den Mäusen errechenbar, welche zur Darstellung der Schilddrüse fünf bis neun Stunden nach Injektion eine erneute Bildgebung erhalten haben. T_{50} lag im Median bei diesen Tieren bei 138,5 min ([125,6 - 174,9] 100,3 - 215,1).

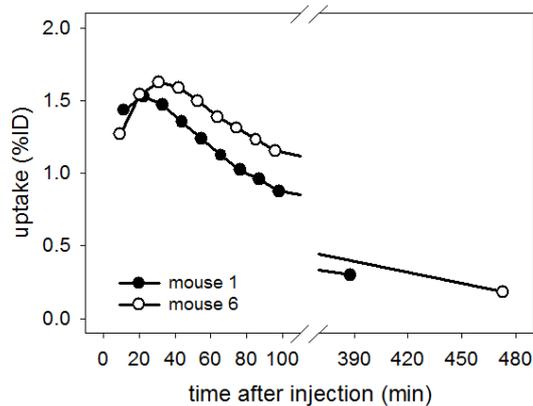


Abbildung 6: Zeit-Aktivitäts-Kurven der Schilddrüse von zwei 1-Monate alten Mäusen. Dargestellt ist der Uptake in % ID in Abhängigkeit von der Zeit.

Circadianer Rhythmus - T_{max}

Bei der Schilddrüse ist kein signifikanter Unterschied bei weiblichen und männlichen Mäusen beim Erreichen des Zeitpunkts des maximalen Uptakes in Abhängigkeit von der Tageszeit zu beobachten. Nur bei den weiblichen jungen Mäusen (ein Monat) ist ein signifikanter Unterschied nachweisbar (Wachphase: 21,1 min [19,3 - 24,6] 14,7 - 24,7; Schlafphase: 30,6 min [27,3 - 33,3] 23,1 - 40,1).

Alter - T_{max}

Bis auf eine Tendenz eines späteren Auftretens des maximalen Uptakes bei männlichen Mäusen ($p = 0,059$) ist bei der Untersuchung von T_{max} in der Schilddrüse kein signifikanter Einfluss des Alters beobachtet (siehe Abbildung 7).

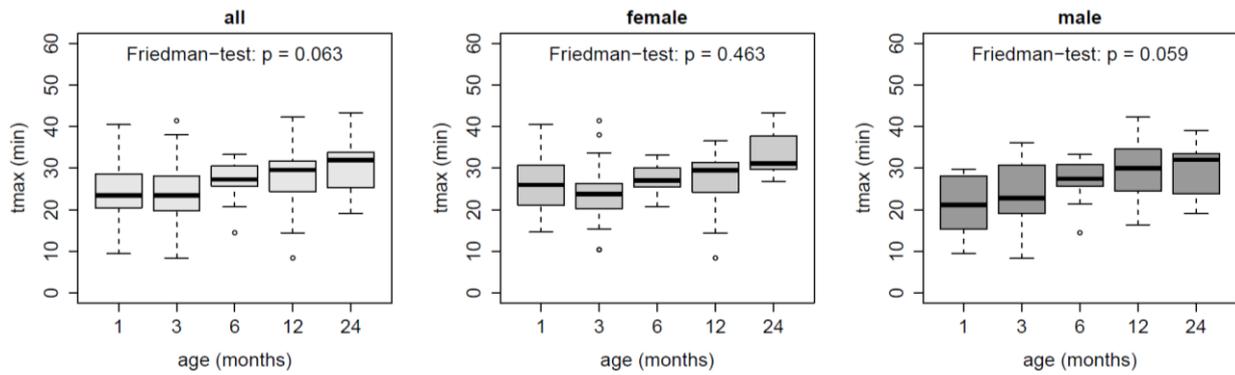


Abbildung 7: Unterschiede von T_{max} des $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptakes in der Schilddrüse in Abhängigkeit vom Alter bei allen Tieren sowie unterteilt in männliche und weibliche Mäuse.

Geschlecht - T_{max}

Die Schilddrüse zeigt weder in den einzelnen Altersgruppen, noch bei den Alters-gepoolten Daten einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen (weibliche Mäuse: 26,7 min [23,0 - 30,8] 8,4 - 43,3; männliche Mäuse: 27,0 min [21,6 - 31,9] 8,4 - 42,2; $p = 1$).

Uptake (%ID)

Die Schilddrüse zeigt beim Uptake ein ähnliches Verhalten wie die PG. Der maximale Uptake, der zwischen 8 und 45 min nach Injektion von $^{99m}\text{TcO}_4$ erreicht wird, beträgt im Median 1,3 %ID ([1,1 - 1,6] 0,7 - 2,3).

Alle ermittelten Uptakewerte von $^{99m}\text{TcO}_4$ in % ID in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus bei der Maus sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptake (%ID) der Schilddrüse in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus.

Sex	Age (months)	1 month		3 months		6 months		12 months		24 months	
		sleep	awake								
females	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 –	0.9-	1.4-	1.2-	1.4-	1.5-	1.1-	1.4-	1.2-	0.8-	1.0-
	max	2.1	1.7	1.9	2.0	2.3	2.2	1.7	1.9	1.7	1.5
	no. of animals	6	6	11	11	10	10	10	10	4	4

Tabelle 3: $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptake (%ID) der Schilddrüse in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus.

males	median	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1
	[IQR]	[1.0-	[1.1-	[1.1-	[0.9-	[1.1-	[1.0-	[1.1-	[1.0-	[1.1-	[1.0-
		1.2]	1.2]	1.2]	1.1]	1.3]	1.2]	1.3]	1.2]	1.3]	1.2]
	min –	0.9-	1.0-	0.9-	0.8-	1.0-	0.9-	1.0-	0.8-	0.7-	0.9-
	max	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.5	1.3	1.3	1.7	1.3
	no. of animals	6	6	11	11	11	10	10	10	8	8

Uptake (%ID) – circadianer Rhythmus

Bei der Schilddrüse findet sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied beim Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in weiblichen Mäusen in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus (Schlafphase 1,6 %ID [1,5 - 1,7] 0,8 - 2,3; Wachphase 1,7 %ID [1,4 - 1,8] 1,0 - 2,3; $p = 0,65$). Bei männlichen Mäusen besteht statistisch ein zwar signifikanter, aber nur marginaler Unterschied zwischen Wach- und Schlafphase (Schlafphase: 1,2 %ID [1,1 - 1,3] 0,7 - 1,7; Wachphase 1,1 %ID [1,0 - 1,2] 0,8 - 1,5; $p = 0,02$).

Uptake (%ID) – Alter

Die Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter beim Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse in männlichen und weiblichen Mäusen sind in Abbildung 8 dargestellt. Bis zu einem Alter von sechs Monaten wurde beim Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse bei weiblichen Mäusen kein signifikanter Anstieg gesehen ($p = 0,56$). Ab diesem Alter bis zum Alter von 24 Monaten verhält sich die Schilddrüse der weiblichen Mäuse erneut ähnlich den PG mit einem Abfall des Uptakes mit zunehmendem Alter (12 Monate: $p = 0,02$; 24 Monate: $p = 0,048$). Dagegen zeigt der Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse der männlichen Mäuse keine Veränderung mit zunehmendem Alter ($p = 0,27$).

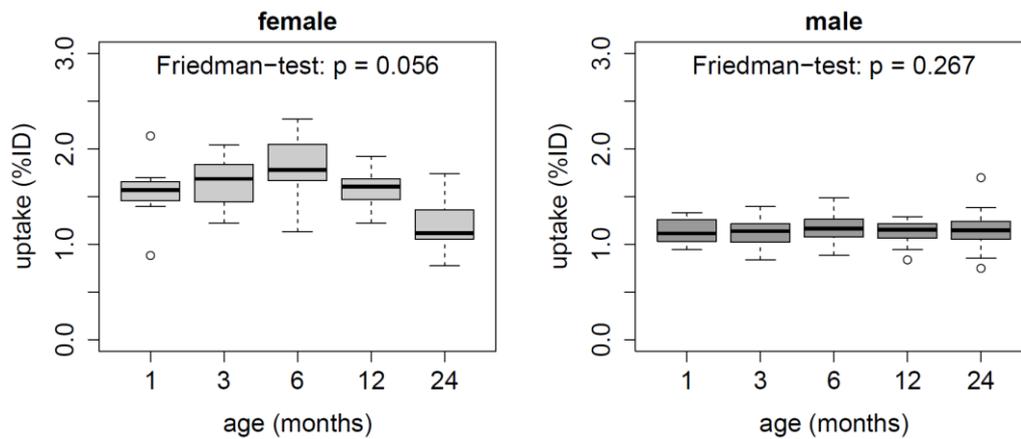


Abbildung 8: Unterschiede des $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptakes (% ID) in der Schilddrüse in Abhängigkeit vom Alter bei männlichen und weiblichen Mäusen.

