

**[¹²³I]-3-Iodcytisin als möglicher Radiotracer für die Darstellung der
nikotinerger Acetylcholin Rezeptoren mittels
Single-Photon-Emissions-Computertomographie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

**Dagmar Julia Paulik
Göttingen**

2015

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Stefan Guhlke
2. Gutachter: Prof. Dr. med U. Wüllner

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.03.2015

Aus Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
Direktor: Prof. Dr. Hans-Jürgen Biersack

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einführung in die Nuklearmedizin	9
1.1 Die Bedeutung der PET-Diagnostik in der Medizin	10
1.2 Einsatzgebiete und Substanzen der PET	11
1.3 Die Bedeutung der SPECT-Diagnostik in der Medizin	15
1.4 Vor- und Nachteile von SPECT und PET	18
1.5 nACh-Rezeptoren und ihre Bildgebung	19
1.6 Toxikologie von Nikotin	25
1.7 Toxikologie von Cytisin	26
2. Problemstellung	28
3. Experimenteller Teil	30
3.1 Verwendete Chemikalien	30
3.2 Analytische Verfahren und Geräte	32
3.3 Radioiodierung	33
3.3.1 Radioiodierung mit Iodogen in TFA zur Herstellung von [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	33
3.3.2 Radioiodierung mit Salpetersäure zur Herstellung von 3-[¹³¹ I]-Cytisin	33
3.4 Radiofluorierung mit [¹⁸ F] Fluor zur Herstellung von 2-[¹⁸ F]F-A-85380	34
3.5 Qualitätskontrolle mittels Radio-HPLC	34
3.6 SPE-Aufreinigung des [¹³¹ I]-3-Iodcytisins	35
3.7 Autoradiographie	36

3.8	Intravenöse Applikation und Präparation der Mäuse	36
3.9	Injektion von 2-[¹⁸ F]F-A-85380	37
3.9.1	Injektion von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 ohne Nikotin	37
3.9.2	Injektion von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 mit Nikotin	38
3.10	Injektion von [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	38
3.10.1	Injektion von [¹³¹ I]-3-Iodcytisin ohne Nikotin	38
3.10.2	Injektion von [¹³¹ I]-3-Iodcytisin mit Nikotin	38
3.11	Metabolitenbestimmung	39
4.	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1	Radioiodierung von Cytisin	41
4.1.1	Radioiodierung mit Iodogen	42
4.1.2	Radioiodierung mit Salpetersäure	43
4.2	Formulierung des [¹³¹ I]-3-Iodcytisin und 2-[¹⁸ F]F-A-85380	44
4.3	Verwendete Kennzahlen	45
4.4	Autoradiographie	46
4.5	Injektion von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 und [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	49
4.5.1	2-[¹⁸ F]F-A-85380 und [¹³¹ I]-3-Iodcytisin mit und ohne subkutane Nikotininjektion	50
4.5.1.1	2-[¹⁸ F]F-A-85380 ohne subkutane Nikotininjektion	50
4.5.1.2	2-[¹⁸ F]F-A-85380 mit subkutaner Nikotininjektion	53
4.5.1.3	[¹³¹ I]-3-Iodcytisin ohne subkutane Nikotininjektion	55
4.5.1.4	[¹³¹ I]-3-Iodcytisin mit subkutaner Nikotininjektion	57
4.5.2	Die Aktivitätsanreicherung von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 und [¹³¹ I]-3-Iodcytisin im Hirngewebe	59
4.5.2.1	2-[¹⁸ F]F-A-85380 Anreicherung im Hirngewebe	59
4.5.2.2	[¹³¹ I]-3-Iodcytisin Anreicherung im Hirngewebe	62
4.6	Vergleich von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 und [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	65
4.6.1	Vergleich von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 und [¹³¹ I]-3-Iodcytisin in den Organen	65

4.6.2	Vergleich von 2-[¹⁸ F]F-A-85380 und [¹³¹ I]-3-Iodcytisin im Hirn	67
4.7	Metabolitenbestimmung	69
5.	Zusammenfassung	73
6.	Verzeichnis der Tabellen	75
7.	Verzeichnis der Abbildungen	77
8.	Literaturverzeichnis	80
	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Erkrankung
ADS	Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom
A-84543	3-[1-methyl-2-(S)-pyrrolidinylmethoxy]pyridin
A-85380	[3-(2(S)-azetidylmethoxy) pyridindihydrochlorid]
Bq	Becquerel= Zerfälle/s
β^+	Betaplusteilchen
CaCl₂	Calciumchlorid
Ce	Cerebellum
C₁₀H₁₄N₂	Nikotin
CH₂Cl₂	Methylenchlorid
CO₂	Kohlendioxid
Co	Cortex
CPM	Counts per minute
CT	Computertomographie
C-14	Kohlenstoff-14
Da	Darm
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fe	Femur
¹⁸F-FDG	[¹⁸F]-Fluordesoxyglucose
[¹⁸F]NFEP	[¹⁸F]norchlorfluorepibatidin
[¹⁸F]-FMISO	[¹⁸F]-Fluormisonidazol
[¹⁸F]-6-Fluoro-DOPA	[¹⁸F]-6-Fluoro-Dihydroxyphenylalanin
[¹⁸F]FPH	[(+/-)-exo-2-(2-[¹⁸F] fluoro-5-pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1] heptan
HCl	Salzsäure
He	Herz
Hi	Hirn
HNO₃	Salpetersäure

HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
Hs	Hirnstamm
HWZ	Halbwertszeit
H-3	Wasserstoff-3
H₂O	Wasser
Iv	Intravenös
¹²³I-IBZM	[¹²³I] –Iodbenzamide
% ID/g	Prozent injizierter Dosis pro Gramm
KCl	Kaliumchlorid
keV	kilo Elektronenvolt
Le	Leber
Lu	Lunge
M	Molar
Ma	Magen
MeCN	Acetonitril
MgCl₂	Magnesiumchlorid
Mi	Milz
MRT	Magnetresonanztomographie
nAChR	nikotinerger Acetylincholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
n.c.a.	No carrier added
Ni	Nieren
PBS-Puffer pH 7,4	Phosphate buffer saline (Natriumdihydrogenphosphat /Natriumhydrogenphosphat-Puffer und Kochsalzlösung)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.i.	Post injectionem
Pufferlösung pH 1	Glycin-Salzsäure
SepPak QMA	Anionentauscher Kartusche
SepPak QMA-light	Anionentauscher (mit geringem Bettvolumen)
SepPak CM-light	Kationentauscher (mit geringem Bettvolumen)

SepPak C18	Reversed Phase Kartusche
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
T	Thalamus
^{99m}Tc	Technetium-99m
^{99m}Tc-ECD	Technetium-99m Ethyl Cystin Dimer
^{99m}Tc-HMPAO	Technetium-99m-hexamethylpropyleneamin-oxim
TEAP	Triethylamin 0,11M, H₃PO₄ 0,15M
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
¹³³Xe-NaCl	Xenon-133-Natrium Chlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einführung in die Nuklearmedizin

Nuklearmedizin ist ein „Teilgebiet der Medizin, das sich mit der Verwendung von Radionukliden in Diagnostik und Therapie beschäftigt“ (Reuter, 2007). Ihr Ursprung geht zurück auf die Entdeckung der Röntgenstrahlung durch Konrad Röntgen im Jahre 1895 und die Entdeckung der radioaktiven Strahlung durch Henry Becquerel im Jahre 1896. Beide Forscher erhielten für ihre Arbeiten jeweils den Nobelpreis für Physik (Röntgen, 1901; Becquerel, 1903).

Ihre Entdeckungen eröffneten den Weg für die Nutzung von Tracern in der Nuklearmedizin. Die erste Anwendung der Radioaktivität in Form eines Tracers erfolgte durch den ungarischen Chemiker und Nobelpreisträger (1943) George de Hevesy, wenn auch noch nicht im Bereich der Medizin. Als er seine Vermieterin einmal in Verdacht hatte, die Reste des Sonntagsessens während der Woche wiederzuverwerten, mischte er in geringer Menge ein radioaktives Isotop unter die sonntäglichen Essensreste, um sie dadurch zu überführen. Sein Verdacht wurde bestätigt, als er daraufhin in späteren Mahlzeiten Radioaktivität nachweisen konnte. Dafür setzte ihn seine Vermieterin unverzüglich auf die Straße.

Die von de Hevesy angewandte Methode, mit der chemische Elemente durch die Beimischung ihrer radioaktiven Isotope analytisch gekennzeichnet werden, wurde später als ‚Tracermethode‘ bezeichnet. Am Anfang wurden Tracer mit den beiden langlebigen Radionukliden Wasserstoff-3 und Kohlenstoff-14 markiert, um erste biochemische Stoffwechselprozesse zu identifizieren. Mittlerweile lassen sich auf der Grundlage dieses Prinzips unterschiedliche biochemische Prozesse im menschlichen Körper darstellen.

Hierbei wird einem Menschen eine geringe radioaktive Stoffmenge verabreicht. Dabei kann es sich um eine radioaktiv markierte, körpereigene oder auch körperfremde Substanz handeln, die am Stoffwechsel des Körpers teilnimmt. Wegen der äußerst geringen Menge beeinflussen sie nicht die Stoffwechselprozesse im Körper, doch können durch diese Tracer unterschiedliche Untersuchungen/Beobachtungen des interessierenden Organs mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) oder planaren Aufnahmen außerhalb des Körpers vorgenommen werden. Die Entwicklung neuartiger Radiopharmaka, die wie Sonden dem Arzt Erkenntnisse über die Funktion von Enzymen, Botenstoffen und anderen Stoff-

wechsellvorgängen liefern, bewirkte in den letzten Jahrzehnten einen beträchtlichen Fortschritt in der Nuklearmedizin (Universitätsklinikum Düsseldorf, 2005).

1.1 Die Bedeutung der PET-Diagnostik in der Medizin

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist eine Methode, die es ermöglicht, biochemische und physiologische Vorgänge durch minimal invasive Eingriffe im menschlichen Körper von außen zu betrachten (Wienhard et al., 1999). Sie ist ein rechnergestütztes Schichtaufnahmeverfahren der Szintigraphie, bei der die Strahlung der inkorporierten Radionuklide mit Hilfe von Ringdetektoren oder einer Koinzidenz-Gammakamera gemessen wird und zur Berechnung von Schnittbildern der zu untersuchenden Organe dient.

Zur Anwendung der PET werden Positronenstrahler eingesetzt. Beim β^+ -Zerfall gehen instabile neutronenarme Atomkerne in einen stabileren Energiezustand über. Dabei wird im Atomkern ein Proton in ein Neutron umgewandelt, wobei gleichzeitig ein Betaplusteilchen/Positron (β^+) und ein Neutrino (ν) emittiert werden. Die Anzahl der Nukleonen im Kern bleibt dabei unverändert und nur die Ordnungszahl erniedrigt sich um eine Einheit.



Die kinetische Energie, die beim Beta-Zerfall frei wird, verteilt sich auf das Positron und das Neutrino. Trifft ein Positron, nachdem es seine kinetische Energie verloren hat, auf ein negativ geladenes Elektron, vereinigen sie sich und die Massen der beiden Teilchen wandeln sich in elektromagnetische Strahlung um (Annihilation, Vernichtungsstrahlung); dabei entstehen zwei Photonen, die je einer Energie von 511 keV (entspricht jeweils der Energie der Ruhemasse eines Beta-Teilchens) aufweisen und dabei in 180° entgegengesetzter Richtung emittiert werden. Diese Vernichtungsstrahlung kann mit gegenüberliegenden Detektoren, die außerhalb des Körpers angebracht werden, in zeitlicher Koinzidenz nachgewiesen werden. Dabei kann aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung dieser registrierten Zerfallsereignisse auf die räumliche Verteilung des Radiopharmakons im Körperinneren geschlossen und eine Serie von Schnittbildern errechnet werden. Dieser Vorgang ist die Grundlage der PET-Diagnostik (Lange, 2001; Schicha und Scho-

ber, 2003). Für die PET-Aufnahme wird dem Patienten ein Radiopharmakon, das einen Positronenstrahler chemisch gebunden enthält, intravenös injiziert. Dabei lässt sich mittels Bildrekonstruktionsmethoden der Computertomographie die Aktivitätsverteilung in Schichten berechnen.

Eine PET-Kamera besteht aus vielen kleinen Detektoren, die ringförmig um den Patienten angeordnet sind. Es sind dabei mehrere Ringsysteme zusammengefasst, um gleichzeitig die Darstellung in mehreren Schichtebenen zu erhalten und als 3 dimensionales Bild rekonstruieren zu können. Die PET-Scanner können nicht nur statische Aufnahmen erstellen, sondern auch dynamische Prozesse qualitativ und quantitativ erfassen. In der klinischen Anwendung ergänzt die PET die stärker strukturell orientierten bildgebenden Verfahren der diagnostischen Radiologie. Da bei der PET-Diagnostik die Beobachtung der Stoffwechselfvorgänge im Organismus möglich ist, erlaubt sie Diagnose, Staging, Verlaufsbeobachtung und Therapieplanung von Erkrankungen und gesundheitlichen Störungen.

Dass die PET eine absolute quantitative Messung der Aktivitätsanreicherung im Körper erlaubt, ist ein entscheidender messtechnischer Vorteil gegenüber der Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT).

Die in der PET angewendeten Isotope weisen i.A. sehr kurze Halbwertszeiten auf (Minuten- wenige Stunden), woraus eine geringe Strahlenbelastung für die Patienten resultiert. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit müssen die Isotope für die PET-Diagnostik vor Ort bzw. in unmittelbarer Nähe hergestellt werden. Es bedarf daher eines Zyklotrons in räumlicher Nähe für den anwendenden Mediziner, falls die Verwendung von sehr kurzlebigen Isotopen, wie z.B. ^{15}O , ^{11}C oder ^{13}N vorgesehen ist.

1.2 Einsatzgebiete und Substanzen der PET

Die Mehrzahl körpereigener Stoffe sind organische Moleküle, die aus C-, H-, N-, O, P- und S-Atomen aufgebaut sind. In der nuklearmedizinischen Funktionsdiagnostik ist für die Markierung von Radiopharmaka der formale Austausch eines dieser Atome in geeigneten Verbindungen gegen chemisch identische Radioisotope, wie ^{11}C (HWZ=20,3 Minuten), ^{13}N (HWZ=10 Minuten), ^{15}O (HWZ= 2,1 Minuten) oder ^{30}P (HWZ= 2,5 Minuten) besonders, geeignet. Der Organismus kann nicht zwischen inaktiven und radioaktiv

markierten Tracern unterscheiden. Deshalb verhalten sich die markierten Substanzen, abgesehen von vernachlässigbaren Isotopieeffekten, im Organismus identisch und nehmen ebenso an natürlichen und pathogenen Stoffwechselprozessen teil. Die Radiopharmaka selbst haben in der Regel keinen Einfluss auf den Stoffwechsel im Körper, da die applizierten Substanzmengen gewöhnlich im nano-bis picomolaren Bereich liegen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten dieser Radioisotope sind jedoch zeitaufwendige, umfangreiche Synthesen nicht möglich. Lediglich die HWZ des Kohlenstoff-11 (HWZ=20,3 Minuten) erlaubt komplexere Radiosynthesen und somit die Darstellung einer Vielzahl ^{11}C -markierter Substanzen, die in der Nuklearmedizin ihren Nutzen gefunden haben, wie zum Beispiel das $[^{11}\text{C}]$ -S-Methyl-L-Acetat zur Visualisierung des Sauerstoffverbrauchs des Herzmuskels und das $[^{11}\text{C}]$ -S-Methyl-L-Methionin zur Sichtbarmachung der Proteinsynthese bei der Diagnostik von niedriggradig maligner Gliome. Für zeitaufwendigere Synthesen oder langsamere in vivo Pharmakokinetiken werden etwas langlebigere Radionuklide genutzt, insbesondere das ^{18}F (HWZ= 109 Minuten). Die Markierung mit diesen Radionukliden basiert oft auf sterischen und/oder chemischen Analogien des Radioisotops zu der zu ersetzenden Gruppe oder Atome (Struktur-Analog-Prinzip). Es lassen sich z.B. Wasserstoffatome/Hydroxidgruppen gut gegen ^{18}F (analog) ersetzen, da Fluor eine sterische Analogie zu Wasserstoff und eine chemische Analogie zur Hydroxidgruppe besitzt. Brom und Iod weisen hingegen eine sterische Analogie zu Methylgruppen auf.

Das Glukoseanalogon ^{18}F -FDG ist der in der PET-Diagnostik am häufigsten genutzte Tracer. FDG wird in größeren Umfang kommerziell hergestellt. Der wesentliche Grund für die diagnostische Sonderstellung der FDG in der PET beruht auf der in vivo Verteilung. FDG wird wie Glukose via Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen und ebenso wie Glukose zu FDG-Phosphat phosphoryliert. Im Gegensatz zu Glukose wird FDG aber nicht weiter metabolisiert, sondern in den Zellen akkumuliert (metabolic trapping). Dieser Anreicherungsmechanismus ermöglicht quantitative regionale Messungen von Zucker verbrauchenden biologischen Vorgängen durch die PET.

^{18}F -FDG wird überwiegend in der Onkologie angewendet, findet sich aber auch in der Neurologie und Kardiologie. Die FDG eignet sich aufgrund des erhöhten Glukosestoffwechsels der malignen Tumoren hervorragend zur Diagnostik solcher Erkrankungen. Es

ermöglicht die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren sowie nach Blessing et al. (1995) zur Differenzierung zwischen Narbengewebe und vitalem Gewebe. Des Weiteren wird die PET in der Rezidiv- wie auch in der Therapieverlaufskontrolle eingesetzt (Damian et al., 1996). Die PET-Diagnostik wird aber auch zur Untersuchung der Stoffwechselleistung des Gehirns und verschiedener anderer Organe verwendet. Der Energiebedarf des Gehirns wird vor allem durch den oxidativen Abbau der Glukose gedeckt. Unter physiologischen Bedingungen ist der Energiestoffwechsel und die Durchblutung an den Gewebezustand des Gehirns gekoppelt; daher erlauben Untersuchungen des Stoffwechsels von Glukose und Sauerstoff und der Durchblutung mittels PET Aussagen über die Gehirnstrukturen, so dass die Untersuchungsergebnisse Rückschlüsse auf lokale Ausfälle und pathologische Mechanismen ermöglichen, wie M. Alzheimer, M. Parkinson und Epilepsie sowie bei Hirninfarkt, Trauma, demenziellen Erkrankungen und Enzephalitis (Singhal, 2012; Tai et al., 2004).

Nach Biersack et al. (2000) bietet die PET der SPECT gegenüber nicht nur den Vorteil, dass sie eine höhere räumliche Auflösung und Quantifizierbarkeit der gemessenen Parameter erlaubt, sondern sie eröffnet auch die Möglichkeit, dass z.B. in der „subakuten“ Phase des Schlaganfalls, die sehr variabel sein kann, neben der Durchblutung u. a. auch der regionale Sauerstoffverbrauch durch Inhalation von radioaktivem Sauerstoff und die lokale Glukoseutilisation durch ^{18}F -FDG gemessen werden kann.

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Isotope. Es soll vorweg das Isotop ^{18}F hervorgehoben werden, da es nicht nur eine zur Diagnostik sehr geeignete Halbwertszeit aufweist, sondern auch durch seine niedrige β^+ Energie zur besten Ortsauflösung unter den gelisteten Isotopen führt.

Tab. 1: Medizinisch häufig angewendete Radionuklide und ihre Zerfallsdaten (Chu et al., 1999)

Radionuklid	Zerfall/Zerfallsart und (Häufigkeit %)	Halbwertszeit	Energie des abgestrahlten Teilchens in MeV
Kohlenstoff ^{11}C	β^+ (99,8) EC (0,2)	20,38 Minuten	1,2
Fluor ^{18}F	β^+ (96,9) EC (0,2)	109,7 Minuten	0,6
Stickstoff ^{13}N	β^+ (100)	10,1 Minuten	1,2
Sauerstoff ^{15}O	β^+ (99,9) EC (0,1)	2,03 Minuten	1,8
Gallium ^{68}Ga	β^+ (90) EC (10)	68 Minuten	1,8
Rubidium ^{82}Rb	β^+ (96) EC (4)	1,25 Minuten	3,3
Iod ^{124}I	β^+ (25) EC (75)	4,18 Tage	2,13
Kupfer ^{62}Cu	β^+ (98) EC (2)	9,7 Minuten	2,9
Kupfer ^{64}Cu	β^+ (39) EC (61)	12,7 Stunden	0,65

Tab. 2: Anwendungsgebiete einiger PET-Radiopharmaka (Brandau et al., 2001)

Radiopharmaka	Hauptanwendung
1-[¹¹ C]-Acetat	Myokardialer Sauerstoffverbrauch
Methyl-[¹¹ C]-Flumazenil	Benzodiazepinrezeptoren: Dichte und Funktion
[¹³ N]-Ammoniak	Myokardperfusion
[¹⁵ O]-Wasser	Perfusion
[¹⁸ F]-Fluorid	Knochenstoffwechsel
[¹⁸ F]-FDG	Glukosetransport (und –phosphorylierung)
[¹⁸ F]-FMISO	Sauerstoffmangel (Hypoxie)
[¹⁸ F]-6-Fluoro-DOPA	Präsynaptischer Dopamin-Pool + Amino- säuretransport
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTATOC/DOTATATE	Neuroendokrine Tumore (Onkologie)
[¹⁸ F]-FET/[¹¹ C]-Methionin	Hirntumore/ Glioblastom, Neuroblastom

1.3 Die Bedeutung der SPECT-Diagnostik in der Medizin

In den letzten 20 Jahren hat sich die Single–Photon–Emissions–Computertomographie zu einer Routinediagnostik in der Nuklearmedizin entwickelt. Sie ermöglicht die Bildgebung im lebenden Organismus entsprechend der Verteilung des Radiopharmakons in vivo. Je nach Wahl des Radiopharmakons kann eine Beurteilung der Funktion von bestimmten Organen durchgeführt werden.

Zu Beginn der Untersuchung wird dem Patienten ein Radiopharmakon appliziert, das ein Radionuklid beinhaltet, welches idealerweise Gammastrahlen zwischen 100 und 300 keV emittiert, die mittels einer Gammakamera detektiert werden. Dabei rotieren Detekto-

ren um den Körper, die die zeitliche und räumliche Verteilung des Radiopharmakons registrieren. Mit diesen Informationen können Schnittbilder rechnerisch erstellt werden.

Man kann zwischen einer statischen und einer dynamischen SPECT-Untersuchung unterscheiden. Bei der statischen Untersuchung wird die Verteilung des Radiopharmakons zu einem bestimmten Zeitpunkt aufgenommen. Bei der dynamischen Untersuchung werden dagegen Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten, in Abstand von Stunden oder Tagen durchgeführt, und somit die zeitliche Änderung der Verteilung des Radiopharmakons erfasst und beurteilt.

Die SPECT wird unter anderem zur Untersuchung des Herzens genutzt, und zwar zur Beurteilung der Vitalität des Myokards. Das dabei verwendete Radionuklid ist meist ^{99m}Tc , das nach seiner Entdeckung im Jahr 1962 zum wichtigsten SPECT-Nuklid der Diagnostik geworden ist. ^{99m}Tc wird aus $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ Generatoren gewonnen und ist somit jederzeit in den Kliniken oder Praxen verfügbar. Durch seine 140 keV Gammalinie ist das ^{99m}Tc fast ideal für die in den Gammakameras verwendeten Natriumiodid-Detektoren. Unter Verwendung entsprechender Radiopharmaka können auf diese Weise das Gehirn, die Lunge, die Leber, die Gallenblase, der Pankreas, das Knochengewebe, die Nieren, die Schilddrüse und das Herz untersucht werden.

Die Skelettszintigraphie wird unter Verwendung von ^{99m}Tc markierten Phosphonaten zur Suche nach Regionen mit verändertem Knochenstoffwechsel genutzt.

Die Octreotid-SPECT wird im Rahmen der Somatostatinrezeptorzintigraphie bei endokrinen Tumoren und die MIBG-SPECT u.a. bei andrenergen Tumoren, z.B. des Nebennierenmarks (das sogenannte Phäochromozytom), genutzt.

