

**Aus der  
Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar**

Direktor: Herr Prof. Dr. med. W. Reith

**Die Auswirkungen des Langzeit-Cannabis-Konsums auf  
den cerebralen Stoffwechsel junger Erwachsener unter  
Zuhilfenahme der Phosphor- und  
Protonenmagnetresonanzspektroskopie bei 3 Tesla**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes 2022

vorgelegt von Maximilian Benedikt Fenzl  
geboren am 15.09.1988 in München

## Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Vorwort</b>                          | <b>7</b>  |
| <b>2</b> | <b>Zusammenfassung</b>                  | <b>8</b>  |
| 2.1      | Deutsch                                 | 8         |
| 2.2      | Englisch                                | 9         |
| 2.3      | Fragestellungen                         | 10        |
| <b>3</b> | <b>Einleitung</b>                       | <b>11</b> |
| <b>4</b> | <b>Material und Methodik</b>            | <b>13</b> |
| 4.1      | Prinzip der Magnetresonanzspektroskopie | 13        |
| 4.1.1    | Historie                                | 14        |
| 4.1.2    | Physikalische Grundlagen                | 15        |
| 4.1.3    | Chemische Verschiebung (Chemical Shift) | 15        |
| 4.1.4    | Spektrale Auflösung                     | 16        |
| 4.1.5    | Nachweisgrenzen                         | 17        |
| 4.1.6    | Kernsorten                              | 18        |
| 4.2      | Wasserstoff-Spektroskopie               | 18        |
| 4.2.1    | Wasserstoff-Metaboliten                 | 19        |
| 4.2.2    | Wasser-Unterdrückung                    | 20        |
| 4.3      | Phosphor-Spektroskopie                  | 20        |
| 4.3.1    | Phosphor-Metaboliten                    | 21        |
| 4.3.2    | Hardware-Voraussetzungen                | 22        |
| 4.4      | Lokalisierungs-Methoden                 | 23        |
| 4.4.1    | Einzelvolumentechnik (SVS)              | 23        |
| 4.4.2    | Multivolumentechnik (CSI)               | 24        |
| 4.5      | Spektroskopie-Sequenzen                 | 26        |
| 4.5.1    | PRESS und STEAM                         | 26        |
| 4.5.2    | ISIS                                    | 28        |
| 4.5.3    | CSI                                     | 29        |
| 4.6      | Spektroskopie-Artefakte                 | 31        |
| 4.6.1    | Lokalisierungs-Artefakte bei SVS        | 31        |
| 4.6.2    | Lokalisierungs-Artefakte bei CSI        | 32        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 4.7       | Quantifizierung                            | 33         |
| 4.7.1     | Signalauswertung                           | 33         |
| 4.7.2     | Relativwerte                               | 34         |
| 4.7.3     | Referenz- und Absolutwerte                 | 35         |
| 4.7.4     | Phosphor-Phantom                           | 37         |
| 4.8       | Probanden                                  | 37         |
| 4.9       | Datenverarbeitung                          | 39         |
| 4.9.1     | Datenerhebung                              | 39         |
| 4.9.2     | Datenauswertung                            | 41         |
| 4.9.3     | Parameterberechnungen                      | 48         |
| 4.9.4     | Statistische Methoden                      | 49         |
| <b>5</b>  | <b>Ergebnisse</b>                          | <b>52</b>  |
| 5.1       | Segmentierungs-Ergebnisse                  | 52         |
| 5.2       | Phosphorspektroskopie-Ergebnisse           | 56         |
| 5.2.1     | Unterschiede männlich-weiblich             | 57         |
| 5.2.2     | Unterschiede Konsumenten-Nicht-Konsumenten | 57         |
| 5.2.3     | Seitenunterschiede innerhalb der Gruppen   | 57         |
| 5.3       | Protonenspektroskopie-Ergebnisse           | 68         |
| 5.3.1     | Unterschiede männlich-weiblich             | 68         |
| 5.3.2     | Unterschiede Konsumenten-Nicht-Konsumenten | 68         |
| 5.4       | Zusammenfassung der Ergebnisse             | 71         |
| <b>6</b>  | <b>Diskussion</b>                          | <b>72</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>                | <b>77</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Anhang</b>                              | <b>86</b>  |
| <b>9</b>  | <b>Publikationen</b>                       | <b>99</b>  |
| <b>10</b> | <b>Danksagung</b>                          | <b>99</b>  |
| <b>11</b> | <b>Lebenslauf</b>                          | <b>101</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |  |
|---------------|--|
| <i>Δ9-THC</i> | Delta-9-tetrahydrocannabinol   |
| <i>1H</i>     | Proton   |
| <i>31P</i>    | Phosphor   |
| <i>3T</i>     | 3 Tesla  |
| <i>ADP</i>    | Adenosin Diphosphat  |
| <i>AMARES</i> | Advanced method for accurate, robust, and efficient spectral fitting                               |
| <i>AMP</i>    | Adenosin Monophosphat  |
| <i>CB 1</i>   | Cannabinoid Rezeptor 1   |
| <i>CBD</i>    | Cannabidiol  |
| <i>Ch</i>     | Cholin   |
| <i>CK</i>     | Cannabis-Konsument(en)   |
| <i>Cr</i>     | Creatin  |
| <i>CSF</i>    | cerebrospinal fluid = Liquor   |
| <i>CSI</i>    | chemical-shift-imaging   |
| <i>FID</i>    | free-induction-decay   |
| <i>Glu</i>    | Glutamat   |
| <i>GPC</i>    | Glycerophosphocholin   |
| <i>GPE</i>    | Glycerophosphoethanolamin  |
| <i>jMRUI</i>  | java-based graphical user interface for the magnetic resonance user interface quantitation package |
| <i>ml</i>     | Myoinositol  |
| <i>mK</i>     | männliche Cannabis-Konsumenten   |
| <i>mN</i>     | männliche Nicht-Konsumenten  |
| <i>MPRAGE</i> | Magnetization-prepared rapid gradient echo   |
| <i>MRS</i>    | magnetic resonance spectroscopy  |
| <i>NAA</i>    | N-Acetyl-Aspartat  |
| <i>NAD</i>    | Nicotinamidadenindinukleotid   |
| <i>NK</i>     | Nicht-Konsumenten  |
| <i>PCr</i>    | Phosphocreatin   |
| <i>PDE</i>    | Phosphodiester   |
| <i>PE</i>     | Phosphatidylethanolamin  |
| <i>Pi</i>     | Anorganisches Phosphat   |
| <i>PME</i>    | Phosphomonoester   |

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| <i>ppm</i>  | parts per million              |
| <i>ROI</i>  | region of interest             |
| <i>SD</i>   | Standardabweichung             |
| <i>tCho</i> | Gesamtcholin                   |
| <i>tCr</i>  | Gesamtcreatin                  |
| <i>TE</i>   | Echozeit                       |
| <i>tNAA</i> | Gesamt N-Acetyl-Aspartat       |
| <i>TR</i>   | Repetitionszeit                |
| <i>VOI</i>  | volume of interest             |
| <i>wK</i>   | weibliche Cannabis-Konsumenten |
| <i>wN</i>   | weibliche Nicht-Konsumenten    |

## Funktionen der Metaboliten

### Protonen-Metabolite und ihre Funktionen

|                  |   |
|------------------|---|
| NAA              | Marker für intakte Neurone                |
| Cholin           | Marker für Membranzumsatz                 |
| Creatin          | Marker für Energiemetabolismus            |
| Myo-Inositol     | Marker für Gliose                         |
| Lipide           | Nekrosebildung                            |
| Laktat           | Anaerobe Glykolyse                        |
| Alanin, Glutamin | Energieförderer, Lipid- / Proteinsynthese |
| Glutamat         | Exzitatorischer Neurotransmitter          |

### Phosphor-Metabolite und ihre Funktionen

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| PME, PE, PC   | Zellmembranen (Anabolismus)           |
| PDE, GPE, GPC | Zellmembranen (Katabolismus)          |
| PCr           | Energiespeicher                       |
| ATP           | Energieträger                         |
| NAD           | Redoxcoenzym                          |
| Pi            | Energieförderer, Stoffwechselprozesse |

## 1 Vorwort

Die Dissertation beruht auf der zugrundeliegenden Studie (siehe unten), die sich aktuell im Einreichungsprozess befindet.

### **Impact of cannabis use on brain metabolism using $^{31}\text{P}$ and $^1\text{H}$ magnetic resonance spectroscopy**

Maximilian Fenzl,<sup>1</sup> Martin Backens,<sup>1</sup> Silviu Bodea,<sup>2</sup> Miriam Wittmann,<sup>3</sup> Florian Werler,<sup>4</sup> Jule Brielmaier,<sup>5</sup> Robert Christian Wolf,<sup>4</sup> Wolfgang Reith<sup>1</sup>

1 Institute of Neuroradiology, Saarland University, 66421 Homburg, Germany

2 Helmholtz Zentrum Munich, German Research Center for Environmental Health Institute of Biological and Medical Imaging, 85748 Munich, Germany

3 Department of Psychiatry and Psychotherapy, Saarland University, 66421 Homburg, Germany

4 Department of General Psychiatry at the Center for Psychosocial Medicine, Heidelberg University, 69115 Heidelberg, Germany

5 Department of Obstetrics and Gynecology, RKH Clinic Ludwigsburg, 71640 Ludwigsburg, Germany

## 2 Zusammenfassung

### 2.1 Deutsch

Der chronische Cannabiskonsum steht im Zusammenhang mit verschiedenen funktionellen und strukturellen cerebralen Veränderungen, wie zum Beispiel verändertem Hirnmetabolismus, verändertem Volumen der grauen Substanz, Stimmungsschwankungen und Beeinträchtigungen des Gedächtnisses. Da Cannabis, insbesondere der psychotrope Inhaltsstoff THC, immer weiter an medizinischer Bedeutung gewinnt, beispielsweise in der Schmerzbehandlung, ist eine Langzeiterforschung notwendig, um ein tiefgreifendes Verständnis der Cannabis-induzierten biochemischen Veränderungen zu erlangen und die medizinische Sicherheit von THC zu bewerten.

Die Magnetresonanzspektroskopie (MR-Spektroskopie) liefert Informationen über Hirnmetaboliten, die in Zusammenhang mit der neuronalen Integrität, dem Zellmembran-Stoffwechsel und dem Energiemetabolismus stehen. In der zugrundeliegenden prospektiven Studie wurde die Einzelvoxel-Protonenspektroskopie (1H-MRS) mit der Multivoxel-Phosphorspektroskopie (31P-MRS) kombiniert, um sowohl 45 junge Cannabiskonsumenten (CK) im Alter von 18-30 zu untersuchen, die zuvor regelmäßig über einen Zeitraum von mindestens 2 Jahren Cannabis konsumierten, als auch 47 altersentsprechende Nicht-Konsumenten (NK). Die 31P-MRS-Daten wurden in verschiedenen Hirnregionen bei 3 Tesla Feldstärke mithilfe einer doppelresonanten 1H/31P-Kopfspule gemessen, die anatomische Bildgebung sowie die 1H-MRS-Datenakquisition fand mit einer Standard-20-Kanal-1H-Kopfspule statt. Die Absolutkonzentrationen der Protonen-Metaboliten wurden durch eine Kalibrierung anhand des Gewebswassers als interne Referenz errechnet, wohingegen eine 75 mmolare KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Lösung als externe Referenz für die Kalibrierung des Phosphorsignals diente.

