

2 Methodik

2.1 Patientenauswahl

An der Studie nahmen 17 Patienten (10 Frauen, 7 Männer) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Encephalomyelitis disseminata teil. Für den Einschluss in die Studie mussten folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Klinisch sichere Encephalomyelitis disseminata nach den Kriterien von Mc Donald [16]
- Aufnahme in die Studie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
- Keine Behandlung mit einem Kortikoid während der letzten 6 Monate
- Keine immunmodulatorische Behandlung während der letzten 6 Monate
- Patienten aktuell nicht im Schub

Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie zwischen 17 und 46 Jahren (Mittelwert 33 J, Standardabweichung 7,86). Jeder Patient wurde ausführlich über die Art der Studie aufgeklärt und gab sein schriftliches Einverständnis.

Zu Beginn der Studie wurden 17 unbehandelte Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aufgenommen.

Für insgesamt 8 Patienten, die in der Folgezeit mit Interferon β 1a behandelt wurden, konnte die Verlaufsuntersuchung mit monatlichem Intervall über mindestens 2 Jahre fortgesetzt werden.

Bei einem Patienten fand nach 15 Monaten Beobachtungszeitraum eine Konversion der Erkrankung von der schubförmig remittierenden in die sekundär chronisch progrediente Form statt.

1 Patient wurde über mindestens 2 Jahre untersucht und mit Glatirameracetat behandelt.

1 Patient blieb unbehandelt und wurde über mindestens 2 Jahre untersucht. 1 Patient bekam eine unterschiedliche Zubereitung von Interferon β 1a

7 Patienten brachen die Verlaufsuntersuchung aus persönlichen Gründen wie Wechsel des Aufenthaltsortes zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab.

Kontrollgruppe:

Als Kontrollgruppe wurden 17 gesunde Personen (10 Frauen, 7 Männer) mit einem Alter zwischen 20 und 45 Jahren (Mittelwert 30,5 J, Standardabweichung 6,95) untersucht. Zum Untersuchungszeitpunkt war bei keinem Probanden eine neurologische Erkrankung bekannt. Die Familienanamnese bezüglich MS war negativ. Kein Proband wurde mit Kortikoiden oder immunmodulatorisch wirksamen Substanzen behandelt.

Die MRT Untersuchungen der Probanden waren unauffällig. 17 Probanden wurden insgesamt untersucht. 6 Probanden wurden über den Verlauf von 1 Jahr mindestens 5-mal untersucht.

2.2 Kernspintomographie

Alle Untersuchungen wurden am selben Kernspintomographen (Magnetom Vision plus, Fa. Siemens Erlangen, 1,5 T, Standardkopfspule) durchgeführt. Nach schriftlich festgehaltener Aufklärung und Einverständnis wurden die Patienten in der Kopfspule auf ein Vakuumkissen positioniert.

Nach Ausrichtung des Kopfes in der Mittellinie und in der Horizontale mithilfe des lasergesteuerten Positionierungssystems wurde das Vakuumkissen unter Fixierung des Kopfes entleert. Danach wurden die Patienten wie folgt untersucht:

2.2.1 Positionierung und allgemeine Durchführung

Nach der Aufnahme der Übersichtssequenz (Scout) in 3 Ebenen wurden die Sequenzen mit dem Zentrum der Schichtgruppen anhand der sagittalen Übersichtsaufnahme entlang einer gedachten Linie zwischen den kaudalen Grenzen von Genu und Splenium corporis callosi ausgerichtet. Anhand der coronalen Aufnahme erfolgte die Positionierung orthogonal zur von der falx cerebri repräsentierten Mittellinie.

Schichtdicke, Schichtabstand und Schichtgruppenzentrum wurden bei allen Sequenzen übereinstimmend eingestellt. Aufgrund der Auswertung im längeren Verlauf wurde sorgfältig auf reproduzierbare, korrespondierende Positionierung geachtet.

Während im üblichen Protokoll zum Ausschluss einer MS eine sagittale FLAIR oder T2 Standard ist wurde aufgrund der sicheren Diagnose der Erkrankung in dieser Studie auf sie verzichtet. Kontrastmittelaufnahme von Läsionen war nicht Gegenstand dieser Arbeit und die kontrastmittelgestützte T1-Wichtung wurde im Rahmen der üblichen Kontrollen bei Verdacht auf Verschlechterung oder Schub bei Bedarf durchgeführt.

