Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
des Campus Charité Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin
und der Klinik für Strahlenheilkunde
des Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleich des zerebralen Metabolitenprofils zwischen gesunden Rauchern und Nichtrauchern mittels der in vivo ^{1}H-MRS bei 3,0 Tesla

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Jeffrey C. Bierbrauer

aus Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Gallinat

2. Prof. Dr. med. M. Bajbouj

3. Prof. Dr. med. D. Rujescu

Datum der Promotion: 19. November 2010

Widmung

für Debora

Abstract

KEYWORDS: smoking, nicotine, MRS, NMR, N-acetylaspartate, choline, creatine, myo-Inositol, brain alteration, glia, PRESS

BACKGROUND: Converging lines of evidence suggest cognitive, electrophysiologic, functional, and structural alterations of specific brain regions in smokers compared to never-smokers, notably the anterior cingulate cortex (ACC). Some of these deficits were also detected in former smokers even after several years of abstinence. Animal studies in fetal and adolescent rodents imply neurotoxic effects of nicotine during brain development and indicate a potential for developmental disruption or damage of distinct brain regions, since ninety percent of smokers start their smoking habit during adolescence. When performing this study, there was only one magnetic resonance spectroscopic imaging (MRSI) study published comparing smokers to nonsmokers. That study suggested that cigarette smoking exacerbates chronic alcohol-induced brain damage, since N-acetylaspartate (NAA) deficits could only be detected in smoking 1-week abstinent revocering alcoholics but neither in nonsmoking 1-week abstinent recovering alcoholics nor in healthy smokers or nonsmokers.

METHODS: Absolute concentrations of total creatine (Cre), N-acetylaspartate (NAA), total choline (tCho) and myo-inositol (mIns) were measured in anterior cingulate cortex (ACC), posterior cingulate cortex (PCC) and right frontal white matter (RFWM) in 11 healthy smokers and 22 healthy never-smokers without any history of mental or physical disease or abnormality. To control for potential differences of cerebrospinal fluid content in voxels, ratios of absolute concentrations of NAA, tCho and mIns were built with Cre. It was postulated that smokers would show NAA/Cre deficits in ACC but not or to a smaller degree in PCC. For RFWM it was hypothetisized that NAA/Cre levels would not differ significantly between smokers and never-smokers.

RESULTS: Analysis of covariance (ANCOVA) showed that absolute concentrations of Cre did not differ significantly between smokers and never-smokers in any of the three volumes of interest (VOI) ($p \geq 0.485$). As hypothesized, NAA/Cre levels of smokers and never-smokers did not differ significantly in PCC ($p = 0.994$) or RFWM ($p = 0.563$). However, NAA/Cre levels in ACC showed no significant difference between smokers and never-smokers, either ($p = 0.229$). Post-hoc analysis of secondary parameters showed significant smoking effects for

tCho/Cre in gray matter of ACC (p = 0.025) and mIns/Cre in white matter (RFWM) (p=0.010). After all, neither significance level survived Bonferroni correction (p = 0.225 for tCho/Cre in ACC; p = 0.090 for mIns/Cre in RFWM), despite a persisting statistical trend towards a smoking effect for mIns/Cre in RFWM ($p \leq 0.100$).

CONCLUSIONS: A possible reason for not being able to detect significant NAA/Cre differences in smokers and never-smokers in the ACC may either lie in the rather small study population or in pattern differences of neurotoxicity of fetal and adolescent nicotine exposure in animal models: fetal nicotine exposure in rodents points to neuronal damage in midbrain and neocortex while adolescent nicotine exposure in rodents points to neuronal damage in midbrain, hippocampus, and striatum but not in neocortex. This is in line with a recently published MRS study describing NAA deficits in hippocampus but not in ACC. However, the observed statistical trend towards a smoking effect of mIns/Cre in RFWM may suggest glial alteration ($p = 0.090$ after Bonferroni correction), since NAA/Cre as a potential neuronal marker is not significantly affected and recent imaging studies describe regional alteration of fractional anisotropy (FA) or white matter volume in smokers, while animal experiments of neonatal rat optic nerves describe an irreversible nicotinic receptor dependent conduction block, histologically characterized by profound glial alterations with intact axonal structure.

Interpreting the observed statistical trend for mIns/Cre in RFWM as potential glial alteration of frontal white matter remains speculative until this effect is replicated by other studies. Should other groups be able to observe a similar smoking effect, an a priori nature of this finding might still not be ruled out, although animal models point to a causal relationship between nicotine exposure and neuronal and glial alteration.

WIDMUNG **3**

ABSTRACT **4**

1 EINLEITUNG **8**

1.1 AKTUELLER WISSENSSTAND 8

1.1.1 Epidemiologie *8*

1.1.2 Bestandteile des Tabaks *9*

1.1.3 Nikotinrezeptoren *10*

1.1.4 Kognitive Defizite bei Rauchern *11*

1.1.5 Veränderungen im EEG bei Rauchern *12*

1.1.6 Zerebrale Bildgebung bei Rauchern *13*

1.1.7 Nikotin wirkt neurotoxisch und neuroprotektiv *19*

1.2 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG UND HYPOTHESEN 21

1.2.1 Haupthypothesen *22*

1.2.2 Nebenhypothesen und weitere Fragestellung *23*

2 PROBANDEN UND METHODEN **24**

2.1 AUFBAU EINES MAGNETRESONANZ-TOMOGRAPHEN (MRT) 24

2.2 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER MAGNETRESONANZ-TOMOGRAPHIE 25

2.3 MAGNETRESONANZ-SPEKTROSKOPIE (MRS) 28

2.3.1 Grundlagen der MRS *28*

2.3.2 ^{1}H-NMR-Spektrum des Gehirns in vivo *30*

2.3.3 Sequenzen zur Volumenselektion *30*

2.4 STUDIENDESIGN 32

2.4.1 Ein- und Ausschlusskriterien *32*

2.4.2 Ablauf der Studie *33*

2.4.3 Ablauf der MR-Untersuchung *34*

2.4.4 Die unterschiedlichen Untersuchungsvolumina (Volumes Of Interest (VOI)) *35*

2.5 QUALITÄT DER SPEKTREN 36

2.6 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG ANHAND VON QUOTIENTEN 37

2.7 UNTERSUCHTE METABOLITEN 38

2.7.1 [Creatin] *40*

2.7.2 N-Acetylaspartat (NAA/Cre) *40*

2.7.3 Gesamtcholin (tCho/Cre) *41*

2.7.4 myo-Inositol (mIns/Cre) *41*

2.8 BERECHNUNG DER SPEKTREN MIT LCMODEL 42

2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG 43
2.10 DESKRIPTIVE STATISTIK 44
2.10.1 Gruppencharakteristik 44
2.10.2 Einfluss des Alters auf zerebrale Metaboliten 46
2.10.3 Einfluss des Geschlechts auf zerebrale Metaboliten 48
3 ERGEBNISSE 50
3.1 ABSOLUTES CREATIN 50
3.1.1 Mittelwerte für [Creatin] 50
3.1.2 ANCOVA (analysis of covariance): [Creatin] in ACC, PCC bzw. RFWM 50
3.1.3 I. Haupthypothese 51
3.2 METABOLITENQUOTIENTEN: NAA/CRE, TCHO/CRE, MINS/CRE IN ACC, PCC, RFWM 52
3.2.1 Mittelwerte der Metabolitenquotienten 52
3.2.2 ANCOVA (analysis of covariance) der Metabolitenquotienten 53
3.2.3 II. Haupthypothese 54
3.2.4 III. Haupthypothese 56
3.2.5 Nebenhypothesen und weitere Fragestellungen 57
4 DISKUSSION 60
4.1 KOVARIABLEN – VLTER, GESCHLECHT, ALKOHOLKONSUM 60
4.2 I. HAUPTHYPOTHESE 60
4.3 II. HAUPTHYPOTHESE 61
4.4 III. HAUPTHYPOTHESE 64
4.5 NEBENHYPOTHESEN UND WEITERE FRAGESTELLUNGEN 67
4.5.1 Kortikale Voxel grauer Substanz: tCho/Cre bzw. mIns/Cre in ACC und PCC 67
4.5.2 Weiße Substanz rechtfrontal (RFWM): tCho/Cre bzw. mIns/Cre 70
4.6 LIMITIERUNG DER STUDIE 74
5 ZUSAMMENFASSUNG 76
6 LITERATURVERZEICHNIS 80
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 96
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS 99
DANKSAGUNG 101
LEBENSLAUF 102

1 Einleitung

1.1 Aktueller Wissensstand

1.1.1 Epidemiologie

Laut statistischem Bundesamt beziffert sich der Anteil der aktiven Raucher im Jahr 2005 auf 27 Prozent aller Einwohner der Bundesrepublik mit einem Mindestalter von 15 Jahren (Statistisches Bundesamt, 2006). Dementsprechend belaufen sich Nichtraucheranteil auf 73 Prozent, Nieraucheranteil auf 54 Prozent und Exraucheranteil auf 19 Prozent. In der Altersgruppe der 15- bis 39-Jährigen liegt der prozentuale Anteil der aktiven Raucher über 34 Prozent. Betrachtet man Männer und Frauen separat, sind 32 Prozent der Männer aktive Raucher, bei den Frauen dagegen nur 22 Prozent. 56 Prozent aller Männer gegenüber 36 Prozent aller Frauen hatten zum damaligen Zeitpunkt oder zu einem früheren Zeitpunkt aktiv geraucht; die Ausstiegsquote, entsprechend des Anteils ehemaliger Raucher, liegt bei den Männern mit 24 Prozent deutlich höher als bei den Frauen mit 14 Prozent. Die Wahrscheinlichkeit zu irgendeinem Lebenszeitpunkt aktiver Raucher zu sein ist somit für Männer größer als für Frauen, haben Frauen jedoch erst einmal mit dem Rauchen begonnen, sind ihre Aussichten auf einen erfolgreichen Ausstieg aus der Nikotinabhängigkeit geringer. Zudem beschreibt der Mikrozensus 2005 einen Zusammenhang zwischen Bildungsstand und Raucherstatus: Nur 18 Prozent aller männlichen und 14 Prozent aller weiblichen Akademiker sind aktive Raucher.

Mehr als 90 Prozent aller Raucher beginnen noch in ihrer Jugend mit dem Zigarettenrauchen. Dabei kommt es umso häufiger zur Ausbildung von Nikotinabhängigkeit, je früher mit dem Rauchen begonnen wird (Chen et Millar, 1998, Nelson et al., 1995; Pierce et Gilpin, 1996).

2003 waren 13,4 Prozent (114.647) aller Todesfälle Deutschlands ursächlich auf Zigarettenrauchen zurückzuführen (20,2 Prozent der männlichen gegenüber 7,6 Prozent der weiblichen Todesfälle); die Summe der infolge Zigarettenrauchens verlorenen Lebensjahre soll mehr als 1,5 Millionen betragen (Neubauer et al., 2006). Laut CDC (*Center for Disease Control and Prevention, USA)* stellt Zigarettenrauchen das häufigste vermeidbare Risiko bezüglich eines frühen Todes dar. Jeder fünfte Todesfall in den USA steht in engem kausalen Zusammenhang mit Rauchen (CDC, 1991, 2008). Zigarettenrauchen gilt zudem als Hauptursache der erhöhten Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer, pulmonaler sowie maligner Erkrankungen von

Lunge, Kehlkopf, Speiseröhre, Oropharynx, Blase, Zervix, Pankreas, Nieren u.a. (Haustein, 2008).

Weltweit liegt der Anteil aktiver Zigarettenraucher bei etwa einem Drittel der Gesamtbevölkerung. Während der Anteil aktiver Raucher innerhalb entwickelter Länder in den letzten Jahren und Jahrzehnten rückläufig ist, steigt dieser in Entwicklungsländern jährlich um über 3 Prozent. Laut WHO wird bereits jede dritte Zigarette im westpazifischen Raum geraucht, dort ist der Prozentsatz aktiver Raucher weltweit am größten - fast zwei Drittel der männlichen Bevölkerung raucht, in ländlichen Regionen Kambodschas liegt die Quote sogar über 80 Prozent. Eine Umfrage an Chinesen verdeutlicht die Versäumnisse der öffentlichen Gesundheitspolitik in dieser Region: 60 Prozent der Befragten wissen nicht, dass Rauchen Lungenkrebs verursachen kann und 96 Prozent ist eine Kausalität zwischen Herz-/Kreislauferkrankungen und Rauchen unbekannt (WHO, Regional Office for the Western Pacific, 2002).

1.1.2 Bestandteile des Tabaks

Nikotin stellt nur einen der fast 4800 aus Tabakrauch isolierbaren Inhaltsstoffe dar (Rodgman et al., 2000; Römpp et al., 1996). Während des Rauchens verbrennt der größte Anteil des Nikotins in der Glutzone und im Nebenstromrauch, so dass insgesamt nur 15 bis 20 Prozent des Nikotins die Mundhöhle erreichen. Davon werden nach Inhalation ca. 90 Prozent resorbiert; erfolgt keine Inhalation werden etwa 5 Prozent des Nikotins über die Mundschleimhaut resorbiert. Tabakrauch beinhaltet neben Nikotin zahlreiche weitere Stoffe, bei denen es sich um organische und anorganische Verbindungen in Gas- und/oder Partikelphase (Kondensat) handelt (Ambrose et Barua, 2004; Römpp et al., 1996).

Die im Kondensat enthaltenen Stoffe gelten als besonders schädlich. In der Partikelphase lassen sich freie Radikale in einer Konzentration von etwa 10^{17}/g[Tabakrauch] nachweisen, in der Gasphase liegt die entsprechende Konzentration bei etwa 10^{15}/g[Tabakrauch]. Die freien Radikale der Partikelphase verfügen über Halbwertszeiten von Stunden bis Monaten (Ambrose et Barua, 2004).

Bei der Herstellung von Tabakprodukten werden häufig Stoffe zugesetzt, um Produkteigenschaften wie Abbrennverhalten oder Mindesthaltbarkeit zu verändern. Als weitere Tabakzusätze verstärken Ammoniak, Harnstoff oder Natron die Wirkung des Tabaks und bedingen so

ein noch höheres Abhängigkeitspotential. Zucker und Glykol karamellisieren beim Verbrennungsvorgang und erzeugen einen weicheren Geschmack. Menthol wird auch „mentholfreien“ Zigaretten zugesetzt, um die Schmerzempfindlichkeit der Lunge herabzusetzen. Diesen Effekt kann man auch durch Zusatz von Gewürznelken erreichen. Neben Schellack als Klebemittel werden häufig Lakritze, Kaffee, Konservierungsstoffe, Ammoniumchlorid und weitere Stoffe zugesetzt (Haustein, 2008).

Das Suchtpotential von Tabakprodukten wird hauptsächlich dem Nikotin zugeschrieben, da es auf das dopaminerge Belohnungssystem wirkt und psychoaktive Eigenschaften aufweist (Picciotto et Corrigall, 2002; Pidoplichko et al., 1997). Neben Verhalten und Motivation beeinflusst Nikotin zahlreiche weitere neurophysiologische Vorgänge (Laviolette et van der Kooy, 2004). Aufgrund seiner unmittelbaren Resorption durch die Lungenalveolen erreicht es das Gehirn nur wenige Sekunden nach seiner Inhalation; der kurze Abstand zwischen Reizung der Atemwege und subjektivem Wirkungseintritt spielt verhaltensbiologisch eine bedeutende Rolle (Oldendorf, 1992). Pharmakologisch zählt man Nikotin wie Koffein, Amphetamin oder Kokain zur Gruppe der Stimulanzien. Eine direkte kanzerogene Wirkung konnte für Nikotin bislang nicht nachgewiesen werden. Es wird aber diskutiert, ob Nikotin infolge Interaktion mit nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren biologische Vorgänge deregulieren kann, beispielsweise Angiogenese, Apoptose oder zellvermittelte Immunität (Zeidler et al., 2007).

1.1.3 Nikotinrezeptoren

Acetylcholin-Rezeptoren unterscheiden sich anhand ihrer unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Agonisten oder Antagonisten. Es werden muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) unterschieden. Während es sich bei muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren um metabotrope Rezeptoren handelt, stellen nikotinerge Rezeptoren (Nikotinrezeptoren) ionotrope Rezeptoren dar, also ligandengesteuerte Ionenkanäle (in diesem Fall für Na+, K+ oder Ca2+) (Rogers et Wonnacott, 1997). Der überwiegende Anteil neuronaler Nikotinrezeptoren des Säugerhirns wird vom Subtyp des $\alpha_4\beta_2$-nAChR repräsentiert (Flores et al., 1992; Wonnacott, 1990), α_7-nAChR stellen einen weiteren bedeutenden Subtyp dar (Chen et Patrick, 1997) und werden mit der Symptomatik des Nikotinentzugs in Verbindung gebracht (Markou et Paterson, 2001). $\alpha_4\beta_2$-nAChR weisen eine etwa eintausendfach höhere Affinität gegenüber Nikotin auf als α_7-nAChR (Gotti et al., 1997). Neben Auf-

bau, Lokalisation und Nikotinaffinität unterscheiden sich die Subtypen insbesondere bezüglich ihrer Desensibilisierungs- und Erholungseigenschaften (Kuryatov et al., 2000; Mansvelder et al., 2002; McGehee et al., 1995). In Anwesenheit von Nikotin wird die Anzahl der neuronalen nAChR heraufreguliert, bei längerer Nikotinexposition kommt es zur anhaltenden Rezeptordesensibilisierung, woraus eine Tachyphylaxie resultieren kann. Vareniclin (Champix®) stellt einen selektiven Partialagonisten des $\alpha_4\beta_2$-Nikotinrezeptors dar und wird wie Bupropion zur pharmakologischen Raucherentwöhnung eingesetzt (Coe et al., 2005). Bei Bupropion handelt es sich um ein atypisches Antidepressivum, das bereits im unteren μmolaren Dosisbereich spannungsunabhängig $\alpha_3\beta_2$-, $\alpha_4\beta_2$ und α_7-nAChR hemmt (Slemmer et al., 2000).

Aufgrund ihrer präsynaptischen, postsynaptischen oder präterminalen (am Zellkörper gelegenen) Lokalisation können nAChR unterschiedliche Effekte vermitteln. Durch Bindung an nAChR bahnt Nikotin die Ausschüttung der Neurotransmitter Noradrenalin, Acetylcholin, Serotonin, GABA, Dopamin und β-Endorphin und verursacht somit die Vielfalt und Komplexität seiner ausgelösten Wirkung (Benowitz, 2008).

1.1.4 Kognitive Defizite bei Rauchern

Mehrere Studien beschreiben kognitive Leistungssteigerungen infolge akuter Nikotinapplikation, insbesondere für Konzentration, Erinnerungsvermögen und Arbeitsgedächtnis. Solche Leistungssteigerungen wurden sowohl bei Nichtrauchern, aber auch bei Rauchern mit und ohne gleichzeitige Nikotinkarenz beobachtet (Ernst et al., 2001; Foulds et al., 1996; Kumari et al., 2003; Le Houezec et al., 1994; Perkins et al., 1994; Phillips et Fox, 1998; Pritchard et al., 1992). Allerdings beschreiben nicht alle Studien derart positive Effekte (Hasenfratz et al., 1989; Heishman et al., 1993; Hindmarch et al., 1990; Jacobsen et al., 2006; Keenan et al., 1989; Landers et al., 1992; Petrie et Deary, 1989; Sakurai et Kanazawa, 2002; Spilich et al., 1992).

Am häufigsten zeigten sich schnellere Reaktionszeiten und bessere Gesamtresultate bei Aufgaben mit erhöhten Aufmerksamkeitsanforderungen (Rezvani et Levin, 2001). Auch im Tiermodell konnte nach einmaliger oder dauerhafter Nikotinverabreichung eine verbesserte Leistung von Komponenten des Arbeitsgedächtnisses demonstriert werden (Rezvani et Levin,

2001). Dass nicht alle Studien konsistent positive oder negative Nikotineffekte beschreiben, könnte genetisch bedingt sein: Erst kürzlich beschrieb Jacobsen, dass positiver Trägerstatus für das 957T-Allel des D_2-Rezeptors (Dopaminrezeptor) mit einer nach Nikotinapplikation höheren Fehlerquote beim Lösen von Aufgaben zum verbalen Arbeitsgedächtnis assoziiert ist (Jacobsen et al., 2006).

Jugendliche Raucher (n = 41) zeigen unabhängig vom Zeitpunkt ihrer zuletzt gerauchten Zigarette gegenüber nach Alter, Geschlecht und Bildung vergleichbaren Nierauchern (n = 32) kognitive Defizite ihres Arbeits- und Wortgedächtnisses. Das Ausmaß beobachteter Defizite korreliert positiv mit dem zeitlichen Abstand der zuletzt gerauchten Zigarette. Interessanterweise begannen männliche Raucher dieser Studie signifikant früher mit dem Rauchen als weibliche Raucher und zeigten signifikant größere Aufmerksamkeitsdefizite als Raucherinnen oder Nieraucher. Jacobsen schließt daraus, dass sich ein früherer Rauchbeginn besonders schädlich auswirkt (Jacobsen et al., 2005).

1.1.5 Veränderungen im EEG bei Rauchern

Mehrere elektrophysiologische Untersuchungen beschreiben, dass akuter Nikotin- oder Tabakkonsum im EEG gesteigerte Erregbarkeiten bedingt und Nikotin- oder Tabakentzug gegensätzliche Effekte verursacht. Umstritten ist jedoch, ob gesteigerte Erregbarkeiten Normalisierungen entzugsbedingter Defizite oder darüber hinausgehend Stimulierungen widerspiegeln (Conrin, 1980; Domino, 2003; Knott et al., 1998). Nach akuter Nikotinzufuhr zeigt sich im EEG eine dosisabhängige Verschiebung des Frequenzmusters zugunsten schnellerer α-(7,6 – 12,4 Hz) und β-(12,6 – 26,0 Hz) Frequenzen bei gleichzeitig vermindertem Anteil an δ-(1,0 – 3,4 Hz) Rhythmen, entsprechend einer zunehmenden Desynchronisierung der Aktivität kortikaler Neurone (Domino, 2003; Knott et al., 1998).

Zudem werden für Raucher verminderte Amplituden ereigniskorrelierter P300-Potenziale beschrieben, die sich zum Teil nach Nikotinapplikation wieder normalisieren (Anokhin et al., 2000; McDonough et Warren, 2001; Neuhaus et al., 2006; Polich et Ochoa, 2004). Interessanterweise beobachtet man entsprechende Veränderungen der P300-Komponente auch bei Patienten mit Schizophrenien, eine aktuelle Metaanalyse beschreibt derartige Veränderungen der

P300-Komponente sogar als möglichen Endophänotyp für Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises (Bramon et al., 2005).

Basierend auf Untersuchungsergebnissen mit LORETA (*low resolution brain electromagnetic tomography analysis*) wurde berichtet, dass gesunde Raucher (n = 84) im Gegensatz zu Nikotin-naiven Probanden (n = 110) umschrieben kortikale Aktivierungsdefizite aufweisen, u.a. in ACC (anteriorer Gyrus cinguli) und PFC (präfrontaler Kortex). Vergleichbare Aktivierungsdefizite zeigten sich im ACC auch bei Exrauchern nach einer durchschnittlichen Nikotinabstinenz von 11,9 Jahren (n = 53) (Neuhaus et al., 2006).

1.1.6 Zerebrale Bildgebung bei Rauchern

Im Gegensatz zur Röntgen-Computertomographie ist die Magnetresonanztomographie nicht mit der Belastung durch ionisierende Strahlung verbunden, so dass sich die MRT besonders gut für Untersuchungen gesunder Probanden eignet. Neben der klassischen MR-Bildgebung ermöglicht diese Technologie volumetrische (VBM), spektroskopische (MRS) oder funktionelle (fMRT) Untersuchungen. Weitere Optionen funktioneller Bildgebung bieten PET (Positronen-Emissions-Tomographie) und SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*), im Gegensatz zur MRT allerdings nicht ohne radioaktive Strahlenbelastung.

Mittels PET konnten Konzentrationsunterschiede der zentralen und peripheren Monoamino-Oxidase (MAO) nachgewiesen werden. Konzentrationen von MAO-A und MAO-B sind bei Rauchern bis zu 40 Prozent niedriger als bei Nierauchern oder Exauchern (Fowler et al., 1996, 1998, 2003). Da Monoamino-Oxidasen am Abbau von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin beteiligt sind, wird spekuliert, ob manche Effekte des Zigarettenrauchens hierdurch bedingt sein könnten. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zu dem seit längerem diskutierten und umstrittenen protektiven Effekt des Zigarettenrauchens gegenüber Morbus Parkinson (Quik, 2004).

Die im Folgenden beschriebenen funktionellen Bildgebungsstudien untersuchen akute Nikotineffekte unter Ruhebedingung bzw. kognitiver Beanspruchung bei Rauchern oder Exrauchern und Veränderungen der Hirnaktivität während des gesteigerten Rauchverlangens (*Craving*). Bildgebungsstudien struktureller Veränderungen bei Rauchern werden im Anschluss an

die funktionelle Bildgebung beschrieben, gefolgt von Untersuchungen des zerebralen Metabolitenprofils mittels der ^{1}H-Magnetresonanz-Spektroskopie (^{1}H-MRS).

1.1.6.1 Funktionelle Bildgebung

Für den Zeitraum unmittelbar nach erfolgter Nikotinzufuhr bzw. nach dem Zigarettenrauchen beschreiben mehrere Autoren (Domino et al., 2000; Stapleton et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) unter Ruhebedingungen global erniedrigte Hirnaktivitäten. Eine dieser Studien zeigt regional nach entsprechender Datentransformation relative Aktivitätsanstiege (Domino et al., 2000).

Regionale Veränderungen der Hirnaktivität unmittelbar nach intravenöser Nikotinzufuhr wurden mittels fMRT (BOLD-Kontrast) ohne vorausgehende Nikotinabstinenz untersucht und zeigten sich bei Stein und Kollegen als Aktivitätsanstiege in Teilen aller vier Hirnlappen, sowie in Thalamus, Hypothalamus, Amygdala, Cingulum und einem Teil der Basalganglien (Stein et al., 1998). Unter vergleichbaren Untersuchungsbedingungen konnten Bruhn und Kollegen jedoch keine Aktivitätsanstiege limbischer Regionen beobachten (Bruhn et al., 2003). Untersuchungen der Glukoseverwertung (Domino et al., 2000) bzw. des regionalen Blutflusses (Domino et al., 2000; Zubieta et al., 2001) nach erfolgter Nikotinapplikation wurden mittels PET nach nächtlicher Nikotinabstinenz durchgeführt, Veränderungen ergaben sich dabei insbesondere frontal und okzipital, zum Teil aber auch temporal, in Zerebellum und Thalamus.

Mehrere Studien untersuchen zudem Veränderungen des Aktivierungsmusters unter kognitiver Aufgabenbearbeitung (visuelle Wiedererkennung oder Aufgaben zum Arbeitsgedächtnis) unmittelbar nach oder während intravenöser (Ghatan et al., 1998; Jacobsen et al., 2002), subkutaner (Kumari et al., 2003), transdermaler (Jacobsen et al., 2004; Lawrence et al. 2002) bzw. bukkaler (Ernst et al., 2001) Nikotinapplikation. Aktivitätsanstiege zeigen sich dabei je nach Aufgabentyp oder untersuchter Region in Thalamus (Jacobsen et al., 2002; Lawrence et al., 2002) und visuellem System (Ghatan et al., 1998; Lawrence et al., 2002). Innerhalb des ACC beschreiben Ernst und Ghatan erniedrigte (Ernst et al., 2001; Ghatan et al., 1998), Jacobsen und Kumari gesteigerte Aktivierungen (Jacobsen et al., 2004; Kumari et al., 2003).

Nikotinabhängige Raucher verspüren bereits Minuten nach ihrer zuletzt gerauchten Zigarette erneut den Drang zu Rauchen (*Craving*). Die Intensität des subjektiven Verlangens steigt innerhalb der nächsten drei bis sechs Stunden kontinuierlich an (Schuh et Stitzer, 1995) und kann innerhalb dieses Zeitraums durch Zigaretten-assoziierte Stimuli (*Cues*) verstärkt werden (Carter et Tiffany, 1999). *Cues* spielen in der funktionellen Bildgebung von Abhängigkeitserkrankungen eine wichtige Rolle, da das dadurch ausgelöste oder gesteigerte *Craving* mit messbaren Aktivitätsveränderungen regionaler Hirnstrukturen einhergeht. Funktionelle Untersuchungen des Zigaretten-*Cravings* erfolgten unter *Cue*-Präsentation und stammen von Due (Due et al., 2002), Brody (Brody et al., 2002 , 2004) und Wilson (Wilson et al., 2005). Alle Autoren beschreiben dabei Aktivierungen von Subregionen des präfrontalen Kortex und drei der vier Studien beschreiben Aktivitätsanstiege innerhalb des anterioren Gyrus cinguli (ACC). Dass Due keine gesteigerte Aktivität innerhalb des ACC findet, führt Brody auf methodische Unterschiede hinsichtlich Dauer und Intensität der *Cues* zurück. In einer der Studien wurden auch Raucher unter Bupropionbehandlung untersucht, deren täglicher Zigarettenkonsum vor Behandlungsbeginn bei 27,1 Zigaretten lag und zum Untersuchungzeitpunkt nur 3,7 Zigaretten betrug. Raucher unter Bupropionbehandlung zeigten im Vergleich zu Rauchern ohne Bupropionbehandlung niedrigere *Cravingscores* und geringere Aktivitätsanstiege innerhalb des ACC (Brody et al., 2004).