Für die männlichen Cannabiskonsumenten konnte ein generell niedrigeres Konzentrationsniveau einiger Protonen- und Phosphor-Metabolite im Vergleich zu den männlichen Nicht-Konsumenten festgestellt werden. Insbesondere energiestoffwechselbezogene Phosphate wie Adenosintriphosphat (ATP) und anorganisches Phosphat (Pi) waren im Frontallappen, in den Basalganglien, im Thalamus und in der Temporalregion erniedrigt. Die PCr-Konzentrationen waren hauptsächlich in den linken Basalganglien und in der linken frontalen weißen Substanz erniedrigt. Darüber hinaus konnte eine geringfügige pH-Erniedrigung in der frontalen grauen Substanz festgestellt werden. Die



Ergebnisse legen nahe, dass die erhöhten Risiken für die Entwicklung funktioneller Hirnstörungen bei Langzeit-Cannabiskonsumenten auf eine Beeinträchtigung des Energiemetabolismus des Gehirns zurückzuführen sind.

## 2.2 Englisch

As cannabis and its main psychoactive compound THC (Tetrahydrocannabinol) gain increasing medical relevance regarding for example pain treatment, more scientific research in this field is necessary to determine the medical security of THC, especially in the context of known functional and structural brain changes associated with cannabis.

In this study we analyzed several brain metabolites of 45 young cannabis users aged 18-30 who had been using cannabis regularly over a period of at least 2 years, and 47 age-matched controls by using combined single-voxel proton ( $^1\text{H}$ -MRS) and multi-voxel phosphorus ( $^{31}\text{P}$ -MRS) magnetic resonance spectroscopy. The determined metabolites are associated with the energy metabolism, neuronal integrity and cell membrane metabolism of the brain.

Technically, the  $^{31}\text{P}$ -MRS data were acquired with a double-resonant  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  head coil, anatomic images and  $^1\text{H}$ -MRS data were obtained with a standard 20-channel  $^1\text{H}$  head coil. For proton metabolites, tissue water was used as an internal reference while a phantom with a known solution of 75 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was used as an external reference for the calibration of the phosphorus signals.

In general, lower concentration levels of several proton and phosphorus metabolites could be found among cannabis users compared to non-users. In the frontal and temporal lobe, in the basal ganglia and in the thalamus energy-related phosphates like adenosine triphosphate (ATP) and inorganic phosphate (Pi) were reduced. In the left basal ganglia and the left frontal white matter PCr showed decreased values, too. Additionally, a slight reduction of the pH value was found in the frontal grey matter. These results indicate that the increased risk of developing functional brain disorders in long-term cannabis use could be caused by an impairment of the energy metabolism of the brain.

## 2.3 Fragestellungen

1. Akquirierung der Probanden in Suchtberatungsstellen sowie darauffolgende Untersuchung im 3T-MRT.
2. Akquirierung der Spektroskopie-Rohdaten sowie nachfolgende digitale Weiterverarbeitung zur Ermittlung absoluter Metabolitenkonzentrationen.
3. Analyse der Finaldaten im Hinblick auf Metabolitenveränderungen hinsichtlich des Probandenkollektivs sowohl im Vergleich Konsumenten zu Nicht-Konsumenten als auch im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Probandengruppen.

### 3 Einleitung

Cannabis ist eine der meistgenutzten Freizeitdrogen in der Welt ((Unodc), 2018). Obwohl es seit Jahrzehnten öffentliche Bedenken bezüglich des Cannabiskonsums gibt, der als Ursprung verschiedener psychiatrischer Erkrankungen diskutiert wird, kann man ein stetiges Ansteigen der mit Cannabis in Verbindung zu bringenden Erkrankungen über die letzten Jahre feststellen (Hasin et al., 2015). Der erhöhte Konsum sowie das verringerte Risikobewusstsein lassen sich in Zusammenhang mit der teilweise erfolgten Legalisierung bringen (Cerdá et al., 2017). Aufgrund dieser Entwicklung bedarf es weiterer wissenschaftlicher Forschung, um das Ausmaß der schädlichen Wirkung des Cannabiskonsums auf den menschlichen Körper, insbesondere auf den Hirnmetabolismus und das gesamte Nervensystem, zu bestimmen.

Die psychotrope Hauptsubstanz von Cannabis ist Delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), welches am Cannabinoid-Rezeptor (CB1) wirkt. Diese Rezeptoren finden sich im menschlichen Gehirn in hoher Dichte in Zentren, die für Lernen, Aufmerksamkeit, Gedächtnis, kognitive Prozesse und motorische Kontrolle zuständig sind (Glass et al., 1997). Moderate bis hohe Konzentration an CB1-Bindungsstellen wurden im Thalamus, im Cerebellum, in der Amygdala, in den Basalganglien, im occipito-temporalen sowie im inferioren temporalen Gyrus, im Frontalcortex und im Hippocampus nachgewiesen (Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1991; Terry et al., 2010). Studien konnten zeigen, dass sich chronischer Cannabiskonsum negativ auf das Gedächtnis, motorische Fähigkeiten, exekutive Funktionen, emotionale Weiterverarbeitung sowie Aufmerksamkeit auswirkt, sowohl bei Jugendlichen (Gonzalez, Swanson, 2012; Meier et al., 2012; Solowij et al., 2011) als auch bei Erwachsenen (Battisti et al., 2010; Crean et al., 2011; Pope et al., 2001; Pope, Yurgelun-Todd, 1996; Whitlow et al., 2004). In Neuroimaging-Studien mit Langzeit-Cannabiskonsumern konnte eine abnorme Hirnaktivierung während des Ausübens funktioneller Aufgaben, Entscheidungsfindungen, verbalem Lernen, visueller Aufmerksamkeit sowie Reaktionsunterdrückung festgestellt werden (Block et al., 2002; Chang et al., 2006b; Gruber, Yurgelun-Todd, 2005; Matochik et al., 2005).

Die Protonenmagnetresonanzspektroskopie (Protonen-MRS) ist eine nicht-invasive Technik, die bereits umfassend verwendet wird, um Hirnmetaboliten zu detektieren und zu quantifizieren (Bittšanský et al., 2012). Mit den Single- oder Multivoxel-Akquisitionsschemata ist es möglich, Hirnmetaboliten wie NAA (N-Acetyl-Aspartat), ml (Myo-Inositol), Cr (Creatin), Cho (zytosolisches Cholin) und Glutamat zu untersuchen. NAA spielt eine Rolle als Biomarker, der die neuronale Integrität widerspiegelt (Moffett et al., 2007). Gesamtkreatin (tCr, Creatin plus Phosphocreatin) ist in den cerebralen Energiestoffwechsel involviert. Es fungiert als ein

Energiespeicher, indem es Energie innerhalb des Gehirns zur Verfügung stellt und durch die Creatin-Kinase-Reaktion für einen konstanten Adenosintriphosphat (ATP)-Spiegel sorgt (Andres et al., 2008; Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000). Das Cho-Signal steht im Zusammenhang mit der zellulären Membransynthese und dem Membranabbau (Bayindir et al., 2012), während ml zu der Regulation des Zellvolumens und der neuronalen Energieverwendung beiträgt (Coupland et al., 2005; Maragakis, Rothstein, 2006). Glutamat (Glu) findet sich in der höchsten Konzentration sowohl in der grauen Substanz als auch in Neuronen, da es als einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter fungiert. Gln ist in hoher Konzentration im zentralen Nervensystem vorhanden und ist an einer Vielzahl von Stoffwechselwegen beteiligt. Es dient als Ausgangssubstanz für Neurotransmitter wie GABA, Glu und Aspartat (Albrecht et al., 2010). Physiologische Glu/Gln Verhältnisse betragen etwa 2-3 in vielen verschiedenen wichtigen Hirnregionen (Sanaei Nezhad et al., 2018). Jedoch erweist es sich als schwierig, Gln und Glu in MR-Spektren bei 3 Tesla zu differenzieren. Um Fehlzuordnungen in den Spektren zu vermeiden, wird folgend Glx verwendet als Kombination dieser beiden Metaboliten, somit bedeutet  $Glx = Glu + Gln$ .

Die Phosphormagnetresonanzspektroskopie (Phosphor-MRS) ermöglicht eine in-vivo Analyse einiger direkt am Zellstoffwechsel des Gehirns beteiligten Metaboliten, dazu gehören die Hochenergiephosphate Adenosintriphosphat (ATP), Phosphocreatin (PCr) und anorganisches Phosphat (Pi). Die Hochenergiephosphate (HEP) stehen mit dem Hirnstoffwechsel durch biochemische Energieproduktion (z.B. ATP-Synthese) und Energie-Verbrauch (z.B. ATP-Spaltung) in Zusammenhang. Weiterhin kann die  $^{31}P$ -MRS Nicotindiamidnucleotid (NADP) detektieren, das an Oxidationsketten und am Phospholipid-Metabolismus der Zellmembranen beteiligt ist (Lei et al., 2003), sowie die Phosphomonoester (PME), die eine Vorgängersubstanz der Zellmembran darstellen und eine wichtige Rolle in der Synthese der Membranlipide spielen. Zusätzlich können die Membranabbauprodukte Phosphatidylmethylethanolamin (PDE), Glycerophosphoethanolamin (GPE) und Glycerophosphocholine (GPC) erfasst werden. Eine erniedrigte Membranerneuerungsrate konnte mit erhöhten PDE-Spiegeln in Verbindung gebracht werden (Wasser et al., 1997). Eine PME-Reduzierung deutet ebenfalls auf eine veränderte Membranerneuerungsrate hin, beispielsweise haben Studien eine signifikant veränderte PME-Konzentration im Frontallappen bei Patienten mit bipolaren Depressionsstörungen feststellen können. (Kato et al., 1992). Weiterhin lässt sich auch der intrazelluläre pH-Wert, der unter anderem für die Regulation des zellulären Energiemetabolismus und die Regulation der intrazellulären Proteinsynthese verantwortlich ist, bestimmen (Busa, Nuccitelli, 1984; Romero, Rossano, 2019). Zusätzlich kann die Konzentration des freien  $Mg^{2+}$  bestimmt werden, das als Cofaktor für eine Vielzahl von

Enzymen dient, als intrazellulärer Antagonist von  $\text{Ca}^{2+}$  angesehen werden kann und den zellulären Energiestoffwechsel beeinflusst (Pilchova et al., 2017).

