

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel sollen die elektrische Stimulation, das Messverfahren und die Datenverarbeitung näher erläutert werden. Die Abweichungen der einzelnen Studien vom generellen Studiendesign werden in separaten Unterkapiteln beschrieben.

3.1 Die somatosensorische Stimulation

Für die somatosensorische Stimulation wurde ein klinisches SEP-Gerät (Compact4[®], der Firma Nicolet) verwendet. Das SEP-Gerät muss sich außerhalb des eigentlichen Messraums befinden, da das starke Magnetfeld jeden Gegenstand, der ferromagnetisch ist, anzieht. Zudem führen die bei den MRT-Messungen verwendeten Hochfrequenzpulse zu extremen Störungen von elektrischen Geräten. Die Verbindung zwischen dem SEP-Gerät und den Stimulationselektroden wurde mittels speziell abgeschirmter Kabel hergestellt, die aus dem Vorraum über eine spezielle Öffnung in den Messraum gelangten. Der Messraum selbst ist wie ein Faradayscher-Käfig gegenüber den angrenzenden Räumen abgeschirmt.

Die elektrische Fingerstimulation wurde über zwei Ringelektroden durchgeführt. Die Kathode wurde proximal und die Anode distal angebracht (siehe Abbildung 7). Um den Hautwiderstand zu minimieren wurde eine handelsübliche Elektrodencreme verwendet. Die Stimulation der Lippe in Studie 3 wurde über konzentrische Elektroden, die mit leichtem Druck an der Lippe befestigt waren, durchgeführt. Da es unterschiedliche individuelle Sensibilitätsschwellen gibt, wurde zu Beginn einer Messung die jeweilige sensible Schwelle bestimmt, um dann mit mindestens doppelter Stromstärke zu stimulieren. Die elektrische Pulsdauer betrug 200 μ s. Die Stärke des Reizes wurde so adjustiert, dass er in keinem Fall als schmerzhaft empfunden wurde.

3.1.1 Studie 1: Einfluss der Stimulationsfrequenz auf die Repräsentation des Zeigefingers im primären somatosensorischen Kortex

In der ersten Studie sollte die Abhängigkeit der kortikalen Fingerrepräsentation von der elektrischen Stimulationsfrequenz untersucht werden. Die Studie wurde in drei Untergruppen aufgeteilt. Der rechte Zeigefinger wurde mit folgenden Frequenzen stimuliert:

- Gruppe I: Acht Probanden wurden mit den Frequenzen 1, 3, 7 und 10 Hz stimuliert.

- Gruppe II: Sechs Probanden wurden mit den Frequenzen 1, 2 und 3 Hz stimuliert.
- Gruppe III: Sieben Probanden wurden mit den Frequenzen 3, 5 und 7 Hz stimuliert. (Drei der Probanden wurden anstelle von 5 Hz mit 4,5 Hz und anstelle von 7 Hz mit 7,5 Hz stimuliert. Die Daten wurden zusammen mit denen von 5 Hz und 7 Hz ausgewertet.)

Die sensorische Schwelle wurde in den Gruppen I und III bei 7 Hz und in der Gruppe II bei 3 Hz bestimmt. Die Stimulusintensität bei jeder Frequenz betrug die doppelte Intensität der sensorischen Schwelle plus 1mA.

Insgesamt haben 21 Probanden, 10 weibliche, 11 männliche mit einem Alter zwischen 22 und 48 Jahren (Median 25 Jahre) an der Studie teilgenommen. 20 der Probanden waren Rechtshänder, bei einem Probanden war keine Hand dominant ausgeprägt.

3.1.2 Studie 2: Somatotope Darstellung der Finger 2 und 5 in der Area 3b

In der zweiten Studie wurde untersucht, ob die elektrisch stimulierten Finger 2 und 5 der rechten Hand im somatosensorischen Kortex getrennt darstellbar sind, und wie deren Lage zueinander ist.