Unter den radioaktiven Isotopen des Iods wird vor allem ^{123}I zur Diagnostik verwendet. Das ^{123}I wird als Iodid zur Diagnostik der Schilddrüse genutzt, es ist aber auch das radioaktive Nuklid im MIBG, welches zur Diagnostik von Tumoren eingesetzt wird. Das ^{123}I hat eine Halbwertszeit von 13,02 Stunden, was zeitaufwendige Synthesen aber auch eine längere in vivo Messung oder längere Transporte zulässt. Durch eine γ -Linie von 159keV ist es ebenfalls gut für die SPECT geeignet.

Ein wesentlicher Vorteil der SPECT-Diagnostik ist, dass die Kosten der Radiopharmaka niedriger und ihre Handhabung sowie die Herstellung der Radiopharmaka leichter sind. Die Entwicklung von PET-Radiopharmaka fördert auch die Entwicklung von entsprechenden SPECT-Radiopharmaka und umgekehrt.

In den angegebenen Tabellen sind einige Beispiele für Isotope und Radiopharmaka in der SPECT–Diagnostik angegeben:

Tab. 3: Einige Beispiele für Isotope in der SPECT – Diagnostik mit ihren Halbwertszeiten, die sich für zeitaufwendige Synthesen, längere in vivo Messungen oder längere Transporte eignen.

Radioisotope	Halbwertszeit
^{99m}Tc	6 Stunden
^{123}I	13,02 Stunden
Seltener genutzt: ^{133}Xe	5,27 Stunden
^{111}In	2,81 Tage

Tab. 4: Einige Beispiele für Radiopharmaka in der SPECT – Diagnostik (Horti und Villemagne, 2006; Otte und Halsband, 2006)

Radiopharmaka	Einsatzgebiet
^{99m}Tc -HMPAO ^{99m}Tc -ECD ^{133}Xe -NaCl	Durchblutung des Hirns
$^{99m}\text{TcO}_4$	Schilddrüse
^{99m}Tc -Bisphosphonate	Skelettszintigrafie
^{99m}Tc -Octreotide	Tumore
^{99m}Tc -MIBI	Herz (Myokardbildgebung)
^{123}I -Iomazenil	Benzodiazepinrezeptoren
^{123}I -IBZM	Dopamin-D2-Rezeptoren
^{123}I - α -Methyl-Tyrosin	Proteinmetabolismus

1.4 Vor- und Nachteile von SPECT und PET

Der Unterschied zwischen SPECT und PET liegt im Kameraprinzip. Der Hauptvorteil der SPECT gegenüber der PET sind die Kosten. Die SPECT-Kamera kostet nur etwa ein Fünftel des Preises einer PET-Kamera. Des Weiteren benötigt man zur Herstellung der PET-Tracer ein Zyklotron mit erfahrener Personal in der Nähe, da die meisten PET-Radionuklide eine kurze Halbwertszeit haben, wie z.B. ^{18}F : 110 Minuten, ^{11}C : 20 Minuten. Im Gegensatz dazu ist die Herstellung von SPECT-Tracern weniger kostspielig, u.a. wegen der Verfügbarkeit von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ über Generatoren, außerdem muss die Herstellung nicht vor Ort stattfinden, da die zur Diagnostik genutzten Radionuklide eine längere Halbwertszeit besitzen, wie z.B. ($^{99\text{m}}\text{Tc}$: 6 h, ^{123}I : 13 h). Aus diesem Grunde sind die mit diesen Nukliden markierten Pharmaka zugänglicher für die Routinediagnostik.

Durch die SPECT kann z.B. noch Stunden nach der Injektion eines Tracers ein statisches Bild des Hirns erzeugt werden. Dies hat einige Vorteile bei der Diagnostik von bestimmten Zuständen im Gehirn, z.B. in der Epilepsie-Diagnostik oder in der Schlafforschung (Otte et al., 2002; Otte et al., 2003). Darüber hinaus ist die radioaktive Strahlungsdosis für den Patienten bei den SPECT-Gammastrahler meist etwas niedriger im Vergleich zur PET trotz längerer Halbwertszeiten wie z.B. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6h), da sie sonst keine Emission haben.

Ein Nachteil der SPECT-Diagnostik gegenüber der PET-Diagnostik sind zum einen die unterlegene Bildgebungsqualität aufgrund der niedrigeren Bildauflösung und Sensitivität. Außerdem ist die Auswahl der Radionuklide, die in der SPECT genutzt werden können, begrenzt und finden sich nicht natürlicherweise in organischen Biomolekülen. Tc ist als Metall nur über Chelatoren an Biomoleküle zu markieren, während Iod markierte Moleküle häufig unter Instabilität in vivo leiden. Hingegen lassen sich körpereigene Substanzen mit PET-Nukliden entweder identisch oder aber nur im geringen Maße verändert markieren, wie z.B. Kohlenstoff sowie Fluor. PET-Isotope können daher fast jedes organische Molekül markieren (Otte und Halsband, 2006).

1.5 nACh-Rezeptoren und ihre Bildgebung

Umfassende Diagnostik ist ohne den Gebrauch von bildgebenden Verfahren kaum mehr denkbar. Die moderne Bildgebung erlaubt einen Einblick in den Körper ohne invasive bzw. minimal invasive Methoden. Man kann z.B. chemische Stoffe bis ins Hirn verfolgen und Informationen über sich dort abspielende biochemische Prozesse gewinnen.

Bei der Bildgebung von Strukturen bzw. Organen nutzt man gewöhnlich das Röntgengerät, das CT oder das MRT. Durch die SPECT, die PET und teilweise auch das MRT können biochemische Prozesse im Körper tomographisch dargestellt werden. In den letzten 20 Jahren hat sich die SPECT- und die PET-Diagnostik sehr stark weiterentwickelt, besonders im Bereich der Forschung an zentralen und peripheren Nervenrezeptoren *in vivo*.

Die Möglichkeit der Bildgebung von zentralen nACh-Rezeptoren durch PET und SPECT kann zur Überwachung als auch bei der Behandlung einer Reihe von ZNS-Erkrankungen dienen, wie z.B. Alzheimer oder Parkinson, bei denen es zum Untergang von u.a. cholinergen und dopaniergen Neuronen im Hirn kommt (O'Brien, 2007; Ogawa et al., 2009).

Zentrale nACh-Rezeptoren sind pentamere Komplexe, die verschiedene Protein-Untereinheiten umfassen. Sie sind eine Untergruppe der von Liganden gesteuerten Ionenkanäle. Einige charakteristische Eigenschaften haben sie mit den Glycin abhängigen Ionenkanälen, den γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren, den Glutamat-gesteuerten Ionenkanälen und den Serotonin-Rezeptoren gemeinsam. Bis zum heutigen Tag wurden α , β , γ , δ und ϵ Untereinheiten für nACh-Rezeptoren gefunden und isoliert. Es handelt sich dabei um Untereinheiten der neuromuskulären Verbindungen. Die Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 9$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ sind hauptsächlich innerhalb des Nervensystems gefunden worden. Die nACh-Rezeptoren sind allosterische Oligomere und kommen in verschiedenen Konformationszuständen vor. Sie umfassen den Ruhezustand, den offenen Kanal und den Refraktärzustand. Das pharmakologische Profil der nACh-Rezeptoren hängt vom Subtyp mit seinen Protein-Untereinheiten ab. Durch die experimentelle Bindung von radioaktiv markierten Liganden konnten eine Reihe von nACh-Rezeptor-Subtypen im ZNS identifiziert werden. Unter den nACh-Rezeptoren im menschlichen Hirn haben die Subtypen $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 7$ die höchste Konzentration. Diese zwei Subtypen unterscheiden sich in ih-

rer Affinität für verschiedene Liganden und haben spezifische regionale Verteilungen. Sie sind beide an verschiedenen kognitiven Prozessen im Hirn beteiligt. Die zentralen nACh-Rezeptoren sind u.a. beteiligt an Alzheimer- und Parkinsonerkrankungen, ADS (Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom), Hyperaktivität, Tourettesyndrom, Schizophrenie, Depression und Tabakabhängigkeit (Wu et al. 2010).

Die Visualisierung von zentralen nACh-Rezeptoren mit den bildgebenden Verfahren PET und SPECT waren zunächst begrenzt durch den Mangel an geeigneten radioaktiv markierten Liganden. [^{11}C]-(-)-Nikotin war der erste nACh-Rezeptor-Tracer, der für die in vivo Bildgebung entwickelt wurde; aufgrund von Metabolismus besitzt er ein hohes Ausmaß an nichtspezifischen Bindungen in vivo, was den Gebrauch bei Untersuchungen an lebenden Objekten begrenzt.

In den letzten Jahren wurde eine Anzahl von Liganden mit teilweise hohen Affinitäten für den $\alpha 4\beta 2$ Subtyp der nACh-Rezeptoren gefunden. Diese beinhalten Nikotin-Analoga, Epibatidine (ein Alkaloid vom Dendrobatid Giffrosch und seine Analoga) sowie 3-Pyridylether-Verbindungen.

Bis jetzt hat sich die Entwicklung von in vivo radioaktiv markierten Liganden auf die nACh-Rezeptoren besonders auf den $\alpha 4\beta 2$ Subtyp konzentriert. Von den neu entwickelten nACh-Liganden mit Potential eignen sich vor allem ^{18}F , ^{76}Br und ^{123}I markierten Analoga des 3-Pyridylether A-85380 zur Markierung und Bildgebung.

Die optimale Auswahl der Liganden für die in vivo Bildgebung ist einer der wichtigsten und zugleich einer der kritischsten Schritte in der Entwicklung neuer Radiopharmaka. Wichtige Kriterien bei der Rezeptorszintigraphie sind z.B. hohe Selektivität und Stereoselektivität bei der Bindung sowie die nano- oder subnanomolare Bindungsaffinität zu den Rezeptoren in vivo, da die neuronalen nACh-Rezeptoren im Gehirn eine relativ geringe Dichte haben.

Als Maziere et al. (1976) das [^{11}C]-(-)-Nikotin 1976 hergestellt hatten, wurde es für Untersuchungen von Nikotin in vivo und seiner Folgen im menschlichen Körper bei Rauchern verwendet sowie zur Diagnostik von Diabetes insipidus genutzt. Es konnte eine hohe Anreicherung von [^{11}C]-(-)-Nikotin innerhalb von 5 Minuten in den Nieren von Mäusen beobachtet werden, gefolgt vom Hirn, der Leber und der Lunge. Man fand außerdem einen schnellen Abfall der Konzentration im Hirn (46 % in 10 Minuten) und

eine rapide Oxidation von [^{11}C]-(-)-Nikotin zu [^{11}C]-Cotinine. Aufgrund dessen wurde vorgeschlagen, [^{11}C]-(-)-Nikotin als einen in vivo Tracer zu Studien von tabakinduzierten Schäden der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität und zur Diagnostik von Papillennekrosen der Nieren aufgrund der hohen Anreicherung zu nutzen. 1982 gelang es Langström et al. (1982) die Racematen [^{11}C]-(+)-(R)-Nikotin und [^{11}C]-(-)-(S)-Nikotin herzustellen. Der erste Anlauf, nikotinische Rezeptoren in vivo im Hirn darzustellen, wurde an Affen unternommen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Enantiomeren in der regionalen Verteilung der Radioaktivität im Hirn; während der Peak nach der Verabreichung von [^{11}C]-(+)-(R)-Nikotin im Hirn höher lag, war der Aktivitätsabfall vom [^{11}C]-(+)-(R)-Nikotin im Gegensatz zu dem [^{11}C]-(-)-(S)-Nikotin schneller. In Untersuchungen an Menschen zeigte das [^{11}C]-(-)-Nikotin einen uptake Peak im Hirn nach 1-2 Minuten und einen schnellen Abfall innerhalb von 25-30 Minuten. Die schnelle Aktivitätsauf- und abnahme von [^{11}C]-(-)-Nikotin ins Hirn wird hauptsächlich über den Blut-Hirn-Fluss bestimmt. Die schnelle Metabolisierung zu $^{11}\text{CO}_2$, führte außerdem zu einer Bildüberlagerung mit [^{11}C]- CO_2 und Nikotin. Deshalb ist das [^{11}C]-(-)-Nikotin kein geeigneter Tracer für die Bildgebung von Nikotinrezeptoren im Hirn in vivo. Die Ergebnisse aus den Studien über Alzheimer Erkrankungen spiegeln wahrscheinlich den neuronalen Verlust und den verminderten Blutfluss wider. Grünwald et al. (1996) betrachteten drei fundamentale Aussagen über Nikotinrezeptorfunktionen: Erstens, [^{11}C]-(-)-Nikotin besitzt Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Rezeptoren. Zweitens, die frühe Verteilung vom [^{11}C]-(-)-Nikotin ist entsprechend an den lokalen Blutfluss gebunden. Drittens, die späte Verteilung repräsentiert Metabolite, wie z.B. markierte Cotinine. Eine kontinuierliche Gabe könnte eine alternative Methode sein, aber auch den Anteil an Metaboliten steigern. Grünwald et al. (1996) fassten zusammen, dass das [^{11}C]-(-)-Nikotin kein geeigneter Tracer für die Bildgebung in vivo ist.

Flesher et al. (1994) nutzten als eine der ersten Cytisin als Vorlage für neue Tracer der nACh-Rezeptoren. Dabei prüften sie die Kinetik, Inhibition und das Sättigungsprofil in CD-1 Mäusen von [^3H] Cytisin. Man fand heterogene Verteilungsmuster der Radioaktivität nach 30 Minuten, mit der höchsten Konzentration im Thalamus und einer langsamen Clearance. Das Verhältnis von spezifischen zu nicht spezifischen Bindungen stieg innerhalb von 2 Stunden. Da N-methyl-cytisin eine höhere Affinität für nACh-Rezeptoren

im Hirn als [^3H] Cytisin aufwies, wurde N-[^{11}C]methyl-cytisin von Valette et al. (1997) hergestellt und untersucht.

N-[^{11}C]methyl-cytisin zeigte eine langsame und niedrige Aufnahme in das Hirn von Affen: Jedoch konnte nach der Injektion von N-[^{11}C]methyl-cytisin kein signifikanter Aktivitätsunterschied zum Plasma gefunden werden. Der maximale Peak der Konzentrationsaufnahme im Hirn ist bei Affen niedriger als bei Mäusen. Die regionale Verteilung von N-[^{11}C]methyl-cytisin im Hirn war homogen und zeigte keinen Unterschied in der Aktivität in den verschiedenen Regionen des Hirns. Somit war das N-[^{11}C]methyl-cytisin auch kein geeigneter Ligand für die Abbildung der nACh-Rezeptoren im Hirn durch PET.

Nach der Entdeckung des Epibatidins (einem Alkaloid, das aus der Haut eines ecuadorianischen Giffrosches extrahiert wurde) haben etliche Forschergruppen neue Analoga des Epibatidins als Tracer zur Bildgebung der nACh-Rezeptoren im Hirn untersucht. [^3H]Epibatidin selbst bindet mit einer extrem hohen Affinität an $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren. In ex vivo Studien zeigte [^3H]Epibatidin eine hohe Aktivitätsaufnahme im Hirn von Mäusen, mit einer regionalen Verteilung entsprechend der dortigen nACh-Rezeptorenverteilung. Im Vergleich zu den nikotinmarkierten Tracern konnte gleichzeitig eine langsamere Abnahme der Aktivität im Hirn beobachtet werden. Man versprach sich dabei viel von markierten ^{11}C , ^{18}F und ^{123}I Epibatidinanaloga in der Bildgebung.

Die ^{18}F markierten Epibatidinanaloga [^{18}F]FPH und [^{18}F]NFEP wurden von zwei Forschungsgruppen Ding et al. (1999); Liang et al. (1997) zur gleichen Zeit entwickelt. Beide Gruppen beobachteten eine hohe Aufnahme und eine langsame Abnahme der Tracer im Thalamus in ihren PET-Studien von Pavianen. Aber sie ermittelten unterschiedliche Werte in Bezug auf die Halbwertszeit der Clearance, wobei als Grund insbesondere der Einfluss von Prä- oder Komedikation in Betracht gezogen werden muss. Obwohl das [^{18}F]FPH und das [^{18}F]NFEP vielversprechende Tracer für die zentralen nACh-Rezeptoren sind, gibt die extrem hohe Toxizität von Epibatidinen Anlass, noch weitere Untersuchungen bezüglich der toxischen Effekte der Fluorverbindungen durchzuführen (Molina et al., 1997). Die Abbott Laboratorien entwickelten eine Serie von 3-Pyridyl-ethern, die ebenfalls eine hohe Affinität zu nACh-Rezeptoren im Hirn aufwiesen. Da diese Verbindungen weniger Nebenwirkungen und toxische Effekte zeigen als Epibatidine, wirken sie vielversprechend in der Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung von

Alzheimer und Schmerzen. Der erste Tracer, der zur in vivo Studie der zentralen nACh-Rezeptoren entwickelt wurde, hatte 3-Pyridyl-ether als Vorlage und wurde von Kaasiou et al. (1997) synthetisiert: das A-84543. Er zeigte bei der Untersuchung an Mäusen eine niedrigere spezifische Bindung im Vergleich zu den Epibatidinen, aber im Gegensatz dazu auch eine wesentlich niedrigere Toxizität. Diese Entdeckung förderte die Entwicklung weiterer PET- und SPECT-Tracer aus dieser Serie zur Untersuchung von zentralen nACh-Rezeptoren.

Bei der weiteren Entwicklung von 3-Pyridyl-ether Verbindungen hat man sich besonders auf Halogene als Substituenten am Pyridylrest konzentriert. Für diesen Zweck wurde ein 3-Pyridyl-ether mit einer Azetidin-Struktur, das A-85380, genutzt. Das A-85380 weist im Hirn von Ratten eine sehr hohe Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren auf. Die PET- und ein SPECT-Tracer, die auf dem A-85380 basieren sind das 2- und 6-Fluoro-A85380 sowie das 5-Bromo- und 5-Iodo-A-85380. Sie wurden mit den entsprechenden Nukliden ^{18}F , ^{76}Br und ^{123}I synthetisiert. Das 2- ^{18}F -, das 6- ^{18}F -, das 5- ^{76}Br - und das ^{123}I -A-85380 zeigten eine starke Aufnahme ins Hirn mit hoher Konzentration an den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren auf.

Dolle et al. (1999) fanden in ex vivo Untersuchungen an Ratten heraus, dass die Kinetik des 2- ^{18}F -A-85380 im Thalamus und Cerebellum durch Isofluran verändert wird. Die Aufnahme wurde bis zu 50 % herabgesetzt, und die Zeit-Aktivitätskurve erschien flacher. Die Clearance im Thalamus und im Cerebellum war schneller bei Gebrauch von Isofluran als Anästhetikum als ohne. Das 2- ^{18}F -A-85380 erfüllt die Hauptkriterien als radioaktiv markierter Ligand für die Bildgebung in vivo (Chefer et al., 1999). Es hat eine hohe Affinität zu den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren, überwindet die Blut-Hirn-Schranke, konzentriert sich in den Regionen im Hirn mit der höchsten Dichte an $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren und interagiert mit diesen für mehr als 4 Stunden und zeigt ein reversibles Bindungsverhältnis. Die in vitro Verteilung der Radioaktivität in den Blutkompartimenten zeigte, dass 80 % der totalen Radioaktivität im Plasma nicht an das Plasmaprotein gebunden ist und somit frei zur Verfügung steht, um ins Hirn zu gelangen. Das 2- ^{18}F -A-85380 löste bei Mäusen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen aus, wie Krämpfe oder Tod. Dennoch zeigte sich in der Untersuchung von Pavianen ein langsamer metabolischer Prozess beim zusätzlichen Gebrauch von Isofluran als Anästhetikum, bei dem etwa 60 % noch nach 40-80 Minuten p.i. unverändert im Plasma vorlagen. In der Serie

der 3-Pyridyl-ether wurde ebenfalls das 6-[¹⁸F]-A-85380 für die in vivo Bildgebung der zentralen nACh-Rezeptoren hergestellt (Koren et al., 2000; Horti et al., 2000). 6-[¹⁸F]-A-85380 bindet nach verschiedenen Verdrängungsstudien spezifisch und reversibel an zentrale nACh-Rezeptoren in vivo. Wie das 2-[¹⁸F]-A-85380 besitzt auch das 6-[¹⁸F]-A-85380 eine geringere Toxizität als das FPH, das Fluoroanalogon der Epibatidine.

5-[¹²³I]Iodo-A-85380 ist der erste und derzeit auch der einzige SPECT-Tracer in der 3-Pyridyl-ether Serie (Gündisch, 2000). Es weist die vergleichsweise niedrigste Toxizität in dieser Serie auf. Das 5-Iodo-A-85380 wurde auch für in vitro und in vivo Untersuchungen entwickelt, und zwar für audiographische Bindungsuntersuchungen. In ex vivo Untersuchungen zeigte sich, dass das 5-Iodo-A-85380 eine hohe Affinität zu den zentralen Rezeptoren besitzt und sich besonders in den Regionen mit einer hohen Dichte an $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren konzentriert. Die höchste Konzentration war im Thalamus aufzufinden, eine moderate Konzentration im Cortex und die niedrigste Konzentration im Cerebellum. Nebenbei zeigt sich beim 5-Iodo-A-85380 eine hohe Subtypen-Selektivität mit einer höheren Affinität (K_i) zu $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren als zu den $\alpha 3\beta 4$, den $\alpha 7$ oder den $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ Subtypen im Vergleich zu den auf dem Epibatidin basierenden Tracern. Aber auch das 2-[¹⁸F]-A-85380 zeigt eine höhere Affinität (K_i) zu den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren als die auf Epibatidin basierenden Tracer. Bei Verdrängungsstudien mit Cytisin an Affen deutet sich an, dass 5-Iodo-A-85380 auch reversibel bindet (Kimes et al., 2003).

Wüllner et al. (2008) konnten mittels 2-[¹⁸F]-A-85380 in vivo zeigen, dass die Dichte der $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren im Hirn von Rauchern erhöht sind. Vor allem im Cerebellum und Hirnstamm.

5-Iodo-A-85380 und 2-[¹⁸F]-A-85380 wurden bereits in PET und SPECT Studien bei Patienten eingesetzt. Da gegenwärtig noch zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen potentiellen Tracern durchgeführt werden, ist in nächster Zeit mit der Veröffentlichung weiterer Ergebnisse zu rechnen (Kuruville et al., 2014; Pérez et al., 2012).

1.6 Toxikologie von Nikotin

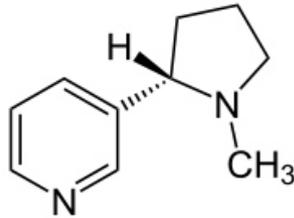


Abb. 1: Struktur des Nikotins

Nikotin ist ein Alkaloid mit der Summenformel $C_{10}H_{14}N_2$; es hat bei Zimmertemperatur eine flüssig-ölige Konsistenz und verfärbt sich unter Lufteinfluss bräunlich. Der Geruch erinnert an Tabak. Zudem ist es ein starkes Gift. Für einen nicht an Nikotin gewöhnten Menschen kann die einmalige Gabe von 60 mg tödlich wirken. Toxische Dosen führen zu zentraler Erregung und zur Atemlähmung sowie zum Kreislaufkollaps.

Nikotin entfaltet seine Wirkung im ZNS und an den nikotineren Cholinrezeptoren (Ganglien, Nebennierenmark, Muskelendplatte), woher diese auch ihren Namen haben. Während geringe Dosen anregend sind, wirken hohe Dosen paralytisch. Nach Nikotinaufnahme kommt es zu einer vorwiegend parasymphatischen Stimulation des Verdauungstrakts (Sekretion, Peristaltik) und zu einer vorwiegend sympathischen Stimulation des Herzkreislaufsystems (Blutdruckanstieg). Bei regelmäßigen Rauchern entwickelt sich eine Toleranz und Abhängigkeit, wobei das Abhängigkeitspotential mit dem von Opiaten vergleichbar ist (Wikimedia Foundation Inc., 2007).