Sequenz	TR in ms	TE in ms	Flipwinkel in Grad	Matrix	FoV	Anzahl der Schichten	Dicke in mm	Abstand in mm	Orientierung
PD:	2625	16	180	256x192	250	19	5	0	transversal
T2:	2625	98	180	256x192	250	19	5	0	transversal
T1:	650	14	70	512x192	250	19	5	0	transversal
2DGE:	600	12	20	256x192	230	17	5	0	transversal
MRS	1500	135	-	8x8	160	1	20	-	transversal

Tabelle 3: Sequenzparameter des Untersuchungsprotokolls.

2.2.2 Konventionelle Sequenzen

Aus den PD/T2 Sequenzen wurde Anzahl der Läsionen und Läsionsvolumen bestimmt und die Segmentierung der gesamten weissen Substanz des Cerebrums vorgenommen.

Aus der T1-Sequenz wurde das Volumen der T1-Läsionen, der sogenannten „Black holes“ bestimmt.

2.2.3 Magnetresonananzspektroskopie

Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde eine Chemical shift imaging (CSI) Sequenz gewählt. Hierbei werden über eine erweiterte Ortskodierung mehrere Voxel während einer Messung aufgenommen. Die Positionierung erfolgte unter Einschluss des Corpus callosum parallel einer gedachten Linie durch Splenium und Genu desselben und Einbeziehung von Teilen des periventrikulären Marklagers. Das VOI hatte eine Kantenlänge von 80 mm und eine Dicke von 20 mm.

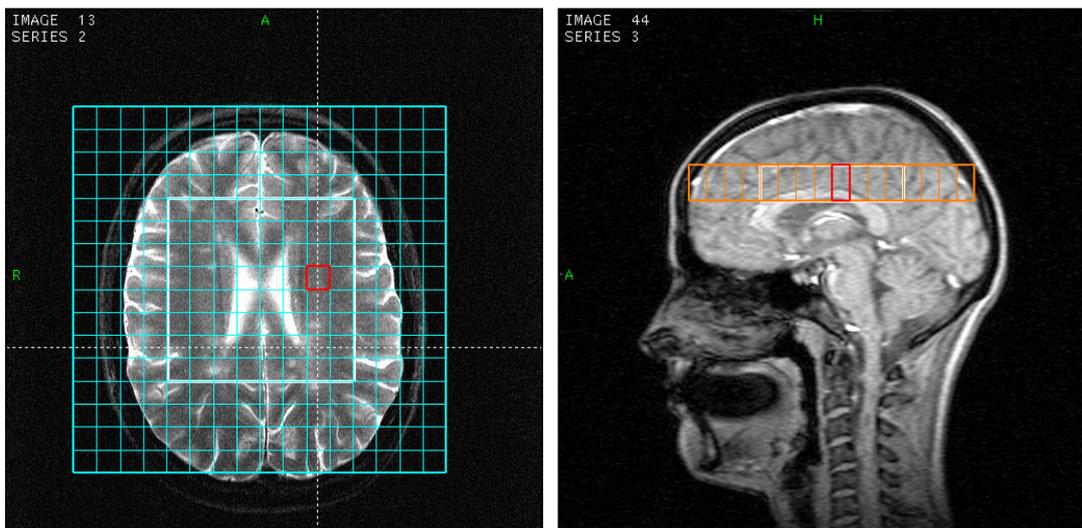


Abbildung 6: Positionierung des CSI-Schichtblocks im periventrikulären Marklager unter Einschluss des Corpus Callosum.

Nach der Positionierung wurde ein lokales Shimming durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet maximal 10 Hz fwhm (full width at half maximum) des Wasserpeaks zu erreichen.

