

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Anwendung der Magnetresonanztomographie mit einem
3 Tesla MRT *Philips Achieva 3.0T* zur Messung verschiedener Metaboliten im
Rückenmark des Hundes *in vivo***

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von
Liza K. Ahrend
Köln

Hannover 2013

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Andrea Tipold
Klinik für Kleintiere

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Andrea Tipold

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hermann Seifert

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2013

Diese Dissertation wurde im Rahmen der Forschergruppe (FOR 1103) „Neurodegeneration und -regeneration bei ZNS-Erkrankungen des Hundes“ finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (FOR TI 309/4-1) gefördert.

Meiner Familie

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden auf folgender Fachtagung präsentiert:

L.K. Ahrend, R. Carlson, D.C. Ludwig, M. Angelbeck-Schulze, V. M. Stein, A. Tipold
Magnetresonanz-Spektroskopie im caninen Rückenmark
21. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Innere Medizin und Klinische
Labordiagnostik, München, 01.02.-02.02.2013,
Tierärztliche Praxis (K), 1/2013 (ISSN: 1434-1239), S. 18-19, 2013

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	¹ H-Magnetresonanztomographie (¹ H-MRT)	3
2.2	¹ H-Magnetresonanzspektroskopie (¹ H-MRS).....	4
2.2.1	Messbare Metaboliten der ¹ H-MRS	5
2.2.2	Einschränkungen der Nutzung der ¹ H-MRS im Rückenmark <i>in vivo</i>	7
2.2.3	Bisherige Anwendung der ¹ H-MRS im Rückenmark <i>in vivo</i>	8
3	Untersuchungsgut, Material und Methoden	11
3.1	Material und Untersuchungsgut	11
3.1.1	Geräte und deren Zubehör	11
3.1.2	Labormaterial und Anästhesiezubehör	12
3.1.3	Reagenzien und Medikamente	14
3.1.4	Lösungen.....	16
3.1.5	Computer Software	17
3.1.6	Untersuchte Hunde	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Untersuchte Hunde	18
3.2.2	Phantom	19
3.2.3	¹ H-Magnetresonanztomographie	19
3.2.4	¹ H-Magnetresonanzspektroskopie	20
3.2.5	Statistische Auswertung.....	22
4	Manuskript	23
4.1	Abstract	24
4.2	Introduction	24
4.3	Material and methods.....	25
4.3.1	Animals	25
4.3.2	Round bottom flask phantom	26
4.3.3	Magnetic resonance imaging.....	27
4.3.4	Magnetic resonance spectroscopy.....	28
4.3.5	Statistics	30
4.4	Results	30

Inhaltsverzeichnis

4.5	Discussion	34
4.6	Disclaimer	38
4.7	Acknowledgements	39
4.8	References	39
5	Diskussion	42
6	Zusammenfassung.....	49
7	Summary	51
8	Literaturverzeichnis	53
9	Tabellarischer Anhang.....	66
10	Danksagung.....	86

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°	Grad
°C	Grad Celsius
C	cervical vertebrae/ Zervikaler Wirbel
Cho	choline/ Cholin
CNS	central nervous system/ Zentrales Nervensystem
Cr	creatine/ Kreatin
CSF	cerebro spinal fluid/ Hirn-Rückenmarks-Flüssigkeit
Fig.	Figure/ Abbildung
FLAIR	Fluid-Attenuated-Inversion-Recovery-Sequenz
Glx	glutamate and glutamine/ Glutamat und Glutamin
HF	Hochfrequenz
Hz	Hertz
Lac	lactate/ Laktat
meq/L	milliEquivalent per liter/ Millimol pro Liter
ml	myo-Inositol/ Myo-Inositol
ml	Milliliter
MI	Myo-Inositol
min	minute/s/ Minute/n
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MR	Magnetresonanz
MRI	magnetic resonance imaging/ Magnetresonanztomographie
MRS	magnetic resonance spectroscopy/ Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
msec	milliseconds/ Millisekunden
NAA	N-acetyl-aspartate/ N-acetyl-aspartat
NSA	number of signals averaged/ Anzahl der Wiederholungen einer Pulssequenz

Abkürzungsverzeichnis

OVS	outer volume suppression/ Signalunterdrückung außerhalb des Voxel
ppm	parts per million/ Einheit der Frequenzverschiebung
PRESS	Point REsolved Spectroscopy-Sequenz
Rest-slabs	regional saturation technique/ Anzahl der Abschirmungseinrichtungen neben dem Voxel
RF	radio frequency/ Radiofrequenz
ROI	region of interest/ Gewebeabschnitt in dem die Messungen stattfinden
SCI	spinal cord injury/ Rückenmarksverletzung
SD	standard deviation/ Standard Abweichung
SENSE	sensitive encoding/ Name der MRT-Spulen
si	Scyllo-Inositol
SNR	signal to noise ratio/ Signal-Rausch-Verhältnis
SV	Single Voxel/ Einzel Voxel Messung
T	Tesla
Tab.	Table/ Tabelle
TE	time to echo/ Echozeit
TR	time to repeat/ Repetitionszeit
TSE	Turbo Spin Echo
VOI	volume of interest/ Gewebeabschnitt in dem die Messungen stattfinden
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) erlaubt die nicht invasive Messung und quantitative Bestimmung von speziellen Metaboliten. Bei einer genauen Positionierung des Voxel können diese Metaboliten *in vivo* Veränderungen im zentralen Nervensystem aufzeigen. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Pathologie der zugrundeliegenden Erkrankung genauer zu detektieren als die herkömmliche alleinige Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) (PROVENCHER 2001; SARCHIELLI et al. 2001; KIM et al. 2004; BLAMIRE et al. 2007). Die lokalisierte „single voxel“ (SV)-¹H-MRS, also die Messung nur mittels einer „region of interest“ (ROI), erlaubt unter anderem die Messung der Metaboliten N-acetyl-aspartat (NAA), Laktat (Lac), Glutamat und Glutamin (Glx), Kreatin und Phosphokreatin (Cr), Cholin (Cho) und Myo-Inositol (MI) in einem quaderförmigen Voxel (BONAVITA et al. 1999; NARAYANA 2005; QIAN et al. 2010). Die Spektroskopie wurde bereits in der Untersuchung zahlreicher Krankheiten des Gehirns eingesetzt (GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000; HOLLY et al. 2009), jedoch gibt es nur wenige Veröffentlichungen über die Möglichkeit der Nutzung einer spektroskopischen Untersuchung im Rückenmark *in vivo* (VINK et al. 1989; ZELAYA et al. 1996; BILGEN et al. 2001; SILVER et al. 2001; BALLA u. FABER 2007; QIAN et al. 2010). Die Messungen im Rückenmark sind nur eingeschränkt möglich. Probleme entstehen durch Bewegungsartefakte, den schmalen Durchmesser, den anatomischen Verlauf des Rückenmarkes und magnetische Inhomogenitäten durch das das Rückenmark umgebende Gewebe. All diese Faktoren führen zu einem inadäquaten Signal-Rausch-Verhältnis (SNR), das eine gesicherte Analyse erschwert (BONAVITA et al. 1999; NARAYANA 2005; QIAN et al. 2010).

Die traumatische Rückenmarkschädigung bei Hunden, im Besonderen nach einem Bandscheibenvorfall (MEOLA et al. 2007) in der thorakolumbalen Region der Wirbelsäule (LEVINE et al. 2009), ist eine sehr häufige neurologische Erkrankung bei chondrodystrophen Hunderassen (BRISSON 2010). Jedoch kann ein Bandscheibenvorfall auch bei vielen anderen Rassen auftreten (BRISSON 2010). Er führt zu einem Verlust der neurologischen Funktion kaudal der Läsion

(LIKAVČANOVÁ et al. 2008) und kann auf diesem Wege zu einer Beeinträchtigung vieler weiterer Organe, wie der Harnblase, innerhalb des Körpers führen (BAPTISTE u. FEHLINGS 2006). Der mechanische Insult des Rückenmarkes führt zu einer sekundären Kaskade, die eine weitere Schädigung auslöst und axonale Degeneration, Zelltod, Nekrose, Glutamat bedingte Exzitotoxizität und entzündliche Reaktionen beinhaltet (SHORES 1992; BAPTISTE u. FEHLINGS 2006; BRISSON 2010; QIAN et al. 2010). Diese pathologischen Veränderungen könnten mittels der oben genannten speziellen biochemischen Marker in der Magnetresonanztomographie detektierbar sein (BONAVITA et al. 1999).

In vorliegender Studie sollte die Hypothese bestätigt werden, dass mit Hilfe der MRS Metaboliten *in vivo* im Rückenmark von Hunden messbar sind und Läsionen näher charakterisiert werden können. Das Ausmaß von intramedullären Veränderungen in T1- und T2-gewichtete MRT-Aufnahmen nach Bandscheibenvorfällen kann zwar beim Hund in Korrelation zur Prognose gesetzt werden (BOEKHOFF et al. 2012), diese hyperintensiven Läsionen spiegeln jedoch eine vielfältige Pathologie wider. Da durch T1- und T2-gewichtete Sequenzen die pathologischen Veränderungen nicht exakt definiert sind, wird die Signifikanz vieler Veränderungen häufig diskutiert (HOLLY et al. 2009). Daher sollte diese Studie genutzt werden, um den Nutzen der MRS als unterstützende Methode zur konventionellen magnetresonanztomographischen Untersuchung aufzuzeigen. Dabei sollte vor allen Dingen im Hinblick auf die Schwere von Insulten, die richtige Diagnose und daraus resultierend, auch die bessere Einschätzung einer Prognose für Hunde mit Rückenmarktrauma im Vordergrund stehen.

2 Literaturübersicht

2.1 ^1H -Magnetresonanztomographie (^1H -MRT)

Das Grundprinzip der ^1H -Magnetresonanztomographie (MRT), wurde bereits 1946 von Felix Bloch und Edward Mills Purcell unabhängig voneinander entdeckt (BLOCH et al. 1946; PURCELL et al. 1946). Weitergeführt wurde dies von Paul Christian Lauterbur, der 1973 das erste MRT Bild einer lebenden Maus herstellte (LAUTERBUR 1973). Die MRT ist eine bildgebende Technik, die sich aus Schnittbildern zusammensetzt. Sie beruht auf einer Reaktion der Wasserstoffatome (das häufigste Atom im lebenden Organismus) im Körper, wenn diese in ein starkes äußeres magnetisches Feld gelangen und anschließend durch Radiofrequenzimpulse aus ihrer üblichen Bewegung abgelenkt werden. Bewegen sich diese Atome zurück in ihre ursprüngliche Position, geben sie die aus den Radiofrequenzen aufgenommene Energie wieder ab, was dem gemessenen Signal entspricht (TIDWELL u. JONES 1999). Durch eine Variation dieser Radiofrequenz-Pulse können verschiedene Sequenzen kreiert werden, die jeweils zu einer unterschiedlichen Reaktion der Wasserstoffatome auf diesen Impuls und somit zu verschiedenen Darstellungen der gleichen Struktur in dem gewonnenen Bild führen (TIDWELL u. JONES 1999). Diese Methodik ermöglicht die Darstellung verschiedener Ebenen. Um das zentrale Nervensystem (ZNS) darzustellen, werden meist eine transversale, eine sagittale und eine dorsale Ebene beurteilt. Diese Untersuchung lässt einen dreidimensionalen Überblick über das zu untersuchende Areal zu (TIDWELL u. JONES 1999). Die Darstellung dieser Ebenen erfolgt durch eine computergestützte Berechnung der ermittelten Daten. Erst mit den errechneten Bildern ist es möglich, die erhaltenen Datenpunkte einer anatomischen Struktur zuzuordnen (TIDWELL u. JONES 1999). Bis heute hat sich an diesen Grundsätzen der magnetresonanztomographischen Untersuchung nichts geändert. In der Humanmedizin, sowie in der Tiermedizin, hat sich das MRT mittlerweile als Standardmethode zur Diagnose von Bandscheibenvorfällen etabliert und löst damit weitestgehend die bisherigen Methoden (Röntgen und Myelographie) zur Erkennung

von Bandscheibenvorfällen ab (SANDERS et al. 2002; MEOLA et al. 2007; BRISSON 2010).

2.2 ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (^1H -MRS)

Die magnetresonanzspektroskopische Untersuchung ist wie die magnetresonanztomographische Untersuchung eine nicht invasive Untersuchungsmethode (COOKE et al. 2004; KIM et al. 2004; BLAMIRE et al. 2007; LUNDIN et al. 2011), die jedoch, im Gegensatz zur MRT, auch einen Einblick in die Neurochemie von normalem und verändertem Gewebe zulässt (LAUBENBERGER et al. 1998; WILICHOWSKI et al. 1999; WILKEN et al. 2000). Die MRS beruht prinzipiell auf dem gleichen physikalischen Grundprinzip wie die Magnetresonanztomographie (LANFERMANN et al. 2004). Im Gegensatz dazu hat die SV-MRS jedoch den Grundsatz, dass sie ein kurzes Radiofrequenz-Signal in das zu untersuchende Gewebe, ein meist kubisch begrenztes Volumen, das so genannte Voxel, sendet (MANDAL 2011). Die dort vorhandenen Protonen gelangen so auf ein höheres Energieniveau, gehen jedoch anschließend wieder zurück auf ihr ursprüngliches Niveau und geben dabei die zuvor gewonnene Energie wieder ab. Diese Energieabgabe kann daraufhin als chemische Verschiebung gemessen und graphisch dargestellt werden (DE STEFANO u. FILIPPI 2007). Die Metaboliten können dabei aufgrund der Unterschiede im Energieniveau, die abhängig von der Umgebung des jeweiligen ^1H -Atoms sind, und anhand der emittierten Radiofrequenz identifiziert werden (LANFERMANN et al. 2004; STUCKEY et al. 2005). Anschließend wird jeder Peak mit seiner charakteristischen chemischen Verschiebung, angegeben in parts per million (ppm), auf der x-Achse dargestellt, während die Fläche, oder auch „Area under the curve“, des Peaks seine Konzentration im untersuchten Gewebe angibt (LANFERMANN et al. 2004; LIN et al. 2005; NARAYANA 2005). Durch die Möglichkeit der Bestimmung verschiedener Metaboliten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (PROVENCHER 2001) hat sich die Spektroskopie zu einem Standardverfahren in der Biochemie, wie auch in der Medizin, entwickelt. In der Medizin konnte sie jedoch erst ab den 1980er Jahren mit der Entwicklung und Einführung der klinischen Magnetresonanztomographen für die

Diagnostik und Forschung an lebenden Objekten genutzt werden (DU MESNIL DE ROCHEMONT 2004). Durch ihre Möglichkeit, Veränderungen und pathologische Vorgänge auf zellulärer Ebene durch die Quantifizierung bestimmter Metaboliten darzustellen, eignet sie sich optimal als meist sensitivere und spezifischere Ergänzung zur MRT-Untersuchung (BONAVITA et al. 1999; SARCHIELLI et al. 2001; KIM et al. 2004; NARAYANA 2005; BLAMIRE et al. 2007; HOLLY et al. 2009). Über die Jahre entwickelte sich die Technik weiter, von der Single-Voxel zur Multi-Voxel und anschließend weiter zur single- und multislice ^1H -MRS-Bildgebung. Jedoch ist die Single-Voxel Technik weiterhin, im Bereich der Spektroskopie, die Untersuchungsmethode der Wahl, um fokale Läsionen zu untersuchen (BONAVITA et al. 1999).

2.2.1 Messbare Metaboliten der ^1H -MRS

N-acetyl-aspartat (NAA), eine modifizierte Aminosäure (MOFFETT et al. 1991) ist bekannt als jener Metabolit, der in jedem Spektrum meist den größten Peak im zentralen Nervensystem erzeugt (NARAYANA 2005). Er wird in Nervenzellen (URENJAK et al. 1993) und Axonen (MIKE WATTJES et al. 2008) gefunden und dient damit als ein Marker für neuronale und axonale Integrität (MOELLER et al. 2005; BLAMIRE et al. 2007). Reduzierte NAA-Werte werden in der Regel bei neurologischen Erkrankungen mit axonalem oder neuronalem Zellverlust (BROOKS et al. 2010) wie bei Infarkten, Epilepsie, Gehirntumoren oder neurodegenerativen Erkrankungen, gemessen (BONAVITA et al. 1999; CHOI et al. 2009; HOLLY et al. 2009).

Laktat (Lac) ist das Endprodukt der Glykolyse (LIN et al. 2005) und tritt normalerweise nur unter pathologischen Bedingungen auf, die mit einem niedrigen Sauerstoffgehalt einhergehen, wie er bei lokaler Ischämie, mitochondrialer Dysfunktion in neuronalen Zellen oder Entzündung auftritt. Eine Ausnahme besteht, wenn der untersuchte Bereich große Mengen an Liquor enthält und der hohe Laktatpeak den Gehalt darin widerspiegelt (NARAYANA 2005; EL GHAZI et al. 2009; HOLLY et al. 2009). Unter normalen Bedingungen sollte in einer Messung des

neuronalen Gewebes, aufgrund seiner niedrigen Konzentration, kein Laktatpeak detektierbar sein (BONAVITA et al. 1999; LIN et al. 2005; NARAYANA 2005).

Der aus Kreatin und Phosphokreatin zusammengesetzte Metabolit wird in der Spektroskopie meist nur als Kreatin (Cr) angezeigt. Er visualisiert den Energiemetabolismus der Neuronen, jedoch vor allen Dingen den der Gliazellen (NARAYANA 2005). Weiterhin wird angenommen, dass er ein repräsentativer Marker für eine Entzündung und eine aktive Gliose ist (RATAI et al. 2011). Kreatin scheint unter einer Vielzahl von pathologischen Bedingungen stets eine nahezu konstante Konzentration aufzuweisen, die unabhängig ist von Veränderungen im angrenzenden Gewebe. Auf Grund dieser Tatsache wird Kreatin in der Spektroskopie häufig als interner Referenzpeak verwendet (BONAVITA et al. 1999; NARAYANA 2005; LIKAVČANOVÁ et al. 2008; HOLLY et al. 2009).

Cholin (Cho), bestehend aus freiem Cholin, Glycerophosphocholin und Phosphocholin, ist in den Membranstoffwechsel, also die Synthese und den Abbau von Zellwänden, involviert. Erhöhte Werte finden sich somit bei Demyelinisierung, Remyelinisierung, Gehirntumoren und entzündlichen Erkrankungen (BONAVITA et al. 1999; NARAYANA 2005; HOLLY et al. 2009).

Der zyklische Alkohol Myo-Inositol (MI) (ROSS 1991), ein Metabolit in Gliazellen, ist vermutlich ein Gliamarker, der bei Gliose oder entzündlichem Geschehen erhöht ist (KHIAT et al. 2010; RATAI et al. 2011). Des Weiteren soll er sowohl demyelinisierende Veränderungen anzeigen als auch einen Anteil an der osmotischen Regulation des Volumens des Gehirngewebes haben (BONAVITA et al. 1999; NARAYANA 2005; HOLLY et al. 2009).

Die Spektroskopie-Kennung „Glx“ vereint in sich sowohl den Metaboliten Glutamat als auch das intermediäre neuronale Übertragungsprodukt Glutamin (SCHUBERT et al. 2004; GUSSEW et al. 2009) und besteht damit aus einer Mischung aus Aminosäuren und Bioamiden. Durch ihre sehr nahe nebeneinander liegenden Peaks, die leicht überlagern, sind sie erst bei stärkeren Feldstärken sicher zu trennen und können separat ausgewertet werden (SRINIVASAN et al. 2004). Im zentralen Nervensystem ist Glutamat der vorrangige exzitatorische Neurotransmitter und wird unter anderem bei Anfallsgeschehen in hohem Maße von Neuronen freigesetzt. Er

wird jedoch relativ schnell wieder von Astrozyten aufgenommen und in Glutamin umgewandelt (SCHUBERT et al. 2004; NARAYANA 2005; EL GHAZI et al. 2009; BARKER et al. 2010). Weiterhin kommt es auch zu Erhöhungen der Konzentration bei entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (CIANFONI et al. 2007).

Im Allgemeinen scheinen die Metaboliten-Konzentrationen im Rückenmark höher zu sein, als im Gehirn (CHOI et al. 2009).

2.2.2 Einschränkungen der Nutzung der ^1H -MRS im Rückenmark *in vivo*

Die MRS wird für Messungen im Rückenmark nicht routinemäßig eingesetzt (MARLIANI et al. 2007). Verschiedene Ursachen für Fehlmessungen sind beschrieben worden. Es muss beachtet werden, dass das Voxel, je nach Platzierungsort, unterschiedliche Gehalte an grauer- und weißer Substanz (BLAMIRE et al. 2007), sowie Liquor cerebrospinalis enthalten kann (ZELAYA et al. 1996; SCHUBERT et al. 2004). Zusätzlich gibt es aufgrund dieser Unterschiede in der Zusammensetzung des Gewebes auch Abweichungen in der chemischen Zusammensetzung an unterschiedlichen Regionen des zentralen Nervensystems (CHOI et al. 2009). Des Weiteren gilt es außerdem zu beachten, dass es bei einem Voxel auch zu Verunreinigungen durch das umliegende, gesunde Gewebe kommen kann (BONAVITA et al. 1999; GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000; BILGEN et al. 2001; KIM et al. 2004).