Es wurden 20 gesunde Probanden untersucht (12 männlich, 8 weiblich, zwischen 22 und 32 Jahre alt); ein Proband war Linkshänder.

Jeweils zwei Ringelektroden wurden an den zweiten und fünften Finger der rechten Hand befestigt. Die Stimulationsfrequenz betrug 8,1 Hz.

3.1.3 Studie 3: Somatotopie der kortikalen Repräsentation von Daumen, Ober- und Unterlippe

An dieser Studie nahmen 12 Probanden teil (5 weibliche und 7 männliche, zwischen 22 bis 36 Jahre alt). Bis auf einen waren alle Probanden Rechtshänder.

Der Daumen wurde, wie in den vorher beschriebenen Studien, mit zwei Ringelektroden gereizt. Zur Stimulation der Lippen wurden kleine konzentrische Elektroden (Curio et al., nicht veröffentlicht) verwendet, die am rechten äußeren Rand der jeweiligen Lippe befestigt wurden (siehe Abbildung 8). Die elektrische Stimulation wurde mit einer Frequenz von 7 Hz durchgeführt.

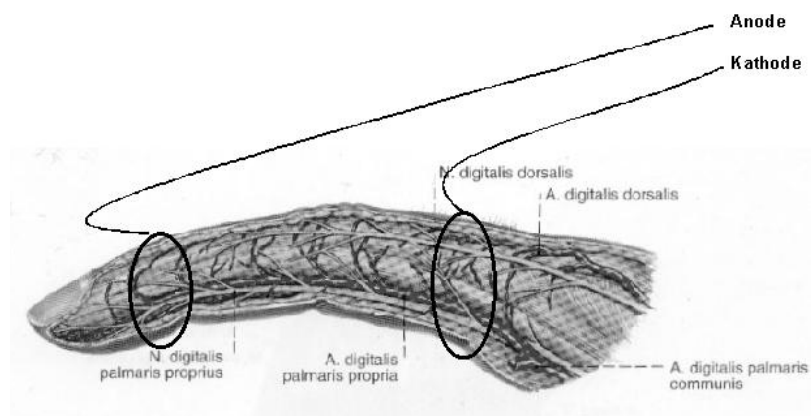


Abbildung 7: Anordnung der Ringelektroden am Zeigefinger (modifiziert nach [154]).

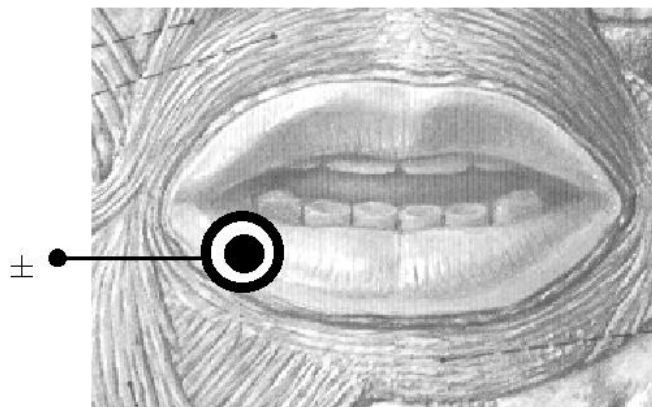


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer konzentrischen Elektrode an der Unterlippe (ohne Befestigungsmaterial).