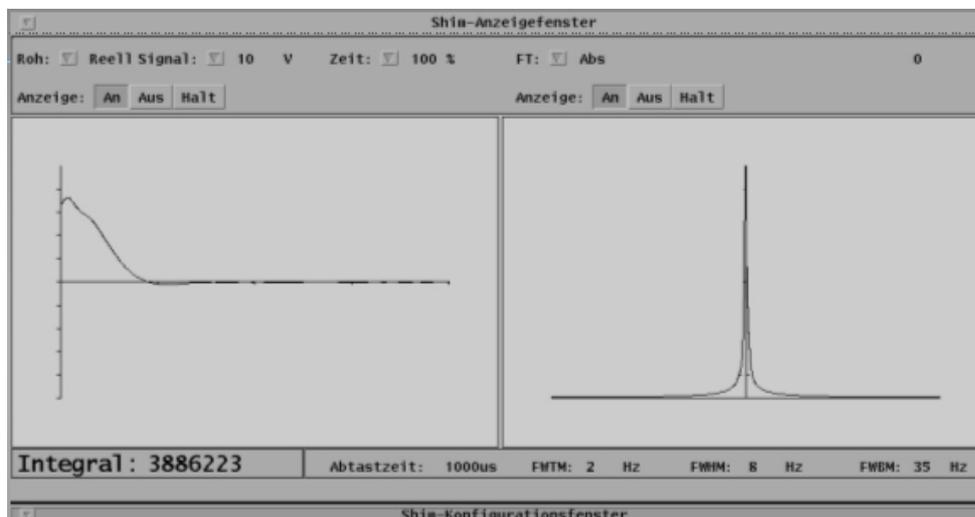


Abbildung 7: Einstellung des lokalen Shims.

Daraufhin wurde die Wassersunterdrückung so eingestellt, dass bei maximaler Verstärkung von 114,85 dB im Phasenbild die Peaks herausgearbeitet werden konnten.

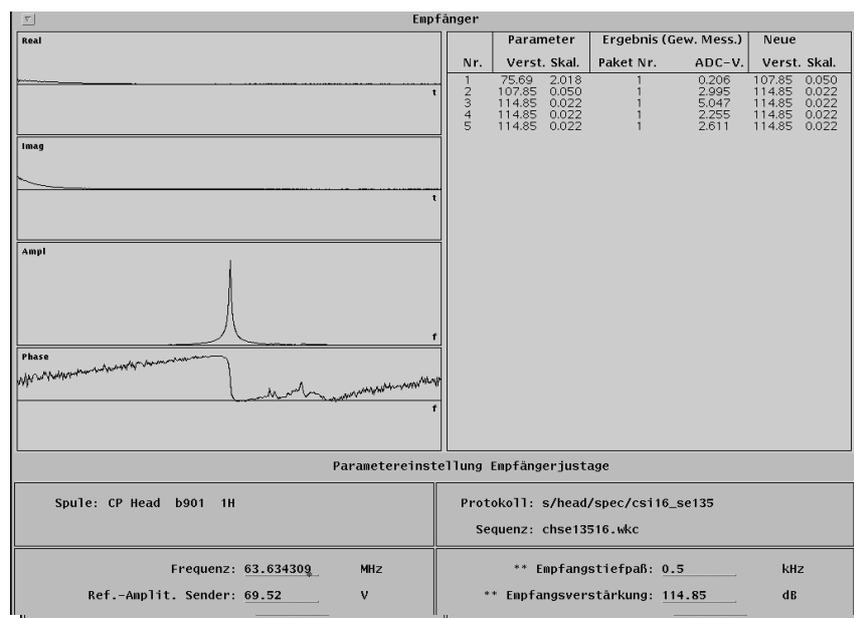


Abbildung 8: Manuelle Einstellung für die Wassersunterdrückung.

Danach erfolgte die Akquisition von 256 Messungen. Nach erfolgter Aufnahme wurde mit der Software „LUISE“ des Herstellers des MR-Tomographen eine Phasen- und Basislinienkorrektur sowie ein automatisches Peakfitting mit Integralberechnung durchgeführt.

Insgesamt wurden pro Patient und Messung 64 Voxel mit einer Kantenlänge von 10 x 10 x 20 mm akquiriert..

Auf Basis der einzelnen Spektren wurde eine Spektrenkarte erstellt, die die Einzelspektren über dem anatomischen Bild sichtbar macht. Auf Basis dieser Spektrenkarte wurde eine visuelle Qualitätskontrolle durchgeführt. Einzelspektren konnten hier zur genauen Kontrolle auf volle Bildschirmgröße gebracht werden. Nach visueller Kontrolle der Spektrenkarte des akquirierten Volumens wurden Voxel, deren Signalqualität nicht ausreichend war oder solche, die Läsionen enthielten, von der Berechnung ausgenommen.