Uptake (%ID) – Geschlecht

Abbildung 9 stellt wesentliche Unterschiede im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse zwischen männlichen und weiblichen Mäusen in den verschiedenen Altersstufen dar. Die weiblichen Mäuse haben einen signifikant höheren Uptake in der Schilddrüse als männliche Mäuse bis zu einem Alter von zwölf Monaten (12 Monate: weibliche Mäuse 1,6 %ID [1,5 - 1,7] 1,2 - 1,9; männliche Mäuse 1,2 %ID [1,1 - 1,2] 0,8 - 1,3; $p < 0,001$). Ab diesem Alter gleicht sich der Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ der weiblichen Mäuse dem der männlichen an (24 Monate: weibliche Mäuse 1,1 %ID [1,1 - 1,2] 0,8 - 1,7; männliche Mäuse 1,1 %ID [1,1 - 1,2] 0,7 - 1,7; $p = 0,93$). Im Gegensatz zu den weiblichen Mäusen zeigen die männlichen Mäuse während des Alterungsprozesses keine signifikante Änderung des Uptakes von $^{99m}\text{TcO}_4$.

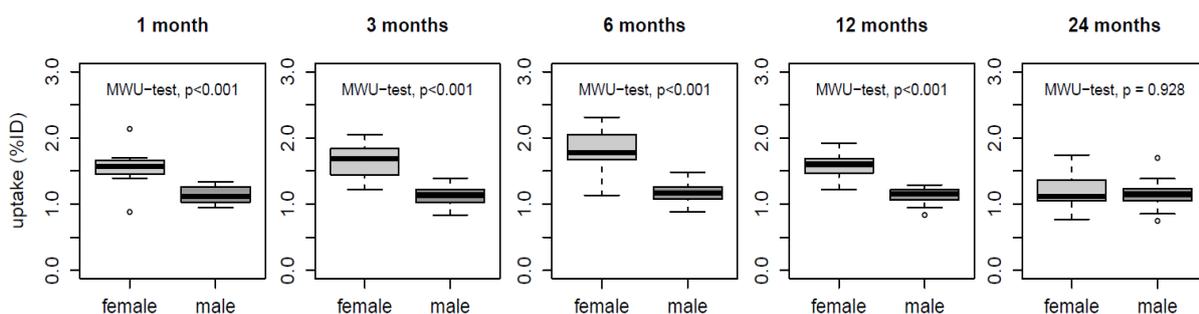


Abbildung 9: Unterschiede des $^{99m}\text{TcO}_4$ Uptakes (% ID) in der Schilddrüse in Abhängigkeit vom Geschlecht in den verschiedenen Altersstufen.

Volumen

Die Schilddrüsen der männlichen Mäuse haben ein größeres Volumen als die der weiblichen Tiere (weibliche Mäuse: 12,7 mm³ [11,8 - 13,5] 10,2 - 14,9; männliche Mäuse: 13,9 mm³ [12,7 - 15,2] 10,4 - 21,0; $p < 0,001$). Da die weiblichen Mäuse einen höheren Uptake bei einem

kleinerem Volumen zeigen, ist der Uptake pro mm³ bei den weiblichen Mäusen signifikant höher als bei den männlichen (weibliche Mäuse: 0,13 %ID/mm³ [0,12 - 0,14] 0,05 - 0,18; männliche Mäuse: 0,08 %ID/mm³ [0,07 - 0,09] 0,04 - 0,13; p < 0,001).

Niere

Tabelle 4 zeigt die ermittelten Normwerte des Uptakes von ^{99m}Tc-MAG3 in der Niere in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus.

Tabelle 4: ^{99m}Tc-MAG3 Uptake (%ID) der Nieren in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus.

Kidney uptake (T _{max} in min)		1 month		3 months		6 months		12 months		22 months	
		sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake	sleep	awake
Sex	Age										
females	median	1.7	1.9	1.8	1.7	2.3	2.2	2.5	2.3	2.7	2.5
	[IQR]	[1.7-	[1.8-	[1.7-	[1.6-	[2.1-	[2.1-	[2.3-	[2.1-	[2.6-	[2.2-
	min-max	1.8]	2.2]	1.9]	1.8]	2.5]	2.3]	2.6]	2.5]	3.0]	2.8]
	no. of animals	1.6-2.1	1.6-2.8	1.6-2.4	1.5-2.7	2.0-2.9	2.0-2.9	2.2-8.2	2.0-4.1	2.0-4.4	2.0-3.3
		6	6	12	12	10	10	9	9	6	6
males	median	2.1	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	2.0	1.8	2.3	1.8
	[IQR]	[2.0-	[1.4-	[1.6-	[1.4-	[1.6-	[1.4-	[1.6-	[1.7-	[1.9-	[1.6-
	min-max	2.4]	1.6]	1.6]	1.7]	1.7]	1.7]	2.1]	1.8]	3.0]	1.9]
	no. of animals	1.9-3.3	1.4-1.7	1.5-2.1	1.4-1.9	1.5-1.9	1.3-2.0	1.5-2.8	1.5-2.0	1.7-7.6	1.5-3.4
		6	6	11	12	10	10	9	8	8	8

Kinetik

Die Niere erreicht sehr früh den maximalen ^{99m}Tc-MAG3 Uptake (siehe Abbildung 10). Der Median liegt hier bei 1,9 min ([1,6 - 2,2] 1,3 - 8,2). Der Abfall der Aktivität ist deutlich langsamer als der Anstieg. T₅₀ liegt im Median bei 6,3 min ([5,4 - 7,7] 4,0 - 34,9), T₂₅ (75 % Clearance) wird im Median nach 10,4 min ([9,0 - 12,8] 6,6 - 34,9) erreicht. Am Ende der renalen Bildgebung ist ungefähr noch 10 % der maximalen Aktivität in den Nieren nachweisbar.

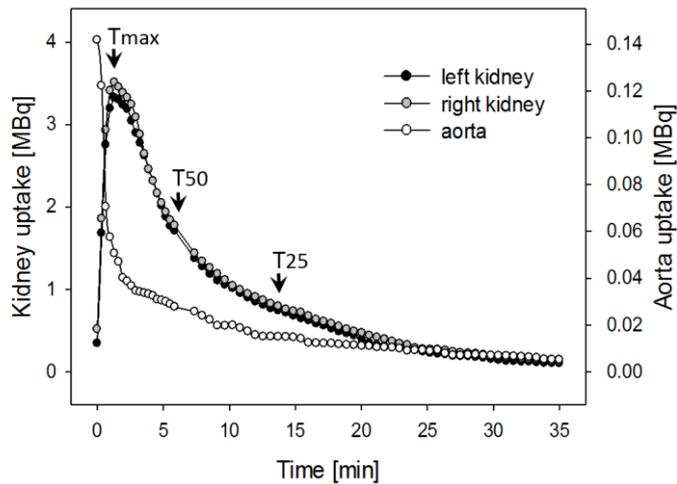


Abbildung 10: Zeit-Aktivitäts-Kurven der Aorta und der Nieren einer 1 Monate alten Maus.

Circadianer Rhythmus - T_{max}

Im Gegensatz zu Schild- und Speicheldrüse besteht bei den Nieren ein signifikanter Unterschied von T_{max} in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus. Während der Schlafphase tritt T_{max} etwas später als in der Wachphase auf (Schlafphase: 2,0 min [1,7 - 2,4] 1,5 - 8,2; Wachphase: 1,8 min [1,6 - 2,1] 1,3 - 4,1; $p = 0,0019$). Ebenso zeigen T_{50} und T_{25} signifikante Unterschiede. Hier werden T_{50} und T_{25} jeweils in der Schlafphase später erreicht (T_{50} : Schlafphase: 6,7 min [5,6 - 8,9] 4,5 - 34,9; Wachphase: 5,9 min [5,2 - 7,1] 4,0 - 28,4; $p = 0,003$; T_{25} : Schlafphase: 11,3 min [9,5 - 14,2] 6,6 - 34,9; Wachphase: 9,8 min [8,8 - 11,5] 6,8 - 34,9; $p = 0,003$).

