

3. 1. Allgemeine Methodik

3.1.1 Grundlagen der funktionellen Bildgebung

In dieser Studie wurde zur Darstellung der neuronalen Aktivierungen und des zeitlichen Verlaufes neuronaler Aktivität die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) verwendet.

Am Anfang sollen die Grundprinzipien und Techniken der funktionellen Bildgebung dargestellt und erklärt werden. Die nicht invasiven Methoden zur funktionellen Bildgebung können in zwei Ansätze unterteilt werden:

1. elektromagnetische Techniken, wie die Elektroenzephalographie (EEG) und die Magnetenzephalopathie (MEG). Sie haben beide eine hohe zeitliche, jedoch geringe räumliche Auflösung.
2. Techniken, die vaskulär- und metabolische Veränderungen messen, wie die funktionelle Kernspintomographie (fMRT) und die Positronenemissionstomographie (PET). Diese beruhen beide auf der Kopplung von neuronaler Aktivität mit dem Energiestoffwechsel und dem Blutfluss (Roy und Sherrington, 1890). Sie ermöglichen eine gute räumliche Auflösung und eine vielfach bessere anatomische strukturelle Darstellung, als es mit elektrophysiologischen Techniken möglich ist

3.1.2 Funktionelle Kernspintomographie

Die funktionelle Kernspintomographie (fMRT) stellte sich Anfang der 90er Jahre als alternative Methode der Bildgebung zur strahlenbelastenden Positronenemissionstomographie (PET) dar. Das Prinzip der funktionellen Kernspintomographie beruht auf den Grundstrukturen der konventionellen Kernspintomographie, die wiederum auf der von Bloch und Purcell entdeckten Magnetresonanz (Bloch, 1946; Purcell et al., 1946). Derzeit gilt als wichtigste fMRT-Methode die Blood-oxygen-level-dependent-technik (BOLD) (Villringer und Dirnagl, 1995). Es kann hierbei aufgrund einer spezifischen Sensitivität gegenüber stimulationsassoziierten Veränderungen der Blutoxygenierung auf die intravenöse Applikation eines Kontrastmittels, wie in der PET, verzichtet werden.

Normalerweise beinhalten fMRT- Messungen neben den funktionellen Daten immer auch anatomische Daten. Zwischen den funktionellen und den anatomischen Datensätzen erfolgt eine graphische Überlagerung (Alignment), um topographisch eine

bessere Zuordnung zwischen aktivierten Kortexarealen vornehmen zu können. Als Referenz dienen die auch in der klinischen Diagnostik etablierten hochauflösenden T1-gewichteten Sequenzen.

3.1.2.1 Biophysikalische Grundlagen

Bringt man ein biologisches Objekt in einen Magneten, so kommt es zu einer Magnetfeldbildung entlang einer Magnetfeldachse, auch Longitudinalmagnetisierung genannt. Diese wird mittels Radiofrequenz (RF-Puls) in eine Transversalmagnetisierung überführt. Durch Induktion einer Spannung kann diese in den Radiofrequenzspulen (Antennen) nachgewiesen werden.

Zur Grundlage einer möglichst genauen Ortskodierung wird eine Bildebene erzeugt. Sie entsteht durch spezifische Schaltung von Schichtselektionsgradienten, d.h. variabler Schichtdicke und Position definierender Magnetfelder. Bei den in der funktionellen Kernspintomographie zum Einsatz kommenden Pulssequenzen wird dann der mit der Zeitkonstante $T2^*$ bezeichnete Zerfall der Transversalmagnetisierung durch Ein- und Ausschalten von Gradientenpulsen kodiert, um wiederum eine Ortskodierung der Bildebene zu ermöglichen. Damit steht dann nach einigen elektromagnetischen Schaltungsvorgängen eine, in Anlehnung an die Fourieroptik als k-Raum bezeichnete Datenmatrix für ein MRT-Bild zur Verfügung (Stehling et al., 1995).

3.1.2.2 Echoplanar Imaging

Echo-planar-imaging ist ein Messverfahren der funktionellen Kernspintomographie (Mansfield und Maudsley, 1977).

Hierbei wird die nach Applikation des RF-Pulses zur Verfügung stehende Transversalmagnetisierung zur Erzeugung mehrere MR-Echos genutzt. Dies wird durch weitere schnelle Gradientenschaltungen ermöglicht. Aus dem $T2^*$ -Zerfall können dann bis zu 128 Gradienten-Echos erzeugt werden (Stehling et al., 1995).

3.1.2.3 Neurovaskuläre Kopplung

Bereits im 19. Jahrhundert wurde ein Zusammenhang zwischen neuronaler Funktion und zerebrovaskulären Änderungen beschrieben (Roy und Sherrington, 1890). Um eine korrekte und genaue Interpretation funktioneller Datensätze, die mit vaskulär-metabolisch basierten Techniken erhoben wurden, liefern zu können, ist das Grundverständnis für die Beziehung zwischen neuronaler Aktivität und metabolischer

bzw. vaskulärer Antwort zu verstehen (Villringer und Dirnagl, 1995). Auch, wenn über die genaue Kopplung zwischen biochemischen und elektrischen Vorgängen hinsichtlich des regionalen zerebralen Blutflusses, des zerebralen Blutvolumens und der Sauerstoffsättigung, noch nicht völlige Klarheit herrscht, so ist sicher, dass elektrische, vaskuläre und metabolische Parameter in ihrer Funktion miteinander verbunden sind. Unstrittig ist es, dass es bei erhöhter neuronaler Aktivität auch zu einer Zunahme des lokalen Energieverbrauches und ebenso zu einer Erhöhung des lokalen Blutflusses (Roy und Sherrington, 1890; Fox und Raichle, 1986) kommt. Dabei steigt der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) bei erhöhter neuronaler Aktivität stärker an als der lokale Sauerstoffverbrauch. Dies wurde von den nachfolgenden Autoren als focal uncoupling bezeichnet (Fox und Raichle, 1986; Fox et al., 1988). Es findet also eine lokale Hyperoxygenierung statt, die sich mittels optischer Methoden darstellen lässt und sich in einer Zunahme der Konzentration des oxygenierten Hämoglobins und einer Abnahme des deoxygenierten Hb widerspiegelt (Malonek und Grinvald, 1996; Obrig et al., 1996; Wenzel et al., 1996b).