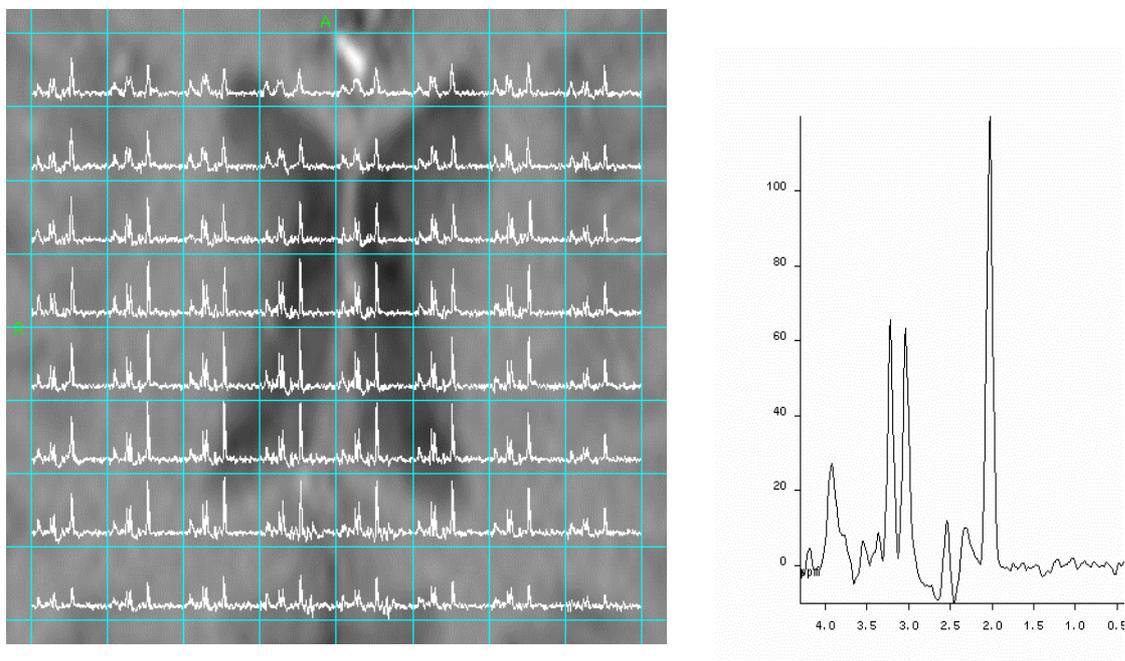


Abbildung 9: Spektrenkarte mit Darstellung der 64 aufgenommenen Einzelspektren und Beispielspektrum

Für jeden Voxel wurde das Verhältnis der Integrale des NAA-Peaks und des Cho-Peaks zum Integral des CR-Peaks bestimmt. Dieses Ergebnis wurde daraufhin gemittelt.

NAA: Integral								
191.9	267.3	207.9	222.3	240.3	264.5	207.3	118.2	
283.1	276.5	249.1	247.4	249.6	239.9	200.4	128.5	
250.1	275.6	261.7	239.0	238.3	232.3	213.3	142.6	
227.7	292.3	260.1	233.6	251.1	230.4	221.9	145.5	
215.1	303.1	243.9	226.9	256.0	239.8	228.0	141.3	
235.3	306.0	265.9	238.6	270.0	257.3	235.3	127.6	

Abbildung 10: Darstellung der Peakintegrale des NAA der Einzelvolumina.

Insgesamt wurden 12096 Voxel gemessen und ausgewertet

2.2.4 Magnetisierungstransferbildung:

Aus den MTR Sequenzen wurde die durchschnittliche MTR der Läsionen und der NAWM errechnet.

Unter Berücksichtigung der Literatur und nach eigenen Versuchen wurde für die MTR Sequenz ein offresonanter Gauss-Puls mit 1,5 kHz Entfernung von der Larmorfrequenz des Wasserstoffs, 16,4 ms Dauer, 850 grad Flipwinkel und 768 Hz Bandbreite gewählt.

Die Sequenz wurde so programmiert, dass zuerst die Gradientenechosequenz ohne offresonantem Puls und direkt im Anschluss ohne weitere Schicht- oder Parameterjustagen des Scanners mit offresonantem Puls gemessen wurde. Für die normale weisse Substanz des gesamten Cerebrums von gesunden Probanden ermittelten wir mit diesem Puls eine durchschnittliche MTR von 40,30 %.