1.7 Toxikologie von Cytisin

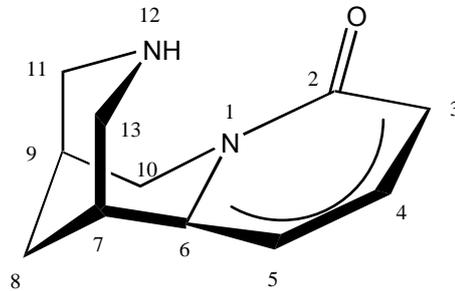


Abb. 2: Struktur des Cytisins

Cytisin gehört ebenfalls zur Gruppe der Alkaloide. Es ist ein Pflanzenbestandteil des Goldregens und in allen Pflanzen der Gruppe *Laburnum anagyroides* enthalten. Cytisin aus gekauten Pflanzenteilen kann zu schweren Vergiftungen führen, vor allem bei Kindern. Die ersten Symptome setzen bereits $\frac{1}{4}$ bis 1h nach der oralen Aufnahme Cytisin haltiger Pflanzenteile ein: Brennen im Mund, Speichelfluss, Übelkeit, Erbrechen, Durst, Schweißausbrüche, Schwindel, Mydriasis. Zusätzlich sind Herzfrequenz und Blutdruck erhöht. Folge höherer Intoxikationen sind zudem tonisch-klonische Krämpfe und Halluzinationen bis hin zum Kollaps. Muskellähmung kann schließlich zum Tod durch Atemlähmung führen.

Cytisin ist ein Ganglienblocker mit sehr ähnlichem Wirkungsprofil wie Nikotin. Angriffspunkt von Cytisin ist der nikotinerge Acetylcholinrezeptor. Im Zentralnervensystem führt dessen Blockade durch Cytisin erst zur Erregung, dann zur Lähmung (Urhahn, 1999). Halogenierte Cytisinanaloga an den Positionen 3,5 oder 3 und 5 am 2-Pyridon-Gerüst zeigen eine besonders hohe Affinität zu $(\alpha 4)_2 (\beta 2)_3$ nACh-Rezeptoren und zum $\alpha 7$ nACh-Rezeptor. Die 3-Halocytisine weisen eine subnanomolare Affinität zu $(\alpha 4)_2 (\beta 2)_3$ nACh-Rezeptoren auf, die höher ist als diejenige, die für (-)-Cytisine und auch für 5-Halocytisine sowie 3,5-Dihalocytisine gefunden wurde (Imming et al., 2001). Es besteht die Hoffnung, dass Liganden, die eine hohe agonistische Affinität zu nACh-Rezeptoren haben, möglicherweise als Therapeutikum genutzt werden können, und zwar in der Behandlung von psychischen Erkrankungen, die mit der Abnahme von cholinergen Funk-

tionen zu tun haben: wie z.B. bei Demenz vom Alzheimer Typ, Parkinson, Tourette Syndrom, Depressionen, Colitis ulcerosa uvm.

Tab. 5: Affinitäten der Cytisinderivate zu nACh-Rezeptor Subtypen (Imming et al., 2001). Dabei weisen die 3-Halocytisine eine höhere subnanomolare Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren auf als 5-Halocytisine und 3,5-Dihalocytisine.

Cytisinderivat	Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ k_i (nM)	Affinität zu $\alpha 7$ k_i (nM)
3-Iodcytisin	0,017± 0,002	1,5± 0,1
5-Iodcytisin	0,230± 0,02	21± 2
3,5-Diiodcytisin	0,520± 0,015	41± 2
3-Bromcytisin	0,010± 0,001	2,0± 0,3
5-Bromcytisin	0,308± 0,014	28± 2
3,5-Dibromcytisin	10,8± 0,4	1,500

2. Problemstellung

Radioaktiv markierte nikotinerge Acetylcholinrezeptorliganden sind geeignet, diese Rezeptoren und deren Veränderungen bei neurodegenerativen Erkrankungen mittels PET oder SPECT darzustellen. 2-[¹⁸F]F-A-85380 ist ein bekannter Tracer, welcher eine hohe Affinität zu den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren im Hirn aufweist (Ding et al., 1996; Horti et al., 1998). Hierbei besteht das Problem bezüglich der Herstellungsverfahren und deren Kosten. Zur Durchführung der Diagnostik mit 2-[¹⁸F]F-A-85380 benötigt man für die Synthese ein Zyklotron vor Ort, da die Halbwertszeit von ¹⁸F mit 110 Minuten relativ kurz ist. Nicht an jeder Klinik ist ein für die Darstellung notwendiges PET-Gerät vorhanden und die zusätzlich langsame in vivo Kinetik verhindert eine Routine-Anwendung.

Als Alternative soll in dieser Arbeit die Eignung des Tracers 3-Iodcytisin untersucht werden, welcher in vitro ebenfalls eine hohe Affinität zu den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren aufweist (Imming et al., 2001). Ein Vorteil von [¹²³I]-3-Iodcytisin besteht in der längeren Halbwertszeit von ca. 13 Stunden. Dementsprechend müsste [¹²³I]-3-Iodcytisin nicht vor Ort hergestellt werden. Zur bildgebenden Diagnostik nach der in vivo Markierung der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren würde sich hierfür die SPECT eignen, die an vielen Krankenhäusern zur Verfügung steht.

Zielsetzung dieser Doktorarbeit sind ex vivo und in vitro Untersuchungen mit [¹²³I]-3-Iodcytisin für den Einsatz in der SPECT als eine potenzielle Alternative zu 2-[¹⁸F]F-A-85380 in der PET. Dabei sind folgende Aspekte von besonderem Interesse:

- Besseres Verständnis des Verhaltens im Körper von [¹²³I]-3-Iodcytisin im Vergleich zu 2-[¹⁸F]F-A-85380, wie die Affinität zu den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren und in vivo Kinetiken
- Verteilung von [¹²³I]-3-Iodcytisin und 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Körper und Hirn sowie die Frage nach der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke
- Untersuchung potentieller Nebeneffekte, d.h. die Bildung von Metaboliten

- Die Verdrängung mit Nikotin an den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren

Für die Untersuchung dieser Aspekte wird folgendes Vorgehen gewählt:

Anstelle des ^{123}I wird das ^{131}I als Radionuklid verwendet, da abgesehen von dem vernachlässigbaren Isotopieeffekt das chemisch pharmakologische Verhalten identisch ist und die längere Halbwertszeit für Laboruntersuchungen geeigneter ist.

Für die Herstellung von [^{131}I]-3-Iodcytisin werden zwei Verfahren der Radioiodierung angewandt:

Radioiodierung mit Iodogen in TFA und Radioiodierung mit Salpetersäure als Oxidationsmittel. Diese werden im Hinblick auf Ausbeute an [^{131}I]-3-Iodcytisin und Entstehung von Nebenprodukten miteinander verglichen.

Nach Herstellung der Tracer wird zunächst durch eine Autoradiographie in vitro überprüft, wie das [^{131}I]-3-Iodcytisin in den verschiedenen Hirnregionen bindet. In einem zweiten Schritt werden die Tracer in vivo an den Versuchstieren weiter untersucht. Dieser Schritt gliedert sich in zwei Teile:

- Die Lokalisierung der zu untersuchenden Tracer im Körper, um Erkenntnisse über die Biodistribution, die Rezeptordichte, Verdrängung bzw. Reversibilität und Metabolisierung der Tracer zu den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren zu erhalten.
- Die Lokalisierung der zu untersuchenden Tracer im Hirn, um Erkenntnisse über die Spezifität sowie die Stabilität der Traceranlagerung an die $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren zu erhalten.

3. Experimenteller Teil

Die hier beschriebenen Experimente wurden in dem Zeitraum von Juli 2005 bis November 2006 unter den Bedingungen, die für den Strahlenschutz und den tierexperimentellen Vorschriften gelten, durchgeführt (Aktenzeichen: 50.203.2-BN, 26/03). Dabei wurden die Laborräume des Instituts für Nuklearmedizin der Universität Bonn genutzt.

3.1 Verwendete Chemikalien

Die in Tab. 6 aufgeführten Chemikalien wurden hauptsächlich für die HPLC, zur Radioiodierung, zur Radiofluorierung und zur Pufferherstellung verwendet.

Zur vollständigen Übersicht werden die Chemikalien, deren Hersteller sowie teilweise die Qualität und ihre unterschiedlichen Anwendungen in den durchgeführten Untersuchungen zusammengestellt.

Tab. 6: Verwendete Chemikalien in den durchgeführten Untersuchungen

Chemikalie	Qualität/Anwendung
Acetonitril	<ul style="list-style-type: none"> • 99,9 % • Laufmittel der HPLC • Radiofluorierung
Alkalische Bisulfitlösung	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese und Qualitätskontrolle
Calciumchlorid (CaCl ₂)	<ul style="list-style-type: none"> • Pufferherstellung
Cytisin (Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese • > 99,9 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
Ethanol	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
¹⁸ F (WCG Bonn)	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese

F-A-85380 (ABX Radeberg)	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese
Hepes	<ul style="list-style-type: none"> • Pufferherstellung
¹³¹ I (Amersham)	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese
I-Cytisin (Pharmazeutische Chemie, Uni-Bonn)	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese
Iodogen	<ul style="list-style-type: none"> • Radioiodierung
Isofluran	<ul style="list-style-type: none"> • Narkose der Mäuse
Kaliumcarbonat	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
Kaliumchlorid (KCl)	<ul style="list-style-type: none"> • Pufferherstellung
Kryptofix	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
LiChrosolv Wasser	<ul style="list-style-type: none"> • Chromatographie
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	<ul style="list-style-type: none"> • Pufferherstellung
Methylenchlorid (CH ₂ Cl)	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
Nikotin	<ul style="list-style-type: none"> • Injektion der Mäuse
Natriumchlorid (NaCl)	<ul style="list-style-type: none"> • Pufferherstellung
Natriumhydrogencarbonat	<ul style="list-style-type: none"> • SPE-Aufreinigung
Precursor (2-Nitro-3-(1-tert-butoxycarbonyl-2(S)-acetidinylmethoxy)-pyridin)	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
PBS-Puffer pH 7,4 (Natriumdihydrogenphosphat/Natriumhydrogenphosphat)	<ul style="list-style-type: none"> • SPE-Aufreinigung
Pufferlösung pH 1 (Glycin-Salzsäure)	<ul style="list-style-type: none"> • +/-0,02 (20°C) • Synthese

Salzsäure	<ul style="list-style-type: none"> • 1 N • SPE-Aufreinigung
Salpetersäure	<ul style="list-style-type: none"> • 64-66 % • Radioiodierung
SepPak QMA	<ul style="list-style-type: none"> • SPE-Aufreinigung
SepPak QMA-light	<ul style="list-style-type: none"> • SPE-Aufreinigung
SepPak CM-light	<ul style="list-style-type: none"> • SPE-Aufreinigung
SepPak C18	<ul style="list-style-type: none"> • Radiofluorierung
Trifluoressigsäure	<ul style="list-style-type: none"> • 99,8 % • Radiofluorierung und Radioiodierung

3.2 Analytische Verfahren und Geräte

Die Aktivitäten der synthetisierten Verbindungen sowie der Organe wurden mittels Gammacounters bzw. Curiemeters gemessen und mittels HPLC charakterisiert. Zur Auftrennung des Plasmas und der übrigen Blutbestandteile wurde vor den Messungen eine Zentrifuge genutzt.

Dazu wurden folgende Geräte benutzt:

- Analytische High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC):
 - Kontron Instruments Pump System 322
 - Agilent 1100 Serie Variabler Wellenlängendetektor
 - Radioaktivitätsdetektor von raytest Modell GABI STAR
 - RP18-Säule (LiChrospher 100)
 - Software GINA STAR
- Gammacounter:

- Wallace Wizard 1480-011
- Zentrifuge:
 - Heraeus Instruments sepatech
 - Megafuge 1.0R
- Curiemeter:
 - Biodex Medical System
 - ATOMLAB 100plus Dose
- Analytische Feinwaage:
 - Sartorius 1207 MP
- Radioaktivitäts-Imagingplatte für Phosphorimager
 - Fuji BAS 1800

3.3 Radioiodierung

Für die Herstellung von [¹³¹I]-3-Iodcytisin wurden zwei Verfahren der Radioiodierung angewandt und in Hinblick auf Ausbeute an [¹³¹I]-3-Iodcytisin und Entstehung von Nebenprodukten miteinander verglichen.

3.3.1 Radioiodierung mit Iodogen in TFA zur Herstellung von [¹³¹I]-3-Iodcytisin

Es wurden 8,5 µmol (1,6 mg) (-)-Cytisin in 350 µl Trifluoressigsäure in einem Wheaton-Vial gelöst. Dann wurde 100 µl (1-3 MBq) n.c.a. [¹³¹I]-Iodid in wässriger Lösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µmol (430 µg) Iodogen in 50 µl TFA bei 105°C gestartet. Nach 30 Minuten wurden 100 µl entnommen und das Lösungsmittel mit Helium vertrieben. Der Rückstand wurde in 100 µl Wasser gelöst und mit 100 µl 0,066 M alkalischer Bisulfitlösung versetzt. Daraus wurde ein Aliquot von 20 µl entnommen und mittels HPLC analysiert (vgl. Abb. 6).

3.3.2 Radioiodierung mit Salpetersäure zur Herstellung von 3-[¹³¹I]-Cytisin

Zur Radioiodierung mit Salpetersäure wurden 8,5 µmol (1,6 mg) (-)-Cytisin mit 200 µl pH 1 Pufferlösung in einem Wheaton-Vial versetzt. Nach Zugabe von 30 - 50 MBq n.c.a.

[¹³¹I]-Iodid in 100 µl wässriger Lösung wurden weiterhin 200 µl 2N HNO₃ hinzugefügt. Der Kolben wurde dicht verschlossen in einen Heizblock gestellt und sein Inhalt bei 105°C für 45 Minuten gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 150 µl Aliquot entnommen, mit 50 µl Bisulfitlösung versetzt und durch HPLC analysiert (vgl. Abb. 7).

3.4 Radiofluorierung mit [¹⁸F] Fluor zur Herstellung von 2-[¹⁸F]F-A-85380

Es wurden 530 MBq wässrige n.c.a. [¹⁸F]-Fluoridlösung auf die QMA-light-Kartusche (Anionentauscher) fixiert, die zuvor mit 10 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat, 10 ml H₂O und 20 ml Luft konditioniert wurde. Die QMA-light-Kartusche wurde mit einer Lösung aus 100 µl 0,266 M Kaliumcarbonatlösung, 900 µl Acetonitril und 23 - 26 mg Kryptofix in einem Wheaton-Vial eluiert. Die erhaltene [¹⁸F]-Fluoridlösung wurde im Heliumstrom bei ca. 90°C unter sukzessiver Zugabe von 2 ml Acetonitril getrocknet. Anschließend wurden 2 mg 2-Nitro-3-(1-tert-butoxycarbonyl-2(S)-azetidylmethoxy)-pyridin (Precursor) in 500 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, dem Rückstand hinzugefügt und bei 155°C für 20 Minuten gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml H₂O zugegeben und die Reaktionslösung über eine mit 10 ml Ethanol und 10 ml H₂O konditionierte C18 Sep-Pak-Kartusche eluiert. Die Aktivität auf der C18 Sep-Pak-Kartusche wurde im Curiemeter gemessen und dann mit 1 ml Methylenchlorid (CH₂Cl₂) herunter gewaschen (50 % der Anfangsaktivität, nicht zerfallskorrigiert). Zu dem Methylenchlorid (CH₂Cl₂) wurden 0,2 ml Trifluoressigsäure hinzugefügt und auf einem Heizblock bei 90°C im Helium-Strom für 10 Minuten gerührt, um die Schutzgruppe abzuspalten. Nach verdampfen der Lösungsmittel wurde das Produkt mittels HPLC (Acetonitril/TEAP pH 2,5: 0/100) für die in vitro/ex vivo Versuche gereinigt (Schmaljohann et al., 2004).

3.5 Qualitätskontrolle mittels Radio-HPLC

Die Reaktionsgemische wurden mit Hilfe der HPLC analysiert. Der Vergleich der Retentionszeiten der radioaktiven Peaks mit den UV-Retentionszeiten der inaktiven Standards erlaubte die Zuordnung der n.c.a. Verbindungen.

Aus dem Aliquot der oben beschriebenen synthetisierten [^{131}I]-3-Iodcytisin wurden jeweils etwa 5 μl entnommen, mit 5 μl 0,66 M alkalischer Bisulfidlösung sowie mit 10 μl PBS pH 7,4 versetzt und über die HPLC aufgetrennt.

Die HPLC-Analyse wurde mit einem Gradienten von 0:100 \rightarrow 40:60 (MeCN/TFA 0,1 %) in 30 Minuten durchgeführt (Flow 1 ml/min). Das Produkt [^{131}I]-3-Iodcytisin besitzt eine Retentionszeit von 15 Minuten. Für die Reinigung des Produktes für die nachfolgende Autoradiographie bzw. für die Behandlung der Mäuse erfolgte die analoge Auftrennung mit ca. 1/3 des Ansatzes.

3.6 SPE-Aufreinigung des [^{131}I]-3-Iodcytisins

Zur Aufreinigung der HPLC-Fraktion des [^{131}I]-3-Iodcytisins (s. 3.5.) wurden eine CM-light- und eine QMA-Kartusche konditioniert. Hierzu wurden erst 10 ml H_2O zum Anfeuchten gegeben. Danach wurde die CM-light-Kartusche mit 20 ml Salzsäure (HCl 0,1 M) und die QMA-Kartusche mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (NaHCO_3) konditioniert. Beide Kartuschen wurden jeweils mit 40 ml Wasser (H_2O) gespült. Die aufgesammelte HPLC-Fraktion wurde über die konditionierten Kartuschen in folgender Reihenfolge gegeben:

1. QMA,
2. CM-light.

Nebenprodukte und Reagenzien wurden entweder von der QMA zurückgehalten oder überhaupt nicht retardiert, während das Produkt [^{131}I]-3-Iodcytisin auf der CM-light-Kartusche getrappt wurde. Die CM-light-Kartusche wurde mit PBS-Puffer eluiert und das Eluat in Fraktionen zu je 2-3 Tropfen aufgefangen.

Die Fraktion mit der höchsten Aktivität wurde per HPLC auf Reinheit untersucht und danach für die Autoradiographie bzw. zur Injektion der Mäuse verwendet.

3.7 Autoradiographie

Bei der Autoradiographie wurden Hirnschnitte von CD1 Ratten und Wildtypmäusen untersucht und die Intensität der [^{131}I]-3-Iodcytisin-Anreicherung im Thalamus, Striatum und Cortex gemessen. Zur Versuchsdurchführung wurde ein Puffer hergestellt, indem folgende Substanzen in LiChrosolv-Wasser gelöst wurden:

- 15 mM Hepes
- 120 mM Natriumchlorid
- 5,4 mM Kaliumchlorid
- 0,8 mM Magnesiumchlorid
- 1,8 mM Calciumchlorid

Die Hirnschnitte von CD1 Ratten und Wildtypmäusen wurden in dem hergestellten Puffer gewässert. Nach 5 Minuten wurden die Schnitte entnommen und in eine Inkubationskammer mit einer Lösung aus dem hergestellten Puffer und ca. 400 kBq [^{131}I]-3-Iodcytisin inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 70 Minuten. Danach wurden die Schnitte für zweimal 2 Minuten mit Puffer und einmal für 2 Minuten mit 4°C kaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie getrocknet und zur Belichtung auf eine Phosphor Imagingplatte (Fuji BAS 1800) gelegt. Die Auswertung der Aktivitätsverteilung erfolgte mit der AIDA-Software (raytest GmbH) (vgl. Abb. 8 und Abb. 9).

3.8 Intravenöse Applikation und Präparation der Mäuse

Für die Versuche wurden weibliche 30g schwere CD-1-Mäuse ausgesucht. 50 μl der Produktlösung wurden in einer Spritze aufgezogen. Davon wurden 25 μl als Aliquot zur Referenzbestimmung im Gammacounter gemessen und die anderen 25 μl mit einer Aktivität von ca. 50 kBq wurden über die Schwanzvene der Maus appliziert. Diese wurde dafür in einen Mausinjektor fixiert und die Schwanzvene mit einer Wärmelampe erwärmt.

Entsprechend dem unten genannten zeitlichen Ablauf wurden die Tiere nach Isofluranarkose durch Genickbruch getötet. Im Anschluss daran wurden alle für die Untersuchung relevanten Organe sowie Hirn und Hirnregionen entnommen. Die Masse der einzelnen Präparate wurde bestimmt und deren Radioaktivität im Gammacounter gemessen. Die prozentuale injizierte Dosis wurde als Quotient der Dosis des zu untersuchenden Organs in Counts per minute (cpm) durch die Differenz der injizierten Dosis in cpm und der verbliebenen cpm im Schwanz der Maus ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der injizierten Dosis pro Gramm des Organs angegeben (% ID/g).

Es handelt sich dabei um folgende entnommenen Organe:

- Herz, Lunge, Leber, Magen, Darm, Nieren, Milz, Knochen, Schwanz, Blut sowie das Hirn als ganzes und seine Teilstrukturen:
 - Thalamus,
 - Hirnstamm,
 - Cerebellum,
 - Cortex.

3.9 Injektion von 2-[¹⁸F]F-A-85380

Bei dieser Untersuchung sollte die Wirkung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 sowohl ohne als auch mit Nikotinsubstitution auf die $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren beobachtet werden.

3.9.1 Injektion von 2-[¹⁸F]F-A-85380 ohne Nikotin

Wie oben beschrieben wurde den Mäusen 2-[¹⁸F]F-A-85380 intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden zu den Zeitpunkten 60 und 180 Minuten getötet und die oben aufgelisteten Organe entnommen. Die Organe wurden gewogen und ihre Aktivität wurde im Gammacounter gemessen (vgl. Abb. 10 und Abb. 20).

3.9.2 Injektion von 2-[¹⁸F]F-A-85380 mit Nikotin

Zur Hemmung der nACh- Rezeptoren in vivo wurde den Mäusen 5 Minuten vor der Injektion von 2-[¹⁸F]F-A85380 100 µl Nikotin (5 mg Nikotin auf 1 ml H₂O) subkutan in den Nacken injiziert. Die Tiere wurden nach 60 Minuten getötet und die Organe wie oben beschrieben gemessen (vgl. Abb. 13 und Abb. 19).

3.10 Injektion von [¹³¹I]-3-Iodcytisin

Vergleichbar mit dem Versuch zuvor wird hier zwischen der Injektion von [¹³¹I]-3-Iodcytisin sowohl mit als auch ohne Nikotinsubstitution unterschieden.

3.10.1 Injektion von [¹³¹I]-3-Iodcytisin ohne Nikotin

Dabei wurde den Mäusen [¹³¹I]-3-Iodcytisin wie oben beschrieben in die Schwanzvene injiziert, und die Tiere wurden zu den Zeitpunkten 15, 60, 120, 180 und 240 Minuten getötet. Die Organe wurden entnommen, gewogen und ihre Aktivität im Gammacounter gemessen (vgl. Abb. 14 und Abb. 22).

3.10.2 Injektion von [¹³¹I]-3-Iodcytisin mit Nikotin

5 Minuten vor der Injektion von [¹³¹I]-3-Iodcytisin wurde den Mäusen 100 µl Nikotin (5 mg Nikotin auf 1 ml H₂O) subkutan in den Nacken injiziert. Die Tiere wurden nach 120 Minuten getötet und die Organe, wie in 3.8 beschrieben, gemessen (vgl. Abb. 17).

Tab. 7: Aufschlüsselung der Anzahl von Versuchstieren

Zeitpunkt der Untersuchung	Injektion von $2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{F-A-85380}$ in Tieren ohne Nikotin	Injektion von $2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{F-A-85380}$ in Tieren mit Nikotin	Injektion von $^{131}\text{I}]\text{-3-Iodcytisin}$ in Tieren ohne Nikotin	Injektion von $^{131}\text{I}]\text{-3-Iodcytisin}$ in Tieren mit Nikotin
15 Minuten	-	-	5	-
60 Minuten	5	2	9	-
120 Minuten	-	-	7	4
180 Minuten	3	-	7	-
240 Minuten	-	-	2	-

Zu den Tierzahlen siehe Tab. 7: Die Anzahl der Tiere wurde aus Tierschutzgründen so gering wie möglich gehalten. Aus diesem Grund wurden nur wenige Tiere für die Versuche mit $2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{F-A-85380}$ eingesetzt, da hier schon Daten aus der Literatur vorliegen und man für diese Arbeit nur einen Vergleichsstandard haben wollte.

Es wurden nur wenige Zeitpunkte für diejenigen Tiere ausgewählt, die zuvor Nikotin injiziert bekommen hatten, da hier keine Kinetik zu erwarten war. Es sollte jedoch der Anteil der spezifischen Bindungen nachgewiesen werden.

Ausserdem konnten aus unterschiedlichen Gründen (wie Messfehler, vor Injektion verstorbene Tiere) nicht alle Tiere ausgewertet werden, was dazu führte dass die Anzahl der erfaßten Tiere zu den verschiedenen Zeitpunkten variiert.