3.1.2.4 Modelle zur Erklärung der Hyperoxygenierung

Verschiedene Thesen versuchen diese Hyperoxygenierung zu erklären.

Ein Erklärungsmodell geht davon aus, dass der rCBF-Anstieg primär der Deckung eines gesteigerten Glucosebedarfs dient. Unterstützend hierfür spricht, dass der Blutfluss proportional zum Glucoseverbrauch ansteigt (Fox et al., 1988), ebenso, dass der Glukosemetabolismus mit der synaptischen Aktivität gekoppelt ist (Schwartz et al. 1979, Sibson et al., 1998). Es wird in diesem Zusammenhang angenommen, dass der gesteigerte Energiebedarf der Astrozyten nicht oxidativ durch Glykolyse gedeckt wird und dass die Astrozyten Glutamat aus dem Extrazellulärraum entfernen und in Glutamin umwandeln (Shulman und Rothman, 1998; Sibson et al., 1998; Magistretti und Pellerin, 1999). Dies könnte ein Grund für die Disproportionalität des Blutflussanstieges und des Sauerstoffverbrauches bei gleichzeitiger Proportionalität von Glukoseverbrauch und Blutflussanstieg sein. Mittels MR-Spektroskopie konnte man während der Aktivierung einen Anstieg der Lactatkonzentration nachweisen. Die Menge war jedoch zu gering, um der Energiebereitstellung aus nicht oxidativer Glykolyse zu genügen (Shulman et al., 1993; Madsen et al., 1998, Prichard et al., 1991). Ebenso konnte festgestellt werden, daß es bei verlängerter Stimulation auch wieder zu einem Abfall des Laktat, also zu einer Rückkehr zum oxidativen Metabolismus, kommen kann. Dieser Vorgang

wurde von den nachfolgenden Autoren als recoupling bezeichnet (Sapppy-Marinier et al., 1992; Frahm et al., 1996).

Eine zu dieser Hypothese konkurrierende Erklärung besagt, dass der Gasaustausch an der Kapillarwand der Blutgefäße bei höheren Blutflussgeschwindigkeiten der limitierende Faktor des Sauerstoffmetabolismus ist. Um den erhöhten oxidativen Metabolismus bei Aktivierung zu decken, ist eine erhöhte Sauerstoffspannung an der Gefäßwand notwendig und somit ein disproportional hoher Blutflußanstieg im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch (Buxton und Frank, 1997). Insofern würde doch eine Kopplung zwischen Blutfluß und Sauerstoffverbrauch bestehen. Auch eine Kombination beider Hypothesen zur Erklärung der Hyperoxygenierung wurde vorgeschlagen (Gjedde und Marrett, 2001).

3.1.2.5 Verhältnis von neuronaler Aktivität und Blutfluss

Wie einleitend bereits erwähnt, besteht Einigkeit über die Kopplung neuronaler Aktivität und vaskulärer und metabolischer Parameter. Hierbei stellt sich die zentrale Frage, welche Prozesse im Nervengewebe mit den beobachteten vaskulären und metabolischen Veränderungen korrelieren. Da jenseits der Hypothesen zur Erklärung der fokalen Hyperoxygenierung angenommen werden muss, dass der Blutflussanstieg der Deckung eines gesteigerten Energiebedarfes dient, kommt einer genaueren Aufschlüsselung des Energieverbrauches bei der neuronalen Erregung eine zentrale Bedeutung zu.

Lange Zeit ging man davon aus, dass Aktionspotentiale nur zu einem sehr geringen Teil (0.3 bis 3%) zum Energieverbrauch beitragen (Creutzfeldt, 1975). Jueptner und Weiller kommen 1995 in einer Literaturübersicht zu dem Schluss, dass die synaptische Aktivität, genauer die präsynaptischen Axon-Endigungen, wichtigster Konsument der metabolisierten Glukose sind (Jueptner und Weiller, 1995). Arbeiten, die die Annahme stützen, dass synaptische Aktivität den Hauptenergieverbrauch darstellt, zeigten, dass die präsynaptischen Elemente der Axonterminale Orte mit hohem Metabolismus sind (Nudo und Masterton, 1986). Eine Übersicht zum Energieverbrauch des Gehirns (Attwell, 2001) zeigte jedoch davon deutlich abweichende Ergebnisse. Für Aktionspotentiale wurden bei Nagern 47% und für postsynaptische Aktivität 34% (beim Menschen geschätzte 74%) des signalbezogenen Energieverbrauches veranschlagt, während für das Recycling von Glutamat der angestellten Rechnung zufolge nur 3% anfielen. Daraus wurde gefolgert, dass, wenn indirekte Methoden der funktionellen

Bildgebung Veränderungen des Energiebedarfes reflektieren, ihr Signal hauptsächlich von postsynaptischen Aktionen des Glutamats und den den Aktionspotentialen zugrunde liegenden Ionenströmen bestimmt ist, wobei beide sensitiv in Bezug auf die so genannte Spike-Aktivität sind.

Experimente, die in der Ratte direkt den Einfluss von Spike-Aktivität und synaptischer Aktivität auf den rCBF untersuchten, zeigten jedoch, dass die Spike-Aktivität einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Blutflussantwort hat (Lauritzen, 2001). Auf der anderen Seite bestehen in dem in der Gruppe von Lauritzen genutzten Kleinhirnmodell jedoch abhängig von der Stimulationsart und -frequenz Korrelationen zwischen prä- und postsynaptischer Aktivität mit dem rCBF.

Es erfolgte ebenfalls die direkte Untersuchung der Frage nach der Korrelation des der funktionellen Kernspintomografie zugrunde liegenden BOLD-Kontrastes (s.u.) zu elektrophysiologischen Größen. In einer Studie beim Affen konnten gleichzeitig Einzel- und Multi-Unit Aktivität (MUA), lokale Feld-Potentiale (LFP) und Änderungen des BOLD-Kontrastes gemessen werden und eine starke Korrelation zwischen den LFP und der vaskulären Antwort demonstriert werden (Logothetis, 2001). Hierbei wird davon ausgegangen, dass MUA die Spike-Aktivität der Neurone, die LFP die Superposition von synchronisierten dendritischen Entladungen reflektieren. Die methodische Stärke und damit die Wertigkeit der Befunde der zitierten Arbeit besteht sicherlich in der Kombination von elektrophysiologischen und kernspintomografischen Methode.