Nach meinem Kenntnisstand gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine vergleichbare Arbeit, die Veränderungen des Hirnstoffwechsels bei jungen Cannabiskonsumenten unter Zuhilfenahme der  $^{31}\text{P}$ -MRS untersucht hat. In der zugrundeliegenden Studie verwendeten wir sowohl die  $^1\text{H}$ -MRS als auch die multi-voxel- $^{31}\text{P}$ -MRS bei 3 Tesla Feldstärke, um die absoluten Metabolitenkonzentrationen in 5 Hirnregionen, nämlich in der frontalen weißen und grauen Substanz, im Thalamus, in den Basalganglien und im Temporallappen, zu quantifizieren.

## **4 Material und Methodik**

### **4.1 Prinzip der Magnetresonanzspektroskopie**

Die MR-Spektroskopie ist eine nicht-invasive Methode zur Beobachtung von Stoffwechselvorgängen im menschlichen Körper. Dabei werden keine Bilddaten akquiriert, sondern biochemische Informationen (Metabolitenmuster) in Form von Spektren. Auf diese Weise ist eine volumenselektive Messung des Stoffwechsels innerhalb eines bestimmten Areals durchführbar. Metabolitenkonzentrationen können entweder absolut quantifiziert werden in mmol/kg oder als Relativwerte in Form von Metaboliten-Verhältnissen. Aus Gründen der Einfachheit wird jedoch häufiger auf Relativwerte zurückgegriffen, da die Absolutquantifizierung technisch komplexer ist und einen erheblichen Rechenaufwand nach sich zieht. Die Protonenspektroskopie hat sich mittlerweile im Klinikalltag, z.B. bei der Tumordiagnostik, etabliert. Sie benötigt in aller Regel keine Zusatzhardware und kann somit schnell und kostengünstig durchgeführt werden. Die Phosphorspektroskopie hingegen erfordert zusätzliche Technik in Form einer meist kostenintensiven Spule und spezieller Software, sowie höhere Magnetfeldstärken (z.B. 3 Tesla). Deswegen bleibt sie in der Anwendung auf wenige Zentren beschränkt und findet sich nur sehr begrenzt im Klinikalltag wieder.

#### 4.1.1 Historie

Purcell und Bloch entdeckten 1946 das Phänomen der Kernmagnetresonanz (Bloch, 1946; Purcell et al., 1946), jedoch war die primäre Anwendung zunächst auf in-vitro-Stoffanalysen beschränkt. 1950 postulierte Proctor, dass die Resonanzfrequenz eines jeden Atomkerns abhängig von dem Molekül ist, in das es eingebettet ist. Da die chemische Umgebung (das Molekül) also eine Frequenzverschiebung verursacht, nannte er das Phänomen chemische Verschiebung (chemical shift) (Proctor, Yu, 1950). Diese Entdeckung macht man sich unter anderem auch bei der Magnetresonanzspektroskopie (MRS) zunutze, wie im folgenden Kapitel erläutert.

Lauterbur führte 1973 die Kernspintomographie als bildgebendes Verfahren und die in-vivo-MRS erstmalig durch (Lauterbur, 1973). Im weiteren Verlauf konnte die Technik im Jahre 1986 durch Luyten et al. (Luyten et al., 1986) weiterentwickelt werden, sodass sie eine Visualisierung in Form einer spektroskopischen Bildgebung ermöglichte. Diese Methode nennt man chemical shift imaging (CSI) oder magnetic resonance spectroscopy imaging (MRSI). Mithilfe dieser Technik ist es heute möglich, die Verteilung von Metabolitenkonzentrationen mit anatomischen Bildern zu überlagern. Die Kernspintomographie etablierte sich bereits früh für medizinische Indikationen, während die MRS lange Zeit nur für naturwissenschaftliche Grundlagenforschung verwendet wurde, beispielsweise für die Analyse von Feststoffen, Flüssigkeiten, Gasen sowie kinetische und strukturelle Stoffanalysen. (Jezzard, Buxton, 2006; Mansfield, Grannell, 1973; Ramsey, 1999; Weinmann et al., 2005; Wüthrich, 2001, 2003). Dies war darin begründet, dass die Spektroskopie für medizinische Zwecke nicht sensitiv genug und die Untersuchungszeiten zu lang waren. Der technische Fortschritt führte jedoch zu einer drastischen Reduktion der reinen Untersuchungszeiten (beispielsweise ca. 3 Minuten für eine Protonen-Single-Voxel-Spektroskopie), sodass die **Protonen-MRS** mittlerweile in den klinischen Alltag eingebunden werden kann. Während die MR-Bildgebung ausschließlich auf den relativ starken Signalen des Wasserstoff-Kerns (Proton) beruht, ist die MR-Spektroskopie auch mit anderen Kernsorten, vor allem dem Phosphor-Kern, möglich. Allerdings steht die **Phosphor-Spektroskopie** nur in wenigen Universitäts- und Forschungszentren zur Verfügung, da für die Detektion anderer Atomkerne als Wasserstoff kostenintensive Zusatzhard- und Software notwendig sind.

#### **4.1.2 Physikalische Grundlagen**

Die MR-Bildgebung ermöglicht eine detaillierte Darstellung anatomischer Strukturen, wohingegen die MR-Spektroskopie (MRS) auf eine biochemische Analyse eines definierten Gewebes abzielt und Konzentrationen wichtiger Metaboliten liefert (Backens, 2010; Van Der Graaf, 2010). Sowohl Protonen- als auch Phosphorspektroskopie unterliegen den physikalischen Grundlagen der magnetischen Resonanz (Bachert, Lichy, 2004; Bachert, Schröder, 2003). Der Eigendrehimpuls der Atomkerne wird als Kernspin bezeichnet. Kernspins zeichnen sich durch ein permanentes magnetisches Dipolmoment aus und richten sich deshalb in einem starken externen Magnetfeld aus. Erfolgt nun die Einstrahlung von Radiowellen passender Frequenz (Resonanz), werden die Kernspins angeregt und senden ein schwaches Radiosignal aus, das mit geeigneten Antennen (in diesem Fall MR-Spulen) empfangen werden kann und zur Generierung eines Bildes oder Spektrums nutzbar ist. Die Qualität des Bildes bzw. Spektrums hängt von der Intensität der MR-Signale und somit von der Anzahl der Kernspins im Zielvolumen und auch von der verwendeten Magnetfeldstärke ab.

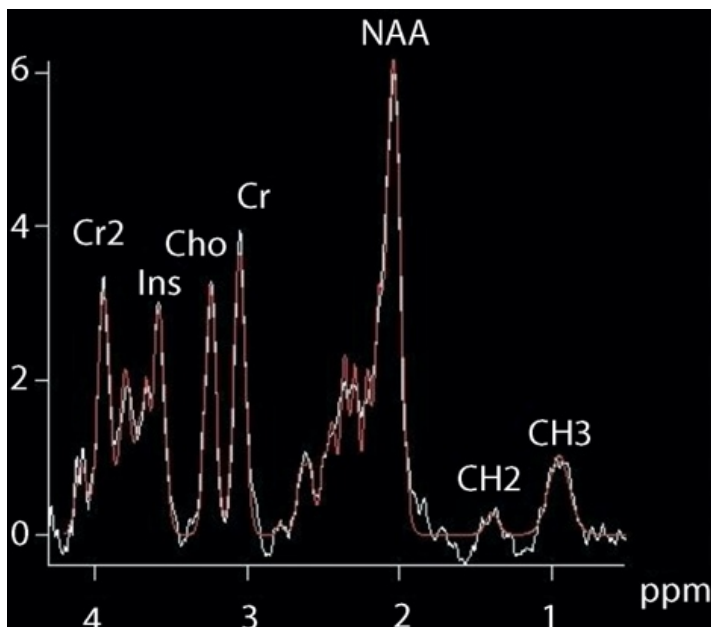
#### **4.1.3 Chemische Verschiebung (Chemical Shift)**

Die Magnetfeldstärke des MR-Tomographen legt die Frequenz der empfangenen MR-Signale sowie der eingestrahlten Radiowelle fest. Dennoch ergeben sich für die Signale grundsätzlich identischer Kernspins geringfügige Frequenzunterschiede, die von der molekularen Struktur abhängig sind, in der die Kernspins eingebettet sind. Diese sogenannte chemische Verschiebung (chemical shift) steigt mit der Magnetfeldstärke. Aufgrund dessen werden meist relative Verschiebungswerte angegeben, die im Bereich einiger parts per million (ppm) liegen. Die chemische Verschiebung verursacht also eine charakteristische Signal-Frequenz für verschiedene Moleküle und ermöglicht so eine deutliche Unterscheidung. Dies stellt die Grundlage für die MR-Spektroskopie dar und erlaubt, chemische Komponenten im Gewebe zu identifizieren und zu quantifizieren. Das MR-Signal setzt sich zunächst aus den Beiträgen aller Metaboliten im Untersuchungsvolumen zusammen. Anschließend kann die Fourier-Transformation genutzt werden, um die akquirierten MR-Signale in die einzelnen Frequenzkomponenten zu zerlegen. Dabei wird die Intensität in einem Linienspektrum dargestellt.

#### 4.1.4 Spektrale Auflösung

Die verschiedenen Metaboliten im Spektrum sind im Idealfall durch eindeutig separierte Peaks mit einer spezifischen chemischen Verschiebung dargestellt. Die dazu notwendige hohe spektrale Auflösung ist jedoch nur zu erreichen, wenn das äußere Magnetfeld eine sehr hohe Homogenität besitzt. Eine unzureichende Feldhomogenität führt zu breiten, teils überlappenden Spektrallinien, die keine eindeutige Trennung und Zuordnung erlauben. Um optimale Bedingungen sicherzustellen, muss deshalb das Magnetfeld vor dem Beginn der Spektroskopiemessung homogenisiert werden, auch „Shimmen“ genannt. Dies ist ein weitgehend automatisierter Vorgang, bei dem schwache zusätzliche Korrektur-Magnetfelder justiert werden, um etwaige Magnetfeldinhomogenitäten auszugleichen.

Je höher die Feldstärke, in unserem Fall 3 Tesla statt 1.5 Tesla, desto höher die absolute Frequenzverschiebung und desto besser die spektrale Auflösung, wodurch sich die dicht beieinanderliegenden Peaks besser voneinander abgrenzen lassen. Jedoch führen höhere Feldstärken auch zu einem höheren Einfluss der Suszeptibilitätseffekte, die wiederum die Magnetfeldhomogenität zusätzlich stören. Sorgfältiges Shimmen ist also besonders wichtig, im Fall der zugrundeliegenden Studie wurde die automatisierte Shimfunktion durch ein manuelles Nachshimmen ergänzt, um die Magnetfeldhomogenität zu optimieren. Hier besteht softwareseitig weiterer Entwicklungsbedarf.



**Bild 1**

Protonenspektrum des Gehirns, TE 30 ms, die rote Überlagerungslinie stellt eine Anpassung des Spektrums durch Modellfunktionen dar. Cr2 Creatin, Ins Inositol, Cho Cholin, Cr Creatin, NAA N-Acetyl-Aspartat, CH2/CH3 Methylen-/Methyl-Gruppe bei Lipiden, ppm = parts per million



Die erreichbare spektrale Auflösung ist letztendlich, unabhängig von der Qualität des Magnetfeldes, durch die molekulare Beweglichkeit der Metaboliten beschränkt.

