

2 Material und Methoden

2.1 Rekrutierung, Ein- und Ausschlußkriterien

Durch Aushang an den Berliner Universitäten wurden gesunde, männliche Rechtshänder im Alter zwischen 18 und 35 Jahren als Probanden für die vorliegende Arbeit gesucht. Aufgrund der zu erwartenden geringfügigen Konzentrationsunterschiede und in Hinblick auf die eingeschränkte Präzision der spektroskopisch ermittelten Konzentrationen wurde eine homogene Stichprobe hinsichtlich Alter und Geschlecht gesucht, um interindividuelle Ursachen für die Variabilität der Messungen zu minimieren. So wurden weibliche Probanden nicht in die Untersuchung eingeschlossen, um zyklusbedingte Einflüsse auf das HPA-System als Störvariable auszuschließen.

Nach Kontaktaufnahme und weiterer ausführlicher Information über Ziel und Ablauf der Untersuchungen wurden die Probanden in einer ersten Screening-Untersuchung auf Ein- und Ausschlusskriterien untersucht. Ausschlusskriterien waren aktuell vorliegende oder chronische körperliche Erkrankungen, eine Medikamenteneinnahme in den letzten 4 Wochen vor oder voraussichtlich während des Untersuchungszeitraumes, außerdem aktuell vorliegende bzw. in der Anamnese bekannte psychiatrische Erkrankungen. Weitere Ausschlusskriterien waren regelmässiger Konsum illegaler Drogen aktuell oder in der Vergangenheit, neurochirurgische Operationen oder Operationen bei denen Metallteile im Körper verblieben sind und ebenso aktuell vorliegende oder voraussichtliche Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus, zum Beispiel durch Schichtarbeit.

Zum Ausschluss einer aktuellen psychiatrischen Erkrankung wurde als standardisierter Fragebogen das Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) verwendet [149].

Die Händigkeit der Probanden wurde anhand der Edinburgh-Händigkeitsskala überprüft. Probanden, die einen Wert < 20 auf der Edinburgh-Händigkeitsskala erreichten, wurden als Nicht-Rechtshänder gewertet [116].

Die vorliegende Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Charite geprüft und als ethisch unbedenklich angesehen. Alle Probanden unterzeichneten nach aus-

fürlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung sowohl eine ausführliche Probandeninformation als auch eine Einwilligungserklärung.

2.2 Studiendesign und zeitlicher Ablauf

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde ein placebokontrolliertes 2-Phasen Cross-Over-Design gewählt. Alle Messungen wurden doppelblind durchgeführt.

Insgesamt wurden 22 Probanden eingeschlossen und, um Reihenfolgeeffekte zu vermeiden, randomisiert zwei Gruppen zugeordnet, die sich in der Abfolge der Cortisolexposition unterschieden. Die Probanden der einen Untersuchungsgruppe erhielten in der ersten Versuchsbedingung Cortisol und im darauffolgenden Durchgang Placebo (im folgenden Gruppe Cortisol/Placebo). Die Probanden der anderen Gruppe nahmen im ersten Untersuchungsdurchgang Placebo und im zweiten Durchgang Cortisol ein (Gruppe Placebo/Cortisol).

Ein Proband aus der Cortisol/Placebo-Gruppe erkrankte nach dem ersten Untersuchungstermin, konnte aus diesem Grund die anderen Untersuchungstermine nicht wahrnehmen und schied deswegen aus der Untersuchung aus.

Pro Versuchsbedingung wurde je eine Pre- und eine Postmedikations-Messung durchgeführt. Zwischen diesen beiden Messungen lagen 4 Tage, in denen die Studienmedikation jeweils morgens und abends von den Probanden selbstständig eingenommen wurde.

Die Studienmedikation wurde von der Apotheke der Charite - Campus Virchow Klinikum hergestellt. Die Cortisol- und Placebokapseln waren hinsichtlich Kapselgröße, Form und Farbe identisch.