Jüngere Veröffentlichungen, die direkt eine proportionale Beziehung zwischen BOLD-Signal und neuronaler Entladungsrates postulierten, beruhen auf einem Analogieschluss von Befunden aus fMRI-Studien bezüglich verschiedener humaner visueller Areale und elektrophysiologischen Ableitungen aus dem Kortex des Affen (Heeger, 2000; Rees, 2000).

Eine definitive Zuordnung von Orten mit erhöhter vaskulär-metabolisch-neuronaler Aktivität zu einem bestimmten neuronalen Prozess ist bisher noch nicht vollständig geklärt worden (Lauritzen, 2001). Diese Aufschlüsselung hat eine große Bedeutung, denn von ihr ist abhängig, ob „Aktivierung“ auf neuronaler Ebene synaptischen Transfer, lokale Feldpotentiale (LFP) oder eher Spike-Aktivität bezeichnet.

3.1.3 Das BOLD Signal

Ogawa und Mitarbeiter demonstrierten erstmals die Abhängigkeit von T2- oder T2*-gewichteten MR-Signalen vom Oxygenierungsstatus des Hämoglobins (Ogawa et al., 1990; Ogawa et al., 1993), welcher dieser Bildgebungstechnik den Namen Blood oxygen level dependent (BOLD) gab. Es wird von einem magnetischen Suszeptibilitätskontrast zwischen intra- und extravaskulärem Raum ausgegangen. Da oxygeniertes Hämoglobin diamagnetisch und deoxygeniertes Hämoglobin paramagnetisch ist, entsteht durch den paramagnetischen Anteil im Gefäß um das Gefäß ein magnetischer Feldgradient, der einen Abfall der Signalintensität im T2 und T2* gewichteten MR-Bild bewirkt. Eine Zunahme von deoxygeniertem Hämoglobin hat eine Zunahme der magnetischen Suszeptibilität des Blutes zur Folge (Thulborn et al., 1982). Wenn deoxygeniertes Hämoglobin den Hauptanteil endogener paramagnetischer Substanzen darstellt, kann man umgekehrt den Signalanstieg bei der Hirnaktivierung auf einen Abfall von deoxygeniertem Hämoglobin zurückführen (Bandettini et al., 1992). Physiologische Grundlage des BOLD-Kontrastes bei funktioneller Aktivierung ist also die oben erwähnte Hyperoxygenierung mit einem Abfall der Konzentration des deoxygenierten Hämoglobins. Regionaler Blutfluss, das Blutvolumen und der lokale Sauerstoffverbrauch stellen damit die drei hauptsächlichsten physiologischen Einflussgrößen auf das BOLD- Signal dar.

3.1.4 Graphische 3D- Rekonstruktion

In der graphischen Darstellung von fMRT-Daten etablierte sich im Laufe der Jahre die dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion des Kortex und dessen Auffaltung. Dieses Verfahren wurde aus Tierexperimenten übernommen (Carman et al., 1995; Van Essen et al., 1998) und macht eine anatomische Lokalisation von Arealen in durch Faltungen überlagerten Sulci wesentlich einfacher. Beim Menschen wurden 3D-Rekonstruktion und Auffaltung in fMRT-Arbeiten u.a. zur Bestimmung von Arealgrenzen des primären visuellen Kortex angewandt (Serenio et al., 1995; Tootell et al., 1995; Tootell et al., 1998). Mittlerweile stellen sie einen Bestandteil vieler neurowissenschaftlicher Untersuchungen dar.

3.2 Spezielle Methodik

3.2.1 Probanden

Die Untersuchungen von Versuchspersonen waren von der Ethikkommission der Charité genehmigt und wurden im Sinne der Erklärung von Helsinki durchgeführt.

Es erfolgte zunächst mit acht Frauen und fünf Männern zwischen 20 und 40 Jahren und ohne neurologische Vorerkrankung die Durchführung eines psychophysikalischen Versuches ausserhalb des fMRT.

Vor den Messungen im fMRT fand jeweils ein ausführliches Aufklärungsgespräch über die Risiken einer Messung im fMRT statt. Es nahmen sieben Frauen und vier Männer zwischen 20 und 40 Jahren ohne bekannte neurologische Vorerkrankungen an dem Versuch im fMRT teil. Alle Probanden waren Rechtshänder.

3.2.2 Grundlagen des Piezoeffektes

Übt man auf definierte Flächen eines bestimmten Kristalls mechanischen Druck aus, so tritt ein elektrisches Potential auf. 1880 entdeckte Pierre Curie zusammen mit seinem Bruder Jacque dieses Phänomen bei Quarz und Rochellesalz und nannten es „piezoelektrischer Effekt“ (Gerthsen et al., 1992). Piezoelektrische Effekte beobachtet man bei verschiedenen kristallinen Substanzen.

Der piezoelektrische Effekt wird durch die Verschiebung von Ionen in Kristallen mit nichtsymmetrischen Einheitszellen verursacht. Beim Zusammenpressen verschieben sich die Ionen in jeder Einzelzelle und verursachen damit eine Verschiebung der Ladungsschwerpunkte von negativer und positiver Ladung relativ zueinander. Dies führt zu einer elektrischen Polarisierung. Aufgrund der regelmässigen kristallinen Struktur verstärken sich diese Effekte und erzeugen so eine elektrische Potentialdifferenz zwischen einzelnen Flächen des Kristalls (Bogdanov, 2002).

Die Deformation beruht darauf, dass die in der Feldrichtung hintereinander liegenden Dipole einander anziehen. Benachbarte Schichten werden durch diese Kräfte solange einander genähert, bis elastische Gegenkräfte die elektrischen kompensieren. Die Deformation erfolgt gegen die Coulombschen-Felder zwischen Elementarladungen.