Schnell bewegliche, kleine Moleküle, die sich in Lösung befinden, erzeugen schmale, gut abgrenzbare Peaks. Zellmembrangebundene Moleküle oder Makromoleküle sind dagegen immobil, sodass sehr breite Linien entstehen, die oft kaum als solche zu identifizieren sind. Ebenfalls ist eine Feinaufspaltung bei manchen Peaks sichtbar, d.h. es ist keine Einzellinie, sondern eine Multiplettstruktur erkennbar. Dies kann mit der magnetischen Wechselwirkung zwischen den einzelnen Kernen in einem Molekül, die über die Elektronen der chemischen Bindungen vermittelt wird, erklärt werden. Das Phänomen wird als Spin-Spin Kopplung (oder auch J-Kopplung) bezeichnet und ist – anders als die chemische Verschiebung - nicht von der Magnetfeldstärke abhängig. Das Ausmaß der Linienaufspaltung, sprich der Linienabstand, wird durch die Kopplungskonstante J in Hertz (Hz) angegeben.

#### **4.1.5 Nachweisgrenzen**

Eine entscheidende Einschränkung der Nachweisbarkeit von Metaboliten im Spektrum liegt in der geringen Sensitivität der MR-Spektroskopie. Die Signalstärke eines Moleküls steht im direkten Zusammenhang mit der Konzentration  $c$  im Gewebe, d.h. mit der Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit. Ein einzelnes MR-Signal ist üblicherweise nicht stark genug, um sich von dem nicht vermeidbaren Basis-Messrauschen abzuheben. Aus diesem Grund wird eine Mehrfachmessung durchgeführt, um durch eine Akkumulation vieler Signale eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR, signal to noise ratio) zu erreichen. Die ansteigende Messzeit ist hierbei der limitierende Faktor. Leider erhöht sich das SNR nur um  $\sqrt{n}$  ( $n$  = Anzahl der Wiederholungen), während die Messzeit linear mit  $n$  ansteigt. Die Verwendung höherer Feldstärken erweist sich hierbei als hilfreich, da das SNR linear mit der Feldstärke wächst. Aus diesem Grund ist MR-Spektroskopie bei Feldstärken unterhalb von 1.5 T kaum sinnvoll. Im MR-Spektrum sind unter klinischen Bedingungen nur Metaboliten nachweisbar, deren Konzentration  $c = 1$  mmol/kg übersteigt.

#### 4.1.6 Kernsorten

Biologisches Gewebe setzt sich aus mehreren Elementen zusammen, die wiederum aus mehreren Isotopen bestehen, von denen einige messbare MR-Signale liefern. Neben dem Wasserstoff ( $^1\text{H}$ ) zählen dazu unter anderem Phosphor ( $^{31}\text{P}$ ), Natrium ( $^{23}\text{Na}$ ), das Kohlenstoffisotop ( $^{13}\text{C}$ ) und Fluor ( $^{19}\text{F}$ ). Viele Moleküle, die diese Kerne enthalten, können grundsätzlich mit der MR-Technik erfasst werden. Jedoch unterscheiden sich die Signalstärken der verschiedenen Atomkerne erheblich. Die intensivsten Signale liefert der Wasserstoffkern, welcher gleichzeitig bei Weitem das häufigste Element (ca. 60% aller Atome) im Gewebe darstellt, da er Bestandteil von Wasser- und Fettmolekülen ist.

Für die anatomische MR-Bildgebung wird deshalb ausschließlich der Wasserstoff verwendet. Andere Atomkerne erzeugen kleinere Signale, finden sich seltener als Wasserstoff im Gewebe und zeigen deutlich geringere prozentuale Isotopenhäufigkeiten; deswegen ist ihr Nachweis wesentlich schwieriger. Praktische Bedeutung konnte neben der Protonen-MRS nur die Phosphorspektroskopie erlangen. Die weiteren Kerne werden ausschließlich für die medizinisch-physikalische Grundlagenforschung verwendet und finden im klinischen Alltag praktisch keine Verwendung.

#### 4.2 Wasserstoff-Spektroskopie

Für die  $^1\text{H}$ -Spektroskopie spielen Fett und Wasser, die bei weitem häufigsten Moleküle im Körpergewebe, nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr sind hier Biomoleküle von Interesse, deren Konzentration ca. 10 000-fach geringer ist. Dementsprechend schwach sind die resultierenden MR-Signale, sodass die minimal mögliche Auflösung ca.  $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3 = 1 \text{ ml}$  beträgt, was einer wesentlich gröbereren Auflösung als die der Bildgebung entspricht (ca.  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}$ ). Die  $^1\text{H}$ -Spektroskopie wird klinisch hauptsächlich im Gehirn angewendet: Zum einen für die Untersuchung fokaler Läsionen insbesondere bei differentialdiagnostischen Fragestellungen (Tumor vs. Ischämie, Graduierung von Gliomen usw.), d.h. insbesondere dann, wenn eine sichere Diagnose allein aus den konventionellen Bilddaten schwierig ist (Van Der Graaf, 2010). Zum anderen für die genauere Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen (De Stefano, Mortilla, 2007).

Die weitere Einsatzbandbreite erstreckt sich über Erkrankungen der Leber, Prostata, Muskulatur und der Mamma (Baltzer, Dietzel, 2013; Kobus et al., 2015; Mueller-Lisse, Scherr, 2003; Qayyum, 2009; Wang et al., 2014). Ein entscheidender Vorteil der Protonenspektroskopie ist, dass sie keine zusätzliche Hardware benötigt. Die Sende- und Empfangsspulen, die für die anatomische Bildgebung verwendet werden, können ebenso für

die Protonenspektroskopie genutzt werden. Hieraus ergibt sich ein Zeitvorteil. Die Protonenspektroskopie kann also nahtlos in die klinische Routineuntersuchung integriert werden und die Messzeit beträgt nur wenige Minuten. Um qualitativ hochwertige Messungen zu erlangen, ist jedoch eine Feldstärke von mindestens 1.5 T notwendig, 3T verbessern die Qualität signifikant.

#### **4.2.1 Wasserstoff-Metaboliten**

Im Protonenspektrum liegen die relevanten Metaboliten dicht beieinander im Bereich der chemischen Verschiebung von 0 bis 5 ppm. Zu den wichtigen nachweisbaren <sup>1</sup>H-Metaboliten im Gehirn gehören der Neuronenmarker N-Acetyl-Aspartat (NAA), Cholin (Cho) als Marker für die Zellproliferation, Creatin als zellulärer Energielieferant, Glutamin/Glutamat und GABA als Neurotransmitter sowie Inositol, ein Second Messenger, der bei vielen Stoffwechselfvorgängen eine zentrale Rolle spielt. Pathologisch verändertes Hirngewebe kann auch erhöhte Konzentrationen von Laktat, Alanin, Aminosäuren und Lipiden aufweisen, in der Prostata konnte Citrat als Marker für gesundes Prostatagewebe beobachtet werden (Kobus et al., 2015; Mueller-Lisse, Scherr, 2003).

Die Protonenspektroskopie nutzt meist Spinechosequenzen zur Signalerzeugung. Die verschiedenen Metaboliten weisen jedoch unterschiedliche T1- und T2-Zeiten auf, sodass ihre Signale abhängig von der Wahl der Sequenzparameter Echozeit (TE) und Repetitionszeit (TR) sind. Insbesondere die Echozeit TE bestimmt maßgeblich, welche Moleküle im Spektrum nachweisbar sind. Spektren mit kurzen Echozeiten ( $\leq 30$  ms) enthalten sehr viele Linien, die dicht zusammen liegen und sich teilweise auch überschneiden, sodass die exakte Analyse oft schwierig sein kann. Wird die Echozeit erhöht ( $\geq 135$  ms), sind nur noch Metaboliten mit längerer T2-Zeit nachweisbar. Insgesamt enthält das Spektrum dann weniger Informationen, die Auswertung gestaltet sich aber einfacher. In der klinischen Spektroskopie des Gehirns hat sich der Nachweis von Laktat als besonders wichtig und hilfreich erwiesen. Der Nachweis wird jedoch dadurch erschwert, dass die Lipid-(CH<sub>2</sub>) und Laktatpeaks etwa dieselbe chemische Verschiebung haben, d.h. an derselben Stelle im Spektrum liegen und sich daher überlagern können. Als hilfreich für die Unterscheidung der beiden Metaboliten kann sich die oben erwähnte J-Kopplung erweisen, die zu einer Dublett-Struktur des Laktat-Peaks bei 1.33 ppm führt, dessen Phasenlage stark von der Echozeit abhängt. Beträgt TE = 135 ms, kann das Laktatsignal durch sein negatives Vorzeichen von den immer positiv bleibenden Fettsignalen eindeutig differenziert werden.

## 4.2.2 Wasser-Unterdrückung

Ein grundlegendes Problem der Protonen-MRS liegt darin, dass die intensiven Signale der Fett- und Wasserprotonen die eigentlich interessierenden, sehr viel schwächeren Metabolitenpeaks maskieren und so deren Nachweisbarkeit einschränken. Um den dominierenden Wasserpeak zu unterdrücken, bedient man sich der Chemical-shift-selective-suppression (CHESS)-Methode. Hierbei wird ein Vorsättigungspuls exakt auf der Frequenz der Wasserprotonen eingestrahlt, das übrige Spektrum bleibt dabei weitgehend unverändert. Bei Fettsignalen ist solch eine Signalunterdrückung leider nicht möglich, da der Vorsättigungspuls weitere Metaboliten treffen würde, die sich in demselben Frequenzbereich befinden. Deswegen wird im Vorhinein versucht, ein passendes Zielvolumen ohne oder mit möglichst wenig Fett festzulegen. Dies lässt sich bei kleinen Regionen, zumindest im Gehirn, relativ gut durchführen. Ein weiteres Hilfsmittel zur Ausschaltung von Fettsignalen ist die OVS (= outer volume suppression), die räumlich selektiert Vorsättigungsimpulse in das Umgebungsgewebe des Zielvolumens sendet.

## 4.3 Phosphor-Spektroskopie

Neben dem Wasserstoffkern ist vor allem der Phosphorkern für die Spektroskopie geeignet. Die natürliche Häufigkeit des Kerns beträgt 100 %, jedoch ist die Signalstärke um den Faktor 15 geringer als die des Wasserstoffs. Aus diesem Grund erhöht sich die Qualität der Phosphorspektroskopie besonders bei hohen Feldstärken, im klinischen Umfeld wird sie meist an 3T-MRTs durchgeführt.

Phosphorspektren stellen sich im Vergleich zu Protonenspektren übersichtlicher dar, da weniger Metabolite abgebildet werden, die sich über einen deutlich breiteren Bereich chemischer Verschiebung verteilen ( -20 bis +10 ppm). Einzelne Linien werden jedoch zusätzlich durch Kopplungseffekte zwischen Protonen- und Phosphorspins aufgespalten. Bei niedrigeren Feldstärken oder erhöhten Magnetfeldinhomogenitäten sind diese Linien nicht mehr trennbar, sondern zu deutlich verbreiterten Peaks verschmolzen. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Protonenspektroskopie liegt darin, dass es keine Interferenzen mit intensiven Fett- oder Wassersignalen gibt.