Die Zeit zwischen beiden Untersuchungsbedingungen, wurde als passive Eliminationszeit, d.h. ohne Placebo- oder Medikamenten-Einnahme, durchgeführt und betrug 4 Wochen. Durch dieses Vorgehen war ein vollständiges Abfallen der erhöhten Cortisolkonzentration vor Beginn des nächsten Untersuchungsdurchganges gewährleistet.

Mit der Einnahme der Studienmedikation (80 mg Cortisol bzw. Placebo) wurde am Abend des Untersuchungstages nach der Basis-Messung begonnen. Die letzte Medikamenteneinnahme eines Untersuchungsdurchganges erfolgte am Morgen vor der Postmedikations-Messung. Während der Versuchsbedingung Cortisol nahmen die Probanden die Tagesdosis von 160 mg Cortisol auf zwei Einnahmezeitpunkte (8.00 und 20.00 Uhr) verteilt ein.

An jedem Untersuchungstermin kamen die Probanden selbstständig zum Ort der Untersuchung. Nach einer kurzen Ruhephase von 10 Minuten erfolgte die Blutentnahme für die Bestimmung der Serumcortisolkonzentration. Im Anschluß an die Blutentnahme absolvierten die Probanden eine neuropsychologische Testung, nach der die MRT-Messungen durchgeführt wurden.

2.3 Magnetresonanztomographische Messungen

Alle Messungen wurden unter Aufsicht eines in der Durchführung von MR-Spektroskopien sehr erfahrenen Radiologen, PD Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. H. Bruhn, an einem 3-Tesla Signa MR-Scanner (General Electric Healthcare, USA), durchgeführt.

Der eigentlichen spektroskopischen Messung ging die Aufnahme T1-gewichteter struktureller Planungsbilder mittels einer inversionspräparierten 3D Gradientenecho-Sequenz voraus. In Tabelle 2.1 sind die Parameter der anatomischen und spektroskopischen Sequenz angegeben.

	3D-FSPGR	PRESS Gyrus cinguli Weisse Substanz	PRESS Linker Hippocampus Rechter Hippocampus
TR/TE	7,9/3,2 ms	6000/30 ms	6000/30 ms
Auflösung	0,86 x 0,86 x 1 mm ³	-	-
Voxelgröße	-	16 x 16 x 16 mm ³	12 x 12 x 12 mm ³
Scan-Zeit in min	5:08	8:24	8:24
Flipwinkel	20°	90°	90°

Tabelle 2.1: Parameter der MR-Sequenzen

Zu jedem Untersuchungstermin wurden in folgenden Hirnregionen Untersuchungsvolumina für die Spektroskopien plaziert: Gyrus cinguli posterior, rechte frontale weisse Substanz, linker und rechter anteriorer Hippocampus.

Die Voxelgröße in den Hippocampi betrug jeweils 1,7 ml (12 x 12 x 12 mm³), in den beiden anderen Untersuchungsregionen 4,1 ml (16 x 16 x 16 mm³). Die geringere Voxelgröße für die Hippocampus-Messungen wurde gewählt, um eine spezifische Selektion des Hippocampus-Gewebe zu erreichen, wobei ein geringeres Signal-Rausch-Verhältnis