Ob ein solcher Piezoeffekt auftritt, hängt davon ab, ob der Isolator eine polare Achse hat oder nicht. Die Richtung der polaren Achse entscheidet, in welche Richtung das elektromagnetische Feld zeigt (Gerthsen et al. 1992). Wird im umgekehrten Fall ein elektrisches Feld an bestimmte Kristallflächen angelegt, kommt es zu einer Kristallverformung, wenn die Frequenz der Wechselspannung der Resonanzfrequenz

des anzuregenden Stoffes entspricht. Es findet dann eine Verlängerung oder Verkürzung des Stoffes, je nach der Polung der Spannung statt. Dieses Phänomen wird als „umgekehrter Piezoeffekt“ (Bogdanov, 2002) bezeichnet und wurde für das hier beschriebene Experiment durch Anlegen einer Wechsellspannung an den entworfenen Piezokeramikschwinger zur Erzeugung einer tiefenvibratorischen Stimulation genutzt. Die gebräuchlichsten Piezomaterialien sind Quarz, Turmalin, Bariumtitanat und Piezokeramiken. Wichtig sind auch organische Salze, wie Seignette-Salz und Rochelle-Salz, in denen die Polarisierung nicht auf einer Verschiebung von Elektronen beruht, sondern von Protonen in Wasserstoffbrücken.

3.2.3 Konstruktion des Piezokeramikschwingers

Zur Durchführung des geplanten Versuches war die Konstruktion eines vibratorischen Stimulators notwendig, der in den magnetischen Feldern des fMRT einsetzbar ist. Der für dieses Experiment verwendete Multilayer Bender Actuator wurde von den Forschungswerkstätten des Virchow Klinikums, Charité, Berlin, unter der Leitung von Dipl. phys. D. Heinze in Kooperation mit Piezo Systems, Cambridge (USA), G. Harrington, Californien (USA) sowie PI Ceramic GmbH, Lederhose (Deutschland) konstruiert (Heinze et al. 2001/2002, Harrington et al., 2000).

Das entworfene piezokeramische Element besteht aus mehreren Schichten (Multilayer), in dem sich 20-40 µm dicke Plättchen befinden, welche beidseitig in einer Kunststoffhalterung fixiert und gegeneinander mit einem speziellen Polyoxymethylenkleber, der weder stromleitend noch erwärmend wirkt, aneinander geheftet sind. Durch Anlegen einer Wechsellspannung kommt es durch die Umkehrung des oben beschriebenen piezokeramischen Effektes zu einer Auslenkung der piezokeramischen Plättchen. Umgeben ist der Schwinger von einer Kunststoffhülle, nach unten liegt diese als gewölbte abgerundete Platte mit einem Durchmesser von 2,1cm der Haut auf und überträgt hier die Schwingung. Die Schwingungsrichtung hängt von der Orientierung der Kristallachsen ab. Diese wurden vom Hersteller so gewählt, dass diese der gewünschten Ausrichtung der Schwingung entspricht.

Der Vorteil eines Multilayers gegenüber den klassischen bimorphen Schwingern besteht insbesondere in einer sehr schnellen Antwortzeit (< 10ms) und einer um den Faktor 3-10 reduzierten Spannung, die notwendig ist, den Schwingungseffekt auszulösen (60V_{max}). Die Tatsache, dass nur eine verhältnismässig geringe Spannung benötigt wird, ermöglicht auch den Einbau eines Multilayers in nur sehr kleine Geräte. Zudem

zeigen Multilayer eine ausgesprochen grössere Beständigkeit sowohl gegenüber Hitze als auch gegenüber Feuchtigkeit und sind damit trotz ihres filigranen Materials relativ robust.

Zum Anlegen der für dieses Experiment benötigten Wechselspannung wurde ein Generator konzipiert. An diesem liess sich zum einen eine Amplitude zwischen $50\mu\text{m}$ und $200\mu\text{m}$ einstellen, zum anderen die Frequenz f (Hz) des Ausgangssignals (20-200 Hz). Laut Hersteller war der entworfene Multilayer bis maximal 450 Hz belastbar. Eine Ausreizung der Maximalbelastung bis 450 Hz war jedoch von Anfang an nicht das Ziel, da eine gefühlte Tiefenvibration in diesen Frequenzspektren bereits nicht mehr gegeben ist und zudem der auditive Einfluss des Schwingers einen beträchtlichen störenden sensorischen Einfluss eingenommen hätte.

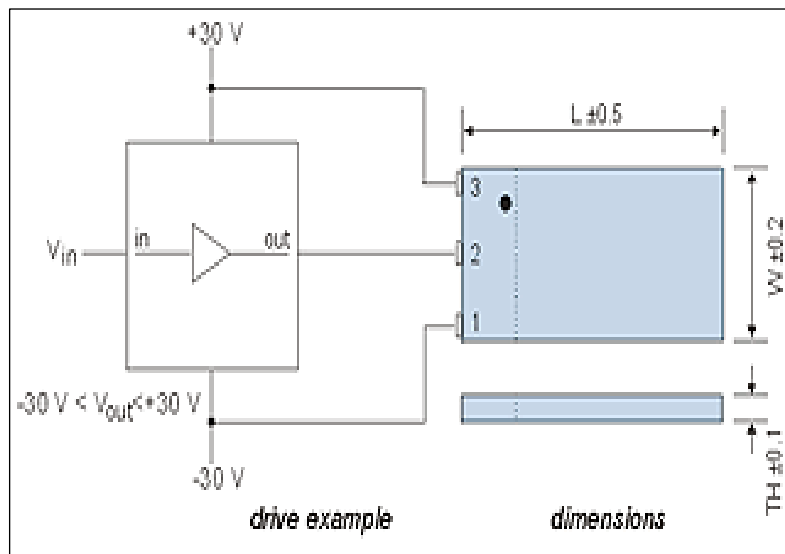


Abb.3.1 Konstruktion und Maße des Piezokeramikschwingers
 450 Hz Resonanzfrequenz, 31x 9,6 x 0,75 mm
 (Forschungsstätten Virchow, Berlin)



Abb.3.2 Photographie des Piezoschwingers von außen. Das runde schwarze Areal in der Mitte zeigt die abgerundete Auflagefläche.
 (Forschungswerksstätten Virchow Klinikum, Berlin)

3.2.4 Versuchsaufbau des psychophysikalischen Versuches

Das Ziel des psychophysikalischen Versuches bestand darin, mit dem Schwinger im Bereich der Halsmuskeln eine Tiefenvibration zu erzeugen, welche zu einer illusionären Bewegungswahrnehmung eines an die Decke projizierten Laserpunktes führt (Karnath et al., 2002; Mc Closkey et al., 1973).