3.2 Messverfahren und Versuchsaufbau

Außerhalb des MRT-Raums wurden den Probanden die Elektroden angelegt. Mit den Elektroden ausgestattet wurden die Probanden im Tomographen gelagert. Mit Hilfe eines Vakuumkissens konnte der Kopf fixiert werden, um Bewegungsartefakte zu reduzieren. Die Elektroden wurden über Kabel durch eine Filterplatte führend mit dem außerhalb des MRT-Raums stehenden SEP-Gerät verbunden. Der Proband wurde mit dem Kopf zuerst auf dem Rücken liegend auf der MRT-Liege in die Öffnung des Kernspintomographen hineingefahren, bis der Kopf im Zentrum des Magneten positioniert war (siehe Schema Abbildung 9). Die Messungen begannen mit dem sogenannten Scout der je eine Messung in den drei Raumebenen (sagittal, koronar und transversal) beinhaltet. Anhand dieser anatomischen Übersichtsaufnahmen werden die entsprechenden Schichten der folgenden Sequenzen transversal durch den Gyrus postcentralis positioniert (siehe Abbildung 10). Danach folgte die eigentliche funktionelle Messung mit der entsprechenden BOLD-sensitiven Sequenz (Messdaten zu den einzelnen Studien siehe Tabelle 1). In den Studien 1 und 3 wurde die sehr schnell messende EPI-Sequenz verwendet. In der zweiten Studie wurde dagegen eine langsamer messende FLASH-Sequenz^a verwendet, die, um Messzeit einzusparen, mit weniger Schichten (drei in dieser Studie) auskommen musste. Um diese drei Schichten möglichst korrekt in das zu untersuchende somatosensorische Handareal zu positionieren, wurde das motorische Handareal im Gyrus präcentralis aufgesucht, das sich in einer abgrenzbaren anatomischen Struktur befindet, die in der transversalen Schichtführung wie ein Omega aussieht [147, 175]. Das motorische Handareal wurde mit einer kurzen funktionellen Messung dargestellt (Fingeroppositionsbewegung) und bei der Auswertung als Anhalt für das angrenzende somatosensorische Handareal verwendet. Danach folgte das eigentliche Experiment mit der elektrischen Stimulation einzelner Finger.

Die funktionelle Messung wurde mit einer Ruheperiode begonnen, die eine bestimmte Anzahl von Bildern in einer bestimmten Zeit beinhaltete (siehe Tabelle 2). Darauf folgte die Stimulationsperiode mit der gleichen Bildanzahl in der gleichen Zeit (siehe Tabelle 3). Eine Ruhe- und Stimulationsperiode entsprechen zusammen einem Zyklus (Unterschiede in den einzelnen Studien siehe unten und Tabelle 2). Da die relativen BOLD-

^a Diese Studie wurde zeitlich als erstes durchgeführt; die schnellere EPI-Auslesetechnik stand erst nach einer technischen Aufrüstung des MRT-Gerätes zur Verfügung.

Signalintensitätsänderungen gering sind (wenige Prozent), muss eine große Anzahl an Meßdaten erhoben werden, um statistisch verwertbare Daten zu erhalten. Es mussten daher mehrere Zyklen durchgeführt werden (zwischen 8 und 10). Am Ende der Messungen sind mehrere Bildzyklen mit den jeweiligen Ruhe- bzw. Stimulusbedingungen entstanden und konnten in der folgenden Datenverarbeitung ausgewertet werden.