1.1.6.2 Bildgebung struktureller Veränderungen

Erste Hinweise auf strukturelle Hirnveränderungen, welche mit positivem Raucherstatus assoziiert sind, ergaben sich durch retrospektive Cluster-Analyse kranialer MRT-Bilder, die im Rahmen der *Cardiovascular Health Study* bei älteren Patienten (≥ 65 Jahre) angefertigt wurden. Nach Einteilung in 5 Cluster zeigte sich, dass Probanden innerhalb der Atrophieclusters (n = 891; 18,6 Zigaretten-Packungsjahre) eine signifikant größere Anzahl an Packungsjahren aufweisen als Probanden innerhalb des Normalbefundclusters (n = 981; 14,0 Packungsjahre). Einfache bzw. mehrfache Hirninfarkte sowie prominente Veränderungen der weißen Substanz waren von diesen beiden Clustern ausgeschlossen, da sie den anderen drei Clustern zugeordnet wurden (Longstreth et al., 2001).

2004 zeigte Brody mittels Voxel-basierter Morphometrie hochauflösender MRT-Schichten bei gesunden Rauchern Volumen- und Dichtedefizite grauer Substanz, die über das Maß der

bis dahin beschriebenen Atrophien oder Ventrikelerweiterungen hinausgingen: Signifikant kleinere Volumina grauer Substanz zeigten sich in Subregionen von linkem anterioren Gyrus cinguli (ACC) und bilateralem präfrontalen Kortex (PFC), signifikante Dichteverminderungen in Subregionen von PFC (bilateral) und Kleinhirn (rechts). Die Summe der Packungsjahre korrelierte dabei negativ mit der Dichte grauer Substanz in Subregionen des PFC (Brody et al., 2004).

Gallinat beschrieb 2006 in einer Studie vergleichbaren Studiendesigns (veröffentlicht nach Aufgabenstellung dieser Dissertation) ebenfalls Volumen- und Dichtedefizite bei Rauchern. Volumenverminderungen fanden sich in Subregionen aller vier Hirnlappen, Thalamus und ACC, Dichteverminderungen u.a. in frontalen, temporalen und parietalen Subregionen, sowie in Zerebellum und Insula. Auch hier waren regionale Defizite (frontal, temporal und zerebellär) mit Packungsjahren korreliert (Gallinat et al., 2006).

1.1.6.3 Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS)

Entsprechend der MRT nutzt auch die Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS) das Phänomen der magnetischen Kernresonanz. Infolge ihrer Noninvasivität erlaubt die MRS Gewebsuntersuchungen in vivo und ermöglicht indirekt Aussagen über pathologische Gewebsveränderungen. Häufig sind Veränderungen des Metabolitenprofils früher nachweisbar als strukturelle Auffälligkeiten.

Infolge von geringeren Feldstärken, Magnetfeldinhomogenitäten, Bewegungsartefakten und kürzeren Messzeiten ist die in vivo Protonenspektroskopie (^{1}H-MRS) im Vergleich zur NMR (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*) der analytischen Chemie jedoch durch eine geringere spektrale Auflösung gekennzeichnet, so dass zerebrale MR-Spektren bei 3 Tesla ein typisches Metabolitenprofil zeigen: Am markantesten stellen sich die Singlettresonanzen für Gesamtcreatin (Cre), N-Acetylaspartat (NAA) und Gesamtcholin (tCho) sowie die Pseudosinglettresonanz für myo-Inositol (mIns) dar. Creatin gilt als relativ stabiler Metabolit, so dass quantitative Aussagen bezüglich NAA, tCho und mIns häufig als Quotienten mit Creatin im Nenner getroffen werden: NAA/Cre, tCho/Cre bzw. mIns/Cre. Anhand solcher Quotienten kann der Einfluss interindividueller Unterschiede des Liquoranteils innerhalb entsprechender Untersuchungsvolumina minimiert werden.

1.1.6.3.1 Resonanzen zerebraler MR-Spektren bei 3,0 Tesla.

N-Acetylaspartat (NAA) zeigt innerhalb zerebraler MR-Spektren den prominentesten Peak. NAA wird innerhalb neuronaler Mitochondrien produziert und anschließend entlang neuronaler Axone transportiert (Knizley, 1967). Da sich NAA fast ausschließlich in Neuronen findet, gilt NAA als neuronaler Marker (Bruhn et al., 1989a; Ross et Bluml, 2001).

Das Cholinsignal resultiert hauptsächlich aus Phosphocholin und Glycerophosphocholin, normalerweise tragen Cholin und Acetylcholin nur geringfügig zum Signal bei, ebensowenig Phosphatidylcholin, das trotz seiner hohen Konzentration innerhalb des Myelins infolge seiner Immobilität mittels ^{1}H-MRS kaum detektiert werden kann. Daher unterscheiden sich Cholinkonzentrationen zwischen grauer und weißer Substanz nur geringgradig. Veränderungen der Cholinkonzentrationen können einen Hinweis auf die zelluläre Dichte innerhalb eines Untersuchungsvolumens geben, erhöhte Cholinkonzentrationen können einen erhöhten Membranumsatz andeuten (Bruhn et al., 1989b; Burtscher et Holtås, 2001; Ross et Bluml, 2001). Astrozyten und Oligodendrozyten zeigen gegenüber isolierten Neuronen 20-fach bzw. 4-fach erhöhte intrazelluläre Cholin/Aminosäure-Quotienten (Urenjak et al., 1993).

Myo-Inositol (mIns) als ubiquitärer zyklischer Sechsfachalkoholalkohol wird in der Protonenspektroskopie häufig als Astrozytenmarker interpretiert. Ein erhöhter Anfall von Myelin-Spaltprodukten kann mit erhöhten myo-Inositol-Konzentrationen assoziiert sein (Ross et Bluml, 2001).

Die Resonanz des Gesamtcreatins setzt sich aus Creatin und Phosphocreatin zusammen. Bei Phosphocreatin handelt es sich um einen wichtigen Energiespeicher und Phosphatgruppendonor gegenüber ADP, bei Creatin um eine organische Säure mit zentraler Bedeutung für den Energiemetabolismus. Konzentrationen von Gesamtcreatin verändern sich während der Hirnentwicklung weniger stark als beispielsweise NAA-Konzentrationen und sind in verschiedenen Hirnarealen grauer bzw. weißer Substanz vergleichbar. Bei gesunden Probanden eignet sich Gesamtcreatin als relativ stabile Konzentration daher als Referenzkonzentration, pathologische Veränderungen der Cre-Konzentration zeigen sich bei Hypoxie, Tumoren oder nach Traumen (Bruhn et al., 1989b; Burtscher et Holtås, 2001; Ross et Bluml, 2001).

Glx beinhaltet die gemeinsame Resonanz von Glutamat, Glutamin und GABA, kann aber in physiologischen Konzentrationen anhand gängiger MR-Sequenzen nicht so genau wie Cre, NAA, tCho und mIns quantifiziert werden, da hier gekoppekte Multiplettresonanzen vorlie-

gen. Zudem finden sich weitere gekoppelte Multiplettresonanzen, die sich aber ebenfalls nicht verlässlich genug quantifizieren lassen und daher wie Glx in dieser Dissertation nicht berücksichtigt werden.

1.1.6.3.2 MR-Spektroskopische Untersuchungen bei Rauchern und Nichtrauchern

Eine 1,5 Tesla MRSI (*magnetic resonance spectroscopy imaging)* Untersuchung nichtrauchender und rauchender Alkoholabhängiger zeigte nach einwöchiger Alkoholkarenz bei rauchenden Alkoholabhängigen gegenüber nichtrauchenden Alkoholabhängigen signifikante Erniedrigungen für N-Acetylaspartat (NAA) in frontalen Regionen weißer Substanz sowie für NAA und Gesamtcholin (tCho) im Mesenzephalon (Durazzo et al., 2004). 2006 untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe Konzentrationsveränderungen bei rauchenden und nichtrauchenden Alkoholabhängigen im Längsschnitt, jeweils eine Woche und einen Monat nach Entzugsbeginn von Alkohol. Im Längsschnitt zeigten sich Wiederanstiege für NAA und tCho in verschiedenen Regionen, ein hauptsächlich durch nichtrauchende Alkoholabhängige bedingter Effekt, da sich bei rauchenden Alkoholabhängigen geringere Wiederanstiege zeigten. Adjustierte Alkohol- und Rauchereffekte nach einmonatigem Alkoholentzug wurden mittels Kovarianzanalyse untersucht: Alkoholeffekte ergaben sich für NAA und tCho in der weißen Substanz parietal, Rauchereffekte zeigten sich für NAA in der weißen Substanz frontal und parietal, sowie in der grauen Substanz parietal (Durazzo et al., 2006).

MR-Spektroskopische Unterschiede des Metabolitenprofils *gesunder* Raucher und Nieraucher werden bislang nur von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (Durazzo et al., 2004; Gallinat et Schubert, 2007; Gallinat et al., 2007):

Neben rauchenden und nichtrauchenden Alkoholabhängigen verglichen Durazzo et al. gesunde Raucher mit gesunden Nichtrauchern. Gesunde Raucher und Nichtraucher unterschieden sich im Gegensatz zu rauchenden und nichtrauchenden Alkoholabhängigen innerhalb der weißen Substanz nicht signifikant bezüglich ihrer NAA-Konzentration, dafür zeigten gesunde Raucher gegenüber gesunden Nichtrauchern signifikant erniedrigte Gesamtcholinkonzentrationen innerhalb des Kleinhirnwurms. Neben NAA und Gesamtcholin wurden auch Konzentrationen von Creatin und myo-Inositol bestimmt.

Da Konzentrationen mittels 1,5 Tesla MRSI gemessen wurden, handelt es sich bei dieser Untersuchung nicht wie in unserer Studie um spektroskopische Einzelvolumenmessungen, sondern um Multivoxelmessungen innerhalb jeweils einer Bildebene (*MRS-Imaging*), deren Problem im Vergleich zur Einzelvolumenspektroskopie jedoch eine deutlich geringere Sensitivität ist. Metabolitenkonzentrationen grauer Substanz, weißer Substanz und subkortikaler Areale wurden separat angegeben: Graue Substanz wurde in frontale, parietale und temporale Regionen unterteilt, weiße Substanz dagegen in frontale, temporale, parietale und okzipitale Regionen; subkortikale Areale beinhalten u.a. Thalamus, Mesenzephalon und Kleinhirnwurm. Mit Ausnahme des Gesamtcholins im Kleinhirnwurm unterschieden sich gesunde Raucher und Nichtraucher in keiner sonstigen Region signifikant bezüglich ihrer gemessenen Metabolitenkonzentration (Durazzo et al., 2004).

Bei Gallinat zeigten gesunde Raucher signifikant erniedrigte NAA-Konzentrationen innerhalb des Hippocampus, nicht jedoch im ACC. Weder Creatin noch Gesamtcholin unterschieden sich in Hippocampus oder ACC signifikant zwischen Rauchern und Nierauchern, myo-Inositol wurde aufgrund der längeren Echozeit (TE = 80ms) im Gegensatz zu unserer Studie (TE = 30ms) nicht untersucht. Im Gegensatz zu Durazzos Untersuchung gesunder Raucher und Nichtraucher handelte es sich bei dieser Untersuchung um MRS-Einzelvolumenuntersuchungen zweier Untersuchungsregionen bei 3,0 Tesla (Veröffentlichung erfolgte nach Aufgabenstellung dieser Dissertation, Gallinat et al., 2007).

1.1.7 Nikotin wirkt neurotoxisch und neuroprotektiv

Insbesondere während der embryonalen Entwicklung und in der Adoleszenz zeigt Nikotin im Rattenmodell neurotoxische Effekte (Trauth et al., 1999, 2000; Xu et al., 2001). Aber auch an adulten Ratten konnten neurotoxische Effekte in Gestalt verringerter Purkinjezellzahlen zerebellärer Subregionen nachgewiesen werden (Chen et al., 2003). In Zellkulturen kommt es bei Vorläuferzellen der hippokampalen Formation unter Nikotinexposition zu erhöhten Apoptoseraten (Berger et al., 1998). Rattenföten, denen man kontinuierlich Nikotin in Raucherüblichen Konzentrationen verabreicht, zeigen weniger Projektionen und verminderte Aktivitäten der unterschiedlichen Transmittersysteme für Noradrenalin, Acetylcholin, Dopamin oder Serotonin (Slotkin 1998; Xu et al., 2001).

Potentiell neuroprotektive Effekte werden von Yamashita, Maggio, Kaneko u.a. beschrieben (Kaneko et al., 1997; Maggio et al., 1997, 1998; Yamashita et Nakamura, 1996), beispielsweise via α_7-nAChR als Schutz gegenüber glutamaterger Exzitotoxizität (Kaneko et al., 1997) oder β-Amyloid verstärkter glutamaterger Exzitotoxizität (Kihara et al., 2001; Shimohama et Kihara, 2001). Epidemiologische Untersuchungen beschreiben zudem eine negative Assoziation zwischen Zigarettenrauchen und der Prävalenz von Morbus Parkinson, teils auch bezüglich der Prävalenz von Morbus Alzheimer (Picciotto et Zoli, 2008; Quik, 2004).

Kontinuierliche Nikotininfusionen führen sowohl bei adoleszenten wie bei adulten Ratten zu einer vermehrten Expression nikotinerger Acetylcholinrezeptoren: Bei adoleszenten Ratten zeigen sich dabei keine regionalen Unterschiede, bei adulten Ratten folgt die Heraufregulation der nAChR einer regionalen Hierarchie: am ausgeprägtesten im Hippokampus, gefolgt von zerebralem Kortex und Mesenzephalon. Selbst einen Monat nach Beendigung der Infusion ist bei adoleszenten Ratten die Expression von Nikotinrezeptoren noch signifikant gesteigert (Trauth et al., 1999). Regionale und entwicklungsassoziierte Unterschiede der Expression nikotinerger Acetylcholinrezeptoren erlauben bislang allerdings keine vereinfachende Aussage bezüglich neurotoxischer oder neuroprotektiver Effekte. Dennoch suggeriert die bei adoleszenten Ratten unspezifischere Heraufregulation der nAChR eine während der Adoleszenz gesteigerte Vulnerabilität gegenüber Nikotinexposition.

1.2 Herleitung der Aufgabenstellung und Hypothesen

Die für Raucher unter 1.1.6 beschriebenen zerebralen Abnormalitäten struktureller und funktioneller Bildgebungsstudien lassen ebenso, wie die unter 1.1.4 und 1.1.5 für Raucher und Exraucher beschriebenen kognitiven und elektrophysiologischen Alterationen vermuten, dass regelmäßiges Zigarettenrauchen mit molekularen Veränderungen des zerebralen Metabolitenprofils bestimmter Hirnregionen assoziiert ist.

Kognitive, neurophysiologische, strukturelle und funktionelle Untersuchungen beschreiben bei Rauchern überdurchschnittlich häufig Unterschiede der Funktion oder Struktur des ACC (anteriorer Gyrus cinguli), weshalb dieser als eines von drei zu untersuchenden Untersuchungsvolumina (*voxel of interest,* VOI) ausgewählt wurde.

Eine entsprechende Evidenz bezüglich struktureller oder funktioneller Auffälligkeiten des PCC (posteriorer Gyrus cinguli) liegt für Raucher zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung nicht vor, weshalb dieser als Vergleichsvolumen für den ACC ausgewählt wurde, um ACC-spezifische Alterationen von globaleren Veränderungen des kortikalen Metabolitenprofils zu differenzieren.

Die einzige zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung veröffentlichte ^{1}H-spektroskopische MR-Untersuchung eines gesunden Raucher- und Nichtraucherkollektivs bezieht sich auf eine MRSI-Untersuchung von Durazzo und Kollegen bei 1,5 Tesla (Durazzo et al., 2004). Die Echozeit von 144ms, deutlich kleinere Untersuchungsvolumina und die gewählte Feldstärke von 1,5 Tesla trugen jedoch zur Datenungenauigkeit bei, weshalb Probanden unserer Studie mittels Einzelvolumenspektroskopie bei einer Echozeit von 30ms und der Feldstärke von 3,0 Tesla untersucht werden. In der entsprechenden Studie verglich Durazzo alkoholabhängige Raucher, alkoholabhängige Nichtraucher, gesunde Raucher und gesunde Nichtraucher, wobei sich gesunde Raucher und Nichtraucher signifikant bezüglich ihrer Gesamtcholinkonzentration innerhalb des Kleinhirnwurms unterschieden (Raucher zeigten erniedrigte Konzentrationen), nicht aber bezüglich ihrer Metabolitenkonzentrationen innerhalb der weißen Substanz. Demgegenüber unterschieden sich rauchende und nichtrauchende alkoholabhängige Patienten nach jeweils einwöchiger Alkoholabstinenz signifikant bezüglich ihrer NAA-Konzentrationen innerhalb der frontalen weißen Substanz und bezüglich NAA und Gesamtcholin innerhalb des Mesenzephalons. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die weiße Substanz rechtsfrontal (RFWM) als drittes VOI ausgewählt.

1.2.1 Haupthypothesen

I. Creatin gilt als relativ konzentrationsstabiler Metabolit, da Gesamtcreatin-Konzentrationen während der Hirnentwicklung weniger stark variieren und physiologische Konzentrationen innerhalb verschiedener Hirnareale grauer bzw. weißer Substanz vergleichbar sind. Daher wird hypothetisiert, dass sich absolute Creatin-Konzentrationen zwischen Rauchern und Nierauchern nicht signifikant unterscheiden würden. Träfe diese Hypothese zu, könnten quantitative Aussagen zu NAA, tCho und mIns anhand von Quotienten mit Creatin im Nenner getroffen werden, um mögliche interindividuelle Unterschiede des Liquorgehalts der entsprechenden VOI (volumes of interests) auszuschließen.

II. Raucher-assoziierte zerebrale Alterationen zeigen sich insbesondere bezüglich des ACC als kognitive, elektrophysiologische, funktionelle und strukturelle Defizite und lassen sich bei Exrauchern zum Teil noch nach jahrelanger Nikotinabstinenz nachweisen. Daraus entsteht die Vermutung, dass sich mittels ^{1}H-MRS innerhalb des ACC Veränderungen des zerebralen Metabolitenprofils nachweisen lassen könnten. Da 90 Prozent der Raucher während ihrer Adoleszenz mit dem Rauchen beginnen und Tierversuche insbesondere während der Fötalzeit und Adoleszenz neurotoxische Nikotineffekte beschreiben, wird hypothetisiert, dass sich innerhalb des ACC signifikante Defizite für NAA finden würden, die sich im PCC als nicht signifikant oder zumindest weniger deutlich ausgeprägt erweisen würden.

III. Dass sich bei alkoholabhängigen Rauchern gegenüber alkoholabhängigen Nichtrauchern in Querschnitts- und Längsschnittsuntersuchungen nach jeweils einwöchiger Alkoholabstinenz NAA-Defizite innerhalb der frontalen weißen Substanz zeigten, welche sich in einer Querschnittsuntersuchung gesunder Raucher und Nichtraucher bislang nicht nachweisen ließen, führt zur dritten Hypothese, dass sich NAA innerhalb von RFWM (rechtsfrontale weißer Substanz) zwischen gesunden Rauchern und Nierauchern nicht signifikant unterscheiden würden.

1.2.2 Nebenhypothesen und weitere Fragestellung

Neben NAA/Cre sollen Raucher und Nieraucher sekundär auf signifikante Unterschiede der Gewebsspiegel von tCho/Cre (Gesamtcholin) bzw. mIns/Cre (myo-Inositol) untersucht werden (Post-hoc):

- Sollten sich bei Rauchern kortikal in ACC oder PCC signifikante Defizite oder signifikant erhöhte Metabolitenspiegel für tCho/Cre oder mIns/Cre zeigen, wird analog der zweiten Haupthypothese postuliert, dass Rauchereffekte innerhalb des ACC deutlicher ausfallen als innerhalb des PCC.

- Innerhalb der weißen Substanz soll weiterhin untersucht werden, ob sich die Gewebsspiegel von tCho/Cre oder mIns/Cre zwischen Rauchern und Nierauchern signifikant unterscheiden.

- Innerhalb des Raucherkollektivs sollen NAA/Cre-Gewebsspiegel innerhalb des ACC auf Korrelationen mit der Anzahl täglich gerauchter Zigaretten (gemessen in Packungsjahren) und Alter bei Rauchbeginn untersucht werden. Weitere Korrelationen zwischen Packungsjahren, täglicher Anzahl gerauchter Zigaretten bzw. Alter bei Rauchbeginn und Metabolitenquotienten werden für Metaboliten untersucht, welche signifikante Rauchereffekte zeigen.

2 Probanden und Methoden

2.1 Aufbau eines Magnetresonanz-Tomographen (MRT)

Ein MRT koordiniert *drei* Magnetfelder:

- *Hauptmagnetfeld*, als statisches Magnetfeld B_0 bezeichnet und vom Hauptmagneten erzeugt
- *Hochfrequenz-Feld*, als dynamisches Magnetfeld B_1 bezeichnet und vom Hochfrequenzsystem erzeugt
- *Gradientenfeld*, vom Gradientensystem erzeugt (überlagert das statische Magnetfeld B_0 um ΔG)

Komponenten eines MRT

- Hauptmagnet (zumeist supraleitender Magnet)
- Hochfrequenzsystem (Senderspule, Hochfrequenz-Verstärker, Empfangsspule, Vorverstärker), die Frequenz hängt dabei vom untersuchten Kern (z.B. ^1H) ab
- Gradientensystem (drei zueinander orthogonale Gradientenspulen mit je einem Verstärker, welche durch den Gradientencontroller koordiniert werden)
- Steuercomputer mit Pulssequenzgenerator, Rekonstruktionscomputer und Hauptcomputer

Der Magnet erzeugt das statische Hauptmagnetfeld B_0. Statisch bedeutet in diesem Zusammenhang zeitlich konstant. Die Magnetfeldstärke eines Magnetresonanz-Tomographen bestimmt in erster Linie das Signal-zu-Rauschverhältnis (SNR), welches mit ansteigender Feldstärke proportional ansteigt und zur verbesserten Bildqualität führt. Der Magnet gehört zu den teuersten Bestandteilen eines MRT.

Das Gradientensystem besteht aus drei separaten Gradientenspulen mit jeweils einem Verstärker. Entsprechend eines dreidimensionalen Koordinatensystems stehen diese orthogonal zueinander und entsprechen den Raumrichtungen x, y und z. Kombiniert man Gradienten untereinander, kann man schräge Gradientenfelder erzeugen. Das Isozentrum eines MRT ent-

spricht dabei dem Schnittpunkt aller drei Raumachsen, so dass an diesem Punkt kein Gradient erzeugt wird. Gradientenspulen sind fester Bestandteil des Tomographen und weitgehend für das charakteristische Klopfen während der Untersuchung verantwortlich.

Die Hauptfunktion des Hochfrequenzsystems besteht in der Aussendung von Hochfrequenzimpulsen zur Anregung des Spin-Systems und in der Detektion des Magnetresonanzsignals. Da die Larmorfrequenz für ^{1}H bei 3,0 Tesla mit 128 MHz im Bereich von Rundfunkfrequenzen liegt und das detektierbare Magnetresonanzsignal relativ schwach ist, muss ein MRT in einem gut abgeschirmten Raum installiert werden, um Störstrahlungen von außerhalb des Untersuchungsraumes zu vermeiden. Besonders wichtige Bestandteile des Hochfrequenzsystems sind neben Analog-Digital-Wandlern, Radiofrequenz-Synthesizer, Mixer, Splitter und Sende-Empfangsschalter vor allem ein leistungsfähiger Hochfrequenzsender mit Verstärker sowie ein Hochfrequenzempfänger mit hochempfindlichem Vorverstärker (Edelman, 2005).

2.2 Physikalische Grundlagen der Magnetresonanz-Tomographie

Intrinsischer Spin

Atomkerne bestehen aus Nukleonen, also aus Protonen und Neutronen. Ausnahme dieser Regel ist der ^{1}H-Kern, da dieser aus nur einem Proton besteht. Nukleonen verfügen über eine physikalische Eigenschaft, die man als intrinsischen Spin bezeichnet: Sie drehen sich um sich selbst. Die Größe des Spins ist dabei konstant und hängt vom untersuchten Isotop ab. Zusätzlich zur Eigenschaft des intrinsischen Spins verfügen Nukleonen über einen Drehimpuls, d.h. sie verfügen über relativ konstante Rotationsachsen. Rotiert ein Nukleon, resultiert daher ein zur Rotationsebene orthogonales magnetisches Moment. Dieses magnetische Moment verhält sich in einem Magnetfeld wie ein kleiner Magnet und wird auch als mikroskopische Magnetisierung bezeichnet.

Statisches Magnetfeld B_0

Kommt kein künstlich erzeugtes äußeres Magnetfeld zur Anwendung beträgt die makroskopische Nettomagnetisierung entsprechend des Summenvektors einzelner magnetischer Momente praktisch Null, da die Ausrichtung der Vektoren infolge des thermodynamischen Gleich-

gewichts zufällig erfolgt. Kommt ein statisches, also über die Zeit konstantes, externes Magnetfeld B_0 zum Einsatz, nimmt die makroskopische Magnetisierung dagegen mit steigender Feldstärke zu: Während sich die einzelnen magnetischen Momente parallel zu B_0 ausrichten, vollführen sie Kreisbahnen um B_0 mit unterschiedlicher Auslenkung, bedingt durch Wechselwirkungen von externem Magnetfeld und Drehmomenten. Diese Kreisbewegung um die Achse B_0 bezeichnet man als Präzession, die Geschwindigkeit dieser Kreisbewegung als Präzessionsfrequenz oder Larmorfrequenz ω_0.

Aus der Larmorgleichung

$$\boldsymbol{\omega_0 = \gamma \cdot B_0}$$

geht hervor, dass Veränderungen der Feldstärke B_0 zu direkt proportionalen Veränderungen der Larmorfrequenz führen, da es sich bei γ um eine kernspezifische Konstante handelt. Jedes Isotop besitzt ein bestimmtes gyromagnetisches Verhältnis γ, das sich aus der Größe von Spins und magnetischem Moment berechnen lässt. ^1H besitzt ein relativ großes gyromagnetisches Verhältnis von 42,58 MHz/T.

Dynamisches Magnetfeld B_1

Die zur Anregung magnetischer Momente notwendige Resonanzfrequenz wird durch Hochfrequenz-Impulse appliziert. Infolge Applikation einer Wechselspannung innerhalb der Hochfrequenz-Spule kommt es zum richtungswechselnden Ladungsfluss und somit zur Erzeugung des dynamischen (also über die Zeit *in*konstanten) Magnetfelds B_1. Die Leistung des HF-Impulses bedingt die Abkippung der Längsmagnetisierung um einen bestimmten Winkel, der als Kippwinkel (engl. *flip angle*) bezeichnet wird.

Resonanzbedingung

Die Resonanzbedingung gilt als erfüllt, wenn die Präzessionsfrequenz mit der vom Hochfrequenz-System orthogonal ausgesandten Radiofrequenz identisch ist und ist Voraussetzung für den Übergang eines magnetischen Moments in seinen energiereicheren Quantenzustand. Magnetische Momente können in einem energiereicheren und einem energieärmeren Quantenzustand vorliegen, was als parallele oder antiparallele Ausrichtung aufgefasst werden kann.

Magnetresonanz-Signal

Die aus einem Anregungsimpuls resultierende Quermagnetisierung M_{xy} präzediert dabei mit der entsprechenden Larmorfrequenz um die Achse des statischen Magnetfelds B_0. Folge ist ein sich über die Zeit veränderndes Magnetfeld, das in einer Spule eine Spannung induziert. Je näher die Spannung dabei am Probanden detektiert wird, umso besser ist das erhaltene Signal.