Auch Bewegungsartefakte, wie sie durch kardiale (COOKE et al. 2004) und respiratorische Bewegungen, besonders im thorakalen Rückenmarksbereich, entstehen und indirekt auch zu einer rhythmischen Verlagerung des Rückenmarks und einem Liquorfluss im Zentralkanal führen, beeinflussen ebenfalls das erhaltene Signal (GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000; KIM et al. 2004; MARLIANI et al. 2007; HENNING et al. 2008; HOLLY et al. 2009).

Eine weitere Einschränkung besteht in der geringen Größe und der Nähe des Rückenmarkes zum umgebenden Knochen, aber auch zu anderem, das Rückenmark umgebende Gewebe, wie Meningen und Fettgewebe (HENNING et al.

2008). Das Setzen des Voxel kann aufgrund eines starken Gradienten zwischen diesen zwei Gewebetypen (ZELAYA et al. 1996) für Magnetfeldinhomogenitäten sorgen und damit zu einer Einschränkung oder Verminderung der spektralen Auflösung führen (BONAVITA et al. 1999; GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000; MARLIANI et al. 2007; HOLLY et al. 2009). Cooke et al. (COOKE et al. 2004) fanden heraus, dass auch der Spalt zwischen den Procc. spinosi und dem die Procc. spinosi verbindenden Gewebe zu Unregelmäßigkeiten im Magnetfeld führt. Eine Korrektur dieser Defizite war bei Voxel, die mehr als einen Intervertebral-Spalt überspannten, meist nicht mehr auszugleichen (COOKE et al. 2004). Durch diese anatomischen Umstände, die auch die physiologische Biegung besonders im Bereich der Brustwirbelsäule beinhaltet (ZELAYA et al. 1996), kann das Voxel meist nur in einer nicht ausreichenden Größe gewählt werden, was wiederum ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis zur Folge hat (COOKE et al. 2004; KIM et al. 2004; BALLA u. FABER 2007; HOLLY et al. 2009; QIAN et al. 2010). Des Weiteren kommt es im Bereich von Läsionen, durch Verlagerung des Gewebes im Epizentrum der Läsion, zu einer weiteren Reduzierung des dem Voxel zur Untersuchung zur Verfügung stehenden Gewebes (QIAN et al. 2010).

Um bei einer Single-Voxel Messung ein zur Auswertung ausreichendes Signal und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, ist noch immer eine längere Messzeit notwendig (MARLIANI et al. 2007). Diese birgt jedoch auch wiederum die Gefahr von Bewegungsartefakten und die Schwierigkeit, gegebenenfalls bei einem schlechten Zustand des Patienten eine lange Narkosedauer tolerieren zu müssen (ZELAYA et al. 1996; BONAVITA et al. 1999).

2.2.3 Bisherige Anwendung der ^1H -MRS im Rückenmark *in vivo*

Die spektroskopische Messung wurde in den vergangenen Jahren bereits zur Diagnostik vieler verschiedener Erkrankungen des Gehirns, jedoch nur selten zur Diagnostik bei Rückenmarkleiden, eingesetzt (BONAVITA et al. 1999; GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000; KENDI et al. 2004; HOLLY et al. 2009).

In der Humanmedizin gab es verschiedene Ansätze der spektroskopischen Messungen im Rückenmark. Gómez-Ansón et al. (GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000) nutzten die MRS zur Untersuchung der Halswirbelsäule. Verschiedene weitere humanmedizinische Studien beschäftigten sich mit der MRS im Rückenmark zur Untersuchung von verschiedenen Umfangsvermehrungen (KIM et al. 2004), zur Abklärung der multiplen Sklerose (KENDI et al. 2004; BLAMIRE et al. 2007), dem Vergleich der Metaboliten-Konzentrationen gesunder Patienten aus verschiedenen Hirnregionen mit dem zervikalen Rückenmark (COOKE et al. 2004), zur Evaluierung verbesserter Untersuchungsprotokolle (HENNING et al. 2008) und zur Untersuchung der zervikalen spondylootischen Myelopathie (HOLLY et al. 2009). Marliani et al. (MARLIANI et al. 2007) untersuchten das zervikale Rückenmark und den Hirnstamm mittels eines 3T MRT-Gerätes mit dem Ziel, ein MRS-Protokoll zur Quantifizierung der Metaboliten zu finden, das Einzug in die Routinediagnostik halten sollte.

Bei Tieren gibt es nur vereinzelte Studien, die sich mit der Nutzung der MRS im Rückenmark befassen. Vink et al. (VINK et al. 1989) beschäftigten sich als eine der ersten mit der Nutzung der MRS im Rückenmark in Kombination mit Oberflächenspulen. Sie benutzten hierfür Kaninchen, die vor und nach einem experimentellen Schaden des Rückenmarks in unterschiedlichen Zeitabständen untersucht wurden. Zur Bestätigung ihrer Befunde wurde nach zwei Wochen eine histopathologische Untersuchung des Rückenmarkes vorgenommen. Zelaya et al. (ZELAYA et al. 1996) induzierten experimentell eine autoimmune Enzephalomyelitis bei Ratten und benutzten Oberflächenspulen zur Detektion der entstehenden Veränderungen im Rückenmark. Mittels eines MRT-Gerätes mit 4.3T erhielten sie auswertbare Spektren, hatten jedoch Schwierigkeiten, durch auftretende Inhomogenitäten, aufgrund der geringen Voxelgröße. Eine Verlängerung der Messzeit ergab bessere Resultate. Bei den darauf folgenden Studien wurde vor allem Wert auf die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gelegt, welches durch die Implantation von Spulen unmittelbar neben das thorakolumbale Rückenmark erreicht werden sollte. Bilgen et al. (BILGEN et al. 2001) nutzten dafür Ratten in einem 7T MRT-Scanner und waren in der Lage, gute Spektren zu erzeugen. Auch Silver et al. (SILVER et al. 2001) nutzten durch Laminektomie

implantierte Spulen im thorakalen Rückenmark von Ratten und gebräuchliche Oberflächenspulen und verglichen die von einem 4,7T MRT-Gerät erhaltenen Resultate miteinander. Wie sie erwarteten, zeigte die implantierte Spule eine deutlich geringere Störanfälligkeit gegenüber Magnetfeldinhomogenitäten als die Oberflächenspulen. In einer Studie von Balla und Faber (BALLA u. FABER 2007) wurden konventionelle Methoden zur Erlangung von Spektren (PRESS-Sequenz) bei Ratten mit einer so genannten intermolekularen zero-quantum coherence (iZQC)-Spektroskopie (HOMOGENIZED-Sequenz) in einem Phantom in einem 17,6T MRT Scanner miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die iZQC- Spektroskopie unter normalen Umständen dieselben Ergebnisse wie eine PRESS-Sequenz liefert, gegen Magnetfeldinhomogenitäten durch paramagnetische Stoffe jedoch enorm unanfällig ist und daher bei gewissen metallenen Implantaten oder geronnenem Blut eine gute Alternative darstellen könnte (BALLA u. FABER 2007). Die neueste Studie von Qian et al. (QIAN et al. 2010) beschäftigte sich mit der MRS als Möglichkeit zur Beobachtung der Veränderungen kranial, im Epizentrum und kaudal eines experimentellen traumatischen Rückenmarkschadens zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer durch eine Laminektomie implantierte Spule in einem 7T MRT-Gerät. Sie verglichen diese erhaltenen Ergebnisse anschließend mit den Funden aus der histopathologischen Untersuchung des betroffenen Rückenmarkabschnitts und fanden eine sehr gute Übereinstimmung (QIAN et al. 2010). Spontane Rückenmarkerkrankungen bei Haustieren wurden bisher nicht mittels MRS untersucht.

3 Untersuchungsgut, Material und Methoden

3.1 Material und Untersuchungsgut

3.1.1 Geräte und deren Zubehör

Thermometer microlife® VetTemp	Mikrolite AG, Widnau, Schweiz
Laborwaage, LabStyle 204	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Laryngoskop NT 3,5V	Heine Optotechnik GmbH & Co KG
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitsbank, Herasafe KS	Thermo Fischer Scientific GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Narkose-Überwachungsmonitor PM 8050 MRI	Dräger, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Narkose-Überwachungsmonitor Tesla Oxysat®	MIPM Mammendorfer Institut für Physik und Chemie GmbH, Mammendorf, Deutschland
Narkosegerät Forane Trajan 808	Dräger, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Narkosegerät Titus	Dräger, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
pH Meter, pH300	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
Philips Achieva® 3.0T X-series	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
Pipetten, einstellbar (0,1 – 1000 µl)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer, accu-jet®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Pipettierhelfer, Handystep	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
SENSE-Flex Large 3,0T/ 2 elements	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
SENSE-Flex Medium 3,0T/ 2 elements	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
SENSE-Flex Small 3,0T/ 2 elements	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
SENSE-Knee coil 3,0T/ 8 elements	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
SENSE-Neurovascular coil 3,0T/ 16 elements	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
SENSE-Spine coil 3,0T/ 15 elements	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
Überwachungsmonitor Datex Ohmeda	GE Healthcare, München, Deutschland

3.1.2 Labormaterial und Anästhesiezubehör

3M™ Gehörschutzstöpsel	3M Deutschland, Neuss, Deutschland
Atembeutel Silko Bag, Size 0,5; 1; 1,5; 2,3; 3 Liter	Rusch, Kamunting, Malaysia
Beisshölzer	Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte, Tuttlingen, Deutschland
Combination Cap	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
HEI-KA-KOMP® Mehrfach-Kalt-warm-Kompresse 22x40cm	Regina Reus Medizinische Produkte, Bad Salzschlirf, Deutschland
Infusionsbesteck Typ: IV-Standard-Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Mullbinden	Noba Verbandsmittel Danz GmbH & Co

	KG, Wetter, Deutschland
Nobatop® g Tupfer	Noba Verbandsmittel Danz GmbH & Co KG, Wetter, Deutschland
NS-Stopfen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
OP-Abdecktuch	Karl Dieckhoff GmbH & Co. KG, Wuppertal, Deutschland
Parafilm® M, 4 IN. X 250 FT. Roll	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Peha Haft®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 0.1 – 20 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 2 – 20µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 50 – 1000 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Rundkolben 1000ml, Size: 29/32	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rüschelit® Endotracheal Tubes, Size 2,0-4,5 I.D. mm	Rusch, Kamunting, Malaysia
SI Systeme Silkomed	Rusch, Kamunting, Malaysia
Spritze, 1 ml, BD Plastipak®	Becton Dickinson SA., Madrid, Spain
Spritze, 2 ml	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Spritze, 5 ml	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Spritze, 10 ml	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Spritze, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen,

	Deutschland
tesaband® 4651, weiß	Tesa, Hamburg, Deutschland
Tracheal Tubes, Size 5,0 – 10,0 I.D. mm	Smiths medical International Ltd., Kent, UK
Unisan® Comfort Schutzunterlagen	ZVG Zellstoff- Vertriebs- GmbH & Co. KG, Troisdorf, Deutschland
Venenverweilkatheter, VasoVet, 18G x 1 ¼“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkatheter, VasoVet, 20G x 1 ¼“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkatheter, VasoVet, 22G x 1“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkatheter, VasoVet, 24G x ¾“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Verbandsschere	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Verlängerungsschlauch Typ: Heidelberger 140 cm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

3.1.3 Reagenzien und Medikamente

Bepanthen Nasen- und Augensalbe®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Cholin chloride (C ₅ H ₁₄ ClNO), MW: 139,62g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Creatine (C ₄ H ₉ N ₃ O ₂), MW: 131,13g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Diazepam-Ratiopharm® Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Dotarem® Gadolinium 0,5mmol/ml	Guerbet GmbH, Sulzbach/Taunus, Deutschland

Hände-Desinfektionsmittel, Sterillium®	BODE CHEMIE GmbH, Hamburg, Deutschland
Haut-Desinfektionsmittel, Softasept® N	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran CP® 250 ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung 0,9%, Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
L-Glutamic acid (C ₅ H ₉ NO ₄), MW: 147,13g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Polamivet®	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Lactic acid (C ₃ H ₆ O ₃), MW: 90,08g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Myo-Inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆), MW: 180,16g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-Acetyl-L-aspartic acid (C ₆ H ₉ NO ₅), MW: 175,14g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Narcodorm® (182,3mg/ml Pentobarbital)	CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Deutschland
Narkofol®, Propofol 10mg/ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Deutschland
Potassium phosphate monobasic (H ₂ KO ₄ P), MW: 136,09g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sodium acid 0,1% (N ₃ Na)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Sterofundin® Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vetranquil® 1%	Albrecht GmbH, Autendorf, Deutschland

3.1.4 Lösungen

Phantom-Flüssigkeit zur Nachahmung der Gehirnmoleküle:	
N-acetyl-L-aspartic acid	2189,25mg
Creatine	1311,40mg
Lactic acid	450,40mg
L-Glutamin acid	1839,56mg
Potassiumphosphate	6804,50mg
Choline	418,86mg
Myo-Inositol	1351,20mg
Na-acid 0,1%	10,00ml
Reinstwasser	ad 1000ml
Sterofundin® Infusionslösung:	
NaCl	5,55g
KCl	0,30g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,37g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20g
Natriumlaktat-Lösung	10,09g (≈ 5,05g Natriumlaktat)
Aqua ad inj.	ad 1000ml

3.1.5 Computer Software

Philips Auswertungssoftware SpectroView R 2.3.6.1	Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Niederlande
SAS® (statistic analysis system) version 9.2	SAS Institute, Cary, NC

3.1.6 Untersuchte Hunde

Die in dieser Studie untersuchten Hunde waren Patienten der Klinik für Kleintiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover, die mit dem Einverständnis der Besitzer und mit eindeutiger Indikation einer magnetresonanztomographischen Untersuchung unterzogen werden mussten, Tierversuchs-Nummer: 33.9-42502-05-11A190.

Ebenfalls wurden Tiere verwendet, die unmittelbar vor der MRT-Untersuchung aufgrund einer eindeutigen Indikation und auf Wunsch der Besitzer euthanasiert werden mussten.

Insgesamt konnten 47 Hunde in die Studie eingeschlossen werden, die sich aus folgenden Rassen zusammensetzten: sieben Mischlinge, sechs Dobermänner, vier Labrador Retriever, drei Beagle, drei Deutsche Schäferhunde, zwei Australien Shepherds, zwei Border Collies, zwei Riesenschnauzer, zwei Yorkshire Terrier, ein Bolonka Zwetna, ein Dachshund, ein Elo, eine Französische Bulldogge, eine Bordeaux Dogge, ein Galgo Español, ein Hannoverscher Schweißhund, ein Irish Setter, ein Jack Russell Terrier, ein Malteser, ein Zwergschnauzer, ein Petit Basset Griffon de Vendéen, ein Rottweiler, ein Samojede, ein Tibet Terrier und ein Weimeraner. Das mittlere Alter der Tiere betrug 6,5 Jahre (Spanne: 1-13 Jahre), das mittlere Gewicht lag bei 23 Kilogramm (Spanne: 3-43 kg) und es gab eine geschlechtliche Aufteilung von 23 männlichen und 24 weiblichen Tieren.

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchte Hunde

Zur spektroskopischen Untersuchung wurden ausschließlich Tiere verwendet, die eine eindeutige Indikation für eine magnetresonanztomographische Untersuchung hatten (Tierversuchs-Nummer: 33.9-42502-05-11A190). Nach einer gründlichen allgemeinen- sowie neurologischen Untersuchung war meist eine vorläufige Differentialdiagnose der zugrundeliegenden Erkrankung möglich und so wurden die Hunde anschließend einer ASA (American Society of Anaesthesiology)-Stufe zugeordnet und damit ihre Narkosefähigkeit eingeschätzt. Unterstützt wurde diese Einschätzung jeweils durch Röntgenbilder des Thorax und des Abdomens sowie mit einer Laboruntersuchung. Nach Legen eines Venenverweilkatheters wurde eine Narkose eingeleitet. Die Prämedikation bestand aus der intravenösen Applikation von 0,2mg/kg Levomethadon und 0,5mg/kg Diazepam, gefolgt von 1-5mg/kg Propofol, welches je nach Wirkung verabreicht wurde. Vorher wurde eine intramuskuläre Sedation mittels Azepromazin (bis 0,05mg/kg) angestrebt, die im erfolgten Falle das Benzodiazepin ersetzte. Fortgeführt wurde diese Narkose in einem halbgeschlossenen System, nach Intubation, durch ein Sauerstoff-Isofluran-Gemisch, wobei auch hier das Narkosemittel je nach Wirkung dosiert wurde. Anschließend wurden die Tiere an den Überwachungsmonitor für Atemfrequenz und Sauerstoff- sowie Kohlendioxid-Gehalte im Blut angeschlossen. Jedes Tier wurde anschließend einer routinemäßigen MRT-Untersuchung im Bereich des vermuteten Sitzes der Veränderung unterzogen. Bei 26 Patienten konnten keine strukturellen pathologischen Veränderungen gesehen werden, 10 hatten verschiedene Gehirnerkrankungen, acht zeigten einen oder mehrere Bandscheibenvorfälle, einer hatte Veränderungen an den peripheren Nervenscheiden, einer hatte den Verdacht auf eine intramedulläre Läsion und einer hatte den Verdacht auf eine Polymyositis. Unabhängig von Alter, Geschlecht, Gewicht oder der zugrundeliegenden Krankheit wurden die Tiere nach der magnetresonanztomographischen Untersuchung anschließend in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, die 23 Patienten umfasste, hatte eine Voxelpositionierung im Gehirn, die 2. Gruppe, die aus 24 Hunden bestand,

wurde in verschiedenen Rückenmarksbereichen untersucht. Tiere mit deutlichen magnetresonanztomographischen Veränderungen im zentralen Nervensystem (ZNS), die eine spektroskopische Untersuchung in unverändertem ZNS-Gewebe unmöglich machten, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

3.2.2 Phantom

Das Phantom wurde untersucht, um Referenzpeaks von allen gemessenen Metaboliten mit bekannter Konzentration unter gleichen Messbedingungen wie bei den untersuchten Hunden zu erhalten. Um das Phantom herzustellen, wurde ein gläserner Rundkolben mit 1000ml Fassungsvermögen verwendet. Gefüllt wurde dieser mit einer Lösung, die ungefähr den physiologischen Metabolitenkonzentrationen im Gehirn nachempfunden war (BARKER et al. 2001). Nachdem die kristallinen und flüssigen Bestandteile abgewogen waren, wurde eine Lösung vorbereitet, die sich wie folgt zusammensetzte: 3mM Cholin, 10mM Kreatin, 5mM Laktat, 12,5mM L-Glutamat, 12,5mM N-acetyl-aspartat, 7,5mM Myo-Inositol, 50mM Kaliumphosphat und 0,1% Natriumazid, um einen pH von 7,03 zu erhalten (BARKER et al. 2001). Nach Vorbereitung der Lösung wurde der Flascheninhalt auf circa 37,5° Celsius erhitzt und im Magnetresonanztomographen positioniert. Um die Wärme der Lösung zu erhalten, wurden angewärmte Gel-Pads rund um die Flasche positioniert und die Spule weiterhin mit Tüchern abgedeckt. Zur Positionierung des Voxel innerhalb der Lösung wurde ein Standard MRT-Protokoll durchgeführt und anschließend die spektroskopische Messung vorgenommen.

3.2.3 ¹H-Magnetresonanztomographie

Für die magnetresonanztomographische Untersuchung wurde ein 3,0T Philips Achieva MRT-Gerät in Kombination mit verschiedenen Hochfrequenz (HF)-Spulen benutzt, wie sie nachfolgend genannt sind: Sensitivity encoding (SENSE)-Flex S (small)-Spule mit 2 Kanälen, SENSE-Flex M (medium)-Spule mit 2 Kanälen, SENSE-

Flex L (large)-Spule mit 2 Kanälen, SENSE-Knee Spule mit 8 Kanälen, SENSE-Spine Spule mit 15 Kanälen und die SENSE-Neurovascular Spule mit 16 Kanälen. In der Regel wurden sie einzeln benutzt, sollte es jedoch die Größe des untersuchten Tieres nicht anders zulassen, wurde eine Kombination aus verschiedenen Spulen benutzt, im Sinne einer dualen Spulen-Bildgebung.

Die der Spektroskopie vorangehenden T2-TSE-gewichteten Sequenzen wurden jeweils in einer dorsalen, einer transversalen und einer sagittalen Ebene durchgeführt. Sie waren nötig, um das Voxel zur spektroskopischen Messung genau positionieren zu können und um sicher zu gehen, dass das Voxel in unverändertem Gewebe platziert wurde. Bei der Sequenz handelte es sich um eine T2-gewichtete Einstellung mit einer Echozeit von 80-120ms, einer Repetitionszeit von 3000-6000ms, einer Schichtdicke von 2,2-3,0mm und einer Matrix von 256x204 für Untersuchungen des Kopfes oder einer Matrix von 448x333 für thorakale und lumbale Wirbelsäulenaufnahmen. Für Untersuchungen des Kopfes und der Halswirbelsäule wurden die Tiere in Brustlage und „head-first“ gelagert. Bei Messungen an der thorakalen und/oder der lumbalen Wirbelsäule wurden die Tiere meist in Rückenlage untersucht. Ob sie jedoch mit dem Kopf voran oder „feet-first“ gelagert wurden, hing von dem zu untersuchenden Bereich ab.