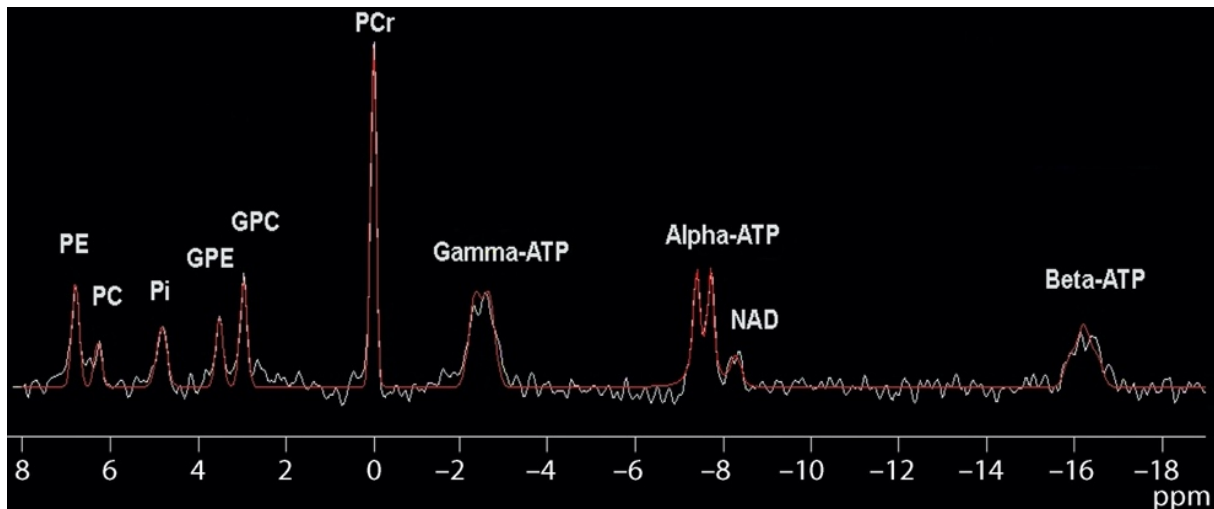
### 4.3.1 Phosphor-Metaboliten

Phosphorspektren und Protonenspektren unterscheiden sich grundsätzlich in den detektierbaren Metaboliten (Lee et al., 2012). Phosphor-Metaboliten lassen sich grob einteilen in Energiemetaboliten und Metaboliten, die am Zellmembranstoffwechsel beteiligt sind. Zu den wichtigsten Energiemetaboliten zählen Phosphocreatin (PCr), welches häufig den größten Peak darstellt und Adenosintriphosphat (ATP). Die 3 Phosphatgruppen des ATPs erzeugen 3 verschiedene Peaks ( $\alpha$ -ATP,  $\beta$ -ATP und  $\gamma$ -ATP), die wiederum in Dubletts ( $\alpha$  und  $\gamma$ ) bzw. ein Triplett ( $\beta$ ) aufgespalten sind. Die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Linien werden von den Phosphaten des Adenosindiphosphat (ADP) - Moleküls und des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats (NAD) überlagert, wohingegen die  $\beta$ -Linie ausschließlich auf das ATP zurückgeht.

PME (Phosphomonoester) und PDE (Phosphodiester) spielen eine wichtige Rolle beim Zellaufbau, Zellabbau und der Membranerneuerungsrate. Ab ca. 3T Feldstärke lassen sich die Peaks von PME und PDE in jeweils 2 Linien auflösen: Die Monoester Phosphoethanolamin (PE) und Phosphocholin (PC) gelten als Ausgangsstoffe für die Phospholipidsynthese. Dagegen stellen die Diester Glycerophosphoethanolamin (GPE) und Glycerophosphocholin (GPC) Abbauprodukte des Phospholipidmetabolismus dar. Zudem ist auch anorganisches Phosphat (Pi) detektierbar, das in vielen Stoffwechselprozessen eine wichtige Rolle spielt. Der intrazelluläre pH-Wert lässt sich aus der chemischen Verschiebung bzw. dem Abstand der Linien von Pi und PCr errechnen (Barker et al., 1999; Cichocka et al., 2015; Petroff et al., 1985).

Die MRS wurde initial zur Erforschung des Muskel- und Leberstoffwechsels (Kemp et al., 2007) verwendet, jedoch war die räumliche Auflösung damals unzureichend.

Der technische Fortschritt in der Sequenz-, Spulen- und Softwaretechnik ermöglicht es jedoch heute, lokalisierte Phosphorspektroskopie in Gehirn, Leber und Herz durchzuführen (Hetherington et al., 2001; Laufs et al., 2014). Aufgrund der geringeren Signalstärke des  $^{31}\text{P}$ -Kerns ist die maximal erreichbare räumliche Auflösung jedoch deutlich schlechter (10-20 ml) im Vergleich zur Protonenspektroskopie (1 ml).



**Bild 2**

Die Abbildung zeigt das Phosphorspektrum des Gehirns, von links nach rechts sind folgende Peaks zu erkennen: PE Phosphoethanolamin, PC Phosphocholin, Pi anorganisches Phosphat, GPE Glycerophosphoethanolamin, GPC Glycerophosphocholin, PCr Phosphocreatin, ATP Adenosintriphosphat, NAD Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, Die chemische Verschiebung ist in ppm „parts per million“ auf der Abszisse aufgetragen.

#### 4.3.2 Hardware-Voraussetzungen

Die Resonanzfrequenz der Phosphorkerne ist um den Faktor 2.5 geringer als bei Wasserstoffkernen. Aus diesem Grund kann die Phosphorspektroskopie nur mit speziellen Sende- und Empfangsspulen betrieben werden, die auf die Phosphorfrequenz abgestimmt sind. Auch der Signalempfänger muss für die Verarbeitung der Phosphorsignale geeignet sein. Deswegen stellt die Entscheidung, einen MR-Tomographen auf die Phosphor-MRS aufzurüsten, ein kostenintensives Unterfangen dar. Aktuell sind sogenannte doppelresonante Kopfspulen von verschiedenen Herstellern erhältlich. Der Vorteil liegt darin, dass sie sowohl Protonen- als auch Phosphorsignale empfangen können (Mandal, Akolkar, 2011), was von besonderer Wichtigkeit ist, da zur Positionierung des Zielvolumens auch anatomische (protonenbasierte) Bildgebung benötigt wird. Die Phosphorspulen dienen jedoch nicht ausschließlich als Empfangsspulen, sondern zusätzlich als Sendespulen, da der im MR-Tomographen verbaute Ganzkörperresonator nur auf der Protonenfrequenz arbeitet. Trotz der Verfügbarkeit doppelresonanter Spulen ist eine singuläre Protonenspule weiterhin unverzichtbar, da eine qualitativ hochwertige und schnelle anatomische Bildgebung besser mit dieser erzielt werden kann. Unter Umständen ist also trotz einer vorhandenen doppelresonanten Spule ein Spulentauch während der Untersuchung notwendig.

## **4.4 Lokalisierungs-Methoden**

Ein Grundproblem der MR-Signale liegt darin, dass sie keinen automatischen Ortsbezug haben und nicht an einen anatomischen Ursprungsort gekoppelt sind. Grundsätzlich tragen also alle angeregten Atomkerne im Empfindlichkeitsbereich der Empfangsspule zum Gesamtsignal bei. Man unterscheidet bei den Empfangsspulen zwischen Volumenspulen und Oberflächenspulen. Volumenspulen nehmen alle Signale aus ihrem Inneren mit einer relativ homogenen Intensität auf und werden z.B. in der Regel bei Untersuchungen des Gehirns verwendet. Oberflächenspulen hingegen weisen einen räumlich eingeschränkten Empfindlichkeitsbereich auf, d.h. die Signalstärke nimmt mit zunehmender Entfernung von der Spule stark ab, sodass nur Signale aus dem direkten Spulumfeld akquiriert werden.

Oberflächenspulen sind somit für eine einfach, grobe Lokalisierung der Signale geeignet, kleinere Oberflächenspulen ermöglichen eine genauere Volumenselektivität, jedoch nur in Regionen nahe der Körperoberfläche. Eine Oberflächenspule wird so z.B. bei der Phosphorspektroskopie der Skelettmuskulatur verwendet, da hierbei kein Anspruch an eine hochexakte räumliche Auflösung gestellt wird. Für eine genauere Lokalisierung der MR-Signale existieren mittlerweile mehrere Verfahren; dabei bedient man sich der Technik der Magnetfeldgradienten wie bei der anatomischen Bildgebung. Man unterscheidet hier zwischen der Einzelvolumen- und der Multivolumentechnik. Bei der Einzelvolumentechnik nutzt man Schichtselektionsgradienten, um sicherzustellen, dass die gemessenen MR-Signale nur aus einem zuvor definierten Gewebevolumen stammen. Bei der Multivolumentechnik hingegen erfolgt die Lokalisierung mithilfe von Phasenkodiergradienten, die die gemessenen MR-Signale so kodieren, dass eine Zuordnung jedes Signalbetrags zu seinem anatomischen Ursprungsort möglich ist.

Vor der Spektroskopie-Sequenz wird das eigentliche Untersuchungsvolumen, auch „Volume of Interest“ (=VOI) genannt, anhand anatomischer Referenz-Bilder geplant, die initial bei der MRS-Untersuchung akquiriert werden.

### **4.4.1 Einzelvolumentechnik (SVS)**

Bei der Untersuchung fokaler, definiert begrenzter Läsionen findet die Einzelvolumentechnik Verwendung (auch „single voxel spectroscopy“, SVS, genannt). Die Auswahl des Zielvolumens („voxel of interest“, VOI) geschieht hierbei durch die Anwendung von Schichtselektionsgradienten in mehreren (meist 3) Raumrichtungen. Der Ursprung des MR-Signals und damit die Herkunft des Spektrums ist dadurch auf ein quaderförmiges Voxel beschränkt. Prinzipiell lassen sich zwei Arten der Einzelvolumenselektion unterscheiden:

Entweder werden die Atomkerne nur im Zielvolumen angeregt, oder es erfolgt eine universelle Anregung mit anschließender Auslöschung umgebender Signale.