Das Signal, welches sich direkt im Anschluss an einen HF-Impuls messen lässt und welches der um B_0 präzedierenden transversalen Magnetisierung entspricht, wird als freier Induktionszerfall (FID, engl. *free induction decay*) bezeichnet. Da man B_1 nur kurzzeitig appliziert, führt dies dazu, dass die gemessene Magnetisierung der Transversalebene infolge Phasendispersion entsprechend einer Exponentialfunktion rückläufig ist, während sich die Längsmagnetisierung wieder erholt. Die Erholung der Längsmagnetisierung bezeichnet man als T_1-Relaxation (Spin-Gitter-Wechselwirkung), die transversale Relaxation entsprechend des Rückgangs der Quermagnetisierung als T_2-Relaxation (Spin-Spin-Wechselwirkung).

T1-Relaxation und T2-Relaxation

Die longitudinale Relaxation wird auch Spin-Gitter-Relaxation genannt, da hierbei Energie vom Spin-System an die molekulare Umgebung abgegeben wird, welche als Gitter aufgefasst werden kann. Analog zur longitudinalen Relaxation bezeichnet man die transversale Relaxation als Spin-Spin Relaxation, da der Energieaustausch hierbei unter den einzelnen magnetischen Momenten selbst erfolgt und keine Energie an die Umgebung abgegeben wird. Longitudinale und transversale Relaxation erfolgen exponentiell. Aufgrund gewebsspezifischer Werte bezüglich T_1-Relaxation und T_2-Relaxation ergibt sich die Möglichkeit Gewebe anhand spezifischer Relaxationseigenschaften zu differenzieren: Da die T_1-Relaxationszeit den Anteil der Längsmagnetisierung bestimmt, der für eine wiederholte Anregung des Spin-Systems zur Verfügung steht und T_1 gewebsspezifisch ist, lassen sich durch Wahl kurzer Repetitionszeiten (TR) Gewebe mit kürzeren und längeren T_1-Relaxationszeiten unterschiedlich gewichten. Wählt man längere Echozeiten (TE), gewichtet man Gewebe mit längerer T_2-Relaxation stärker als solche mit kürzeren T_2-Relaxationszeiten.

Gradienten

Voraussetzung für das Darstellen von Schnittbildern mit dem MRT ist neben der Applikation des statischen und des dynamischen Magnetfelds der Einsatz von Gradienten in x-, y- und z-Richtung (Lauterbur, 1973). Will man ein schichtselektives Signal erhalten, muss man die Feldstärke innerhalb des Tomographen graduell so verändern, dass der HF-Impuls ausschließlich die Schicht anregt, deren Feldstärke der Larmorfrequenz des HF-Impulses entspricht. Entscheidet man sich beispielsweise für die Darstellung eines Transversalschnitts verläuft der Schichtselektionsgradient entlang der z-Richtung. Zwei weitere Gradienten stehen entlang der x- und y-Richtung zur Verfügung, und werden für die Ortskodierung genutzt. Meist entspricht der x-Gradient der frequenzkodierenden Information des MR-Signals während der y-Gradient die Phasenkodierung übernimmt. Sowohl x-Gradient, als auch y-Gradient werden dann erst nach dem HF-Puls appliziert.

Fourier-Transformation

Fourier-Transformationen sind für die Magnetresonanz-Tomographie und die Magnetresonanz-Spektroskopie von großer Bedeutung: Sie ermöglichen die Transformation eines in der Zeitdomäne kodierten Signals in die Frequenzdomäne und bei Bedarf auch umgekehrt (inverse FT) (Edelman, 2005).

2.3 Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS)

2.3.1 Grundlagen der MRS

Zahlreiche Phänomene der MRS (beziehungsweise der MRT) lassen sich anhand der folgenden Larmorgleichung veranschaulichen:

$$\nu_0 = \gamma / 2 \pi \cdot B_0$$

Anders ausgedrückt besagt diese Gleichung, dass ein Spin eines bestimmten gyromagnetischen Verhältnisses γ innerhalb eines Magnetfelds mit der Feldstärke B_0 Radiowellen der Frequenz ν_0 empfangen und aussenden kann. ν_0 wird deshalb auch als Resonanzfrequenz bezeichnet. Zudem wird an obiger Gleichung deutlich, dass die Resonanzfrequenz ν_0 sowohl von der Stärke des Magnetfelds als auch vom gyromagnetischen Verhältnis γ abhängt. Da das

gyromagnetische Verhältnis für die ^{1}H-MRS einen konstanten Wert darstellt (42,58 MHz/T), hängt die Resonanzfrequenz direkt von der Feldstärke B innerhalb des Magnetfelds ab. Schreibt man die Larmorgleichung wie folgt

$$(\nu \pm \Delta\nu) = \gamma / 2\pi \cdot (B \pm \Delta B)$$

wird deutlich, dass die Veränderung der Feldstärke $B + \Delta B$ eine messbare Veränderung der Resonanzfrequenz $\nu + \Delta\nu$ nach sich zieht.

Veränderungen der Feldstärke können Folge zweier Mechanismen sein:

1. Gradienten erzeugen eine Überlagerung des statischen Magnetfelds B_0. Aufgrund der Veränderungen der Feldstärke B entlang des Gradienten um ΔB, verändert sich auch die Resonanzfrequenz ν um $\Delta\nu$. Diesen Effekt nutzt man in der MRS zur Definition des Untersuchungsvolumens (engl. VOI, *voxel of interest*).
2. Chemische Verschiebung (engl. *Chemical Shift*): Kovalente Bindungen innerhalb eines Moleküls sind durch gemeinsame Elektronenpaare zweier Atomkerne bedingt. Elektronenpaare schirmen das Magnetfeld ab, so dass deren Atomkerne schwächeren Feldstärken ausgesetzt sind. Die Elektronenverteilung ist allerdings infolge unterschiedlicher Elektronegativitäten der verschiedenen Elemente ungleich. Dies führt dazu, dass ein Proton innerhalb einer Methylgruppe deutlich besser abgeschirmt wird als ein Proton, das an ein C-Atom gebunden ist, welches über eine Doppelbindung mit O verfügt. Derartige Unterschiede des Abschirmungsverhaltens führen zu Verschiebungen der Resonanzfrequenzen.

Man kann die Larmorgleichung um die Abschirmungskonstante σ erweitern:

$$\nu = \gamma / 2\pi \cdot B_0 (1 - \sigma)$$

Schirmen Elektronen einen Atomkern wirksam ab, ist der Frequenzwert für σ relativ groß und die Resonanzfrequenz entsprechend kleiner. Ist σ jedoch mangels abschirmender Elektronen relativ klein ist die Resonanzfrequenz entsprechend größer. In Relation zur Gesamtfeldstärke sind charakteristische Veränderungen der Feldstärke jedoch so gering, dass sie in *parts per million* (ppm) angegeben werden. Für diese Einheit entschied man sich unter anderem aufgrund der besseren Vergleichbarkeit von Spektren unterschiedlich starker Magneten: Wasserstoffkerne der Methylgruppe des NAA finden sich im MR-Spektrum der Protonenspektroskopie bei 2,0 ppm, egal ob das Spektrum bei 1,5 Tesla oder 3,0 Tesla aufgenommen wurde.

Die Einführung der *Fourier-Transformation* (FT) in das Feld der Magnetresonanz-Spektroskopie ermöglichte deutlich effizientere Messvorgänge als die bis dato übliche *Continuous-Wave*-Methode: Anstatt, wie vor Einführung der FT üblich, Signale in ihrer Frequenzdomäne zu messen und somit Einzelmessungen mit kontinuierlich ansteigenden Frequenzen durchführen zu müssen, kann bereits eine einzige Messung des Signals in der Zeitdomäne die Darstellung der beteiligten Frequenzen liefern, wenn das gemessene Signal anschließend mittels FT von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne umgewandelt wird. Ein qualitativ hochwertiges Spektrum erhält man jedoch erst nach Mittelung mehrerer Spinechos. (Edelman, 2005)

2.3.2 ^{1}H-NMR-Spektrum des Gehirns in vivo

Da die chemische Verschiebung der ^{1}H-Atome an bestimmten Orten eines Moleküls unter identischen Untersuchungsbedingungen konstant ist und 0 ppm einer Referenzsubstanz zugeordnet wird, identifiziert die x-Achse chemische Gruppen bestimmter Metabolite oder gibt zumindest Auskunft über die nähere Auswahl potentieller Kandidaten. Bei näherer Betrachtung des Spektrums stellt man fest, dass die Ordinate nicht weiter bezeichnet ist. Dies deutet bereits die Komplexität der absoluten Quantifizierung an und ist unter anderem durch die mehrfache und teils beliebige elektronische Verstärkung der Spannung des detektierten Magnetresonanzsignals bedingt. Zudem muss man berücksichtigen, dass bestimmte Resonanzen das Signal mehrerer ^{1}H-Atome desselben Moleküls (beispielsweise tCho) oder Protonen anderer Moleküle enthalten und dass bestimmte Metaboliten über mehr als eine Resonanz verfügen.

2.3.3 Sequenzen zur Volumenselektion

Als häufigste Sequenzen kommen in der Einzelvolumen-^{1}H-MRS PRESS (*Point Resolved Spectroscopy*) und STEAM (*Stimulated Echo Acquisition Mode*) zur Anwendung. Die Spektren dieser Untersuchung wurden mittels PRESS gemessen. PRESS und STEAM haben gemeinsam, dass drei aufeinanderfolgende Hochfrequenzimpulse das VOI definieren und zum detektierbaren Signal führen. Die beiden Sequenzen unterscheiden sich hauptsächlich durch

die Orientierung ihrer HF-Impulse. Mittels STEAM detektiert man das stimulierte Echo, welches man nach drei aufeinander folgenden HF-Impulsen von exakt 90° erhält. Das stimulierte Echo verfügt dabei über eine maximale Amplitude von 50 Prozent des theoretisch erreichbaren Spinechos. Hierin kann man einen Nachteil von STEAM gegenüber PRESS sehen. Andererseits sind mit STEAM kürzere Echozeiten möglich (bis ca. 10ms) als mit PRESS (meist ≥ 30ms), was zu einer geringeren T2-Wichtung und zu einem SNR-Anstieg führt. Zudem hat STEAM Vorteile bei der Darstellung gekoppelter Resonanzen und der genaueren Ortscodierung des VOI.

Point Resolved Spectroscopy (PRESS)

Das reformierte Spinecho stellt das zweite Spinecho eines doppelten Spinechos dar und wird als Signal der PRESS-Sequenz detektiert. Die Gradienten der einzelnen HF-Impulse richten sich dabei wie folgt aus:

90°-180°-180°

Der erste HF-Impuls (90°) verlagert die Längsmagnetisierung in die Transversalebene. Aufgrund der folgenden 180° HF-Impulse bleibt sie dies bis zur Formierung des zweiten Spinechos. Um ein dreidimensionales Volumen entsprechend des gewünschten VOI zu messen, werden drei zueinander orthogonale Schichten angeregt.

Das maximal detektierbare Signal des zweiten Spinechos unterliegt natürlich auch T_2–Prozessen, weshalb die PRESS-Sequenz so kurz wie möglich gestaltet werden sollte. Will man von dem intrinsisch höheren SNR des PRESS-Signals profitieren, muss man jedoch (wie bei dieser Untersuchung erfolgt) kurze Echozeiten realisieren und über moderne, für PRESS geeignete Gradientensysteme verfügen, da hiervon die Genauigkeit der 180°-HF-Impulse abhängt.

2.4 Studiendesign

2.4.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

Alter: 18 bis 75 Jahre

Geschlecht: männliche oder weibliche Probanden

Raucherstatus: Raucher (regelmäßig mindestens 1 Zigarette pro Tag) oder Nieraucher (nicht mehr als 5 Zigaretten im gesamten Leben)

Händigkeit: Rechtshänder

Einverständniserklärung: schriftliches Einverständnis durch die Probanden nach detaillierter Aufklärung über die Studie und Beantwortung offener Fragen (*written informed consent*)

Ausschlusskriterien:

Alter: jünger als 18 Lebensjahre oder älter als 75 Lebensjahre

Anamnestisch: aktuell oder früher neurologische Erkrankung; aktuell oder früher psychiatrische Erkrankungen/Auffälligkeiten (erfragt mittels M.I.N.I. (Sheehan et al., 1998) und strukturiertem Telefoninterview); aktuell somatische Erkrankung; regelmäßige Medikamenteneinnahme oder Medikamenteneinnahme innerhalb der letzten sieben Tage vor der spektroskopischen Untersuchung; Abhängigkeitserkrankungen außer Nikotinabhängigkeit; Exraucher; Gelegenheitsraucher (weniger als 1 Zigarette pro Tag aber mehr als 5 Zigaretten in der gesamten Vorgeschichte); Drogenkonsum; durchschnittlicher Alkoholkonsum > 1 Drinkäquivalent pro Tag (1 Drinkäquivalent entspricht 13g Ethanol); Zustand nach Schädelhirntrauma oder Bewusstlosigkeit länger als 60 Minuten; ungenügende Deutschkenntnisse; positive Familienanamnese (Blutsverwandte 1. Grades) bezüglich Depression, Schizophrenie und anderen Psychosen, bipolaren Störungen, Angststörungen, Phobien, Alkoholabhängigkeit, Polytoxikomanie, ADHD, Zwangserkrankungen, Suizidalität, Essstörungen, Migräne, Epilepsie, Demenzerkrankungen oder Enzephalomyelitis disseminata.

MRT-assoziiert: Eisenstaub-haltige Tätowierungen, Metallimplantate im Kopfbereich mit Ausnahme von Titan oder Platin, potenzielle Schwangerschaft, Platzangst oder Beklemmung in engen Räumen, Herzschrittmacher, Cochleaimplantat o.ä.

Drop-Out: Strukturelle Auffälligkeiten in den angefertigten MR-Bildern; Artefakte auch nach Wiederholung des Spektrums; FWHM (*full width at half maximum*) der Wasserresonanz < 10 Hz (entsprechend 0,07 ppm).

2.4.2 Ablauf der Studie

35 Probanden (12 Raucher und 23 Nieraucher) wurden über Annoncen in regionalen Tageszeitungen rekrutiert. Potentielle Kandidaten konnten ihre Kontaktdaten auf einem Anrufbeantworter hinterlassen oder sich im Zeitfenster von 18:00 bis 22:00 Uhr innerhalb einer Woche nach Anzeigenschaltung persönlich um die Studienteilnahme bewerben. Probanden, welche ihre Telefonnummer auf dem Anrufbeantworter hinterließen, wurden innerhalb einer Woche zurückgerufen.

Die Eignung bezüglich einer Studienteilnahme wurde zunächst anhand strukturierter Telefoninterviews überprüft. Vor Durchführung der MRT-Untersuchungen wurden Patienten anhand des *Mini-International Neuropsychiatric Interview* (M.I.N.I. - Sheehan et al., 1998) ausführlich bezüglich neuropsychiatrischer Erkrankungen befragt. Erfolgte insofern kein Ausschluss und lagen keine anderen Ausschlusskriterien vor, konnten die Probanden in die Studie eingeschlossen werden, nachdem sie zuvor ausführlich über die Studie informiert worden waren und ihr schriftliches Einverständnis abgegeben hatten. Ablauf und Aufklärung der Studie waren zuvor von der Ethikkommission des Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin als ethisch unbedenklich bescheinigt worden. Nach Durchführung aller Untersuchungen erhielten die Probanden eine Aufwandsentschädigung von 40 Euro. Im Rahmen der Studie nahmen Probanden an einem anderen Tag auch an einer EEG-Untersuchung teil. Die Probanden hatten jederzeit die Option, ihre Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen vorzeitig zu beenden.

Während der gesamten Studie war es den Probanden gestattet, ihre bisherigen Rauchgewohnheiten ohne Einschränkungen bis zum Beginn der Untersuchungen beizubehalten. Während der Untersuchungen war das Rauchen jedoch nicht gestattet. Die Probanden wurden weiterhin instruiert, 24 Stunden vor den Untersuchungsterminen keinen Alkohol zu trinken und an Untersuchungstagen nicht mehr als eine Tasse Kaffee zu trinken.

Zwei Probanden wurden infolge *Drop-Outs* nicht in die statistische Analyse miteinbezogen. Dabei handelte es sich um einen Raucher und eine Nieraucherin. Die Nieraucherin zeigte nach wiederholter Spektrenmessung Artefakte innerhalb des ACC, der Raucher schied infolge schlechter Spektrenqualität aus (siehe Abschnitt 2.4.1).

2.4.3 Ablauf der MR-Untersuchung

Die Magnetresonanz-spektroskopischen Untersuchungen wurden im 3,0 Tesla MR-Scanner (3T94SIGNA, General Electric Healthcare, Wisconsin, USA) mit der 8 Kanal-Kopfspule HRBRAIN in der Klinik für Strahlenheilkunde am Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt und erfolgten unter Aufsicht des Radiologen und Diplom-Chemikers PD Dr. rer. nat Dr. med. H. Bruhn.

Vor Durchführung der bildgeleiteten spektroskopischen Messungen wurden T1- und T2-gewichtete strukturelle Planungsbilder angefertigt (Transversalschichten parallel zur gedachten Linie zwischen anteriorer und posteriorer Kommissur). Im Anschluss daran erfolgte eine inversionspräparierte 3D-Gradientenechosequenz zum Ausschluss struktureller Hirnveränderungen (FSPGR-Sequenz: 84 Schichten in 246 Sekunden, Teilung 2 mm, $\alpha = 20°$, TR/TE/TI = 8 ms/3,2 ms/500 ms, 256 x 192 Matrix, Field of View 220 x 170 mm, Voxelgröße 0,86 x 0,89 x 2 mm).

Danach erfolgte die spektroskopische Datenaufnahme: Nach Messung des anterioren Gyrus cinguli (ACC) wurden der posteriore Gyrus cinguli (PCC) und schließlich die rechtsfrontale weiße Substanz (RFWM) gemessen. Mittels *Shimming* auf die lokale Wasserresonanz erfolgte eine Optimierung der Magnetfeldhomogenität. Die Volumenselektion wurde anhand der PRESS-Sequenz durchgeführt. Koordinaten entsprechender Untersuchungsvolumina ergaben sich aus den Planungsbildern angrenzender Schichten, woraus der Steuercomputer vollautomatisch die benötigten Gradienten und Bandbreiten der Hochfrequenzimpulse errechnete. Die Platzierung der Voxel in ACC, PCC bzw. RFWM wird unter 2.4.4 dargestellt. Die kubischen Untersuchungsvolumina betrugen in allen Interessensregionen und bei allen Probanden 4,1 ml (entsprechend 16 mm x 16 mm x 16 mm Kantenlänge). Der Kippwinkel entspricht 90°, die Repetitionszeit 6000 ms und die Echozeit 30 ms.

2.4.4 Die unterschiedlichen Untersuchungsvolumina (Volumes *Of Interest (VOI)*

2.4.4.1 Anteriorer Gyrus Cinguli (ACC)

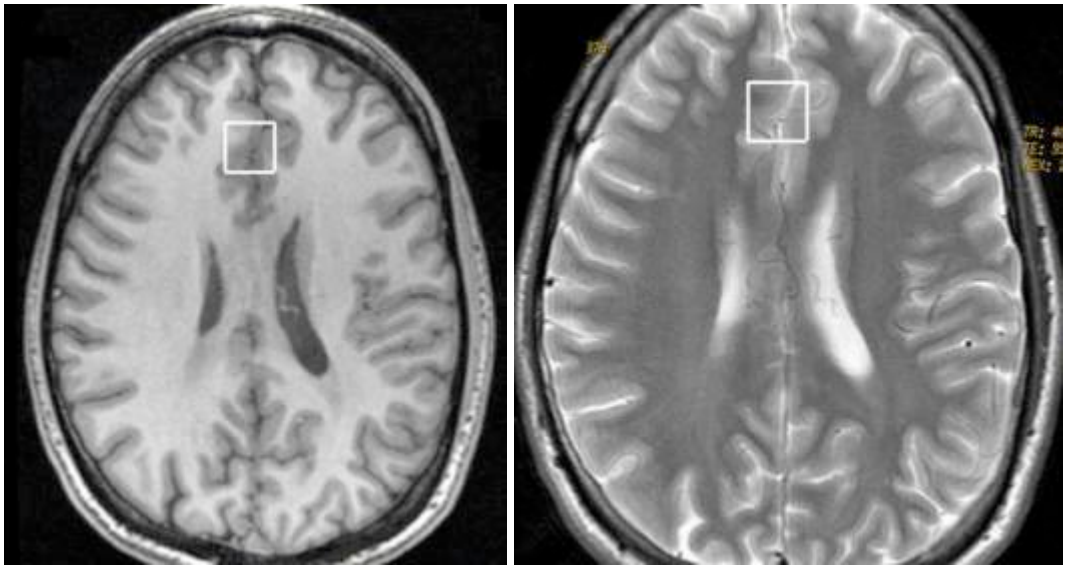


Abbildung 2.1a: Voxelplatzierung im ACC, angezeigt durch ein Quadrat im links T1- und rechts T2-gewichteten MRT-Bild unterhalb des Seitenventrikeldachs

2.4.4.2 Posteriorer Gyrus Cinguli (PCC)

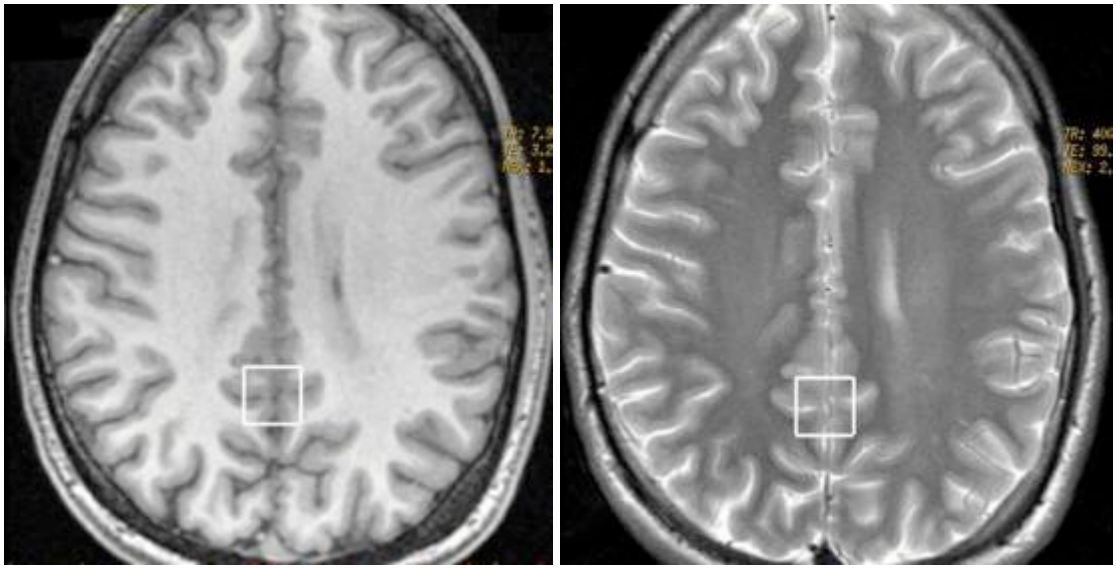


Abbildung 2.1b: Voxelplatzierung im PCC, angezeigt durch ein Quadrat im links T1- und rechts T2-gewichteten MRT-Bild in Höhe des Seitenventrikeldachs

2.4.4.3 Weiße Substanz rechtsfrontal (RFWM)

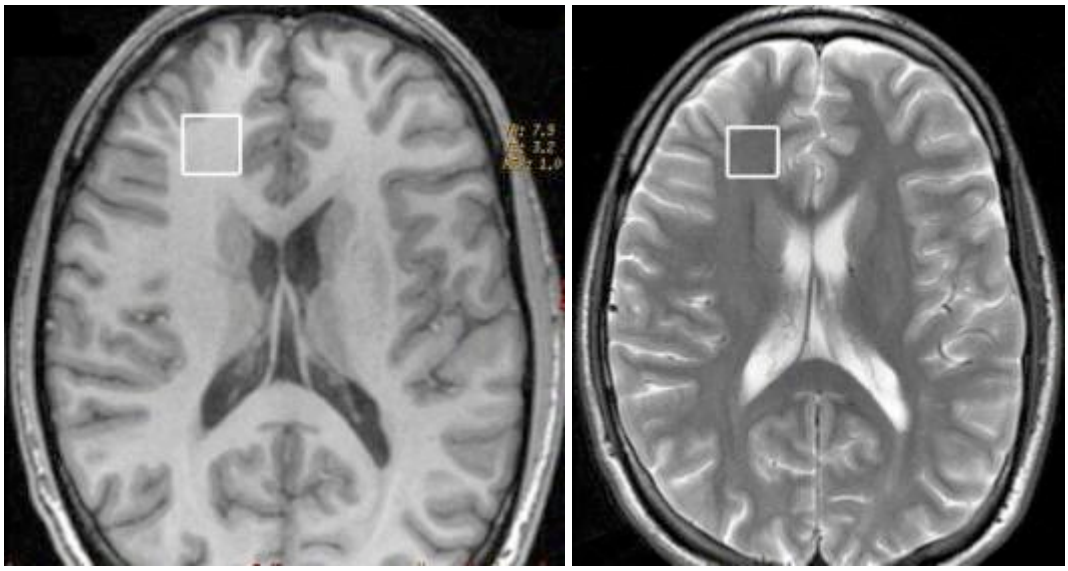


Abbildung 2.1c: Voxelplatzierung in der rechten frontalen Hirnsubstanz (RFWM), angezeigt durch ein Quadrat im links T1- und rechts T2-gewichteten MRT-Bild auf Höhe der Seitenventrikel

2.5 Qualität der Spektren

Die **Linienbreite** FWHM (*full width at half maximum*) der Wasserresonanz ist abhängig von T_2*. T_2* hängt von den T_2-Relaxationszeiten chemischer Gruppen ab, aber auch von der Homogenität des Magnetfelds. Da die Homogenität eines Magnetfelds mittels *Shimming* auf die Wasserresonanz verbessert wird, stellt FWHM ein Gütekriterium des angewandten *Shims* dar. Im Gegensatz zum *Shim* erfolgt die eigentliche Spektroskopie unter Suppression des Wassersignals. Alle von uns analysierten Spektren weisen Linienbreiten der Wasserresonanz ≤ 0,07 ppm auf (siehe auch Kreis, 2004). Ein Proband schied infolge einer FWHM > 0,1 ppm aus. Die Linienbreiten der anderen Probanden liegen im ACC bei 0,056 ± 0,010 ppm, im PCC bei 0,044 ± 0,009 ppm und in RFWM bei 0,051 ± 0,008 ppm.

Signal-zu-Rauschverhältnis (SNR): Die Sensitivität der Magnetresonanzspektroskopie ist im Vergleich zur herkömmlichen MRT gering, da die MRT einen Großteil ihres Signals von den Protonen des Wassers bezieht, welches in der ^{1}H-MRS jedoch unterdrückt werden muss, da Konzentrationen der detektierbaren Metaboliten bei Konzentrationen im Millimolbereich vergleichsweise gering sind. Um eine verhältnismäßige SNR zu erhalten, geht man folgendermaßen vor: Durch wiederholte Einzelmessungen desselben Voxels erhält man mehrere

Spektren, welche anschließend automatisch gemittelt werden. Zudem wählt man eine geeignete Größe der Untersuchungsvolumina, indem man berücksichtigt, dass die SNR exponentiell vom Messvolumen abhängt. Will man das SNR erhöhen, ohne längere Messzeiten in Kauf zu nehmen, besteht neben der Wahl größerer Untersuchungsvolumina die Möglichkeit, Messungen an einem MRT größerer Feldstärke durchzuführen. Da die Spektren unserer Studie bei 3,0 Tesla gemessen wurden, besteht ein SNR-Gewinn von einem theoretischen Faktor 2 gegenüber 1,5 Tesla. Die Voxelgröße betrug in ACC, PCC und RFWM jeweils 4,1 ml.

Basislinie der Spektren: Die Basislinie wird hauptsächlich durch Makromoleküle verursacht und ist für die Quantifizierung von großer Bedeutung. Die Abgrenzung der Basislinie von Metabolitenpeaks kann kompliziert und vom Untersucher beeinflusst sein, wurde aber in unserer Studie vollautomatisch und objektiv anhand mathematischer Dekonvolution mittels der Fitting-Software *LCModel* durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8).

Alle Spektren wurden durch PD Dr. H. Bruhn einzeln auf Artefakte überprüft und gegebenenfalls innerhalb derselben Untersuchung wiederholt. Alle analysierten Spektren entsprechen den u.a. von Frahm etablierten (Frahm, 1991) und Kreis (Kreis, 2004) geforderten Qualitätsmaßstäben. Keines der analysierten Spektren zeigt Artefakte oder unklare Fittingresiduen. Alle Spektren weisen Linienbreiten der Wasserresonanz ≤ 0,07 ppm auf. Die *Cramer Rao lower bounds* liegen für alle Metaboliten deutlich unter 50%SD (%SD für NAA ≤ 10; %SD für Creatin ≤ 10; %SD für Gesamtcholin ≤ 15; %SD für myo-Inositol ≤ 50, davon 89 Prozent ≤ 20).