3.11 Metabolitenbestimmung

Nach 120 Minuten wurde den Mäusen, denen zuvor $^{131}\text{I}]\text{-3-Iodcytisin}$ injiziert wurde, Blut entnommen und für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde das Plasma von den

Feststoffen getrennt. 200 µl Plasma wurden auf die HPLC-Säule aufgetragen und chromatographisch aufgetrennt. Das HPLC-Chromatogramm wurde mit einem Gradienten von 0:100 → 40:60 (MeCN/TFA 0,1 %) 30 Minuten aufgenommen (vgl. Abb. 26 und Tab. 11). Als Vergleichschromatogramm wurden 50 µl des Blutplasmas mit [¹³¹I]-3-Iodcytosin gemischt und per HPLC-Säule mit dem o.g. Gradienten untersucht (vgl. Abb. 27).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Radioiodierung von Cytisin

Cytisin ist eine tricyclische Verbindung aus einem Bispidin-Gerüst und einem 2-Pyridon-Glied, dessen 3. und 5. Position bevorzugter Angriffspunkt elektrophiler Substitutionen sind (vgl. Tab. 5).

Die Ladungsverteilungen im (-)-Cytisin bilden mesomere Grenzstrukturen, welche semiaromatische Eigenschaften aufweisen. Iod-Derivate des Cytisins sind 3- und 5-Iod-Cytisin, wobei das 3-Iod Cytisin die höhere Affinität zu $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren (vgl. Tab. 5) besitzt. Es ist also der bevorzugte Tracer für eine Markierung.

Durch die höhere Ladungsdichte der Carbonylgruppe des 2-Pyridons (Özbolat, 2004) ist die Position 3 stärker aktiviert als die 5, so dass erwartet wird, dass 3-Iod Cytisin bevorzugt bei der elektrophilen Substitution gebildet wird.

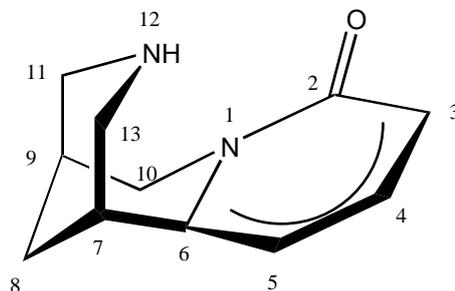


Abb. 3: Struktur des Cytisins mit mesomeren Grenzstrukturen

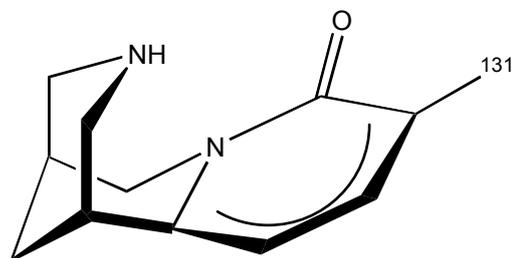


Abb. 4: Struktur des 3-Iod Cytisins

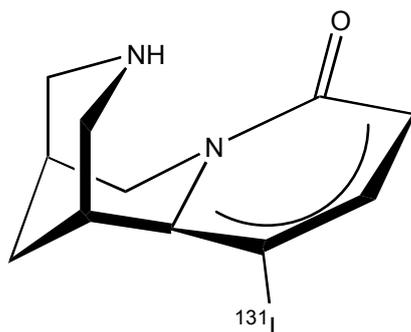


Abb. 5: Struktur des 5-Iod Cytisins

Bei der Herstellung von [^{131}I]-3-Iodcytosin versucht man diese Eigenschaften auszunutzen, um eine möglichst hohe Ausbeute von [^{131}I]-3-Iodcytosin und eine möglichst geringe Verunreinigung durch [^{131}I]-5-Iodcytosin zu erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu zwei Verfahren untersucht, nämlich die Radioiodierung mit Iodogen in TFA und die Radioiodierung mit Salpetersäure als Oxidationsmittel.

4.1.1 Radioiodierung mit Iodogen

Die direkte Radioiodierung des (-)-Cytisins mittels Iodogen wurde in Trifluoressigsäure (TFA) als Lösungsmittel durchgeführt. TFA ist ein stark polares Lösungsmittel, das Substanzen mit Elektronendefiziten durch seine freien Elektronenpaare zu stabilisieren vermag. Das hinzugegebene Iodogen dient als Oxidationsmittel für das [^{131}I]-Natriumiodid, der chemischen Ausgangsform der Iodnuklide. Die HPLC-Analyse (vgl. Abb. 6) ergab einen Hauptpeak bei ca. 15 Minuten. Durch Co-Injektion des kalten Standards konnte sowohl der Hauptpeak als [^{131}I]-3-Iodcytosin identifiziert werden als auch das [^{131}I]-5-Iodcytosin und das [^{131}I]-3,5-Diiodcytosin.

Bei dem pH-Wert der Trifluoressigsäure von 1 wird nach einer Reaktionszeit von 45 Minuten eine Ausbeute von etwa 50 % (vgl. Tab. 8) an [^{131}I]-3-Iodcytosin erreicht. Als Nebenprodukt erhält man zusätzlich [^{131}I]-5-Iodcytosin (vgl. Abb. 6). Für die weiteren Versuche an Mäusen wird allerdings ein möglichst reines [^{131}I]-3-Iodcytosin vorausgesetzt, weil sich sonst die Verteilungen überlagern und somit die weiteren ex vivo Ergebnisse nicht interpretierbar sind. Deshalb sollen Nebenprodukte, insbesondere das [^{131}I]-5-Iodcytosin, nach Möglichkeit nur in geringem Ausmaß oder gar nicht vorliegen.

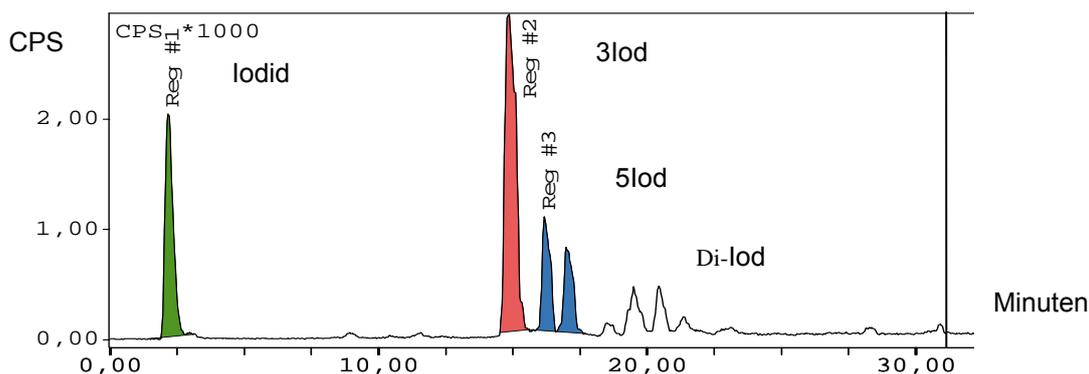


Abb. 6: HPLC 050825.1 - Radioiodierung mit Iodogen in Trifluoressigsäure HPLC-Bedingungen: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) (MeCN/TFA 0,1 %; 40/60). Die HPLC-Analyse ergab dabei einen Hauptpeak bei ca. 15 Minuten, der als [^{131}I]-3-Iodcytisin identifiziert werden konnte.

Tab. 8: Retentionszeiten der Peaks und relative Produktverteilung (für Radioiodierung in TFA). Nach 45 Minuten Reaktionszeit konnte eine Ausbeute von etwa 50 % an [^{131}I]-3-Iodcytisin erreicht werden.

Peak	Retentionszeit [min]	Radiochemische Ausbeute
Iodid	2,18	26 %
3-Iod	14,83	49 %
5-Iod	16,18	24 %
Di-Iod	21	-

4.1.2 Radioiodierung mit Salpetersäure

Im Falle der Radioiodierung von (-)-Cytisin mit Salpetersäure führte die Synthese nach 45-minütiger Reaktionszeit fast ausschließlich zur Bildung von [^{131}I]-3-Iodcytisin. Die Retentionszeit des radioaktiven Peaks von [^{131}I]-3-Iodcytisin liegt bei 15 Minuten (vgl. Abb. 7). Die Ausbeute an [^{131}I]-3-Iodcytisin war mit über 93 % im Vergleich zur Radioiodierung mit Iodogen deutlich höher (vgl. Tab. 9). Dies deutet auf eine sehr hohe Selektivität des Produktes bei der Radioiodierung mit Salpetersäure hin.

Aufgrund der Vermeidung einer Bildung von [^{131}I]-5-Iodcytisin und wegen der höheren Ausbeute wurde diese Rohlösung für die weiteren Versuche mittels SPE gereinigt.

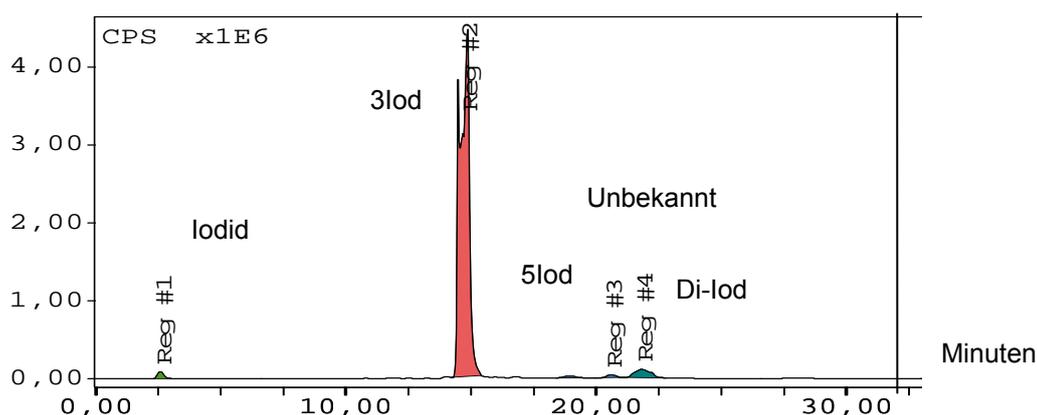


Abb. 7: HPLC 050901.2 - Radioiodierung mit Salpetersäure - HPLC-Bedingungen: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) (MeCN/TFA 0,1 %). Die HPLC-Analyse ergab dabei einen Hauptpeak bei ca. 15 Minuten, der als [^{131}I]-3-Iodcytisin identifiziert werden konnte.

Tab. 9: Retentionszeiten der Peaks und relative Produktverteilung (Radioiodierung mit Salpetersäure). Nach 45 Minuten Reaktionszeit führte die Synthese fast ausschließlich zur Bildung von [^{131}I]-3-Iodcytisin.

Peak	Retentionszeit [min]	Radiochemische Ausbeute
Iodid	2,60	1 %
3-Iod	14,85	93 %
Unbekannt	20,62	1 %
Di-Iod	21,83	4 %

4.2 Formulierung des [^{131}I]-3-Iodcytisin und 2- ^{18}F F-A-85380

Die Formulierung der [^{131}I]-3-Iodcytisin HPLC Fraktion erfolgte über die Solid Phase Extraction (SPE). Verwendet wurden ein schwacher Anionentauscher (QMA Plus in HCO_3^- -Form) und ein schwacher Kationentauscher (CM light in H^+ -Form). Das über die HPLC gereinigte [^{131}I]-3-Iodcytisin wurde über die konditionierten Kartuschen gegeben, zuerst über die QMA-Kartusche und dann über die CM-light-Kartusche. Das Acetonitril der HPLC Fraktion passiert beide Kartuschen und wird im Waste aufgefangen. Die Trifluoracetationen wurden auf den Anionentauscher durch Austausch gegen Hydrogencarbonat getrappt. Die Protonen der TFA wurden durch Reaktionen mit dem HCO_3^- zu

Wasser und Kohlenstoffdioxid neutralisiert. Das protonierte (kationische) [^{131}I]-3-Iodcytisin konnte auf dem nachgeschalteten Kationentauscher fixiert werden. Etwa 70 % (nicht optimiert) des [^{131}I]-3-Iodcytisin, bezogen auf die Aktivität der HPLC-Fraktion werden auf dem Kationentauscher getrappt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nicht alle Säureprotonen der TFA neutralisiert wurden und somit auf der CM-light-Kartusche einen Teil des Produktes eluiert haben. Mit einer größeren Kartusche, CM plus, wäre die Ausbeute der Aktivität vermutlich 100 %. Doch wäre dann auch das End-Volumen größer und die Aktivitätskonzentration geringer. Da allerdings das Injektionsvolumen für die Mäuse möglichst gering sein sollte, wurde der Verlust aufgrund der geringeren Kapazität der CM-light-Kartusche in Kauf genommen.

Die Elution der CM-light-Kartusche erfolgte mit PBS-Puffer, da dieser ungiftig und isoton ist und somit ohne weitere Aufarbeitung direkt einer Maus injiziert werden kann.

Die Formulierung des 2- ^{18}F F-A-85380 erfolgte ebenfalls über die Solid Phase Extraction (SPE). Hierbei wurde ein schwacher Anionentauscher (QMA Plus in HCO_3^- -Form), ein starker Kationentauscher und eine „reverse phase“ Kartusche verwendet. Das über die HPLC gereinigte 2- ^{18}F F-A-85380 passiert die ersten beiden konditionierten Kartuschen, dabei wird das Kryptofix durch den starken Kationentauscher aufgefangen. Das ^{18}F -Fluorid, das nicht gebunden ist wird über den Anionentauscher getrappt. Das 2- ^{18}F F-A-85380 sammelt sich dabei auf der „reverse phase“ Kartusche. Reines 2- ^{18}F F-A-85380 wird durch Ethanol von der Kartusche eluiert und kann nach Verdünnen mit PBS-Puffer der Maus injiziert werden (Schmaljohann et al., 2005).

4.3 Verwendete Kennzahlen

Für eine bessere Lesbarkeit der Arbeit werden die in der folgenden Diskussion verwendeten Kennzahlen bzw. Formeln hier noch einmal kurz zusammengestellt und beschrieben:

Einfacher Mittelwert \bar{a} über die jeweiligen Populationen von Versuchstieren in den betrachteten Gruppen sowie die zugehörige **Standardabweichung** σ (die mittlere absolute Schwankungsbreite) als Maß für die Stabilität der Messergebnisse. Bei nicht weiter spe-

zifizierten Messwerten (z.B. für Aktivität) handelt es sich in dieser Arbeit immer um einfache Mittelwerte in den jeweils relevanten Gruppen von Versuchstieren.

Relative Standardabweichung σ_{relativ} (die mittlere relative Schwankungsbreite in Prozent, auch Variationskoeffizient genannt). Sie ermöglicht realistische Vergleiche zwischen verschiedenen Gruppen und ergibt sich als:

$$\sigma_{\text{relativ}} = \frac{\sigma}{a}$$

% ID/g Halbwertszeit-korrigierte Aktivität des entsprechenden Organs in % der gesamtinjizierten Aktivität dividiert durch das Gewicht des Organs.

Ratio Verhältnis zweier % ID/g-Werte meist zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

4.4 Autoradiographie

Bei der Autoradiographie handelt es sich um eine Bildgebung, bei der Strukturen bzw. zwei- oder dreidimensionale Verteilungen durch radioaktive Isotope sichtbar gemacht werden. In den hier durchgeführten Experimenten geht es um die *in vitro* Sichtbarmachung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren in Hirnabschnitten durch [¹³¹I]-3-Iodcytisin.

Aus vorherigen Studien weiß man, dass die höchste Dichte an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren bei Ratten und Mäusen im Thalamus liegt, gefolgt von Striatum und Cortex, dabei weist der Hippocampus anscheinend keine und das Cerebellum nur eine sehr geringe Dichte an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren auf (Horti et al., 1998).

Ziel der Autoradiographie war die Darstellung der nACh-Rezeptoren *in vitro*, um die Blut-Hirn-Schranke und die mögliche Bildung von Metaboliten *in vivo* zu umgehen. Es sollte bei den *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass das [¹³¹I]-3-Iodcytisin tatsächlich eine hohe Affinität zu den $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren hat und dementsprechend in den einzelnen oben genannten Strukturen/Regionen bindet.

In und Abb. 8 und Abb. 9 sind das Rattenhirn und das Mäusehirn dargestellt, jeweils mit der Region des Thalamus im Bereich der roten Färbung. Der Cortex sowie das Striatum

sind grünlich blau gefärbt, was auf eine geringere Anreicherung der Aktivität und damit auf eine geringere Dichte der Rezeptoren zurückzuführen ist.

Bei der Auswertung der Hirnschnitte nach der Inkubation mit [^{131}I]-3-Iodcytisin wurde die Intensität des [^{131}I]-3-Iodcytisinsignals in den Hirnregionen mittels Autoradiographie gemessen. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich hauptsächlich auf die Strukturen Striatum, Cortex und Thalamus, und die Ergebnisse wurden aufgrund sehr geringer Dichte der nACh-Rezeptoren im Verhältnis zum Cortex dargestellt. In allen Schnitten der Mäuse und der Ratten konnte gezeigt werden, dass die höchste Intensität und damit die höchste Dichte an Rezeptoren im Thalamus liegt (vgl. Abb. 8, Abb. 9 und Tab. 10). Die dabei gemessene Intensität des [^{131}I]-3-Iodcytisin liegt im Mittel bei Mäusen 2,97-mal höher als die im Cortex und bei Ratten 4,35-mal höher, gefolgt von den Intensitäten im Striatum (vgl. Tab. 10).

Vergleicht man die Ergebnisse mit der Literatur, bei der 2- ^{18}F -A85380 in vitro an Ratten untersucht wird, so zeigt sich, dass auch hier die höchste Intensität im Thalamus und im Cortex, gefolgt vom Striatum gefunden wurde (vgl. Tab. 10) (Schmaljohann et al., 2004). Mit dem Vergleich der Daten in der Literatur konnte gezeigt werden, dass [^{131}I]-3-Iodcytisin ein Tracer ist, der eine ähnlich hohe Affinität zu den $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren besitzt und auch in vitro bindet.

Die Ergebnisse bei den Ratten sind vergleichbar mit den Ergebnissen für das 2- ^{18}F -A85380 in der Literatur, bei der die Aktivitätsanreicherung im Striatum niedriger als im Thalamus ist, aber höher als im Cortex.

Die unterschiedlichen Ergebnisse für das Ratten- und Mäusehirn in unseren Versuchen kann durch unterschiedliche Dichte der Rezeptoren, aber auch durch Subaffinitäten zu anderen Rezeptoren oder Ungenauigkeiten bzw. Fehler bei den Messungen erklärt werden.

Festzuhalten ist, dass die Ergebnisse der Autoradiographie positiv zu bewerten sind. Beide Tracer, das [^{131}I]-3-Iodcytisin und das 2- ^{18}F -A85380, sind in vitro vergleichbar und zur Darstellung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren geeignet. Es konnte hierbei die Verteilung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren gezeigt werden.

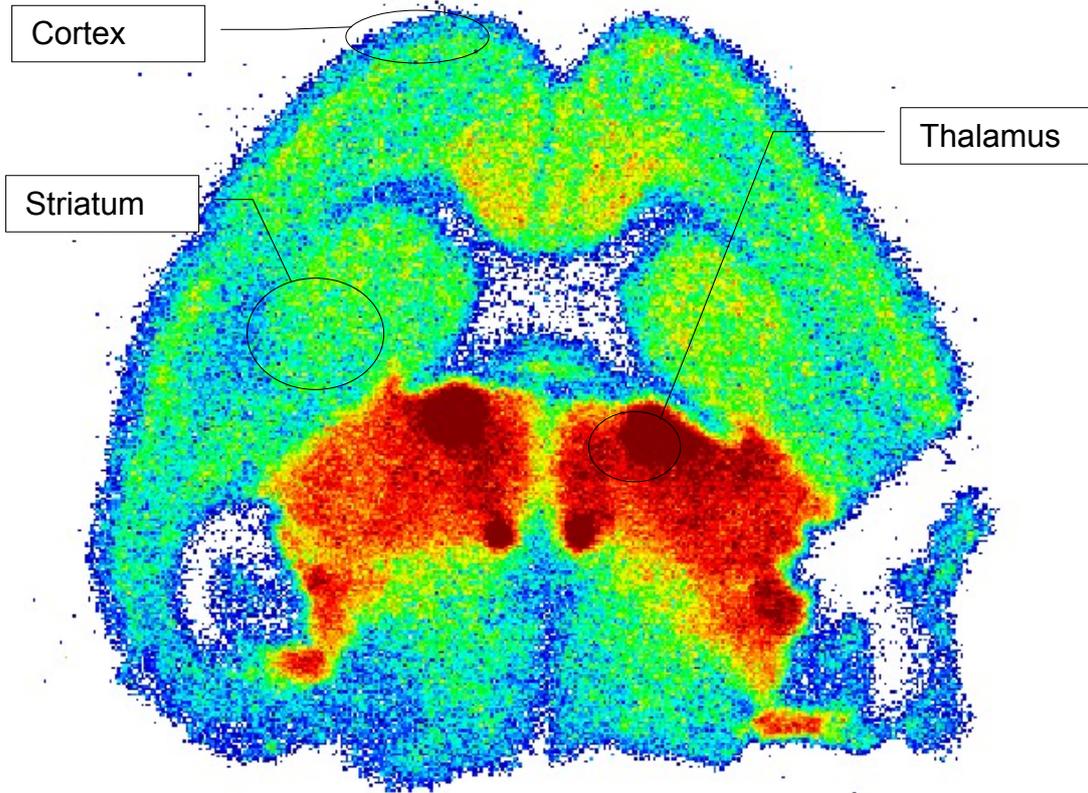


Abb. 8: Autoradiographie des Rattenhirns im Horizontalschnitt zur in vitro Darstellung der nACh-Rezeptoren durch $[^{131}\text{I}]-3\text{-Iodcytisin}$

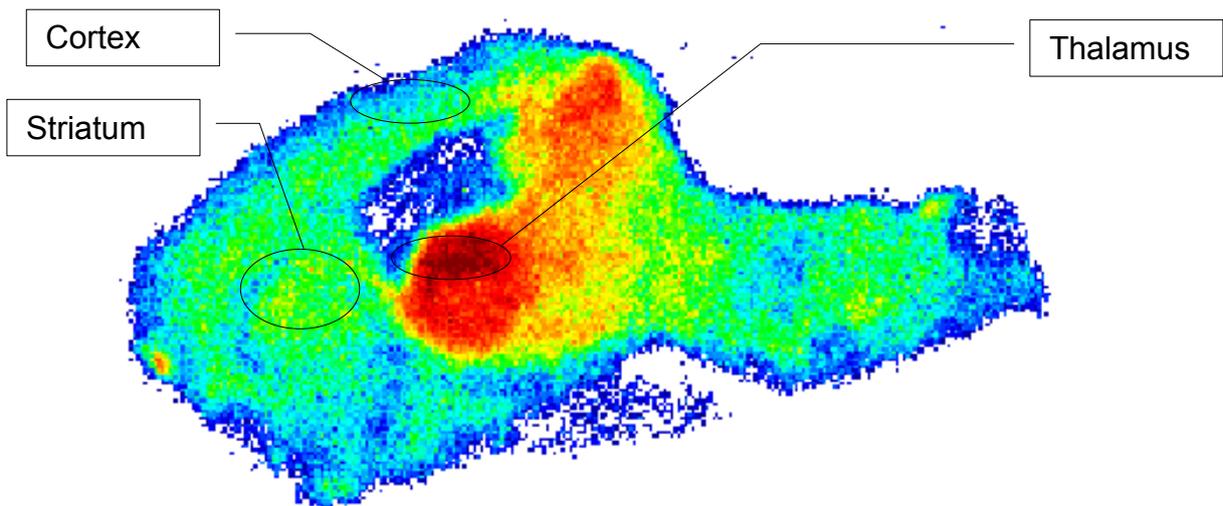


Abb. 9: Autoradiographie des Mäusehirns im Sagittalschnitt zur in vitro Darstellung der nACh-Rezeptoren durch $[^{131}\text{I}]-3\text{-Iodcytisin}$

Tab. 10: Verhältnisse der gemessenen Intensitäten des [¹³¹I]-3-Iodcytisin in Bezug zum Cortex von Mäusen und Ratten sowie Literaturwerte des 2-[¹⁸F]F-A-85380 für Ratten (Schmaljohann et al., 2004)

Hirnregion	Ratio x/Cortex
Mäuse – Thalamus [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	2,97
Mäuse – Striatum [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	0,98
Ratten – Thalamus [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	4,35
Ratten – Striatum [¹³¹ I]-3-Iodcytisin	1,19
Ratten – Thalamus Lit. 2-[¹⁸ F]F-A-85380	3,5
Ratten – Striatum Lit. 2-[¹⁸ F]F-A-85380	1,23

4.5 Injektion von 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisin

2-[¹⁸F]F-A-85380

Um die Verteilung der Aktivität von [¹³¹I]-3-Iodcytisin vergleichen zu können, wurde der bekannte Tracer 2-[¹⁸F]F-A-85380 als „interner Standard“ in dieser Arbeit ausgewählt. 2-[¹⁸F]F-A-85380 erfüllt die Hauptkriterien als radioaktiv markierter Ligand für den Gebrauch bei der Bildgebung in vitro und in vivo. Es hat eine hohe Affinität zu den α4β2 nACh-Rezeptoren, überwindet die Blut-Hirn-Schranke und bindet reversibel in den Regionen des Hirns mit der höchsten Dichte an α4β2 nACh-Rezeptoren.