#### **4.4.2 Multivolumentechnik (CSI)**

Die Multivolumentechnik erweist sich immer dann als vorteilhaft, wenn keine eng begrenzten, fokalen Läsionen von Interesse sind, sondern die breite räumliche Verteilung von Metaboliten im Gewebe. Mithilfe dieser Technik ist gleichzeitig eine Vielzahl von Spektren aus einer oder mehreren Schichten messbar. Hierbei wird eine zwei- oder dreidimensionale Matrix erzeugt, die jeweils aus kleineren Volumenelementen besteht (siehe Bild 12). Die genaue Lokalisierung wird mithilfe von Phasenkodiergradienten erreicht, die vor der Signalakquirierung für jede einzelne Raumrichtung geschaltet werden. Die Anwendung der Frequenzkodierung ist nicht möglich, da es dann zu Überlagerungen der spektralen Frequenzinformationen und der Gradienten-induzierten ortsabhängigen Frequenz-unterschiede kommen würde, sodass kein Spektrum zustande käme. Die Umrechnung der ortskodierten Spektroskopiesignale in die entsprechenden Einzelvoxel erfolgt durch Fourier-Transformationen über die (2 oder 3) Raumachsen der Spektren-Matrix, die zusätzlich zu der für die Spektren-Berechnung benötigten Fourier-Transformation (siehe Kap. 4.2.2) erforderlich ist. Neben der klassischen Spektrendarstellung in Linienform (siehe Bild 2) besteht auch die Möglichkeit, Metabolitenbilder zu erzeugen. Hierbei werden die Intensitäten der interessierenden Spektrallinien in den verschiedenen Voxeln als Farbskala (etwa in einer Heatmap) oder Grauskala dargestellt und in einem anatomischen Bild überlagert (siehe Bild 3). Da hierbei eine Visualisierung der Intensität von Spektrallinien mit anatomischer Korrelierung erfolgt, wird diese Technik auch „chemical shift imaging“ (CSI) oder „spectroscopic imaging“ (MRSI) genannt.

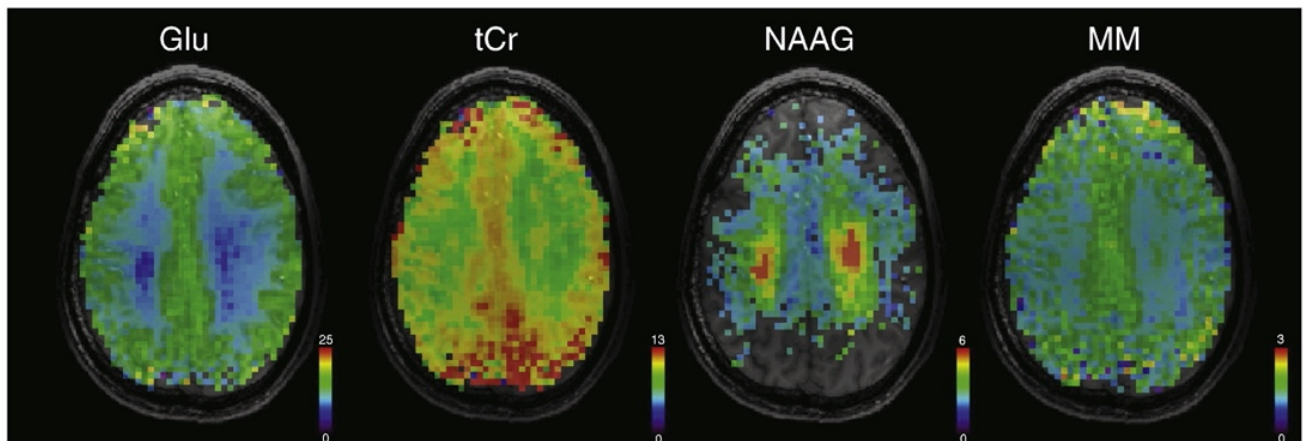
Der Hauptvorteil der Multivolumentechnik im Vergleich zur Einzelvolumentechnik ist die höhere Effektivität, da viele Spektren aus einem großen Volumen gleichzeitig erfasst werden können, wohingegen in der SVS in der gleichen Zeit nur ein einziges Volumenelement messbar ist.

Wie aus der Bildgebung bekannt, ist es auch bei der CSI möglich, die Matrix nachträglich zu interpolieren. Hierbei wird die Spektrenmatrix rechnerisch verfeinert, der tatsächliche Informationsgehalt der Messung bleibt jedoch gleich. Die Interpolation ermöglicht eine genauere Selektierung der ROI, da unter Umständen mit den originalen Messrastern feine Strukturen wie z.B. im Gehirn nur unsauber selektiert werden können.



Neben der Interpolation der Matrix ist auch eine nachträgliche räumliche Verschiebung des Matrix-Gitters um maximal eine Voxelbreite in jeder Raumrichtung möglich, um das Gitter besser an die Anatomie des Patienten anzupassen.

Ein Nachteil der Multivolumentechnik liegt darin, dass das „shimmen“ bei größeren Volumina schwieriger ist. Bleiben deshalb höhere Magnetfeldinhomogenitäten übrig, kann es zu Qualitätseinbußen bei den Spektren kommen.



**Bild 3**

Darstellung einer Protonen-MRSI, Grafik von (Považan et al., 2015)

## 4.5 Spektroskopie-Sequenzen

### 4.5.1 PRESS und STEAM

Bei der Protonen-MRS kommt am häufigsten die PRESS-Sequenz zum Einsatz (Point-resolved-spectroscopy) (Bottomley, 1987). Dabei werden 3 schichtselektive Radioimpulse ( $90^\circ, 180^\circ, 180^\circ$ ) in 3 zueinander senkrecht orientierten Schichten verwendet, um ein Doppelspinecho zu erzeugen. Ausschließlich das zweite Echosignal, das nur im quaderförmigen Schnittvolumen der 3 Schichten entsteht, wird zur Erzeugung des Spektrums genutzt.

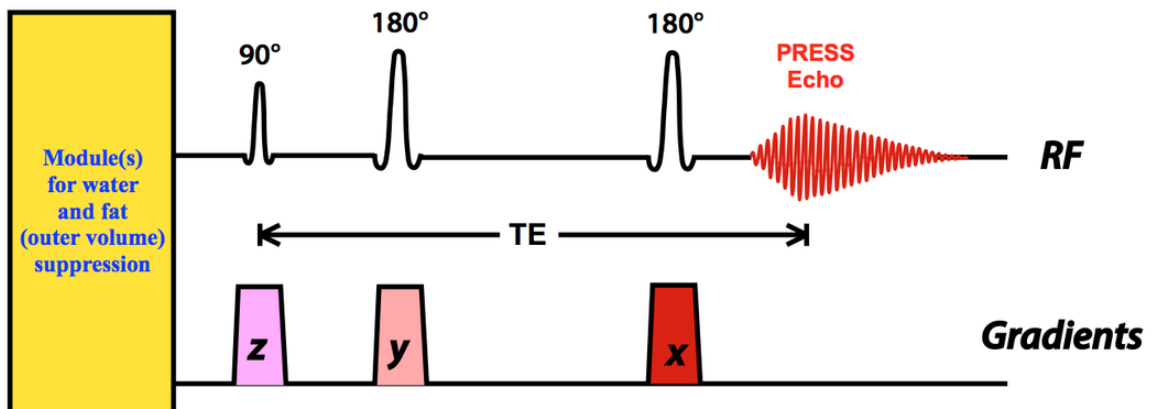
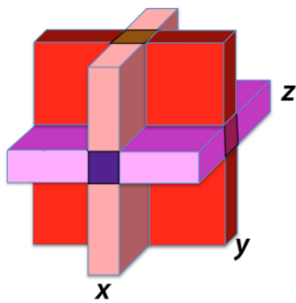
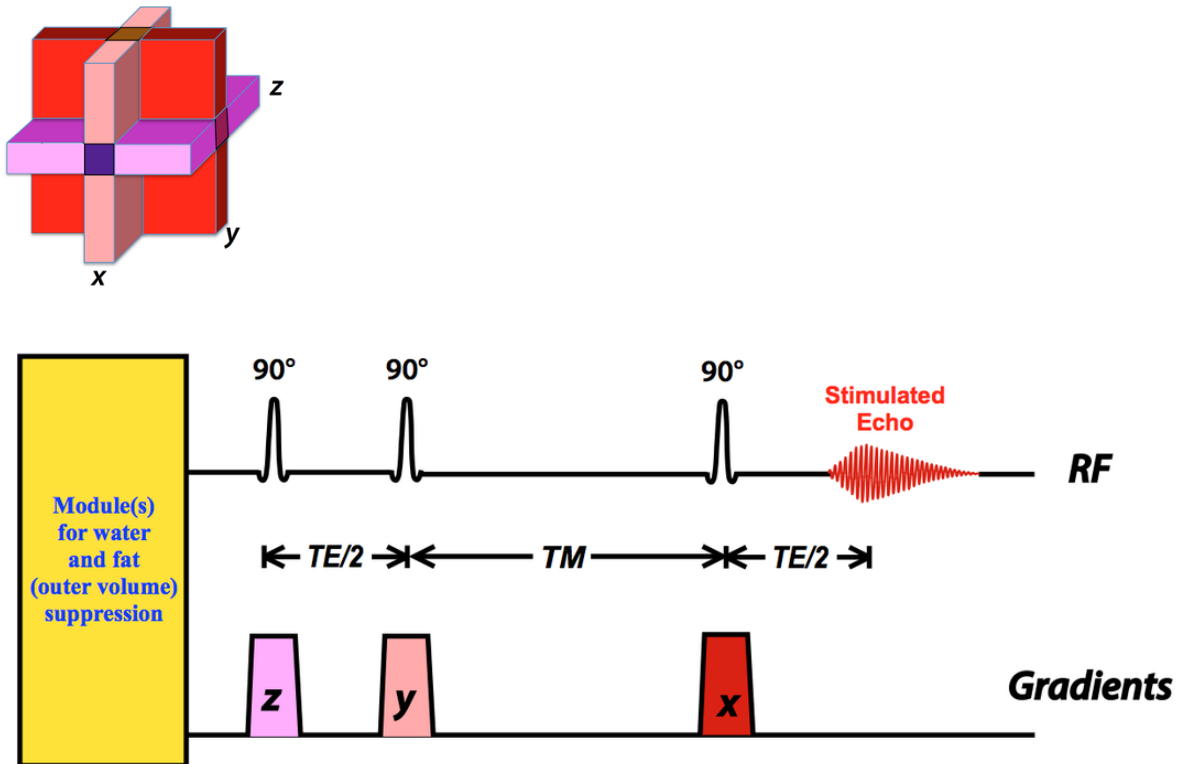


Bild 4

Darstellung der PRESS-Sequenz © <http://mriquestions.com>

Eine weitere Option zur Gewinnung von Spektroskopiedaten ist die STEAM-Sequenz (Stimulated-echo-acquisition-mode). Hier wird mit 3 schichtselektiven 90°-Pulsen ein sogenanntes stimuliertes Echo erzeugt. Durch STEAM sind kürzere Echozeiten möglich und eine genauere Zielvolumenabgrenzung, jedoch halbiert sich die Signalintensität im Vergleich zu PRESS.