2.6 Relative Quantifizierung anhand von Quotienten

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Ansätze zur Beschreibung der quantitativen Informationen von MR-Spektren: Die Angabe relativer Metabolitenquotienten (engl. *ratio*) oder die Berechnung absoluter Konzentrationen in mmol/l [Laborstandard]. Beide Methoden bieten Vor- und Nachteile.

Häufig werden quantitative Metabolitenangaben als relative Quotienten gemacht, als Referenzmetabolit dient dann zumeist Creatin. Diese Dissertation verwendet die von LCModel errechneten Creatin-Quotienten entsprechend NAA/Creatin, Gesamtcholin/Creatin und myo-Inositol/Creatin. Nachteil der Verwendung solcher Quotienten ist allerdings, dass von vier

robusteren Metaboliten nur drei Quotienten auswertbar sind. Zudem geht diese Methode von der Annahme aus, dass die für Creatin gemessenen Konzentrationen interindividuell bei gesunden Probanden vergleichbar sind. Ist dies jedoch nicht der Fall, führen relative Anstiege der Creatinkonzentration zu kleineren Quotienten und erniedrigte Creatinkonzentrationen zu erhöhten Quotienten. Daher wurde vor der Analyse der Creatin-Quotienten postuliert und überprüft, dass sich absolute Creatin-Konzentrationen von Rauchern und Nierauchern nicht signifikant unterscheiden würden. Vorteile der Verwendung von Quotienten bestehen vor allem in der unkomplizierten und dadurch besser standardisierten Anwendung sowie der möglicherweise geringeren Fehleranfälligkeit. Gleichzeitig minimiert man durch die Angabe von Creatin-Quotienten die Wahrscheinlichkeit zu groß oder zu klein gemessener Konzentrationen, welche aus interindividuell schwankenden Liquoranteilen innerhalb des jeweiligen Untersuchungsvolumens resultieren können.

2.7 Untersuchte Metaboliten

Zu den robusteren Peaks gehören neben dem besonders markanten Signal des *N-Acetylaspartats* (NAA) bei 2,0 ppm auch das Signal von C*reatin (Cre)*, *Gesamtcholin (tCho)* und *myo-Inositol (mIns)*. Neben diesen Singlett- bzw. Pseudosinglett-Resonanzen kann man unter anderem auch *Glx* als gemeinsame gekoppelte Multiplett-Resonanz von Glutamat, Glutamin und GABA nachweisen.

Statistisch ausgewertet werden NAA/Cre, tCho/Cre und mIns/Cre. Glx/Cre wird nicht in die statistische Auswertung einbezogen, da dessen Konzentration unter den gegebenen Untersuchuchsbedingungen nicht genau genug bestimmt werden kann.

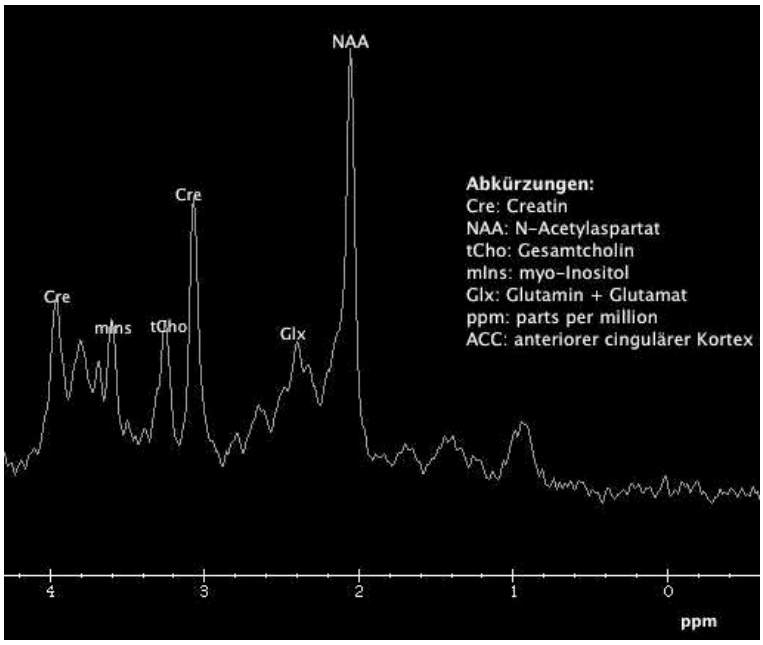


Abb. 2.2: Beispielspektrum der grauen Substanz (ACC) eines Rauchers

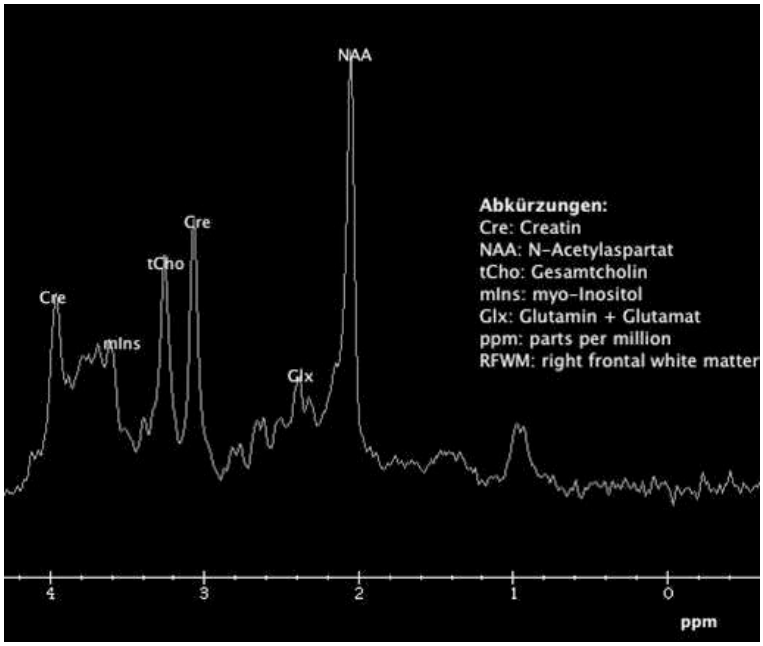


Abb. 2.3: Beispielspektrum der weißen Substanz (RFWM) eines Rauchers

2.7.1 [Creatin]

Die Creatin-Resonanz resultiert aus dem Gesamtcreatin, das sich aus Creatin und Phosphocreatin zusammensetzt. Die Hauptresonanz des Creatins findet sich bei 3,0 ppm und resultiert aus quaternären, Stickstoff-gebundenen Methylgruppen. Eine weitere Resonanz kann bei 3,9 ppm nachgewiesen werden, bedingt durch Protonen der Methylengruppen (Michaelis, 1991; Imamura, 2003). Bei Phosphocreatin handelt es sich um einen wichtigen Energiespeicher und Phosphatgruppendonor gegenüber ADP, bei Creatin um eine organische Säure mit zentraler Bedeutung für den Energiemetabolismus.

Quantitativ verändert sich die Creatin-Resonanz während der Hirnentwicklung weniger stark als beispielsweise NAA (Hüppi, 1991). Physiologische (Gesamt-)Creatinkonzentrationen verschiedener Hirnareale grauer bzw. weißer Substanz sind inter- und intraindividuell relativ konstant. Bei gesunden Probanden eignet sich Gesamtcreatin als relativ stabile Konzentration daher als Referenz, Konzentrationsveränderungen zeigen sich beispielsweise bei Hypoxie, Tumoren oder nach Traumen (Bruhn et al., 1989a+b; Ross et Bluml, 2001).

Ist im Folgenden von Creatin die Rede, bezieht sich dies auf die gemeinsame Resonanz von Creatin und Phosphocreatin.

2.7.2 N-Acetylaspartat (NAA/Cre)

N-Acetylaspartat (NAA) zeigt innerhalb zerebraler MR-Spektren die prominenteste Resonanz. Diese findet sich bei 2,0 ppm und wird durch dessen Methylgruppe als Singlett-Resonanz verursacht. Ein weiteres, jedoch kleineres Signal zeigt sich bei 2,4 ppm und resultiert aus der Methylengruppe des Aspartats. Aufgrund gekoppelter Resonanzen stellt sich diese Resonanz in höheraufgelösten Spektren als Doublett dar (Imamura, 2003). NAAG (N-Acetylaspartyl-Glutamat) weist eine kleine Resonanz neben der prominenten NAA-Resonanz auf und ist mittels in vivo Spektroskopie bei 3,0 Tesla nicht ausreichend davon abzugrenzen. Daher ist dessen Signal Teil der NAA-Resonanz bei 2,0 ppm und bedingt einen (geringen) Teil der errechneten NAA-Konzentration.

NAA wird innerhalb neuronaler Mitochondrien produziert und anschließend entlang neuronaler Axone transportiert (Knizley, 1967). Da sich NAA fast ausschließlich in Neuronen findet,

gilt NAA als neuronaler Marker (ausführlich diskutiert unter 4.3 und 4.4).

Quantitative Angaben des NAA erfolgen anhand von Quotienten mit Creatin im Nenner: NAA/Cre.

2.7.3 Gesamtcholin (tCho/Cre)

Die Hauptresonanz des Gesamtcholins bei 3,20 ppm resultiert aus freiem Cholin und cholinhaltigen Verbindungen, also Phosphocholin und Glycerophosphocholin. Die Hauptresonanz ist durch jeweils drei Methylgruppen am Stickstoff bedingt (Imamura, 2003). Das Gesamtcholinsignal resultiert hauptsächlich aus Phosphocholin und Glycerophosphocholin, da Cholin und Acetylcholin normalerweise nur geringfügig zum Signal beitragen. Entsprechendes gilt für Phosphatidylcholin, das trotz hoher Konzentrationen innerhalb des Myelins infolge seiner Immobilität physiologisch mittels ^{1}H-MRS kaum detektiert werden kann. Daher unterscheiden sich die Gesamtcholin-Gewebsspiegel zwischen grauer und weißer Substanz nur geringgradig. Veränderungen des Gesamtcholin-Gewebsspiegels können einen Anhalt auf die zelluläre Dichte innerhalb des Voxels geben, erhöhte Gesamtcholin-Spiegel können einen erhöhten Membranumsatz andeuten (Burtscher et Holtås, 2001; Ross et Bluml, 2001). Astrozyten und Oligodendrozyten zeigen höhere intrazelluläre Gesamtcholinkonzentrationen als Neuronen (Urenjak et al., 1993). Gesamtcholin wird näher unter 4.5.1.1 und 4.5.2.1 diskutiert.

Diese Dissertation verwendet für die quantitative Angabe und Analyse des Gesamtcholins Quotienten mit Creatin im Nenner: tCho/Cre.

2.7.4 myo-Inositol (mIns/Cre)

Bei myo-Inositol (mIns) handelt es sich um einen ubiquitären zyklischen Sechsfachalkohol, welcher in Spektren Resonanzen bei 3,6 ppm (Pseudo-Singlett) und 4,1 ppm verursacht. Bei 3,0 Tesla kann sich die Resonanz, die bei 1,5 - 2,0 Tesla bei 3,57 ppm gemessen wird unter Umständen als Doublett bei 3,55 ppm und 3,61 ppm aufspalten. Das Pseudo-Singlett bei 3,57 ppm repräsentiert die Protonen der Kohlenstoffatome 3 bis 6, die Resonanz bei 4,05 ppm hingegen Protonen des Kohlenstoffatoms 2. Die myo-Inositol-Resonanz liegt relativ nah am un-

terdrückten Wassersignal, wurde aber aufgrund der exzellenten Wasserunterdrückung in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Reproduzierbarkeit und Sensitivität gemessener myo-Inositol-Niveaus sind bei 3,0 Tesla signifikant höher als bei 1,5 Tesla (Ross et Bluml, 2001; Srinivasan et al., 2004).

Myo-Inositol wird häufig als Astrozytenmarker beschrieben und unter 4.5.1.2 und 4.5.2.2 ausführlich diskutiert.

Quantitative Angaben zu myo-Inositol werden als Quotienten mit Creatin im Nenner angegeben: mIns/Cre.

2.8 Berechnung der Spektren mit LCModel

LCModel (Linear Combination Model) integriert „*Prior Knowledge*" durch Applikation eines Basisspektrums (Provencher, 1993). „*Prior Knowledge*" beinhaltet Informationen über die charakteristischen Signalparameter der einzelnen Metabolite, beispielsweise hinsichtlich gekoppelter Resonanzen. Das gemessene Probandenspektrum wird also mit einem Basisspektrum verglichen, welches in die *LCModel* Software integriert ist. Je nach Anzahl der im Basisspektrum vorhandenen Metabolite werden die entsprechenden Resonanzen im Probandenspektrum zugeordnet und angepasst *(„gefittet")*. Dabei wird eine Basislinie berechnet, welche die untere Begrenzung der Resonanzen darstellt und deshalb für die Quantifizierung von großer Bedeutung ist.

Nach Auswertung der Probandenspektren mit *LCModel* erhält man einen Ausdruck, dem u.a. das gefittete Spektrum, das ungefittete Spektrum, LWHM, die Baseline, die errechneten absoluten Konzentrationen (in mmol/l$_{(Laborstandard)}$) und die relativen Metabolitenquotienten zu entnehmen sind. Zusätzlich zur FWHM werden Phase und SNR angegeben. Für die Berechnung der Basislinie wurde in unserer Studie der Bereich zwischen 4,2 ppm und 0,2 ppm gewählt. Angewandt wurde *LCModel* in der Version 6.1-0. Das Handbuch für *LCModel* steht zum freien Download zur Verfügung (Provencher, 2005).

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Computersoftware SPSS 16.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Vor Auswahl entsprechender statistischer Tests wurden abhängige Variablen mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine hinreichende Normalverteilung untersucht. Bei hinreichender Normalverteilung ($p > 0{,}05$ im KS-Test) wurden parametrische Tests gewählt, bei nicht hinreichender Normalverteilung ($p \leq 0{,}05$) nonparametrische Tests. Folgende Testverfahren kamen zum Einsatz: Chi-Quadrat-Test, t-Test unabhängiger Stichproben, Mann-Whitney-U-Test, einfaktorielle Kovarianzanalyse (ANCOVA), sowie die Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. Spearman. Boxplots und Streudiagramme wurden mit SPSS erstellt, Tabellen mit Microsoft Word für Windows (Redmond, WA, USA). Aufgrund der häufig beschriebenen Effekte von Alter und Geschlecht auf zerebrale Metaboliten-Gewebsspiegel wurden Metabolitenquotienten zwischen Rauchern und Nierauchern anhand einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit den Kovariablen Alter, Geschlecht und durchschnittlicher Anzahl alkoholischer Getränke pro Woche analysiert. Für den Fehler 1. Art wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

2.10 Deskriptive Statistik

2.10.1 Gruppencharakteristik

Tabelle 2.10.1 Gruppencharakteristik: Raucher/Nieraucher

	Nieraucher	Raucher
n (männlich/weiblich)[a]	22 (10/12)	11 (4/7)
Alter (Jahre)[b]	40,3 ± 14,5	30,8 ± 9,0
Schuljahre[c]	11,7 ± 1,5	11,0 ± 1,6
*alkohol. Getränke/Woche[d]	1,3 ± 0,3	3,0 ± 0,7
Zigaretten/Tag[e]	-	11,1 ± 7,7
Packungsjahre[f]	-	7,1 ± 3,9
Jahre aktiver Raucher[g]	-	10,7 ± 8,5
Alter bei Rauchbeginn (Jahre)[h]	-	17,5 ± 3,0

[b-h]Mittelwerte ± Standardabweichung, [a]absolute Angaben

[a]χ^2 (1) = 0,248, p = 0,618 (Chi-Quadrat-Test)

[b]t (31) = 1,976, p= 0,057 (t-Test)

[c]u = 85,000, p = 0,135 (Mann-Whitney-U-Test)

[d]u = 60,500, $\boldsymbol{p}$ **= 0,019** (Mann-Whitney-U-Test)

*ein alkoholisches Getränk entspricht 330 ml Bier (13,2 g Ethanol bei 5 Vol%), 150 ml Wein (13,2 g Ethanol bei 11 Vol%) oder 4 cl Spirituosen (12,8 g Ethanol bei 40 Vol%)

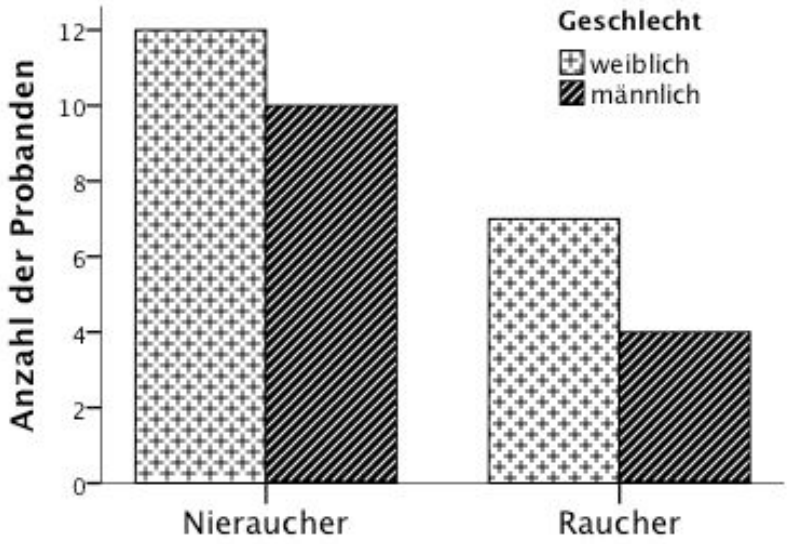


Abb. 2.4: Balkendiagramm der Geschlechterverteilung untersuchter Raucher und Nieraucher

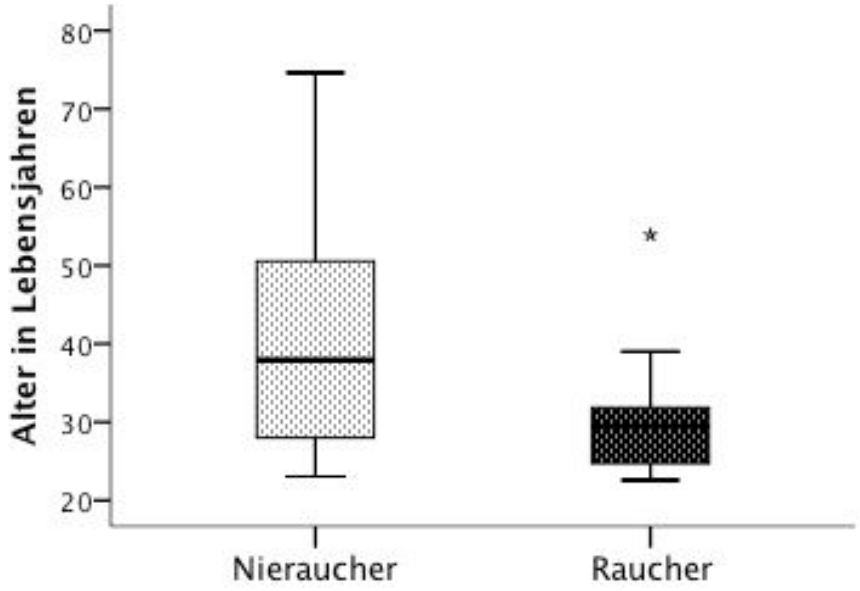


Abb. 2.5: Boxplot der Altersverteilung untersuchter Raucher und Nieraucher

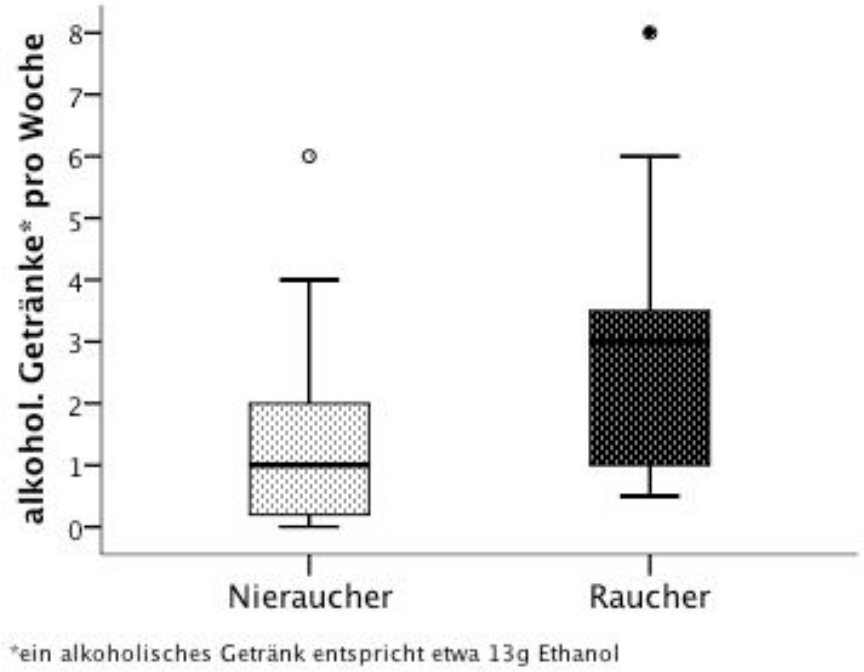


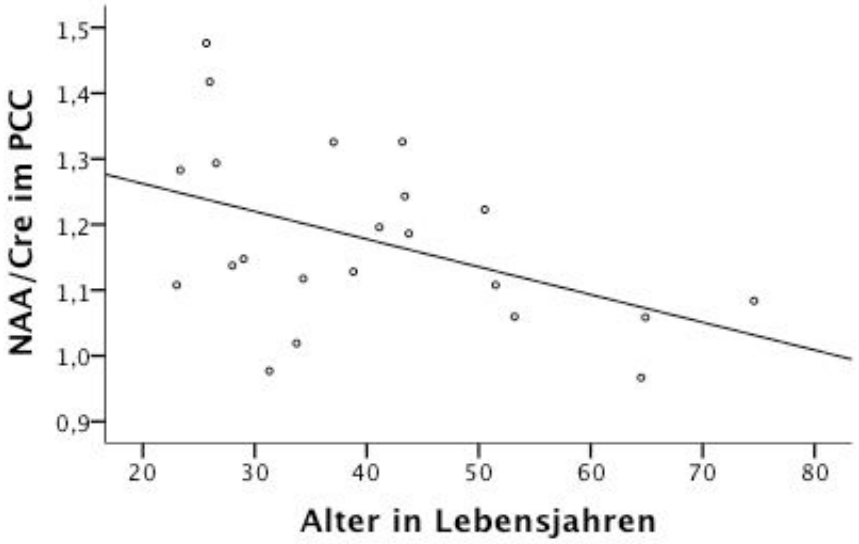
Abb. 2.6: Boxplot des durchschnittlichen Alkoholkonsums untersuchter Raucher und Nieraucher

2.10.2 Einfluss des Alters auf zerebrale Metaboliten

Korreliert man innerhalb des Nieraucherkollektivs (n = 22) Alter und relative Metabolitenquotienten für ACC, PCC und RFWM, ergeben sich statistisch signifikante Korrelationen für

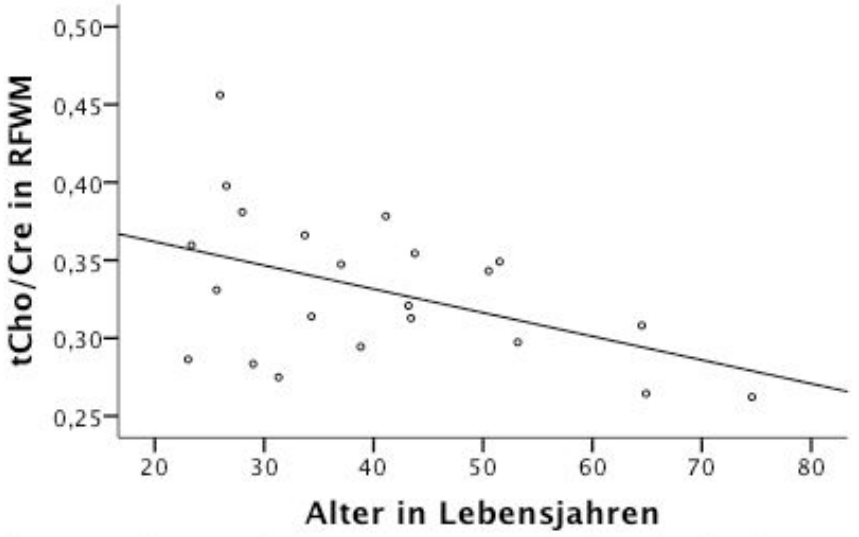
- NAA/Cre in PCC ($r_{Pearson}$ = -0,453; p = 0,034)
- tCho/Cre in ACC ($r_{Pearson}$ = -0,424; p = 0,049)
- tCho/Cre in RFWM ($r_{Pearson}$ = -0,460; p = 0,031)
- mIns/Cre in RFWM ($r_{Pearson}$ = 0,549; p = 0,008)

Alter und [Cre] korrelieren weder in ACC, PCC oder RFWM signifikant, dasselbe gilt für NAA/Cre in ACC und RFWM, tCho/Cre in PCC und mIns/Cre in ACC und PCC.



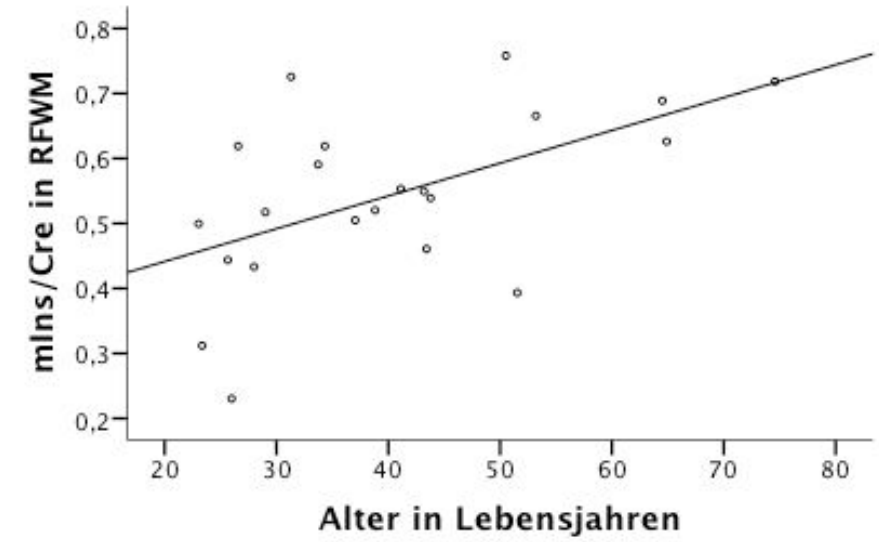
Abkürzungen: NAA: N-Acetylaspartat; Cre: Creatin; PCC: posteriorer Gyrus cinguli

Abb. 2.7: Altersabhängigkeit von NAA/Cre im PCC (nur Nieraucher)



Abkürzungen: tCho: Gesamtcholin; Cre: Creatin; RFWM: rechtsfrontale weiße Substanz

Abb. 2.8: Altersabhängigkeit von tCho/Cre innerhalb der rechtsfrontalen weißen Substanz RFWM (nur Nieraucher)



Abkürzungen: mIns: myo-Inositol; Cre: Creatin; RFWM: rechtsfrontale weiße Substanz

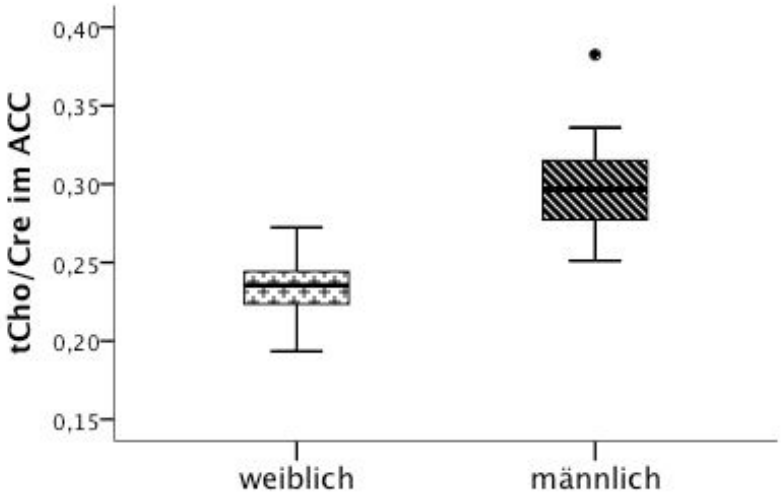
Abb. 2.9: Altersabhängigkeit von mIns/Cre innerhalb der rechtsfrontalen weißen Substanz RFWM (nur Nieraucher)

2.10.3 Einfluss des Geschlechts auf zerebrale Metaboliten

Untersucht man die Nieraucher (als Referenzkollektiv) in allen drei Untersuchungvolumina hinsichtlich geschlechtsabhängiger Mittelwertsunterschiede für [Creatin], NAA/Cre, tCho/Cre und mIns/Cre, zeigt sich ein signifikanter Geschlechtseffekt für

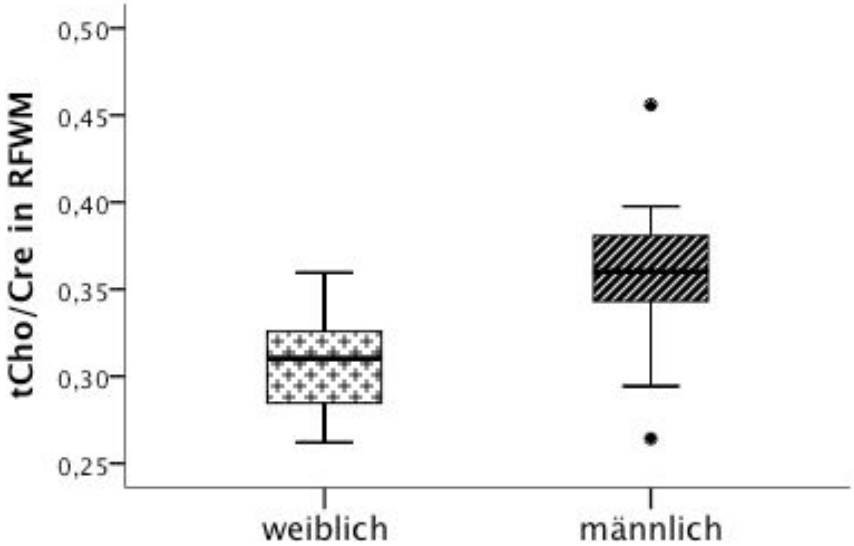
- tCho/Cre in ACC ($t = 5{,}008$; $p < 0{,}001$)
- tCho/Cre in RFWM ($t = 2{,}796$; $p = 0{,}011$)

[Creatin], NAA/Cre, mIns/Cre unterscheiden sich dagegen weder in ACC, PCC oder RFWM signifikant zwischen männlichen und weiblichen Nierauchern ($t \leq 0{,}984$, $p \geq 0{,}337$), dasselbe gilt für tCho/Cre im PCC ($t = 1{,}571$, $p = 0{,}132$).