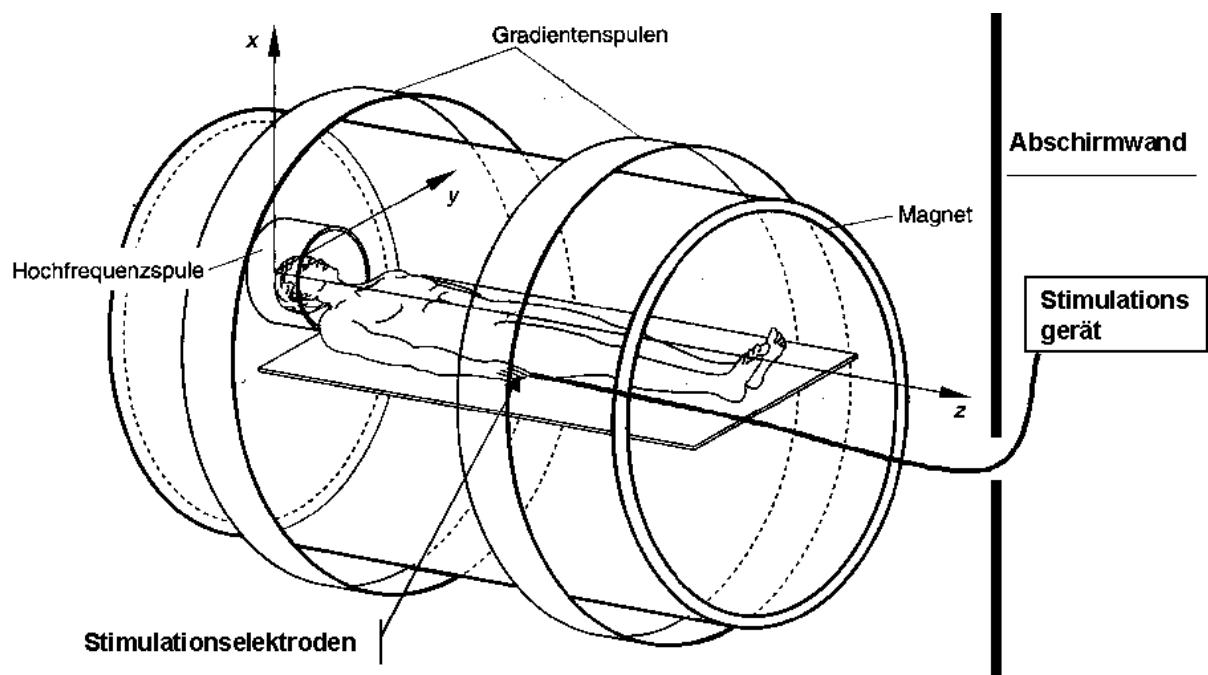


Abbildung 9: Versuchsaufbau: Schemazeichnung eines Ganzkörperkernspintomographen mit Stimulationsgerät, Kabelverlauf, supraleitendem Magnetkörper, Gradientensystem und Hochfrequenzkopfspule (modifiziert nach [88]).

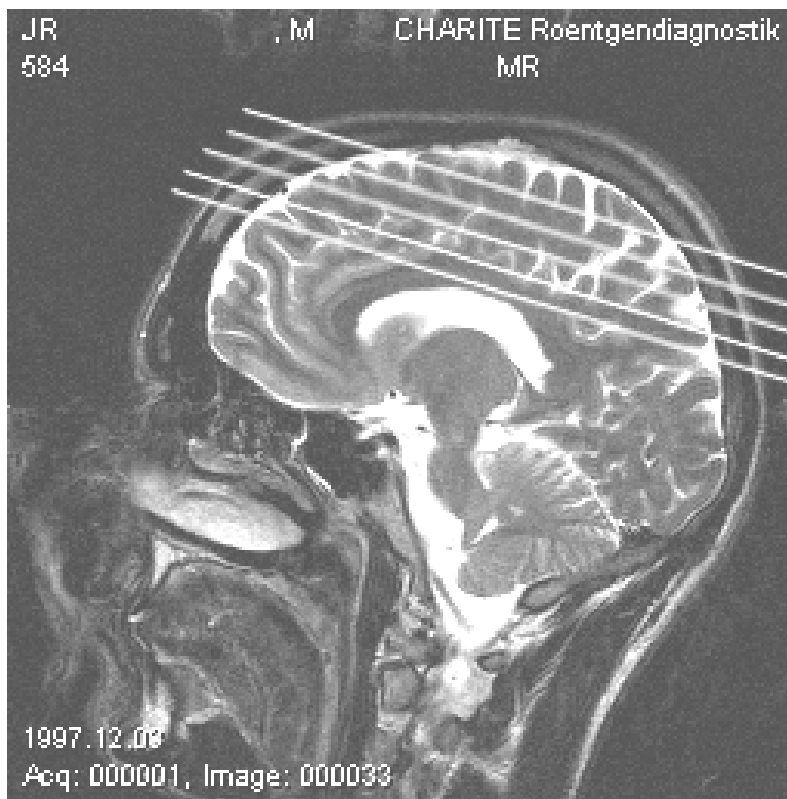


Abbildung 10: Anatomisches (T2 gewichtetes) Sagittalbild mit der eingezeichneten transversalen Schichtpositionierung (weiße Linien), die bei den funktionellen Messungen verwendet wurde. Die oberste und unterste Schicht wurden jeweils so gewählt, dass sie bei einem eventuellen Verlust durch die Bewegungskorrektur außerhalb des zu untersuchenden Areals lagen.