Alter - T_{max}

Auch bei den Nieren ist eine altersabhängige Veränderung der Kinetik zu finden. Bei jungen Mäusen (1 Monat) tritt T_{max} etwas später auf (8 s) als bei den 3 Monate alten Mäusen (1 Monat: 1,8 min [1,6 - 2,0] 1,4 - 3,3; 3 Monate: 1,7 [1,6 - 1,8] 1,4 - 2,7; $p = 0,035$). Ab diesem Alter wird die Nierenfunktion während des Alters zunehmend schlechter – T_{max} und ebenso T_{50} und T_{25} werden später erreicht (T_{max} 22 Monate: 2,3 min [1,9 - 2,7] 1,5 - 8,7; $p < 0,001$).

Geschlecht - T_{max}

Bei den Nieren sind deutliche Geschlechterunterschiede beim Erreichen von T_{max} zu finden (siehe Abbildung 11). T_{max} wird in weiblichen Mäusen signifikant später (24 s) erreicht als bei den männlichen (weibliche Mäuse: 2,1 min [1,8 - 2,5] 1,5 - 8,2; männliche Mäuse: 1,7 min [1,6 - 1,9] 1,3 - 7,6; $p < 0,001$). Bei der Exkretion sind nur bei T_{25} signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht zu finden. T_{25} erfolgt auch bei weiblichen Mäusen später als bei

den männlichen (weibliche Mäuse: 10,8 min [9,7 - 13,2] 7,1 - 25,4; männliche Mäuse: 10,0 min [8,5 - 12,4] 6,6 - 34,9; $p = 0,030$).

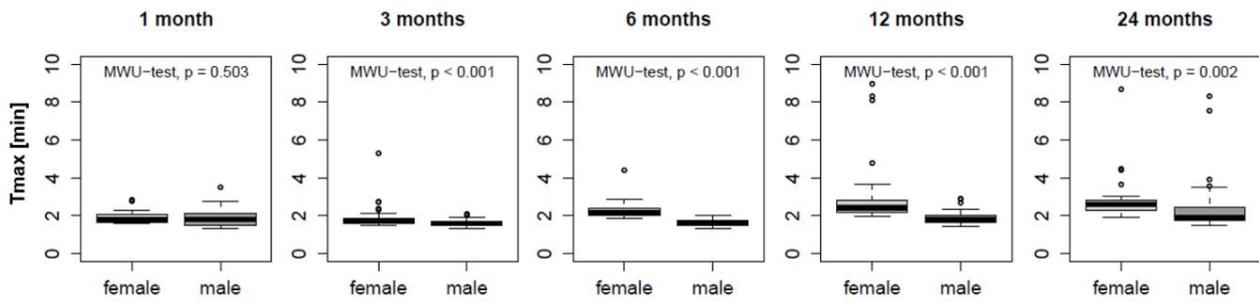


Abbildung 11: Unterschiede im Zeitpunkt des maximalen ^{99m}Tc -MAG3 Uptakes in der Niere in Abhängigkeit vom Geschlecht in den verschiedenen Altersstufen.

3.4 Diskussion

Durch die vorliegenden Studien konnten szintigraphische Normwerte für gesunde C57BL/6N Mäuse für die Schilddrüse, Speicheldrüsen und Nieren bis zu einem Alter von 24 Monaten ermittelt werden. Insbesondere wurde der Einfluss von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus auf den Uptake dargestellt. Bisher sind nur wenige Daten von Szintigraphien an Mäusen vorhanden und vor allem systematische longitudinale Untersuchungen über einen so langen Zeitraum gibt es in der Literatur bisher nicht. Die jetzige Datenlage beachtet auch nicht den möglichen Einfluss der Tageszeit der Untersuchung, des Alters oder des Geschlechtes. Die vorliegenden Studien schlagen einen standardisierten, reproduzierbaren Untersuchungsablauf zur Quantifizierung des Uptakes bzw. der nachgewiesenen Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion mit $^{99m}\text{TcO}_4$ für die Schilddrüse und Speicheldrüsen sowie mit ^{99m}Tc -MAG3 für die Nieren mittels SPECT/CT vor und fassen die an gesunden Mäusen erhobenen Daten zusammen unter Berücksichtigung der untersuchten Einflussfaktoren.

Speicheldrüsen

Allgemein

Die vorliegende Arbeit zeigt den Zeitpunkt des maximalen $^{99m}\text{TcO}_4$ -Uptakes bei Mäusen in den PG zwischen sieben und 45 min (Median 11,4 min), und bei den Schilddrüsen zwischen acht und 45 min. Aufgrund der Ähnlichkeit des Zeitpunktes des maximalen Uptakes bei den PG und der Schilddrüse können diese Untersuchungen leicht kombiniert werden. Eine SPECT-Untersuchung mit sechs konsekutiven Aufnahmen mit jeweils einer Dauer von 10 min ist hierfür ausreichend. Für eine Untersuchung des SSC sollte jedoch der Zeitraum der Untersuchung erweitert werden, da das Maximum hier bei den Mäusen erst später erreicht wird. Hier sollten zwölf Aufnahmen mit einer jeweiligen Dauer von 10 min erfolgen, da im Median der Zeitpunkt des maximalen Uptakes erst bei 78,8 min erreicht wird (14 – 103 min).

Die parallele Darstellung von Schild- und Speicheldrüsen ist auf den in beiden Organen vorhandenen NIS zurückzuführen. Spitzweg et al. zeigen mittels Gennachweis über Polymerasekettenreaktion zudem eine häufigere Expression von NIS in den PG im Vergleich zu den Gl. submandibularis (27). Dies könnte die Ursache für das ähnliche Verhalten der Schilddrüse und der Parotis sein, während sich der SSC auf Grund abweichender Transportergenexpressionsmuster anders verhält.

Der maximale Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ der Mäuse zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen dem SSC und den PG (SSC: 6.7 %ID [4.9 - 10.2] 0.6 - 20.7; PG: 0.4 %ID [0.3 - 0.6] 0.1 - 1.2).

Dieses Ergebnis stimmt mit publizierten Studien überein, welche die Verschiedenheit der Funktionen der einzelnen Speicheldrüsen untersucht haben. So unterscheidet sich die Fähigkeit, ^{131}I zu konzentrieren, bei den PG von Mäusen und Menschen. Das Verhältnis von ^{131}I im Speichel und im Serum beträgt bei den PG der Mäuse 0,59 und beim Menschen 4,6. Hingegen unterscheidet sich dieses Verhältnis weniger bei den submandibulären Drüsen (bei Mäusen: 5,1; beim Menschen: 6,9) (28). Der Unterschied beruht auf der verschiedenen Konzentrationsfähigkeit von ^{131}I in den Ausführungsgängen der einzelnen Speicheldrüsen in Mäusen (29). Es wurde nachgewiesen, dass ^{131}I am Besten in den Ausführungsgängen der submandibulären Speicheldrüsen konzentriert werden kann, danach folgen die PG mit ihrer Fähigkeit, ^{131}I zu konzentrieren und am Schluss die sublingualen Speicheldrüsen. Somit können, wie in unserer Studie gezeigt, bei Mäusen im SSC höhere Uptakewerte erwartet werden als in den PG. Beim Menschen werden ebenfalls Unterschiede im Verhalten vom Uptake von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ durch Hermann et al. beschrieben. Hier wurden ein höherer Uptake sowie höhere Sekretionsraten in den PG nachgewiesen (30). Die Exkretionsfraktion von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ist ebenfalls beim Menschen in den PG im Vergleich zu den submandibulären Speicheldrüsen signifikant höher.