Abkürzungen: tCho: Gesamtcholin; Cre: Creatin; ACC: anteriorer Gyrus cinguli

Abb. 2.10: Boxplot - tCho/Cre-Quotienten im ACC nach Geschlecht (nur Nieraucher)



Abkürzungen: tCho: Gesamtcholin; Cre: Creatin; RFWM: rechtsfrontale weiße Substanz

Abb. 2.11: Boxplot - tCho/Cre-Quotienten der weißen Substanz rechtsfrontal (RFWM) nach Geschlecht (nur Nieraucher)

3 Ergebnisse

3.1 Absolutes Creatin

3.1.1 Mittelwerte absoluten Creatins

Tabelle 3.1.1 Mittelwerte ± SD für [Creatin] in ACC, PCC bzw. RFWM

VOI	Metabolit	Nieraucher (n = 22)	Raucher (n = 11)
ACC	[Creatin]	5,81 ± 0,64	5,71 ± 0,87
PCC	[Creatin]	6,00 ± 0,61	5,98 ± 0,53
RFWM	[Creatin]	5,35 ± 0,64	5,24 ± 0,55

[Creatin] als absolute Konzentration in mmol/l (Laborstandard)

Abkürzungen: SD: Standardabweichung; VOI: *voxel of interest*; ACC: anteriorer Gyrus cinguli; PCC: posteriorer Gyrus cinguli; RFWM: rechtsfrontale weiße Substanz; NAA/Cre: N-Acetylaspartat/Creatin ; tCho/Cre: Gesamtcholin/Creatin; mIns/Cre: myo-Inositol/Creatin

3.1.2 ANCOVA *(analysis of covariance)*: [Creatin] in ACC, PCC bzw. RFWM

Wie unter 2.10.1 beschrieben wird, unterscheiden sich die untersuchten Raucher von den untersuchten Nierauchern signifikant bezüglich ihres durchschnittlichen Alkoholkonsums (mehr als acht alkoholische Getränke à 13 g Ethanol/Woche galten jedoch als Ausschlusskriterium).

In der Literatur werden häufig Geschlechts- und Alterseffekte gegenüber zerebralen Metabolitenspiegeln beschrieben (Kaiser et al., 2005; Wilkinson et al., 1997), so dass die statistische Analyse, neben der durchschnittlichen Anzahl der alkoholischen Getränke pro Woche, Alter und Geschlecht als Kovariablen berücksichtigt.

Abhängige Variablen des unabhängigen Faktors *Status* (Raucher bzw. Nieraucher) sind die absoluten Creatin-Konzentrationen der unterschiedlichen VOI in ACC, PCC bzw. RFWM.

Tabelle 3.1.2 Einfaktorielle ANCOVA für Creatin in ACC, PCC bzw. RFWM

VOI	**abhäng. Variable**	[a]Status *ohne* Adjustierung	**[a]Status *adjustiert*** nach Kovariablen	**[b]Alter**	**[b]Geschlecht**	**[b]Alkohol-konsum**
ACC	[Creatin]	$F(1) = 0{,}153$ $p = 0{,}698$	$F(1) = 0{,}397$ $p = 0{,}534$	$F(1) = 2{,}826$ $p = 0{,}104$	$F(1) = 0{,}100$ $p = 0{,}754$	$F(1) = 0{,}368$ $p = 0{,}549$
PCC	[Creatin]	$F(1) = 0{,}012$ $p = 0{,}914$	$F(1) = 0{,}500$ $p = 0{,}485$	$F(1) = 0{,}046$ $p = 0{,}832$	$F(1) = 0{,}986$ $p = 0{,}329$	$F(1) = 2{,}469$ $p = 0{,}127$
RFWM	[Creatin]	$F(1) = 0{,}224$ $p = 0{,}639$	$F(1) = 0{,}129$ $p = 0{,}722$	$F(1) = 3{,}887$ $p = 0{,}059$	$F(1) = 0{,}194$ $p = 0{,}663$	$F(1) = 1{,}743$ $p = 0{,}197$

[Creatin] als absolute Konzentration in mmol/l (Laborstandard)

Abhängige Variable: [Creatin] in ACC, PCC bzw. RFWM

[a]Faktor: Status (Raucher/Nieraucher) *ohne* Berücksichtigung der Kovariablen **bzw**. *adjustiert* nach Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum

[b]Kovariablen: Alter, Geschlecht, Alkoholkonsum

Freiheitsgrade in Klammern

Abkürzungen: SD: Standardabweichung; VOI *voxel of interest*; abh. Variable: abhängige Variable; ACC: anteriorer Gyrus cinguli; PCC: posteriorer Gyrus cinguli; RFWM: weiße Substanz rechtsfrontal; NAA/Cre: N-Acetyl-aspartat/Creatin; tCho/Cre: Gesamtcholin/Creatin; mIns/Cre: myo-Inositol/Creatin; Alkohol: durchschnittliche Anzahl alkoholischer Getränke pro Woche

3.1.3 I. Haupthypothese

Entsprechend der I. Haupthypothese unterscheidet sich Creatin als relativ konzentrationsstabiler Metabolit in keinem der drei Untersuchungsvolumina signifikant zwischen Rauchern und Nierauchern ($p \geq 0{,}485$). Dementsprechend können Metabolitenquotienten mit Creatin als Referenzkonzentration gebildet und analysiert werden.

3.2 Metabolitenquotienten: NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

3.2.1 Mittelwerte der Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

Tabelle 3.2.1 Mittelwerte ± SD der Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

VOI	Metabolit	Nieraucher (*n* = 22)	Raucher (*n* = 11)
ACC	NAA/Cre	1,13 ± 0,17	1,19 ± 0,13
	tCho/Cre	0,27 ± 0,04	0,25 ± 0,04
	mIns/Cre	0,58 ± 0,09	0,51 ± 0,08
PCC	NAA/Cre	1,18 ± 0,14	1,24 ± 0,04
	tCho/Cre	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,03
	mIns/Cre	0,54 ± 0,08	0,53 ± 0,09
RFWM	NAA/Cre	1,42 ± 0,22	1,44 ± 0,21
	tCho/Cre	0,33 ± 0,05	0,32 ± 0,06
	mIns/Cre	0,54 ± 0,13	0,59 ± 0,14

NAA/Cre, tCho/Cre bzw. mIns/Cre als Quotienten

Abkürzungen: SD: Standardabweichung; VOI: *voxel of interest*; ACC: anteriorer Gyrus cinguli; PCC: posteriorer Gyrus cinguli; RFWM: rechtsfrontale weiße Substanz; NAA/Cre: N-Acetylaspartat/Creatin; tCho/Cre: Gesamtcholin/Creatin; mIns/Cre : myo-Inositol/Creatin

3.2.2 ANCOVA *(analysis of covariance)* der Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

Analog den Creatin-Konzentrationen werden Unterschiede der Metabolitenquotienten des jeweiligen Untersuchungsvolumens anhand einer entsprechenden Kovarianzanalyse untersucht.

Als abhängige Variablen des unabhängigen Faktors *Status* (Raucher bzw. Nieraucher) werden die Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre bzw. mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM mittels einfaktorieller ANCOVA unter Berücksichtigung der Kovariablen Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum auf signifikante Effekte untersucht. Die detaillierten Ergebnisse der ANCOVA sind in Tabelle 3.2.2 dargestellt.

Tabelle 3.2.2 Einfaktorielle ANCOVA der Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

VOI	**abhäng. Variable**	[a]Status *ohne* Adjustierung	[a]***Status adjustiert*** nach Kovariablen	[b]**Alter**	[b]**Geschlecht**	[b]**Alkoholkonsum**
ACC	NAA/Cre	$F(1) = 0{,}301$ $p = 0{,}587$	$F(1) = 1{,}512$ $p = 0{,}229$	$F(1) = 0{,}418$ $p = 0{,}523$	$F(1) = 0{,}269$ $p = 0{,}608$	$F(1) = 1{,}371$ $p = 0{,}252$
	tCho/Cre	$F(1) = 1{,}486$ $p = 0{,}232$	$F(1) = 5{,}590$ $\mathbf{p = 0{,}025}$	$F(1) = 5{,}211$ $\mathbf{p = 0{,}030}$	$F(1) = 20{,}339$ $\mathbf{p < 0{,}001}$	$F(1) = 1{,}179$ $p = 0{,}287$
	mIns/Cre	$F(1) = 4{,}136$ $p = 0{,}051$	$F(1) = 1{,}490$ $p = 0{,}232$	$F(1) = 2{,}341$ $p = 0{,}137$	$F(1) = 0{,}111$ $p = 0{,}742$	$F(1) = 0{,}012$ $p = 0{,}912$

VOI	abh. Variable	Status nicht adjust.	*Status adjust.*	Alter	Geschlecht	Alkoholkonsum
PCC	NAA/Cre	$F(1) = 1{,}791$	$F(1) < 0{,}001$	$F(1) = 3{,}695$	$F(1) = 0{,}106$	$F(1) = 2{,}896$
		$p = 0{,}190$	$p = 0{,}994$	$p = 0{,}065$	$p = 0{,}747$	$p = 0{,}100$
	tCho/Cre	$F(1) = 0{,}257$	$F(1) = 0{,}023$	$F(1) = 0{,}657$	$F(1) = 4{,}098$	$F(1) = 1{,}582$
		$p = 0{,}616$	$p = 0{,}881$	$p = 0{,}424$	$p = 0{,}053$	$p = 0{,}219$
	mIns/Cre	$F(1) = 0{,}053$	$F(1) = 0{,}032$	$F(1) = 2{,}059$	$F(1) = 0{,}322$	$F(1) = 0{,}015$
		$p = 0{,}820$	$p = 0{,}859$	$p = 0{,}162$	$p = 0{,}575$	$p = 0{,}903$
RFWM	NAA/Cre	$F(1) = 0{,}083$	$F(1) = 0{,}343$	$F(1) = 4{,}627$	$F(1) = 1{,}556$	$F(1) = 0{,}339$
		$p = 0{,}776$	$p = 0{,}563$	$\mathbf{p = 0{,}040}$	$p = 0{,}223$	$p = 0{,}565$
	tCho/Cre	$F(1) = 0{,}392$	$F(1) = 0{,}711$	$F(1) = 1{,}131$	$F(1) = 5{,}348$	$F(1) = 0{,}033$
		$p = 0{,}536$	$p = 0{,}406$	$p = 0{,}297$	$\mathbf{p = 0{,}028}$	$p = 0{,}856$
	mIns/Cre	$F(1) = 0{,}739$	$F(1) = 7{,}589$	$F(1) = 8{,}973$	$F(1) = 0{,}827$	$F(1) = 4{,}319$
		$p = 0{,}397$	$\mathbf{p = 0{,}010}$	$\mathbf{p = 0{,}006}$	$p = 0{,}371$	$\mathbf{p = 0{,}047}$

Abhängige Variable: NAA/Cre, tCho/Cre bzw. mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

[a]Faktor: Status *ohne* Berücksichtigung der Kovariablen **bzw**. adjustiert nach Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum

[b]Kovariablen: Alter, Geschlecht, Alkohol

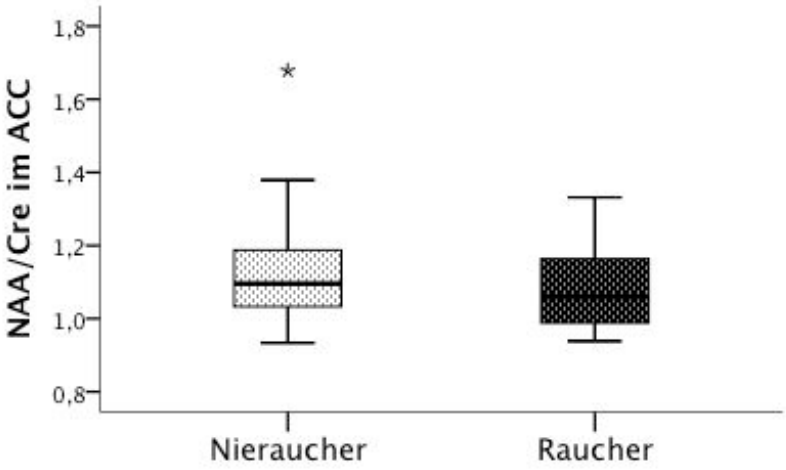
Freiheitsgrade in Klammern

Abkürzungen: VOI: *voxel of interest*; ACC: anteriorer Gyrus cinguli; PCC: posteriorer Gyrus cinguli; RFWM: weiße Substanz rechtsfrontal; NAA/Cre: N-Acetylaspartat/Creatin; tCho/Cre: Gesamtcholin/Creatin; mIns/Cre: myo-Inositol/Creatin; Alkoholkonsum: durchschnittliche Anzahl alkoholischer Getränke à 13 g Ethanol pro Woche

3.2.3 II. Haupthypothese

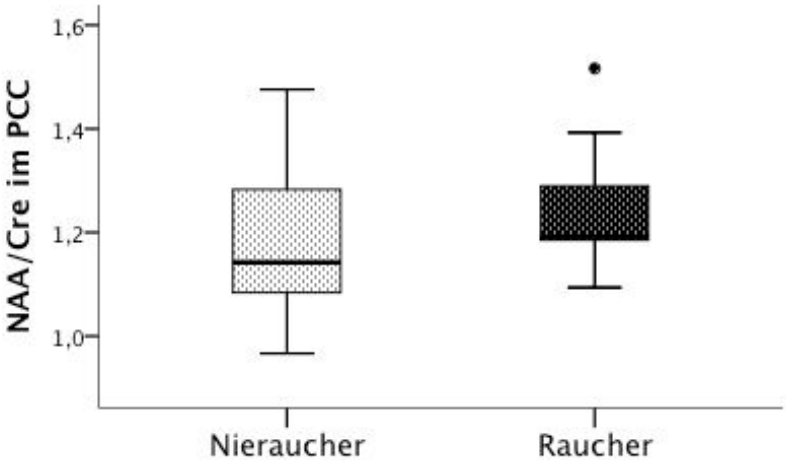
Entgegen der II. Haupthypothese findet sich für NAA/Cre im ACC kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nierauchern ($F = 1{,}512$; $p = 0{,}229$). Auch innerhalb des PCC

findet sich für NAA/Cre kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nierauchern. Entsprechend der II. Haupthypothese ist die Effektstärke des adjustierten Rauchereffekts innerhalb des PCC jedoch geringer ($F < 0{,}001$; $p = 0{,}994$). Bei Interpretation der Boxplots berücksichtige man den für NAA/Cre in PCC zuvor beschriebenen Alterseffekt.



Abkürzungen: NAA: N-Acetylaspartat; Cre: Creatin; ACC: anteriorer Gyrus cinguli

Abb. 3.1: Boxplot – NAA/Cre-Quotienten im ACC nach Raucherstatus

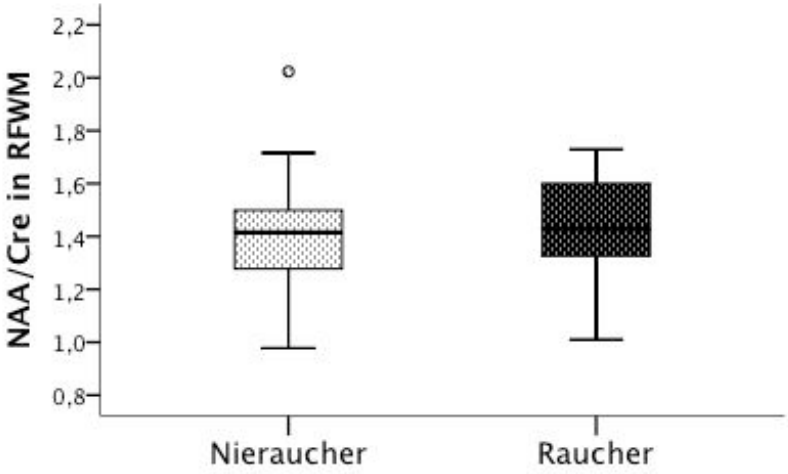


Abkürzungen: NAA: N-Acetylaspartat; Cre: Creatin; PCC: posteriorer Gyrus cinguli

Abb. 3.2: Boxplot – NAA/Cre-Quotienten im PCC nach Raucherstatus

3.2.4 III. Haupthypothese

Entsprechend der III. Haupthypothese unterscheidet sich NAA/Cre zwischen Rauchern und Nierauchern nicht signifikant ($F = 0{,}343$; $p = 0{,}563$).



Abkürzungen: NAA: N-Acetylaspartat; Cre: Creatin; RFWM: rechtsfrontale weiße Subst.

Abb. 3.3: Boxplot – NAA/Cre-Quotienten der weißen Substanz rechtsfrontal nach Raucherstatus

Bei Interpretation des Boxplots berücksichtige man den zuvor für NAA/Cre in RFWM beschriebenen, signifikanten Alterseffekt.

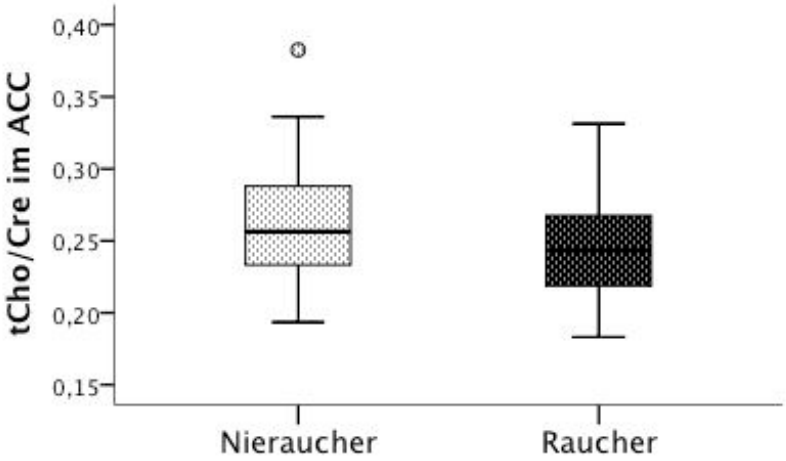
3.2.5 Nebenhypothesen und weitere Fragestellungen

3.2.5.1 Sollten sich bei Rauchern kortikal in ACC oder PCC signifikante Defizite oder signifikant erhöhte Metaboliten-Niveaus für tCho oder mIns nachweisen lassen, wird analog der 2. Haupthypothese postuliert, dass Rauchereffekte innerhalb des ACC deutlicher ausfallen als innerhalb des PCC

Im ACC lässt sich ein signifikanter adjustierter Rauchereffekt für Gesamtcholin/Creatin nachweisen (F = 5,590; $\boldsymbol{p}$ **= 0,025**).

Analog der 2. Haupthypothese ist die Effektstärke innerhalb des PCC deutlich geringer (F = 0,023), das Signifikanzniveau liegt dort bei p = 0,881.

Für mIns/Cre zeigt sich weder im ACC (F = 1,490; p = 0,232) noch im PCC (F = 0,032; p = 0,859) ein signifikanter Rauchereffekt.



Abkürzungen: tCho: Gesamtcholin; Cre: Creatin; ACC: anteriorer Gyrus cinguli

Abb. 3.4: Boxplot – tCho/Cre-Quotienten im ACC nach Raucherstatus

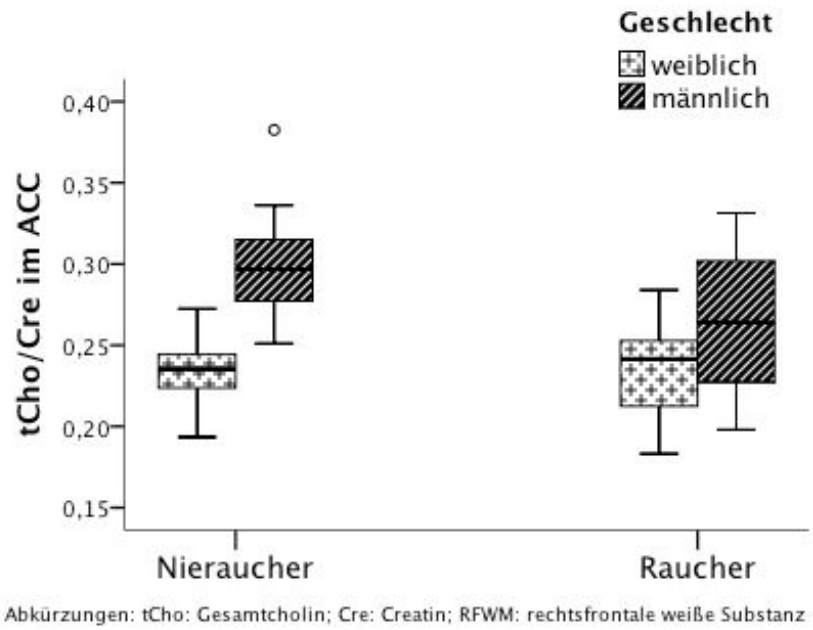


Abb. 3.5: Boxplot –tCho/Cre-Quotienten im ACC nach Raucherstatus und Geschlecht

Bei Interpretation der Boxplots berücksichtige man die für tCho/Cre zuvor beschriebenen, signifikanten Alters- und Geschlechtseffekte.

3.2.5.2 Innerhalb der weißen Substanz soll untersucht werden, ob sich die Gewebsspiegel von tCho oder mIns zwischen Rauchern und Nierauchern signifikant unterscheiden

In RFWM zeigt sich ein signifikanter Rauchereffekt für mIns/Cre (F = 7,589; $\boldsymbol{p}$ **= 0,010**). Für tCho/Cre lässt sich dagegen innerhalb der weißen Substanz kein signifikanter Rauchereffekt nachweisen (F = 0,711; p = 0,406).

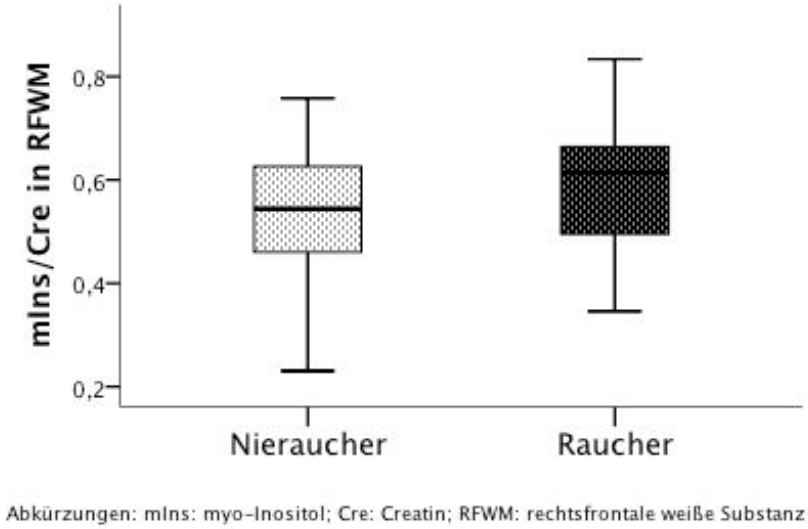


Abb. 3.6: Boxplot – mIns/Cre-Quotienten der weißen Substanz rechtsfrontal nach Raucherstatus

Bei Interpretation der Boxplots berücksichtige man die zuvor beschriebenen, signifikanten Alters- und Alkoholeffekte.

3.2.5.3 Korrelationen: NAA/Cre in ACC, tCho/Cre in ACC bzw. mIns/Cre in RFWM mit Raucherparametern (Packungsjahre, Zigaretten/Tag bzw. Alter bei Rauchbeginn

Weder für NAA/Cre innerhalb des ACC, noch für tCho/Cre in ACC bzw. mIns/Cre in RFWM zeigen sich statistische Signifikanzen bezüglich entsprechender Korrelationen (n = 11). Die Signifikanzniveaus bezüglich der entsprechenden Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. Spearman betragen für NAA/Cre im ACC $p \geq 0{,}358$, für tCho/Cre im ACC $p \geq 0{,}602$ bzw. für mIns/Cre in RFWM $p \geq 0{,}308$.

4 Diskussion

4.1 Kovariablen – Alter, Geschlecht, Alkoholkonsum

Zwischen Rauchern und Nierauchern finden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechterverteilung. Zwar unterscheiden sich beide Gruppen bezüglich ihres Durchschnittsalters ebenfalls nicht signifikant, es zeigt sich aber ein statistischer Trend zugunsten eines Altersunterschiedes. In der Literatur werden häufig Alters- und Geschlechtseffekte gegenüber zerebralen Metabolitenspiegeln beschrieben, so dass Alter und Geschlecht als Kovariablen berücksichtigt wurden.

Rauchende Probanden unserer Studie trinken signifikant mehr alkoholische Getränke pro Woche als Nieraucher (pro Getränk ca. 13 g Ethanol), vereinbar mit Untersuchungen der Allgemeinbevölkerung, die berichten, dass Personen, die regelmäßig Alkohol trinken und Zigaretten rauchen, jeweils mehr Alkohol trinken und Zigaretten rauchen als Personen, die ausschließlich Alkohol trinken oder Zigaretten rauchen (Bien et Burge, 1990; DiFranza et Guerrera, 1990; Gulliver et al., 1995). Mehr als durchschnittlich acht alkoholische Getränke pro Woche galten jedoch als Ausschlusskriterium. Hinsichtlich der durchschnittlich absolvierten Schuljahre finden sich in unserer Studie keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Als Kovariablen der Kovarianzanalyse (ANCOVA) wurden daher Alter, Geschlecht und wöchentlicher Alkoholkonsum berücksichtigt.

4.2 I. Haupthypothese

Die Gewebsspiegel des Gesamtcreatins unterscheiden sich, wie a priori hypothetisiert, weder in ACC, PCC oder RFWM signifikant zwischen gesunden Rauchern und Nierauchern, so dass Metabolitenquotienten mit Cre als Referenz gebildet werden können. Zerebrales Gesamtcreatin gilt als konzentrationsstabil, da sich dessen Konzentrationen zwischen verschiedenen Hirnregionen grauer bzw. weißer Substanz weniger deutlich unterscheiden als die anderer Metaboliten und weil dessen Konzentrationsveränderungen während der Hirnentwicklung relativ gering ausgeprägt sind. Pathologische Veränderungen des Creatin-Spiegels finden sich infol-

ge von Hypoxien, Traumen oder Tumoren (Bruhn et al., 1989a+b; Burtscher et Holtås, 2001; Ross et Bluml, 2001).