Sequenzparameter	Studie 1	Studie 2	Studie3
Sequenzname	EPI - GE	FLASH	EPI - GE
Matrix	128x128	64x128	128x128
Field of View (FOV) [mm]	210 bis 230	210	210
Voxelgröße [mm ³]	1,64x1,64x5 bis 1,8x1,8x5	3,28x1,64x4	1,64x1,64x4
Schichtdicke [mm]	5	4	4
Schichtabstand [mm]	0	2	1
Schichtanzahl	5 bis 6	3	7
Time to Repeat (TR) [ms]	3000	258	4000
Time to Echo (TE) [ms]	66	52	66
Flipwinkel [Grad]	90	15	90

Tabelle 1: fMRT-Daten zu den einzelnen Studien (Das FOV wurde abhängig von der Kopfgröße unterschiedlich gewählt).

	Studie 1	Studie 2	Studie3
Bilder pro Zyklus* und Schicht [Anzahl]	26	6	26
Dauer pro Periode* [sek]	52	67	52
Zyklen* [Anzahl]	8	8	10

Tabelle 2: Stimulations- und Messparameter in den einzelnen Studien (* Definition siehe Seite 29 unten).

1. Studie	Ruhe	Stimulation Finger II	Ruhe	Stimulation Finger V	Ruhe	Stimulation Finger II
2. Studie	Ruhe	Stimulation Oberlippe	Ruhe	Stimulation Finger I	Ruhe	Stimulation Unterlippe
3. Studie	Ruhe	Stimulation 1 Hz	Ruhe	Stimulation 7 Hz	Ruhe	Stimulation 3 Hz

Zeit

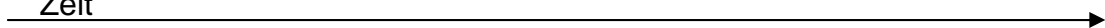


Tabelle 3: Beispiel der Stimulationsreihenfolge für die Studien 1 bis 3.

3.3 Datenverarbeitung

Die Datenverarbeitung umfasst drei Schritte, die bei allen drei Studien identisch sind. Darüber hinaus gibt es spezielle Auswerteverfahren in den einzelnen Studien, die gesondert weiter unten dargestellt werden.

Das Ziel einer funktionellen Magnetresonanztomographie-Messung (fMRT) ist es, die neuronal aktivierten Areale im Gehirn anhand der vaskulären Antwort darzustellen. Der einfachste Vergleich zwischen der Stimulations- und Ruhe-Periode wäre die Subtraktion der Bilder. Da aber der relative Signalintensitätsunterschied nur wenige Prozent beträgt, ist eine einfache Subtraktion der Bilder unzureichend. Daher müssen statistische Verfahren eingesetzt werden. Die statistischen Ergebnisse werden als farbkodierte Karte auf ein hochaufgelöstes anatomisches MRT-Bild des Gehirns überlagert. Die weitere Auswertung richtet sich nach der jeweiligen Fragestellung, die in der ersten Studie Lokalisation, Intensität und Volumen der aktivierten Areale in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz beinhaltet. Die zweite und dritte Studie untersuchen die anatomische Zuordnung und die Größe der einzelnen aktivierten kortikalen Repräsentationsareale von Fingern und Lippen. Die jeweiligen speziellen Auswerteverfahren werden in den entsprechenden Kapiteln näher beschrieben. Im folgenden Teil werden die einzelnen Schritte der allgemeinen Auswertung ausführlich beschrieben.