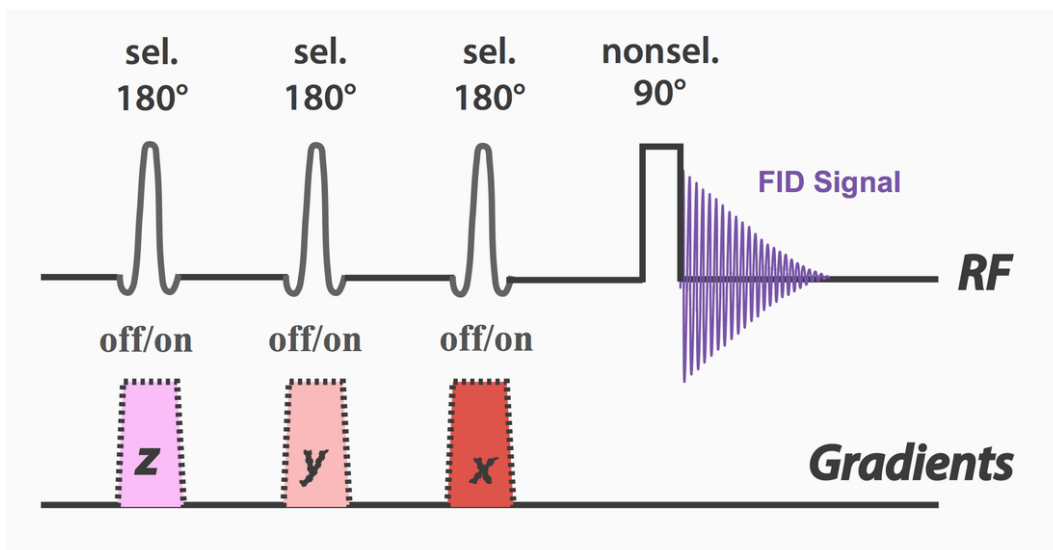
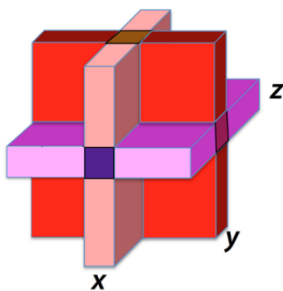


**Bild 5**

Darstellung der STEAM-Sequenz © <http://mriquestions.com>

## 4.5.2 ISIS

Die Phosphorverbindungen weisen eine besonders kurze T<sub>2</sub>-Zeit auf. Deswegen sind Sequenztechniken wie PRESS und STEAM für die Phosphor-MRS nur mit extrem kurzen TE Zeiten sinnvoll, die jedoch technisch kaum zu realisieren sind. Als alternative Einzelvolumentechnik hat sich die ISIS-Methode (Image-selected-in-vivo-spectroscopy) etabliert. Prinzipiell handelt es sich um ein umfangreiches Additions-Subtraktionsverfahren, bei dem das Spektrum des Zielvolumens aus 8 verschiedenen aufeinanderfolgenden Signalakquisitionen mit jeweils unterschiedlichen Schichtselektionsgradienten berechnet wird. Anstelle der bei PRESS und STEAM erzeugten Echo-Signale nutzt die ISIS-Technik das FID-Signal (free induction decay), das unmittelbar nach dem 90°-Puls entsteht und daher nicht vom T<sub>2</sub>-Zerfall betroffen ist.



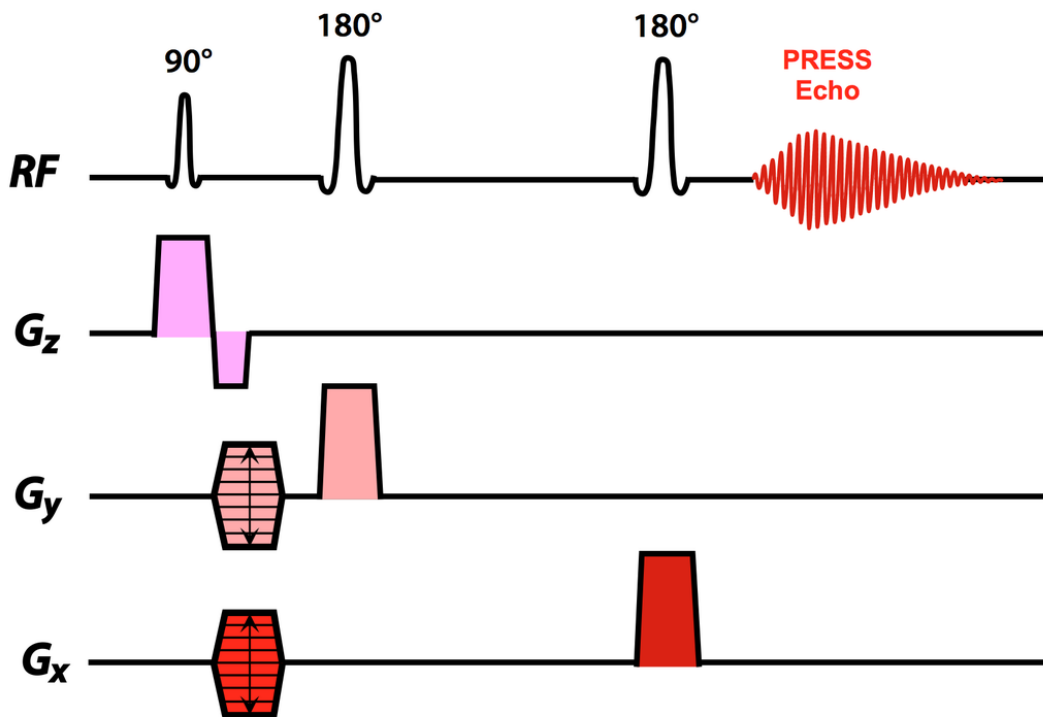
**Bild 6**

Darstellung der Image-Selected In vivo Spectroscopy (ISIS) © <http://mriquestions.com>

### 4.5.3 CSI

Die CSI-Phasen-Kodierung kann in 2D- oder 3D-Technik mit jeglicher Form der Signalanregung und -Generierung kombiniert werden, beispielsweise PRESS oder STEAM für die Protonenspektroskopie bzw. FID für die Phosphorspektroskopie.

Das erste Beispiel (Bild 7) illustriert eine auf der PRESS-Technik basierende 2D-CSI Sequenz, die ein (Doppel-)Spinecho-Signal aus einer durch den Schichtauswahl-Gradienten  $G_z$  bestimmten Schicht erzeugt. Dadurch erhält man gleichzeitig alle Spektren der gewählten Voxel-Matrix aus der angeregten Schicht. Anzahl und Größe der Voxel sind durch die Anzahl der Phasenkodierschritte in x- und y- Richtung ( $n_x$ ,  $n_y$ ) und die Größe des FoV festgelegt. Die beiden Schichtauswahl-Gradienten  $G_x$  und  $G_y$  sorgen dafür, dass außerhalb des FoV keine MR-Signale entstehen.



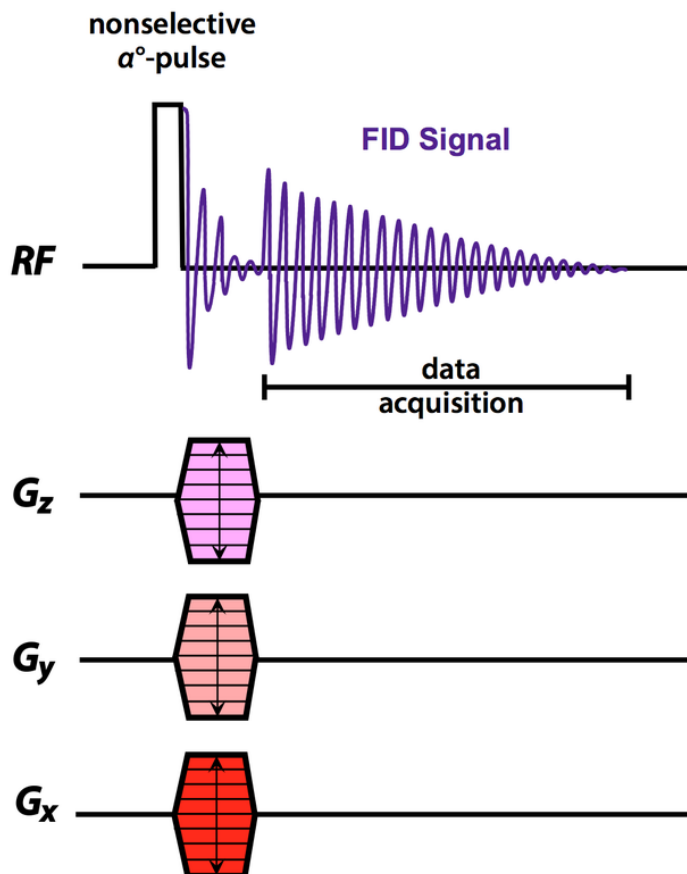
**Bild 7**

2D-PRESS CSI Sequenz mit schichtselektiven Anregungspulsen in 3 Ebenen und gestuften Phasenkodiergradienten entlang zweier Raumrichtungen. Diese Technik findet häufig in der Protonen-MRS Verwendung. Der Einfachheit halber wurden Vorsättigungspulse für Wasser und Fett in dieser Grafik nicht berücksichtigt. © <http://mriquestions.com>

Durch Hinzufügen eines weiteren Phasenkodiergradienten-Schemas (Schrittzahl  $n_z$ ) entlang der dritten Raumachse lässt sich das CSI-Verfahren auf 3 Dimensionen erweitern. Die

Messzeit einer solchen Sequenz ist proportional zum Produkt der Anzahl der Phasenkodierschritte pro Raumrichtung:  $n_x \times n_y \times n_z$

Da bei der Phosphorspektroskopie die echobasierten PRESS- und STEAM-Techniken wegen der geringen T2-Zeit der Phosphor-Metabolite nicht nutzbar sind, kann man die CSI-Sequenz auch mit Verwendung des FID-Signals kombinieren, für das nur ein einzelner Radiopuls erforderlich ist (Bild 8). Aufgrund der fehlenden Schichtauswahl-Gradienten regt der Radiopuls den gesamten Empfindlichkeitsbereich der Spule an (nicht-selektiv). Als Ergebnis erhält man eine 3-dimensionale Voxel-Matrix, deren Abmessungen durch die 3 Phasenkodiergradienten bestimmt sind. Bedingt durch den nicht-selektiven Anregungspuls dieser Sequenz können auch außerhalb des FoV liegende Gewebeanteile MR-Signale erzeugen, die unter Umständen zu einer Verfälschung der gemessenen Spektren führen.