[¹³¹I]-3-Iodcytisin

Die Affinitäten von (-)-Cytisin und seinen halogenierten Formen an den Positionen 3, 5; 3 und 5 zu α4β2 und zu α7 nACh-Rezeptoren im Hirn zeigte, dass das 3(-)Iod-Cytisin die höchste Affinität zu den α4β2 nACh-Rezeptoren im Vergleich zu dem 5(-)Iod-Cytisin und dem 3,5(-)Iod-Cytisin hat (vgl. Tab. 5). Außerdem besitzt 3(-)Iod-Cytisin im Vergleich zu den anderen halogenierten Formen die höchste Affinität zu den α7 nACh-Rezeptoren. Die Affinität von 3(-)Iod-Cytisin zu den α4β2 nACh-Rezeptoren ist höher als zu den anderen Subtypen. Deshalb ist zu erwarten, dass vor allem der Thalamus eine hohe Anreicherung [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Hirn aufweist, da er die höchste Dichte an α4β2 nACh-Rezeptoren besitzt (Imming et al., 2001). Die geringere Affinität zum α7 nACh-

Rezeptor und dessen breitere Verteilung mit geringerer Dichte über das ganze Hirn, lässt wahrscheinlich eine Darstellung mit [^{131}I]-3-Iodcytisin nicht zu (Brust et al., 2012).

4.5.1 2-[^{18}F]F-A-85380 und [^{131}I]-3-Iodcytisin mit und ohne subkutane Nikotininjektion

4.5.1.1 2-[^{18}F]F-A-85380 ohne subkutane Nikotininjektion

Es wurde bei der ex vivo Untersuchung die Verteilung von radioaktiver Aktivität durch 2-[^{18}F]F-A-85380 im Körper anhand der Organe Hirn, Herz, Lunge, Leber, Magen, Darm, Nieren, Milz und Knochen untersucht. Dabei zeigte sich die höchste radioaktive Konzentration (vgl. Abb. 10) nach 60 Minuten in den Nieren mit 4,68 % ID/g, gefolgt vom Magen mit einer Aktivitätsanreicherung von 3,15 % ID/g, der Milz mit 2,44 % ID/g, dem Hirn mit 2,33 % ID/g und der Leber mit 2,28 % ID/g. Die niedrigste radioaktive Anreicherung nach 60 Minuten wurde im Herz mit 0,76 % ID/g gemessen.

Bei Leber, Milz, Nieren und Magen handelt es sich um Stoffwechsel- und Ausscheidungsorgane. Die hohen Aktivitätsanreicherungen in diesen Organen könnten für eine direkte oder eine indirekte Ausscheidung über Metabolitenbildung sprechen. Es scheint dabei ein Großteil der Aktivität relativ schnell über Nieren und Blase ausgeschieden zu werden. Dies ist positiv zu bewerten, da hierdurch eine Ansammlung der Radioaktivität im Körper verhindert wird.

Auch Kimes et al. (2003) haben bei der Untersuchung von 2-[^{18}F]F-A-85380 an Menschen mittels PET eine hohe Radioaktivität in der Blase, der Leber und in den Nieren beobachten können; demnach wurden 93-98 % der injizierten Aktivität über den Urin innerhalb von 2-3 Stunden ausgeschieden. Dies zeigt, dass ein Teil des Tracers die Blut-Hirn-Schranke nicht überwindet und sich somit in der Leber und den Ausscheidungsorganen sammelt. Es kann sich dabei aber auch um Metabolite des Tracers handeln, die über die Nieren und die Harnblase ausgeschieden werden.

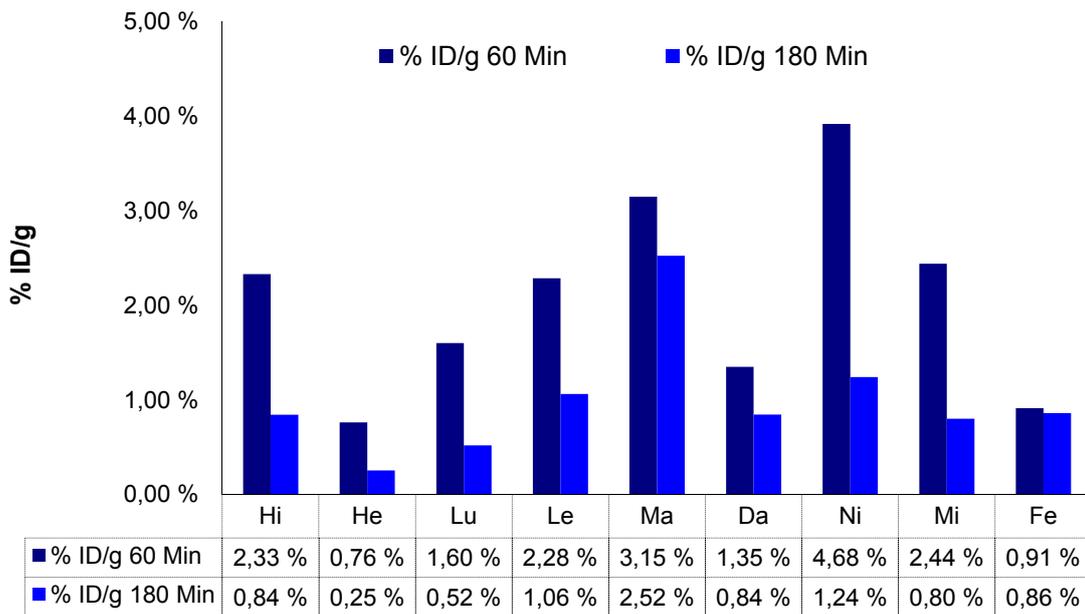


Abb. 10: Vergleich der Verteilung des radioaktiven Tracers 2-[¹⁸F]F-A-85380 in den oben aufgeführten Organen nach 60 und 180 Minuten in % ID/g. Siehe dazu auch die statistische Auswertung Abb. 12.

Vergleicht man die % ID/g zu den beiden Meßzeitpunkten 60 und 180 Minuten als Ratio 180/60, so weisen Herz, Lunge, Nieren und Milz den stärksten Abfall an Aktivität auf (vgl. Abb. 11).

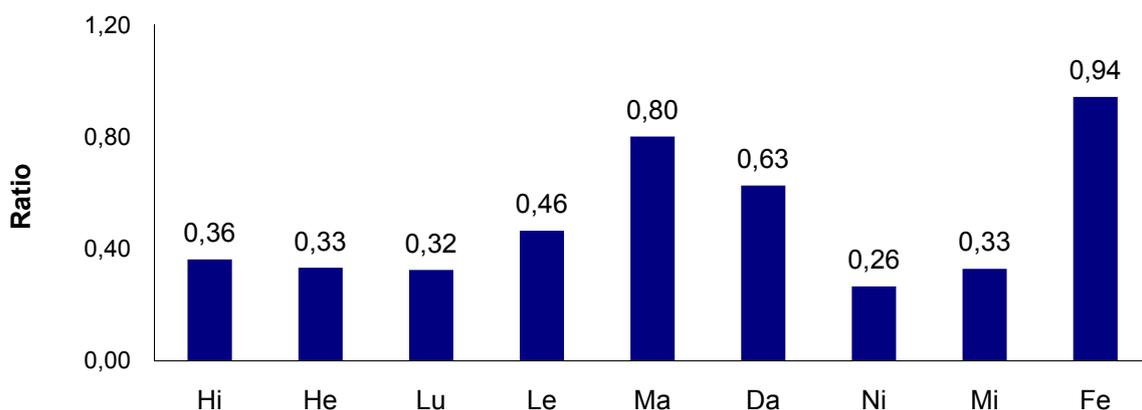


Abb. 11: 2-[¹⁸F]F-A-85380 - Ratio der % ID/g 180/60 Minuten zum Vergleich der Aktivitätsänderung in den einzelnen Organen

Bei den Organen Herz (Ratio 0,33) und Lunge (Ratio 0,32) handelt es sich um sehr gut durchblutete Organe, was den überdurchschnittlich schnellen Abbau an Aktivität erklären kann.

Bei den Nieren (Ratio 0,26) ist wahrscheinlich die Urinbildung und die Ausscheidung über die Harnwege eine Ursache für den sehr schnellen Abbau an Aktivität, so dass ein Großteil der Aktivität über diesen Weg aus dem Körper eliminiert wird.

Der geringste Aktivitätsabfall konnte im Darm, im Magen und in den Knochen mit einer Ratio von 0,63, 0,80 und 0,94 beobachtet werden, dies deutet eher auf eine irreversible Bindung durch den Tracer oder aber eines Metaboliten hin.

Bei der Betrachtung der relativen Standardabweichungen (vgl. Abb. 12), stellt man fest, dass das Hirn, das Herz, die Leber und die Nieren mit ca. 10 % relativer Standardabweichung im Verhältnis zur mittleren gemessenen Konzentration an Aktivität keine hohe Schwankungsbreite haben und somit die Messungen eine höhere statistische Signifikanz aufweisen als Magen und Milz mit ihren relativ hohen Werten bei ca. 30 % relativer Standardabweichung.

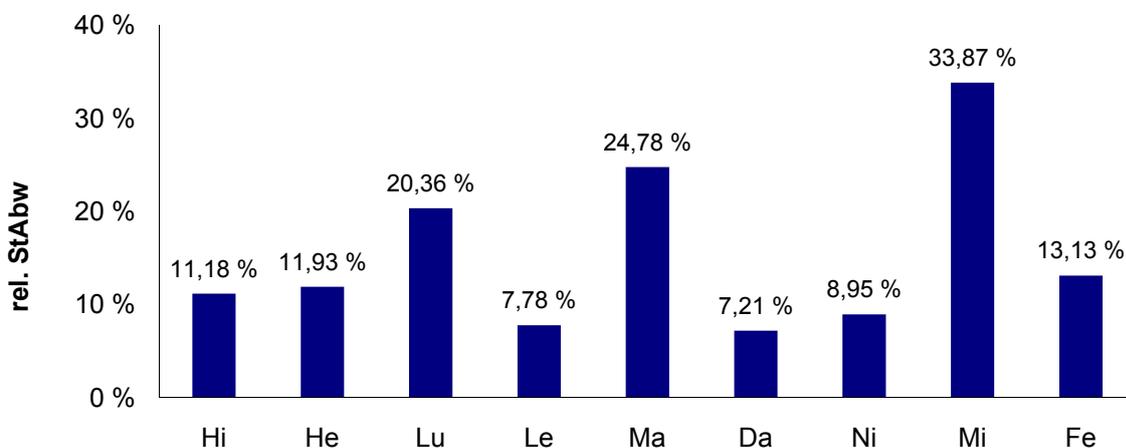


Abb. 12: Relative Standardabweichungen des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in den zu vergleichenden Organen nach 60 Minuten

Da der Magen zu den Ausscheidungsorganen gehört, liegt darin vermutlich ein Grund für die hohe Standardabweichung. Unterschiedliche Stoffwechselforgänge, je nach vorheriger Nahrungsaufnahme oder Ausscheidung, sowie individuelle Ausprägungen im

Stoffwechsel der Versuchstiere hatten wahrscheinlich einen bedeutenden Einfluss auf die Schwankungen in den Messwerten.

Die Milz gehört zu den lymphatischen Organen. Sie baut alte und funktionslose Erythrozyten durch Makrophagen ab und ist gleichzeitig ein sehr stark durchblutetes Organ. Daran angeschlossen ist ein komplexes Immunsystem. Dies kann mitunter Ursache der hohen Schwankungen sein.

Nicht zuletzt können Messfehler bei der Durchführung der Versuche die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen.

4.5.1.2 2-[¹⁸F]F-A-85380 mit subkutaner Nikotininjektion

In weiteren Untersuchungen wurde das Bindungsverhalten von 2-[¹⁸F]F-A-85380 bei Besetzung der Rezeptoren durch Nikotin untersucht. Da Nikotin eine hohe nicht Subtyp-spezifische Affinität zu den nACh-Rezeptoren aufweist, eignet es sich für die Untersuchung des Bindungsverhaltens und der Verdrängung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 bzw. von [¹³¹I]-3-Iodcytisin.

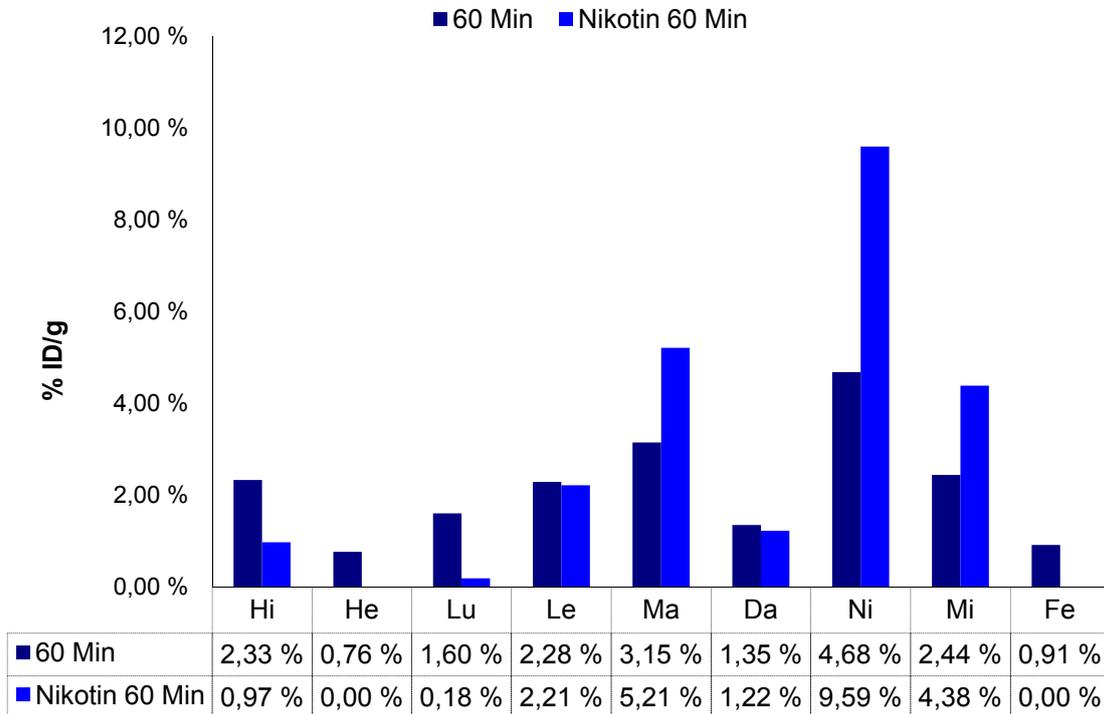


Abb. 13: Vergleich der Aktivitätsverteilung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 anhand der oben aufgeführten Organe mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin nach 60 Minuten

Bei einem Vergleich der Ergebnisse (vgl. Abb. 13) von Tieren mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin zeigte sich nach 60 Minuten vor allem im Herzen, der Lunge und im Hirn eine niedrigere gemessene Aktivitätsanreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 bei den Tieren mit injiziertem Nikotin. Dies lässt vermuten, dass sowohl das Herz, als auch die Lunge nACh-Rezeptoren besitzen, an denen das 2-[¹⁸F]F-A-85380 reversibel bindet, und dass es sich hierbei zumindest teilweise um eine spezifische Bindung handelt.

In den restlichen Organen (Leber, Magen, Nieren, Milz, Darm) ist die Aktivitätsanreicherung an 2-[¹⁸F]F-A-85380 nach 60 Minuten mit injiziertem Nikotin teilweise sogar höher als ohne Injektion von Nikotin (vgl. Abb. 13). Eine zu vermutende Erklärung ist, dass in den Organen keine bzw. eine so geringe Dichte an Rezeptoren vorhanden ist, an denen das Nikotin mit dem 2-[¹⁸F]F-A-85380 konkurriert, dass es keine Auswirkung hat. Es lässt unspezifische Bindungen in den Organen vermuten.

4.5.1.3 [¹³¹I]-3-Iodcytisin ohne subkutane Nikotininjektion

Bei der in vivo Untersuchung von [¹³¹I]-3-Iodcytisin an CD1 Mäusen soll zunächst die Biometrische Verteilung des [¹³¹I]-3-Iodcytisin untersucht werden. Hierbei konnte in den in vivo Untersuchungen die höchste radioaktive Anreicherung (vgl. Abb. 14) nach 15 Minuten mit 12,71 % ID/g im Magen gemessen werden, gefolgt von den Nieren mit 7,32 % ID/g und dann in absteigender Reihenfolge: Milz, Leber, Lunge, Darm, Herz, Hirn und schließlich die Knochen.

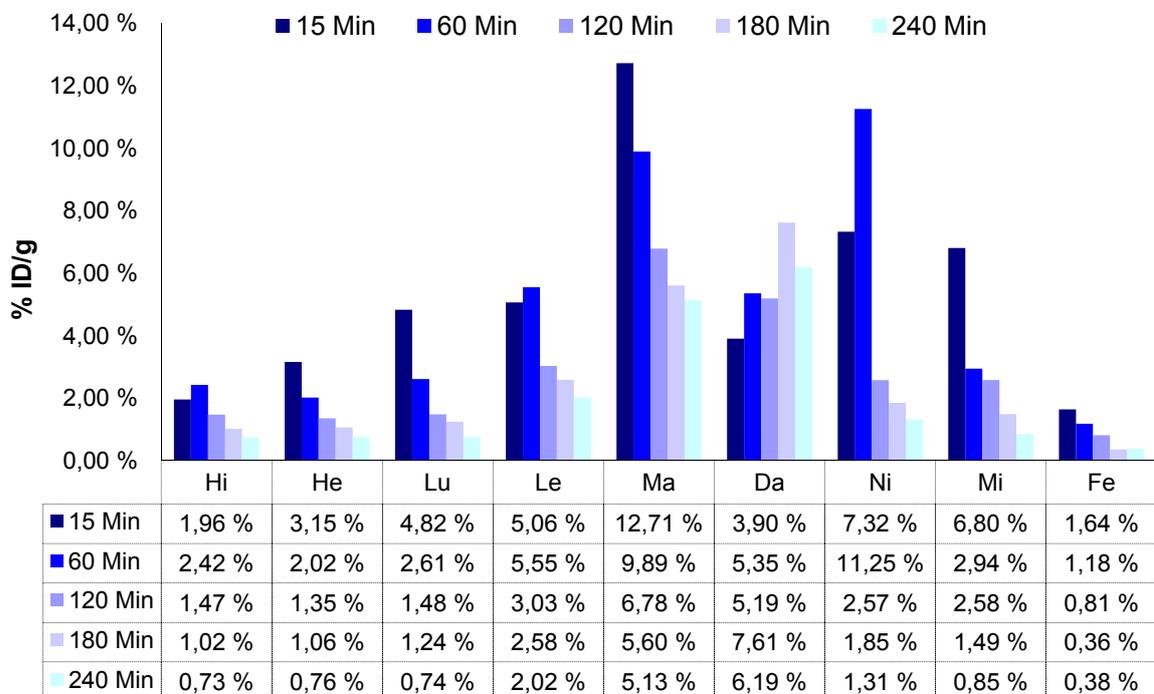


Abb. 14: Vergleich der Anreicherung der Aktivität des [¹³¹I]-3-Iodcytisins anhand der oben aufgeführten Organe in % ID/g nach 15, 60, 120, 180 und 240 Minuten

Magen, Nieren, Milz und Leber gehören zu den Stoffwechsel- und Ausscheidungsorganen des Körpers. Die hohe Anreicherung der Aktivität in diesen Organen könnte für eine direkte oder eine indirekte Ausscheidung über Metabolitenbildung sprechen.

Es ist bekannt, dass freies Iodid bzw. erst durch freie Deiodierungsprozesse in vivo entstandene Iodid häufig im Magen zu hohen Anreicherungen führt. Daher sollte die teil-

weise Iodierung dieses Tracers ebenfalls eine Quelle für die hohe Magenaktivität darstellen.

Betrachtet man hierzu noch die Ratio der einzelnen Organe (vgl. Abb. 15), so fällt auf, dass in den Nieren neben einer hohen und raschen Aktivitätsanreicherung auch ein rascher Abfall der Konzentration, Ratio 120/15 (0,35), zu beobachten ist.

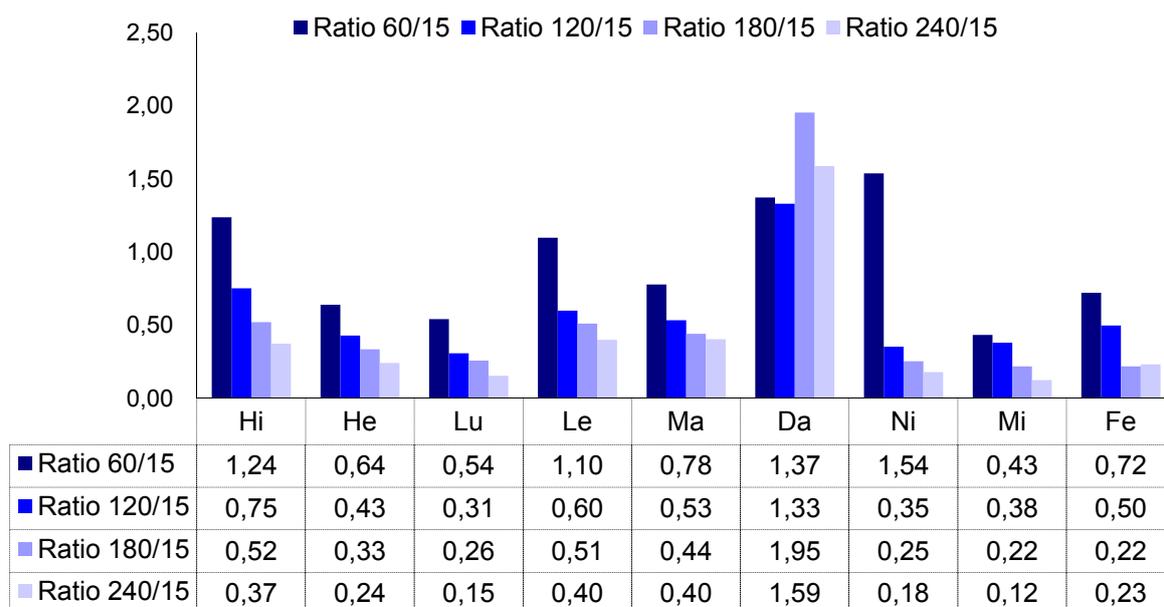


Abb. 15: [¹³¹I]-3-Iodocytisin - Ratio der % ID/g für 60/15, 120/15, 180/15 und 240/15 Minuten zum Vergleich der Aktivitätsänderung in den einzelnen Organen

Vergleicht man die Ergebnisse mit denen in 2-[¹⁸F]F-A-85380, so liegt die Vermutung nahe, dass auch hier ein Großteil der Aktivität über diesen Weg aus dem Körper eliminiert wird.

Im Magen ist ein langsamer kontinuierlicher Abfall der Aktivität zu beobachten, während im Darm in dem Zeitraum unserer Messungen kein Abfall der Aktivität zu beobachten war. Es konnte zu diesem Zeitpunkt nicht genau geklärt werden, warum gerade im Magen und im Darm eine so hohe Aktivitätsanreicherung des [¹³¹I]-3-Iodocytisin gemessen wurde. Eine Vermutung wäre die Bildung von Metaboliten, die die verstärkte Anhäufung und den langsamen Abfall der Aktivität erklären könnte. Hierzu wurde in einem weiteren Versuch das Blut der Mäuse untersucht (vgl. 4.7).