Insgesamt wurden 189 Messungen durchgeführt, 142 Messungen an Patienten und 47 Messungen an Probanden. Der erste Patient wurde im Januar 2001 in die Studie eingeschlossen, die letzte Patientenmessung fand im August 2004 statt. Das längste beobachtete Intervall an einem Patienten betrug 3 Jahre. Der Zeitaufwand für 1 Messung betrug ca. 45 Min.

2.2.5 Bildverarbeitung

Ausgehend von den PD- und T2 gewichteten Sequenzen wurden zunächst die Läsionen jeder Untersuchung an einer Workstation (Magic View, Siemens Erlangen) definiert und markiert. Für die weitere Bildverarbeitung wurde die Software AMIRA 3.01 (Konrad Zuse Zentrum, Berlin) auf einer PC-basierten Workstation verwendet.

Mithilfe von AMIRA wurden die Läsionen und die NAWM segmentiert. Hierfür wurde ein Verfahren benutzt was in einem 3D-Volumen ausgehend von einem manuell bestimmten Voxel ähnlich signalintense, verbundene Strukturen markiert und gleichzeitig Grenzen zwischen Materialien aufgrund von Schwellenwerten bestimmt.

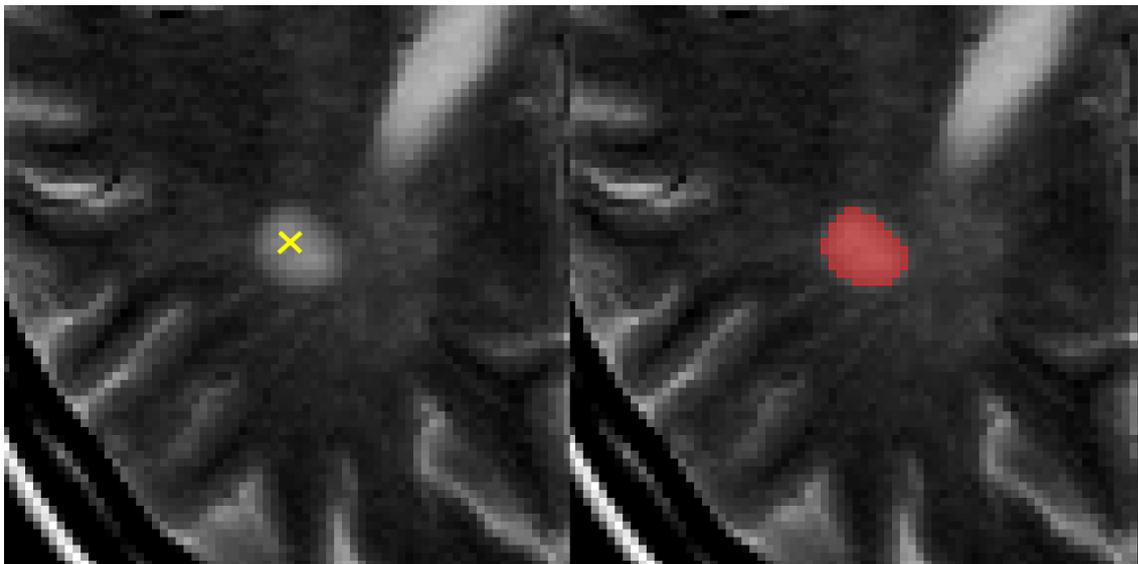


Abbildung 11: Setzen eines Ausgangspunktes für die semiautomatische Segmentation.

Am Beispiel der Läsion im periventriculären Marklager occipital rechts wird die Arbeitsweise dieser Technik deutlich.

Das Verfahren kombiniert die manuelle Auswahl bestimmter Bezirke wie Läsionen und die Verbundenheit ähnlich signalintensere Bereiche unter Berücksichtigung definierter Schwellenwerte.