Hierzu ermittelte jeder Proband zunächst aus der Kombination von Amplitudenstärke und Frequenz sein eigenes optimales Vibrationsempfinden. Der Proband lag hierzu auf einer Liege in einem völlig abgedunkelten Raum. Der Multibender wurde mit einem Vakuumkissen am Nacken des Probanden fixiert. Zuvor erhielt der Proband Schalldämpfer für die Ohren, um auditive Einflüsse zu minimieren. Bei Variation von Frequenzen zwischen 20- 200 Hz und Amplitudenstärken zwischen 50µm und 200µm ermittelte jeder einzelne Proband mit geschlossenen Augen sein für ihn optimales tiefen-vibratorisches Empfindungsvermögen im Bereich der kurzen Halsmuskulatur. Im Anschluss wurde unter gleichen Bedingungen mittels eines Laserpointers ein Lichtpunkt senkrecht an die Decke projiziert. Der Proband fixierte zunächst ohne Vibration den Laserpunkt für 20 Sekunden, anschliessend erfolgte dann die Vibration mit der zuvor ermittelten subjektiv optimalen Frequenz/Amplitudenkombination. Wie bereits ausführlich beschrieben, kann es dann zu subjektiv empfundenen Bewegungsillusionen der Eigenbewegung oder auch von Fremdbewegung kommen. (Goodwin et al., 1972; Mc Closkey, 1973; Lackner und Levine, 1979; Karnath et al., 2002). Es erfolgte eine anschliessende Befragung der Bewegungsrichtung sowohl der Eigenbewegung als auch des an die Decke projizierten Laserpointers.

Es wurden lediglich die Probanden für den anschliessenden Versuch im fMRT ausgewählt, die unter Vibration das Phänomen einer illusionären Blickpunktwanderung wahrnahmen.



Abb.3.3 Platzierung des Schwingers am Hals des Probanden

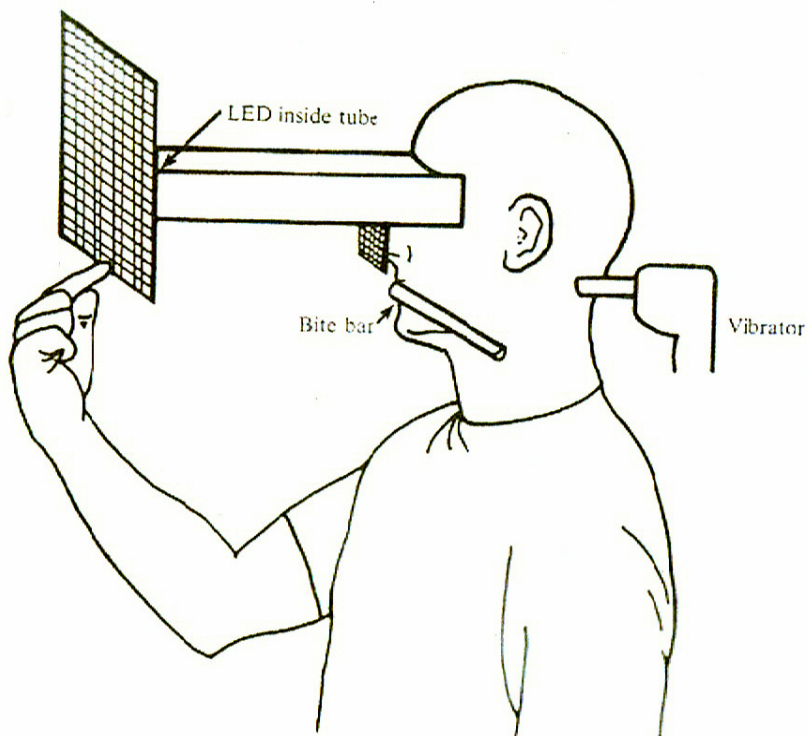


Abb.3.4 Versuchsaubau nach Taylor und seinen Kollegen (Brain 1991). Der Proband sitzt in aufrechter Position. Zur Vermeidung von Kopfbewegungen hat er eine Art Beisskeil im Mund. Während die Vibration am Hals erfolgt, wird dem Probanden auf einem Gitter ein Laserpunkt präsentiert. Mit dem Finger zeigt er die Position des sich scheinbar bewegenden Laserpunktes unter Vibration an.
LED = red light-emitting diode

3.2.5 Versuchsaufbau im fMRT

Für die Vibration der Nackenmuskulatur wurde der konstruierte Piezokeramikschwinger verwendet. Der Stimulus wurde manuell über den ausserhalb des fMRT befindlichen Generator eingestellt und über ein Kabel Spannung an den Piezo-Schwinger geleitet. Der Schwinger wurde, wie im Vorversuch mit einem Vakuumkissen am Hals des Probanden fixiert. Zur Minimierung auditiver Einflüsse erhielt der Proband wieder Schalldämpfer. Es wurde ausschliesslich an der rechten kurzen Halsmuskulatur eines jeden Probanden stimuliert.

Die Positionierung des Schwingers erfolgte im Bereich des rechtsseitigen Musculus splenius capitis am Übergang zum rechtsseitigen Musculus trapezius.

Die Stimulation erfolgte im standardisierten Blockdesign mit abwechselnder Tiefenvibration (120Hz/200 μ m) und oberflächlicher Hautvibration (120Hz/50 μ m). Ein Block bestand aus 16 EPI-Volume-Akquisitionen (32 Sekunden). Diese beinhalteten wiederum jeweils vier Einheiten mit tiefer und oberflächlicher Hautvibration. Bei jedem Probanden wurden vier EPI-Runs mit jeweils 260 EPI-Volume-Akquisitionen durchgeführt.