Bei Herz, Lunge und Leber ist ein kontinuierlicher Abfall der Aktivität des [¹³¹I]-3-Iodocytisin zu beobachten. Der kontinuierliche Abfall der Aktivität des [¹³¹I]-3-Iodocytisin in

diesen Organen könnte ein Hinweis für eine spezifische Bindung an nACh-Rezeptoren in diesen Organen sein. Dieses wird in einem weiteren Versuch mit Nikotinverdrängung untersucht (vgl. 4.5.1.4). Gleichzeitig ist in der Leber eine relativ hohe Aktivitätsanreicherung des [^{131}I]-3-Iodcytisin, mit einem Maximum bei 60 Minuten (mit 5,5 % ID/g) zu beobachten. Mit der Leber als Stoffwechselorgan könnte dies auch ein Hinweis auf die Bildung und Anreicherung von Metaboliten sein (vgl. 4.7).

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, wurden zusätzlich die relativen Standardabweichungen nach 15 Minuten berechnet und in Abb. 16 dargestellt. Die relative hohe Standardabweichung der Aktivitätswerte der Knochen kann auf Messungenauigkeiten aufgrund der geringen Absolutwerte zurückgeführt werden. Ansonsten fällt wieder der durchgängig hohe Wert im Magen auf, der auf Messungenauigkeiten aber auch wie schon vorher erwähnt s.o. auf unterschiedliche Stoffwechselvorgänge bzw. Bildung und Ansammlung von Metaboliten zurückgeführt werden kann.

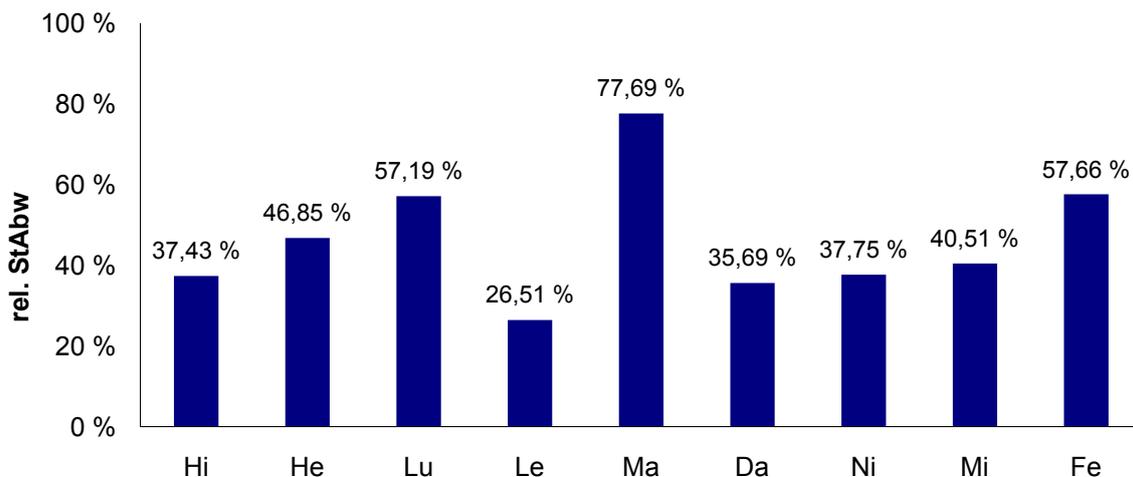


Abb. 16: Relative Standardabweichungen des [^{131}I]-3-Iodcytisins nach 15 Minuten in den zu vergleichenden Organen

4.5.1.4 [^{131}I]-3-Iodcytisin mit subkutaner Nikotininjektion

Durch die Injektion von [^{131}I]-3-Iodcytisin mit Nikotin soll das Bindungsverhalten bzw. die Verdrängung von [^{131}I]-3-Iodcytisin bei Besetzung der nACh-Rezeptoren (analog zu 2- [^{18}F]F-A-85380) untersucht werden.

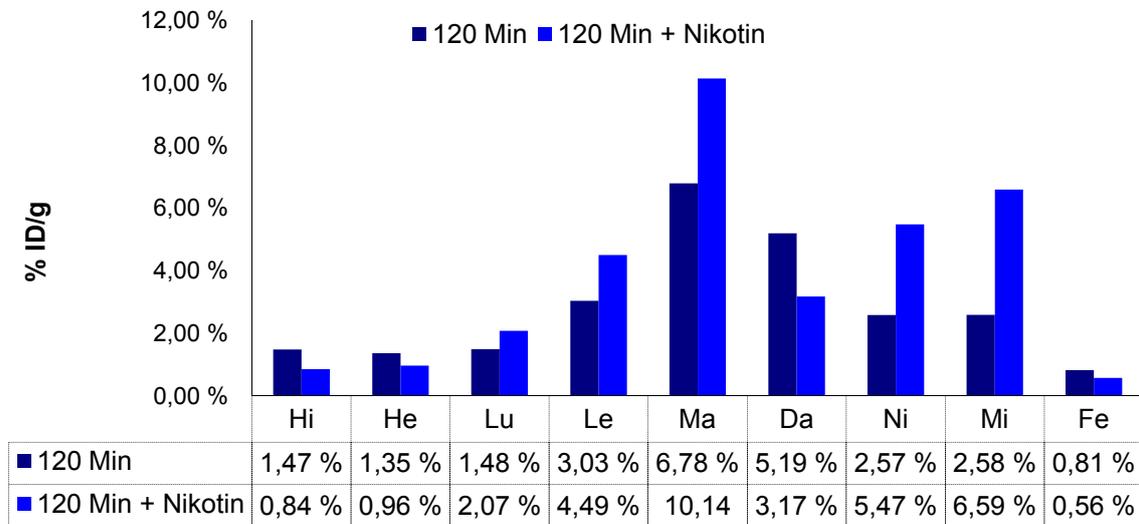


Abb. 17: Vergleich der Aktivitätsverteilung des $[^{131}\text{I}]$ -3-Iodcytisins in den oben aufgeführten Organen mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin nach 120 Minuten

Dabei zeigt die Messung nach 120 Minuten (vgl. Abb. 17) eine deutlich niedrigere Konzentration der Aktivität des $[^{131}\text{I}]$ -3-Iodcytisins in den Organen Hirn (ca. 0,6 %), Herz (ca. 0,4 %), Darm (ca. 2,0 %) und Knochen (ca. 0,3 %) nach der Injektion mit Nikotin.

Für Lunge, Leber, Magen, Nieren und Milz sind die Werte mit Nikotin nach 120 Minuten höher (teilweise deutlich höher) als nach 120 Minuten ohne Nikotin (vgl. Abb. 17). Es findet hier ähnlich wie bei 2- $[^{18}\text{F}]$ F-A-85380 keine Verdrängung statt. Die Ergebnisse des Verdrängungsversuches deuten auf unspezifische Bindungen in diesen Organen hin. Betrachtet man nun zusätzlich die zeitliche Verteilung der $[^{131}\text{I}]$ -3-Iodcytisinanreicherung in der Leber, im Darm aber auch im Magen (vgl. Abb. 15 und Abb. 16), so kann es sich hierbei auch um Metabolitenbildung handeln (vgl. 4.7)

Im Zusammenhang mit der Aktivitätsanreicherung des $[^{131}\text{I}]$ -3-Iodcytisins im Herz und dem Abfall der Aktivität deutet der Verdrängungsversuch mit Nikotin auf eine spezifische Bindung des $[^{131}\text{I}]$ -3-Iodcytisins an nACh-Rezeptoren im Herz hin.

4.5.2 Die Aktivitätsanreicherung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Hirngewebe

4.5.2.1 2-[¹⁸F]F-A-85380 Anreicherung im Hirngewebe

In dieser Arbeit wurde zu den Zeitpunkten 60 und 180 Minuten die % ID/g im Hirngewebe gemessen. Bei 60 Minuten wurde ein Aktivitätsgehalt von 2,33 % ID/g ermittelt. Nach 180 Minuten lag die Aktivitätsanreicherung im Hirn bei 0,84 % ID/g (vgl. Abb. 10 und Abb. 18). Nach Horti et al. (1998) wurde bei der in vivo Injektion von 2-[¹⁸F]F-A-85380 bei männlichen CD1 Mäusen nach 15 Minuten eine Peak Konzentration von 1,86 % ID/g im gesamten Hirn beobachtet, gefolgt von 1,09 % ID/g nach 60 Minuten und von 0,19 % nach 180 Minuten.

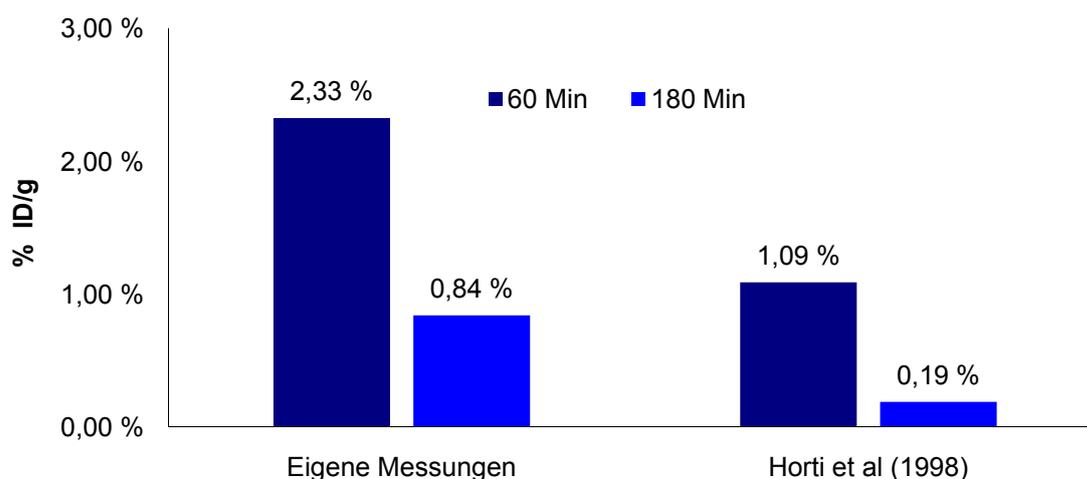


Abb. 18: Die Anreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in % ID/g im Hirn nach 60 und 180 Minuten im Vergleich zu den Daten in der Literatur (Horti et al., 1998)

Die mit eigenen Ergebnissen berechnete Ratio 180/60 betrug 0,36. Nach den Angaben in der Literatur bei Horti et al. (1998) (vgl. Abb. 18) betrug die Ratio 180/60 nur 0,17. Worauf dieser Unterschied der Ratios zurückzuführen ist, lässt sich hier nicht klären, jedoch weisen sie immerhin ähnliche Größenordnungen auf. Nikotin weist eine hohe Affinität zu nACh-Rezeptoren im ZNS auf und eignet sich deshalb für die Untersuchungen

des Bindungsverhaltens und der Verdrängung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 bzw. von [¹³¹I]-3-Iodcytisin.

Durch die Preinjektion mit Nikotin wurde somit das Bindungsverhalten von 2-[¹⁸F]F-A-85380 bei der Besetzung der Rezeptoren durch Nikotin untersucht.

Bei dem Vergleich (vgl. Abb. 19) mit Tieren, denen zuvor kein Nikotin injiziert wurde, sieht man, dass die nach 60 Minuten gemessene Aktivitätsanreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Hirn niedriger ausfällt. Es besteht eine höhere Abnahme der Aktivität des 2-[¹⁸F]F-A-85380 bei Mäusen mit injiziertem Nikotin von ca. 1,4 % ID/g im Vergleich zu den Tieren ohne injiziertes Nikotin.

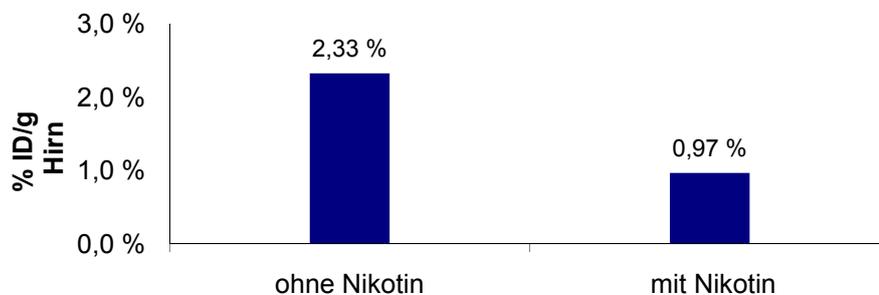


Abb. 19: Vergleich der Aktivitätsanreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Hirn in % ID/g mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin nach 60 Minuten

Festzuhalten ist, dass der deutlich niedrigere gemessene Aktivitätsgehalt im Hirn der Mäuse mit Nikotininjektion auf die Verdrängung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 durch das Nikotin zurückzuführen ist. Es zeigt, dass die Bindung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 an den nACh-Rezeptoren reversibel ist und es besteht die Vermutung einer spezifischen Bindung an die $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Hirn.

Hirnregionen

Bei der Untersuchung der Hirnregionen wurde die höchste Aktivitätsanreicherung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Thalamus (5,4 % ID/g, 60min) (vgl. Abb. 20) gefolgt von Hirnstamm und Cortex gemessen. Im Cerebellum ist die Aktivitätsanreicherung am geringsten. Die Ratio 180/60 Minuten betrug im Thalamus 0,86, im Hirnstamm 0,28, im Cortex 0,41 und im Cerebellum nur noch 0,24.

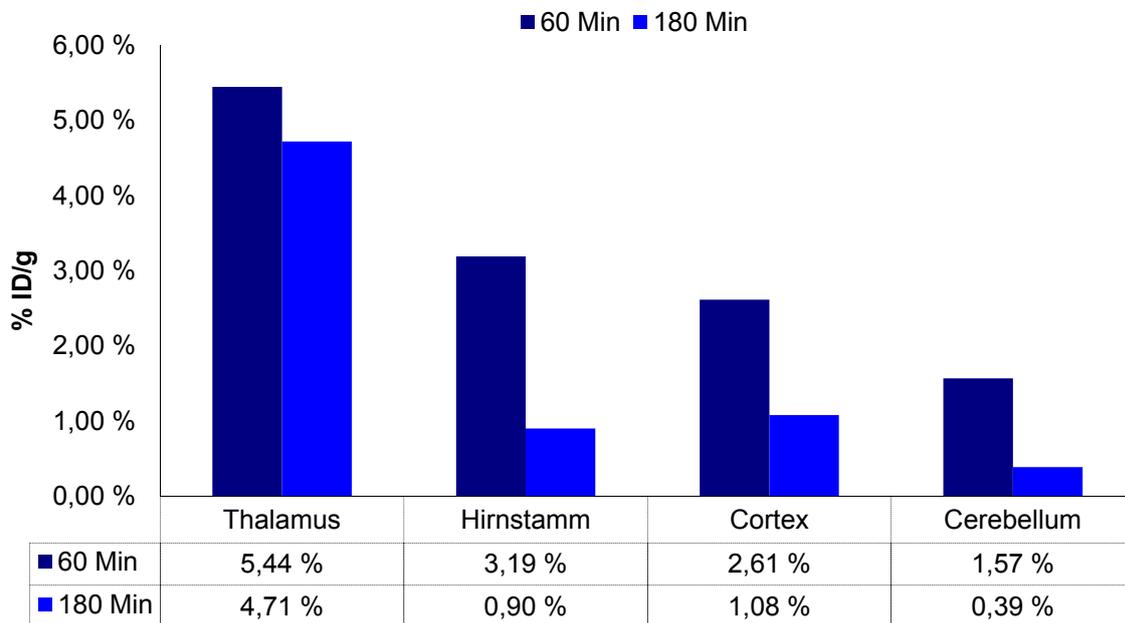


Abb. 20: Vergleich der Verteilung der Aktivität des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in % ID/g in den oben aufgeführten Hirnstrukturen nach 60 und 180 Minuten

Gemäß den Ergebnissen in der Literatur wurde bei Mäusen, denen 2-[¹⁸F]F-A-85380 injiziert wurde, nach 60 Minuten die höchste Aktivitätsanreicherung im Thalamus mit 6 % ID/g erreicht und die geringste Aktivitätsanreicherung im Cerebellum mit etwa 1 % ID/g. Auch die Abnahme der Aktivität im Cerebellum war nach 2 Stunden mit einer Ratio von 0,06 am höchsten (Horti et al., 1998).

Im Vergleich entspricht die Verteilung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in den einzelnen Hirnregionen der Verteilung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Hirn. Der Thalamus besitzt dabei die höchste Dichte an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren, dementsprechend wurde auch eine hohe Aktivitätsanreicherung an 2-[¹⁸F]F-A-85380 gemessen. Das Cerebellum besitzt vermutlich keine $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren, weshalb auch eine niedrigere Aktivitätsanreicherung an 2-[¹⁸F]F-A-85380, sowie eine schnelle Abnahme gemessen wurde. Diese Ergebnisse sind mit den Literaturergebnissen gut korreliert (Gündisch, 2000). Die hohe Aktivitätsanreicherung von 2-[¹⁸F]F-A-85380 nach 60 Minuten und die schnelle Abnahme der Aktivität im Hirnstamm kann auf eine unspezifische Bindung hinweisen (Imming et al., 2001).

Für 2-[¹⁸F]F-A-85380 wird sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur die Bindung an die $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren nachgewiesen. Die ermittelten Anreicherungen im Hirn bzw. im Thalamus sind in guter Übereinstimmung mit den Werten in der Literatur. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte im Hirn durch bildgebende Verfahren die höchste Aktivitätsanreicherung an 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Thalamus festgestellt werden, gefolgt vom Striatum und Cortex; dagegen ergab sich eine kaum messbare bis keine Aktivitätsanreicherung im Cerebellum der Mäuse- und Rattenhirne (Schmaljohann et al., 2004; Wevers und Schröder, 1999). Im Gegensatz dazu besitzt das menschliche Hirn auch im Cerebellum eine geringe Dichte an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren und somit auch eine Bindungsaffinität für 2-[¹⁸F]F-A-85380 (Kimes et al., 2003).

Pharmakologische Nebenwirkungen sind nicht sehr wahrscheinlich. Ferner konnten weder in der Literatur noch bei unseren Versuchen klinische Veränderungen nach der Injektion des Tracers an den Mäusen festgestellt werden. Aufgrund dieser Eigenschaften ist 2-[¹⁸F]F-A-85380 für die PET-Diagnostik geeignet.

Horti et al. (1998) verwendeten für ihre Untersuchung männliche CD1 Mäuse (25 - 35g), wogegen in der vorliegenden Arbeit 30g schwere weibliche CD1 Mäuse verwendet wurden. In Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, bezüglich der Bindungsaffinität, der Verteilung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Hirn und im Körper sowie der Abbaugeschwindigkeit kann man davon ausgehen, dass das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell für die Versuche geeignet ist und gleichwertige Ergebnisse bringt. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen in der Literatur legt nahe, dass die hier verwendete Methodik ebenfalls für die Untersuchung des alternativen SPECT-Tracers [¹³¹I]-3-Iodcytisin geeignet ist.

4.5.2.2 [¹³¹I]-3-Iodcytisin Anreicherung im Hirngewebe

Die maximale Aufnahme des [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Hirn beträgt 2,42 % ID/g (60 Minuten, vgl. Abb. 14 und Abb. 21); sie nimmt anschließend im Verlauf kontinuierlich ab. Es zeigt sich im Vergleich zu den anderen Organen ein relativ langsamer Anstieg der Aktivität des [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Hirn, der für eine Bindung des [¹³¹I]-3-Iodcytisin an die $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren spricht. Gleichzeitig fällt eine relativ langsame Abnahme der Aktivität auf, die auf eine spezifische Bindung hinweist.

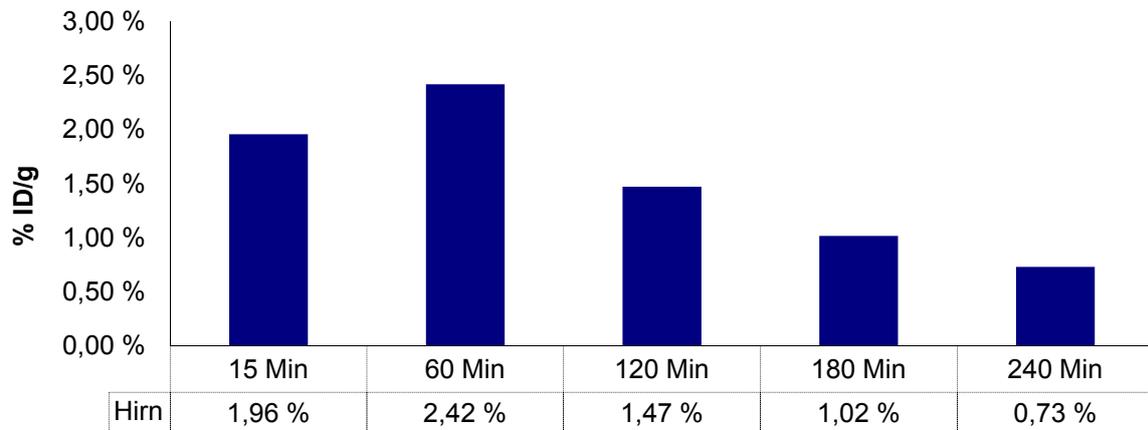


Abb. 21: Vergleich der Anreicherung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins im Hirn in % ID/g nach 15, 60, 120, 180 und 240 Minuten

Nach der Injektion von [¹³¹I]-3-Iodcytisins mit Nikotin soll analog zu 2-[¹⁸F]F-A-85380 das Bindungsverhalten bzw. die Verdrängung von [¹³¹I]-3-Iodcytisins bei Besetzung der nACh-Rezeptoren untersucht werden. Dabei zeigen die Messungen mit Nikotininjektion im Vergleich zu ohne Nikotin nach 120 Minuten (1,47 % und 0,84 %, vgl. Abb. 17) eine 0,6 % niedrigere Aktivitätsanreicherung von [¹³¹I]-3-Iodcytisins an.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch das [¹³¹I]-3-Iodcytisins durch das Nikotin von den Rezeptoren im Hirn verdrängt wird und die Bindung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins an die $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Hirn reversibel ist.

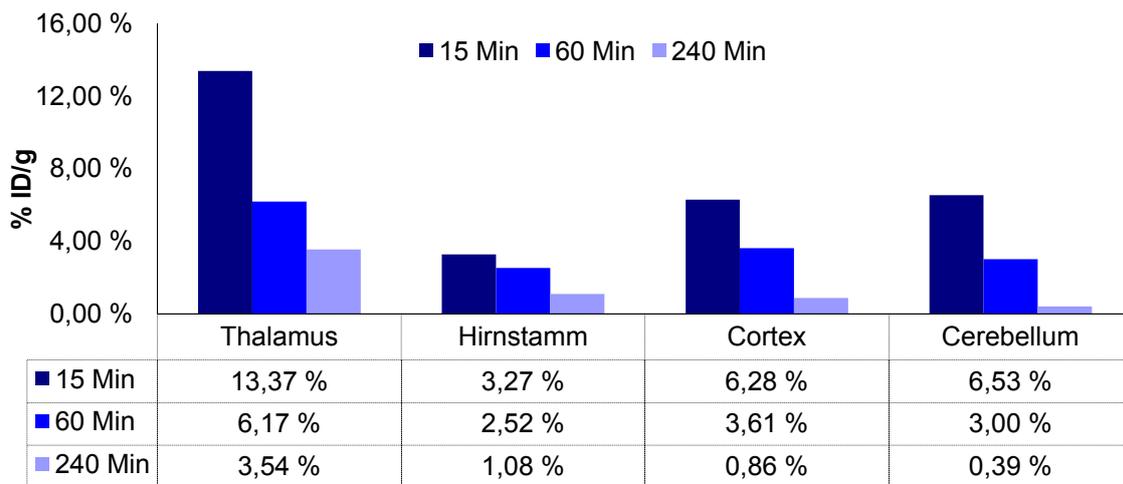


Abb. 22: Die Verteilung der Aktivitätsanreicherung in % ID/g des [¹³¹I]-3-Iodcytisins in den oben aufgeführten Hirnregionen nach 15, 60 und 240 Minuten

Betrachtet man einzelne Hirnbereiche, wie Thalamus, Cortex, Hirnstamm und Cerebellum (vgl. Abb. 22), dann fällt auf, dass im Thalamus mit 13,37 % ID/g nach 15 Minuten die Anreicherung der Aktivität am höchsten ist, gefolgt von Cerebellum mit 6,53 % ID/g und Cortex mit 6,28 % ID/g. Das Maximum der Organaufnahme liegt im Vergleich zu den Ergebnissen im gesamten Hirn (60 Minuten) schon bei 15 Minuten. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass im Cerebellum der Mäuse keine spezifische Bindung stattfindet und somit keine $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren vorhanden sind, weswegen in den Versuchen mit 2-[¹⁸F]F-A-85380 keine bzw. nur eine geringe Anreicherung im Cerebellum beobachtet wurde (Horti et al., 1998; Schmaljohann et al., 2004).