3.2.4 ¹H-Magnetresonanztomographie

Zur spektroskopischen Messung im direkten Anschluss an die magnetresonanztomographische Untersuchung wurde eine so genannte PRESS (point resolved spectroscopy)-Puls-Sequenz (KIESSLING u. PICHLER 2011) verwendet, die die folgenden Einstellungsparameter aufwies: eine Echozeit von 35 oder 144ms, eine Repetitionszeit von 2000ms (MARLIANI et al. 2007; JÄRNUM et al. 2011; RASCHKE et al. 2011), insgesamt 1024 Messungen (NEPPL et al. 2001; M. P. WATTJES et al. 2007), eine spektrale Bandbreite von 2000Hz und eine Wasserunterdrückung mit einer automatischen Voruntersuchung, einem Anregungspuls gefolgt von einem frequenzselektiven zweiten Puls mit einer Bandbreite von 140Hz und einem

Pulswinkel von 300 (KENDI et al. 2004). Des Weiteren wurde ein so genanntes automatisches pencil-beam shimming verwendet, eine Frequenz-Stabilisierung, 16 Phasen Zyklen, eine Receiver-Optimierung und eine Spektrenkorrektur. Die Anzahl der Wiederholungen der Sequenz (NSA) betrug 240 oder 448. Mit einer NSA von 240 dauerte ein Pulssequenzdurchgang 8,36 Minuten, während es 15,32 Minuten dauerte, wenn man die NSA auf 448 erhöhte. Die spektroskopische Messung wurde nachträglich zur, für das jeweilige Tier, notwendigen MRT-Untersuchung durchgeführt. Diese beinhaltet eine T1 (teilweise mit Kontrastmittel-Applikation)- (STOLL u. BENDSZUS 2009) und T2-TSE gewichtete Sequenz, eine FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery)-Sequenz und eine HEMO-Sequenz. Während der gesamten Narkose wurden die Hunde mit einer Sterofundin-Lösung infundiert.

Um zwischen einem kleinen und einem großen Voxel unterscheiden zu können, wurde das kleine Voxel als eine Volumeneinheit mit weniger als einem Milliliter Gewebesinhalt (meist ein Voxel mit den Maßen $5 \times 5 \times 5 \text{mm}^3$) und das große Voxel als ein Volumen von mehr als 1ml Inhalt (vor allem Voxel der Größe $5 \times 5 \times 60 \text{mm}^3$) definiert. Alle Voxel wurden im Anschluss an die MRT-Untersuchung sorgfältig in unauffälligem ZNS-Gewebe platziert.

Da alle zur Untersuchung herangezogenen Probanden Patienten waren, die mit einer eindeutigen Indikation einer MRT-Untersuchung unterzogen werden mussten, wurde bei jedem Hund nur eine PRESS-Sequenz durchgeführt. Diese wurde daher also je nach Krankheitsprozess entweder im Gehirn oder im Rückenmark gemessen.

Im Phantom wurden für den Einstellungsparameter Voxelgröße, klein und groß, jeweils zwei Messungen vorgenommen. Eine Untersuchung erfolgte bei Raumtemperatur und eine bei einer Temperatur von $37,5^\circ$ Celsius.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte anschließend an einer externen, computergestützten Magnetresonanz-Plattform, die mit einer speziellen Auswertungssoftware namens SpectroView (R 2.3.6.1, Philips Medical Systems, Eindhoven, Niederlande) bestückt war. Alle erhaltenen Peaks, die außerhalb der für den jeweiligen Metaboliten normalen Position lagen, wurden in die weitere Auswertung nicht miteinbezogen (Cholin = 3,17-3,20ppm, Kreatin = 3,02-3,03ppm, Glutamat und Glutamin = 2,35 und 3,7ppm (SCHUBERT et al. 2004), Laktat =

1,32ppm, Myo-Inositol = 3,5-3,6ppm, N-acetyl-aspartat = 2,00-2,02ppm) (BARKER et al. 2001; KUZNIECKY u. JACKSON 2005; NARAYANA 2005; BALLA u. FABER 2007; HOLLY et al. 2009; BARKER et al. 2010). Anschließend wurde für alle Metaboliten ihre Peak-Konzentration anhand der Referenz-Peaks im Phantom berechnet.

3.2.5 Statistische Auswertung

Der Test auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk und dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Zusätzlich wurde die Normalverteilung durch die visuelle Beurteilung der erhaltenen Box-Plots und der q-q-Plots beurteilt. Im Weiteren wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test genutzt, um die Signifikanz der Metaboliten-Konzentrationen zwischen den Lokalisationen Gehirn und Rückenmark zu evaluieren. Der Chi-Quadrat-Test wurde genutzt, um die Korrelation zwischen sicher beurteilbaren und nicht sicher beurteilbaren Werten zwischen den untersuchten Bereichen Gehirn und Rückenmark, sowie zwischen großem und kleinem Voxel zu evaluieren. Die gesamte Datenanalyse erfolgte mit dem statistischen Programm Packet SAS® Version 9.2. Für alle statistisch ausgewerteten Daten nahmen wir eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikante Grenze an.

4 Manuskript

In vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy of the canine spinal cord

Liza K. Ahrend,¹ Davina C. Ludwig,¹ Mandy Angelbeck-Schulze,¹ Regina Carlson,¹ Xiaoqi Ding,² Veronika M. Stein,¹ Andrea Tipold¹

Running head: Spectroscopy of the canine spinal cord

¹Department of Small Animal Medicine and Surgery, University of Veterinary medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany

²Department for Neuroradiology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Key words: proton magnetic resonance spectroscopy (MRS), spinal cord, phantom, dogs

Address correspondence and printing request:

Liza Ahrend

Department of Small Animal Medicine and Surgery

University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

Bünteweg 9

30559 Hannover, Germany

Phone: +49-511-953-6264

Fax: +49-511-953-6204

Email: liza.ahrend@gmx.net

Funding source: This study was funded by „Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, FOR 1103)“

4.1 Abstract

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a noninvasive method to reveal pathological changes that might not be visible in routine magnet resonance imaging. In the current study a 3 Tesla Philips Achieva MRI scanner (Philips Medical Systems Nederland, PC Best, the Netherlands) was used to prove the hypothesis that measurement of metabolites in the canine spinal cord *in vivo* is feasible. Fortyseven dogs were examined under general anesthesia to measure the concentrations of N-acetyl-aspartat (NAA), choline (Cho), myo-inositol (ml), creatine (Cr), lactate (Lac) and glutamate, and glutamine (Glx) using a PRESS-pulse sequence. Spectroscopic examination was performed with the voxel placed in the brain in 23 dogs and in the spinal cord in 24 animals, respectively. For comparison, defined concentrations of the metabolites were evaluated in a round bottom flask phantom. In the central nervous system and the phantom two different voxel sizes were used and compared.

Peaks of NAA, Cho, Cr, Lac, ml as well as Glx were measurable in well resolved spectra in both voxel sizes. Small voxel showed an increased amount of unreliable measurements due to decreased signal to noise ratios (SNR) resulting in low spectral resolution. Enlargement of the voxel size in the spinal cord lead to loss of visualization of small focal lesions but permit a verified assignment of metabolites. Metabolite concentrations were higher in the canine spinal cord than in the brain. In conclusion, MRS measurements are feasible in the canine spinal cord but subject to many restrictions.

4.2 Introduction

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) enables the noninvasive acquisition and quantitative measurement of special metabolites, which, with correct positioning of the voxel, may indicate changes in the central nervous system (CNS) *in vivo*. Thus it is more sensitive in determining the underlying pathology of diseases than conventional magnetic resonance imaging (MRI).¹⁻³ The localized single voxel ¹H

MRS permits, among others, the investigation of N-acetyl-aspartate (NAA), lactate (Lac), glutamate and glutamine (Glx), creatine and phosphocreatine (Cr), choline (Cho) and myo-inositol (ml) in a cuboid region.⁴⁻⁶ MRS has already been used in several studies of brain disorders,^{7, 8} but only a few investigations were published about the feasibility of spectroscopic examinations in the spinal cord of animals *in vivo*.^{6, 9-13} Restrictions of measurements in the spinal cord are due to movement artifacts, the small diameter and anatomical bending of the spinal cord and magnetic inhomogeneities caused by the surrounding tissue. All of these factors may lead to inadequate signal to noise ratios (SNR) impeding the analysis.⁴⁻⁶

Traumatic spinal cord injury (SCI) is a very common neurological disorder in dogs. The mechanical insult of the spinal cord leads to an initiation of a secondary cascade including axonal degeneration, neuronal cell death, glutamate excitotoxicity, and inflammatory reactions.^{6, 14, 15} These pathophysiological findings could be further characterized *in vivo* by the measurement of different metabolites in MRS.⁴

In the current study the hypothesis should be proven that examinations of the canine spinal cord by MRS are feasible to support the prognosis in patients with SCI in future investigations. Restrictions of MRS measurements in the spinal cord should be evaluated. The areal extent of intramedullary damages in T1- and T2-weighted images in conventional MRI has been shown to correlate with outcome in dogs with SCI.^{16, 17} However, the nature of such lesions is not always well defined and the pathogenetic background and significance of these changes are often debated.⁷ Therefore, in the current study it was hypothesized that the use of MRS will support the conventional MRI examination to determine the severity of spinal cord lesions.

4.3 Material and methods

4.3.1 Animals

In the current study, 47 animals were examined with the consent of their owners. Different breeds were included comprising six Doberman, four Labrador retriever, three Beagle, three German shepherds, two Australian shepherds, two Border

collies, two Giant schnauzer, two Yorkshire terrier, and one dog of each breed: Bolonka Zwetna, Dachshund, Elo, French bulldog, French mastiff, Galgo español, Hanoverian bloodhound, Irish setter, Jack Russell terrier, Maltese, Miniature schnauzer, Petit basset griffon vendeen, Rottweiler, Samoyed, Tibet terrier, and Weimaraner. Moreover, seven crossbred dogs were included. The mean age was 6.5 years (range 1-13 years) and the mean body weight was 23 kilogram (range 3 to 43 kilogram). We included 23 male and 24 female dogs in this study. All dogs examined were patients of the Department of Small Animal Medicine and Surgery, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany, and were presented due to different neurological disorders. Twentysix patients, with suspected idiopathic epilepsy, did not reveal structural CNS lesions in the MRI examination, ten displayed a focal brain lesion, eight were diagnosed with intervertebral disc disease, one with peripheral nerve sheet lesions, one with an intramedullary spinal cord lesion and one with polymyositis. The dogs were divided into two groups, independent of age, weight, gender and underlying disease. The voxel was placed in the brain in 23 of the patients and in the spinal cord of 24 patients, respectively. Each dog underwent a standard MRI examination under general anesthesia (premedication: levomethadone 0.2 mg/kg and diazepam 0.5 mg/kg followed by propofol 1-5 mg/kg to effect, maintenance with isoflurane and oxygen and continuous monitoring of breathing rate and blood gases) to diagnose the underlying disease. Dogs with changes in the spinal cord or brainstem precluding a spectroscopic measurement in unaffected CNS tissue were excluded. The study was conducted according to the ethical rules of the University, approved by the promotion Committee, the appointee for animal protection and received the animal experiment number: 33.9-42502-05-11A190.

4.3.2 Round bottom flask phantom

A phantom was examined to obtain reference peaks of all investigated metabolites under the same measurement conditions as performed in the dogs. A round glass bottom flask with one liter of fluid was prepared containing a nearly physiological composition of brain metabolites as described before:¹⁸ 3 mM choline, 10 mM

creatine, 5 mM lactic acid, 12.5 mM L-glutamic acid, 12.5 mM N-acetyl-L-aspartate acid, 7.5 mM myo-inositol, 50 mM potassium phosphate, and 0.1% sodium acid as preservative. The pH was adjusted to 7.03.¹⁸ After preparation of the solution, the bottle was heated to 37.5°C and positioned in the MRI scanner. Heated gel pads were placed next to the phantom to preserve the temperature. Standard MRI protocols for canine brain examinations were used for positioning of the voxel (Fig. 1).

4.3.3 Magnetic resonance imaging

Images were obtained using a 3.0T Philips Achieva MRI scanner (Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Eindhoven, the Netherlands) in combination with different phased arrays survey coils: Sensitivity encoding (SENSE)-Flex S (small) coil with 2 elements, SENSE-Flex M (medium) with 2 elements, SENSE-Flex L (large) with 2 elements, SENS-Knee coil with 8 elements, SENSE-Spine coil with 15 elements, and SENSE-Neurovascular coil with 16 elements (Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Eindhoven, the Netherlands). When necessary, a combination of two coils in terms of dual-coil imaging was used in large breed dogs.

T2-TSE-weighted images in dorsal, transversal and sagittal plains were necessary to position the voxel in unaffected tissue (Fig. 1). For the acquisition of T2-TSE weighted sequences the following parameters were used: Time to echo (TE): 80-120 milliseconds (msec.), time to repeat (TR): 3000-6000 msec., matrix size of 256x204 for head scans or a matrix size of 448x333 for the thoracic und lumbar spinal cord, with a slice sickness of 2.2-3.0 millimeter (mm).

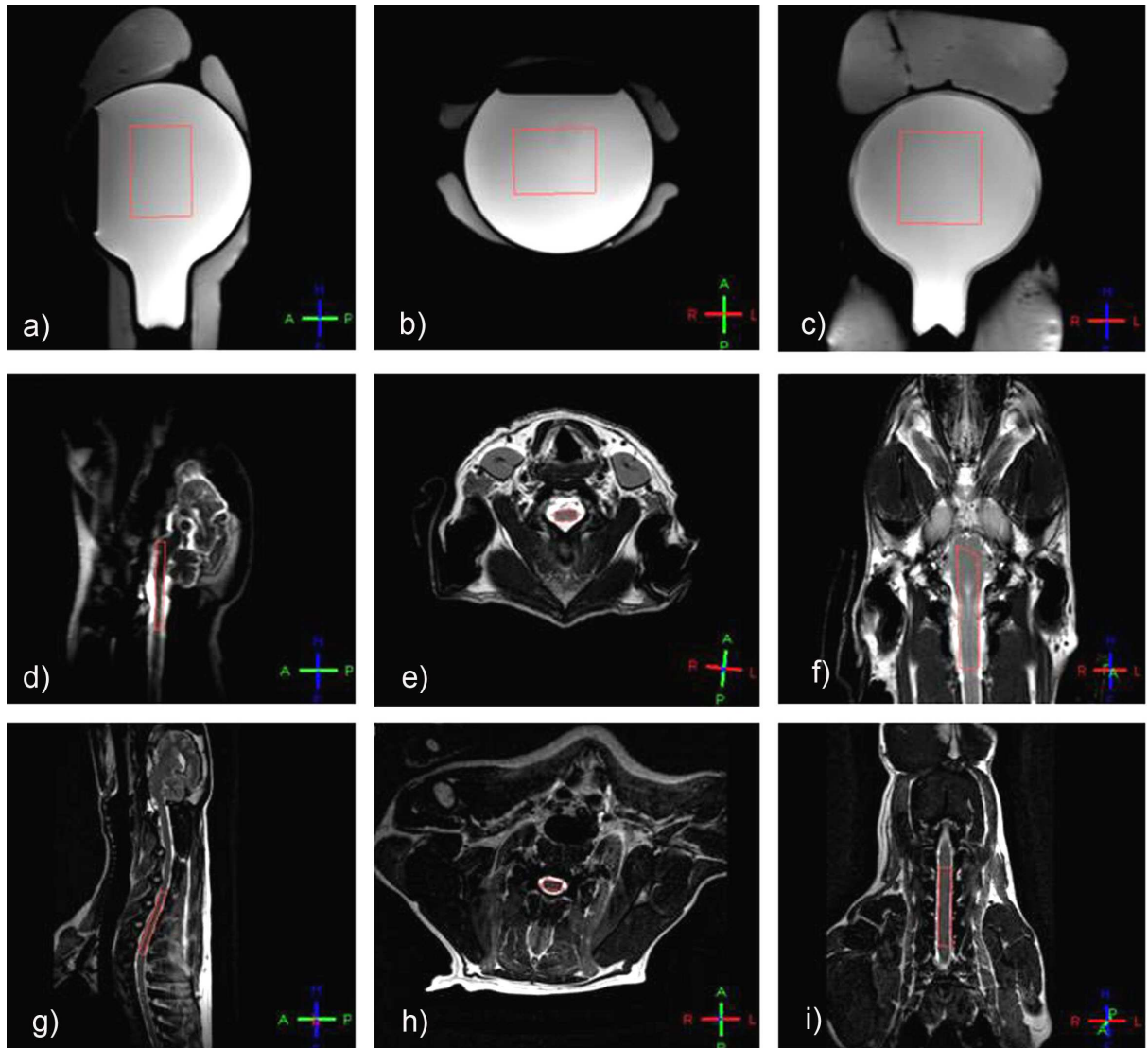


Fig. 1: Voxel positioning in the a) - c) phantom (voxel size $42 \times 53 \times 63 \text{ mm}^3$), d) - f) brain (voxel size $5 \times 10 \times 60 \text{ mm}^3$, placed in the brainstem) and g) – i) spinal cord (voxel size $5 \times 9 \times 61 \text{ mm}^3$, placed between the vertebral level C4–C7) each in a sagittal, transversal and dorsal plane using a 3.0T Philips Achieva MRI scanner (Philips Medical Systems Nederland, PC Best, Eindhoven, the Netherlands).

4.3.4 Magnetic resonance spectroscopy

Parameters for spectroscopic acquisition were as follows: a point-resolved-spectroscopy (PRESS)-pulse-sequence for spectroscopic measurements, TE = 35 or

144 msec., TR 2000 msec.,¹⁹ 1024 samples, spectral bandwidth of 2000 Hz, water suppression (automated prescan, excitation pulse, followed by frequency selective second pulse with bandwidth of 140 Hz and a second pulse angle of 300),²⁰ pencil beam shimming and the number of signal averages (NSA) 240 or 448. A regional saturation technique (REST)-slabs was not used. With a NSA of 240, one PRESS sequence lasted 8.36 minutes (min), while it took 15.32 min. for 448 NSA. MRS was performed subsequently to the standard MRI protocol including T1- and T2-weighted sequences, a Fluid-Attenuated-Inversion-Recovery (FLAIR)-sequence and a HEMO-sequence. Small voxel were defined to contain less than one milliliter (mL) tissue (predominantly voxel around 5x5x5 mm³), the large voxel as a volume of interest (VOI) containing more than 1mL tissue (mainly 5x5x60 mm³). All voxels were placed in CNS regions unaffected by any structural abnormality detected by conventional MRI. Since all examined dogs were patients with medical indication for MRI, one PRESS sequence was performed either in the brain or spinal cord region. Two runs for each voxel size were performed at body temperature and at room temperature, respectively to measure the metabolites in the phantom. The analysis of the data received was conducted on an Extended MR workspace with the special application tool SpectroView (R 2.3.6.1, Philips Medical Systems, Eindhoven, the Netherlands). All metabolite peaks, which were beyond the normal range (Cho = 3.17-3.20 ppm, Cr = 3.02-3.03 ppm, Glx = 2.35 and 3.7 ppm,²¹ lactate = 1.32 ppm, ml = 3.5-3.6 ppm, NAA = 2.00-2.02 ppm),^{5, 7, 10, 18, 22, 23} were excluded. Finally, 21 measurements in the brain and 22 examinations of the spinal cord could be evaluated. The 21 measurements in the brain were divided into 15 measurements with small voxel and six with large voxel. In the 22 examinations of the spinal cord 15 measurements were performed setting a small voxel and seven with large voxel. The metabolite concentration estimates were calculated by comparison of the areas under the curve in the CNS and the defined concentrations of the phantom.

4.3.5 Statistics

The testing for normal distribution was performed by Shapiro-Wilk and the Kolmogorov-Smirnov test as well as by the visual assessment of q-q-plots. Furthermore, the Wilcoxon-Mann-Whitney-Test was used to evaluate a potential significant difference of the metabolite concentration between brain and spinal cord. Additionally, the chi-square-test was performed to determine the correlation of reliable peaks and unreliable measurements between brain and spinal cord but also small and large voxel. All data analyses were conducted with statistic program package SAS®, version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC). For all statistical tests we attained an error probability of $p < 0.05$ as significant level.

4.4 Results

After MRI examination, all examined voxel were measured in apparently unaffected tissue. Fortyseven dogs were included in the study. Of these, 23 had measurements in the brain and 24 examinations in the spinal cord. Two dogs of each group were excluded due to peaks which were not evaluable. The 21 measurements in the brain were divided into 15 measurements with small voxel and six with large voxel. In the 22 examinations of the spinal cord 15 measurements were performed setting a small voxel and seven with large voxel.

The concentrations of each metabolite could be defined in meq/L in normal appearing neuronal tissue of spinal cord and brain (Fig. 2 and Tab. 1).