Um mögliche visuelle oder retinale Einflüsse zu minimieren, erfolgte der Versuch in kompletter Dunkelheit. Eine Befragung der Probanden bezüglich der Bewegungssillusionen erfolgte zwischen den einzelnen Runs.

3.3 fMRT Messungen

Die Messungen wurden mit einem 1.5 Tesla Siemens Vision Kernspintomographen durchgeführt, der mit einem EPI- Booster aufgerüstet war.

3.3.1 EPI- Sequenzen

EPI-Sequenzen (TR = 2s, TE = 60ms, flip angle = 90°, FOV = 256 x 256mm Bildmatrix = 64x64, Schichtdicke = 5mm, skip = 0.5mm) wurden in schräger Schichtführung positioniert, so dass die 16 Schichten den supratentoriellen Teil des Gehirns einschlossen. Die Sequenz erlaubte es, 16 Einzelbilder in eine Bildmatrix zu schreiben und somit die Limitierung des Siemens Systems auf 128 Messpunkte zu umgehen. Ein funktioneller Run bestand aus 260 Bildern pro Schicht

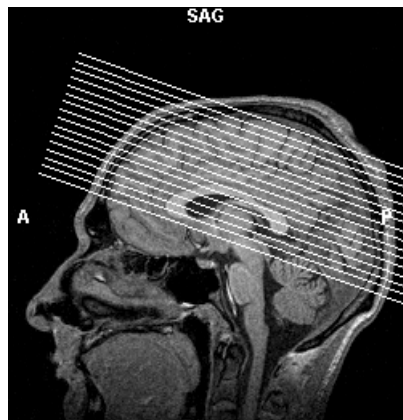


Abb.3.5 Schichtführung der EPI-Sequenzen bei propriozeptivem Versuchsparadigma einer repräsentativen Versuchsperson (sagittale Ansicht)

3.3.2 T1-Sequenzen

Zur anatomischen Orientierung und zur 3D-Rekonstruktion kamen drei verschiedene T1-Sequenzen zur Anwendung.

Jede Sitzung beinhaltete eine hochauflösende T1-gewichtete 3D-MP-Rage Messung (TR = 9.7ms, TE = 4ms, flip angle = 90°, FOV = 256 x 256mm, voxel size 1 x 1 x 1 mm, 190 slices). Diese Messung ermöglicht eine Transformation der EPI-Daten in den dreidimensionalen Raum sowie eine integrierende Datenanalyse in verschiedenen Sitzungen. Zur visuellen Kontrolle der räumlichen Transformation wurde eine zweidimensionale T1-gewichtete Messung (TR = 900 ms, TE = 14ms, voxel size 2 x 2 x 5 mm, 16 slices) in gleicher Schichtführung wie die EPI-Sequenz durchgeführt. In der ersten Sitzung wurde statt der MP-Rage von jeder Versuchsperson eine hochauflösende 3D-Flash-Sequenz (TR = 20ms, TE = 5ms, flip angle = 30°, FOV = 256 x 256mm, voxel size 1 x 1 x 1 mm, 190 slices, 2 Akquisitionen) gemessen, die als Grundlage der Kortexrekonstruktion und Auffaltung diente.

3.4 Datenanalyse

Die Daten wurden mit der von Prof. R. Göbel (Maastricht) entwickelten Software (Brain Voyager 2000/QX) ausgewertet.

3.4.1 Anatomische Messungen

Die T1-gewichteten anatomischen Datensätze dienten als Grundlage der verschiedenen Realignment-Prozesse (2D-T1, 3D-MP-Rage) und der grafischen Überlagerung der funktionellen EPI-Daten auf die rekonstruierte 3D-Flash.

3.4.2 Funktionelle Messungen

Die jeweils ersten vier Bilder einer EPI-Messung wurden aufgrund des ungesättigten T1-Signals verworfen. Nach dem Einlesen der übrigen 256 Aufnahmen des Protokolls wurden diese mit den Daten der in gleicher Schichtführung durchgeführten T1-Messung überlagert (2D-2D-Alignment) (Abbildung 3.6). Das halbautomatische 2D-3D-Alignment, bei dem die funktionellen Daten anhand der in den Rohdaten enthaltenen Schichtpositionsparameter (Headerinformationen) in den dreidimensionalen Raum der MP-Rage Aufnahme transformiert wird, konnte visuell durch den hochauflösenden zweidimensionalen T1-Datensatz kontrolliert bzw. bei geringen Verschiebungen entsprechend modifiziert werden.

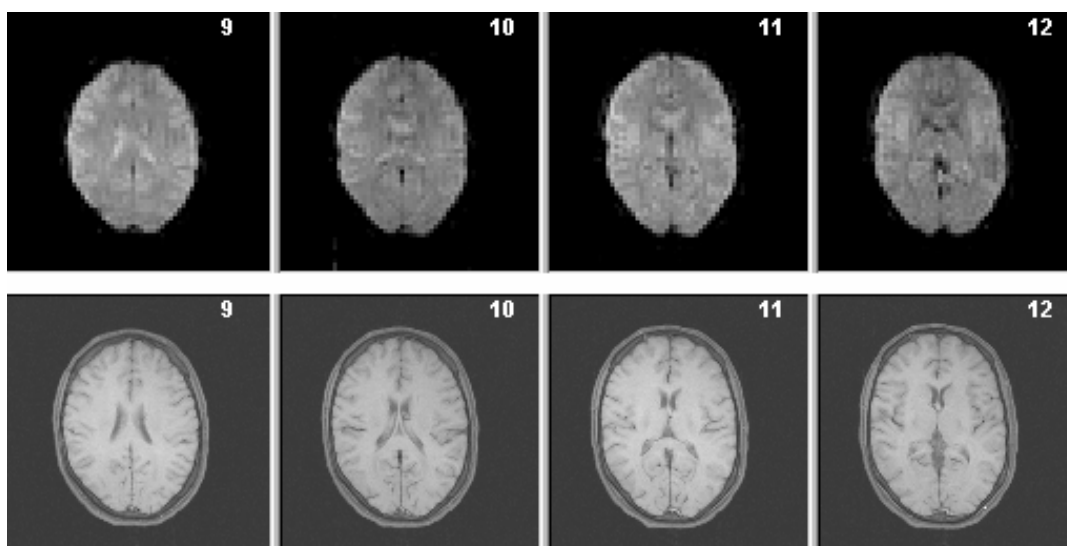


Abb.3.6 Alignment der EPI-Daten mit der T1-Sequenz am Beispiel der Schichten 9-12 eines Runs. Da beide Aufnahmen in gleicher Schichtführung aufgenommen wurden, kann der funktionelle EPI-Datensatz (oben) mit dem anatomischen (unten) überlagert werden.