Im Versuch mit [¹³¹I]-3-Iodcytisins zeigte sich hingegen mit 6,53 % ID/g eine relativ hohe Anreicherung im Cerebellum (15 min). Dieser Wert ist im Vergleich zu den anderen Hirnstrukturen und den mit 2-[¹⁸F]F-A-85380 gemessenen Werten relativ hoch. Jedoch wird eine rasche Abnahme der Aktivität beobachtet, die für eine unspezifische Bindung spricht.

Die Aktivität des [¹³¹I]-3-Iodcytisins nimmt in allen Hirnabschnitten mit der Zeit kontinuierlich ab. Die Ergebnisse vom Thalamus und Cortex sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Versuche mit 2-[¹⁸F]F-A-85380, auch im Hinblick auf die Verteilung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Hirn (Schmaljohann et al., 2004).

Die Ergebnisse der Verteilung und der Verdrängung der Aktivitätsanreicherung im Hirn spricht für eine Bindung des [^{131}I]-3-Iodcytisin an den $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren. Der genauere Vergleich mit 2- ^{18}F F-A-85380 folgt in Abschnitt 4.6.

4.6 Vergleich von 2- ^{18}F F-A-85380 und [^{131}I]-3-Iodcytisin

4.6.1 Vergleich von 2- ^{18}F F-A-85380 und [^{131}I]-3-Iodcytisin in den Organen

In Abb. 23 sind die Messergebnisse von 2- ^{18}F F-A-85380 und [^{131}I]-3-Iodcytisin nach 60 und 180 Minuten nebeneinander dargestellt. Die Anreicherung der Aktivität von [^{131}I]-3-Iodcytisin ist in den Organen Herz, Lunge, Leber, Magen, Nieren und Milz höher als diejenige von 2- ^{18}F F-A-85380 bei beiden Zeitpunkten. Dabei können die unterschiedlichen Ergebnisse durch den Gebrauch verschiedener Tracer durch die Ausscheidung, durch unterschiedliches Bindungsverhalten oder aber durch Bildung von Metaboliten bedingt sein.

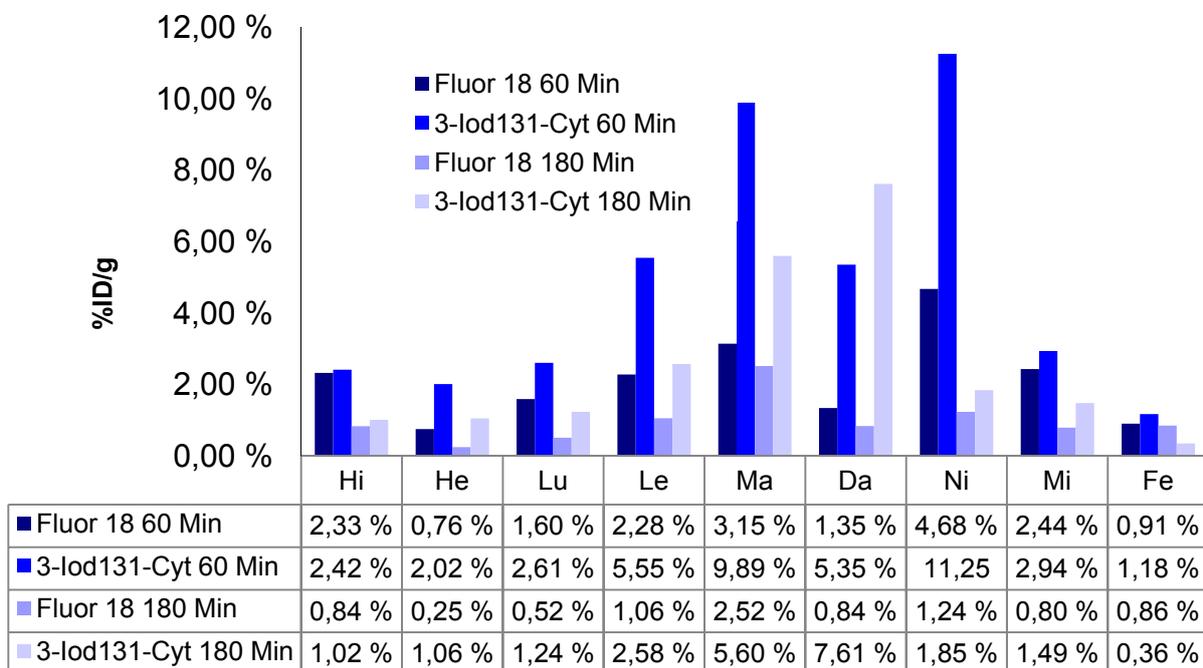


Abb. 23: Vergleich der Aktivitätsverteilung des 2- ^{18}F F-A-85380 und [^{131}I]-3-Iodcytisins in % ID/g in den oben aufgeführten Organen nach 60 und 180 Minuten

Vergleicht man die Anreicherung der einzelnen Aktivitäten und die jeweilige Ratio der Nieren (vgl. Abb. 11, Abb. 15, Abb. 23), so wird demnach auch das [^{131}I]-3-Iodcytisin direkt über die Nieren eliminiert.

Im Zuge der Untersuchung der Verdrängung mit Nikotin konnte bei beiden Tracern auch eine Verdrängung im Herz beobachtet werden (vgl. Abb. 13 und Abb. 17). Es besteht hierbei die Vermutung einer zumindest teilweise spezifischen Bindung.

Buceri et al. (2006) konnten mittels PET-Untersuchungen mit 2- ^{18}F -A85380 zeigen, dass auch das Herz $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren besitzt, an die dieser Tracer spezifisch bindet.

Es scheint sich also bei [^{131}I]-3-Iodcytisin und 2- ^{18}F -A-85380 um Tracer zu handeln, die miteinander vergleichbar sind.

Es wurden teilweise höhere Anreicherungen des [^{131}I]-3-Iodcytisin im Vergleich zu 2- ^{18}F -A-85380 in Leber, Magen, Darm und Nieren beobachtet. Dabei handelt es sich um nicht spezifische Bindungen, da durch den Verdrängungsversuch mit Nikotin keine deutliche Reduzierung der Aktivität des [^{131}I]-3-Iodcytisin Tracers erreicht werden konnte. Die im Vergleich zu 2- ^{18}F -A-85380 hohen Aktivitätsanreicherungen des [^{131}I]-3-Iodcytisin in den Organen Magen, Darm, Leber und Nieren sind nicht unbedingt wünschenswert, können aber teilweise durch die Art der Ausscheidung in den Nieren oder aber durch einen noch näher zu untersuchenden Metabolismus (vgl. 4.7) erklärt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das [^{131}I]-3-Iodcytisin und das 2- ^{18}F -A-85380 sich ähnlich verhalten. Dabei fällt die rasche Auf- und Abnahmegeschwindigkeit der radioaktiven Konzentration beider Tracer in den Nieren auf, die für eine direkte Eliminierung der Tracer über die Nieren und die Ausscheidung über den Urin spricht.

In den Organen Magen, Darm, Milz und Leber konnten vor allem beim [^{131}I]-3-Iodcytisin teilweise sehr hohe Anreicherungen an Aktivität gemessen werden. Selbst durch Nikotin wurde die Aufnahme nicht beeinflusst, welches für eine nicht spezifische Bindung spricht. Die teilweise hohen Anreicherungen des [^{131}I]-3-Iodcytisins können hingegen für die Bildung von Metaboliten sprechen.

4.6.2 Vergleich von 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Hirn

In Abb. 24 sind die Messergebnisse von 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisin nach 60 und 180 Minuten dargestellt. Im Hirn wird dabei nach 60 Minuten in etwa die gleiche Aktivitätsanreicherung gemessen.

In den restlichen Organen ist vor allem die Anreicherung der Aktivität von [¹³¹I]-3-Iodcytisin höher als diejenige von 2-[¹⁸F]F-A-85380. Ein ähnliches Bild bietet sich auch nach 180 Minuten.

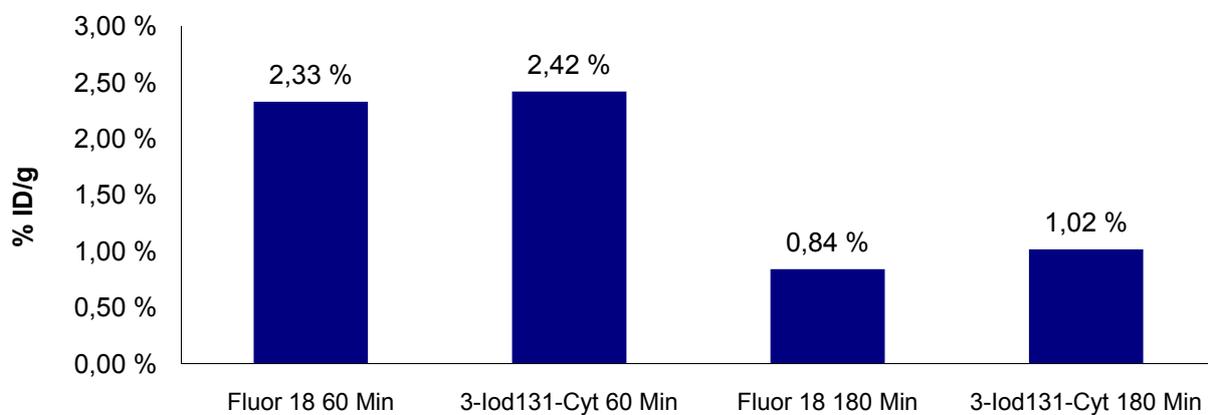


Abb. 24: Vergleich der Aktivitätsanreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisins in % ID/g im Hirn nach 60 und 180 Minuten

Im Zuge der Untersuchung der Verdrängung mit Nikotin konnte bei beiden Tracern eine deutlich niedrigere Aktivität der jeweiligen Tracer gemessen werden und somit eine Verdrängung durch Nikotin beobachtet werden.

Die Ratio mit Nikotin/ohne Nikotin betrug für 2-[¹⁸F]F-A-85380 0,41 und für [¹³¹I]-3-Iodcytisin 0,57. Dies deutet also auf eine spezifische und reversible Bindung beider Tracer an $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren im Hirn hin.

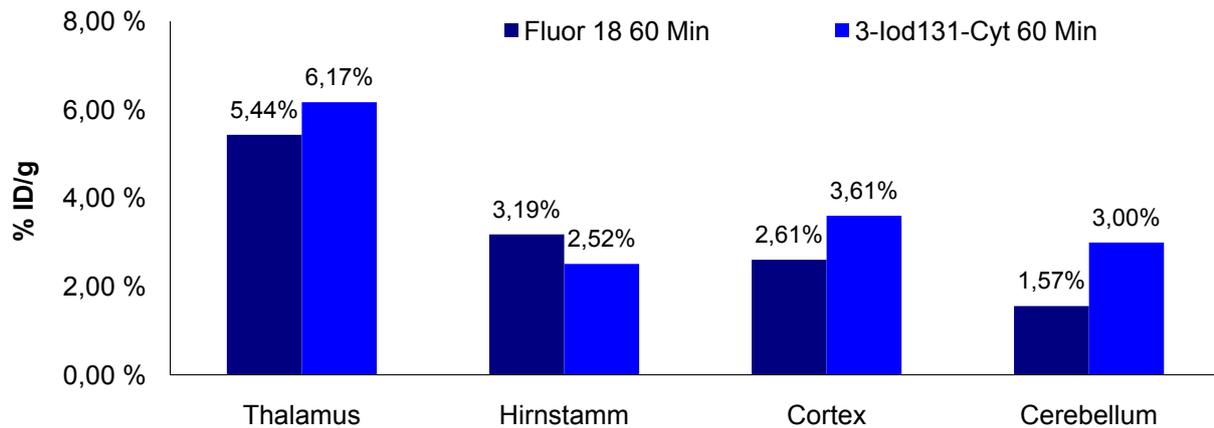


Abb. 25: Vergleich der Aktivitätsverteilungen des 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisins in % ID/g in den oben aufgeführten Hirnstrukturen nach 60 Minuten

Betrachtet man die einzelnen Hirnabschnitte (vgl. Abb. 25), so fällt auf, dass im Thalamus die höchste Aktivitätsanreicherung von [¹³¹I]-3-Iodcytisins und von 2-[¹⁸F]F-A-85380 vorliegt. Vergleicht man die Werte des [¹³¹I]-3-Iodcytisins in Abb. 22 mit Ergebnissen in der Literatur, so stellt man fest, dass das [¹³¹I]-3-Iodcytisins schon nach 15 Minuten sein Maximum an Aktivitätsanreicherung im Thalamus mit 13,17 % ID/g erreicht, im Gegensatz zum 2-[¹⁸F]F-A-85380, bei dem das Aktivitätsmaximum erst nach 60 Minuten bei 6 % ID/g erreicht wird (Horti et al., 1998). Das 2-[¹⁸F]F-A-85380 weist somit eine langsamere Kinetik als [¹³¹I]-3-Iodcytisins auf.

Nach dem Thalamus (vgl. Abb. 25) beobachtet man auch Aktivitätsanreicherung im Cortex, Hirnstamm und Cerebellum. Die Ergebnisse des 2-[¹⁸F]F-A-85380 sind, wie schon erwähnt, mit den Ergebnissen in der Literatur vergleichbar. Entsprechend der Verteilung der $\alpha\beta_2$ nACh-Rezeptordichte wird im Cortex eine Aktivitätsanreicherung von [¹³¹I]-3-Iodcytisins gemessen, die mit den oben erwähnten Daten der Literatur und unseren Ergebnissen mit 2-[¹⁸F]F-A-85380 vergleichbar sind.

Es zeigt sich zusätzlich eine Anreicherung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins im Cerebellum (vgl. Abb. 22), die mit 2-[¹⁸F]F-A-85380 an Mäusen nicht zu beobachten war. Betrachtet man die Ratio des Cerebellums (Ratio 60/15, 0,46 und Ratio 240/15, 0,05) nach 60 und 240 Minuten und vergleicht sie mit der Ratio des Thalamus (Ratio 60/15 0,5 und Ratio 240/15, 0,3) und des Cortex (Ratio 60/15, 0,57 und Ratio 240/15, 0,14), dann kann der rasche Abfall der Aktivität im Cerebellum ein Hinweis darauf sein, dass es sich um eine

nicht-spezifische Bindung des injizierten Tracers oder um einen hirngängigen Metaboliten handelt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass sich das [^{131}I]-3-Iodcytisin nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in den Bereichen des Hirns mit der höchsten Dichte von $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren anreichert.

Es scheint sich somit bei [^{131}I]-3-Iodcytisin um einen Tracer zu handeln, der mit ^{123}I markiert für das bildgebende Verfahren der SPECT geeignet sein könnte.

Festzuhalten gilt jedoch auch, dass teilweise höhere Anreicherungen des [^{131}I]-3-Iodcytisin im Vergleich zu 2- ^{18}F]-F-A-85380 in Leber, Magen, Darm und Nieren beobachtet wurden. Die im Vergleich zu 2- ^{18}F]-F-A-85380 hohen Aktivitätsanreicherungen in diesen Organen sind nicht unbedingt wünschenswert, können aber teilweise durch die Art der Ausscheidung über die Nieren oder aber durch einen noch näher zu untersuchenden Metabolismus (vgl. 4.7) erklärt werden.

4.7 Metabolitenbestimmung

Ziel der Metabolitenbestimmung ist es, Metabolite im Blut nachzuweisen und somit die beobachtete Verteilung bzw. Kinetik besser interpretieren zu können.

Das durch zentrifugieren erhaltene Plasma wird zur Identifizierung der Strukturen durch die HPLC aufgetrennt.

Die Messung des Plasmas auf der HPLC-Säule ergab den ersten radioaktiven Peak nach ca. 3 Minuten, den zweiten Peak nach ca. 14 Minuten und den dritten nach ca. 17 Minuten (vgl. Abb. 26 und Tab. 11).

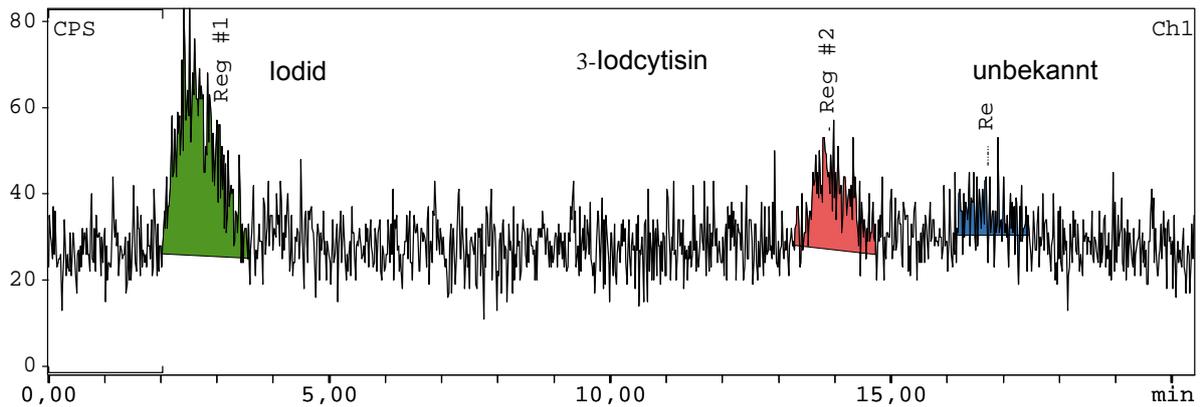


Abb. 26: HPLC 060228.6: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) [^{131}I]-3-Iodcytisin [Gradient 0:100 → 40:60 (MeCN/TFA 0,1 %)] : Nachweis von Metaboliten in der Plasmaprobe nach 120 Minuten: Peaks nach 4, 14 und 17 Minuten auf der HPLC.

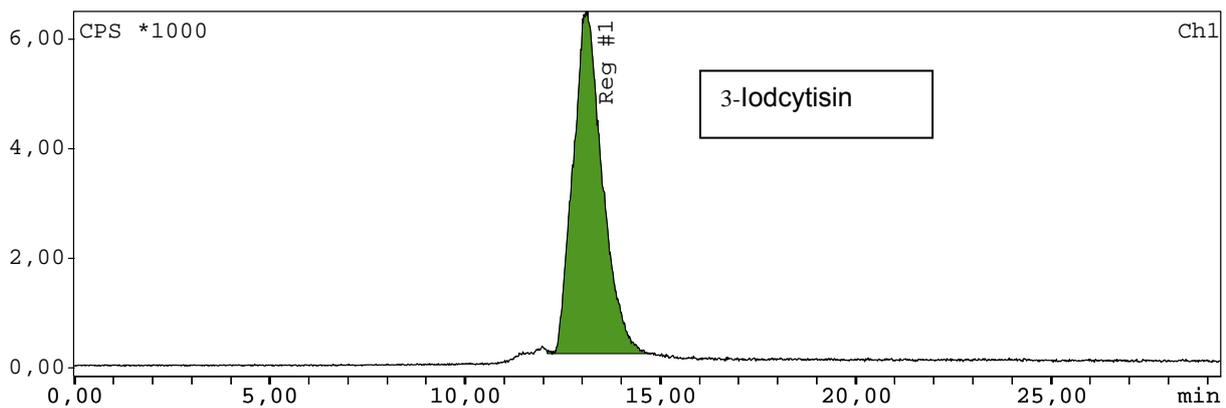


Abb. 27: HPLC 060301.3: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) [^{131}I]-3-Iodcytisin [Gradient 0:100 → 40:60 (MeCN/TFA 0,1 %)] Chromatogramm des Kontrollversuches (Mischung aus Plasma und [^{131}I]-3-Iodcytisin). Peak nach ca. 13 Minuten, der als [^{131}I]-3-Iodcytisin identifiziert wurde.

Tab. 11: Retentionszeiten und die relative Intensität der Peaks für die HPLC (Plasmaprobe nach 120 Minuten). Neben dem [¹³¹I]-3-Iodcytisin wurden auch 2 Metabolite nach ca. 2-3 und 16 Minuten nachgewiesen.

Peak	Retentionszeit [min]	Anteil Fläche an der Gesamtfläche
Reg #1 Iodid	2,60	62 %
Reg #2 3-Iodcytisin	13,8	28 %
Reg #3 unbekannt	16,2	10 %

Zur Verifizierung der Retentionszeiten der gefundenen Peaks wurde ein Kontrollversuch mit einer Mischung aus Plasma und [¹³¹I]-3-Iodcytisin (vgl. 3.11) durchgeführt. Hierbei wurde der nach ca. 13 Minuten gemessene Peak als [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Blutplasma identifiziert (vgl. Abb. 27).

Neben einer relativ geringen Aktivitätsanreicherung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins (28 %) konnten im Plasma (120 Minuten) zwei Metabolite nachgewiesen werden. Während der Metabolit bei ca. 16 Minuten unbekannt ist, konnten etwa 60 % der Aktivität als [¹³¹I]-3-Iodid identifiziert werden. Die gemessene hohe Aktivitätsanreicherung in Magen, Leber und im gesamten Intestinaltrakt kann durch die Bildung des [¹³¹I]-3-Iodid erklärt werden. Das Iodid gelangt nicht über die Blut-Hirn-Schranke und man kann deshalb davon ausgehen, dass im Hirn nur die Verteilung des intakten Tracers gemessen wurde. Es wurde jedoch ein weiterer Metabolit entdeckt, der nicht identifiziert werden konnte und deshalb die Hirngängigkeit weder bestimmt noch abgeschätzt werden kann. Jedoch sprechen die Ergebnisse der Verteilung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins im Hirn in dieser Arbeit nicht dafür.

Abschließend lässt sich aus den Ergebnissen der Metabolitenbestimmung folgern, dass eine weitgehende Metabolisierung von [¹³¹I]-3-Iodcytisin in den ersten 2 Stunden stattgefunden haben muss, d.h. dass eine Anreicherung an Aktivität aufgrund von Rezeptorenbindung vorwiegend am Anfang stattgefunden hat. Der Metabolismus von [¹³¹I]-3-Iodcytisins zum [¹³¹I]-3-Iodid hat für die Verteilung im Hirn nur marginale Bedeutung. Durch die Metabolisierung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins werden aber kinetische Berechnungen

erschwert und es wird die Ganzkörper-Strahlenbelastung bei potentiellen Probanden erhöht.

5. Zusammenfassung

Für die Darstellung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren sind sowohl das 2-[^{18}F]-A85380 in der PET als auch potentiell das [^{131}I]-3-Iodcytisin in der SPECT gut geeignet. Damit eröffnen beide Tracer eine weitere Möglichkeit, degenerative Prozesse und andere nAChR-abhängige Krankheiten im Hirn, wie die Alzheimer Erkrankung oder Parkinson, frühzeitig zu entdecken und im Verlauf zu beobachten.

Bei der Synthese von [^{131}I]-3-Iodcytisin wurden zwei Verfahren angewandt. Die Radioiodierung mit Iodogen und die Radioiodierung mit Salpetersäure. Bei der Radioiodierung mit Iodogen in TFA entstanden als Produkte nicht nur [^{131}I]-3-Iodcytisin, sondern auch das verwandte [^{131}I]-(-)5-Iodcytisin und weitere nicht-radioaktive Nebenprodukte. Aufgrund ihrer höheren Ausbeute an reinem [^{131}I]-3-Iodcytisin und der ausschließlichen Bildung des 3-Iod-Isomers wurde die Radioiodierung mit Salpetersäure zur Synthese ausgewählt.

Das 2-[^{18}F]-A85380 wurde über die Radiofluorierung mit [^{18}F]-Fluorid hergestellt. Abschließend wurden beide Tracer über die HPLC und SPE für die weiteren Versuche aufgereinigt.