4.3 II. Haupthypothese

In der Hirnsubstanz Erwachsener findet sich N-Acetylaspartat (NAA) fast ausschließlich in Neuronen. NAA wird daher in der Literatur häufig als neuronaler Marker interpretiert, nicht zuletzt deshalb, weil neurodegenerative Vorgänge im Tiermodell von parallelen Konzentrationsverminderungen für NAA begleitet werden und postmortale Untersuchungen neurodegenerativer Erkrankungen dasselbe Phänomen beschreiben. Veränderungen der Synapsendichte werden in der Literatur ebenfalls mit Veränderungen von NAA-Gewebsspiegeln in Verbindung gebracht. Anstiege des NAA-Spiegels finden sich kompensatorisch infolge axonaler Regenerationsprozesse bei vorausgehender Neuronenschädigung (Jackson et Connelly, 1999) sowie physiologisch innerhalb der ersten Lebensjahre (Hüppi, 1991; van der Knaap et al., 1990; Kreis et al., 1993), vermutlich als Resultat einer Zunahme von Anzahl, Größe und Komplexität neuronaler Dendriten und synaptischer Verbindungen (van der Knaap et al., 1990). Trotzdem ist NAA als „neuronaler Marker“ nicht unumstritten, da NAA auch mit transienten Dysfunktionen des mitochondrialen Energiestoffwechsels (Demougeot et al., 2001) oder osmoregulativen Funktionen in Verbindung gebracht wird (Taylor et al., 1995) und weil ein Fallbericht eines dreijährigen, neurologisch retardierten Jungen mit moderat verzögerten Myelinisierungsprozessen existiert, bei dem man mittels ^{1}H-MRS überraschenderweise in Nervengewebe kein NAA nachweisen konnte (Martin et al., 2001).

Entgegen der 2. Haupthypothese unterscheiden sich Raucher und Nieraucher in unserer Studie innerhalb des ACC nicht signifikant bezüglich ihres NAA-Niveaus (p = 0,229). Innerhalb des PCC unterscheiden sich Raucher und Nieraucher ebenfalls nicht signifikant bezüglich NAA/Cre (p = 0,994), die Effektstärke fällt für den PCC jedoch deutlich geringer aus als für den ACC. Entsprechend des Fehlers 2. Art kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich infolge diskreterer Konzentrationsunterschiede anhand eines größeren Probanden- und Raucherkollektivs nicht möglicherweise doch signifikante Unterschiede zeigen.

In der Literatur wurden bislang zwei magnetresonanzspektroskopische Studien beschrieben, welche gesunde Raucher und Nichtraucher bezüglich ihres zerebralen Metabolitenprofils untersuchen (Durazzo et al., 2004; Gallinat et al., 2007).

Die erste Studie (Durazzo et al., 2004) wurde bereits unter 1.1.6.3.2 ausführlich beschrieben und spielte eine Rolle für die Formulierung der III. Haupthypothese. Im Vergleich gesunder Raucher mit gesunden Nichtrauchern wurden mittels MRSI bei 1,5 Tesla signifikante Konzentrationsunterschiede für Gesamtcholin (tCho) im Kleinhirnwurm beschrieben, wobei gesunde Raucher niedrigere Gesamtcholin-Spiegel zeigten als gesunde Nichtraucher.

Die zweite angesprochene Studie (Gallinat et al., 2007) untersucht gesunde Raucher und Nieraucher, die sich bezüglich Alter, Geschlecht, Bildung oder durchschnittlichem Alkoholkonsum nicht signifikant unterscheiden. Signifikant erniedrigte NAA-Konzentrationen wurden für das Untersuchungsvolumen des linken Hippokampus beschrieben, nicht aber für das andere Untersuchungsvolumen im ACC. Unsere Studie zeigt ein vergleichbares Ergebnis für den ACC: Raucher und Nieraucher unterscheiden sich hier nicht signifikant bezüglich ihrer NAA/Cre-Quotienten.

Dass sich zwischen Rauchern und Nierauchern kortikal im ACC und PCC keine signifikanten Unterschiede für NAA/Cre nachweisen lassen, während Raucher bei Gallinat innerhalb des (linken) Hippokampus signifikante Erniedrigungen absoluter NAA-Konzentrationen zeigten, ist vereinbar mit Ergebnissen tierexperimenteller Studien, laut welchen Neurone adulter Ratten im Gegensatz zu denen adoleszenter Ratten hierarchische Nikotinempfindlichkeiten unterschiedlicher Hirnstrukturen zeigen, wobei die höchste Vulnerabilität für den Hippokampus beschrieben wird (Abrous et al., 2002; Trauth et al., 2000; Trauth et al., 1999; Xu et al., 2001). Das Muster neuronaler Schädigung bestimmter Transmittersysteme unterscheidet sich tierexperimentell weiterhin zwischen fötaler und adoleszenter Nikotinexposition: Unter kontinuierlicher Nikotininfusion zeigt sich bei fötalen Ratten eine verminderte kortikale Paroxetinbindung bei vermehrter Paroxetinbindung im Hirnstamm, interpretiert als Schädigung kortikaler serotonerger Nervenendigungen bei reaktiver Aussprossung ihrer Zellkörper innerhalb des Hirnstamms (Xu et al., 2001); adoleszente Ratten zeigen unter vergleichbaren Untersuchungsbedingungen ebenfalls erhöhte Paroxetinbindungskapazitäten innerhalb des Hirnstamms, die verminderte Paroxetinbindungskapazität wurde jedoch in Hippokampus und Striatum beobachtet, nicht aber kortikal (Xu et al., 2001). Kortikale Konzentrationen der Cholinacetyltransferase als Marker des Ausmaßes cholinerger Innervation unterscheiden sich bei

adoleszenten Ratten vor und nach entsprechender Nikotininfusion ebenfalls nicht signifikant, demgegenüber finden sich hierfür im Mesenzephalon selbst noch einen Monat nach Beendigung der Nikotininfusion signifikante Konzentrationsverminderungen (Trauth et al., 2000).

Bereits seit längerem ist bekannt, dass im Hippokampus von Ratten und Menschen im Gegensatz zu anderen Hirnstrukturen auch postnatal eine kontinuierliche Neurogenese stattfindet (Altman et Das, 1965; Eriksson et al., 1998), inzwischen konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass neu entstehende Nervenzellen anschließend zu funktionellen Neuronen ausreifen (van Praag et al., 2002). Der in der Literatur zum Teil als neurotoxisch, zum Teil als neuroprotektiv beschriebene Nikotineffekt scheint somit insbesondere vom neuronalen Entwicklungsstand abzuhängen: Vermutlich gelten neuroprotektive Nikotineffekte adulten Neuronen (Yamashita et Nakamura, 1996), während neurotoxische Nikotineffekte v.a. bei unausgereiften Neuronen, insbesondere während der fötalen und adoleszenten Entwicklung beobachtet werden (Slotkin, 2004). Allerdings wurden neurotoxische Effekte auch gegenüber adulten Neuronen beschrieben: Im Rattenmodell ist eine längerfristige Nikotinexposition mit reduzierten Purkinjezellzahlen im Kleinhirnwurm assoziiert (Chen et al., 2003). Interessanterweise beobachtete Durazzo dort bei Rauchern signifikant niedrigere Gewebsspiegel für tCho, nicht jedoch für NAA (Durazzo et al., 2004).

Die Annahme einer vorwiegenden Schädigung neu entstehender bzw. neu entstandener Neurone innerhalb des Hippokampus könnte erklären, weshalb NAA-Defizite bei Rauchern bislang ausschließlich in dieser Region nachgewiesen wurden, vorausgesetzt die entsprechenden Raucher- und Nichtraucherkollektive unterschieden sich nicht signifikant bezüglich ihrer etwaigen intrauterinen Nikotinexposition. Dies kann in unserer Studie nur zum Teil ausgeschlossen werden, zumal das Zutreffen anamnestischer Angaben bezüglich des mütterlichen Schwangerschaftverlaufs aus verschiedenen Gründen schwierig zu evaluieren ist.

Subtile neuronale Schädigungen müssen allerdings nicht zwangsläufig mit quantitativen NAA-Veränderungen assoziiert sein, nicht zuletzt deshalb, weil die frontale Hirnreifung ab dem 12. Lebensjahr in Form von Synapseneliminierungen abläuft: Zwar erreicht die graue Substanz des menschlichen frontalen Kortex ihre maximale Dicke durch Arborisierungsprozesse bereits mit einem Alter von durchschnittlich 11,5 Lebensjahren, einen wichtigen Teil der neuronalen Hirnentwicklung übernimmt jedoch das folgende *Pruning*, bei dem es durch selektive Synapseneliminierung (Cowan et al., 1984; Huttenlocher et al., 1982; Oppenheim, 1985; Purves et Lichtman, 1980; Rakic et Riley, 1983) zur konsekutiven Abnahme der Kor-

texdicke kommt. Dieser zweite Reifungsprozess beginnt okzipital und endet erst während der späten Adoleszenz in frontalen Hirnarealen (Huttenlocher, 1979).

Da das Durchschnittsalter bei Rauchbeginn in unserer Studie bei 17,2 ± 3,0 Jahren liegt und der durchschnittliche Zigarettenkonsum 11,1 ± 7,7 Zigaretten pro Tag beträgt, ist weiterhin nicht auszuschließen, dass sich im ACC bei einem größeren Raucherkollektiv mit früherem Rauchbeginn und stärkerem Tabakkonsum ein signifikanter Rauchereffekt für NAA/Cre zeigen könnte. Dagegen spricht jedoch das zuvor beschriebene, tierexperimentell unter Nikotinexposition beobachtete lokale Verteilungsmuster neuronaler Schädigungen.

4.4 III. Haupthypothese

Weiße Substanz besteht aus markhaltigen Nervenfasern und Gliazellen. Die Reifung des Marklagers (weiße Substanz) erstreckt sich beim Menschen bis in die dritte Lebensdekade und ist somit bei einem Teil der untersuchten Probanden noch nicht abgeschlossen. Postnatal verläuft sie im Gegensatz zur Reifung der grauen Substanz nicht in Form eines inversen *U*, sondern annähernd linear mit ähnlichen Geradenverläufen in Frontal-, Temporal, Parietal- und Okzipitallappen (Giedd, 2004).

Während des Reifungsprozesses erfolgt durch Oligodendrozyten die Myelinisierung von Nervenfasern, was bis zu 100-fach erhöhte Axonleitgeschwindigkeiten ermöglicht. Nervenfasern der weißen Substanz werden unterteilt in Projektionsfasern, Assoziationsfasern und Kommissurenfasern, wobei Assoziationsfasern den größten Anteil des Marklagers ausmachen und verschiedene Kortexareale innerhalb derselben Hemisphäre miteinander verbinden (Duus, 1995).

Unsere Studie zeigt für RFWM zwischen Rauchern und Nierauchern keinen signifikanten Unterschied der NAA/Cre-Quotienten. Dies entspricht der III. Haupthypothese und ist vereinbar mit der Studie von Durazzo und Kollegen, die zwischen gesunden Rauchern und Nichtrauchern keinen signifikanten Unterschied für NAA innerhalb der frontalen weißen Substanz beobachten.

Wie für den ACC kann jedoch auch für RFWM nicht ausgeschlossen werden, dass sich, entsprechend des Fehlers 2. Art, bei Wahl eines größeren Probanden-/Raucherkollektivs diskretere Unterschiede für NAA/Cre als signifikant erweisen könnten. Zumindest kann man aber

interpretieren, dass sich der Neuronenanteil innerhalb des entsprechenden Untersuchungsvolumens nicht deutlich zwischen Rauchern und Nierauchern unterscheidet. Dies schließt gliale Veränderungen des (frontalen) Marklagers allerdings nicht aus:

MR-Untersuchungen mittels Diffusionstensor-Imaging (DTI) ergaben bei adoleszenten Rauchern erhöhte Werte fraktioneller Anistotropie (FA), und zwar insbesondere frontal (Jacobsen et al., 2007). Innerhalb des Corpus callosum wurden bei Rauchern ebenfalls erhöhte Werte fraktioneller Anisotropie beobachtet (Paul et al., 2008). Veränderungen der FA assoziiert man insbesondere mit dem Myelinisierungsgrad, dem Faserdurchmesser, der direktionalen Kohärenz bzw. der axonalen Organisation von Faserverbindungen (Beaulieu, 2002). Erst kürzlich konnte mittels DTI gezeigt werden, dass die physiologische Entwicklung frontotemporaler Verbindungen besonders langsam abläuft und 90 Prozent der maximalen FA erst nach dem 25. Lebensjahr erreicht werden (Lebel et al., 2008). Eine volumetrische Untersuchung bei Rauchern berichtet zudem temporal vergrößerte Volumina weißer Substanz (Gazdzinski et al., 2005).

Da Astrozyten (Sharma et Vijayaraghavan, 2001, 2002; Teaktong et al., 2003) und oligodenrogliale Vorläuferzellen (Rogers et al., 2001) funktionelle Nikotinrezeptoren exprimieren können, könnte eine Nikotinexposition während der Adoleszenz den ungestörten Ablauf der Reifung weißer Substanz beeinträchtigen, zumal etwa 90 Prozent der aktiven Raucher während dieser Phase mit dem Rauchen beginnen (Chen et Millar, 1998; Nelson et al., 1995; Pierce et Gilpin, 1996) und das Durchschnittsalter bei Rauchbeginn in unserer Studie bei 17,5 ± 3,0 Jahren liegt.

Anhand optischer Nerven neonataler Ratten wurde erst kürzlich ein irreversibler, partieller Leitungsblock infolge Nikotinexposition beschrieben (50 μmolare Nikotinlösung), inhibierbar durch vorausgehende Applikation des $\alpha_4\beta_2$-nAChR- und α_7-nAChR-Antagonisten Mecamylamin. Histologische Untersuchungen zeigten keine axonalen Schäden, dafür aber ausgedehnte Schädigungen von Oligodendrozyten und Astrozyten, wobei signifikant mehr Astrozyten als Oligodendrozyten betroffen waren. Bei Oligodendrozyten kam es gehäuft zur Vakuolenbildung innerhalb der Zellmembran, bei Astrozyten zu einer plumpen Vergrößerung von Mitochondrien, generalisierter Vakuolenbildung und einem gesteigerten Membranumsatz. Ca^{2+}-Konzentrationsanstiege infolge Aktivierung nikotinerger Acetylcholinrezeptoren werden sowohl für Astrozyten als auch für Oligodendrozyten beschrieben und könnten Teil des zugrun-

deliegenden Pathomechanismus beschriebener Astrozyten- und Oligodendrozytenveränderungen sein (Constantinou et Fern, 2009).

Dass Nikotin experimentell in relativ hoher Konzentration einen irreversiblen, partiellen, Rezeptor-vermittelten Nervenleitungsblock verursacht, welcher histologisch mit Veränderungen der Gliastruktur ohne markante axonale Schädigung einhergeht, suggeriert, dass Nikotin innerhalb der weißen Substanz möglicherweise auch in Raucher-üblichen Konzentrationen eher toxisch auf gliales Gewebe als auf Axone wirkt und wäre vereinbar mit dem von uns nicht nachweisbaren signifikanten Rauchereffekt für NAA/Cre in RFWM. Dafür spräche auch, dass sich für myo-Inositol in RFWM ein signifikanter Rauchereffekt nachweisen lässt, zumal myo-Inositol häufig als Astrozytenmarker interpretiert wird bzw. einen vermehrten Anfall von Myelinspaltprodukten widerspiegeln kann (siehe Abschnitt 4.5.2). Allerdings geht die Signifikanz dieses Effekts ($p = 0{,}010$) nach Durchführung der Korrektur nach Bonferroni verloren ($p = 0{,}090$), ein statistischer Trend ($p \leq 0{,}100$) bleibt jedoch bestehen.

4.5 Nebenhypothesen und weitere Fragestellungen

4.5.1 Kortikale Voxel grauer Substanz: tCho/Cre bzw. mIns/Cre in ACC und PCC

4.5.1.1 tCho/Cre in ACC bzw. PCC

Das mittels ^{1}H-NMR gemessene Gesamtcholin (tCho) setzt sich vor allem aus freiem Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin zusammen. In der Literatur werden absolute Konzentrationen für [tCho] für die weiße Substanz mit durchschnittlich 1,6 mmol/l angegeben, Konzentrationen für die graue Substanz mit durchschnittlich 1,4 mmol/l (Ross et Bluml, 2001). Dieser relativ geringe Konzentrationsunterschied für [tCho] zwischen weißer und grauer Substanz ist hauptsächlich dadurch bedingt, dass Phosphatidylcholin als bedeutender Myelin- und Membranbestandteil normalerweise mittels Protonenspektroskopie infolge seiner Immobilität nicht detektiert werden kann (Ross et Bluml, 2001). Direkte Rückschlüsse auf relative Myelin- oder Membrananteile lassen sich daher aus [tCho] bzw. tCho/Cre nicht ziehen, indirekte Rückschlüsse hingegen schon, insofern diese messbaren Metabolite ein Bausteinreservoir für metabole und katabole Membranprozesse (Myelinstoffwechsel) widerspiegeln (Ross & Michaelis, 1994).

Signifikant *erhöhte* tCho/Cre-Quotienten im Sinne vermehrt anfallender Myelin- oder Membranspaltpodukte, beispielsweise als Folge eines gesteigerten Membranumsatzes oder von Demyelinisierungsprozessen, lassen sich in unserer Studie bei rauchenden Probanden jedoch weder kortikal noch in der weißen Substanz nachweisen. Wie unter 4.5.2.2 ausführlich beschrieben, wird in der Literatur neben Gesamtcholin auch myo-Inositol als Myelinabbauprodukt interpretiert (Ross et Bluml, 2001): In unserer Studie zeigen Raucher gegenüber Nierauchern kortikal jedoch keine signifikanten Unterschiede ihrer myo-Inositol/Creatin-Quotienten.

Laut Miller beschreibt die Fläche unterhalb der Cholinresonanz bei 3,20 ppm nicht nur die Gesamtresonanz freien Cholins, Phosphocholins und Glycerophosphocholins, sondern auch den zellulären Dichtegrad innerhalb des untersuchten VOI. VOI hyperplastischer Tumoren zeigen höhere Gesamtcholin-Spiegel, Voxel zerfallender Tumoren oder Abszesse niedrigere tCho-Spiegel (Miller et al., 1996).

Anhand der unter 3.2.2 dargestellten ANCOVA zeigen Raucher im ACC signifikant *niedrigere* tCho/Cre-Quotienten ($p = 0{,}025$). Interpretiert man die im ACC erniedrigten tCho/Cre-Quotienten als Verminderung der zelluläreren Dichte (Miller et al., 1996), unterscheiden sich Raucher und Nieraucher dort bezüglich ihrer Zelldichte signifikant. Für PCC oder RFWM lassen sich keine signifikanten Unterschiede für tCho/Cre nachweisen, es handelt sich somit um einen regionalen Effekt innerhalb des ACC.

Allerdings zeigt sich bei Gallinat im ACC kein signifikanter Mittelwertunterschied für Gesamtcholin. Zudem beschreibt Gallinat im ACC von Rauchern eine positive Korrelation zwischen Packungsjahren und absoluter Gesamtcholinkonzentration (Gallinat et al., 2007). Unsere Studie zeigt für tCho/Cre keine entsprechende Korrelation, möglicherweise aufgrund vorhandener Alters- oder Geschlechtseffekte. Dass Packungsjahre bei Gallinat mit höheren [tCho]-Konzentrationen korreliert sind, aktiver Raucherstatus in unserer Studie dagegen mit erniedrigten tCho/Cre-Quotienten assoziiert ist, erscheint widersprüchlich, könnte jedoch durch den früheren Rauchbeginn der Probanden unserer Studie bedingt sein oder Folge geschlechtsspezifischer Nikotineffekte, zumal sich Männer und Frauen bezüglich tCho/Cre im ACC hochsignifikant unterscheiden ($p < 0{,}001$, siehe 3.2.2).

Mittels Voxel-basierter Morphometrie wurden für Raucher bereits erniedrigte Volumina des ACC beschrieben, die sich allerdings, wie unter 1.1.6.2 beschrieben, auch in anderen Hirnregionen nachweisen lassen. Dichtedefizite des ACC wurden jedoch weder von Brody oder Gallinat beschrieben, Gallinat beschreibt aber Dichteverminderungen innerhalb des mittleren Cingulums und beide beobachten Dichteverminderungen innerhalb unterschiedlicher Regionen des präfrontalen Kortex (Brody et al., 2004; Gallinat et al., 2006).

Für eine Dichteverminderung infolge nichtneuronaler Defizite innerhalb des ACC spräche neben der Abwesenheit eines NAA-Effekts die Beobachtung, dass frontotemporale Projektionen innerhalb des Cingulums zu den am spätesten myelinisierten Faserverbindungen des Menschen gehören, wie erst kürzlich mittels Diffusionstensor-Imaging (DTI) gezeigt werden konnte (Lebel et al., 2008). Nikotinabusus während der Adoleszenz könnte diese Verbindungen schädigen, zumal seit kurzem bekannt ist, dass höhere Nikotinkonzentrationen experimentell mit Nikotinrezeptor-vermittelten Gliaschäden assoziiert sein können (Constantinou et Fern, 2009; ausführlich unter 4.4 beschrieben) und Nikotinrezeptoren nicht nur von Neuronen exprimiert werden, sondern auch von Astrozyten und Oligodendrogliavorläuferzellen. Ent-

sprechende Gliaschädigungen geringeren Ausmaßes könnten die in Kapitel 1 beschriebenen funktionellen und strukturellen Veränderungen des ACC zum Teil erklären.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass der hier beschriebene Rauchereffekt Zufallscharakter trägt, zumal eine Korrektur nach Bonferroni zum Signifikanzverlust führt ($p = 0{,}225$), so dass die vorausgehende Interpretation spekulativ bleibt.

4.5.1.2 mIns/Cre in ACC bzw. PCC

Bei Inositol handelt es sich um einen zyklischen Polyalkohol, welcher ubiquitär in neun Isomeren vorkommen kann. Von diesen neun Isomeren findet man myo-Inositol als biologisch aktives Stereoisomer im ZNS am häufigsten. Myo-Inositol kann entweder als wichtiger Ernährungsbestandteil oral mit der Nahrung aufgenommen werden oder aber im ZNS enzymatisch aus Glucose-6-Phosphat de novo synthetisiert werden. Zudem stellt es einen bedeutenden Wachstumsfaktor menschlicher Zellen dar, aber auch ein wichtiges Osmolyt (Häussinger, 1994; Kim et al., 2005).

Veränderungen des myo-Inositol-Niveaus können unterschiedlich interpretiert werden. Einerseits wird myo-Inositol in MRS-Untersuchungen neben freiem Gesamtcholin als Myelin-Spaltprodukt beschrieben, andererseits als Astrozytenmarker (Ross et Bluml, 2001; Ross et Michaelis, 1994). Zudem ist myo-Inositol Ausgangssubstrat des Phosphatidylinositol-Stoffwechsels und somit eine Vorstufe der Inositol-1,4,5-trisphophat(IP_3)-Kaskade (Kim et al., 2005). Allerdings liegen physiologische Gewebskonzentration von IP_3 bei weniger als 100 nmol/l und somit weit unterhalb der Detektionsgrenze der in vivo ^{1}H-MRS von etwa 1 mmol/l.

In unserer Studie unterscheiden sich Raucher und Nieraucher kortikal weder im ACC noch im PCC signifikant hinsichtlich ihrer myo-Inositol/Creatin-Quotienten ($p \geq 0{,}232$).

Im Vergleich gesunder Raucher mit gesunden Nichtrauchern mittels MRSI findet Durazzo kortikal ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für myo-Inositol (Durazzo et al., 2004), allerdings eignet sich die von dieser Arbeitsgruppe angewandte Methodik nur äußerst begrenzt für quantitative Aussagen zu myo-Inositol (siehe 4.5.2.2).

Der Fehler 2. Art ist auch hier nicht sicher auszuschließen.

4.5.2 Weiße Substanz rechtfrontal (RFWM): tCho/Cre bzw. mIns/Cre

4.5.2.1 tCho/Cre in RFWM

Für tCho/Cre ergibt die Kovarianzanalyse in RFWM keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nierauchern.

Signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nierauchern hinsichtlich der zellulären Dichte oder der Konzentration vermeintlicher Membran- bzw. Myelinspaltprodukte (siehe auch 4.5.1.1) innerhalb der rechtsfrontalen weißen Substanz erscheinen daher eher unwahrscheinlich, es sei denn, es käme zum vermehrten Anfall solcher Spaltprodukte bei gleichzeitig verringerter Zelldichte. Auch bei Durazzo (Durazzo et al., 2004) unterscheiden sich Raucher und Nichtraucher nicht signifikant bezüglich ihrer Gesamtcholin-Spiegel innerhalb der weißen Substanz.

4.5.2.2 mIns/Cre in RFWM

Während die Kovarianzanalyse unter 3.2.2 zwischen Rauchern und Nierauchern kortikal keine signifikanten Unterschiede für mIns/Cre-Konzentrationen anzeigt, zeigen Raucher im Vergleich zu Nierauchern innerhalb des rechtsfrontalen Marklagers (RFWM) unter Adjustierung signifikant höhere mIns/Cre-Quotienten ($p = 0{,}010$).

Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich wird, werden mIns/Cre-Quotienten der weißen Substanz weiterhin signifikant durch Alter ($p = 0{,}006$) und Alkoholkonsum ($p = 0{,}047$) beeinflusst, nicht aber durch das Geschlecht ($p = 0{,}371$). Postmortale Untersuchungen bestätigen, dass sich Männer und Frauen hinsichtlich ihrer zerebralen myo-Inositol-Konzentrationen nicht signifikant unterscheiden (Shimon et al., 1997).

Ursächlich für die bei Rauchern innerhalb der frontalen weißen Substanz erhöhten mIns/Cre-Quotienten könnten Gliaveränderungen sein, zumal DTI-Untersuchungen bei Rauchern erhöhte Werte fraktioneller Anistotropie (FA) zeigen (Jacobsen et al., 2007; Paul et al., 2008) und erst kürzlich anhand derselben Methode gezeigt werden konnte, dass die physiologische Ausreifung eines Teils der frontotemporalen Verbindungen nicht vor dem 25. Lebensjahr abgeschlossen ist (Lebel et al., 2008), die meisten Raucher jedoch in ihrer Adoleszenz mit dem

Rauchen beginnen. Eine volumetrische Untersuchung beschreibt zudem für Raucher temporal vergrößerte Volumina weißer Substanz (Gazdzinski et al., 2005).

Wie bereits unter 4.4 beschrieben, exprimieren Astrozyten (Sharma et Vijayaraghavan, 2001, 2002; Teaktong et al., 2003) und oligodenrogliale Vorläuferzellen (Rogers et al., 2001) funktionelle Nikotinrezeptoren. Dementsprechend könnte Nikotinabusus während der Adoleszenz den Reifungsprozess der weißen Substanz beeinträchtigen. Dass Nikotin in höheren Konzentrationen experimentell einen irreversiblen, Nikotinrezeptor-vermittelten Leitungsblock verursacht, welcher histologisch durch gliale Schädigungen bei intakter Axonstruktur charakterisiert ist, suggeriert gegenüber glialen Anteilen weißer Substanz eine höhere Vulnerabilität als gegenüber axonalen Anteilen. Möglicherweise zeigen sich derartige Gliaschäden in geringerem Aumaß auch bei Nikotinkonzentrationen, welche Gewebs-Nikotinkonzentrationen aktiver Raucher entsprechen.

Die in unserer Studie bei Rauchern erhöhten mIns/Cre-Quotienten können als Zunahme des relativen Astrozytenvolumens innerhalb des Untersuchungsvolumens der weißen Substanz Voxels interpretiert werden, beispielsweise infolge reaktiver Astrozytenschwellung. Ursächlich für derartige Astrozytenschwellungen könnten pathologische Ca^{2+}-Konzentrationsanstiege infolge prolongierter Nikotinrezeptoraktivierung bei chronischem Nikotinabusus sein. Möglicherweise trägt ein vermehrter Anfall an Myelinspaltprodukten zum signifikant erhöhten Niveau des myo-Inositols bei, *per se* können derartige Spaltprodukte den signifikanten Unterschied der mIns/Cre-Quotienten jedoch nicht erklären, da sich für RFWM kein signifikanter Unterschied des tCho-Spiegels nachweisen lässt.

Dass sich bei Durazzo, im Gegensatz zu unserer Studie, in der frontalen weißen Substanz kein signifikanter Unterschied für myo-Inositol ergibt, ist vermutlich dadurch bedingt, dass myo-Inositol dort mit einer deutlich geringeren Sensitivität gemessen wurde, bedingt durch multiple kleine Voxel bei gleichzeitiger Wahl einer Echozeit von 144ms und der Feldstärke von 1,5 Tesla. Durch Wahl der optimalen Kopfspule, der kurzen Echozeit von 30 ms, der doppelten Magnetfeldstärke von 3,0 Tesla und der größeren Untersuchungsvolumina fällt das SNR unserer Untersuchung um ein vielfaches höher aus als bei Durazzo und Kollegen.