In der Literatur ist ein Einfluss von Isofluran auf den Speichelfluss beschrieben. So zeigte ein Anstieg der Konzentration von Isofluran von 1 % auf 2 % einen Abfall der Speichelsekretion um 19 % bei Ratten. Eine Konzentration bei ca. 1,3 % Isofluran ist somit ein guter Kompromiss zwischen der nötigen Anästhesie mit einer Ruhigstellung der Tiere zur Vermeidung von Bewegungsartefakten und einer möglichst geringen Hemmung der Speichelsekretion bei Untersuchungen an den Speicheldrüsen der Mäuse (31). In der vorliegenden Studie sind die Untersuchungen mit einer Isoflurankonzentration von 1,3 % durchgeführt, weshalb ein größerer Einfluss der Anästhesie auf den Speichelfluss nach aktueller Literatur nicht zu erwarten ist. Da alle Untersuchungen unter der gleichen Konzentration an Isofluran erfolgten, ist somit ein systematischer Fehler mit einem insgesamt etwas vermindertem Uptake zwar nicht auszuschließen, sollte aber bei allen Tieren in einer vergleichbaren Größenordnung liegen, sodass die beobachteten Gruppenunterschiede bezüglich Alter, Geschlecht und Untersuchungszeitpunkt nicht primär auf die Anästhesie mit Isofluran zurückgeführt werden können.

Circadianer Rhythmus

Es ist bekannt, dass die Speichelflussrate sich mit dem circadianen Rhythmus bzgl. der Zusammensetzung und der Menge ändert. So folgt zum Beispiel der Speichelfluss beim

Menschen dem circadianen Rhythmus (32-34). Die Speicheldrüsen und die Niere folgen hierbei den gleichen physiologischen Mechanismen. Der Hypothalamus reguliert als innere Uhr die Expression von Aquaporin 5 (35), welches in den Speicheldrüsen bei Menschen (36), Ratten (37) und Mäusen (38) vorkommt. In den Nieren und Speicheldrüsen wurden die gleichen Gene gefunden, welche das Membrankanal-Gen Aquaporin 5 codieren. Aquaporin 5 spielt eine wichtige Rolle in der Speichelsekretion (35). Beim Menschen ist der maximale Speicheldrüsenfluss um 18:00 Uhr, der minimale um 06:00 Uhr nachgewiesen (32). Diese Proteine sind außer in den Ausführungsgängen auch in den Azini der Drüsen zu finden (35). Die Unterschiede bestehen vor allem in den enthaltenen Proteinen sowie in der Elektrolytkonzentration von Na^+ , Cl^- und K^+ . Durch Stress und dadurch erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems wird in Mäusen die Speichelflussrate sowie auch die Konzentration der enthaltenen Proteine gesenkt (39).

Die vorliegende Studie zeigt ausschließlich einen Einfluss des circadianen Rhythmus im Alter von einem Monat bei den weiblichen Mäusen mit einem früheren Zeitpunkt des Erreichens des maximalen Uptakes von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ in dem SSC in der Wachphase. In den übrigen Altersphasen wurde weder bei weiblichen Mäusen, noch insgesamt bei männlichen Mäusen ein Einfluss des circadianen Rhythmus auf den Zeitpunkt des maximalen Uptakes gefunden. In den Speicheldrüsen wurde bei beiden Geschlechtern in keiner Altersgruppe – weder bei dem SSC noch bei den PG – ein Einfluss des circadianen Rhythmus gefunden.

Der Uptake in %ID zeigt auch kaum einen Einfluss des circadianen Rhythmus. Ausschließlich in den PG zeigen die drei Monate alten weiblichen Mäuse einen höheren Uptake von $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ [%ID] während der Schlafphase, während die einen Monat alten männlichen Mäuse einen höheren Uptake in der Wachphase zeigen. Die übrigen Altersgruppen ebenso wie alle Altersgruppen bezüglich des SSC zeigen keine Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus.

Der fehlende tageszeitabhängige Unterschied in der vorliegenden Studie ist am Ehesten durch den Umgang mit den Mäusen durch das Herausholen aus dem gewohnten Umfeld sowie die Interaktion mit dem Menschen und der damit verbundenen Stressreaktion insbesondere in der Schlafphase erklärbar. Ishii et al. (2001) beschreiben einen stressabhängigen Abfall der Speichelflussrate sowie der Proteinkonzentration des Speichels der Mäuse (39). Es ist möglich, dass durch den Versuchsablauf Unterschiede in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus nivelliert werden.

Alter

Die vorliegende Studie zeigt in männlichen und weiblichen Mäusen einen zunehmend früheren Zeitpunkt des maximalen Uptakes von $^{99m}\text{TcO}_4$ in den PG mit zunehmendem Alter. Dagegen wurde bei dem SSC ein zunehmend späterer Zeitpunkt des maximalen Uptakes beobachtet. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichten Choi et al. (2013), keinen Unterschied im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in Mäusen im Alter von 10, 30 und 90 Wochen beobachtet zu haben (1). Die Exkretionsrate nach Pilocarpin-Injektion war jedoch bei den Mäusen im Alter von 90 Wochen geringer als bei den jüngeren (1). Bei den Menschen sind dagegen altersabhängige Unterschiede in den Speicheldrüsen bekannt (40). Hierbei nimmt die Speichelflussrate im Alter ab, weshalb es häufiger zu Mundtrockenheit und damit verbundenen enoralen oder dentalen Erkrankungen im Alter kommt (41). Diese altersabhängigen Veränderungen zeigen sich auch histologisch. Der Alterungsprozess der Speicheldrüsen beginnt mit einer Atrophie der Azini. Weiter lässt sich ein schrittweiser Umbau des Gewebes der Ausführungsgänge in Fett- und Bindegewebe nachweisen (42).

In menschlichen Speicheldrüsen wurden altersabhängige Unterschiede im Uptake gefunden. Bei Frauen zeigte sich der höchste Uptake in der 4. Lebensdekade bei den PG und den submandibularen Speicheldrüsen. Die Untersuchungen des Uptakes bei Männern zeigten unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Drüsen. Hier konnten die höchsten Uptake-Werte in den PG in der 2. und in den submandibularen Speicheldrüsen in der 3. Lebensdekade nachgewiesen werden (43).

Die Veränderungen mit zunehmendem Alter sind am Ehesten durch die beschriebenen histologischen Veränderungen während des Alterungsprozesses zu erklären. So beschreiben Choi et al. (2013) histologische Unterschiede in den Speicheldrüsen in Abhängigkeit vom Alter bei C57BL/6-Mäusen. Während die 30 Wochen alten Mäuse histologisch eine normale Drüsenstruktur mit dicht gelagerten Azini und gut entwickeltem Gangsystem aufweisen, zeigen die Mäuse im Alter von 90 Wochen eine Atrophie der Azinuszellen, eine Zunahme der Vakuolenanzahl im Zytoplasma, eine zunehmende Lymphozyteninfiltration sowie eine zunehmende Anzahl von apoptotischen Zellen sowie eine periductale und perivaskuläre Fibrose (1). Ähnliche Beobachtungen, nämlich die Abnahme der Zellen der Ausführungsgänge während des Alterungsprozesses, gibt es auch bei männlichen Ratten (44). Diese histologischen Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter könnten die szintigraphisch beobachtete altersabhängige Veränderung des Uptakes in den Speicheldrüsen begründen. Auch bei den Menschen konnten histologische Veränderungen während des Alterungsprozesses in den PG,

submandibularen und sublingualen Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Hier wird ein Abfall des Azinusvolumens zwischen dem Erwachsenenalter und dem Seniorenalter beobachtet (45-47). Auch nimmt in den PG der Speichelfluss signifikant bei gesunden achtzigjährigen Personen ab (40).