Ziel der Autoradiographie war die in vitro Darstellung der nACh-Rezeptoren in Hirnabschnitten bei der Umgehung der Blut-Hirn-Schranke. Es sollte bei den in vitro Versuchen gezeigt werden, dass das [^{131}I]-3-Iodcytisin tatsächlich eine hohe Affinität zu den $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren aufweist.

In allen Schnitten der Mäuse- und Rattenhirne wurde die höchste Aktivität des Tracers im Thalamus gemessen. Dies war zu erwarten, da dort die höchste Dichte an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren vorliegt. Der Cortex und das Striatum zeigten dagegen eine relativ geringe Aktivitätsanreicherung des [^{131}I]-3-Iodcytisins. Im Cerebellum war wie erwartet keine Aufnahme nachweisbar.

Festzuhalten ist, dass die Ergebnisse der Autoradiographie positiv zu bewerten sind. Das [^{131}I]-3-Iodcytisin ist in vitro zur Darstellung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren geeignet. Es konnte hierbei die genaue Verteilung der $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren gezeigt werden.

Um einen Vergleich zu haben, wurde einem Teil der Mäuse mit 2-[¹⁸F]-A85380 ein bekannter $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptor-PET Tracer injiziert. Dabei ergab sich, dass das [¹³¹I]-3-Iodcytisin mit einer vergleichbaren Aktivität in % ID/g, wie das 2-[¹⁸F]-A85380 im Hirn angereichert wird. Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass auch das [¹³¹I]-3-Iodcytisin an die $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Hirn bindet. In den restlichen Organen lag die Aktivitätsanreicherung von [¹³¹I]-3-Iodcytisin im Vergleich zu 2-[¹⁸F]-A85380 höher. Durch eine Metabolitenbestimmung konnte der Verdacht bestätigt werden, dass es sich hierbei um nicht spezifische Bindungen in den Organen handelt und außerdem signifikante Mengen an freiem Iodid gebildet werden.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von [¹³¹I]-3-Iodcytisin an die $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Vergleich zu 2-[¹⁸F]-A85380 wurde die Verteilung beider Tracer unter Nikotingabe untersucht. Beide Tracer wurden durch Nikotin im Hirn verdrängt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich sowohl bei 2-[¹⁸F]-A85380 als auch bei [¹³¹I]-3-Iodcytisin um reversible, spezifische Bindungen an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren im Hirn handelt. Auch die Ergebnisse beim Herz lassen vermuten, dass es sich um spezifische und reversible Bindungen an $\alpha_4\beta_2$ nACh-Rezeptoren handelt. In den übrigen Organen wurde bei Zugabe von Nikotin sowohl beim [¹³¹I]-3-Iodcytisin als auch beim 2-[¹⁸F]-A85380 keine Verdrängung beobachtet. Hierbei liegen nicht-spezifische Bindungen vor. Beim [¹³¹I]-3-Iodcytisin spielen hier die Art der Ausscheidung über den Verdauungstrakt und die Harnwege, aber auch die Bildung von Metaboliten ([¹³¹I]-3-Iodid) eine Rolle.

Wie 2-[¹⁸F]-A85380 in der PET so stellt 3-Iodcytisin als ¹²³I markiert für die SPECT eine Alternative zu den bestehenden Tracern dar, und zwar mit einer deutlich höheren Halbwertszeit. In dieser Richtung bildet die vorliegende Arbeit allerdings nur einen ersten Schritt. Für eine weitere Untersuchung mit [¹³¹I]-3-Iodcytisin sollte eine größere Anzahl an Versuchstieren gewählt werden. Damit könnte die Zuverlässigkeit der Ergebnisse deutlich gesteigert werden. Als weiterführende Untersuchungen wären die Bestimmung der Geschwindigkeit der Metabolisierung und die Aufklärung der hohen Aufnahme im Cerebellum ex vivo von Interesse. Lohnend wäre ferner die detaillierte Untersuchung der Hirnaufnahme und Verteilung sowie der Verdrängung durch Nikotin innerhalb der ersten 90 Minuten nach Injektion.

6. Verzeichnis der Tabellen	Seite
Tab. 1: Medizinisch häufig angewendete Radionuklide und ihre Zerfallsdaten (Chu et al., 1999)	14
Tab. 2: Anwendungsgebiete einiger PET-Radiopharmaka (Brandau et al., 2001)	15
Tab. 3: Einige Beispiele für Isotope in der SPECT – Diagnostik mit ihren Halbwertszeiten, die sich für zeitaufwendige Synthesen, längere in vivo Messungen oder längere Transporte eignen.	17
Tab. 4: Einige Beispiele für Radiopharmaka in der SPECT – Diagnostik (Horti und Villemagne, 2006; Otte und Halsband, 2006)	17
Tab. 5: Affinitäten der Cytisinderivate zu nACh-Rezeptor Subtypen (Imming et al., 2001). Dabei weisen die 3-Halocytisine eine höhere subnanomolare Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren auf als 5-Halocytisine und 3,5-Dihalocytisine.	27
Tab. 6: Verwendete Chemikalien in den durchgeführten Untersuchungen	30
Tab. 7: Aufschlüsselung der Anzahl von Versuchstieren	39
Tab. 8: Retentionszeiten der Peaks und relative Produktverteilung (für Radioiodierung in TFA). Nach 45 Minuten Reaktionszeit konnte eine Ausbeute von etwa 50 % an [^{131}I]-3-Iodcytisin erreicht werden.	43
Tab. 9: Retentionszeiten der Peaks und relative Produktverteilung (Radioiodierung mit Salpetersäure). Nach 45 Minuten Reaktionszeit führte die Synthese fast ausschließlich zur Bildung von [^{131}I]-3-Iodcytisin.	44
Tab. 10: Verhältnisse der gemessenen Intensitäten des [^{131}I]-3-Iodcytisin in Bezug zum Cortex von Mäusen und Ratten sowie Literaturwerte des 2- ^{18}F -A85380 für Ratten (Schmaljohann et al., 2004)	49

Tab. 11: Retentionszeiten und die relative Intensität der Peaks für die HPLC (Plasmaprobe nach 120 Minuten). Neben dem [¹³¹I]-3-Iodcytisin wurden auch 2 Metabolite nach ca. 2-3 und 16 Minuten nachgewiesen.

7. Verzeichnis der Abbildungen		Seite
Abb. 1:	Struktur des Nikotins	25
Abb. 2:	Struktur des Cytisins	26
Abb. 3:	Struktur des Cytisins mit mesomeren Grenzstrukturen	41
Abb. 4:	Struktur des 3-Iod Cytisins	41
Abb. 5:	Struktur des 5-Iod Cytisins	42
Abb. 6:	HPLC 050825.1 - Radioiodierung mit Iodogen in Trifluoressigsäure HPLC-Bedingungen: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) (MeCN/TFA 0,1 %; 40/60). Die HPLC-Analyse ergab dabei einen Hauptpeak bei ca. 15 Minuten, der als [¹³¹I]-3-Iodcytisin identifiziert werden konnte.	43
Abb. 7:	HPLC 050901.2 - Radioiodierung mit Salpetersäure - HPLC-Bedingungen: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) (MeCN/TFA 0,1 %). Die HPLC-Analyse ergab dabei einen Hauptpeak bei ca. 15 Minuten, der als [¹³¹I]-3-Iodcytisin identifiziert werden konnte.	44
Abb. 8:	Autoradiographie des Rattenhirns im Horizontalschnitt zur in vitro Darstellung der nACh-Rezeptoren durch [¹³¹I]-3-Iodcytisin	48
Abb. 9:	Autoradiographie des Mäusehirns im Sagittalschnitt zur in vitro Darstellung der nACh-Rezeptoren durch [¹³¹I]-3-Iodcytisin	48
Abb. 10:	Vergleich der Verteilung des radioaktiven Tracers 2-[¹⁸F]F-A-85380 in den oben aufgeführten Organen nach 60 und 180 Minuten in % ID/g. Siehe dazu auch die statistische Auswertung Abb. 12.	51
Abb. 11:	2-[¹⁸F]F-A-85380 - Ratio der % ID/g 180/60 Minuten zum Vergleich der Aktivitätsänderung in den einzelnen Organen	51
Abb. 12:	Relative Standardabweichungen des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in den zu vergleichenden Organen nach 60 Minuten	52

Abb. 13:	Vergleich der Aktivitätsverteilung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 anhand der oben aufgeführten Organe mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin nach 60 Minuten	54
Abb. 14:	Vergleich der Anreicherung der Aktivität des [¹³¹I]-3-Iodcytisins anhand der oben aufgeführten Organe in % ID/g nach 15, 60, 120, 180 und 240 Minuten	55
Abb. 15:	[¹³¹I]-3-Iodcytisins - Ratio der % ID/g für 60/15, 120/15, 180/15 und 240/15 Minuten zum Vergleich der Aktivitätsänderung in den einzelnen Organen	56
Abb. 16:	Relative Standardabweichungen des [¹³¹I]-3-Iodcytisins nach 15 Minuten in den zu vergleichenden Organen	57
Abb. 17:	Vergleich der Aktivitätsverteilung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins in den oben aufgeführten Organen mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin nach 120 Minuten	58
Abb. 18:	Die Anreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in % ID/g im Hirn nach 60 und 180 Minuten im Vergleich zu den Daten in der Literatur (Horti et al., 1998)	59
Abb. 19:	Vergleich der Aktivitätsanreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 im Hirn in % ID/g mit und ohne zuvor injiziertem Nikotin nach 60 Minuten	60
Abb. 20:	Vergleich der Verteilung der Aktivität des 2-[¹⁸F]F-A-85380 in % ID/g in den oben aufgeführten Hirnstrukturen nach 60 und 180 Minuten	61
Abb. 21:	Vergleich der Anreicherung des [¹³¹I]-3-Iodcytisins im Hirn in % ID/g nach 15, 60, 120, 180 und 240 Minuten	63
Abb. 22:	Die Verteilung der Aktivitätsanreicherung in % ID/g des [¹³¹I]-3-Iodcytisins in den oben aufgeführten Hirnregionen nach 15, 60 und 240 Minuten	64
Abb. 23:	Vergleich der Aktivitätsverteilung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisins in % ID/g in den oben aufgeführten Organen nach 60 und 180 Minuten	65

- Abb. 24:** Vergleich der Aktivitätsanreicherung des 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisins in % ID/g im Hirn nach 60 und 180 Minuten **67**
- Abb. 25:** Vergleich der Aktivitätsverteilungen des 2-[¹⁸F]F-A-85380 und [¹³¹I]-3-Iodcytisins in % ID/g in den oben aufgeführten Hirnstrukturen nach 60 Minuten **68**
- Abb. 26:** HPLC 060228.6: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) [¹³¹I]-3-Iodcytisins [Gradient 0:100 → 40:60 (MeCN/TFA 0,1 %)] : Nachweis von Metaboliten in der Plasmaprobe nach 120 Minuten: Peaks nach 4, 14 und 17 Minuten auf der HPLC. **70**
- Abb. 27:** HPLC 060301.3: RP 18 – Säule (LiChrospher 100) (Flow 1 ml/min) [¹³¹I]-3-Iodcytisins [Gradient 0:100 → 40:60 (MeCN/TFA 0,1 %)] Chromatogramm des Konotrollversuches (Mischung aus Plasma und [¹³¹I]-3-Iodcytisins). Peak nach ca. 13 Minuten, der als [¹³¹I]-3-Iodcytisins identifiziert wurde. **70**

8. Literaturverzeichnis

Biersack HJ, Bender H, Ruhlmann J, Oehr P, Guhlke S, Grünwald F. Clinical PET in Oncology. Rev Esp Med Nucl 2000; 19: 219-224

Blessing C, Feine U, Geiger L, Carl M, Rassner G, Fierlbeck G. Positron emission tomography and ultrasonography. A comparative study assessing the diagnostic validity in lymphnode metastases of malignant melanoma. Arch dermatol 1995; 131: 1394-1398

Brandau W, Becker W, Meyer GJ. In: Büll U, Schicha H, Biersack HJ, Knapp WH, Reiners C, Schober O, Hrsg. Nuklearmedizin. Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag, 2001: 83-84

Breidenbach M, 2003: Trägerarm markierte 6-Aminopurinderivate als potentielle Adenosin-A_{2a}Rezeptorliganden für die Positronen-Emissions-Tomographie. <http://kups.ub.uni-koeln.de/1060/> (Zugriffsdatum: 16.07.2013)

Brust P, Peters D, Deuther-Conrad W. Development of radioligands for the imaging of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors with positron emission tomography. Curr Drug Targets 2012; 13: 594-601

Bucerius J, Joe AY, Schmaljohann J, Gündisch D, Minnerop M, Biersack HJ, Wüllner U, Reinhardt MJ. Feasibility of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose-A85380-PET for imaging of human cardiac nicotinic acetylcholine receptors in vivo. Clin Res Cardiol 2006; 95: 105-109

Cheffer SI, Horti AG, Koren AO, Gündisch D, Liks JM, Kurian V, Dannals RF, Mukhin AG, London ED. 2-[¹⁸F]F-A-85380: a PET radioligand for alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. Neuroreport 1999; 10: 2715-2721

Cheffer SI, London ED, Koren AO, Pavlova OA, Kurian V, Kimes AS, Horti AG, Mukhin AG. Graphical analysis of 2-[¹⁸F]FA binding to nicotinic acetylcholine receptors in rhesus monkey brain. Synapse 2003; 48: 25-34

Chu SYF, Ekström LP, Firestone RB, 1999: The Lund/LBNL Nuclear Data Search. <http://nucleardata.nuclear.lu.se/nucleardata/toi/> (Zugriffsdatum: 10.2.2013)

Damian D, Fulham M, Thompson E, Thompson J. Positron emission tomography in the detection and management of metastatic melanoma. *Melanoma Res* 1996; 6: 325-329

Ding YS, Molina PE, Fowler JS, Logan J, Volkow ND, Kuhar MJ, Carroll FI. Comparative studies of epibatidine derivatives [¹⁸F]NFEP and [¹⁸F]N-methyl-NFEP: kinetics, nicotine effect, and toxicity. *Nucl Med Biol* 1999; 26: 139-148

Ding YS, Gatley SJ, Fowler JS, Volkow ND, Aggarwal D, Logan J, Dewey SL, Liang F, Carroll FI, Kuhar MJ. Mapping nicotinic acetylcholine receptors with PET. *Synapse* 1996; 24: 403-407

Dollé F, Dolci L, Valette H, Hinnen F, Vaufrey F, Guenther I, Fuseau C, Coulon C, Botlaender M, Crouzel C. Synthesis and nicotinic acetylcholine receptor in vivo binding properties of 2-fluoro-3-[2(S)-2-azetidylmethoxy]pyridine: a new positron emission tomography ligand for nicotinic receptors. *J Med Chem* 1999; 42: 2251-2259

Engidawork E, Gulesserian T, Balic N, Cairns N, Lubec G. Changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits expression in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2001; 61: 211-222

Flesher JE, Scheffel U, London ED, Frost JJ. In vivo labeling of nicotinic cholinergic receptors in brain with [³H]cytisine. *Life Sci* 1994; 54: 1883-1890

Gündisch D, London ED, Terry P, Hill GR, Mukhin AG. High affinity binding of [³H]epibatidine to rat brain membranes. *Neuroreport* 1999; 10:1631-1636

Gündisch D. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Imaging. *Curr Pharm Des* 2000; 6:1143-1157

Grünwald F, Biersack HJ, Kuschinsky W. Nicotine receptor mapping. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 1012-1014

Horti AG, Scheffel U, Koren AO, Ravert HT, Mathews WB, Musachio JL, Finley PA, London ED, Dannals RF. 2-[¹⁸F]Fluoro-A-85380, an in vivo tracer for the nicotinic acetylcholine receptors. *Nucl Med Biol* 1998; 25: 599-603

Horti AG, Chefer SI, Mukhin AG, Koren AO, Gündisch D, Links JM, Kurian V, Dannals RF, London ED. 6-[¹⁸F]fluoro-A-85380, a novel radioligand for in vivo imaging of central nicotinic acetylcholine receptors. *Life Sci* 2000; 67: 463-469

Horti AG, Villemagne VL. The quest for Eldorado: development of radioligands for in vivo imaging of nicotinic acetylcholine receptors in human brain. *Cur Farm Des* 2006; 12: 3877-3900

Imming P, Klaperski P, Stubbs MT, Seitz G, Gündisch D. Syntheses and evaluation of halogenated cytosine derivatives and of bioisosteric thiocytosine as potent and selective nAChR ligands. *Eur J Med Chem* 2001; 36: 375-388

Kassiou M, Ravert HT, Mathews WB, Musachio JL, London ED, Dannals RF. Synthesis of 3-[(1-[¹¹C]methyl-2(S)-pyrrolidinyl) methoxy]pyridine and 3-[(1-[¹¹C]methyl-2(R)-pyrrolidinyl) methoxy]pyridine: Radioligands for in vivo studies of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Labelled Comp Radiopharm* 1997; 39: 425-431

Kimes AS, Horti AG, London ED, Chefer SI, Contoreggi C, Ernst M, Friello P, Koren AO, Kurian V, Matochik JA, Pavlova O, Vaupel DB, Mukhin AG. 2-[¹⁸F]F-A-85380: PET imaging of brain nicotinic acetylcholine receptors and whole body distribution in humans. *FASEB J* 2003; 17: 1331-1333

Koren AO, Horti AG, Mukhin AG, Gündisch D, Dannals RF, London ED. Synthesis and initial in vitro characterization of 6-[¹⁸F]fluoro-3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine, a high-affinity radioligand for central nicotinic acetylcholine receptors. *J Labelled Comp Radiopharm* 2000; 43: 413-423

Kuruvilla SA, Hillmer AT, Wooten DW, Patel A, Christian BT, Mukherjee J. Synthesis and evaluation of 2-(¹⁸F)-fluoro-5-iodo-3-[2-(S)-3,4-dehydropyrrolinylmethoxy]pyridine ((¹⁸F)-Niofene) as a potential imaging agent for nicotinic $\alpha 4\beta 2$ receptors. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 4: 354-364

Lange D. Physikalische Grundlagen. In: Büll U, Schicha H, Biersack HJ, Knapp WH, Reiners C, Schober O, Hrsg. *Nuklearmedizin*. Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag, 2001: 4-47

Långström B, Antoni G, Halldin C, Svärd H, Bergson G. Synthesis of Some ^{11}C Labelled Alkaloids. Dedicated to Professor Arne Fredga on his 80th birthday. *Chem Scr* 1982; 20: 46-48

Liang F, Navarro HA, Abraham P, Kotian P, Ding YS, Fowler J, Volkow N, Kuhar MJ, Carroll FI. Synthesis and nicotinic acetylcholine receptor binding properties of exo-2-(2'-fluoro-5'-pyridinyl)-7-azabicyclo-[2.2.1]heptane: A new positron emission tomography ligand for nicotinic receptors. *J Med Chem* 1997; 40: 2292-2295

Mazière M, Comar D, Marazano C, Berger G. Nicotine- ^{11}C : synthesis and distribution kinetics in animals. *Eur J Nucl Med* 1976; 1: 255-258

Molina PE, Ding YS, Carroll FI, Liang F, Volkow ND, Pappas N, Kuhar M, Abumrad N, Gatley SJ, Fowler JS. Fluoro-norchloroepibatidine: preclinical assessment of acute toxicity. *Nucl Med Biol* 1997; 24: 743-747

O'Brien JT. Role of imaging techniques in the diagnosis of dementia. *Br J Radiol* 2007; 80: 71-77

Ogawa M, Tsukada H, Hatano K, Ouchi Y, Saji H, Magata Y. Central in vivo nicotinic acetylcholine receptor imaging agents for positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT). *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 337-340

Özbolat A. No carrier added (n.c.a.) Radioiodierung des nikotinischen Acetylcholinrezeptorliganden (-)-Cytisin. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fak., Universität Bonn, 2004

Otte A, Nofzinger FA, Audenaert K, Goethals I, Dierckx RA. Nuclear medicine asleep in sleep research?. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29: 1417-1420

Otte A, Audenaert K, Nofzinger FA, Dierckx RA. Brain SPECT in sleep research. *Sleep* 2003; 26: 227

Otte A, Halsband U. Brain imaging tools in neurosciences. *J Physiol Paris* 2006; 99: 281-292

Pérez EG, Cassels BK, Eibl C, Gündisch G. Synthesis and evaluation of N(1)-alkylindole-3-ylalkylammonium compounds as nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 3719-3727

Reuter P. Nuklearmedizin. In: Springer Klinisches Wörterbuch. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007: 1315

Schiefer U, Skalej M, Kolb R, Grodd W, Fahle M, Herzog H. Cerebral activity during visual stimulation: a positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging study. *Ger J Ophthalmol* 1996 5: 109-117

Schicha H, Schober O. Prinzipien der Nuklearmedizin. In: Schicha H, Schober O. Nuklearmedizin. Basiswissen und klinische Anwendung. Stuttgart - New York: Schattauer, 2003: 2-8

Schmaljohann J, Minnerop M, Karwath P, Gündisch D, Falkai P, Gohlke S, Wüllner U. Imaging of central nACh Receptors with 2-[¹⁸F] F-A85380: optimized synthesis and in vitro evaluation in Alzheimer's disease. *Appl Radiat Isot* 2004; 61: 1235-1240

Schmaljohann J, Gündisch D, Minnerop M, Joe A, Buccerius J, Dittmar C, Jessen F, Gohlke S, Wüllner U. A Simple and fast method for the preparation of n.c.a. 2-[¹⁸F]F-A-85380 for human use. *Appl Radiat Isot* 2005; 63: 433-435

Singhal T. Positron emission tomography applications in clinical neurology. *Semin Neurol* 2012; 32: 421-431

Tai YF, Piccini P. Applications of positron emission tomography (PET) in neurology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 669-676

Universitätsklinikum Düsseldorf, 2005: Überblick über die Geschichte der Nuklearmedizin. <http://www.uniklinik-duesseldorf.de/deutsch/unternehmen/kliniken/nuklearmedizinischeklinik/Willkommen/Geschichte/page.html> (Zugriffsdatum: 30.07.2006)

Urhahn T, 1999: Seminararbeit zur Vorlesung Toxikologie der Naturstoffe Cytisin. <http://www.urhahn.net/Thorsten/Forschung/cytisin.pdf> (Zugriffsdatum: 15.12.2007)

Valette H, Bottlaender M, Dollé F, Dolci L, Syrota A, Crouzel C. An attempt to visualize baboon brain nicotinic receptors with N-[11C]ABT-418 and N-[11C]methyl-cytisine. *Nucl Med Commun* 1997; 18: 164-168

Villemagne VL, Horti A, Scheffel U, Ravert HT, Finley P, Clough DJ, London ED, Wagner HN, Dannals RF. Imaging nicotinic acetylcholine receptors with fluorine-18-FPH, an epibatidine analog. *J Nucl Med* 1997; 38: 1737-1741

Wevers A, Schröder H. Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1999; 1: 207-219

Wienhard K, Wagner R, Heiss WD. PET: Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie. Berlin: Springer, 1989

Wikimedia Foundation Inc., 2007: Pharmakologie und Toxikologie: Efferentes peripheres Nervensystem. http://de.wikibooks.org/wiki/Pharmakologie_und_Toxikologie:_Efferentes_peripheres_Nervensystem (Zugriffsdatum: 07.01.2008)

Wu J, Ishikawa M, Zhang J, Hashimoto K, 2010: Brain imaging of nicotinic receptors in Alzheimer's disease. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/548913> (Zugriffsdatum: 31.07.2014)

Wüllner U, Gündisch D, Herzog H, Minnerop M, Joe A, Warnecke M, Jessen F, Schütz C, Reinhardt M, Eschner W, Klockgether T, Schmaljohann J. Smoking upregulates alpha4beta2* nicotinic acetylcholine receptors in the human brain. *Neurosci Lett* 2008; 430: 34-37

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit danke ich ganz besonders meinen Betreuern Dr. Jörn Schmaljohann und PD Dr. Stefan Guhlke, die mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht haben. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Professor Biersack für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können. Dem Team der Klinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik Bonn schulde ich herzlichen Dank für die hilfreiche Unterstützung, ganz besonders im Labor.

Schließlich danke ich noch meinem Bruder Gustav Paulik und meiner Familie, die mir bei allen Fragestellungen zur Seite gestanden und geholfen haben.