Dabei wird das gesamte untersuchte Volumen in die Segmentation mit einbezogen. Nach Bestimmung der Läsionen wurde die NAWM segmentiert:

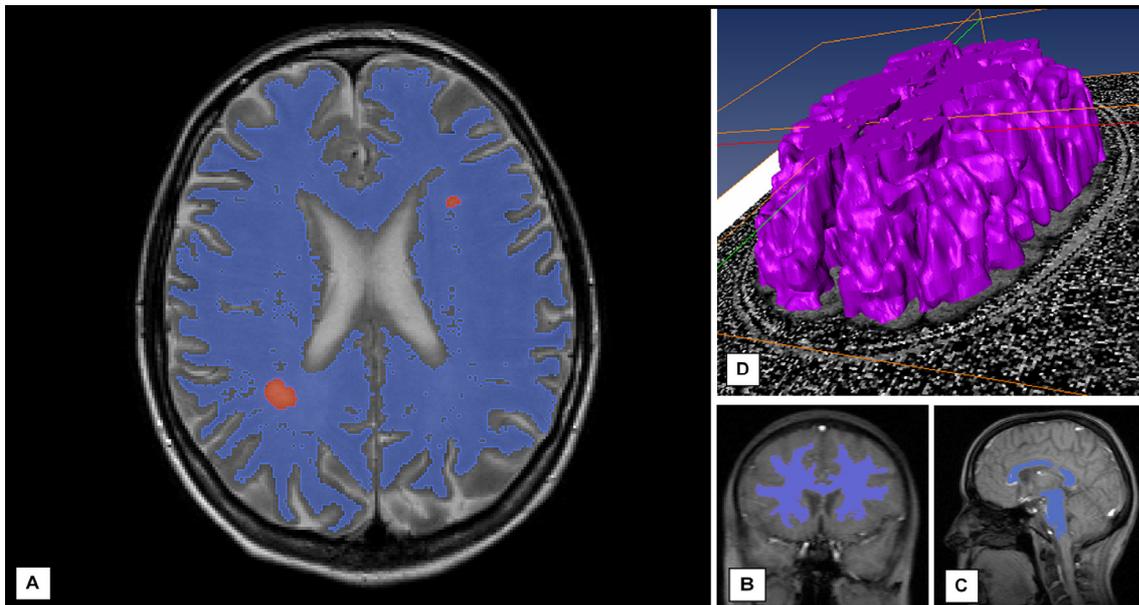


Abbildung 12 a-d: Segmentation von Läsionen und NAWM mit Volumendatensatz.

Aus Abbildung 4 und 5 wird ersichtlich, dass einzelne, meist kleine inselartige Bereiche nicht markiert sind obwohl sie offensichtlich Teil des periventrikulären Marklagers sind und von diesem umschlossen werden.

Im nächsten Schritt werden deshalb nicht markierte Areale, die von der Selektion umschlossen werden automatisiert in diese aufgenommen. Ein definierbares Maximalvolumen dieser Areale schützt nicht zur NAWM gehörige Areale wie die Insula vor dem Einschluss.

Auch die vorher definierten Läsionen werden nicht mit eingeschlossen.

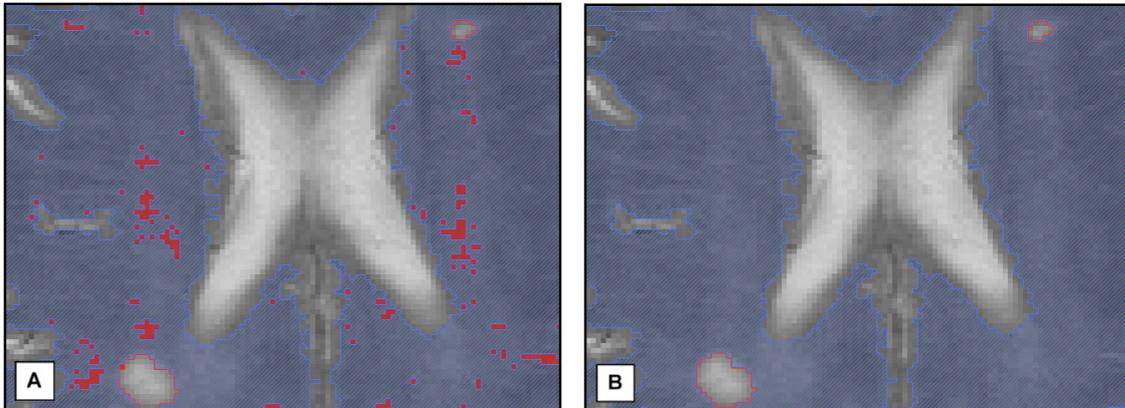


Abbildung 13 a-b: Inseln werden in die Selektion aufgenommen.