Nach der Datenakquisition werden die Bilder im ersten Schritt so vorbereitet, dass die hämodynamische Verzögerung, die durch die zeitverzögerte neurovaskuläre Kopplung zustande kommt (siehe 2.2.1 oben), aus dem Datensatz herausgenommen wird (siehe Abbildung 11). In den Studien 1 und 3 wurden 13 Bilder pro Stimulations- bzw. Ruheperiode akquiriert. Davon sind jeweils zu Beginn einer Stimulations- bzw. Ruheperiode die ersten 3 Bilder verworfen worden. Pro Stimulations- und Ruheperiode sind dann jeweils 10 Bilder vorhanden, die in die weitere Datenauswertung gelangen. In der zweiten Studie trifft dies nicht zu, da bei dieser eine andere Sequenz verwendet wurde. Die fMRT-Messungen wurden jeweils 10s nach Stimulationsbeginn begonnen, um damit den hämodynamischen Delay zu umgehen. In dieser Studie mussten dementsprechend keine Bilder vom Beginn der jeweiligen Periode entfernt werden.

Im zweiten Schritt wird eine Bewegungskorrektur der Bilder durchgeführt. Dieser Schritt ist notwendig, da trotz der Fixierung des Kopfes mit einem Vakuumkissen leichte Bewegungen (z.

B. durch die Atmung) möglich sind. Diese können zu unterschiedlichen Bildartefakten führen, z. B. zu falsch positiven oder falsch negativen Aktivierungen. Die Bewegungskorrektur wird mit der SPM96-Software (Statistical parametric mapping [42, 43, 49]) durchgeführt, die als Freeware im Internet zu bekommen ist (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Die Bewegungskorrektur macht zuerst ein sogenanntes "Realignment", bei dem jedes funktionelle MR-Bild mit dem ersten Bild der Zeitreihe verglichen wird. Danach werden die Abweichungen so korrigiert, dass jedes Voxel eines Bildes dem vorhergehenden entspricht. Dieser Schritt wird "Adjustment" genannt und beruht auf einem mathematischen Modell, welches eine gleitende Autoregression beinhaltet. Friston et al. (1996) konnte zeigen, dass extreme Bewegungen (z. B. 10 mm von der Ausgangsposition) um mehr als 90 % korrigiert werden können. Die Bewegungsartefakte werden somit eliminiert [49].

Der dritte und letzte Schritt der allgemeinen Auswertung beinhaltet die statistische Auswertung der fMRT-Bilder, die in dieser Arbeit mit dem Kolmogorov-Smirnov Test (KS-Test), einem nicht-parametrischen Test für nicht normalverteilte und nicht zusammenhängende Populationen, durchgeführt wurde. Das MRT-Bild besteht aus vielen Voxeln, die eine bestimmte Intensität besitzen. Im fMRT-Bild ändert sich die Intensität in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität. Der KS-Test prüft, inwieweit die Änderungen der Intensität statistisch signifikant sind und errechnet für jedes Pixel ein Signifikanzniveau, das farbkodiert auf ein anatomisches Bild projiziert wird. Dies geschieht mit dem XDS-Programm [30]. Mit einem Grenzwert (P-Wert) kann der Schwellenwert eingestellt werden. Hohe Signifikanzen erreichen Pixel, die in Abhängigkeit vom Paradigma hohe und konstante Änderungen der Intensität über die Zeit aufweisen. Wichtig für die weitere Auswertung ist zudem die Anzahl der benachbarten signifikanten Pixel, aus denen sich das aktivierte Volumen errechnen lässt.

Da die Aktivierungen im primären somatosensorischen Kortex differenzierter betrachtet werden sollen, wurde, wie weiter oben schon beschrieben, eine Unterteilung von SI in die verschiedenen Subareale vorgenommen (siehe Kapitel 2.1.3). Im MRT-Bild sind Gyri und Sulci in SI gut zu unterscheiden. In Anlehnung an eine Arbeit von Geyer und Kollegen wurden hier die einzelnen Subareale unterteilt. Da interindividuelle Schwankungen in den Lokalisationen einzelner Areale (siehe Kapitel 2.1.3) vorkommen, wurde in dieser Arbeit eine operationale Definition vorgenommen um die Ergebnisse systematisch darstellen zu können.