Geschlecht

Die vorliegende Studie zeigt bereits beim Volumen des SSC einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Dagegen zeigen die PG keinen Unterschied im Volumen zwischen den Geschlechtern. Geschlechtsabhängige Unterschiede in den submandibularen Speicheldrüsen sind schon länger bekannt (48, 49). Bei den Speicheldrüsen der Mäuse sind diese sogar seit 1940 beschrieben (4, 48). Diese Unterschiede sind histologischer Art. Die Azini von Speicheldrüsen in weiblichen Mäusen haben kleinere und weniger granulierende Zellen als die der männlichen. Im Gesamtbild zeigen jedoch die submandibularen Drüsen der männlichen Mäuse dominante Ausführungsgänge mit größeren duktalem Epithelzellen und in höherer Anzahl, wogegen bei den weiblichen Mäusen Azinuszellen dominieren (50, 51). Die Größe und das Maß der Granulierung sind hierbei abhängig vom Testosteronspiegel (52) und vom Thyroxin (49). Diese histologischen Unterschiede können auf funktionelle Unterschiede hinweisen. Es bestehen ebenso Unterschiede in der Genexpression von verschiedenen Genen in Parotis, Gl. sublingualis und Gl. submandibularis zwischen männlichen und weiblichen Mäusen (53). Östrogene und Progesteron sind ebenso im Speichel nachweisbar und verhalten sich ähnlich zu den Konzentrationsschwankungen im Plasma (54). In Bezug auf das Volumen der Speicheldrüsen wird der geschlechtsabhängige Unterschied durch Testosteron beeinflusst, welches den Wachstumsfaktor in den submandibularen Speicheldrüsen der Mäuse stimuliert (52). Ebenso zeigen Untersuchungen an BALB/c Mäusen, dass geschlechtsabhängig in den submandibularen Drüsen signifikante Unterschiede in der Genexpression vorhanden sind. Diese Unterschiede waren in den sublingualen Speicheldrüsen und in den PG geringer (53). Dies scheint die deutlicheren Unterschiede beim SSC im Vergleich zu den PG zu begründen. Auch beim Menschen wurden geschlechtsabhängige Unterschiede in der Größe der PG und der submandibularen Speicheldrüsen nachgewiesen, mit signifikant kleineren Drüsen bei den Frauen (55).

Die vorliegende Studie zeigt einen signifikant höheren Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in den PG bei weiblichen Mäusen im Vergleich zu den männlichen bis zu einem Alter von 24 Monate. Ein signifikant höherer Uptake im Verhältnis zum Volumen der PG wurde auch bei weiblichen Mäusen im Vergleich zu den männlichen nachgewiesen.

Im Alter von einem Monat, wo noch keine signifikanten Unterschiede im Volumen zwischen männlichen und weiblichen Mäusen bestehen, ist der Uptake im SSC bei weiblichen Mäusen signifikant erhöht. Danach ist der absolute Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ im SSC bei den männlichen Mäusen höher, jedoch ist das Volumen der SSC der männlichen Mäuse im Vergleich deutlich erhöht. Bezogen auf das Volumen zeigen also auch hier die weiblichen Mäuse einen höheren Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ pro Volumeneinheit. Brandt et al. zeigen auch Unterschiede im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in Abhängigkeit vom Geschlecht – mit höherem Uptake bei männlichen Mäusen. Diese Studie ist jedoch nicht direkt mit unseren Ergebnissen vergleichbar, da hier die verschiedenen Speicheldrüsen nicht getrennt dargestellt wurden (20).

Der höhere Uptake bei weiblichen Mäusen in den PG und dem SSC könnte durch die morphologischen und molekularen Unterschiede auf Grund der zwischengeschalteten, granulierenden Epithelzellen in den Ausführungsgängen der weiblichen Mäuse erklärt werden. Diese fehlen bei submandibulären Speicheldrüsen bei männlichen Mäusen (56, 57). Eine weitere Ursache für die Unterschiede könnte das Vorhandensein von NIS in den Ausführungsgängen der PG sowie der submandibulären Drüsen sein (21). Aufgrund der durch die zwischengeschalteten Epithelzellen längeren Ausführungsgänge bei weiblichen Mäusen (14) ist anzunehmen, dass hierdurch auch mehr NIS vorhanden sind, sodass es zu einer erhöhten Transportkapazität von $^{99m}\text{TcO}_4$, und damit auch zu einem erhöhten Uptake bezogen aufs Volumen im Vergleich zu männlichen Mäusen kommt.

Schilddrüse

Der maximale Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse liegt im Median bei 1,3 % ([1,1 - 1,6] 0,7 - 2,3). Andere Studien bestätigen einen ähnlichen maximalen Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse von Mäusen (1,9 %ID +/- 0,6) (58). Auch bei Menschen liegt der Uptake in der Schilddrüse bei euthyreoter Stoffwechsellage zwischen 0,4 und 1,7 %ID (59).

Circadianer Rhythmus

Der Nucleus suprachiasmaticus, welcher den circadianen Rhythmus steuert, beeinflusst ebenfalls die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (60). So kommt es im Tagesverlauf zu schwankender TSH-Sekretion und damit auch zur Abhängigkeit der Schilddrüsenhormonproduktion vom circadianen Rhythmus (61). Aufgrund der tageszeitabhängigen Schwankungen des TSH bei Nagetieren (61) war auch bei dieser Studie eine Veränderung des Uptakes in Abhängigkeit von der Tageszeit zu erwarten. Es konnte auch

tatsächlich ein signifikanter Unterschied im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ zwischen der Schlaf- und der Wachphase bei den männlichen Mäusen beobachtet werden. Dieser beträgt jedoch nur 0,1 % ID, dem entsprechend weniger als 10 % des gesamten Uptakes, weshalb der circadiane Rhythmus bei weiteren Versuchen trotz der Unterschiede vernachlässigbar erscheint.

Die fehlenden bzw. sehr geringen tageszeitabhängigen Unterschiede in der vorliegenden Studie sind am Ehesten durch den Umgang mit den Mäusen, welcher durch das Herausholen aus dem gewohnten Umfeld sowie die Interaktion mit dem Menschen erklärbar ist. Hierdurch ist es möglich, dass sich die Mäuse auch während der Untersuchung in der Schlafphase bereits in einer stressigen Situation ähnlich der Wachphase befinden, sodass bestehende Unterschiede in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus methodenbedingt nicht mehr so stark ins Gewicht fallen.

Alter

Die vorliegende Studie zeigt bei weiblichen Mäusen mit zunehmendem Alter abnehmende Uptake-Werte von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse, wie es auch für die Speicheldrüsen beobachtet wurde. Im Gegensatz hierzu bleiben die Werte im Altersverlauf bei den männlichen Mäusen stabil. Ursache hierfür könnte die mit zunehmendem Alter beobachtete Größenzunahme bei männlichen, jedoch nicht bei weiblichen Mäusen der Schilddrüse sein.

Ähnlich wie bei den Speicheldrüsen sind auch bei den Schilddrüsen der Mäuse histologische Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter zu finden. Diese zeigten sich vor allem in der Größenzunahme der Schilddrüse durch interstitielle Fibrose sowie Atrophie des Follikelepithels (62).

Geschlecht

Die Unterschiede im Uptake von $^{99m}\text{TcO}_4$ in der Schilddrüse zwischen männlichen und weiblichen Mäusen mit signifikant erhöhten absoluten sowie aufs Volumen bezogenen Uptake-Werten sowie die unterschiedlichen Altersverläufe bei den weiblichen Mäusen sind am Ehesten durch den Zyklus der weiblichen Mäuse zu erklären. Die Zykluslänge bei Mäusen beträgt vier bis fünf Tage (63), was die große Variabilität bei den Untersuchungen der weiblichen Mäuse erklären könnte. Ab einem Alter von neun Monaten wird der Zyklus bei weiblichen Mäusen unregelmäßig (64) und im Alter zwischen elf und 16 Monaten befinden sie sich in der Menopause (65). Diese physiologische Entwicklung läuft parallel mit dem abnehmenden Uptake bei weiblichen Mäusen im Alter ab, sodass im senilen Alter von 24 Monaten zwischen weiblichen und männlichen Mäusen kein Unterschied im Uptake mehr zu finden ist. Ebenso

zeigen Ayala et al. (2013), dass bei Ratten während des Zyklus parallel die TSH-Werte im Blut schwanken. Hierbei sind die niedrigsten Spiegel während des Zirkulierens von Östrogen nachgewiesen (66). Es ist weiter bekannt, dass der TSH-Spiegel in Abhängigkeit vom Östrogen-Spiegel bei weiblichen Ratten schwankt (66).