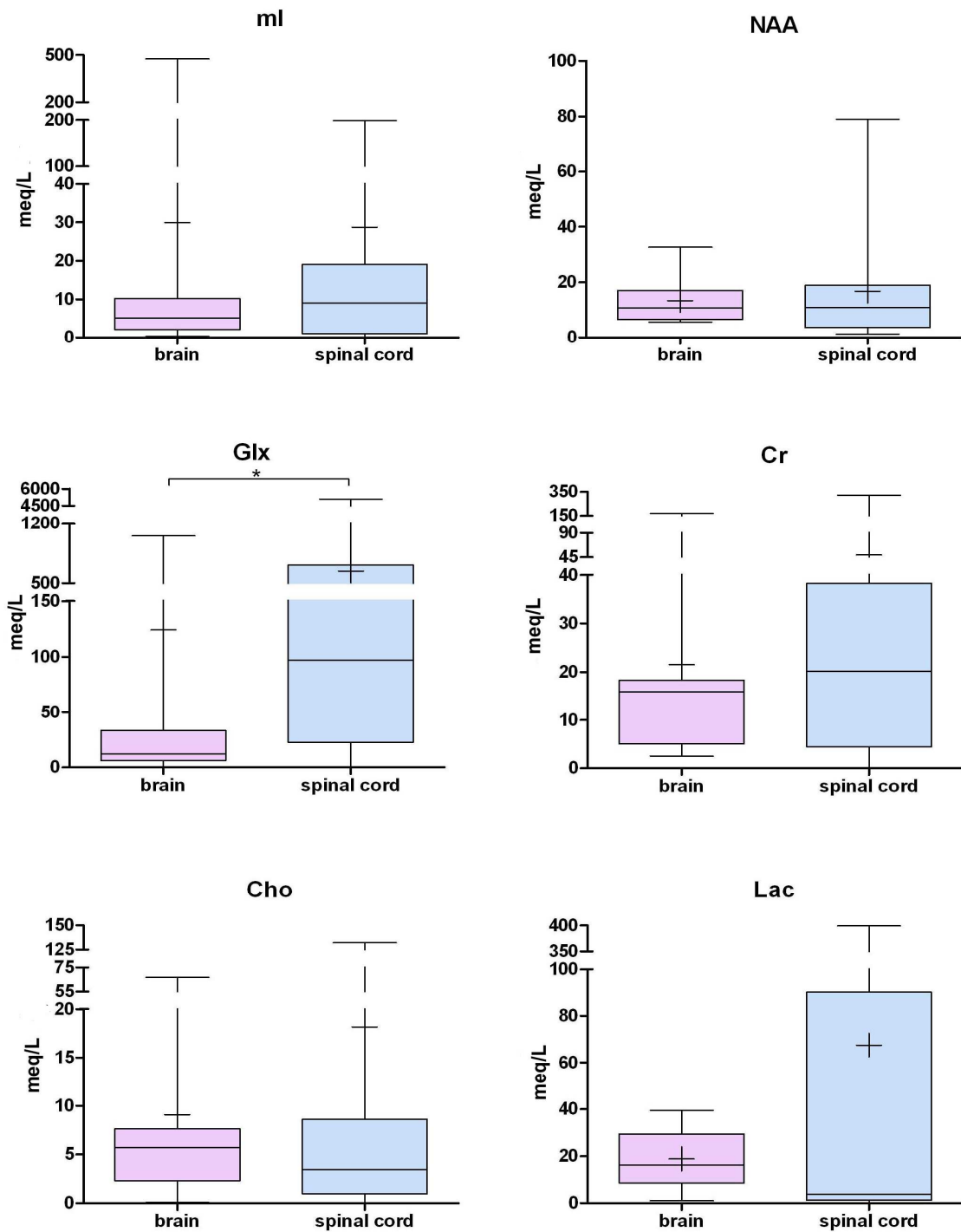


Fig. 2: Box plot illustration of the metabolite concentration estimates of myo-inositol (ml), N-acetyl-aspartate (NAA), glutamate and glutamine (Glx), creatine (Cr), choline (Cho) and lactate (Lac) in meq/L in canine brain (n = 21) and spinal cord (n = 22).

* The significance level was set at $p < 0.05$

Choline nearly exhibited the same concentration estimates in the spinal cord as in the brain. Moreover, equal results were obtained assessing the concentration of N-acetyl-aspartate, myo-inositol and creatine. The acquisition of lactate and glutamate and glutamine displayed a higher concentration range in the spinal cord than in the brain, in case of glutamate and glutamine the difference was significant ($p = 0.0001$; Fig. 2 and Tab. 1). The metabolite concentration estimates in the spinal cord revealed a larger range than detected in the brain.

Tab. 1: Range, quartile range and median of the concentration of different metabolites measured in the canine brain and spinal cord using magnetic resonance spectroscopy

Metabolite:	Location:	Range ($x_{\max} - x_{\min}$) in meq/L	Quartile range ($q_3 - q_1$) in meq/L	Median in meq/L
Cho	brain	0.12 – 66.83	2.35 – 7.46	5.70
	spinal cord	0.00 – 132.17	1.22 – 8.43	3.46
NAA	brain	5.60 – 32.64	7.27 – 16.69	10.70
	spinal cord	1.21 – 78.99	3.87 – 14.62	10.91
ml	brain	0.32 – 476.05	2.51 – 10.01	5.15
	spinal cord	0.00 – 198.47	1.26 – 18.54	8.99
Cr	brain	2.55 – 168.53	6.47 – 18.18	15.95
	spinal cord	0.00 – 323.62	4.97 – 36.63	20.20
Lac	brain	1.06 – 39.42	10.15 – 28.68	16.16
	spinal cord	0.00 – 399.58	1.65 – 60.55	3.73
Glx	brain	0.00 – 1050.14	7.19 – 30.24	12.07
	spinal cord	0.00 – 5086.99	25.43 – 600.87	96.89

Tab. 1: Shows the range, quartile range and median of the concentration of the metabolites Cho (choline), NAA (N-acetyl-aspartate), ml (myo-Inositol), Cr (creatine), Lac (lactate) and Glx (glutamate and glutamine). The concentrations are represented in meq/L.

Figure 3 depicts spectra of the phantom (a) with a $7 \times 7 \times 7 \text{ mm}^3$ voxel at body temperature in contrast to a voxel ($5 \times 7 \times 25 \text{ mm}^3$) placed in the brainstem (b) of a dog. Both voxel are defined as small voxel in the current study. Values that could not definitely be allocated to a metabolite, for several reasons, are therefore evaluated as unreliable. These unreliable values obtained with the small voxel positioned in the brainstem are labeled by interrogation marks next to the metabolite name.

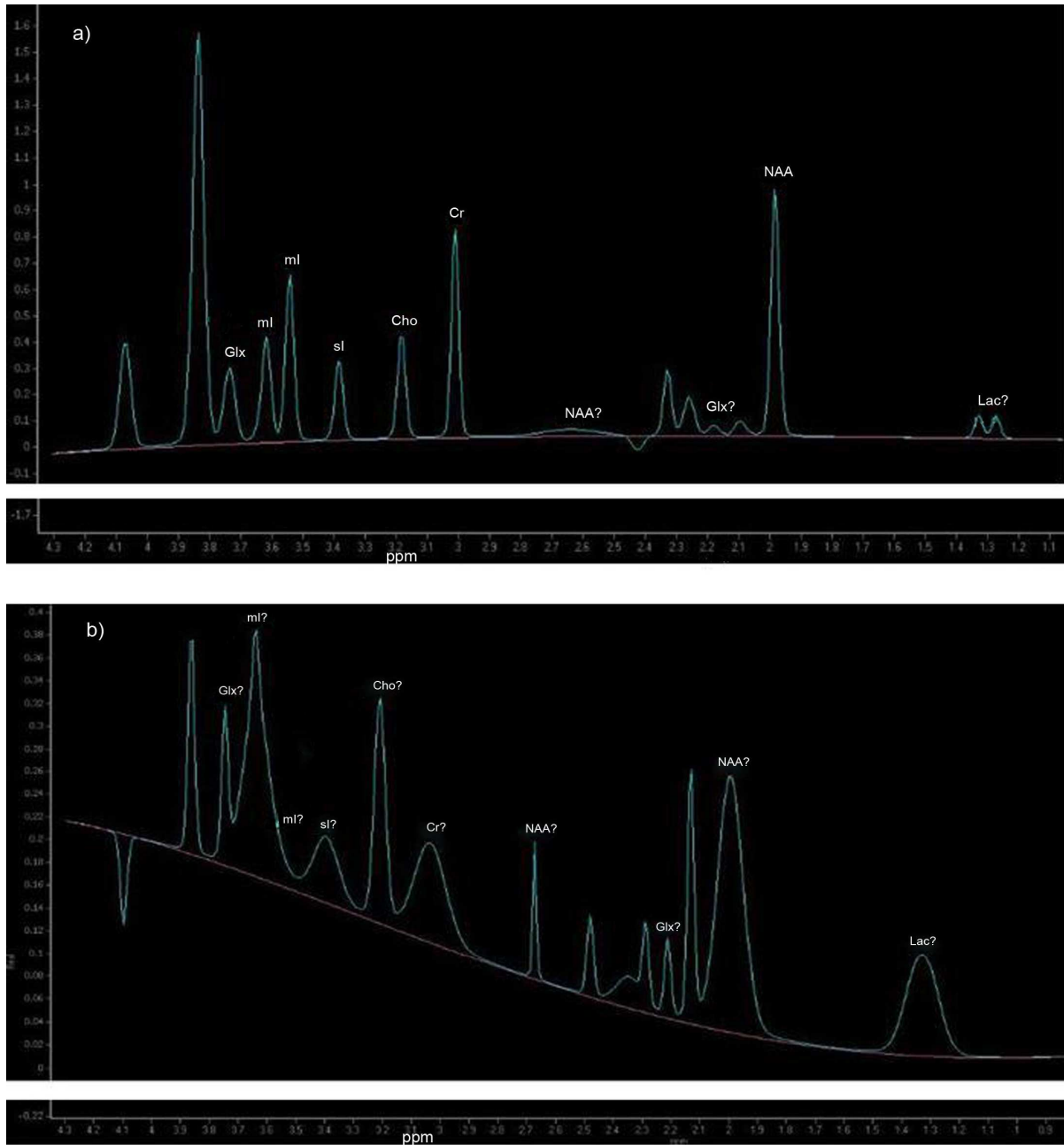


Fig. 3: ¹H magnetic resonance spectroscopy spectrum of a) phantom (voxel size 7x7x7 mm³ at body temperature) and b) spectrum of a voxel placed in the spinal cord of one dog (voxel size 5x7x25 mm³ at C2-C3 vertebral level); PRESS sequence (TE 35 msec., TR 2000 msec., at 3T). Both figures illustrate the peaks of the metabolites choline (Cho), creatine (Cr), glutamate and glutamine (Glx), lactate (Lac), myo-inositol (ml), N-acetyl-aspartate (NAA) and scyllo-inositol (sl). Some of the spinal cord spectra peaks have an interrogation mark next to the metabolite name indicating an unreliable value.

The cause for unreliable measurements may be enhanced noise. In Tab. 2 unreliable measurements indicated by interrogation marks were quantified in the brain and spinal cord. Using small voxel an increased percentage of unreliable results occurred in comparison to measurements in large voxel.

Tab. 2: Percentage of unreliable values

	Total:	Brain:	Spinal cord:	p- value:
Small voxel:	71.76	57.75	88.33	0.0003
Large voxel:	21.05	32.00	0.00	0.0665
p- value:	< 0.0001	0.0268	< 0.0001	

Tab. 2: Shows the percentage distribution of unreliable values (distinct by interrogation marks) of all metabolite measurements (169 measured values) of the brain and spinal cord comparing small and large voxel sizes, calculated by the chi-square-test. An error probability of $p < 0.05$ was the significance level. The spectral resolution is improved using large voxel.

4.5 Discussion

MRS could be a valuable tool to better evaluate pathological changes *in vivo* in the spinal cord of dogs with SCI and other pathological changes in the CNS. Therefore, the hypothesis should be proven that MRS examinations of the canine spinal cord are feasible in dogs. This hypothesis was corroborated only in part by the current study, since some restrictions have to be considered. To the best of our knowledge up to now studies about the use of spectroscopy to measure metabolites in the canine spinal cord are not yet published. Therefore, some prerequisites needed to be assessed as the first steps to introduce this technique into clinical settings. Measurements were performed in unaffected canine CNS which was measured by conventional MRI. Concentrations of the major metabolites such as NAA, Cho, ml, Glx, Lac, and Cr were analyzed. The effect of different voxel sizes was evaluated to improve the quality of measurements and the number of reliable results.

For the definition of pathological changes in the spinal cord, the following metabolites were considered to be good candidates. NAA is known to produce the highest peak

in normal CNS tissue and is found in axons and neurons as a special marker for neuronal efficiency and axonal integrity. NAA is decreased in neurological disorders with axonal or neuronal loss.^{7, 24} Lactate (Lac) is the end product of glycolysis and normally emerges only under pathological conditions with low oxygen content (local ischemia, neuronal mitochondrial dysfunction or inflammation) or in voxel with cerebrospinal fluid (CSF) contamination.^{5, 7, 25} Under normal conditions, a Lac peak should not be detectable in the spectrum.⁵ Creatine, composed of creatine and phosphocreatine, indicates the energy metabolism of neurons and glia cells and is assumed to be a representative marker of inflammation and active gliosis.²⁶ However, under several pathological conditions creatine displayed nearly constant values and was frequently used as an internal reference peak.^{4, 7} Choline, consisting of choline, glycerophosphocholine and phosphocholine, is a metabolite involved in membrane turnover (synthesis and degradation) and increases in demyelinating, remyelinating and inflammatory diseases.⁷ Based on the location in glial cells myo-inositol, a polyol,²⁷ is assumed to be a glia marker, which increases in gliosis, inflammation,²⁶ demyelinating disorders and is involved in the osmotic regulation of brain tissue volume.^{4, 5, 7} Glx, consisting of glutamate and glutamine is a combination of amino acids and bioamides. In the CNS glutamate is the major excitatory neurotransmitter released with excitation, but rapidly metabolized and converted into glutamine.^{5, 21, 23}

The range of concentration estimates of all measured metabolites in the current study was larger in the spinal cord than in the brain (Fig. 2 and Tab. 1). In addition, we could confirm that the concentrations of the metabolites NAA, Cho, Cr, ml, Lac, and Glx measured in dogs are higher in the spinal cord than in the brain which is in line with findings in other species.^{19, 24} A possible explanation might be that the distribution of white and gray matter and the content of CSF considerably changes along the longitudinal axis of the spinal cord.¹³ Therefore, the evaluated concentrations are dynamic and may vary in different regions of the spinal cord. Additionally, these facts explain the increased lactate peak in the spinal cord as a result of its high CSF content. Due to our experimental design with the use of clinical patients, dogs with idiopathic epilepsy were included in the study. No structural

changes were seen in these patients in the brain using conventional MRI. However, MRS measurements were performed in the spinal cord in patients with idiopathic epilepsy. Nevertheless, the relatively high Glx peak may reflect an effect of seizure activity as Glx is known to be increased in the postictal phase in dogs.²⁸ Marliani et al.¹⁹ applied a similar experimental design in humans as performed in the current study. The aim of Marliani et al.¹⁹ were to establish spectroscopic measurements using a 3 Tesla MRI for clinical routine diagnostic. Measurements in the spinal cord were compared to measurements in the brainstem region. Values of NAA, Cho and Cr were similar in both locations,¹⁹ however, the standard deviation (SD) revealed higher values in the spinal cord. These results are similar to our findings and we agree with the postulation of Marliani et al.,¹⁹ that these divergences may be caused by differences in the signal to noise ratio (SNR). The low signal to noise ratio is related with difficulties in shimming in the spinal cord.

In the current study, a small voxel size led to increased noise thereby diminishing the spectral resolution that exacerbates the assessment. Therefore, we enlarged the voxel size to evaluate the increase of spectral resolution proven by the decreasing number of unreliable peaks (decrease of interrogation marks in the Extended MR workspace with the special application tool SpectroView) and were able to confirm this hypothesis (Tab.2). However, the enlargement of the voxel, which was only possible in the head to feet direction, prevents measurements of smaller focal lesions, because a contamination with healthy tissue cannot be avoided. Moreover, recent studies have shown, that unremarkable tissue in conventional MRI located next to the lesion may reveal metabolic changes in MRS.⁷ However, in one study a relation between distortion of the B_0 field and the interface between the interspinous connective tissue and vertebral spinous processes has been detected. Large voxel, extended beyond more than one intervertebral disc space, exacerbates the shimming potential and thereby leads to loss of signal.²⁹ According to these previous findings and the results of the current study, it is not feasible to measure metabolites in small focal spinal cord lesions but an extended area can be evaluated.

Trials to increase the NSA up to 448 to improve the signal to noise ratio led to a considerable prolongation of scan duration and anesthesia and could not be used in a routine clinical setting.

Several factors influence the inhomogeneity and thereby the SNR. The most common artifacts are movement artifacts such as respiratory motion and blood pressure movements which cause alterations of the CSF flow within the central canal and certain movements of the spinal cord.^{29, 30} The contamination of the voxel by fat and other surrounding tissue and the inhomogeneity through the encompassing bone can cause further artifacts.⁸ Cardiac and respiratory movements might be eradicated by using the respiratory compensation and cardiac triggering settings of the MRI scanner. All voxel positioned in the spinal cord or brainstem region contained white as well as gray matter and CSF in the central canal. In the current study the positioning of the voxel was carefully performed to avoid contamination by fat and other tissue around the spinal cord and to minimize the effects of magnetic susceptibility.¹³ Furthermore, the use of outer-volume suppression (OVS) slabs may elude the pulsatile CSF flow³⁰ but also prolongs the scan duration. For this reason none of these setting parameters were used in our study. In the study of Zelaya et al.¹³ experimental autoimmune encephalomyelitis in rats was evaluated using surface coils for spectroscopic measurements in the spinal cord. Their 4.3 Tesla MRI scanner was able to acquire spectra, but the same problems of inhomogeneities and voxel size have been obvious. The limitations were eluded by elongation of the scan time. Under clinical conditions an extensive prolongation of anesthesia is not feasible in most cases.

The previous published studies about spectroscopic measurements in the spinal cord of animals *in vivo* started with implanted radio frequency (RF) coils next to the vertebral column in rats to review the improvement of the signal to noise ratio.^{9, 11, 13} Qian et al.⁶ also utilized implanted RF coils but examined experimental spinal cord injuries in rats with spectroscopic measurements *in vivo* and compared the results with histopathological examinations of the affected spinal cord. These authors could prove a good correlation. Their second aim of the study was to demonstrate that the

metabolic changes are not only in the epicenter of the lesion. In comparison to the current study a 7 Tesla MRI scanner and implanted coils were used.

Using the current protocol in dogs affected with SCI and spinal cord compression may lead to unreliable results, when measured only at the epicenter of the disease. The compression and displacement of the spinal cord above the prolapsed intervertebral disk diminishes the assessable neuronal tissue in this region.⁷ This could lead to significant artifacts in spectral resolution due to deterioration of the signal to noise ratio based on voxel size and positioning. Holly et al.⁷ placed the voxel ahead of the damage in human patients with cervical spondylotic myelopathy because metabolic abnormalities may also occur proximal and/or caudal to a focal spinal cord lesion.³¹ This large extent of metabolic changes may permit the measurement ahead or behind to spinal cord injuries even in a 3 Tesla MRI with appropriate scan duration¹⁹ and large voxel.

In conclusion, MRS is a noninvasive method to investigate cellular structures and metabolism in the CNS but due to some inherent limitations is rarely used in the spinal cord. The current study could prove that MRS measurements are feasible in canine spinal cord using large voxel size and long scanning time. It has to be considered that small voxel have a low spectral resolution and the use of large voxel may result in contamination by surrounding or healthy tissue. The evaluated metabolite concentrations in unaffected tissue exhibit higher values in the spinal cord than in the brain.

4.6 Disclaimer

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

4.7 Acknowledgements

This study was partly funded by the German Research Foundation (DFG, FOR 1103/TI 309/4-1). The authors also thank Dr. Martin Beyerbach for his support with the statistical analysis.