Eine weitere räumliche Transformation, die die MP-Rage in eine deckungsgleiche Position mit der in der ersten Sitzung akquirierten 3D-Flash brachte (3D-3D-Alignment), erfolgte durch einen in der Software integrierten automatischen Prozess, dessen Ergebnis wiederum der visuellen Kontrolle unterlag. Dies diente als Basis für eine Überlagerung jedes am individuellen Probanden erhobenen zweidimensionalen funktionellen Datensatzes (slice time courses), der aufgrund der verschiedenen Alignment-Prozesse in dreidimensionale so genannte volume time courses (vtc) auf dieselbe anatomische Referenzmessung (3D-Flash) verrechnet wurde. Somit konnten

die in verschiedenen Sitzungen gewonnenen Ergebnisse nach statistischer Analyse (s.u.) in funktionellen und anatomischen Bezug zueinander gesetzt werden. Es erfolgte eine Normierung der erstellten volume time courses in den Talairachraum (Nowinski, 2005) und somit die Möglichkeit zur Analyse der Daten von verschiedenen Probanden.

3.4.3 Statistische Analyse

3.4.3.1 Preprocessing

Um Artefakte zu reduzieren, die durch minimale Positionsveränderungen des Kopfes während der Messungen oder durch lineare Signalabfälle des BOLD-Signals entstehen können, mussten vor der Varianzanalyse verschiedene Schritte der Datenprozessierung (preprocessing) durchgeführt werden.

Zunächst durchliefen die funktionellen zweidimensionalen Datensätze eine an allen drei Raumebenen (x;y;z) orientierte dreidimensionale Bewegungskorrektur (motion correction), woraufhin Runs, die eine Verschiebung >2 mm in mindestens einer Koordinate aufwiesen, von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Anschliessend wurden lineare Trends im Signalverlauf entfernt.

3.4.3.2 Allgemeines Lineares Modell

Die von Bandettini beschriebene Auswertungstechnik, die die Errechnung der jeweiligen Korrelationen des zeitlichen BOLD-Signalverlaufes der funktionellen Daten mit dem Stimulationsprotokoll zum Gegenstand hat (Bandettini et al., 1993), konnte im Rahmen des Allgemeinen Linearen Modells (ALM) (Cohen, 1968) erweitert werden. Die Grundlagen dieser multiplen Regressionsanalyse sollen hier kurz dargestellt werden.

Sei y_{ij} das geglättete MRT-Signal des Voxels j in der Messwiederholung i . Dann ist das ALM für y_{ij} durch die folgende multivariate Regressionsgleichung gegeben:

$$y_{ij} = g_{i1}\beta_{1j} + g_{i2}\beta_{2j} + \dots + g_{iK}\beta_{Kj} + e_{ij}. \quad (1)$$

Voraussetzung des ALM ist, dass die Fehler e_{ij} zwischen den Bedingungen unabhängig und normalverteilt sind. Die Koeffizienten g_{ik} bilden K Spaltenvektoren, die den Signalverlauf (insbesondere seinen Anstieg in den experimentellen Bedingungen) nach den Hypothesen des Experimentators vorhersagen. Sie werden deswegen als Prädiktoren bezeichnet. Das Modell besitzt K unbekannte Parameter β für jedes Voxel

\mathbf{j} , die durch Minimierung der Fehler \mathbf{e}_{ij} bestimmt wird. Dazu wird die Gleichung in Matrixschreibweise formuliert:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{G}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{e}. \quad (2)$$

\mathbf{Y} ist die fMRT-Datenmatrix; sie besitzt eine Spalte für jedes Voxel und eine Reihe für jede Messwiederholung. Die Designmatrix \mathbf{G} besteht aus den Koeffizienten \mathbf{g}_{ik} . $\boldsymbol{\beta}$ ist die Parametermatrix mit Spaltenvektoren \mathbf{b}_j für die \mathbf{K} Parameter des Voxels \mathbf{j} . Zur Lösung von Gleichung (2) wird die Methode der kleinsten Quadrate verwendet. Dabei wird jene Parametermatrix $\boldsymbol{\beta}$ bestimmt, für die $\mathbf{e}'\mathbf{e}$ minimiert wird:

$$\mathbf{e}'\mathbf{e} = (\mathbf{Y}-\mathbf{G}\boldsymbol{\beta})'(\mathbf{Y}-\mathbf{G}\boldsymbol{\beta}) = \min. \quad (3)$$

Wird $\mathbf{e}'\mathbf{e}$ nach \mathbf{B} differenziert und die Ableitung gleich Null gesetzt, resultiert die Matrix \mathbf{b} :

$$\mathbf{b} = (\mathbf{G}'\mathbf{G})^{-1}\mathbf{G}'\mathbf{Y}. \quad (4)$$

Für die experimentelle Bedingung wurde ein Prädiktor $\mathbf{g}(i)$ definiert. Im ersten Schritt wurde der Referenzvektor $\mathbf{r}_{\text{deep vibration}}(i)$ durch Dummykodierung bestimmt: Allen Messungen i während der Kontrollbedingung (superficial vibration) wurde der Wert 0 zugeordnet, allen Messzeitpunkten während der experimentellen Bedingung motion wurde der Wert 1 zugeordnet.