Das so erstellte Volumen umfasst die gesamte cerebrale weiße Substanz des wie in Abbildung 6 sichtbar wird.

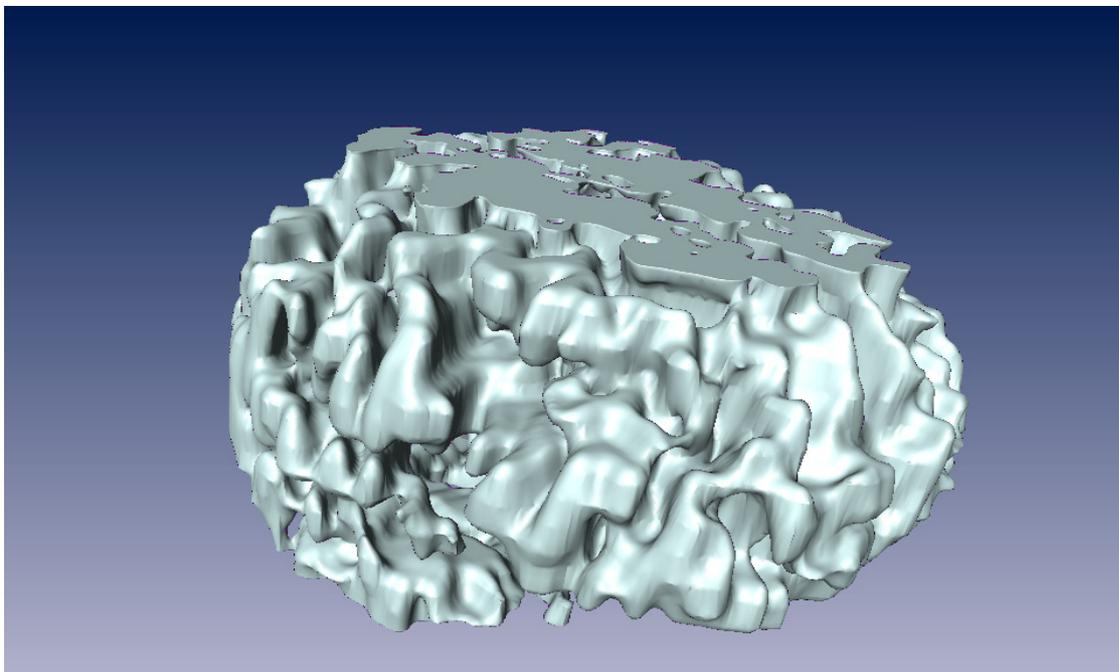


Abbildung 14: Aus der Selektion erstelltes Oberflächenmodell der **weißen** Substanz.

Für die Auswertung der MTR von Läsionen und NAWM wurden zunächst die MTR-Sequenzen mit den PD/T2 Sequenz automatisch koregistriert.

Es stellte sich heraus, dass die Koregistrierung aufgrund der sorgfältigen Lagerung auf dem Vakuumkissen nur selten vonnöten war.

Zur weiteren Auswertung wird diese dreidimensionale Selektion dann auf die koregistrierten MTR Bilder übertragen.