4.8 References

1. Blamire AM, Cader S, Lee M, Palace J, Matthews PM. Axonal damage in the spinal cord of multiple sclerosis patients detected by magnetic resonance spectroscopy. *Magnet Reson Med.* 2007;**58**: 880-885.
2. Kim Y-G, Choi G-H, Kim D-H, Kim Y-D, Kang Y-K, Kim J-K. In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Human Spinal Mass Lesions. *J Spinal Disord Tech.* 2004;**17**: 405-411.
3. Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* 2001;**14**: 260-264.
4. Bonavita S, Di Salle F, Tedeschi G. Proton MRS in neurological disorders. *Eur J Radiol.* 1999;**30**: 125-131.
5. Narayana PA. Magnetic Resonance Spectroscopy in the Monitoring of Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging.* 2005;**15**: 46S-57S.
6. Qian J, Herrera JJ, Narayana PA. Neuronal and Axonal Degeneration in Experimental Spinal Cord Injury: In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy and Histology. *J Neurotraum.* 2010;**27**: 599–610.
7. Holly LT, Freitas B, McArthur DL, Salamon N. Proton magnetic resonance spectroscopy to evaluate spinal cord axonal injury in cervical spondylotic myelopathy. *J Neurosurg: Spine.* 2009;**10**: 194-200.
8. Gómez-Ansón B, MacManus DG, Parker GJM, Davie CA, Barker GJ, Moseley IF, et al. In vivo ¹H-magnetic resonance spectroscopy of the spinal cord in humans. *Neuroradiology.* 2000;**42**: 515-517.
9. Bilgen M, Elshafiey I, Narayana PA. In vivo magnetic resonance microscopy of rat spinal cord at 7 T using implantable RF coils. *Magnet Reson Med.* 2001;**46**: 1250-1253.
10. Balla DZ, Faber C. In vivo intermolecular zero-quantum coherence MR spectroscopy in the rat spinal cord at 17.6 T: a feasibility study. *Magn Reson Mater Phy.* 2007;**20**: 183-191.
11. Silver X, Ni WX, Mercer EV, Beck BL, Bossart EL, Inglis B, et al. In vivo ¹H magnetic resonance imaging and spectroscopy of the rat spinal cord using an inductively-coupled chronically implanted RF coil. *Magnet Reson Med.* 2001;**46**: 1216-1222.

12. Vink R, Noble LJ, Knoblach SM, Bendall MR, Faden AI. Metabolic changes in rabbit spinal cord after trauma: Magnetic resonance spectroscopy studies. *Ann Neurol.* 1989;**25**: 26-31.
13. Zelaya FO, Chalk JB, Mullins P, Brereton IM, Doddrell DM. Localized 1H NMR spectroscopy of rat spinal cord in Vivo. *Magnet Reson Med.* 1996;**35**: 443-448.
14. Brisson BA. Intervertebral Disc Disease in Dogs. *Vet Clin N Am-Small.* 2010;**40**: 829-858.
15. Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotraum.* 2006;**23**: 318-334.
16. Boekhoff TM, Flieshardt C, Ensinger E-M, Fork M, Kramer S, Tipold A. Quantitative Magnetic Resonance Imaging Characteristics: Evaluation of Prognostic Value in the Dog as a Translational Model for Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech.* 2012;**25**: E81-E87.
17. Levine JM, Fosgate GT, Chen AV, Rushing R, Nghiem PP, Platt SR, et al. Magnetic Resonance Imaging in Dogs with Neurologic Impairment Due to Acute Thoracic and Lumbar Intervertebral Disk Herniation. *J Vet Intern Med.* 2009;**23**: 1220-1226.
18. Barker PB, Hearshen DO, Boska MD. Single-voxel proton MRS of the human brain at 1.5T and 3.0T. *Magnet Reson Med.* 2001;**45**: 765-769.
19. Marliani AF, Clementi V, Albini-Riccioli L, Agati R, Leonardi M. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the human cervical spinal cord at 3 tesla. *Magnet Reson Med.* 2007;**57**: 160-163.
20. Kendi AK, Tan F, Kendi M, Huvaj S, Tellioglu S. MR spectroscopy of cervical spinal cord in patients with multiple sclerosis. *Neuroradiology.* 2004;**46**: 764-769.
21. Schubert F, Gallinat J, Seifert F, Rinneberg H. Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *NeuroImage.* 2004;**21**: 1762-1771.
22. Kuzniecky RI, Jackson GD. *Magnetic Resonance In Epilepsy: Neuroimaging Techniques*: Elsevier Academic Press, 2005;334-383.
23. Barker PB, Bizzi A, De Stefano N, Gullapalli R, Lin DDM. Spectral analysis methods, quantitation and common artifacts. *Clinical MR Spectroscopy: Techniques and Applications* Cambridge University Press, 2010;1-18.
24. Choi J-K, Küstermann E, Dedeoglu A, Jenkins BG. Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice and the effects of dietary creatine supplementation. *Eur J Neurosci.* 2009;**30**: 2143-2150.
25. El Ghazi I, Sheng W, Hu S, Reilly B, Lokensgard J, Rock R, et al. Changes in the NMR Metabolic Profile of Human Microglial Cells Exposed to Lipopolysaccharide or Morphine. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;**5**: 574-581.
26. Ratai E-M, Annamalai L, Burdo T, Joo C-G, Bombardier JP, Fell R, et al. Brain creatine elevation and N-acetylaspartate reduction indicates neuronal dysfunction in the setting of enhanced glial energy metabolism in a macaque model of NeuroAIDS. *Magnet Reson Med.* 2011;**66**: 625-634.
27. Lin A, Ross BD, Harris K, Wong W. Efficacy of proton magnetic resonance spectroscopy in neurological diagnosis and neurotherapeutic decision making. *NeuroRX.* 2005;**2**: 197-214.

28. Neppi R, Nguyen CM, Bowen W, Al-Saadi T, Pallagi J, Morris G, et al. In Vivo Detection of Postictal Perturbations of Cerebral Metabolism by Use of Proton MR Spectroscopy: Preliminary Results in a Canine Model of Prolonged Generalized Seizures. *Am J Neuroradiol.* 2001;**22**: 1933-1943.
29. Cooke FJ, Blamire AM, Manners DN, Styles P, Rajagopalan B. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the cervical spinal cord. *Magnet Reson Med.* 2004;**51**: 1122-1128.
30. Henning A, Schär M, Kollias SS, Boesiger P, Dydak U. Quantitative magnetic resonance spectroscopy in the entire human cervical spinal cord and beyond at 3T. *Magnet Reson Med.* 2008;**59**: 1250-1258.
31. Ries M, Jones RA, Dousset V, Moonen CTW. Diffusion tensor MRI of the spinal cord. *Magnet Reson Med.* 2000;**44**: 884-892.

5 Diskussion

Nach unserem Wissen sind bis heute keine Studien über die spektroskopische Untersuchung des kaninen Rückenmarkes veröffentlicht worden. Um Erfahrungen mit dieser Methode zu sammeln und später prognostische Untersuchungen bei Hunden mit Rückenmarkstrauma durchführen zu können, sollten verschiedene Einstellungen evaluiert werden, mit denen eindeutig identifizierbare Metabolitenkonzentrationen gemessen werden können. Aus diesem Grund maßen wir verschiedene Voxelgrößen und verschiedene Metaboliten im Rückenmark von Hunden, um die Möglichkeit einer Nutzung der MRS in dieser Region zu evaluieren. Die gemessenen Metaboliten bestanden aus NAA, einem Marker für neuronale und axonale Integrität (CHOI et al. 2009; HOLLY et al. 2009). Laktat, als Endprodukt der Glykolyse, entsteht nur unter sauerstoffarmen Bedingungen oder spiegelt einen hohen Liquorgehalt wider (NARAYANA 2005; EL GHAZI et al. 2009; HOLLY et al. 2009). Kreatin, als Marker des Energiemetabolismus im zentralen Nervensystem, zeigt relativ konstante Werte und wird daher häufig als Referenzpeak genutzt (BONAVITA et al. 1999; HOLLY et al. 2009). Cholin ist vordergründig ein Metabolit, der den Membranstoffwechsel neuronaler Zellen anzeigt und bei deren Abbau erhöht ist (HOLLY et al. 2009). Myo-Inositol stellt einen Gliamarker dar, der sich bei Gliose erhöht (BONAVITA et al. 1999; NARAYANA 2005; HOLLY et al. 2009). Glutamat als exzitatorische Aminosäure erhöht sich im ZNS bei Anfallsgeschehen (SCHUBERT et al. 2004; NARAYANA 2005; BARKER et al. 2010). Die Evaluierung der absoluten Konzentrationen im Rückenmark war ein wichtiger Schritt, um diese als Ausgangswert zu nutzen und sie so einem Vergleich zu pathologischen Veränderungen zugänglich zu machen. Des Weiteren sind sie als absolute Werte auch zum Vergleich mit unterschiedlichen Geräten und Einstellungen geeignet und durch die Vermeidung der Darstellung als Verhältnis zu einem anderen Metaboliten kann eine Doppeldeutigkeit bezüglich einer Erniedrigung oder Erhöhung eines oder beider Metaboliten ausgeschlossen werden (BARKER et al. 1994). Zusätzlich konnte bei verschiedenen Menschen, die an chronischer multipler Sklerose, aber auch anderen Krankheiten erkrankt waren, gezeigt werden, dass auch die Kreatin-Werte,

also jener Metabolit, der immer als Verhältnis angegeben wird, Schwankungen unterlegen ist (DE STEFANO et al. 2005; MORI et al. 2011) und daher gegebenenfalls nur eingeschränkt als Referenzpeak verwendet werden sollte (SARCHIELLI et al. 2001; LANFERMANN et al. 2004; FORTON et al. 2008; KANG et al. 2009; TAKANASHI et al. 2011). Alle in dieser Studie im Rückenmark gemessenen Metaboliten zeigten sowohl eine größere Spannweite, als auch insgesamt höhere Konzentrationen, als die gemessenen Werte der gleichen Metaboliten im Gehirn. Daher waren wir in der Lage, die Hypothese zu bestätigen, dass die Konzentrationen der Metaboliten Cholin, Myo-Inositol, Glutamat und Glutamin, Kreatin und N-acetyl-aspartat nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Hunden im Rückenmark höhere Werte zeigen als im Gehirn (MARLIANI et al. 2007; CHOI et al. 2009). In diesem Zusammenhang muss jedoch beachtet werden, dass die Verteilung der weißen und der grauen Substanz und der Liquorgehalt entlang der longitudinalen Achse des Rückenmarks schwankt und so regional zu unterschiedlichen Gehalten führt (ZELAYA et al. 1996). Daher ist anzunehmen, dass auch die von uns erfassten Konzentrationen dynamisch sind und regionalen Schwankungen unterliegen könnten. Zusätzlich könnte dieser Aspekt den hohen gemessenen Laktat-Peak im Rückenmark, als Darstellung eines hohen Liquorgehaltes in der gemessenen Probe, erklären. Die ebenfalls im Rückenmark viel höher gemessenen Konzentrationen an Glx könnten gegebenenfalls ein Nebeneffekt eines Anfallsgeschehens sein. Bedingt durch unseren Studienaufbau, also die Nutzung von Patiententieren, die aus verschiedenen Gründen eine Indikation für eine MRT-Untersuchung hatten, wurden viele Tiere mit dem Verdacht auf idiopathische Epilepsie und in einigen Fällen auch Tiere nach einem akuten Auftreten der epileptischen Anfälle untersucht. Diese Hunde könnten daher einen erhöhten Glutamat-Gehalt im zervikalen Rückenmark gehabt haben, obwohl die Auswertung der Bildgebung mittels MRT keine strukturellen Veränderungen ergeben hatte und so bis zur MRS Untersuchung unentdeckt geblieben ist. Marliani et al. (MARLIANI et al. 2007) verwendeten einen unserem Ansatz ähnlichen Versuchsaufbau mit menschlichen Probanden. Auch sie hatten als vorrangiges Ziel die Etablierung von spektroskopischen Messungen in einem 3 Tesla MRT in der klinischen Routine-Diagnostik. Sie verglichen die

Messungen im Rückenmark von 10 gesunden Versuchsprobanden mit Messungen in der Hirnstammregion. Es zeigte sich, dass die Werte von NAA, Cho und Cr in beiden Regionen ähnlich hoch waren, obwohl die prozentuale Standardabweichung höhere Konzentrationen im Rückenmark zeigte. Da diese Erkenntnis unseren Ergebnissen sehr ähnlich war, gehen wir unter anderem mit ihrer Behauptung konform, dass diese Konzentrationsunterschiede zwischen beiden untersuchten Lokalisationen durch Unterschiede im Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) zustande kommen können.

Um die Auswirkung dieser ohnehin schon sehr beengten Region auf die spektroskopische Untersuchung zu testen, benutzten wir in unserer Studie 2 Voxelgrößen und verglichen diese miteinander. Es zeigte sich, dass ein kleines Voxel eine enorme Zunahme an unsicher beurteilbaren Werten zeigte, was auf einen Anstieg des Rauschens im Vergleich zum Signal zurückzuführen war. Die spektrale Auflösung ist dadurch vermindert, die Auswertung erschwert. Aus diesem Grund vergrößerten wir das Voxel, um die Zunahme der spektralen Auflösung, gemessen anhand der Abnahme der unsicher beurteilbaren Werte nach der spektralen Auswertung, zu untersuchen. Es zeigte sich, dass genau dies möglich war. Die Vergrößerung des Voxel war jedoch nur in der so genannten „head-to-feet“, also von kranial nach kaudal, Richtung möglich und verhinderte so die Untersuchung von kleineren fokalen Läsionen des Rückenmarkes, weil es zu einer Kontamination des Voxels mit gesundem Gewebe kam. In vorangegangenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass das im MRT vermeintlich gesunde Gewebe neben einer Läsion deutliche metabolische Veränderungen im MRS zeigte (HOLLY et al. 2009). Es ist jedoch zu beachten, dass in einer Studie von Choi et al. (CHOI et al. 2009) eine Verbindung zwischen der Verzerrung des magnetischen Feldes B_0 und dem Spalt zwischen dem Gewebe, das sich zwischen den Processus spinosi und in den Processus spinosi selbst befindet, besteht. Große Voxel überspannen jedoch in ihrer Ausdehnung mehr als einen Intervertebralspalt und könnten daher auch, da dieser Bereich auch ein „shimmen“ erschwert, zu einem Signalverlust führen (CHOI et al. 2009).

Weiterhin verlängerten wir die NSA, also die Anzahl der Wiederholung der Puls-Sequenz, von anfänglichen 128 auf 240 und steigerten es weiter auf 448, um das

Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Jedoch führte dies automatisch zu einer Verlängerung der Messzeit, im Studienfall sogar um das Zweifache der ursprünglichen Zeit und verlängerte dadurch auch die Anästhesiedauer für den Patienten.

Es gibt zusätzlich weitere Faktoren, die die Inhomogenität und damit deutlich das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflussen. Die am häufigsten auftretenden Probleme sind Bewegungsartefakte, wie sie durch Atem- und kardiale Bewegungen entstehen. Sie führen zu Veränderungen des Liquorflusses im Zentralkanal des Rückenmarkes und können somit zu einer atem- und herzsynchronen Bewegung des Rückenmarkes führen (COOKE et al. 2004). Auch ein hoher Liquorgehalt in der gemessenen Probe stellt eine Kontamination dar, die zu einer Beeinträchtigung des SNR führt (BARKER et al. 2001). Des Weiteren kann es zu einer Kontamination des Voxels durch Fett oder anderes umgebendes Gewebe kommen, und auch der das Rückenmark umfassende Knochen führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Magnetfeldhomogenität (GÓMEZ-ANSÓN et al. 2000). Die Beeinträchtigungen durch Bewegungen können gegebenenfalls durch die Nutzung von gewissen Einstellungsparametern kompensiert werden. So gibt es die Möglichkeiten, einer Atmungskompensation und einer Trigger-Funktion für die Herztätigkeit, bei der die Messungen genau zwischen den abwechselnden Zyklen stattfinden und nur eine minimale Beeinträchtigung aufzeigen (BILGEN et al. 2001; COOKE et al. 2004; BLAMIRE et al. 2007; HENNING et al. 2008; HOLLY et al. 2009). Alle im Rückenmark oder im Hirnstamm positionierten Voxel enthielten ein Gemisch aus grauer und weißer Substanz sowie Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit im Zentralkanal. Wir ließen größte Vorsicht walten, um eine Kontamination des Voxels durch Fett oder anderes, das Rückenmark umgebende Gewebe zu vermeiden und positionierten das Voxel exakt. Wir bezweckten damit eine Vermeidung oder zumindest Verminderung einer Kontamination im größtmöglichen Maße, um die Anfälligkeit der magnetischen Feldstärke auf ein Minimum zu reduzieren (ZELAYA et al. 1996; OBER et al. 2013). Als weitere Möglichkeit der Messungsstabilisierung besteht eine Nutzung einer so genannten „outer volume suppression“ (OVS), die für eine Abschirmung des Voxels gegen Störeinflüsse wie die Liquorpulsation eingesetzt werden kann (MARLIANI et

al. 2007). Jedoch verlängert auch diese Einstellung wieder die Untersuchungs-, und somit auch die Anästhesiedauer und könnte daher einer routinemäßigen Nutzung der MRS im Wege stehen. Aus diesem Grund wurden diese Einstellungen in der vorliegenden Studie nicht genutzt. In der Studie von Zelaya et al. (ZELAYA et al. 1996) wurden eine autoimmune Enzephalomyelitis bei Ratten experimentell induziert und mittels Oberflächenspulen spektroskopische Messungen im Rückenmark durchgeführt. Das verwendete 4,3 Tesla MRT-Gerät war zwar in der Lage, gute Spektren zu ermitteln, jedoch zeigten sich dieselben Probleme bezüglich der Inhomogenität und der Voxelgröße. Die Autoren umgingen dieses Problem durch eine Verlängerung der Untersuchungsdauer. Unter klinischen Bedingungen ist jedoch eine extensive Verlängerung der Anästhesiedauer unter Umständen nicht möglich und, die Entscheidung dafür oder dagegen sollte anhand des Habitus des Patienten getroffen werden.

Die zuvor veröffentlichten Studien über spektroskopische Messungen im Rückenmark an lebenden Tieren begannen mit implantierten Radiofrequenz-Spulen (RF-coils), die vornehmlich Ratten nach einer Hemilaminektomie unmittelbar neben dem zu untersuchenden Rückenmark implantiert wurden. Durch die unmittelbare Nähe zum untersuchten Bereich sollte das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich gesteigert werden (ZELAYA et al. 1996; BILGEN et al. 2001; SILVER et al. 2001). Quian et al. (QIAN et al. 2010) nutzten ebenfalls implantierte RF-Spulen und untersuchten damit anschließend experimentell induzierte Schädigungen des Rückenmarkes mittels Magnetresonanztomographie *in vivo*. Als Ergänzung zu ihren Untersuchungen nahmen sie die histopathologische Untersuchung des betroffenen Rückenmarkabschnitts in Anspruch, um ihre per MRS erhaltenen Daten zu überprüfen. Dies taten sie jeweils nach verschiedenen Zeitabständen nach dem Insult, sowie an verschiedenen Lokalisationen und fanden eine gute Korrelation. Des Weiteren wollten sie als weiteres Ziel ihrer Studie aufzeigen, dass die metabolischen Veränderungen nach einem Insult nicht nur im Epizentrum der Läsion liegen, sondern sich auch auf das umgebende Gewebe ausbreiten. Im Vergleich zu unserer Studie nutzten sie ein 7 Tesla MRT-Gerät, welches eine deutlich bessere Sensitivität und spektrale Auflösung aufzeigt (TKÁČ et al. 2001; TKÁČ et al. 2009). Implantierte

Spulen können unter klinischen Bedingungen nicht angewendet werden. Trotzdem zeigen diese Studien, dass die MRS eine durchaus sichere Methode *in vivo* zur Evaluierung pathologischer Vorgänge im Rückenmark darstellt.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Kompression und Verdrängung des Rückenmarkes nach einem Bandscheibenvorfall, welcher das verfügbare neuronale Gewebe in diesem Bereich stark vermindert (HOLLY et al. 2009). Dadurch stände der Untersuchung gegebenenfalls nur ein enorm kleines Voxel zu Verfügung, welches in einigen Fällen unter Umständen nicht mehr messbar sein könnte. Das heißt, es würde allein durch die stark geschmälerte Voxelgröße und die schwierigen Positionierungsmöglichkeiten zu deutlichen Artefakten bezüglich der spektralen Auflösung durch die Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses kommen. Holly et al. (HOLLY et al. 2009) berücksichtigten diese Gegebenheit und platzierten das Voxel vor der eigentlichen Läsion in menschlichen Probanden mit zervikaler spondylotischer Myelopathie. Sie taten dies in dem Wissen, dass sich metabolische Veränderungen, die im MRT nicht sichtbar sein müssen, auch deutlich vor der Läsion ausbreiten können (RIES et al. 2000). Diese starke Ausbreitung der messbaren Veränderungen könnte das Potential haben, Messungen bei Bandscheibenvorfällen auch in einem 3 Tesla-MRT mit großen Voxel und einer adäquaten Untersuchungs- und Anästhesiedauer vorzunehmen (MARLIANI et al. 2007). Die MRS-Messungen erfolgten dann zwar nicht direkt über der Läsion, hätten aber trotzdem eine große Aussagekraft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Magnetresonanzspektroskopie als nicht invasive Untersuchungsmethode zur Erfassung von zellulären Strukturen und des Metabolismus im zentralen Nervensystem durchaus geeignet ist, jedoch bisher nur selten im Rückenmark zum Einsatz kam. Unsere aus den Messungen erhaltenen Ergebnisse von Untersuchungen im Rückenmark lassen die Behauptung zu, dass Datenerhebungen im kaninen Rückenmark durchaus möglich sind. Jedoch ist zu beachten, dass kleine Voxel auch eine geringere spektrale Auflösung zeigen. Daraus resultierend, lässt sich ableiten, dass die Nutzung von größeren Voxel in der Spektroskopie eine sicherere Auswertung zulässt, wobei Kontaminationen mit

umgebendem Gewebe vermieden werden sollten. Die in unserer Studie, nach MRT-Untersuchungen in unverändertem Gewebe ermittelten, Metaboliten-Konzentrationen zeigten höhere Messwerte im Rückenmark im Vergleich zu den Messungen im Gehirn. Weiterführende Studien müssen zeigen, wie die hier evaluierten Konzentrationen bei Bandscheibenvorfällen an unterschiedlichen Abschnitten des Rückenmarks abweichen. Eine Überlegung wäre es, diese Abweichungen auch mittels der magnetresonanzspektroskopischen Bildgebung (SRINIVASAN et al. 2004; NELSON et al. 2005) darzustellen.