Im zweiten Schritt wurden diese Referenzvektoren mit einer empirisch für das Areal $V1$ gewonnenen hämodynamischen Impulsantwortfunktion \mathbf{h} gefaltet, um mit $\mathbf{g}_{\text{deep vibration}}(i)$ die Signalantwort aktivierter Areale möglichst realistisch zu modellieren (Cohen, 1997):

$$\mathbf{g}(i) = \mathbf{r}(i) * \mathbf{h}(i), \quad (5)$$

wobei die kontinuierliche Funktion \mathbf{h} durch

$$\mathbf{h}(t) = [t / T^{(n-1)} e^{-(t/T)}] / [T(n-1)] \quad (6)$$

gegeben ist. Die Phasenverschiebung der Antwort wurde mit $n = 2.5$ und die Zeitkonstante ihres Anstiegs mit $T = 1.25 \text{ s}^{-1}$ festgelegt (Boynton et al., 1996).

In der fMRT-Datenmatrix \mathbf{Y} wurden alle volume time courses eines Probanden aneinander gehängt, nachdem diese zuvor z-transformiert wurden, um den Einfluss unterschiedlicher Ausgangssignalintensitäten von einem Sequenz-Durchlauf zum nächsten zu eliminieren. Aus \mathbf{b} wurde für jedes Voxel \mathbf{j} der multiplen Korrelationskoeffizient \mathbf{R}_j bestimmt.

3.4.3.3 Statistische Schwellen

Die Oberflächenrekonstruktion der einzelnen Gehirne erfolgte aus den individuellen 3D-Datensätzen. Diese Datensätze wurden in einen standardisierten Talairach Raum transferiert. Als statistische Schwelle konnte bei dem überwiegenden Anteil der Probanden in der Einzelanalyse eine relativ strenge Irrtumswahrscheinlichkeit von $p(\text{Bonf})=10^{-7}$ festgelegt werden. Bei drei Probanden stellten sich erst ab einem $p(\text{Bonf}) < 0,05$ deutliche Aktivierungen dar.

Für die statistische Gruppenanalyse wurden die individuellen volume time courses mit der jeweils individuellen Oberfläche verrechnet und ein individueller mesh time course von den funktionellen Voxeln entlang der Grenze zwischen grauer und weisser Substanz erstellt. Die mesh time courses aller elf Probanden wurden mittels dem allgemeinen linearen Modell statistisch verrechnet. Die Gruppenanalyse erfolgte in einem normierten Standardgehirn (Montréal) im Talairach Raum. Als statistische Schwelle galt in der Gruppenanalyse ein $p(\text{Bonf}) < 0,001$. Die minimal dargestellte Arealgröße entspricht einer Fläche von 20mm^2 (entsprechend fünf funktioneller Voxel auf der Kortexoberfläche).

3.4.4 Grafische Oberflächenrekonstruktion und Auffaltung des Gehirns

Die dreidimensionale Rekonstruktion der individuellen Kortexoberflächen erfolgte in mehreren Schritten anhand des 3D-Flash Datensatzes. Zunächst musste eine grafische Markierung der weißen Substanz durchgeführt werden (Segmentierung). Nach Entfernung von Hirnstamm und Kleinhirn wurde ein dreidimensionales Skelett der segmentierten weißen Substanz erstellt, auf welches nun in mehreren halbautomatischen Prozessen die graue Substanz rekonstruiert werden konnte. Dabei war wieder eine visuelle Kontrolle nötig, da Artefakte durch den schwer beurteilbaren Übergang zu den Hirnhäuten vermieden werden sollten. Nach mehreren grafischen Glättungen und einem strengen Vergleich mit den zugrunde liegenden Flashdaten entstand ein grafisch frei bewegliches Referenzmodell des Probandengehirns. Dieses konnte nun entfaltet werden, wobei die gyrale und sulcale Oberflächenstruktur durch ein spezifisches Schattierungsmuster erhalten blieb. Die Entfaltung erfolgte durch multiple Glättungen des rekonstruierten Referenzmodelles.

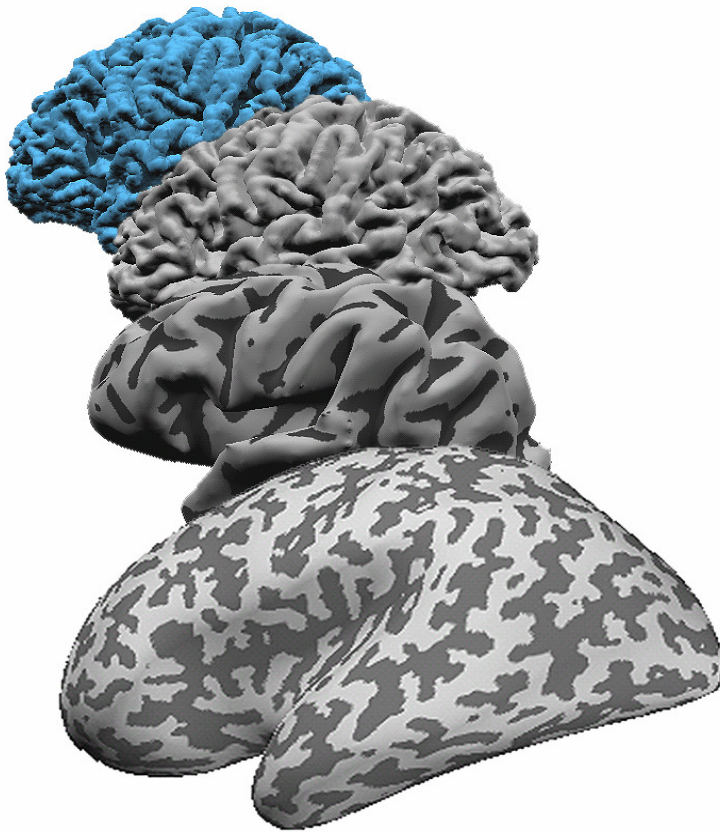


Abb.3.7

Dargestellt ist die Rekonstruktion und Glättung eines segmentierten Datensatzes. Zuerst erfolgte eine Rekonstruktion der grauen Substanz auf ein dreidimensionales Skelett (blau). Die anschließenden Glättungsschritte bestanden aus jeweils ca. 2000 einzelnen grafischen Glättungen. Bei jedem Probandendatensatz wurde dieser Prozess einmal durchgeführt um damit eine möglichst optimale Projektionsfläche für die funktionellen Daten zu erhalten.