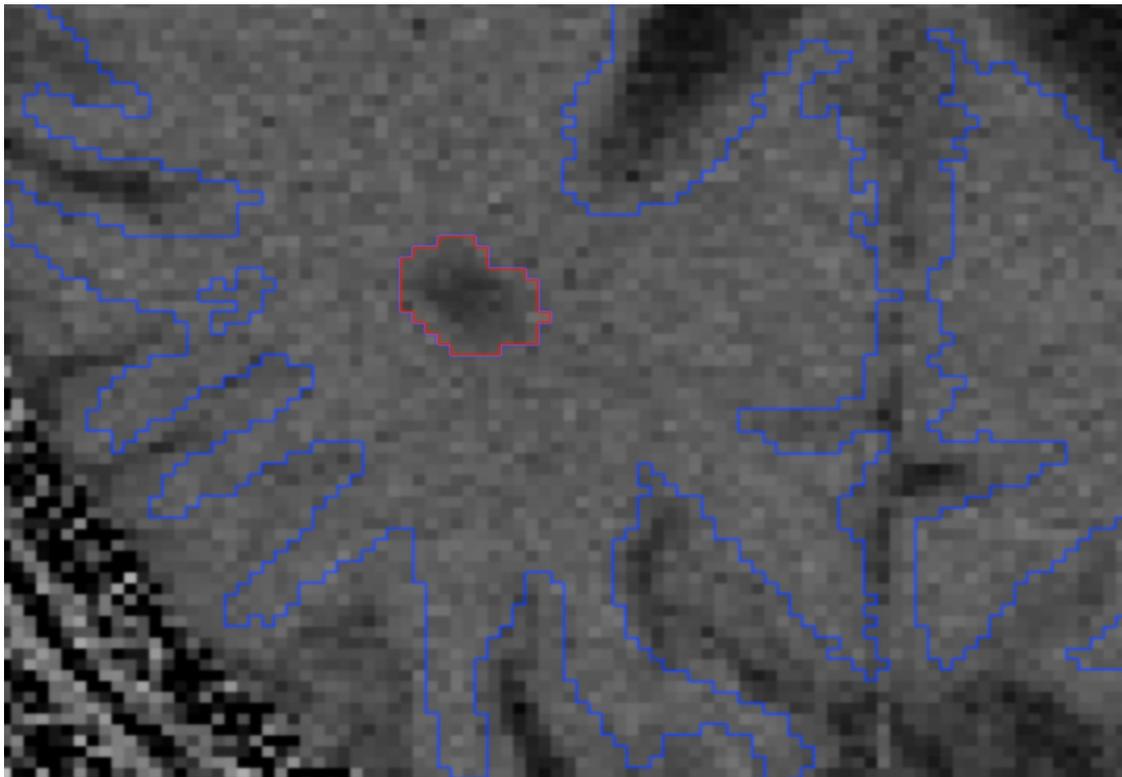


Abbildung 15: Auf die MTR-Schichten übertragene Selektion

Mit der übertragenen Selektion konnten dann folgende Parameter automatisiert bestimmt werden:

- Läsionsanzahl (Läsionslast) in der T2-Wichtung
- Läsionsvolumen in der T2 und T1-Wichtung
- Durchschnittliche MTR der Läsionen mit Standardabweichung.
- Durchschnittliche MTR der gesamten weissen Substanz des Cerebrums mit Standardabweichung.

Insgesamt wurden im Zeitraum vom Januar 2001 bis Oktober 2004 189 Auswertungen durchgeführt. Der durchschnittliche Zeitaufwand pro Auswertung betrug 120 Minuten.

2.3 Neurologische Untersuchungen

Jeder Patient wurde am selben Tag wie die kernspintomographischen Untersuchungen von einem erfahrenen Neurologen untersucht. Dabei wurden EDSS und MSFC erhoben.

Der MSFC setzt sich aus 3 Tests zusammen.

Im 9 hole peg Test (9HPT) bekommt der Patient die Aufgabe 9 normierte Stäbchen in ein Brett mit passenden Löchern zu stecken und wieder zu entfernen. Hierbei wird die Zeit gemessen, die er für die Aufgabe benötigt.

Im Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT) bekommt der Patient über Kopfhörer serielle Rechenaufgaben gestellt, die er lösen muss. Hierbei bildet das Ergebnis einer Aufgabe immer einen Teil der nächsten.

Im timed walk test muss der Patient über eine Strecke von 25 Fuss gehen und die benötigte Zeit wird gemessen.

Aus diesen 3 Tests werden so genannte Z-scores gebildet, die den Unterschied des vom Patienten erzielten Ergebnisses im Verhältnis zur Gesamtheit der untersuchten Kohorte repräsentieren.

2.4 Therapieschema

Die Verabreichung des Interferon β 1a (Rebif 22, Serono, London, England) erfolgte durch den Patienten 3 mal pro Woche subcutan.

2.5 Statistische Verfahren

Die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse und die Erstellung der Diagramme wurden mit der Software SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Für die Auswertung des Querschnitts bei Aufnahme in die Studie wurde der U-Test nach Mann und Whitney sowie die Rangkorrelation nach Spearman verwendet.

Für die Längsschnittuntersuchung wurden der Friedman-Test und der Wilcoxon Test für abhängige Stichproben sowie die Rangkorrelation nach Spearman benutzt.