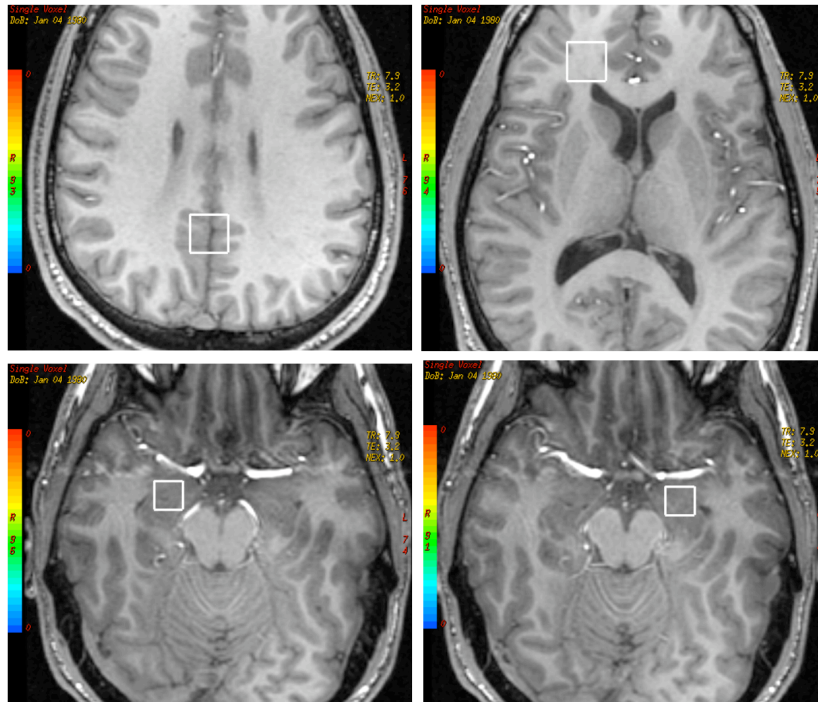


Abbildung 2.1: Voxelpositionierung

in Kauf genommen wurde. Abbildung 2.1 zeigt am Beispiel eines Probanden die Voxelpositionierungen.

Um eine konstante Voxelpositionierung über alle vier Messzeitpunkte hinweg zu gewährleisten, wurde die Voxelposition des ersten Meßzeitpunkt als Referenz benutzt und bei jeder Wiederholungsmessung die Position der Untersuchungsvoxel entsprechend eingestellt.

Für die spektroskopischen Messungen wurde eine PRESS-Sequenz für die Volumenselektion verwendet. Vor jeder Messung wurde die Magnetfeldhomogenität der Untersuchungsvolumina optimiert.

LCModel Analyse der Spektren

Für die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde das Programm LCModel (Linear Combination Model Version 6.01) benutzt [122]. LCM verwendet Referenzspektren der Metabolite und führt mittels Linearkombination unter anderem eine absolute Konzentrationsbestimmung durch.

Aktuell werden von verschiedenen Autoren einheitlichere Qualitätsstandards für spektroskopische Untersuchungen gefordert und vorgeschlagen [86, 165]. Die vorliegende Arbeit orientiert sich an den von Provencher im LCM-Manual genannten Qualitätskriterien. Messungen mit einer zu geringen spektralen Auflösung (FWHM der Wasserresonanz $> 0,1$ ppm) sind nicht in die weiteren Analysen einbezogen worden.

Als weiterer entscheidender Qualitäts- und Reliabilitäts-Indikator wurden die von LC-Model angegebenen Cramer-Rao lower bounds berücksichtigt. Dieser Wert reflektiert zum einen die Qualität der Messungen hinsichtlich spektraler Auflösung und Signal-zu-Rausch-Verhältnis, zum anderen die erreichte Qualität der Anpassung mittels linearer Kombination. Konzentrationswerte mit Cramer-Rao-Werten > 20 sind ebenfalls nicht in der weiteren statistischen Analyse berücksichtigt worden.

Weiterhin wurden die von Kreis genannten Qualitätskriterien umgesetzt [86]. So wurden, neben Berücksichtigung der eben genannten Qualitätsindikatoren, alle Spektren durch PD Dr. Harald Bruhn durch Ansicht einzeln überprüft, um mögliche Artefakte zu identifizieren, die in den vorgeschlagenen Grenzwerten und automatisierten Qualitätskriterien nicht erfasst werden. Die auf den nächsten Seiten folgenden Abbildungen sind Beispiele von LCM-Spektren der vorliegenden Arbeit. Für die untersuchten Hirnregionen ist beispielhaft jeweils ein solches LCModel-Spektrum abgebildet.