Es ist anzumerken, dass der in der weißen Substanz beobachtete adjustierte Rauchereffekt für mIns/Cre ($p = 0{,}010$) Zufallscharakter tragen könnte, zumal auch hier eine Korrektur nach Bonferroni zum Signifikanzverlust führt ($p = 0{,}090$), allerdings besteht nach Bonferroni-Korrektur weiterhin ein statistischer Trend ($p < 0{,}100$).

4.5.2.3 Mögliche klinische Relevanz des für mIns/Cre in RFWM beobachteten Rauchereffekts

Eine aktuelle Metaanalyse beschreibt gegenüber Rauchern ein 1,2- bis 1,5-fach erhöhtes Risiko an Enzephalomyelitis disseminata (ED; früher *Multiple Sklerose*) zu erkranken (Hawkes, 2007). Zudem gilt Rauchen als Risikofaktor für die Konversion eines *Clinically isolated Syndromes* (CIS) zur klinisch diagnostizierten ED, zumal eine Längsschnittstudie von 129 Patienten mit CIS ergab, dass 75 Prozent rauchender CIS-Patienten gegenüber 51 Prozent nichtrauchender CIS-Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 36 Monaten mit einer ED diagnostiziert wurden (Di Pauli et al., 2008). Insbesondere Patienten, die früh mit dem Rauchen beginnen, zeigen signifikant häufiger Progressionen ihrer körperlichen Einschränkung und chronischere Verlaufsformen als nichtrauchende Patienten (Sundström et Nyström, 2008). Plaques von Patienten mit ED oder CIS zeigen in zahlreichen Studien erniedrigte NAA-Konzentrationen bei gleichzeitig erhöhten myo-Inositol-Konzentrationen (Bitsch et al., 1999; Brex et al., 2000; Bruhn et al., 1992; Falini et al., 1998; Kapeller et al., 2001, 2002; Landtblom et al., 1996).

In den letzten Jahren erfolgten zudem mehrfach MRS-Untersuchungen der sich im MRT normal darstellenden weißen Substanz (NAWM; *normal appearing white matter*) außerhalb ED-typischer Läsionen, von denen die Mehrheit erhöhte myo-Inositol-Niveaus (Bitsch et al., 1999; Chard et al., 2002; Fernando et al., 2004; Kapeller et al., 2001, 2002; Sastre-Garriga et al., 2005; Summers et al., 2008) und ein Teil erniedrigte NAA-Niveaus (Chard et al., 2002; Kapeller et al., 2001; Sastre-Garriga et al., 2005; Wattjes et al., 2008) beschreiben.

Möglicherweise finden sich leichtere Formen Nikotin-assoziierter Gliaschäden wie von Constantinou und Fern experimentell nachgewiesen auch infolge chronischer Exposition niedrigerer Nikotinkonzentrationen bei gesunden Rauchern. Bei rauchenden Patienten mit ED oder CIS könnte es sich um additive oder potenzierte Gliaschädigungen handeln, welche zum erhöhten Erkrankungsrisiko bzw. der erhöhten Konversionsrate beitragen könnten.

4.5.2.4 Korrelationen

Packungsjahre, durchschnittliche Anzahl gerauchter Zigaretten pro Tag bzw. Alter bei Rauchbeginn korrelieren weder mit NAA/Cre in ACC, tCho/Cre in ACC oder mIns/Cre in RFWM signifikant.

Dass sich für NAA/Cre innerhalb des ACC keine signifikanten Korrelationen mit genannten Rauchervariablen nachweisen lassen ($p \geq 0{,}358$), ist vermutlich dadurch bedingt, dass sich Raucher und Nieraucher im ACC nicht oder zumindest nur geringgradig bezüglich ihrer NAA/Cre-Quotienten unterscheiden.

Dass sich, trotz der beobachteten Rauchereffekte, für tCho/Cre in ACC ($p \geq 0{,}602$) bzw. für mIns/Cre in RFWM ($p \geq 0{,}308$) keine signifikanten Korrelationen mit oben genannten Rauchervariablen ergeben, ist für tCho/Cre vermutlich durch gleichzeitig vorhandene, signifikante Alters- ($p < 0{,}030$) und Geschlechtseffekte ($p < 0{,}001$) bedingt, bei mIns/Cre wahrscheinlich Folge signifikanter Alters- ($p < 0{,}006$) und Alkoholeffekte ($p < 0{,}047$).

4.6 Limitierung der Studie

Bei den beschriebenen Rauchereffekten handelt es sich um vorläufige Ergebnisse, welche zunächst von anderen Arbeitsgruppen repliziert werden müssen.

Da es sich bei den beobachteten Rauchereffekten für tCho/Cre im ACC und mIns/Cre in RFWM nicht um die primär zu untersuchenden Parameter handelt wurde eine Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Diese Korrektur führt im ACC für tCho/Cre zum vollständigen Signifikanzverlust (p = 0,225), für mIns/Cre bleibt in RFWM zumindest ein statistischer Trend (p = 0,090) zugunsten eines Rauchereffekts bestehen.

Eine zukünftige Studie könnte gleichaltrige Raucher und Nieraucher untersuchen, wobei Raucher optimalerweise im selben Alter mit dem Rauchen begonnen haben sollten und eine vergleichbare Anzahl an Packungsjahren und Zigaretten pro Tag aufweisen. Probanden mit früherem Rauchbeginn und stärkerem Tabakkonsum zeigen möglicherweise deutlichere Unterschiede ihrer zerebralen Metabolitenkonzentrationen, sollten sich jedoch optimalerweise bezüglich ihres Alkoholkonsums von Nierauchern kaum unterscheiden.

Die Anzahl der untersuchten Raucher unserer Studie ist eher gering und sollte in zukünftigen Studien größer gewählt werden um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Fehlers 2. Art zu reduzieren. Dadurch, dass nur 11 Probanden unserer Studie Raucher sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nichtsignifikante Effekte unserer Studie bei einem größeren Probanden-/ Raucherkollektiv signifikant ausfallen. Zudem muss man berücksichtigen, dass myo-Inositol-Gewebsspiegel inter- und intraindividuell stärker schwanken als die von Creatin, NAA oder Gesamtcholin, was ebenfalls für ein größer zu wählendes Probandenkollektiv spricht.

An einem Alters-, Geschlechts- und Alkoholkonsum-gematchten Nieraucher-/ Raucherkollektiv lassen sich möglicherweise auch Korrelationen mit Rauchervariablen nachweisen (z.B. Packungsjahre, täglich gerauchte Zigaretten bzw. Alter bei Rauchbeginn). Die in dieser Studie erfolgte Adjustierung der Metabolitenquotienten könnte dann entfallen.

Interessant wäre weiterhin eine Untersuchung bei noch größerer Feldstärke, da dann infolge der verbesserten spektralen Auflösung Glutamat, Glutamin und GABA quantifiziert werden könnten. Die Quantifikationsgenauigkeit der myo-Inositol-Resonanz ist infolge ihrer relativen

Nähe zur Wasserresonanz fehleranfälliger als beispielsweise die Quantifikation der NAA-Resonanz und würde ebenfalls von der Wahl eines Scanners noch größerer Feldstärke profitieren.

Zudem entspricht unsere Studie einer Querschnittsuntersuchung, so dass nicht genau differenziert werden kann, ob es sich bei den zu beobachtenden Rauchereffekten um a posteriori entstandene oder möglicherweise bereits a priori bestehende Unterschiede des zerebralen Metabolitenprofils handelt. Eine Längsschnittstudie jugendlicher Nichtraucher könnte hinsichtlich dieser Fragestellung weiterhelfen.

Eine der Stärken dieser Untersuchung ist die überdurchschnittliche hohe Tomographen-Feldstärke von 3,0 Tesla. Messzeiten an Tomographen mit 3,0 Tesla sind in Berlin derzeit nur begrenzt verfügbar.

Insbesondere profitiert diese Untersuchung von der Expertise eines sehr erfahrenen Radiologen und MRS-Experten, so dass die ausgewerteten Spektren hohen Qualitätsanforderungen entsprechen und keine Artefakte enthalten, nicht zuletzt Folge optimaler *Shimming*-Resultate. Aufgrund seiner Anwesenheit bei allen Messungen konnten Untersuchungsvolumina optimal und reliabel platziert werden, Spektren mit Artefakten wurden gegebenenfalls unmittelbar nach Durchführung der entsprechenden PRESS-Sequenz identifiziert, verworfen und wiederholt gemessen.

Alle Probanden wurden weiterhin ausführlich bezüglich psychiatrischer, neurologischer oder somatischer Erkrankungen gescreent, so dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten entsprechender Confounder minimiert werden konnte. Zudem wurden nur Nichtraucher eingeschlossen, die laut Anamnese in ihrem Leben maximal 5 Zigaretten geraucht hatten und Raucher, die täglich mindestens eine Zigarette rauchen. Gelegenheitsraucher und Exraucher wurden ausgeschlossen, um einen möglichst deutlichen Rauchereffekt nachzuweisen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Rauchen stellt das größte vermeidbare Gesundheitsrisiko unserer Zeit dar. Seit längerem weiß man, dass aktives und passives Zigarettenrauchen kanzerogen wirken kann und neben kardiovaskulären und pulmonalen Erkrankungen zahlreiche weitere Organsysteme beeinflussen oder schädigen kann.

Im Vergleich dazu ist die Evidenzlage der mit Rauchen bzw. Nikotinabusus assoziierten zerebralen Effekte oder Defizite eher gering, es wird jedoch mehrfach beschrieben, dass Raucher gegenüber Nikotin-naiven Nichtrauchern kognitive und elektrophysiologische Defizite zeigen, die zum Teil auch für Exraucher nach jahrelanger Abstinenz nachgewiesen werden konnten. Zudem beschreiben zerebrale Bildgebungsstudien in vivo funktionelle, strukturelle und metabolische Alterationen bei Rauchern, teilweise auch bei Exrauchern. Insbesondere strukturelle Defizite, beispielsweise als Volumen- oder Dichtedefizite verschiedener Areale kortikaler und subkortikaler grauer Substanz, wie sie wiederholt mittels Voxel-basierter Morphometrie bei Rauchern nachgewiesen werden konnten, sowie tierexperimentelle Untersuchungen fötaler und adoleszenter Ratten, welche ausgeprägte neurotoxische Nikotineffekte beschreiben, suggerieren eine mit dem Zigarettenrauchen assoziierte schädliche Wirkung gegenüber bestimmten Hirnarealen.

Methoden: Die Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS) ermöglicht aufgrund ihrer Noninvasivität zerebrale Gewebsuntersuchungen in vivo und mittels Quantifizierung detektierbarer Metabolite Interpretationen bezüglich der Zusammensetzung eines Untersuchungsvolumens (VOI). N-Acetylaspartat (NAA) beispielsweise wird häufig als neuronaler Marker interpretiert. Als robustere Metabolite der bei 3,0 Tesla mittels Einzelvolumen-1H-MRS im PRESS-Modus gemessenen Spektren wurden Creatin (Cre), N-Acetylaspartat (NAA), Gesamtcholin (tCho) und myo-Inositol (mIns) quantifiziert. Definiert wurden drei Untersuchungsvolumina - der anteriore cinguläre Kortex (ACC), der posteriore cinguläre Kortex (PCC) sowie die rechtsfrontale weiße Substanz (RFWM). Untersucht wurden gesunde Raucher (n = 11) und „Nieraucher“ (Nichtraucher, welche in ihrem Leben maximal 5 Zigaretten geraucht haben) (n = 22).

Hypothesen: *I. Haupthypothese*: Aufgrund der physiologisch relativ stabilen Konzentration des Creatins wird postuliert, dass sich Raucher und Nieraucher bezüglich ihrer Creatin-Spiegel in keinem der drei VOI signifikant unterscheiden. Trifft diese Hypothese zu, werden

Metabolitenquotienten der absoluten Konzentrationen von NAA, tCho und mIns mit Cre gebildet, um potentiell bestehende, interindividuelle Unterschiede des Liquorgehalts innerhalb der jeweiligen VOI zu berücksichtigen.

II. Haupthypothese: Kognitive, elektrophysiologische, funktionelle sowie strukturelle Defizite von Rauchern deuten insbesondere auf Alterationen des ACC hin, entsprechende Hinweise auf eine Beteiligung des PCC liegen derzeit nicht vor, weshalb der PCC als Kontrollvolumen des ACC gewählt wurde, um ACC-spezifische von globaleren kortikalen Defiziten differenzieren zu können. Da neunzig Prozent der Raucher während ihrer Adoleszenz mit dem Rauchen beginnen und Tierversuche während der fötalen und adoleszenten Entwicklung neurotoxische Nikotineffekte beschreiben, wird hypothetisiert, dass sich innerhalb des ACC signifikante Defizite für NAA/Cre finden, die sich innerhalb des PCC als nicht signifikant oder weniger deutlich ausgeprägt erweisen.

III. Haupthypothese: Alkoholabhängige Raucher zeigten frontal gegenüber alkoholabhängigen Nichtrauchern nach jeweils einwöchiger Alkoholabstinenz im Querschnitt sowie im Längsschnitt signifikante NAA-Defizite der weißen Substanz, gesunde Raucher und Nichtraucher unterschieden sich dort diesbezüglich nicht signifikant. Daher wird hypothetisiert, dass sich gesunde Raucher und Nieraucher unserer Studie in RFWM nicht signifikant hinsichtlich ihrer NAA/Cre-Quotienten unterscheiden.

Weitere Fragestellung: Sekundär sollen tCho/Cre- und mIns/Cre-Quotienten zwischen beiden Gruppen explorativ analysiert werden, wobei hyothetisiert wird, dass diese, sollten sich kortikal entsprechende Defizite nachweisen lassen, im ACC deutlicher ausfallen als innerhalb des PCC. Zudem sollen NAA/Cre-Quotienten innerhalb des ACC mit Rauchervariablen (u.a. Packungsjahre) korreliert werden, weitere Korrelationen werden für Metabolite analysiert, welche signifikante Rauchereffekte zeigen.

Ergebnisse: Anhand der durchgeführten Kovarianzanalyse (einfaktoriell, als Faktor Raucherstatus, als unabhängige Variable der jeweilige Metabolitenquotient, als Kovariablen Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum) lassen sich die folgenden Aussagen treffen:

Analog zur I. Haupthypothese unterscheiden sich Raucher und Nieraucher nicht signifikant bezüglich ihrer Creatin-Spiegel ($p \geq 0{,}485$).

Entgegen der II. Haupthypothese unterscheiden sich Raucher und Nieraucher im ACC nicht signifikant bezüglich ihrer NAA-/Cre-Quotienten ($p = 0{,}229$). Für den PCC findet sich ebe-

falls kein signifikanter Uterschied ($p = 0{,}994$). Signifikante Korrelationen zwischen NAA/Cre und Rauchervariablen ergeben sich nicht.

Entsprechend der III. Haupthypothese unterscheiden sich Raucher und Nieraucher nicht signifikant bezüglich ihrer NAA/Cre-Quotienten in RFWM.

Innerhalb des ACC zeigen Raucher gegenüber Nierauchern signifikant niedrigere Metabolitenquotienten für tCho/Cre ($p = 0{,}025$), in der weißen Substanz rechtsfrontal (RFWM) signifikante höhere Metabolitenquotienten für mIns/Cre ($p = 0{,}010$). Analog zur II. Haupthypothese zeigt sich innerhalb des PCC kein signifikanter Rauchereffekt für tCho/Cre ($p = 0{,}881$). Die Korrektur nach Bonferroni führt für tCho/Cre im ACC zum Signifikanzverlust ($p = 0{,}225$), für mIns/Cre in RFWM bleibt ein statistischer Trend bestehen ($p = 0{,}090$).

Korrelationen mit Rauchervariablen lassen sich weder für tCho/Cre im ACC, noch für mIns/Cre in RFWM nachweisen.

Diskussion:

I. Haupthypothese: Wie hypothetisiert unterscheiden sich Raucher und Nieraucher nicht signifikant bezüglich ihrer Creatin-Spiegel, so dass Quotienten für NAA, tCho und mIns mit Cre gebildet werden können.

II. Haupthypothese: Dass sich entgegen der II. Haupthypothese keine NAA-Defizite nachweisen lassen, könnte einerseits durch schwächere Effektstärken bei einer eher geringen Fallzahl bedingt sein, sich andererseits aber dadurch erklären, dass sich die lokalen, neuronalen Schädigungsmuster bestimmter Transmittersysteme im Tiermodell zwischen fötaler und adoleszenter Nikotinexposition unterscheiden: Fötale Ratten zeigen in verschiedenen Experimenten unter Nikotininfusion beispielsweise eine verminderte kortikale Paroxetinbindung bei vermehrter Paroxetinbindung im Hirnstamm, was als Schädigung kortikaler serotonerger Nervenendigungen bei reaktiver Aussprossung ihrer Zellkörper innerhalb des Hirnstamms interpretiert wurde. Ein ähnliches Schädigungsmuster findet sich bei adoleszenten Ratten unter Nikotininfusion, diese zeigen innerhalb des Hirnstamms vergleichbare Veränderungen, kortikal zeigt sich die Paroxetinbindung jedoch nicht vermindert, dafür aber in Hippocampus und Striatum. Diese Beobachtung ist vereinbar mit einer aktuellen MRS-Untersuchung, welche bei Rauchern innerhalb des Hippocampus NAA-Defizite nachweisen konnte, nicht aber innerhalb des ACC, zumal der Großteil aller Raucher während der Adoleszenz mit dem Rauchen beginnt.

Interessanterweise zeigen Raucher in unserer Studie signifikant niedrigere Werte für Gesamtcholin innerhalb des ACC ($p = 0{,}025$), interpretierbar als verminderte zelluläre Dichte bei unverändertem Neuronengehalt und möglicherweise verringertem Gliagehalt dieses VOI. Allerdings führt die durchgeführte Korrektur nach Bonferroni zum Signifikanzverlust dieses Effekts ($p = 0{,}225$), so dass diese Interpretation spekulativ bleibt.

Entsprechend der III. Haupthypothese unterscheiden sich Raucher und Nieraucher nicht bezüglich ihrer NAA/Cre-Quotienten in RFWM, Raucher zeigen dort jedoch signifikant erhöhte Werte für mIns/Cre ($p = 0{,}010$), was ebenso auf gliale Veränderungen durch Zigarettenrauchen hinweisen könnte, zumal mIns häufig als Astrozytenmarker interpetiert wird. Jedoch bleibt auch diese Interpretation spekulativ, zumal die Korrektur nach Bonferroni hier ebenfalls zum Signifikanzverlust führt, wenn auch diesbezüglich ein statistischer Trend bestehen bleibt ($p = 0{,}090$).

Letztendlich handelt es sich bei den beschriebenen Beobachtungen um vorläufige Ergebnisse. Sollte der beobachtete statistische Trend eines Rauchereffekts für myo-Inositol in RFWM statistisch signifikant repliziert werden können, könnte die Frage nach der Kausalität zwischen Nikotin-/Tabakrauchexposition und dem beobachteten Rauchereffekt jedoch nur im Falle einer Längsschnittstudie adressiert werden, da beobachtete Unterschiede bereits a priori vorhanden sein können.

6 Literaturverzeichnis

Abrous, D. N., Adriani, W., Montaron, et al. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci*, *22*(9), 3656-62.

Altman, J., Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *124*(3), 319-35.

Ambrose, J. A., Barua, R. S. (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: An update. *J Am Coll Cardiol*, *43*(10), 1731-7.

Anderson, D. J., Arneric, S. P. (1994). Nicotinic receptor binding of [3H]cytisine, [3H]nicotine and [3H]methylcarbamylcholine in rat brain. *Eur J Pharmacol*, *253*(3), 261-7.

Anokhin, A. P., Vedeniapin, A. B., Sirevaag, E. J., et al. (2000). The P300 brain potential is reduced in smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *149*(4), 409-13.

Beaulieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed*, *15*(7-8), 435-55.

Benowitz, N. L. (2008). Pharmacology of nicotine: Addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*

Berger, F., Gage, F. H., Vijayaraghavan, S. (1998). Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(17), 6871-81.

Bien, T. H., Burge, R. (1990). Smoking and drinking: A review of the literature. *Int J Addict*, *25*(12), 1429-54.

Bitsch, A., Bruhn, H., Vougioukas, V., et al. (1999). Inflammatory CNS demyelination: Histopathologic correlation with in vivo quantitative proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*, *20*(9), 1619-27.

Bramon, E., McDonald, C., Croft, R. J., et al. (2005). Is the P300 wave an endophenotype for schizophrenia? A meta-analysis and a family study. *Neuroimage*, *27*(4), 960-8.

Brex, P. A., Parker, G. J., Leary, S. M., et al. (2000). Lesion heterogeneity in multiple sclerosis: A study of the relations between appearances on T1 weighted images, T1 relaxation times, and metabolite concentrations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *68*(5), 627-32.

Brody, A. L., Mandelkern, M. A., Jarvik, M. E., et al. (2004). Differences between smokers and nonsmokers in regional gray matter volumes and densities. *Biol Psychiatry*, *55*(1), 77-84.

Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., et al. (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Arch Gen Psychiatry*, *59*(12), 1162-72.

Bruhn, H., Frahm, J., Gyngell, M.L., et al. (1989a). Cerebral metabolism in man after acute stroke: new observations using localized proton NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*, 9: 126-131.

Bruhn, H., Frahm, J., Gyngell M.L., et al. (1989b). Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy in vivo: initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology, 172*(2):318-20.

Bruhn, H., Frahm, J., Merboldt, K. D., et al. (1992). Multiple sclerosis in children: Cerebral metabolic alterations monitored by localized proton magnetic resonance spectroscopy in vivo. *Annals of Neurology*, *32*(2), 140-50.

Bruhn, H., Brauer, M., Merboldt, K.D., et al. (2004). The Effects of Nicotine on the Blood Exygenation Level Dependent Response at Functional MR Neuroimaging of Habitual Smokers. Posterpresentation at the *10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (HBM 2004)*, Budapest.

Burtscher, I. M., Holtås, S. (2001). Proton MR spectroscopy in clinical routine. *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI*, *13*(4), 560-7.

Carter, B. L., Tiffany, S. T. (1999). Meta-Analysis of cue-reactivity in addiction research. *Addiction (Abingdon, England)*, *94*(3), 327-40.

CDC (Centers for Disease Control) (1991). Smoking-Attributable mortality and years of potential life lost--united states, 1988. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *40*(4), 62-3, 69-71.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2008). Smoking-Attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses--united states, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *57*(45), 1226-8.

Chard, D. T., Griffin, C. M., McLean, et al. (2002). Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain*, *125*(Pt 10), 2342-52.

Chen, D., Patrick, J. W. (1997). The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(38), 24024-9.

Chen, J., Millar, W. J. (1998). Age of smoking initiation: Implications for quitting. *Health Rep*, *9*(4), 39-46.

Chen, W. J., Edwards, R. B., Romero, R. D., Parnell, S. E., Monk, R. J. (2003). Long-Term nicotine exposure reduces purkinje cell number in the adult rat cerebellar vermis. *Neurotoxicol Teratol*, *25*(3), 329-34.

Coe, J. W., Brooks, P. R., Vetelino, M. G., et al. (2005). Varenicline: An alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J Med Chem*, *48*(10), 3474-7.

Conrin, J. (1980). The EEG effects of tobacco smoking--a review. *Clin Electroencephalogr*, *11*(4), 180-7.

Constantinou, S., Fern, R. (2009). Conduction block and glial injury induced in developing central white matter by glycine, GABA, noradrenalin, or nicotine, studied in isolated neonatal rat optic nerve. *Glia.* [Epub ahead of print]

Cowan, W. M., Fawcett, J. W., O'Leary, D. D., Stanfield, B. B. (1984). Regressive events in neurogenesis. *Science*, *225*(4668), 1258-65.

Demougeot, C., Garnier, P., Mossiat, C., et al. (2001). N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: Its relevance to studies of acute brain injury. *Journal of Neurochemistry*, *77*(2), 408-15.

Di Pauli, F., Reindl, M., Ehling, R., et al. (2008). Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Mult Scler*, *14*(8), 1026-30.

DiFranza, J. R., Guerrera, M. P. (1990). Alcoholism and smoking. *Journal of Studies on Alcohol*, *51*(2), 130-5.

Domino, E. F. (2003). Effects of tobacco smoking on electroencephalographic, auditory evoked and event related potentials. *Brain and Cognition*, *53*(1), 66-74.

Domino, E. F., Minoshima, S., Guthrie, S., et al. (2000). Nicotine effects on regional cerebral blood flow in awake, resting tobacco smokers. *Synapse*, *38*(3), 313-21.

Due, D. L., Huettel, S. A., Hall, W. G., Rubin, D. C. (2002). Activation in mesolimbic and visuospatial neural circuits elicited by smoking cues: Evidence from functional magnetic resonance imaging. *American Journal of Psychiatry*, *159*(6), 954-960.

Durazzo, T. C., Gazdzinski, S., Banys, P., Meyerhoff, D. J. (2004). Cigarette smoking exacerbates chronic alcohol-induced brain damage: A preliminary metabolite imaging study. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *28*(12), 1849-60.

Durazzo, T. C., Gazdzinski, S., Rothlind, J. C., Banys, P., Meyerhoff, D. J. (2006). Brain metabolite concentrations and neurocognition during short-term recovery from alcohol dependence: Preliminary evidence of the effects of concurrent chronic cigarette smoking. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *30*(3), 539-51.

Duus, P. (1995). *Neurologisch-Topische Diagnostik : Anatomie, Physiologie, Klinik.* Stuttgart: Thieme.

Edelman, R., Hesselink, J., Zlatkin, M., Crues, J., eds. (2005). *Clinical Magnetic Resonance Imaging, 3 Vols.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders, vol. I chapt. I.3-I.5, I.15, I.17, vol. II chapt. III.61.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., et al. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, *4*(11), 1313-7.

Ernst, M., Heishman, S. J., Spurgeon, L., London, E. D. (2001). Smoking history and nicotine effects on cognitive performance. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *25*(3), 313-9.

Falini, A., Calabrese, G., Filippi, M., et al. (1998). Benign versus secondary-progressive multiple sclerosis: The potential role of proton MR spectroscopy in defining the nature of disability. *AJNR Am J Neuroradiol*, *19*(2), 223-9.

Fernando, K. T., McLean, M. A., Chard, D. T., et al. (2004). Elevated white matter myo-inositol in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain*, *127*(Pt 6), 1361-9.

Flores, C. M., Rogers, S. W., Pabreza, L. A., Wolfe, B. B., Kellar, K. J. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol*, *41*(1), 31-7.

Foulds, J., Stapleton, J., Swettenham, J., Bell, N., McSorley, K., Russell, M. A. (1996). Cognitive performance effects of subcutaneous nicotine in smokers and never-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *127*(1), 31-8.

Fowler, J. S., Logan, J., Wang, G. J., et al. (2003). Low monoamine oxidase B in peripheral organs in smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11600-5.

Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G. J., et al. (1998). Neuropharmacological actions of cigarette smoke: Brain monoamine oxidase B (MAO B) inhibition. *Journal of Addictive Diseases*, *17*(1), 23-34.

Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G. J., et al. (1996). Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 14065-9.

Frahm, J., Bruhn, H., Hänicke, W. et al. (1991). Localized proton NMR spectroscopy of brain tumors. Methodologic improvements using short-echo time STEAM sequences. *J Comput Assist Tomogr, 15*:915-922.

Gallinat, J., Schubert, F. (2007). Regional cerebral glutamate concentrations and chronic tobacco consumption. *Pharmacopsychiatry*, *40*(2), 64-7.

Gallinat, J., Lang, U. E., Jacobsen, L. K., et al. (2007). Abnormal hippocampal neurochemistry in smokers: Evidence from proton magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *J Clin Psychopharmacol*, *27*(1), 80-4.

Gallinat, J., Meisenzahl, E., Jacobsen, L. K., et al. (2006). Smoking and structural brain deficits: A volumetric MR investigation. *Eur J Neurosci*, *24*(6), 1744-50.

Gazdzinski, S., Durazzo, T. C., Studholme, C., Song, E., Banys, P., Meyerhoff, D. J. (2005). Quantitative brain MRI in alcohol dependence: Preliminary evidence for effects of concurrent chronic cigarette smoking on regional brain volumes. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *29*(8), 1484-95.

Ghatan, P. H., Ingvar, M., Eriksson, L., et al. (1998). Cerebral effects of nicotine during cognition in smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *136*(2), 179-89.

Giedd, J. N. (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*, 77-85.