Niere

Circadianer Rhythmus

Die Nierenfunktion folgt prinzipiell auch dem circadianen Rhythmus, vor allem in Abhängigkeit von der Aktivität des Organismus. So zeigten Studien, dass die glomeruläre Filtrationsrate bei Menschen um 5 % während der Aktivität ansteigt (67, 68). Aufgrund der nötigen Anpassung des Blutdruckes an die Aktivität ändern sich ebenso die Reninaktivität und die Aldosteronsekretion tageszeitabhängig. So ist die höchste Reninaktivität bei Menschen am Morgen nachgewiesen (69). Auch bei der Niere hat die Hypothalamus-Hypophysen-Achse über die tageszeitabhängige Produktion und Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH) einen Einfluss auf die Nierenfunktion. ADH steuert vor allem die Elektrolyt- und Wasserresorption in der Niere.

Die Ergebnisse des Zeitpunktes vom maximalen Uptake in der Niere zeigen Unterschiede in Abhängigkeit von der Tageszeit ausschließlich bei männlichen Tieren im Alter von drei und 24 Monaten. Hier wurde T_{\max} signifikant früher erreicht.

Die fehlenden tageszeitabhängigen Unterschiede in der vorliegenden Studie sind am Ehesten auf untersuchungsbedingte Interaktion während der Schlafphase zurückzuführen, sodass bestehende Unterschiede in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus nicht mehr so stark ins Gewicht fallen.

Alter

Die vorliegende Studie bestätigt die altersabhängigen Veränderungen in der Niere. Mit zunehmendem Alter wird T_{\max} später erreicht.

Auch für die Nierenfunktion bei Menschen sind altersabhängige Veränderungen vor allem im Rahmen einer abnehmenden Nierenfunktion beschrieben (70). Die glomeruläre Filtrationsrate ebenso wie die Clearance von ^{99m}Tc -MAG3 nehmen im Alter ab (71). An Ratten konnten diese Veränderungen vor allem durch histologische Ursachen erklärt werden. Hierzu zählen eine Proliferation des Mesangiums, eine glomeruläre Sklerose sowie eine Verdickung der

Basalmembran, welche den Blutfluss in den Nieren genauso wie die Funktion der Tubuli und die glomeruläre Filtrationsrate beeinflusst (72).

Geschlecht

Bei den jungen Mäusen zeigt sich bei der Nierenuntersuchung kein geschlechtsabhängiger Unterschied. Eine Orchiektomie bei Ratten induziert eine nephroprotektive Wirkung, während eine Steigerung des Testosteronspiegels im Blut die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz beschleunigte (73-75). Insbesondere bei der Entwicklung von chronischen Nierenerkrankungen sind geschlechtsabhängige Unterschiede beim Menschen zu finden. Hier konnte ein schnellerer Progress von chronischen Nierenerkrankungen bei Männern beobachtet werden (73, 76). Das Vorhandensein von weiblichen Sexualhormonen zeigte dagegen eine protektive Wirkung auf die Nieren (73, 77). Diese Unterschiede scheinen auf den Sexualhormonspiegel im Blut zu basieren (78). Bei den jungen, noch nicht geschlechtsreifen Mäusen fehlt die volle Wirkung der Sexualhormone, weshalb kein geschlechtsabhängiger Unterschied zu erwarten ist. In der vorliegenden Studie ist ab dem jungen Erwachsenenalter jedoch ein signifikant späterer T_{max} bei den weiblichen Mäusen gefunden worden. T_{50} und T_{25} unterscheiden sich hingegen nicht. Im Allgemeinen ist die Studienlage trotz des gefundenen Einflusses der Sexualhormone auf die Nierenfunktion auch beim Menschen noch divergent. So konnten Klingensmith et al. (1994) keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern in der Szintigraphie mit ^{99m}Tc -MAG3 der Nieren beim Menschen finden (71).

Schlussfolgerung

Aufgrund der in den durchgeführten Studien dargestellten quantitativen Unterschiede bei der Szintigraphie von Speicheldrüsen, Schilddrüse und Nieren bei Mäusen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht müssen diese Einflussfaktoren bei der tierexperimentellen Forschung mit diesen szintigraphischen Untersuchungen beachtet werden.

Hingegen ließen sich im Hinblick auf die circadiane Rhythmik keine oder nur sehr geringe Unterschiede in den untersuchten Parametern nachweisen. Dies könnte zum einen an den auch aus der Literatur bekannten und größtmäßig teils nur geringen Unterschieden liegen, die sich mit der verwendeten Methodik und Tierzahl nicht eindeutig nachweisen lassen. Ein weiterer zusätzlicher Faktor könnte die Untersuchung der Tiere in der Schlafphase sein, die auf Grund des Aufweckens der Tiere eher einer Untersuchung in der Wachphase nahekommt und somit circadiane Unterschiede verringert.

Die in dieser Arbeit erstellten Untersuchungsabläufe und die systematisch erhobenen Normwerte für die Nieren-, Schilddrüsen- und Speicheldrüsenzintigraphie stellen eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen an Mäusen dar und können helfen, durch Berücksichtigung von Alter und Geschlecht die Streuung der Ergebnisse zu verringern und somit die Tierzahlen in zukünftigen Studien möglichst gering zu halten .

3.5 Literaturverzeichnis

1. Choi JS, Park IS, Kim SK, Lim JY, Kim YM. Analysis of age-related changes in the functional morphologies of salivary glands in mice. *Archives of oral biology*. 2013;58(11):1635-42.
2. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*. 2016;70(1):11-25.
3. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2001;85(2):162-9.
4. Jonjic S. Surgical removal of mouse salivary glands. *Current protocols in immunology*. 2001;Chapter 1:Unit 1 11.
5. Pfestroff A, Muller F, Librizzi D, Eivazi B, Behe M, Hoeffken H, Behr TM, Teymoortash A. Scintigraphic assessment of salivary gland function in a rat model. *In vivo*. 2010;24(5):681-5.
6. Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. *Monographs in oral science*. 2014;24:1-13.
7. Ahmadzadehfar H, Eppard E, Kurpig S, Fimmers R, Yordanova A, Schlenkhoff CD, Gartner F, Rogenhofer S, Essler M. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(11):12477-88.
8. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schafers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lutzen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzl A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bogemann M, Fendler WP, Krause BJ. German Multicenter Study Investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2017;58(1):85-90.
9. Bohuslavizki KH, Brenner W, Klutmann S, Hubner RH, Lassmann S, Feyerabend B, Luttes J, Tinnemeyer S, Clausen M, Henze E. Radioprotection of salivary glands by amifostine in high-dose radioiodine therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1998;39(7):1237-42.
10. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development*. 2017;144(12):2123-40.
11. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*: Thieme; 2009.

12. Werner SC, Quimby EH, Schmidt C. The use of tracer doses of radioactive iodine, I131, in the study of normal and disordered thyroid function in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1949;9(4):342-54.
13. Lang F, Lang P. *Hormonale Regulation. Basiswissen Physiologie*. Heidelberg: Springer; 2007. p. 235-69.
14. Oberdisse E. *Schilddrüse. Pharmakologie und Toxikologie*: Springer; 2002. p. 485-92.
15. Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. *Schilddrüsenhormone - Zentrale Regulatoren von Entwicklung, Wachstum, Grundumsatz, Stoffwechsel und Zelldifferenzierung*. Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer; 2014. p. 512-28.
16. Bizhanova A, Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*. 2009;150(3):1084-90.
17. Wolff J. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacological reviews*. 1998;50(1):89-105.
18. Zuckier LS, Dohan O, Li Y, Chang CJ, Carrasco N, Dadachova E. Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter-expressing tissues in vivo. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2004;45(3):500-7.
19. Boschi F, Pagliuzzi M, Rossi B, Cecchini MP, Gorgoni G, Salgarello M, Spinelli AE. Small-animal radionuclide luminescence imaging of thyroid and salivary glands with Tc99m-pertechnetate. *Journal of biomedical optics*. 2013;18(7):76005.
20. Brandt MP, Kloos RT, Shen DH, Zhang X, Liu YY, Jhiang SM. Micro-single-photon emission computed tomography image acquisition and quantification of sodium-iodide symporter-mediated radionuclide accumulation in mouse thyroid and salivary glands. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2012;22(6):617-24.
21. Josefsson M, Grunditz T, Ohlsson T, Ekblad E. Sodium/iodide-symporter: distribution in different mammals and role in entero-thyroid circulation of iodide. *Acta physiologica Scandinavica*. 2002;175(2):129-37.
22. Cohen BM. The ambulatory treatment of arterial hypertension and the early response to oral cryptenamine. *New York state journal of medicine*. 1955;55(5):653-8.
23. Grunberg H, Borner W. [^{99m}Tc-pertechnetate scintiscanning in the diagnosis of the diseases of the salivary glands]. *Archiv für klinische und experimentelle Ohren- Nasen- und Kehlkopfheilkunde*. 1966;187(2):714-8.
24. Mishkin FS. Radionuclide salivary gland imaging. *Seminars in nuclear medicine*. 1981;11(4):258-65.