6 Zusammenfassung

Ahrend, Liza K. (2013):

Untersuchungen zur Anwendung der Magnetresonanztomographie mit einem 3 Tesla MRT *Philips Achieva 3.0T* zur Messung verschiedener Metaboliten im Rückenmark des Hundes *in vivo*

Die Magnetresonanztomographie (MRS) im Rückenmark wird sowohl in der Human-, als auch in der Tiermedizin selten genutzt. Bei verschiedenen Erkrankungen des Gehirns ist die MRS jedoch eine etablierte Methode, um die der Erkrankung zugrundeliegende Pathologie, neben der routinemäßigen Bildgebung durch eine Kernspintomographie (MRT), zu untersuchen und diese zu unterstützen. Die Nutzung im Rückenmark wird durch Magnetfeldinhomogenitäten, durch den das Rückenmark umgebenden Knochen, den kleinen Durchmesser des Rückenmarkes, Bewegungsartefakte, die Liquorpulsation im Zentralkanal und die Kontamination des Voxels durch das umgebende Gewebe, eingeschränkt. Trotzdem ist die MRS in der Lage, pathologische Veränderungen, die eventuell in der MRT nicht sichtbar sind, aufzudecken.

Um die Hypothese zu bestätigen, dass auch beim Hund Metabolitenmessungen mit Hilfe der MRS im Bereich des Rückenmarkes möglich sind, wurden 47 Hunde, die eine eindeutige Indikation für eine MRT-Untersuchung hatten, in Allgemeinanästhesie mit einem 3 Tesla Philips Achieva MRI-Scanner untersucht. Nach einer routinemäßigen MRT-Untersuchung, die zur Aufdeckung von strukturellen Veränderungen und zur gesicherten Platzierung des Voxels dienen sollte, wurde für die spektroskopische Untersuchung im unveränderten Gewebe eine PRESS-Sequenz verwendet. Die Hunde wurden, unabhängig von Alter, Geschlecht, zugrundeliegender Erkrankung und Gewicht, in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei dreiundzwanzig Hunden wurde das Voxel im Gehirn platziert, während die anderen 24 Hunde eine Untersuchung des Rückenmarkes hatten. Jeder Hund hatte nur eine spektroskopische Untersuchung in einer der beiden Lokalisationen. Zusätzlich

wurden zwei verschiedene Voxelgrößen verwendet, um ihre Aussagekraft zu evaluieren. Voxelgrößen, die weniger als 1ml Inhalt hatten, wurden als kleine Voxel bezeichnet, hatten sie mehr als 1ml Gewebesinhalt, wurden sie als große Voxel definiert. Um die evaluierten Daten vergleichen zu können, wurde dieselbe Sequenz verwendet, um bekannte Metabolitenkonzentrationen in einem Rundkolben Phantom, gefüllt mit einer Lösung, die ungefähr den Metaboliten des Gehirngewebes entspricht, zu messen.

Die Analyse der evaluierten Daten wurde an einer separaten Arbeitseinheit, SpectroView, durchgeführt. In gut aufgelösten Spektren waren die Peaks von N-acetyl-aspartat, Cholin, Kreatin, Laktat, Myo-Inositol und Glutamin und Glutamat mit beiden Voxelgrößen zu erkennen. Jeder Metabolit zeigt mit einer Erhöhung oder Erniedrigung seiner Konzentration verschiedene pathologische Veränderungen an. Kleine Voxel zeigten ein verstärktes Auftreten an unsicher beurteilbaren Werten durch ein vermindertes Signal-Rausch-Verhältnis, die durch die oben genannten Einschränkungen auftraten und eine geringe spektrale Auflösung zur Folge hatten. Eine Vergrößerung des Voxel war nur in der „head-to-feet“ Richtung möglich, führte zu einer verminderten Aussagekraft bezüglich kleiner fokaler Läsionen, zeigte jedoch eine Zunahme an gesicherten Werten. Die Metabolitenkonzentrationen waren in der vorliegenden Studie beim Hund im Rückenmark höher als im Gehirn, wie es auch aus der Literatur bei anderen Spezies bekannt ist. In vorliegender Studie konnte eine Voxelgröße bestimmt werden, die sicher beurteilbare Werte erzeugt. Die Einstellungen können für weiterführende Studien verwendet werden, vor allem um die Prognose bei Hunden mit Rückenmarkstrauma in Zukunft besser einschätzen zu können.

7 Summary

Ahrend, Liza K. (2013):

Evaluation of magnetic resonance spectroscopy techniques using a 3 Tesla MRI Philips Achieva 3.0T-scanner to measure different metabolites in the canine spinal cord *in vivo*

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) measurement in the spinal cord is rarely used in human, as well as in veterinary medicine. For several brain disorders, MRS is an established method to investigate the underlying pathology in addition to routine magnetic resonance imaging (MRI) examinations. However, the use of MRS in spinal cord diseases is restricted due to magnetic field inhomogeneities induced by the encompassing bone, the small diameter of the spinal cord, movement artifacts, cerebrospinal fluid (CSF) pulsation within the central canal and contamination of the voxel by the surrounding tissue. Despite these limitations, MRS is able to reveal pathological changes invisible in conventional magnetic resonance imaging.

To prove the hypothesis that measurement of metabolites in the canine spinal cord is feasible with MRS, 47 dogs undergoing routine magnetic resonance imaging examination, were examined under general anesthesia in a 3 Tesla Philips Achieva MRI-scanner. After routine MRI diagnostic to find structural abnormalities and to place a voxel carefully, a PRESS-sequence was used for spectroscopic measurements in normally appearing tissue. The dogs were divided into two groups, independent of age, gender, underlying disease and weight. In 23 dogs the voxel was placed in the brain and in the other 24 animals in the spinal cord. Every dog had only one spectroscopic examination in one of the two localizations. Additionally, 2 different voxel sizes were used and compared. Voxel sizes containing less than 1ml tissue were defined as small voxel and containing more than one milliliter as large voxel. To compare the evaluated data, the same sequences were used to measure well known metabolite concentrations in a round bottom flask phantom filled with a nearly physiological solution of brain metabolites.

Summary

The analysis of the evaluated data was performed with an extended workspace, SpectroView. In well resolved spectra the peaks of N-acetyl-aspartate, choline, creatine, lactate, myo-inositol as well as glutamine and glutamate were measurable using both voxel sizes. Each metabolite represents different pathological changes depending on their increased or decreased values. Small voxel showed an increased amount of unreliable measurements due to decreased signal to noise ratio (SNR) resulting in low spectral resolution. Enlargement of the voxel size in the spinal cord, which was only possible in the head-to-feet direction, led to loss of presentability of small focal lesions but permitted a verified assignment of metabolites. Additionally, the metabolite concentrations were evaluated for all metabolites and showed higher values in the spinal cord than in the brain, which is consistent with the literature in other species. The evaluation of the voxel size that is able to require reliable values of metabolite concentrations in the canine spinal cord is essential for future studies to investigate prognostic aspects in spinal cord trauma in the dog.

8 Literaturverzeichnis

BALLA, D. Z. u. C. FABER (2007):

In vivo intermolecular zero-quantum coherence MR spectroscopy in the rat spinal cord at 17.6 T: a feasibility study.

Magn Reson Mater Phy 20, 183-191

BAPTISTE, D. C. u. M. G. FEHLINGS (2006):

Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord.

J Neurotraum 23, 318-334

BARKER, P. B., A. BIZZI, N. DE STEFANO, R. GULLAPALLI u. D. D. M. LIN (2010):

Spectral analysis methods, quantitation and common artifacts.

In: Clinical MR Spectroscopy: Techniques and Applications

Cambridge University Press, S. 1-18

BARKER, P. B., S. N. BREITER, B. J. SOHER, J. C. CHATHAM, J. R. FORDER, M.

A. SAMPHILIPO, C. A. MAGEE u. J. H. ANDERSON (1994):

Quantitative proton spectroscopy of canine brain: in Vivo and in Vitro correlations.

Magnet Reson Med 32, 157-163

BARKER, P. B., D. O. HEARSHEN u. M. D. BOSKA (2001):

Single-voxel proton MRS of the human brain at 1.5T and 3.0T.

Magnet Reson Med 45, 765-769

BILGEN, M., I. ELSHAFIEY u. P. A. NARAYANA (2001):

In vivo magnetic resonance microscopy of rat spinal cord at 7 T using implantable RF- coils.

Magnet Reson Med 46, 1250-1253

BLAMIRE, A. M., S. CADER, M. LEE, J. PALACE u. P. M. MATTHEWS (2007):

Axonal damage in the spinal cord of multiple sclerosis patients detected by magnetic resonance spectroscopy.

Magnet Reson Med 58, 880-885

BLOCH, F., W. W. HANSEN u. M. E. PACKARD (1946):

Nuclear induction.

Physiol Rev 69, 127

BOEKHOFF, T. M., C. FLIESHARDT, E.-M. ENSINGER, M. FORK, S. KRAMER u. A. TIPOLD (2012):

Quantitative Magnetic Resonance Imaging Characteristics: Evaluation of Prognostic Value in the Dog as a Translational Model for Spinal Cord Injury.

J Spinal Disord Tech 25, E81-E87

BONAVITA, S., F. DI SALLE u. G. TEDESCHI (1999):

Proton MRS in neurological disorders.

Eur J Radiol 30, 125-131

BRISSON, B. A. (2010):

Intervertebral Disc Disease in Dogs.

Vet Clin N Am-Small 40, 829-858

BROOKS, W. M., W. L. SIBBITT, M. KORNFELD, R. E. JUNG, A. D. BANKHURST u. C. A. ROLDAN (2010):

The histopathologic associates of neurometabolite abnormalities in fatal neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum 62, 2055-2063

CHOI, J.-K., E. KÜSTERMANN, A. DEDEOGLU u. B. G. JENKINS (2009):
Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice
and the effects of dietary creatine supplementation.
Eur J Neurosci 30, 2143-2150

CIANFONI, A., S. NIKU u. S. G. IMBESI (2007):
Metabolite Findings in Tumefactive Demyelinating Lesions Utilizing Short Echo Time
Proton Magnetic Resonance Spectroscopy.
Am J Neuroradiol 28, 272-277

COOKE, F. J., A. M. BLAMIRE, D. N. MANNERS, P. STYLES u. B. RAJAGOPALAN
(2004):
Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the cervical spinal cord.
Magnet Reson Med 51, 1122-1128

DE STEFANO, N., M. L. BARTOLOZZI, L. GUIDI, M. L. STROMILLO u. A.
FEDERICO (2005):
Magnetic resonance spectroscopy as a measure of brain damage in multiple
sclerosis.
J Neurol Sci 233, 203-208

DE STEFANO, N. u. M. FILIPPI (2007):
MR Spectroscopy in Multiple Sclerosis.
J Neuroimaging 17, 31S-35S

DU MESNIL DE ROCHEMONT, A. (2004)
1H-MR-spektroskopische Bestimmung der zerebralen Glutamat- und Glutamin-
konzentration bei Patienten mit einer Demenz vom Alzheimer Typ.
Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe- Universität, Fachbereich Medizin,
Zentrum für Radiologie, Diss. med.

EL GHAZI, I., W. SHENG, S. HU, B. REILLY, J. LOKENSGARD, R. ROCK, P. PETERSON, G. WILCOX u. I. ARMITAGE (2009):

Changes in the NMR Metabolic Profile of Human Microglial Cells Exposed to Lipopolysaccharide or Morphine.

J Neuroimmune Pharmacol 5, 574-581

FORTON, D. M., G. HAMILTON, J. M. ALLSOP, V. P. GROVER, K. WESNES, C. O'SULLIVAN, H. C. THOMAS u. S. D. TAYLOR-ROBINSON (2008):

Cerebral immune activation in chronic hepatitis C infection: A magnetic resonance spectroscopy study.

J Hepatol 49, 316-322

GÓMEZ-ANSÓN, B., D. G. MACMANUS, G. J. M. PARKER, C. A. DAVIE, G. J. BARKER, I. F. MOSELEY, W. I. MCDONALD u. D. H. MILLER (2000):

In vivo ¹H-magnetic resonance spectroscopy of the spinal cord in humans.

Neuroradiology 42, 515-517

GUSSEW, A., R. RZANNY, M. ERDTEL, H. C. SCHOLLE, W. A. KAISER, H. J. MENTZEL u. J. R. R. REICHENBACH (2009):

Time-resolved functional ¹H MR spectroscopic detection of glutamate concentration changes in the brain during acute heat pain stimulation.

NeuroImage 49, 1895-1902

HENNING, A., M. SCHÄR, S. S. KOLLIAS, P. BOESIGER u. U. DYDAK (2008):

Quantitative magnetic resonance spectroscopy in the entire human cervical spinal cord and beyond at 3T.

Magnet Reson Med 59, 1250-1258

HOLLY, L. T., B. FREITAS, D. L. MCARTHUR u. N. SALAMON (2009):

Proton magnetic resonance spectroscopy to evaluate spinal cord axonal injury in cervical spondylotic myelopathy.

J Neurosurg: Spine 10, 194-200

JÄRNUM, H., S. F. ESKILDSSEN, E. G. STEFFENSEN, S. LUNDBYE-CHRISTENSEN, C. W. SIMONSEN, I. S. THOMSEN, E.-T. FRÜND, J. THÉBERGE u. E.-M. LARSSON (2011):

Longitudinal MRI study of cortical thickness, perfusion, and metabolite levels in major depressive disorder.

Acta Psychiatr Scand 124, 435-446

KANG, B.-T., D.-P. JANG, J.-H. LEE, D.-I. JUNG, S.-H. GU, C.-Y. LIM, Y.-B. KIM, F.-S. QUAN, H.-J. KIM, E.-J. WOO, Z.-H. CHO u. H.-M. PARK (2009):

Detection of cerebral metabolites in a canine model of ischemic stroke using ¹H magnetic resonance spectroscopy.

Res Vet Sci 87, 300-306

KENDI, A. K., F. TAN, M. KENDI, S. HUVAJ u. S. TELLIOGLU (2004):

MR spectroscopy of cervical spinal cord in patients with multiple sclerosis.

Neuroradiology 46, 764-769

KHIAT, A., M. D'AMOUR, F. SOUCHON u. Y. BOULANGER (2010):

MRS study of the effects of minocycline on markers of neuronal and microglial integrity in ALS.

Magn Reson Imaging 28, 1456-1460

KIESSLING, F. u. B. J. PICHLER (2011):

Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide.

Springer Verlag, S. 195-205

KIM, Y.-G., G.-H. CHOI, D.-H. KIM, Y.-D. KIM, Y.-K. KANG u. J.-K. KIM (2004):

In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Human Spinal Mass Lesions.

J Spinal Disord Tech 17, 405-411

KUZNIECKY, R. I. u. G. D. JACKSON (2005):

Magnetic Resonance In Epilepsy: Neuroimaging Techniques.

Elsevier Academic Press, S. 334-383

LANFERMANN, H., S. HERMINGHAUS, U. PILATUS, E. HATTINGEN u. F. E. ZANELLA (2004):

Bedeutung der ¹H-MR-Spektroskopie bei der Differenzialdiagnose und Graduierung intrakranieller Tumoren.

Dtsch Arztebl 101, A 649-655

LAUBENBERGER, J., S. BAYER, T. THIEL, J. HENNIG u. M. LANGER (1998):

Klinische Anwendungen der Protonen-Magnetresonanzspektroskopie des Gehirns.

Fortschr Röntgenstr 168, 539-549

LAUTERBUR, P. C. (1973):

Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetiv Resonance.

Nature 242, 190-191

LEVINE, J. M., G. T. FOSGATE, A. V. CHEN, R. RUSHING, P. P. NGHIEM, S. R. PLATT, R. S. BAGLEY, M. KENT, D. G. HICKS, B. D. YOUNG u. S. J. SCHATZBERG (2009):

Magnetic Resonance Imaging in Dogs with Neurologic Impairment Due to Acute Thoracic and Lumbar Intervertebral Disk Herniation.

J Vet Intern Med 23, 1220-1226

LIKAVČANOVÁ, K., L. URDZÍKOVÁ, M. HÁJEK u. E. SYKOVÁ (2008):

Metabolic changes in the thalamus after spinal cord injury followed by proton MR spectroscopy.

Magnet Reson Med 59, 499-506

LIN, A., B. D. ROSS, K. HARRIS u. W. WONG (2005):

Efficacy of proton magnetic resonance spectroscopy in neurological diagnosis and neurotherapeutic decision making.

NeuroRX 2, 197-214

LUNDIN, F., A. TISELL, O. DAHLQVIST LEINHARD, M. TULLBERG, C. WIKKELSOE, P. LUNDBERG u. G. LEIJON (2011):

Reduced thalamic N-acetylaspartate in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a controlled ¹H-magnetic resonance spectroscopy study of frontal deep white matter and the thalamus using absolute quantification.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 82, 772-778

MANDAL, P. K. (2011):

In vivo proton magnetic resonance spectroscopic signal processing for the absolute quantitation of brain metabolites.

Eur J Radiol 81, e653-e664

MARLIANI, A. F., V. CLEMENTI, L. ALBINI-RICCIOLI, R. AGATI u. M. LEONARDI (2007):

Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the human cervical spinal cord at 3 tesla.

Magnet Reson Med 57, 160-163

MEOLA, S. D., J. K. SWIDERSKI, E. K. RANDALL, S. L. KRAFT u. R. H. PALMER (2007):

What Is Your Diagnosis?

J Am Vet Med Assoc 230, 1629-1630

MOELLER, H. E., G. KURLEMANN, M. PUTZLER, D. WIEDERMANN, T. HILBICH u. B. FIEDLER (2005):

Magnetic resonance spectroscopy in patients with MELAS.

J Neurol Sci 229- 230, 131-139

MOFFETT, J. R., M. A. NAMBOODIRI, C. B. CANGRO u. J. H. NEALE (1991):

Immunohistochemical localization of N-acetylaspartate in rat brain.

Neuroreport 2, 131-134

MORI, K., T. MORI, Y. TODA, E. FUJII, M. MIYAZAKI, M. HARADA u. S. KAGAMI (2011):

Decreased benzodiazepine receptor and increased GABA level in cortical tubers in tuberous sclerosis complex.

Brain Dev-Jpn, 1-9

NARAYANA, P. A. (2005):

Magnetic Resonance Spectroscopy in the Monitoring of Multiple Sclerosis.

J Neuroimaging 15, 46S-57S

NELSON, J. A., H. DOU, B. ELLISON, M. UBERTI, H. XIONG, E. ANDERSON, M. MELLON, H. A. GELBARD, M. BOSKA u. H. E. GENDELMAN (2005):

Coregistration of quantitative proton magnetic resonance spectroscopic imaging with neuropathological and neurophysiological analyses defines the extent of neuronal impairments in murine human immunodeficiency virus type-1 encephalitis.

J Neurosci Res 80, 562-575

NEPPL, R., C. M. NGUYEN, W. BOWEN, T. AL-SAAD, J. PALLAGI, G. MORRIS, W. MUELLER, R. JOHNSON, R. PROST u. S. D. RAND (2001):

In Vivo Detection of Postictal Perturbations of Cerebral Metabolism by Use of Proton MR Spectroscopy: Preliminary Results in a Canine Model of Prolonged Generalized Seizures.

Am J Neuroradiol 22, 1933-1943

OBER, C. P., C. D. WARRINGTON, D. A. FEENEY, C. R. JESSEN u. S. STEWARD (2013):

Optimizing a protocol for ¹H-magnetic resonance spectroscopy of the canine brain at 3T.

Vet Radiol Ultrasound 54, 149-158

PROVENCHER, S. W. (2001):

Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel.

NMR Biomed 14, 260-264

PURCELL, E. M., H. C. TORREY u. R. V. POUND (1946):

Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solids.

Physiol Rev 69, 37-38

QIAN, J., J. J. HERRERA u. P. A. NARAYANA (2010):

Neuronal and Axonal Degeneration in Experimental Spinal Cord Injury: In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy and Histology.

J Neurotraum 27, 599–610

RASCHKE, F., E. FUSTER-GARCIA, K. S. OPSTAD u. F. A. HOWE (2011):

Classification of single-voxel ¹H spectra of brain tumours using LCModel.