Dabei wurde das Gesamtareal SI (Gyrus postcentralis) in die Area 3b (die vordere Wand des Gyrus postcentralis) und die Areae 1 und 2 (die Kuppe und der hintere Teil des Gyrus postcentralis) eingeteilt. Area 1 und 2 mussten zusammengefasst werden, da beide Areale makroanatomisch nicht sicher voneinander differenzierbar sind [52, 53, 146]. In den folgenden Unterkapiteln werden die einzelnen speziellen Datenverarbeitungsschritte der jeweiligen Studie erläutert, die sich an die allgemeine Auswertung anschließt.

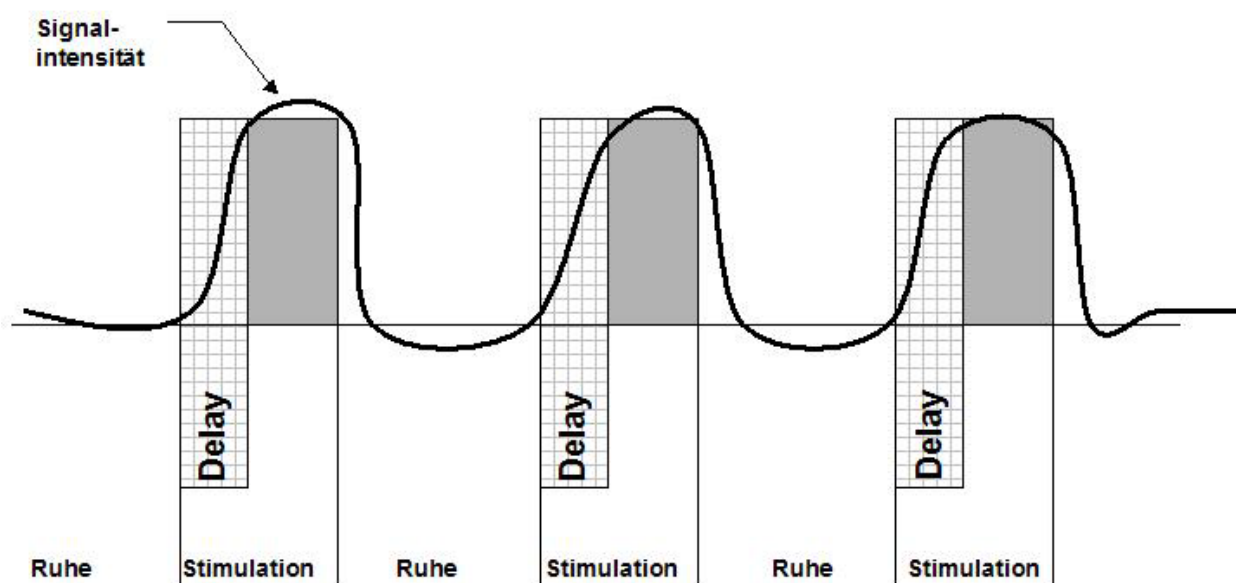


Abbildung 11: Schema eines Boxcardesign-Stimulations-Paradigmas. Die Messungen, die während des hämodynamischen Delay aufgenommen wurden, können nachträglich entfernt werden.

3.3.1 Studie 1

In der ersten Studie wurde der Zusammenhang zwischen der Frequenz der elektrischen Fingerstimulation und dem kortikalen fMRT-Signal untersucht.

Insgesamt wurden 21 Probanden in die weitere Auswertung genommen. Die Daten der übrigen Probanden konnten wegen Erfüllung von Ausschlusskriterien nicht weiter verwertet werden. Ausschlusskriterien waren ein zu geringes Signifikanzniveau ($p > 10^{-5}$) oder dass es nur bei einer von allen verwendeten Stimulationsfrequenzen zu einem aktivierten Voxel kam, d. h. wenn nur ein Voxel bei der gesamten Messung signifikant war.