25. Pani R, Pellegrini R, Cinti MN, Trotta C, Bennati P, Betti M, De Vincentis G, Cusanno F, Garibaldi F, Ridolfi S, Majewsky S, Tsui BM. New devices for imaging in nuclear medicine. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2004;19(1):121-8.
26. Beindorff N, Bartelheimer A, Huang K, Lukas M, Lange C, Huang EL, Aschenbach JR, Eary JF, Steffen IG, Brenner W. Normal Values of Thyroid Uptake of ^{99m}Techneium Pertechnetate SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm. *Nuklearmedizin Nuclear medicine*. 2018;57(5):181-9.
27. Spitzweg C, Morris JC. The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clinical endocrinology*. 2002;57(5):559-74.
28. Cohen B, Myant NB. Concentration of salivary iodide: a comparative study. *The Journal of physiology*. 1959;145(3):595-610.
29. Logothetopoulos JH, Myant NB. Concentration of radio-iodide and ³⁵S-thiocyanate by the salivary glands. *The Journal of physiology*. 1956;134(1):189-94.
30. Hermann GA, Vivino FB, Shnier D, Krumm RP, Mayrin V, Shore JB. Variability of quantitative scintigraphic salivary indices in normal subjects. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1998;39(7):1260-3.
31. Knudsen J, Nauntofte B, Josipovic M, Engelholm SA, Hyldegaard O. Effects of isoflurane anesthesia and pilocarpine on rat parotid saliva flow. *Radiation research*. 2011;176(1):84-8.
32. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *The Journal of physiology*. 1972;220(3):529-45.
33. Dawes C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *The Journal of physiology*. 1975;244(2):535-48.
34. Shannon IL, Suddick RP. Effects of light and darkness on human parotid salivary flow rate and chemical composition. *Archives of oral biology*. 1973;18(5):601-8.
35. Papagerakis S, Zheng L, Schnell S, Sartor MA, Somers E, Marder W, McAlpin B, Kim D, McHugh J, Papagerakis P. The circadian clock in oral health and diseases. *Journal of dental research*. 2014;93(1):27-35.
36. Lee MD, Bhakta KY, Raina S, Yonescu R, Griffin CA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Preston GM, Agre P. The human Aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(15):8599-604.
37. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(4):1908-12.

38. Krane CM, Towne JE, Menon AG. Cloning and characterization of murine Aqp5: evidence for a conserved aquaporin gene cluster. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 1999;10(5):498-505.
39. Ishii H, Nakagawa Y. Stress response to surgical procedures in the submandibular region and its influence on salivary secretion in mice. *Archives of oral biology*. 2001;46(4):387-90.
40. Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *Journal of dental research*. 1994;73(8):1416-20.
41. Vissink A, Spijkervet FK, Van Nieuw Amerongen A. Aging and saliva: a review of the literature. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 1996;16(3):95-103.
42. Azevedo LR, Damante JH, Lara VS, Lauris JR. Age-related changes in human sublingual glands: a post mortem study. *Archives of oral biology*. 2005;50(6):565-74.
43. Firat F, Cermik TF, Sarikaya A, Berkarda S. Effects of gender and age on the quantitative parameters of [99mTc]pertechnetate salivary gland scintigraphy in normal subjects. *Nuclear medicine communications*. 2006;27(5):447-53.
44. Sashima M. Age-related changes of rat submandibular gland: a morphometric and ultrastructural study. *Journal of oral pathology*. 1986;15(10):507-12.
45. Scott J. Qualitative and quantitative observations on the histology of human labial salivary glands obtained post mortem. *Journal de biologie buccale*. 1980;8(3):187-200.
46. Scott J. Quantitative age changes in the histological structure of human submandibular salivary glands. *Archives of oral biology*. 1977;22(3):221-7.
47. Scott J, Flower EA, Burns J. A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. *Journal of oral pathology*. 1987;16(10):505-10.
48. Atkinson WB, Wilson F, Coates S. The nature of the sexual dimorphism of the submandibular gland of the mouse. *Endocrinology*. 1959;65(1):114-7.
49. Raynaud J. The Action of Thyroid and Adrenal Glands on the Submaxillary Gland of Mice. *International series of monographs on oral biology*. 1964;3:47-62.
50. Lacassagne A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la souris. *Comptes Rendus des Scéances de la Société de Biologie et de ses Filiales*. 1940:180-1.
51. Fekete E. Biology of the laboratory mouse. In: Blakiston, editor. *Histology*. Philadelphia: Snell, G.D.; 1941. p. 89-167.

52. Roberts ML. Testosterone-induced accumulation of epidermal growth factor in the submandibular salivary glands of mice, assessed by radioimmunoassay. *Biochemical pharmacology*. 1974;23(23):3305-8.
53. Treister NS, Richards SM, Lombardi MJ, Rowley P, Jensen RV, Sullivan DA. Sex-related differences in gene expression in salivary glands of BALB/c mice. *Journal of dental research*. 2005;84(2):160-5.
54. Choe JK, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Progesterone and estradiol in the saliva and plasma during the menstrual cycle. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1983;147(5):557-62.
55. Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, Inenaga K. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Archives of oral biology*. 2006;51(12):1055-60.
56. Caramia F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I. Sexual differences. *Journal of ultrastructure research*. 1966;16(5):505-23.
57. Gresik EW. The postnatal development of the sexually dimorphic duct system and of amylase activity in the submandibular glands of mice. *Cell and tissue research*. 1975;157(3):411-22.
58. Franken PR, Guglielmi J, Vanhove C, Koulibaly M, Defrise M, Darcourt J, Pourcher T. 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 : official journal of the American Thyroid Association*. 2010;20(5):519-26.
59. Ramos CD, Zantut Wittmann DE, Etchebehere EC, Tambascia MA, Silva CA, Camargo EE. Thyroid uptake and scintigraphy using 99mTc pertechnetate: standardization in normal individuals. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2002;120(2):45-8.
60. Morris CJ, Aeschbach D, Scheer FA. Circadian system, sleep and endocrinology. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;349(1):91-104.
61. Haus E. Chronobiology in the endocrine system. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(9-10):985-1014.
62. Blumenthal HT. Aging processes in the endocrine glands of various strains of normal mice: relationship of hypophyseal activity to aging changes in other endocrine glands. *Journal of gerontology*. 1955;10(3):253-67.
63. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS one*. 2012;7(4):e35538.

64. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biology of reproduction*. 1982;27(2):327-39.
65. Felicio LS, Nelson JF, Finch CE. Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biology of reproduction*. 1984;31(3):446-53.
66. Erman JE, Kilheaney H, Bidwai AK, Ayala CE, Vitello LB. Peroxygenase activity of cytochrome c peroxidase and three apolar distal heme pocket mutants: hydroxylation of 1-methoxynaphthalene. *BMC biochemistry*. 2013;14:19.
67. Bonny O, Firsov D. Circadian regulation of renal function and potential role in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2013;22(4):439-44.
68. Koopman MG, Koomen GC, Krediet RT, de Moor EA, Hoek FJ, Arisz L. Circadian rhythm of glomerular filtration rate in normal individuals. *Clinical science*. 1989;77(1):105-11.
69. Armbruster H, Vetter W, Uhlschmid G, Zaruba K, Beckerhoff B, Nussberger J, Vetter H, Siegenthaler W. Circadian rhythm of plasma renin activity and plasma aldosterone in normal man and in renal allograft recipients. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association European Dialysis and Transplant Association*. 1975;11:268-76.
70. Lapidus J, Zierdt D. Compatibility of normal renal function with aging. *Jama*. 1967;201(10):778-9.
71. Klingensmith WC, 3rd, Briggs DE, Smith WI. Technetium-99m-MAG3 renal studies: normal range and reproducibility of physiologic parameters as a function of age and sex. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1994;35(10):1612-7.
72. Luippold G, Pech B, Schneider S, Osswald H, Muhlbauer B. Age dependency of renal function in CD-1 mice. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002;282(5):F886-90.
73. Neugarten J, Silbiger SR. Effects of sex hormones on mesangial cells. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1995;26(1):147-51.
74. Sakemi T, Baba N. Castration attenuates proteinuria and glomerular injury in hyperlipidemic male Imai rats. *Nephron*. 1993;64(3):429-35.
75. Sakemi T, Toyoshima H, Morito F. Testosterone eliminates the attenuating effect of castration on the progressive glomerular injury in hypercholesterolemic male Imai rats. *Nephron*. 1994;67(4):469-76.