SAGE-Analyse der Wasserresonanz

Brown et al. [15] haben in ihrer Arbeit auf den möglichen Einfluss von Cortisol auf die Höhe des unsupprimierten Wassersignals hingewiesen und erklärten damit die Diskrepanz zwischen ihren Ergebnisse und den Ergebnissen von Khat et al. [82], die das unsupprimierte Wassersignal als Referenz zur Konzentrationsbestimmung genutzt haben.

Um einen Einfluss von Cortisol auf das nicht unterdrückte Wassersignal zu überprüfen wurde mittels der Scanner eigenen Analyse-Software SAGE (Spectroscopy Application General Electric), die Werte der nicht unterdrückten Wasserresonanzen ebenfalls auf Unterschiede zu den jeweiligen Untersuchungsbedingungen überprüft.

2 Material und Methoden

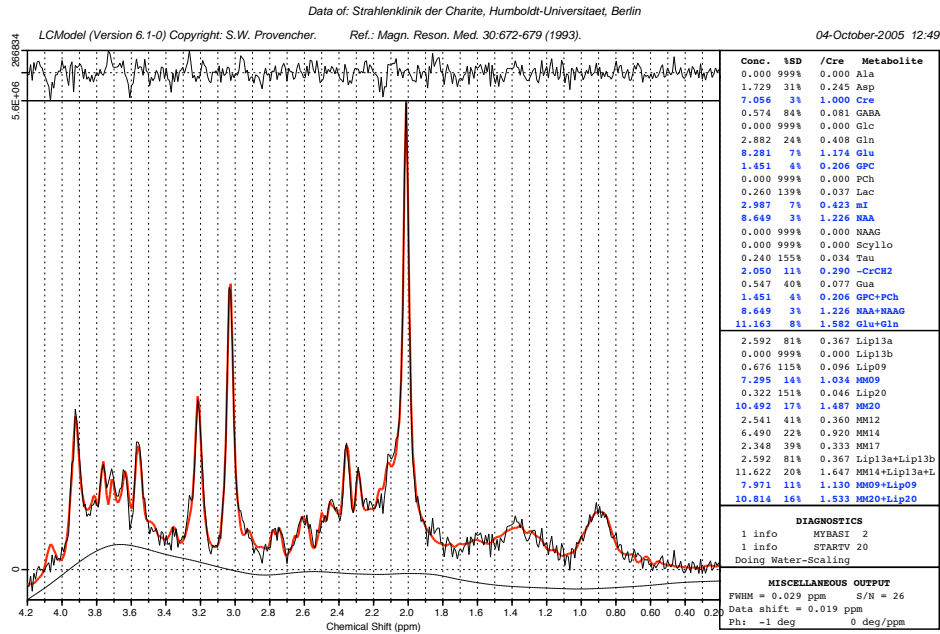


Abbildung 2.2: LCM-Output Gyrus cinguli posterior

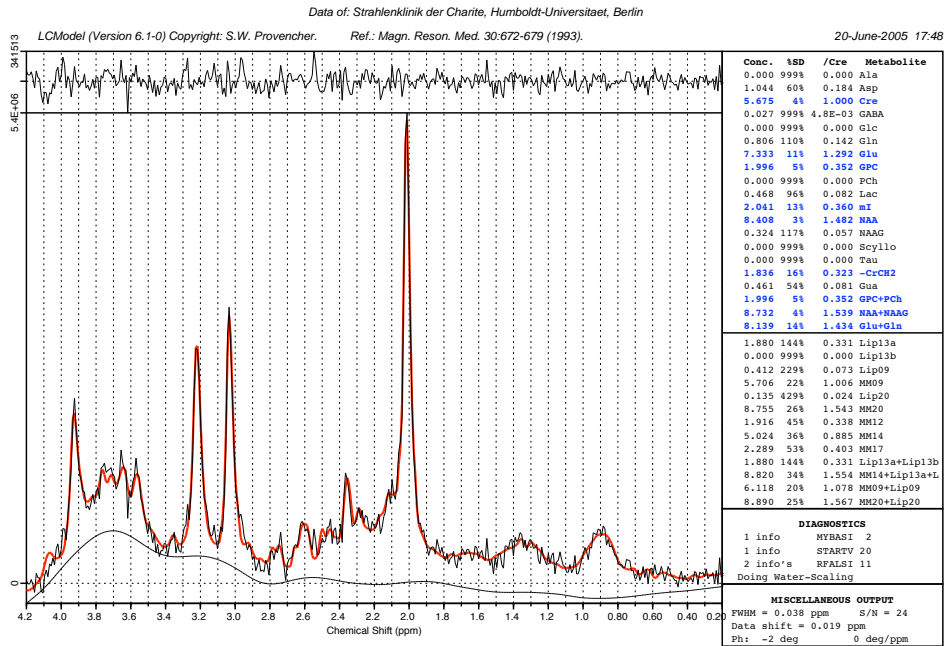


Abbildung 2.3: LCM-Output Weisse Substanz rechts frontal

2 Material und Methoden

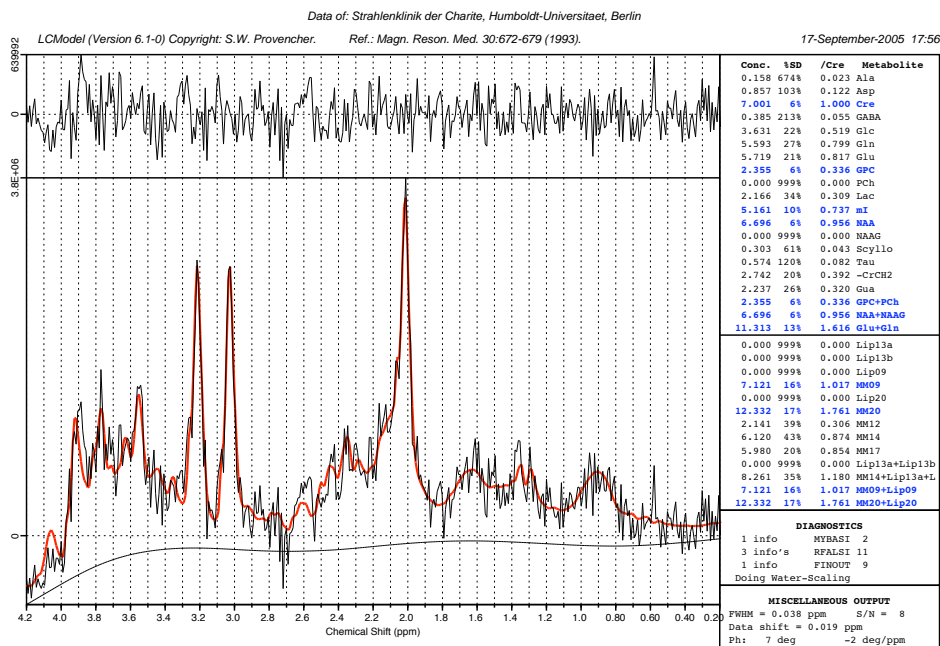


Abbildung 2.4: LCM-Output Linker Anteriorer Hippocampus

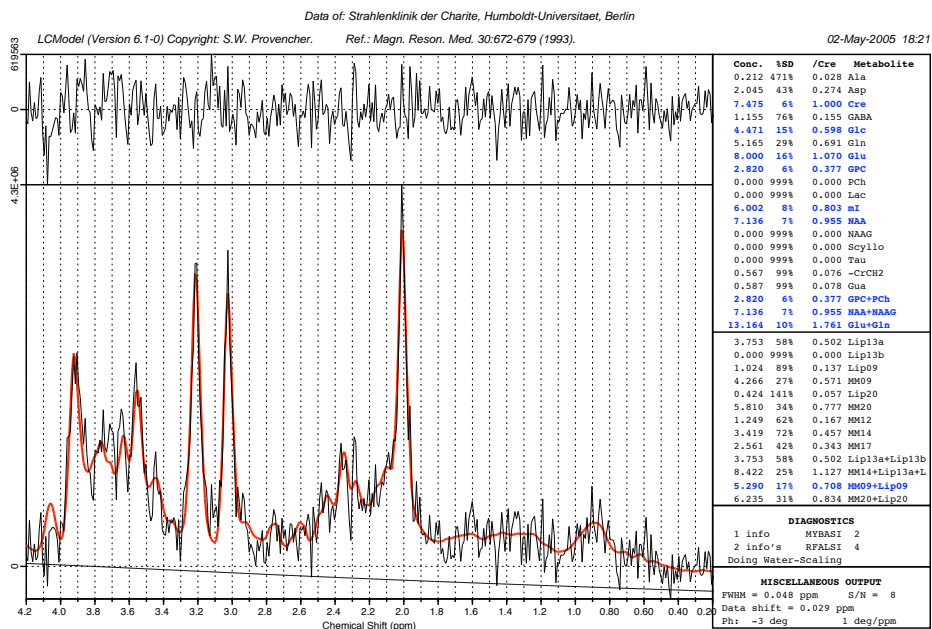


Abbildung 2.5: LCM-Output Rechter Anteriorer Hippocampus