NMR Biomed 25, 322-331

RATAI, E.-M., L. ANNAMALAI, T. BURDO, C.-G. JOO, J. P. BOMBARDIER, R. FELL, R. HAKIMELAHI, J. HE, M. R. LENTZ, J. CAMPBELL, E. CURRAN, E. F. HALPERN, E. MASLIAH, S. V. WESTMORELAND, K. C. WILLIAMS u. R. G. GONZÁLEZ (2011):

Brain creatine elevation and N-acetylaspartate reduction indicates neuronal dysfunction in the setting of enhanced glial energy metabolism in a macaque model of NeuroAIDS.

Magnet Reson Med 66, 625-634

RIES, M., R. A. JONES, V. DOUSSET u. C. T. W. MOONEN (2000):

Diffusion tensor MRI of the spinal cord.

Magnet Reson Med 44, 884-892

ROSS, B. D. (1991):

Biochemical considerations in ¹H spectroscopy. Glutamate and glutamine; Myo-inositol and related metabolites.

NMR Biomed 4, 59-63

SANDERS, S. G., R. S. BAGLEY u. P. R. GAVIN (2002):

Intramedullary spinal cord damage associated with intervertebral disk material in a dog.

J Am Vet Med Assoc 221, 1594-1596

SARCHIELLI, P., G. P. PELLICCIOLI, R. TARDUCCI, P. CHIARINI, O. PRESCIUTTI, G. GOBBI u. V. GALLAI (2001):

Magnetic resonance imaging and ¹H-magnetic resonance spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis.

Neuroradiology 43, 189-197

SCHUBERT, F., J. GALLINAT, F. SEIFERT u. H. RINNEBERG (2004):

Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla.

NeuroImage 21, 1762-1771

SHORES, A. (1992):

Spinal trauma. Pathophysiology and management of traumatic spinal injuries.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 22, 859-888

SILVER, X., W. X. NI, E. V. MERCER, B. L. BECK, E. L. BOSSART, B. INGLIS u. T. H. MARECI (2001):

In vivo ¹H magnetic resonance imaging and spectroscopy of the rat spinal cord using an inductively-coupled chronically implanted RF coil.

Magnet Reson Med 46, 1216-1222

SRINIVASAN, R., D. VIGNERON, N. SAILASUTA, R. HURD u. S. NELSON (2004):
A comparative study of myo-inositol quantification using lcmoel at 1.5 T and 3.0 T with 3 D ¹H proton spectroscopic imaging of the human brain.

Magn Reson Imaging 22, 523-528

STOLL, G. u. M. BENDSZUS (2009):

Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging.

Neuroscience 158, 1151-1160

STUCKEY, D. J., D. C. ANTHONY, J. P. LOWE, J. MILLER, W. M. PALM, P. STYLES, V. H. PERRY, A. M. BLAMIRE u. N. R. SIBSON (2005):

Detection of the inhibitory neurotransmitter GABA in macrophages by magnetic resonance spectroscopy.

J Leuk Bio 78, 393-400

TAKANASHI, J.-I., F. SOMAZAWA, K. MARUYAMA, H. TERADA, D. XU u. A. J. BARKOVICH (2011):

Metabolic changes in early childhood using LCMoel with corrected water scaling method.

J. Magn. Resonance 35, 174-180

TIDWELL, A. S. u. J. C. JONES (1999):

Advanced imaging concepts: a pictorial glossary of CT and MRI technology.

Clin Tech Small Anim Pract 14, 65-111

TKÁČ, I., J. KIM, K. UGURBIL u. R. GRUETTER (2001):

Quantification of ¹H NMR spectra of the human brain using LCMoDel and spin simulations at 7 Tesla.

Magnet Reson Med 9, 214

TKÁČ, I., G. ÖZ, G. ADRIANY, K. UĞURBIL u. R. GRUETTER (2009):

In vivo ¹H NMR spectroscopy of the human brain at high magnetic fields: Metabolite quantification at 4T vs. 7T.

Magnet Reson Med 62, 868-879

URENJAK, J., S. R. WILLIAMS, D. G. GADIAN u. M. NOBLE (1993):

Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types.

J Neurosci 13, 981-989

VINK, R., L. J. NOBLE, S. M. KNOBLACH, M. R. BENDALL u. A. I. FADEN (1989):

Metabolic changes in rabbit spinal cord after trauma: Magnetic resonance spectroscopy studies.

Ann Neurol 25, 26-31

WATTJES, M., M. HARZHEIM, G. LUTTERBEY, M. BOGDANOW, S. SCHMIDT, H. SCHILD u. F. TRÄBER (2008):

Prognostic value of high-field proton magnetic resonance spectroscopy in patients presenting with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis.

Neuroradiology 50, 123-129

WATTJES, M. P., M. HARZHEIM, G. G. LUTTERBEY, L. KLOTZ, H. H. SCHILD u. F. TRAEBER (2007):

Axonal Damage But No Increased Glial Cell Activity in the Normal-Appearing White Matter of Patients with Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis Using High-Field Magnetic Resonance Spectroscopy.

Am J Neuroradiol 28, 1517-1522

WILICHOWSKI, E., P. J. W. POUWELS, J. FRAHM u. F. HANEFELD (1999):

Quantitative Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Cerebral Metabolic Disturbances in Patients with MELAS.

Neuropediatrics 30, 256,263

WILKEN, B., P. DECHENT, J. HERMS, C. MAXTON, E. MARKAKIS, F. HANEFELD u. J. FRAHM (2000):

Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of focal brain lesions.

Pediatr Neurol 23, 22-31

ZELAYA, F. O., J. B. CHALK, P. MULLINS, I. M. BRERETON u. D. M. DODDRELL (1996):

Localized ¹H NMR spectroscopy of rat spinal cord in Vivo.

Magnet Reson Med 35, 443-448

9 Tabellarischer Anhang

Tab. 1: Rohdaten zur statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests.

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
1	11	2	1	1	1	12.55
2	11	2	1	2	1	10.31
3	12	2	1	6	1	60.55
4	13	2	1	6	1	3.19
5	14	2	1	6	1	0.00
6	11	2	1	7	1	0.00
7	12	2	1	1	1	31.38
8	12	2	1	2	1	18.55
9	12	2	1	3	1	0.00
10	12	2	1	5	1	20.20
11	12	2	1	7	2	7.38
12	13	2	1	1	1	8.79
13	13	2	1	2	1	3.09
14	13	2	1	3	1	25.43
15	31	2	1	6	1	18.46
16	13	2	1	7	1	0.74
17	14	2	1	1	1	10.04
18	14	2	1	2	2	10.31
19	14	2	1	5	1	20.20

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
20	40	2	1	6	1	3.73
21	20	2	1	2	1	18.52
22	20	2	1	3	1	96.89
23	20	2	1	7	1	8.43
24	60	1	2	6	1	1.95
25	31	2	1	1	1	1.21
26	31	2	1	2	1	2.98
27	31	2	1	3	1	61.36
28	31	2	1	5	1	37.05
29	32	2	1	1	1	11.77
30	32	2	1	2	1	0.00
31	32	2	1	3	1	19.86
32	32	2	1	5	1	35.36
33	70	2	1	6	1	1.65
34	32	2	1	7	1	1.38
35	40	2	1	1	2	14.70
36	40	2	1	2	1	0.40
37	40	2	1	3	1	4.96
38	40	2	1	5	1	6.31
39	40	2	1	7	1	3.46
40	90	1	2	6	1	1.06
41	50	2	1	1	2	38.41
42	50	2	1	2	1	20.83

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
43	50	2	1	3	2	161.48
44	60	1	2	1	2	17.06
45	60	1	2	2	1	4.42
46	60	1	2	3	1	12.34
47	60	1	2	5	2	22.70
48	110	1	1	6	1	15.93
49	70	2	1	1	1	1.25
50	70	2	1	2	1	0.71
51	70	2	1	5	1	4.53
52	90	1	2	2	2	2.51
53	90	1	2	3	1	6.34
54	90	1	2	5	2	16.13
55	90	1	2	7	2	5.81
56	121	2	1	6	1	119.73
57	100	2	1	1	1	3.92
58	100	2	1	2	1	0.27
59	130	2	1	6	1	0.88
60	110	1	1	1	1	6.28
61	110	1	1	2	1	9.28
62	110	1	1	5	1	18.18
63	140	1	1	6	1	28.68
64	110	1	1	7	1	8.12
65	150	1	1	6	1	12.75

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
66	121	2	1	2	1	7.68
67	121	2	1	3	1	51.64
68	121	2	1	5	1	4.10
69	121	2	1	7	1	8.74
70	161	1	1	6	1	31.53
71	162	1	1	6	1	28.68
72	122	2	1	2	1	17.01
73	122	2	1	3	2	600.87
74	170	1	1	6	1	9.67
75	130	2	1	1	1	3.12
76	130	2	1	2	1	1.14
77	130	2	1	5	1	0.00
78	130	2	1	7	1	1.22
79	140	1	1	2	1	6.18
80	140	1	1	3	1	19.07
81	140	1	1	5	2	18.18
82	140	1	1	7	1	8.12
83	150	1	1	1	2	32.64
84	150	1	1	2	1	5.15
85	150	1	1	3	1	38.14
86	150	1	1	5	1	24.25
87	190	1	1	6	1	16.39
88	150	1	1	7	2	6.64

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
89	161	1	1	1	1	8.43
90	161	1	1	2	1	1.46
91	161	1	1	3	1	11.23
92	200	1	1	6	2	39.42
93	161	1	1	7	1	2.35
94	162	1	1	1	1	16.32
95	162	1	1	2	1	12.37
96	162	1	1	3	1	31.78
97	162	1	1	5	1	12.12
98	211	1	1	6	2	31.20
99	212	1	1	6	2	25.16
100	162	1	1	7	1	7.38
101	170	1	1	1	2	11.16
102	170	1	1	2	2	11.62
103	170	1	1	3	2	515.28
104	170	1	1	5	2	18.39
105	180	1	1	2	2	476.05
106	180	1	1	3	2	1050.14
107	180	1	1	5	2	168.53
108	180	1	1	7	2	66.83
109	190	1	1	1	2	17.75
110	190	1	1	2	2	10.01
111	190	1	1	3	1	11.81

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
112	240	1	2	6	1	5.92
113	200	1	1	1	2	6.61
114	200	1	1	2	1	1.65
115	200	1	1	5	2	3.70
116	200	1	1	7	2	2.37
117	211	1	1	1	2	7.93
118	211	1	1	2	2	4.56
119	211	1	1	3	1	0.00
120	211	1	1	5	2	15.95
121	212	1	1	1	2	10.70
122	212	1	1	2	2	4.56
123	212	1	1	3	1	0.00
124	212	1	1	5	2	16.59
125	212	1	1	7	2	5.59
126	230	1	1	1	2	5.94
127	230	1	1	2	2	7.75
128	230	1	1	3	1	9.73
129	230	1	1	5	2	6.47
130	281	1	1	6	1	11.58
131	240	1	2	1	2	5.60
132	240	1	2	2	2	1.72
133	240	1	2	5	2	3.38
134	240	1	2	7	2	1.17

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
135	250	1	1	2	1	9.61
136	250	1	1	7	2	7.48
137	260	1	1	2	1	0.32
138	260	1	1	5	1	2.55
139	260	1	1	7	1	0.12
140	270	2	1	2	1	1.61
141	270	2	1	3	2	822.39
142	281	1	1	1	1	9.88
143	281	1	1	2	1	0.62
144	281	1	1	3	1	5.77
145	281	1	1	5	1	7.34
146	281	1	1	7	1	2.23
147	290	2	2	3	2	5086.99
148	300	1	2	1	2	13.39
149	300	1	2	2	2	10.40
150	310	2	2	5	2	41.78
151	320	2	2	1	2	78.99
152	320	2	2	2	2	94.34
153	320	2	2	3	2	1236.35
154	320	2	2	5	2	323.62
155	380	1	2	6	2	35.11
156	340	2	2	1	2	14.41
157	360	2	2	3	2	181.58

Tabellarischer Anhang

Beob.	Messungs-Nr.	Loc.	Voxel	Metab.	Fragezeichen	Konz.
158	370	1	2	2	2	43.44
159	370	1	2	5	2	7.83
160	400	2	2	6	2	399.58
161	380	1	2	1	2	31.47
162	380	1	2	2	1	4.64
163	380	1	2	3	1	25.59
164	380	1	2	5	2	3.70
165	380	1	2	7	2	3.00
166	390	2	2	1	2	3.86
167	390	2	2	2	2	110.32
168	400	2	2	2	2	198.47
169	400	2	2	7	2	132.17

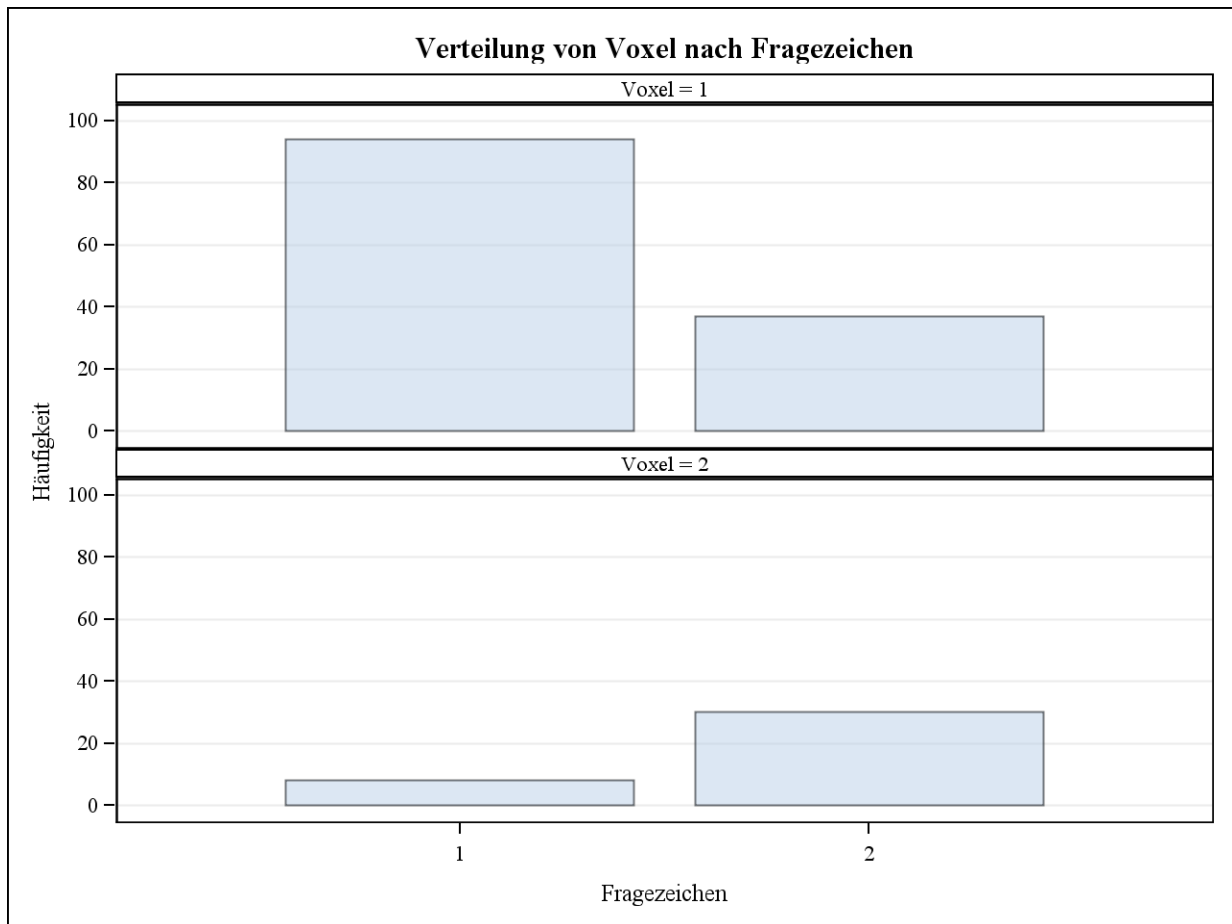
Rohdaten zur statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests. Die Messungs-Nr. (Messungsnummer) gibt die fortlaufende Nummer aller untersuchten Hunde an; Lokalisation (Loc.) 1= Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Metab. (Metabolit) 1 = N-acyetyl-aspartat, 2 = Myo-Inositol, 3 = Glutamin und Glutamat, 5 = Kreatin, 6 = Laktat, 7 = Cholin; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein; Konz (Konzentration) gibt die Konzentration des jeweiligen Metaboliten in mmol/l für eine Peakfläche an.

Tab. 2: Voxelgröße und Anzahl der Fragezeichen (unsichere Werte): Generell

Voxel	Fragezeichen		
	1 ja	2 nein	Summe
Häufigkeit			
Prozent			
1	94	37	131
Kleines Voxel	55.62	21.89	77.51
	71.76	28.24	
	92.16	55.22	
2	8	30	38
Großes Voxel	4.73	17.75	22.49
	21.05	78.95	
	7.84	44.78	
Summe	102	67	169
	60.36	39.64	100.00

Statistische Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte im kleinen und großen Voxel bei einer Stichprobenzahl von 169. Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Abb. 1: Voxelgröße und Anzahl der Fragezeichen (unsichere Werte): Generell



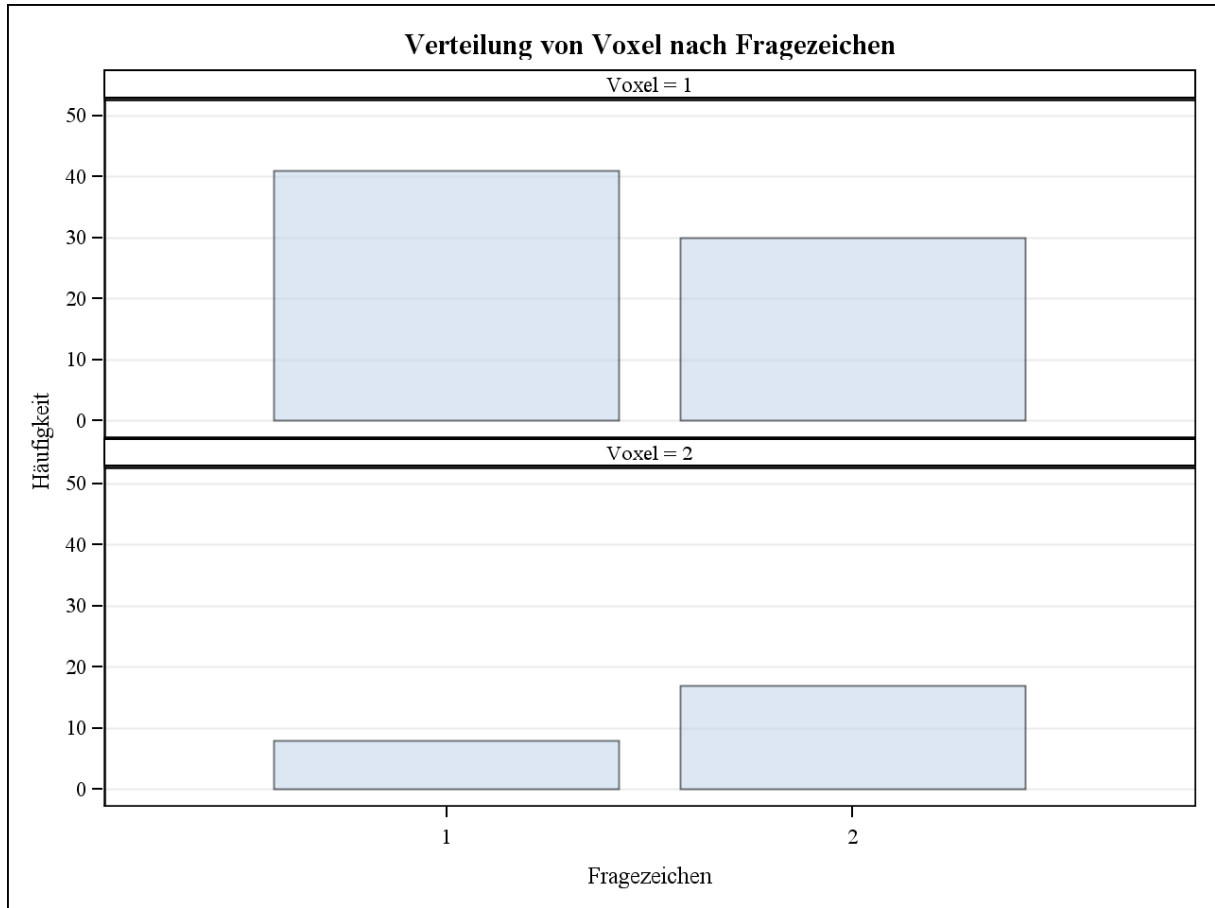
Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte im kleinen und großen Voxel bei einer Stichprobenzahl von 169. Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Tab. 3: Voxelgröße und Anzahl von Fragezeichen (unsichere Werte): Gehirn

Voxel	Fragezeichen		
Häufigkeit Prozent	1 ja	2 nein	Summe
1	41	30	71
Kleines Voxel	42.71 57.75 83.67	31.25 42.25 63.83	73.96
2	8	17	25
Großes Voxel	8.33 32.00 16.33	17.71 68.00 36.17	26.04
Summe	49 51.04	47 48.96	96 100.00