76. Silbiger SR, Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1995;25(4):515-33.
77. Sakemi T, Toyoshima H, Shouno Y, Morito F. Estrogen attenuates progressive glomerular injury in hypercholesterolemic male Imai rats. *Nephron*. 1995;69(2):159-65.
78. Beierle I, Meibohm B, Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 1999;37(11):529-47.

4. Anteilserklärung und eidesstattliche Versicherung

4.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eleonore Huang, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Ermittlung von Normwerten des Uptakes von ^{99m}Tc-Technetium-Perotechnetat in der Schilddrüse, Parotis und in dem Submandibularen-Sublingualen-Speicheldrüsen-Komplex sowie des Uptakes von ^{99m}Tc-Mercaptoacetyltriglycin in der Niere bei Mäusen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und circadianem Rhythmus“ selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildung, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurde die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

4.2. Anteilserklärung

1. **Huang EL**, Steffen IG, Lukas M, Huang K, Aschenbach JR, Eary JF, Brenner W, Beindorff N. **Normal Values for Parotid Gland and Submandibular-Sublingual Salivary Gland Complex Uptake of ^{99m}Techneium Pertechnetate using SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm.** Nuklearmedizin. 2019 Feb;58(1):39-49. doi: 10.1055/a-0810-0174. Epub 2019 Feb 15.

Beiträge im Einzelnen:

1. Beteiligung an Planung und Durchführung der Tierversuche
 2. Auswertung der Bilddaten
 3. Interpretation der Statistikdaten
 4. Manuskripterstellung inkl. Literaturrecherche
2. Beindorff N, Bartelheimer A, Huang K, Lukas M, Lange C, **Huang EL**, Aschenbach JR, Eary JF, Steffen IG, Brenner W. **Normal Values of Thyroid Uptake of ^{99m}Techneium Pertechnetate SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm.** Nuklearmedizin. 2018 Sep;57(5):181-189. doi: 10.3413/Nukmed-0978-18-05. Epub 2018 Sep 28.

Beiträge im Einzelnen:

1. Beteiligung an Planung und Durchführung der Tierversuche
 2. Interpretation der Statistikdaten
 3. Mitwirkung als Koautor bei der Manuskripterstellung inkl. Literaturrecherche
3. Huang K, Lukas M, Steffen IG, Lange C, **Huang EL**, Dorau V, Brenner W, Beindorff N. **Normal Values of Renal Function measured with ^{99m}Techneium Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian Rhythm.** Nuklearmedizin. 2018 Dec;57(6):224-233. doi: 10.3413/Nukmed-0999-18-09. Epub 2018 Dec 18.

Beiträge im Einzelnen:

1. Beteiligung an Planung und Durchführung der Tierversuche
2. Interpretation der Statistikdaten
3. Mitwirkung als Koautor bei der Manuskripterstellung inkl. Literaturrecherche

Unterschrift, Datum und Stempel des
betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

5. Druckexemplare der Publikationen

Publikation 1

Huang EL, Steffen IG, Lukas M, Huang K, Aschenbach JR, Eary JF, Brenner W, Beindorff N. Normal Values for Parotid Gland and Submandibular-Sublingual Salivary Gland Complex Uptake of ^{99m}Techneium Pertechnetate using SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm.

Nuklearmedizin. 2019 Feb;58(1):39-49. doi: 10.1055/a-0810-0174. Epub 2019 Feb 15. PubMed PMID: 30769372.

<http://doi.org/10.1055/a-0810-0174>

Publikation 2

Beindorff N, Bartelheimer A, Huang K, Lukas M, Lange C, **Huang EL**, Aschenbach JR, Eary JF, Steffen IG, Brenner W.

Normal Values of Thyroid Uptake of ^{99m}Techetium Pertechnetate SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm.

Nuklearmedizin. 2018 Sep;57(5):181-189. doi: 10.3413/Nukmed-0978-18-05. Epub 2018 Sep 28. PubMed PMID: 30267400.

<http://doi.org/10.3413/Nukmed-0978-18-05>

Publikation 3

Huang K, Lukas M, Steffen IG, Lange C, **Huang EL**, Dorau V, Brenner W, Beindorff N.

Normal Values of Renal Function measured with ^{99m}Techneium Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian Rhythm.

Nuklearmedizin. 2018 Dec;57(6):224-233. doi: 10.3413/Nukmed-0999-18-09. Epub 2018 Dec 18. PubMed PMID: 30562811.

<http://doi.org/10.3413/Nukmed-0999-18-09>

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7. Publikationsliste (Stand: Februar 2019)

Publikationen

1. Beindorff N, Bartelheimer A, Huang K, Lukas M, Lange C, **Huang EL**, Aschenbach JR, Eary JF, Steffen IG, Brenner W. **Normal Values of Thyroid Uptake of 99mTechnetium Pertechnetate SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm.** Nuklearmedizin. 2018 Sep;57(5):181-189. doi: 10.3413/Nukmed-0978-18-05. Epub 2018 Sep 28.
Impact Factor 2017: 1,352.
2. Huang K, Lukas M, Steffen IG, Lange C, **Huang EL**, Dorau V, Brenner W, Beindorff N. **Normal Values of Renal Function measured with 99mTechnetium Mercaptoacetyltriglycine SPECT in Mice with Respect to Age, Sex and Circadian Rhythm.** Nuklearmedizin. 2018 Dec;57(6):224-233. doi: 10.3413/Nukmed-0999-18-09. Epub 2018 Dec 18.
Impact Factor 2017: 1,352.
3. **Huang EL**, Steffen IG, Lukas M, Huang K, Aschenbach JR, Eary JF, Brenner W, Beindorff N. **Normal Values for Parotid Gland and Submandibular-Sublingual Salivary Gland Complex Uptake of 99mTechnetium Pertechnetate using SPECT in Mice with Respect to Age, Sex, and Circadian Rhythm.** Nuklearmedizin. 2019 Feb;58(1):39-49. doi: 10.1055/a-0810-0174. Epub 2019 Feb 15.
Impact Factor 2017: 1,352.

Abstracts

1. Beindorff N, Bartelheimer A, Huang K, Lukas M, Lange C, **Huang EL**, Steffen IG, Brenner W. **Tc-99m-pertechnetate thyroid uptake correlates with physiological changes in estrous cycle in mice.** Nuklearmedizin 57: A22 (2018)
2. Beindorff N, **Huang EL**, Brönnner A, Huang KP, Steffen IG, Brenner W. P82: **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 (2017)
3. Beindorff N, Brönnner A, **Huang EL**, Huang KP, Lukas M, Lange C, Steffen IG, Brenner W. **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, S476 (2016)

8. Danksagung

Das Thema dieser Dissertation war ein Teilprojekt der Arbeitsgruppe „Normwerte“ des BERIC, welches zur Klinik für Nuklearmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter der ärztlichen Leitung von Prof. Dr. med. W. Brenner gehört.

Mein außerordentlicher Dank geht an meine Betreuer Prof. Dr. med. W. Brenner sowie Dr. med. vet. N. Beindorff für die Überlassung des Forschungsthemas und vor allem für die dauerhafte Unterstützung und konstruktive Kritik.

Des Weiteren danke ich vor allem K. Huang für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die Unterstützung in der Durchführung der Versuche sowie neben ihm den weiteren Mitgliedern A. Bartelheimer und V. Dorau unserer Arbeitsgruppe für die gemeinsame Arbeit und gegenseitige Unterstützung.

Weiter danke ich Dr. med. I. Steffen für die dauerhafte Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die emotionale Unterstützung während der intensiven Arbeitszeit an der Dissertation.