2.4 Bestimmung der Serum-Cortisolkonzentration

Die Blutproben (10 ml Serumröhrchen Saarstedt) wurden sofort nach Entnahme in das Institut für Laboratoriumsmedizin Charité Campus Virchow Klinikum zur Bestimmung der Serumcortisolkonzentration gebracht. Die Konzentrationsmessungen erfolgte mit dem ADVIA Centaur-Cortisol Test (Siemens Medical Solutions Diagnostics).

Dieser Test ist ein kompetitiver Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz-Technologie. Zwischen der Menge an Cortisol in der Patientenprobe und den vom System gemessenen relativen Lichteinheiten besteht eine umgekehrt-proportionale Beziehung. Die Sensitivität und der Messbereich der Methode beträgt 5,5 - 2069 nmol/l.

2.5 Statistische Analyse

Für die Analysen wurden zunächst die Konzentrationsveränderung während einer Untersuchungsbedingung berechnet. Diese wurde als Differenz der Konzentration der Postmedikations-Messung und der Premedikations-Messung der jeweiligen Untersuchungsbedingung errechnet. Negative Werte entsprechen dabei einer Konzentrationsabnahme im Vergleich zur Ausgangsmessung, positive entsprechen einer Konzentrationszunahme.

Diese Konzentrationsveränderungen für beide Untersuchungsbedingungen wurden dann in einem T-Test für verbundene Stichproben zweiseitig auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 für Fehler erster Art angenommen. Der Unterschied zwischen den Untersuchungsbedingungen Cortisol bzw. Placebo errechnet sich aus der Differenz der Konzentrationsveränderung unter Cortisol und unter Placebo. Hinsichtlich der Effektrichtung entsprechen also negative Werte einer Konzentrationsabnahme bzw. geringeren Konzentrationszunahme unter Cortisol im Vergleich zur Placebobedingung.

Eine ANOVA mit Meßwiederholung, die theoretisch bei diesem Design als statistische Analysemethod verwendet werden könnte, wurde aus Gründen der besseren Darstellbarkeit durch die eben beschriebene Methode nicht gewählt. Richtung und Stärke der Konzentrationsveränderung sind durch den Vergleich der Differenz zur Ausgangskonzentration weitaus verständlicher.

Die gesamte statistische Analyse der Daten wurde mit der Software R [125] und SPSS durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit der Software GraphPad Prism (Version 5.0) erstellt.