Um die Daten von mehreren Probanden miteinander vergleichen zu können, wurden zwei Kriterien verwendet:

1. die Größe des aktivierten Areals (Volumen in mm³) in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz
2. Änderung der Signalintensität (in %) in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz

ad 1.: Das Kriterium der Fläche bzw. des Volumens wurde unter folgenden Bedingungen bestimmt: Aus allen Voxeln in SI, die bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 10^{-5}$ als aktiviert galten, wurde das aktivierte Gesamtvolumen errechnet. Die Zählung erfolgte getrennt nach Lokalisation, damit eine Unterscheidung in die einzelnen Areale möglich wurde (zur Erinnerung: Voxel in der Vorderwand des Gyrus postcentralis = Angenommene Area 3b, der Kuppe und der dorsalen Wand des Gyrus postcentralis = Angenommene Area 1/2).

ad 2.: Die Signalintensität wird an dem Voxel bestimmt, das die höchste statistische Signifikanz über alle Frequenzen auf der farbkodierten Karte aufweist. Dabei wird angenommen, dass es über diesem Voxel zur höchsten Amplitude kommt. Die so erhaltene Intensität über die gesamte Zeit, wurde dann den jeweiligen Stimulationsfrequenzen zugeordnet. Der relative Signalanstieg (in %) wurde berechnet. Die am gleichen Ort erhaltene prozentuale Signalintensitätsänderung pro Stimulationsfrequenz wurde mit den anderen Stimulationsfrequenzen und zwischen den einzelnen Probanden verglichen.

Am Ende dieses Auswerteschrittes existieren für jeden Probanden folgende Daten:

- aktiviertes Volumen pro stimulierter Frequenz und Areal
- prozentuale Änderung der Signalintensität pro stimulierter Frequenz und Areal

Weiterhin wurde statistisch untersucht, ob der Unterschied zwischen den einzelnen Frequenzen signifikant ist (Wilcoxon-Test), und zum anderen, ob der Zusammenhang zwischen steigender elektrischer Stimulationsfrequenz und der Veränderung des aktivierten Volumens bzw. der prozentualen Änderung der Signalintensität statistisch begründbar ist (Page-Trend-Test).

3.3.2 Studie 2 und 3

In der zweiten Studie wurde untersucht, ob die Repräsentationsareale des 2. und 5. Fingers der rechten Hand mittels elektrischer Stimulation und fMRT im somatosensorischen Kortex dargestellt werden können.

In der dritten Studie wurden die somatosensorischen Repräsentationen von Daumen, Unter- und Oberlippe mit der Frage untersucht, ob diese darstellbar sind und wie sie zueinander lokalisiert sind.

In beiden Studien wurden die Lokalisationen und deren euklidische Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten zueinander ermittelt. In der dritten Studie wurde im Gegensatz zur zweiten Studie zusätzlich das Volumen der Repräsentationsareale untersucht und wie in Studie 2 die euklidischen Distanzen zwischen den einzelnen zentralen Aktivierungen ermittelt. Als zentrale Aktivierung wurde das jeweilige Voxel mit dem höchsten Signifikanzniveau innerhalb einer Aktivierung bezeichnet.

Die Daten werden, wie oben beschrieben, ausgewertet und mit dem XDS-Programm auf anatomische MRT-Bilder überlagert. Als Schwellenwert wurde ein p-Wert von $< 10^{-5}$ gewählt.

3.4 Probanden

Insgesamt wurden in den 3 Studien 53 Probanden untersucht. Die Probanden waren durchgehend gesund und litten unter keiner Art psychiatrischer, neurologischer oder internistischer Erkrankung oder Vorerkrankung. Jeder Proband wurde nach den in der klinischen Neuroradiologie üblichen Konventionen über die eventuellen Risiken und Kontraindikationen einer nicht-invasiven kernspintomographischen Untersuchung aufgeklärt. Ein Votum der Ethikkommission lag vor.