Statistische Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte im kleinen und großen Voxel im Gehirn bei einer Stichprobenzahl von 96. Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Abb. 2: Voxelgröße und Anzahl von Fragezeichen (unsichere Werte): Gehirn



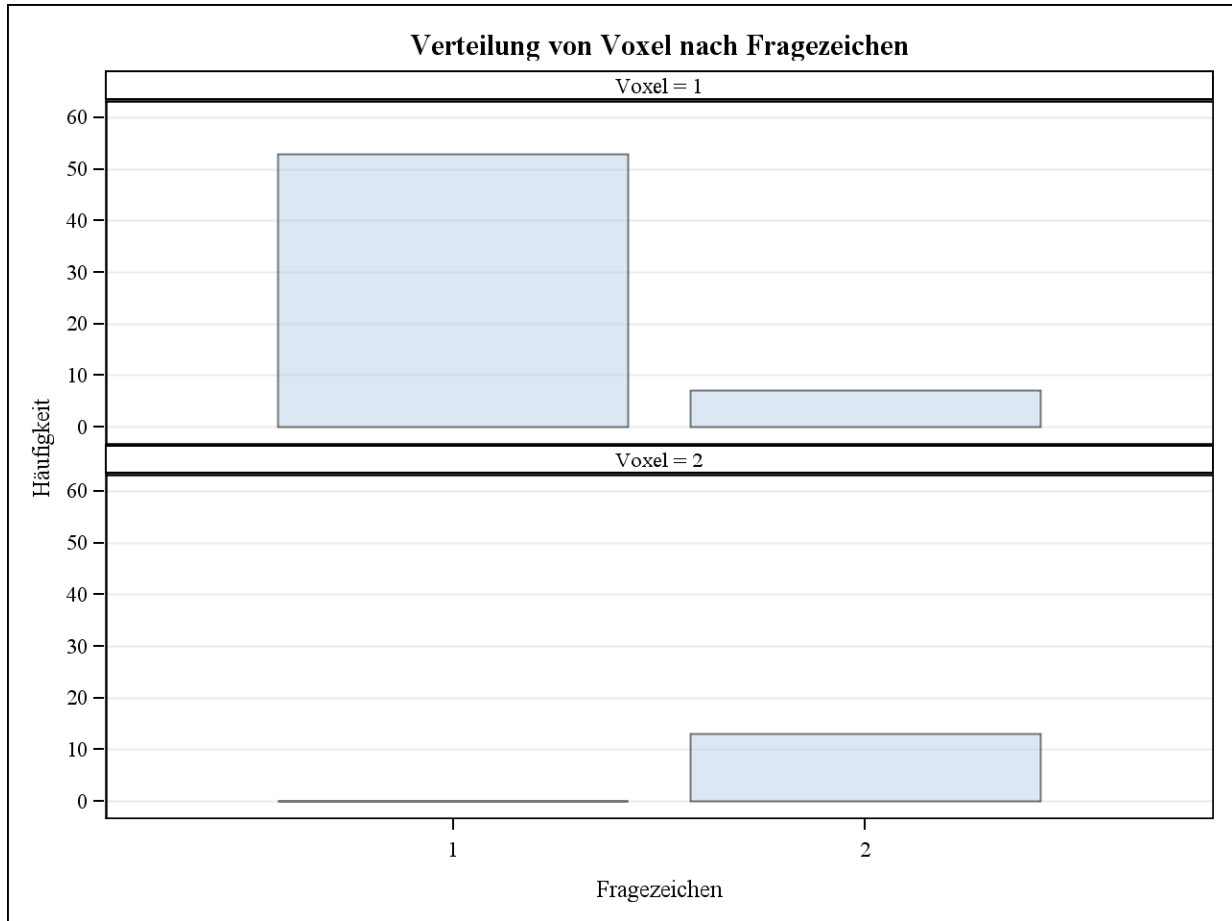
Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte im kleinen und großen Voxel im Gehirn bei einer Stichprobenzahl von 96. Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Tab. 4: Voxelgröße und Anzahl der Fragezeichen (unsichere Werte): Rückenmark

Voxel	Fragezeichen		
	1 ja	2 nein	Summe
Häufigkeit			
Prozent			
1	53	7	60
Kleines	72.60	9.59	82.19
Voxel	88.33	11.67	
	100.00	35.00	
2	0	13	13
Großes	0.00	17.81	17.81
Voxel	0.00	100.00	
	0.00	65.00	
Summe	53	20	73
	72.60	27.40	100.00

Statistische Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte im kleinen und großen Voxel im Rückenmark bei einer Stichprobenzahl von 73. Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Abb. 3: Voxelgröße und Anzahl der Fragezeichen (unsichere Werte): Rückenmark



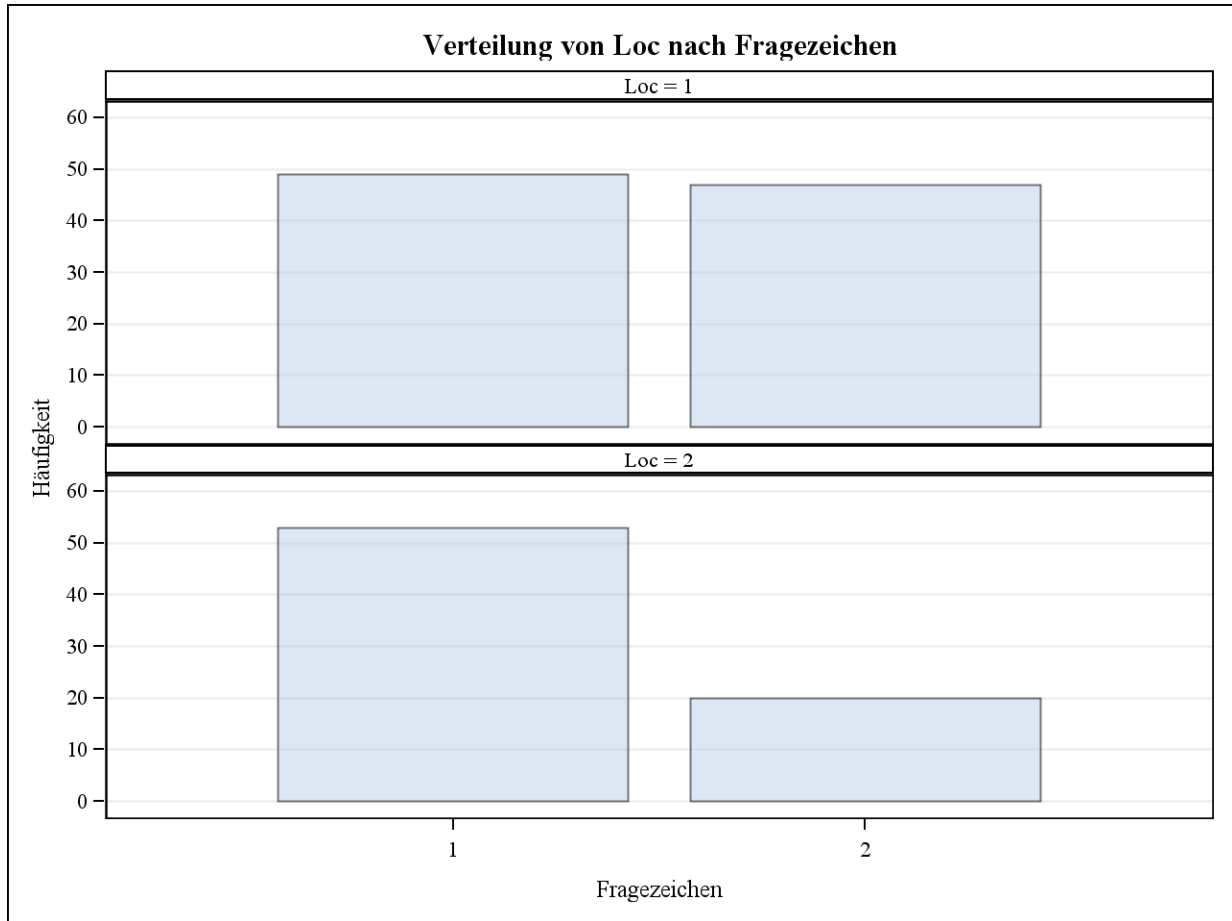
Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat- Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte im kleinen und großen Voxel im Rückenmark bei einer Stichprobenzahl von 73. Voxel 1 = kleines Voxel, Voxel 2 = großes Voxel; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Tab. 5: Lokalisation und Anzahl an unsicheren Werten (Fragezeichen): Generell

Loc	Fragezeichen		
Häufigkeit Prozent	1 ja	2 nein	Summe
1 Gehirn	49	47	96
	28.99	27.81	56.80
	51.04	48.96	
	48.04	70.15	
2 Rückenmark	53	20	73
	31.36	11.83	43.20
	72.60	27.40	
	51.96	29.85	
Summe	102	67	169
	60.36	39.64	100.00

Statistische Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte zwischen Gehirn und Rückenmark bei einer Stichprobenzahl von 169. Lokalisation (Loc) 1 = Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Abb. 4: Lokalisation und Anzahl an unsicheren Werten (Fragezeichen): Generell



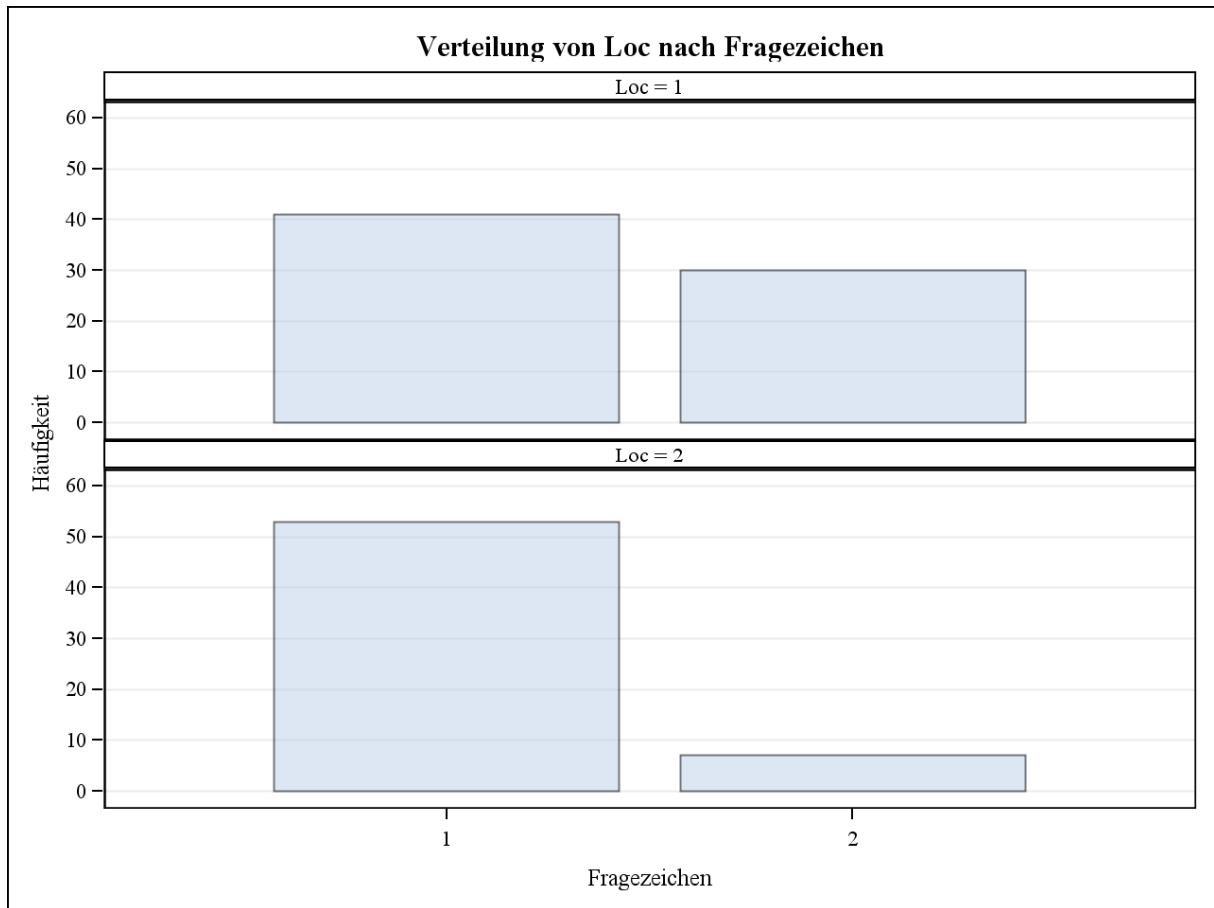
Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte zwischen Gehirn und Rückenmark bei einer Stichprobenzahl von 169. Lokalisation (Loc) 1 = Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Tab. 6: Lokalisation und Anzahl an unsicheren Werten (Fragezeichen): *kleines Voxel*

Loc	Fragezeichen		
	1 ja	2 nein	Summe
Häufigkeit			
Prozent			
1	41	30	71
Gehirn	31.30	22.90	54.20
	57.75	42.25	
	43.62	81.08	
2	53	7	60
Rückenmark	40.46	5.34	45.80
	88.33	11.67	
	56.38	18.92	
Summe	94	37	131
	71.76	28.24	100.00

Statistische Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte zwischen Gehirn und Rückenmark bei einem kleinen Voxel und einer Stichprobenzahl von 131. Lokalisation (Loc) 1 = Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Abb. 5: Lokalisation und Anzahl an unsicheren Werten (Fragezeichen): *kleines Voxel*



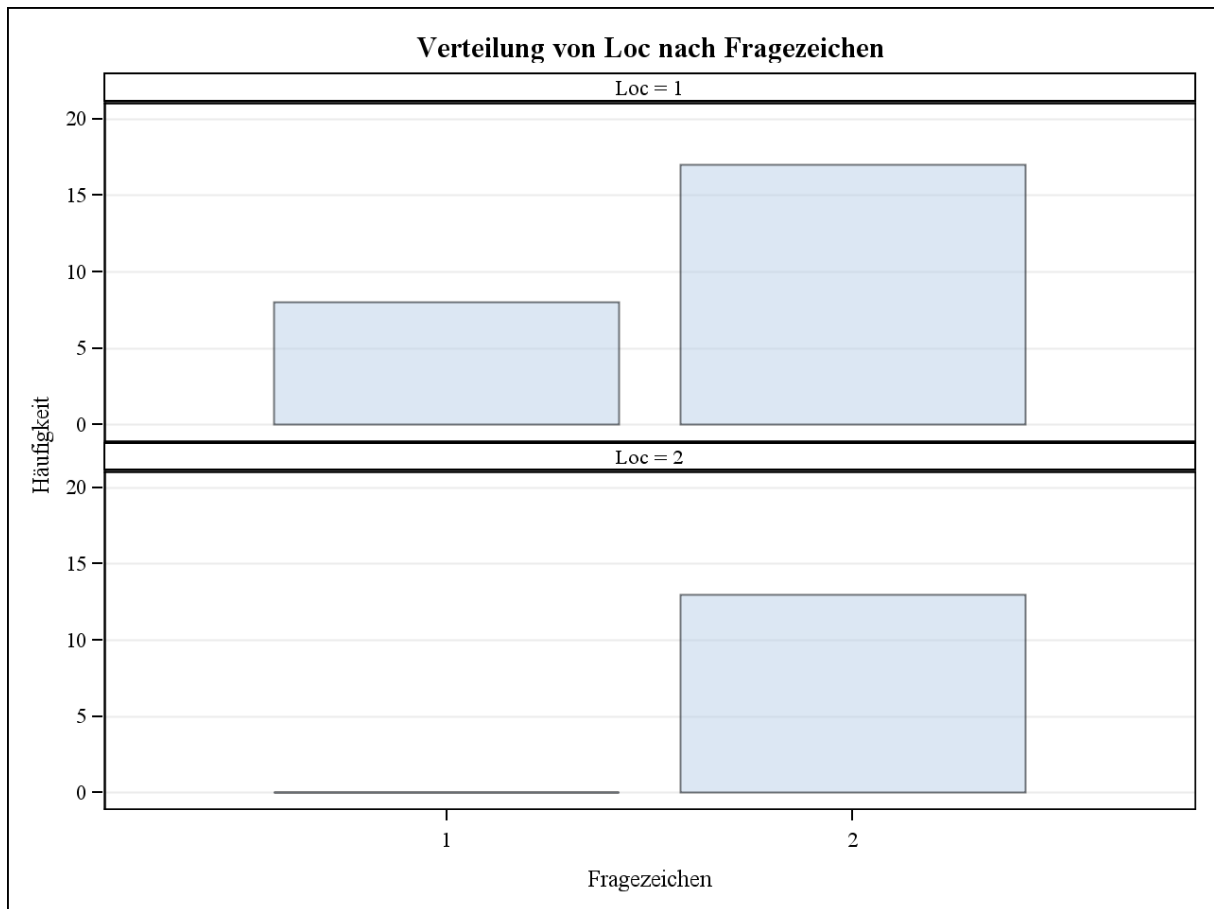
Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte zwischen Gehirn und Rückenmark bei einem kleinen Voxel und einer Stichprobenzahl von 131. Lokalisation (Loc) 1 = Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Tab. 7: Lokalisation und Anzahl an unsicheren Werten (Fragezeichen): großes Voxel

Loc	Fragezeichen		
	1 ja	2 nein	Summe
1 Gehirn	8	17	25
	21.05	44.74	65.79
	32.00	68.00	
	100.00	56.67	
2 Rückenmark	0	13	13
	0.00	34.21	34.21
	0.00	100.00	
	0.00	43.33	
Summe	8	30	38
	21.05	78.95	100.00

Statistische Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte zwischen Gehirn und Rückenmark bei einem großen Voxel und einer Stichprobenzahl von 38. Lokalisation (Loc) 1 = Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

Abb. 6: Lokalisation und Anzahl an unsicheren Werten (Fragezeichen): großes Voxel



Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der unsicheren Werte mittels des Chi-Quadrat-Homogenitätstests in Bezug auf das Auftreten unsicherer Werte zwischen Gehirn und Rückenmark bei einem großen Voxel und einer Stichprobenzahl von 38. Lokalisation (Loc) 1 = Gehirn, Loc 2 = Rückenmark; Fragezeichen 1 = ja, 2 = nein.

10 Danksagung

Bedanken möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Andrea Tipold für die Überlassung des Dissertationsthemas, die stets hilfreiche wissenschaftliche Betreuung, ihre ungemein freundliche Unterstützung, die Möglichkeit zur Erlernung meiner neurologischen Fertigkeiten, ihr offenes Ohr und ihre Ermunterungen.

Dem gesamten Team der Neurologie möchte ich für ihre Unterstützung und die Möglichkeit zur Erlernung und Verbesserung meiner Fähigkeiten, sowie für die schönen gemeinsamen Stunden danken. All dies war eine enorme Bereicherung für mich.

Auch dem restlichen Klinik Team möchte ich für die lehrreiche Zusammenarbeit und interessante gemeinsame Zeit danken.

Prof. Dr. Ingo Nolte und Prof. Dr. Michael Fehr danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung, ihre nächtlichen Korrekturen und ihre enorme Hilfsbereitschaft möchte ich ganz herzlich Mandy Angelbeck-Schulze und Dr. Davina Ludwig danken.

Danken möchte ich auch dem Team der Bildgebung für die zusätzlich bereitgestellte Zeit, so dass ich meine Spektroskopie-Sequenzen an diversen Patienten erst ausprobieren und anschließend routinemäßig durchführen konnte.

Mein Dank gilt außerdem Frau Regina Carlson für ihre sachkundige Hilfe und freundliche Unterstützung in allen Laborangelegenheiten.

Meinen Mitdoktoranden im Büro möchte ich für die heiteren Stunden, die Highlights und die Hilfe in allen Lebenslagen danken.

Danksagung

Anne und Markus möchte ich für die direkte Hilfe in Endnote Notfällen danken.

Weiterhin möchte ich meiner Familie danken. Meinen Eltern für ihr stets offenes Ohr, ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Ermunterungen. Meiner Oma für jegliche Unterstützung und dafür, dass sie einfach da war. Meinem Bruder für die Ablenkung und die Hilfe bei meinem kränkelnden Computer. Auch Claire möchte ich danken, weil sie immer für mich da war. Ich danke euch für alles, ohne euch wäre ich nicht das, was ich heute bin.

Ich möchte meinen Freunden danken, insbesondere Jep, Regina, Lisa, Tim, Julia, Pamela, Inga, Maike, Ines, Carmen und Sibylle für die schönsten Stunden außerhalb der Klinik, Aufmunterung, Unterstützung, unermüdliche Hilfsbereitschaft und einfach dafür, dass ihr seid wie ihr seid.

Ole möchte ich dafür danken, dass er einfach Ole ist, mich in diesem Projekt immer unterstützt hat, für Motivationshasen, lachen und dafür, dass er mir im Endspurt die nötige Rückendeckung gab.

Zum Schluss möchte ich jenen danken, die die meiste Zeit mit mir in dieser Zeit verbracht haben, immer fröhlich und geduldig waren und sich gefreut haben, wenn wir abends endlich nach Hause gefahren sind: Sam, Lucca und Shirley