Gotti, C., Fornasari, D., Clementi, F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Progress in Neurobiology*, *53*(2), 199-237.

Gotti, C., Moretti, M., Maggi, R., et al. (1997). Alpha7 and alpha8 nicotinic receptor subtypes immunopurified from chick retina have different immunological, pharmacological and functional properties. *Eur J Neurosci*, *9*(6), 1201-11.

Gulliver, S. B., Rohsenow, D. J., Colby, S. M., et al. (1995). Interrelationship of smoking and alcohol dependence, use and urges to use. *Journal of Studies on Alcohol*, *56*(2), 202-6.

Häussinger D., Laubenberger J., vom Dahl S., et al. (1994). Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology, 107*(5):1475-80.

Hasenfratz, M., Michel, C., Nil, R., Bättig, K. (1989). Can smoking increase attention in rapid information processing during noise? Electrocortical, physiological and behavioral effects. *Psychopharmacology (Berl)*, *98*(1), 75-80.

Haustein, K. (2008). *Tabakabhängigkeit : Gesundheitliche Schäden durch das Rauchen; Ursachen - Folgen - Behandlungsmöglichkeiten - Konsequenzen für Politik und Gesellschaft.* Berlin: Springer.

Hawkes, C. H. (2007). Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: A metanalysis. *Mult Scler*, *13*(5), 610-5.

Heishman, S. J., Snyder, F. R., Henningfield, J. E. (1993). Performance, subjective, and physiological effects of nicotine in non-smokers. *Drug and Alcohol Dependence*, *34*(1), 11-8.

Hindmarch, I., Kerr, J. S., Sherwood, N. (1990). Effects of nicotine gum on psychomotor performance in smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *100*(4), 535-41.

Hüppi, P.S., Posse S., Lazeyras, F., et al. (1991). Magnetic resonance in preterm and term newborns : 1H-spectroscopy in developing human brain. *Pediatr. Res., 30*:574-78.

Hughes, J. R., Hatsukami, D. K., Mitchell, J. E., Dahlgren, L. A. (1986). Prevalence of smoking among psychiatric outpatients. *Am J Psychiatry*, *143*(8), 993-97.

Huttenlocher, P. R. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, *163*(2), 195-205.

Huttenlocher, P. R., de Courten, C., Garey, L. J., Van der Loos, H. (1982). Synaptogenesis in human visual cortex--evidence for synapse elimination during normal development. *Neuroscience Letters*, *33*(3), 247-52.

Imamura, K. (2003). Proton MR spectroscopy of the brain with a focus on chemical issues. *Magnetic Resonance in Medical Sciences : MRMS : An Official Journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine*, *2*(3), 117-32.

Jackson, G. D., Connelly, A. (1999). New NMR measurements in epilepsy. T2 relaxometry and magnetic resonance spectroscopy. *Advances in Neurology*, *79*, 931-7.

Jacobsen, L. K., D'Souza, D. C., Mencl, W. E., Pugh, K. R., Skudlarski, P., Krystal, J. H. (2004). Nicotine effects on brain function and functional connectivity in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, *55*(8), 850-8.

Jacobsen, L. K., Gore, J. C., Skudlarski, P., Lacadie, C. M., Jatlow, P., Krystal, J. H. (2002). Impact of intravenous nicotine on BOLD signal response to photic stimulation. *Magn Reson Imaging*, *20*(2), 141-5.

Jacobsen, L. K., Krystal, J. H., Mencl, W. E., Westerveld, M., Frost, S. J., Pugh, K. R. (2005). Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biol Psychiatry*, *57*(1), 56-66.

Jacobsen, L. K., Picciotto, M. R., Heath, C. J., et al. (2007). Prenatal and adolescent exposure to tobacco smoke modulates the development of white matter microstructure. *J Neurosci*, *27*(49), 13491-8.

Jacobsen, L. K., Pugh, K. R., Mencl, W. E., Gelernter, J. (2006). C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor gene modulates the effect of nicotine on working memory performance and cortical processing efficiency. *Psychopharmacology (Berl)*, *188*(4), 530-40.

Jacobsen, L. K., Slotkin, T. A., Westerveld, M., Mencl, W. E., Pugh, K. R. (2006). Visuospatial memory deficits emerging during nicotine withdrawal in adolescents with prenatal exposure to active maternal smoking. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *31*(7), 1550-61.

Kaiser, L. G., Schuff, N., Cashdollar, N., Weiner, M. W. (2005). Age-Related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T. *Neurobiol Aging*, *26*(5), 665-72.

Kaneko, S., Maeda, T., Kume, T., et al. (1997). Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res*, *765*(1), 135-40.

Kapeller, P., Brex, P. A., Chard, D., et al. (2002). Quantitative 1H MRS imaging 14 years after presenting with a clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler*, *8*(3), 207-10.

Kapeller, P., McLean, M. A., Griffin, C. M., et al. (2001). Preliminary evidence for neuronal damage in cortical grey matter and normal appearing white matter in short duration relapsing-remitting multiple sclerosis: A quantitative MR spectroscopic imaging study. *J Neurol*, *248*(2), 131-8.

Keenan, R. M., Hatsukami, D. K., Anton, D. J. (1989). The effects of short-term smokeless tobacco deprivation on performance. *Psychopharmacology (Berl)*, *98*(1), 126-30.

Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., et al. (2001). Alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(17), 13541-6.

Kim, H., McGrath, B. M., Silverstone, P. H. (2005). A review of the possible relevance of inositol and the phosphatidylinositol second messenger system (pi-cycle) to psychiatric disorders--focus on magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies. *Human Psychopharmacology*, *20*(5), 309-26.

Klinke, R., Bauer, C. (2003). *Lehrbuch der Physiologie.* Stuttgart; New York: Thieme.

Knizley, H. (1967). The enzymatic synthesis of n-acetyl-l-aspartic acid by a water-insoluble preparation of a cat brain acetone powder. *The Journal of Biological Chemistry*, *242*(20), 4619-22.

Knott, V. J., Harr, A., Ilivitsky, V., Mahoney, C. (1998). The cholinergic basis of the smoking-induced EEG activation profile. *Neuropsychobiology*, *38*(2), 97-107.

Kreis, R., Ernst, T., Ross, B. D. (1993). Development of the human brain: In vivo quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med*, *30*(4), 424-37.

Kreis, R. (2004) Issues of spectral quality in clinical 1H-magnetic spectroscopy and a gallery of artefacts. *NMR Biomed*, 17, 361-381.

Kumari, V., Postma, P. (2005). Nicotine use in schizophrenia: The self medication hypotheses. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(6), 1021-34.

Kumari, V., Gray, J. A., ffytche, D. H., et al. (2003). Cognitive effects of nicotine in humans: An fmri study. *Neuroimage*, *19*(3), 1002-13.

Kumari, V., Soni, W., Sharma, T. (2001). Influence of cigarette smoking on prepulse inhibition of the acoustic startle response in schizophrenia. *Human Psychopharmacology*, *16*(4), 321-326.

Kuryatov, A., Olale, F. A., Choi, C., Lindstrom, J. (2000). Acetylcholine receptor extracellular domain determines sensitivity to nicotine-induced inactivation. *Eur J Pharmacol*, *393*(1-3), 11-21.

Landers, D. M., Crews, D. J., Boutcher, S. H., Skinner, J. S., Gustafsen, S. (1992). The effects of smokeless tobacco on performance and psychophysiological response. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *24*(8), 895-903.

Landtblom, A. M., Sjöqvist, L., Söderfeldt, B., Nyland, H., Thuomas, K. A. (1996). Proton MR spectroscopy and MR imaging in acute and chronic multiple sclerosis--ringlike appearances in acute plaques. *Acta Radiol*, *37*(3 Pt 1), 278-87.

Lauterbur, P.C. (1973). Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature, 242*, 190-191.

Laviolette, S. R., van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci*, *5*(1), 55-65.

Lawrence, N. S., Ross, T. J., Stein, E. A. (2002). Cognitive mechanisms of nicotine on visual attention. *Neuron*, *36*(3), 539-48.

Le Houezec, J., Halliday, R., Benowitz, N. L., Callaway, E., Naylor, H., Herzig, K. (1994). A low dose of subcutaneous nicotine improves information processing in non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *114*(4), 628-34.

Lebel, C., Walker, L., Leemans, A., Phillips, L., Beaulieu, C. (2008). Microstructural maturation of the human brain from childhood to adulthood. *Neuroimage*, *40*(3), 1044-55.

de Leon, J., Diaz, F. J. (2005). A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophr Res*, *76*(2-3), 135-57.

Longstreth, W. T., Diehr, P., Manolio, T. A., et al. (2001). Cluster analysis and patterns of findings on cranial magnetic resonance imaging of the elderly: The cardiovascular health study. *Arch Neurol*, *58*(4), 635-40.

Maggio, R., Riva, M., Vaglini, F., et al. (1998). Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *Journal of Neurochemistry*, *71*(6), 2439-46.

Maggio, R., Riva, M., Vaglini, F., Fornai, F., Racagni, G., Corsini, G. U. (1997). Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental parkinsonism. *J Neural Transm Gen Sect*, *104*(10), 1113-23.

Mansvelder, H. D., Keath, J. R., McGehee, D. S. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, *33*(6), 905-19.

Markou, A., Paterson, N. E. (2001). The nicotinic antagonist methyllycaconitine has differential effects on nicotine self-administration and nicotine withdrawal in the rat. *Nicotine Tob Res*, *3*(4), 361-73.

Martin, E., Capone, A., Schneider, J., Hennig, J., Thiel, T. (2001). Absence of n-acetylaspartate in the human brain: Impact on neurospectroscopy?. *Annals of Neurology*, *49*(4), 518-21.

McDonough, B. E., Warren, C. A. (2001). Effects of 12-h tobacco deprivation on event-related potentials elicited by visual smoking cues. *Psychopharmacology (Berl)*, *154*(3), 282-91.

McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P., Role, L. W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, *269*(5231), 1692-6.

Michelis, T., Merboldt, K.D., Hänicke, W., et al. (1991).On the identification of cerebral metabolites in localized H1-NMR spectra of human brain in vivo. *NMR Biomed, 4*:90-98.

Miller, B. L., Chang, L., Booth, R., et al. (1996). In vivo 1H MRS choline: Correlation with in vitro chemistry/histology. *Life Sciences*, *58*(22), 1929-35.

Nelson, D. E., Giovino, G. A., Shopland, D. R., Mowery, P. D., Mills, S. L., Eriksen, M. P. (1995). Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *American Journal of Public Health*, *85*(1), 34-40.

Neubauer, S., Welte, R., Beiche, A., Koenig, H. H., Buesch, K., Leidl, R. (2006). Mortality, morbidity and costs attributable to smoking in germany: Update and a 10-year comparison. *Tob Control*, *15*(6), 464-71.

Neuhaus, A., Bajbouj, M., Kienast, T., et al. (2006). Persistent dysfunctional frontal lobe activation in former smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *186*(2), 191-200.

Oldendorf, W. H. (1992). Some relationships between addiction and drug delivery to the brain. *NIDA Res Monogr*, *120*, 13-25.

Oppenheim, R. W. (1985). Naturally occurring cell death during neural development. *Trends Neurosci*, *8*, 487-493.

Paul, R. H., Grieve, S. M., Niaura, R., et al. (2008). Chronic cigarette smoking and the microstructural integrity of white matter in healthy adults: A diffusion tensor imaging study. *Nicotine Tob Res*, *10*(1), 137-47.

Perkins, K. A., Grobe, J. E., Fonte, C., et al. (1994). Chronic and acute tolerance to subjective, behavioral and cardiovascular effects of nicotine in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *270*(2), 628-38.

Petrie, R. X., Deary, I. J. (1989). Smoking and human information processing. *Psychopharmacology (Berl)*, *99*(3), 393-6.

Phillips, S., Fox, P. (1998). An investigation into the effects of nicotine gum on short-term memory. *Psychopharmacology (Berl)*, *140*(4), 429-33.

Picciotto, M. R., Corrigall, W. A. (2002). Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: Neural circuits and molecular genetics. *J Neurosci*, *22*(9), 3338-41.

Picciotto, M. R., Zoli, M. (2008). Neuroprotection via nachrs: The role of nachrs in neurodegenerative disorders such as alzheimer's and parkinson's disease. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *13*, 492-504.

Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T., Dani, J. A. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, *390*(6658), 401-4.

Pierce, J. P., Gilpin, E. (1996). How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *American Journal of Public Health*, *86*(2), 253-6.

Polich, J., Ochoa, C. J. (2004). Alcoholism risk, tobacco smoking, and P300 event-related potential. *Clin Neurophysiol*, *115*(6), 1374-83.

Pritchard, W. S., Robinson, J. H., Guy, T. D. (1992). Enhancement of continuous performance task reaction time by smoking in non-deprived smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, *108*(4), 437-42.

Provencher, S. W. (1993). Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*, *30*(6), 672-9.

Provencher, S. W. (2005). LCModel & LCMgui User's Manual. Accessible at http://s-provencher.com

Purves, D., Lichtman, J. W. (1980). Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science*, *210*(4466), 153-7.

Quik, M. (2004). Smoking, nicotine and parkinson's disease. *Trends Neurosci*, *27*(9), 561-8.

Rakic, P., Riley, K. P. (1983). Overproduction and elimination of retinal axons in the fetal rhesus monkey. *Science*, *219*(4591), 1441-4.

Rezvani, A. H., Levin, E. D. (2001). Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry*, *49*(3), 258-67.

Rodgman, A., Smith, C. J., Perfetti, T. A. (2000). The composition of cigarette smoke: A retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Human & Experimental Toxicology*, *19*(10), 573.

Rogers, A. T., Wonnacott, S. (1997). Differential upregulation of alpha 7 and alpha 3 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal and PC12 cell cultures. *Biochem Soc Trans*, *25*(3), 544S.

Rogers, S. W., Gregori, N. Z., Carlson, N., Gahring, L. C., Noble, M. (2001). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression by O2A/oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*, *33*(4), 306-13.

Role, L. W., Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, *16*(6), 1077-85.

Ross, B., Bluml, S. (2001). Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat Rec (New Anat)*, *265*, 54-84.

Ross, B., Michaelis, T. (1994). Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance Quarterly*, *10*(4), 191-247.

Römpp, Falbe, Regitz (1996). *Römpp Chemie Lexikon.* Stuttgart ; New York : Thieme.

Sakurai, Y., Kanazawa, I. (2002). Acute effects of cigarettes in non-deprived smokers on memory, calculation and executive functions. *Human Psychopharmacology*, *17*(7), 369-73.

Sastre-Garriga, J., Ingle, G. T., Chard, D. T., et al. (2005). Metabolite changes in normal-appearing gray and white matter are linked with disability in early primary progressive multiple sclerosis. *Arch Neurol*, *62*(4), 569-73.

Schneiderman, J. S., Buchsbaum, M. S., Haznedar, M. M., et al. (2007). Diffusion tensor anisotropy in adolescents and adults. *Neuropsychobiology*, *55*(2), 96-111.

Schuh, K. J., Stitzer, M. L. (1995). Desire to smoke during spaced smoking intervals. *Psychopharmacology (Berl)*, *120*(3), 289-95.

Sharma, G., Vijayaraghavan, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(7), 4148-53.

Sharma, G., Vijayaraghavan, S. (2002). Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol*, *53*(4), 524-34.

Sheehan, D. V., Lecrubier, Y., Sheehan, K. H., et al. (1998). The mini-international neuropsychiatric interview (M.I.N.I.): The development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *59 Suppl 20*, 22-33;quiz 34-57.

Shimohama, S., Kihara, T. (2001). Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biol Psychiatry*, *49*(3), 233-9.

Shimon, H., Agam, G., Belmaker, R. H., Hyde, T. M., Kleinman, J. E. (1997). Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry*, *154*(8), 1148-50.

Slemmer, J. E., Martin, B. R., Damaj, M. I. (2000). Bupropion is a nicotinic antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *295*(1), 321-7.

Slotkin, T. A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: Nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol*, *198*(2), 132-51.

Slotkin, T.A. (1998). Fetal nicotine or cocaine exposure: which on eis worse? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *285*(3), 931-45.

Spilich, G. J., June, L., Renner, J. (1992). Cigarette smoking and cognitive performance. *Br J Addict*, *87*(9), 1313-26.

Srinivasan, R., Vigneron, D., Sailasuta, N., Hurd, R., Nelson, S. (2004). A comparative study of myo-inositol quantification using lcmodel at 1.5 T and 3.0 T with 3 D 1H proton spectroscopic imaging of the human brain. *Magn Reson Imaging*, *22*(4), 523-8.

Stapleton, J. M., Gilson, S. F., Wong, D. F., et al. (2003). Intravenous nicotine reduces cerebral glucose metabolism: A preliminary study. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *28*(4), 765-72.

Statistisches Bundesamt (2006). Leben in Deutschland. *Haushalte, Familien Und Gesundheit - Ergebnisse Des Mikrozensus 2005.* (Accessed March 11, 2009, at http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pk/2006/Mikrozensus/Pressebroschuere,property=file.pdf)

Stein, E. A., Pankiewicz, J., Harsch, H. H., et al. (1998). Nicotine-Induced limbic cortical activation in the human brain: A functional MRI study. *Am J Psychiatry*, *155*(8), 1009-15.

Summers, M., Swanton, J., Fernando, K., et al. (2008). Cognitive impairment in multiple sclerosis can be predicted by imaging early in the disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *79*(8), 955-8.

Sundström, P., Nyström, L. (2008). Smoking worsens the prognosis in multiple sclerosis. *Mult Scler*, *14*(8), 1031-5.

Taylor, D. L., Davies, S. E., Obrenovitch, T. P., et al. (1995). Investigation into the role of n-acetylaspartate in cerebral osmoregulation. *Journal of Neurochemistry*, *65*(1), 275-81.

Teaktong, T., Graham, A., Court, J., et al. (2003). Alzheimer's disease is associated with a selective increase in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *Glia*, *41*(2), 207-11.

Trauth, J. A., McCook, E. C., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. (2000). Modeling adolescent nicotine exposure: Effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Res*, *873*(1), 18-25.

Trauth, J. A., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. (2000). An animal model of adolescent nicotine exposure: Effects on gene expression and macromolecular constituents in rat brain regions. *Brain Res*, *867*(1-2), 29-39.

Trauth, J. A., Seidler, F. J., McCook, E. C., Slotkin, T. A. (1999). Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain Res*, *851*(1-2), 9-19.

Urenjak, J., Williams, S. R., Gadian, D. G., Noble, M. (1993). Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *13*(3), 981-9.

van der Knaap, M. S., van der Grond, J., van Rijen, P. C., Faber, J. A., Valk, J., Willemse, K. (1990). Age-Dependent changes in localized proton and phosphorus MR spectroscopy of the brain. *Radiology*, *176*(2), 509-15.

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, *415*(6875), 1030-4.

Videen, J. S., Michaelis, T., Pinto, P., Ross, B. D. (1995). Human cerebral osmolytes during chronic hyponatremia. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *The Journal of Clinical Investigation*, *95*(2), 788-93.

Wattjes, M. P., Harzheim, M., Lutterbey, G. G., Bogdanow, M., Schild, H. H., Träber, F. (2008). High field MR imaging and 1H-MR spectroscopy in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis: Correlation between metabolic alterations and diagnostic MR imaging criteria. *J Neurol*, *255*(1), 56-63.

WHO, Regional Office for the Western Pacific (2002). Smoking statistics. *WHO Fact Sheet.* (Accessed March 11, 2009, at http://www.wpro.who.int/media_centre/fact_sheets/fs_20020528.htm)

Wilkinson, I. D., Paley, M. N., Miszkiel, K. A., et al. (1997). Cerebral volumes and spectroscopic proton metabolites on MR: Is sex important?. *Magn Reson Imaging*, *15*(2), 243-8.

Wilson, S. J., Sayette, M. A., Delgado, M. R., Fiez, J. A. (2005). Instructed smoking expectancy modulates cue-elicited neural activity: A preliminary study. *Nicotine Tob Res*, *7*(4), 637-45.

Wonnacott, S. (1990). The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci*, *11*(6), 216-9.

Xu, Z., Seidler, F. J., Ali, S. F., Slikker, W., Slotkin, T. A. (2001). Fetal and adolescent nicotine administration: Effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res*, *914*(1-2), 166-78.

Yamamoto, Y., Nishiyama, Y., Monden, T., Satoh, K., Ohkawa, M. (2003). A study of the acute effect of smoking on cerebral blood flow using 99mtc-ecd SPET. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *30*(4), 612-4.

Yamashita, H., Nakamura, S. (1996). Nicotine rescues PC12 cells from death induced by nerve growth factor deprivation. *Neuroscience Letters*, *213*(2), 145-7.

Yu, C. R., Role, L. W. (1998). Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *The Journal of Physiology*, *509 (Pt 3)*, 651-65.

Zeidler, R., Albermann, K., Lang, S. (2007). Nicotine and apoptosis. *Apoptosis*, *12*(11), 1927-43.

Zubieta, J., Lombardi, U., Minoshima, S., et al. (2001). Regional cerebral blood flow effects of nicotine in overnight abstinent smokers. *Biol Psychiatry*, *49*(11), 906-13.

Abkürzungsverzeichnis

%SD	*Cramér-Rao lower bounds*
[Metabolit]	absolute Konzentrationen entsprechender Metabolite in mmol/l
ACC	anteriorer cingulärer Kortex oder anteriorer Gyrus cinguli
ADHD	*Attention-deficit hyperactivity disorder*
ANCOVA	Kovarianzanalyse (engl. *analysis of covariance*)
BOLD	*Blood Oxygen Level Dependency*
CDC	*Centers For Disease Control And Prevention*, USA
ChAT	Cholin Acetyltransferase
CIS	*Clinically isolated Syndrome*
Cre	(Gesamt-)Creatin
DTI	Diffusionstensor-Imaging
ED	Enzephalomyelitis disseminata (früher Multiple Sclerose, MS)
EEG	Elektroenzephalogramm
EMG	Elektromyogramm
FA	fraktionelle Anisotropie
FID	freier Induktionszerfall (engl. *free induction decay*)
FOV	Bilderfassungsfeld (engl. *field of view*)
fMRT	funktionelle Magnetresonanz-Tomographie
FSPGR	*fast spoiled gradient echo sequence*
FT	Fourier-Transformation
FWHM	Linienbreite der Wasserresonanz (*full width at half maximum*)
GABA	γ-Aminobuttersäure
Glx	gemeinsame Resonanz für Glutamat, Glutamin und GABA
HF	Hochfrequenz

HF-Impuls	Hochfrequenzimpuls
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
LCModel	*Linear Combination Model*
NAA	N-Acetylaspartat
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor oder Nikotinrezeptor
MAO	Monoamino-Oxidase
mI	myo-Inositol
M.I.N.I.	*Mini-International Neuropsychiatric Interview*
MR	Magnetresonanz
MRS	Magnetresonanz-Spektroskopie
MRSI	MRS-*Imaging*
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
NAWM	normal imponierende weiße Substanz (Patienten mit ED/CIS)
NMR	*nuclear magnetic resonance spectroscopy*
PCC	posteriorer cingulärer Kortex oder posteriorer Gyrus cinguli
PET	Positronenemissions-Tomographie
PFC	präfrontaler Kortex
PJ	Packungsjahre (20 Zigaretten pro Tag über 365 Tage)
ppm	*parts per million*
PRESS	*Point Resolved Spectroscopy*
RFWM	rechtsfrontale weiße Substanz (engl. *right frontal white matter*)
ROI	Interessensregion (engl. *region of interest*)
SD	Standardabweichung
SNR	Signal-zu-Rauschverhältnis (engl. *signal to noise ratio*)
SPECT	*Single Photon Emission Computed Tomography*
SPSS	*Statistical Package for the Social Sciences*

SSRI	selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Status	Raucherstatus (Raucher, Nieraucher, Nichtraucher etc.)
STEAM	*Stimulated Echo Acquisition Mode*
tCho	Gesamtcholin
TE	Echozeit (engl. *time of echo*)
TR	Repetitionszeit (engl. *time of repetition*)
VBM	Voxel-basierte Morphometrie
VOI	*Voxel of interest*
Voxel	Volumenelement (engl. *volume element*)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WM	weiße Substanz (engl. *white matter*)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 2.1a Voxelplatzierung im ACC (T1 bzw. T2 gewichtet)

Abb. 2.1b Voxelplatzierung im PCC (T1 bzw. T2 gewichtet)

Abb. 2.1c Voxelplatzierung in RFWM (T1 bzw. T2 gewichtet)

Abb. 2.2 Beispielspektrum der grauen Substanz eines Rauchers (ACC)

Abb. 2.3 Beispielspektrum der weißen Substanz eines Rauchers (RFWM)

Abb. 2.4 Balkendiagramm der Geschlechterverteilung untersuchter Raucher und Nieraucher

Abb. 2.5 Boxplot der Altersverteilung untersuchter Raucher und Nieraucher

Abb. 2.6 Boxplot der Anzahl alkoholischer Getränke pro Woche untersuchter Raucher und Nieraucher

Abb. 2.7 Altersabhängigkeit von NAA/Cre im PCC (nur Nieraucher)

Abb. 2.8 Altersabhängigleit von tCho/Cre innerhalb der rechtsfrontalen weißen Substanz (RFWM) (nur Nieraucher)

Abb. 2.9 Altersabhängigleit von mIns/Cre innerhalb der rechtsfrontalen weißen Substanz (RFWM) (nur Nieraucher)

Abb. 2.10 Boxplot - tCho/Cre-Quotienten im ACC nach Geschlecht

Abb. 2.11 Boxplot - tCho/Cre-Quotienten der weißen Substanz rechtsfrontal (RFWM) nach Geschlecht

Abb. 3.1 Boxplot - NAA/Cre-Quotienten im ACC nach Raucherstatus

Abb. 3.2 Boxplot - NAA/Cre-Quotienten im PCC nach Raucherstatus

Abb. 3.3 Boxplot - NAA/Cre-Quotienten der weißen Substanz rechtsfrontal (RFWM) nach Raucherstatus

Abb. 3.4 Boxplot - tCho/Cre-Quotienten im ACC nach Raucherstatus

Abb. 3.5 Boxplot - tCho/Cre-Quotienten im ACC nach Raucherstatus und Geschlecht

Abb. 3.6 Boxplot - mIns/Cre-Quotienten der weißen Substanz rechtsfrontal (RFWM) nach Raucherstatus

Tabellen:

Tab. 2.10.1 Gruppencharakteristik: Raucher/Nieraucher

Tab. 3.1.1 Mittelwerte ± SD für [Creatin] in ACC, PCC bzw. RFWM

Tab. 3.1.2 Einfaktorielle ANCOVA für [Creatin] in ACC, PCC bzw. RFWM

Tab. 3.2.1 Mittelwerte ± SD der Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

Tab. 3.2.2 Einfaktorielle ANCOVA der Metabolitenquotienten NAA/Cre, tCho/Cre, mIns/Cre in ACC, PCC bzw. RFWM

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Gallinat für die gemeinsame Erarbeitung der Arbeitshypothese dieser Dissertation bedanken, seine exzellente fachliche und tatkräftige Unterstützung loben und seinen beispiellosen Einsatz trotz zahlreicher anderer Aufgaben würdigen! Nicht zu vergessen, die Möglichkeit an zwei spannenden Publikationen mitwirken zu dürfen und als Mitautor genannt zu werden!

Zudem möchte ich meinem zweiten Betreuer PD Dr. Harald Bruhn für seinen unermüdlichen Einsatz während der MR-Messungen danken, dass ich so viel von seiner Expertise als Radiologe, Wissenschaftler und Spektroskopiker profitieren durfte und dass die Zeit während der spektroskopischen Messungen stets so unterhaltsam war.

Vielen Dank auch an Dr. Dr. Ekkehard Dietz vom Institut für Biometrie der Charité für die freundliche Unterstützung und Korrektur des statistischen Teils dieser Doktorarbeit.

Ebenfalls danken möchte ich meinen Doktorrandenkolleginnen Susanne, Annika, Irina, Monica und Damaris für die gegenseitige tolle Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meiner lieben Debora Pehl für all die Unterstützung und Liebe innerhalb der letzten Jahre und Monate!

Zudem vielen Dank meiner lieben Großfamilie, besonders erwähnt seien meine lieben Großeltern und Eltern!

Auch meine Freunde sollen nicht unerwähnt bleiben, da sie mir viel bedeuten und ich ihnen viel zu verdanken habe. Vielen Dank an Christoph Wirth für die fachliche und sprachliche Auseinandersetzung mit mir und dieser Doktorarbeit.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Jeffrey Colin Bierbrauer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Vergleich des zerebralen Metabolitenprofils zwischen gesunden Rauchern und Nichtrauchern mittels der in vivo 1H-MRS bei 3,0 Tesla“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 03. Januar 2010 Jeffrey C. Bierbrauer