**Bild 8**

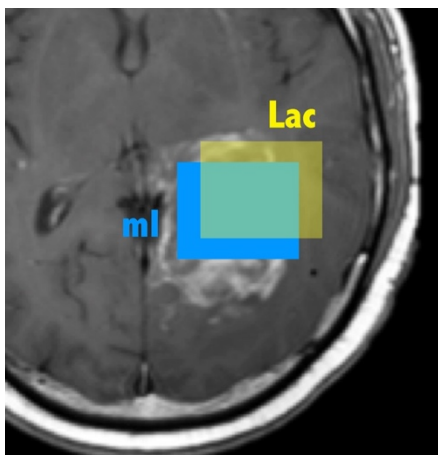
FID-basierte 3D-CSI Sequenz mit nicht-selektiver Volumenanzregung und Phasenkodiergradienten in den 3 Raumrichtungen. Diese Methodik wird häufig bei der Phosphorspektroskopie verwendet. © <http://mriquestions.com>

## 4.6 Spektroskopie-Artefakte

### 4.6.1 Lokalisierungs-Artefakte bei SVS

#### Chemical-Shift-Displacement

Chemical-Shift-bedingte Verschiebungs-Artefakte zwischen verschiedenen Metaboliten in der MRS entstehen ähnlich wie Fett/Wasser-Artefakte in der konventionellen MRT-Bildgebung. Bild 9 zeigt eine Visualisierung der Problematik anhand eines exemplarischen Voxels, das sowohl Laktat (Lac) als auch Myoinositol (ml) enthält. Die chemical-shift-Differenz zwischen beiden Molekülen beträgt 2.3 ppm, was bei 3T in etwa einer Frequenzdifferenz von 300 Hz entspricht. Wenn der eingestrahlte Radiopuls z.B. eine Bandbreite von 1500 Hz besitzt, werden die tatsächlich angeregten Volumina beider Metaboliten um den Faktor 20% ( $=300/1500$ ) gegeneinander verschoben sein. Weil diese Fehlzuordnung in allen 3 Raumrichtungen auftritt, gibt es eine lediglich 51%ige Überlappung beider Volumina. Chemical-shift-displacement entsteht immer dann, wenn Schichtselektions-Gradienten für die Voxel-Lokalisierung verwendet werden. Daher ist vor allem die Single-Voxel-Spektroskopie betroffen. Besonders ausgeprägt ist der Effekt bei höheren Magnetfeldstärken, da die chemische Verschiebung proportional zum Magnetfeld wächst. Zur Vermeidung dieser Artefakte sind Radiopulse mit größerer Bandbreite und starke Gradientenfelder wichtig.



**Bild 9**

Räumlicher Versatz der Spektroskopie-Voxel von Laktat (Lac, gelb) und Myoinositol (ml, blau) aufgrund des chemical-shift-displacements. © <http://mriquestions.com>

## **Kontamination durch angrenzendes Fett**

Fettgewebsprotonen weisen im Vergleich zu den interessierenden Metaboliten deutlich intensivere Signale auf, die das Spektrum trotz Fettunterdrückung stark beeinträchtigen können. Daher ist es wichtig, das Spektroskopie-Voxel so zu platzieren, dass es möglichst kein Fettgewebe enthält. Sowohl das chemical-shift-displacement für Fett als auch die unvermeidlich imperfekten Schichtauswahl-Gradienten können zur Folge haben, dass auch unmittelbar an das Voxel angrenzendes Fettgewebe miterfasst wird. Es ist deshalb ratsam, einen gewissen Sicherheitsabstand zu Fettstrukturen einzuhalten.

### **4.6.2 Lokalisierungs-Artefakte bei CSI**

#### **Spektrale Kontamination**

Die Anzahl der Phasenkodierschritte in der CSI-Sequenz legt die Anzahl der Voxel des Matrixgitters fest, meist verwendet man wegen der begrenzten Messzeit und der geringen Signalstärke der Metaboliten nur 8-16 Phasenkodierschritte. Aufgrund der Eigenschaften der Fourier-Transformation kann bei solch kleinen Matrixgittern eine beachtliche Fehllokalisierung der MR-Signale entstehen. Die Signalanteile eines Voxels können somit zu einem gewissen Anteil über benachbarte Voxel verstreut werden. Dieses Phänomen nennt man auch „Voxel bleeding“. Es ist immer dann besonders stark, wenn lokale Intensitätssprünge auftreten, wie zum Beispiel am Rande des Messfeldes. Aus diesem Grund ist die Auswertung von randständigen Voxeln nur mit Zurückhaltung zu betrachten.

#### **Einfaltungen**

Gewebe, das sich außerhalb des Messfeldes befindet, aber im Empfindlichkeitsbereich der Spule liegt, kann sowohl bei der Bildgebung als auch bei der Spektroskopie zu Einfaltungen in den Messbereich führen. Dies bedeutet, dass z.B. Signalanteile, die aus dem Bereich rechts des Messfeldes stammen, durch messbedingte Fehlkodierung auf der linken Seite im Messfeld eingespiegelt und den dortigen Signalen überlagert werden. Generell können solche Einfaltungen bei einer CSI-Sequenz in allen 3 Raumrichtungen auftreten. Zur Vermeidung gibt es mehrere Möglichkeiten: Im einfachsten Fall wählt man das Messfeld so groß, dass es das gesamte Gewebe in der Empfangsspule abdeckt. Alternativ lässt sich die CSI mit der Einzelvolumentechnik kombinieren (Hybrid-Technik), indem man die Anregung der Spins durch die Verwendung dreier Schichtselektionsgradienten zusätzlich zur Phasenkodierung auf das gewünschte Messvolumen begrenzt (Bild 7). Dies ist allerdings nur bei der Echo-basierten CSI möglich, nicht jedoch bei der FID-CSI (Vgl. Kap. 4.5.3). Ähnlich wie bei der SVS sind auch bei der Hybrid-CSI mögliche chemical-shift-bedingte Verschiebungen des Anregungsvolumens zwischen verschiedenen Metaboliten zu berücksichtigen.



Die CSI-Wasserstoffspektroskopie des Gehirns hat sich als besonders empfindlich für Einfaltungen erwiesen. Das Problem hierbei sind außerhalb des Hirns liegende Fettgewebsprotonen (z.B. Kopfhaut, Orbita), deren intensive Signale auch in die cerebralen Spektroskopie-Voxel einstreuen können und somit die Messqualität beeinträchtigen. Zur Vermeidung bietet sich eine genaue Zielvolumenselektion an, die möglichst kein Fett enthält, sowie zusätzliche Sättigungsschichten um das VOI herum, um mögliche Streusignale zu eliminieren.

## **4.7 Quantifizierung**

Wie auch bei der zugrundeliegenden Studie dieser Arbeit ist es oft nicht von alleinigem Interesse, gewisse Metaboliten nachzuweisen, sondern auch deren Konzentration  $c$  zu bestimmen. Aus der Position der Linien im Spektrum kann bereits abgelesen werden, um welche Metaboliten es sich handelt. Zu beachten ist jedoch, dass nicht die Höhe des Peaks mit der Konzentration korreliert, sondern die Fläche unter dem Peak. Man nennt sie auch Linienintensität und errechnet sie durch die Integralbildung unterhalb eines Peaks. Ein hoher Peak deutet also entgegen der Intuition nicht zwangsläufig auf eine hohe Konzentration hin, da das Integral entscheidend ist. Ein flacher, aber breiterer Peak kann eine deutlich höhere Konzentration indizieren als ein hoher, schmaler Peak.

### **4.7.1 Signalauswertung**

Spektroskopie-Rohdaten unterlaufen nach der Akquirierung mehrere Nachbearbeitungsschritte, die größtenteils softwaretechnisch automatisiert ablaufen und somit gut in die klinische Routine eingebettet werden können. Spektren, die sich durch zusätzliche oder fehlende Peaks von normalen Spektren unterscheiden, bringen die digitale Nachverarbeitung jedoch an ihre Grenzen und erfordern deshalb eine manuelle Nachverarbeitung. Da bei der CSI eine Vielzahl von Einzelspektren gleichzeitig gemessen wird, kann der manuelle Optimierungsaufwand sehr groß werden.

Grundsätzlich stellen Linienüberlagerungen bei der Spektroskopiedaten-Auswertung eines der größten Probleme dar. Moleküle mit sehr kurzer T<sub>2</sub>-Zeit oder Makromoleküle können breite Linien erzeugen und die Spektren-Interpretation maßgeblich erschweren, da der spektrale Untergrund und damit die Basislinie verzerrt wird. Die Basislinie ist jedoch von elementarer Bedeutung, um die Linien-Intensitäten korrekt zu bestimmen. Eine fehlerbehaftete bestimmte Basislinie kann daher den Quantifizierungsprozess verfälschen. Je dichter die einzelnen Peaks im Spektrum beieinander liegen, desto schwieriger ist eine eindeutige Trennung, vor

allem dann, wenn die Peaks aufgrund mangelnder Magnetfeldhomogenität zusätzlich verbreitert sind.

Eine Vielzahl an Metaboliten enthält zudem mehrere Wasserstoff-Atome, die unterschiedliche chemische Bindungen zu Nachbaratomen haben und somit unterschiedliche Larmor-Frequenzen aufweisen. In einem solchen Fall erhält man bereits für einen einzigen Metaboliten ein Multilinienspektrum.

Zusätzlich zu der Auswertesoftware der MR-Gerätehersteller existieren einige Tools von Drittanbietern, die eine standardisierte Nachverarbeitung selbst großer Spektroskopiedatensätze erlauben. Für die Protonen-MRS wurde in unserer Studie das kommerzielle Programm LCModel (Provencher, 2001) verwendet, welches sich in den letzten Jahren als eine Art Standard etabliert hat und mittlerweile als freie Software verfügbar ist. Im Rahmen der Phosphorspektroskopie wird heutzutage hauptsächlich das frei erhältliche jMRUI-Tool (<http://jmrui.eu>) (Stefan et al., 2009) genutzt, das auch wir in unserer Studie eingesetzt haben. Beide Programme bedienen sich verschiedener Modellfunktionen, um die Spektren durch mathematische Anpassung (fitten) im Frequenz- oder Zeitbereich zu analysieren und Intensitäten der Peaks zu bestimmen. Im besten Fall ermöglicht die Software, überlappende Linien in Einzelpeaks aufzulösen und eine sauberere Metabolitentrennung zu erreichen. Durch Eingabe bereits bekannter Spektren-Informationen wie z.B. Peak-Position, Linienbreite oder Linienform („prior knowledge“) lässt sich die Genauigkeit und Schnelligkeit der Spektrenauswertung eventuell deutlich verbessern.

#### **4.7.2 Relativwerte**

Prinzipiell gilt ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der signalerzeugenden Atomkerne und der Intensität des MR-Signals. Bei jeder Messung spielen jedoch eine Vielzahl von unbekanntem Messparametern eine Rolle. Einige dieser Parameter sind konstant, andere erweisen sich jedoch als sehr schwankend zwischen verschiedenen Messungen, da sie in komplexer Weise von variierenden Patienteneigenschaften, Lagerungsbedingungen im MR-Gerät, verwendeten MR-Spulen und veränderlichen, im Allgemeinen automatisch ablaufenden, elektronischen Justagen abhängen. Aus diesem Grund ist der Vergleich von Signalintensitäten aus verschiedenen MR-Untersuchungen – selbst bei derselben Person – und die Bestimmung absoluter Metabolitenkonzentrationen schwierig. Im klinischen Alltag wird die Absolutquantifizierung weitestgehend durch die Angabe relativer Konzentrationen ersetzt. Der Vorteil relativer Konzentrationsangaben ist offensichtlich: Durch Bildung einfacher Signalquotienten verschiedener Metaboliten (Quotienten der Peakintegrale) lassen sich Aussagen über deren zeitliche Veränderungen oder über Unterschiede zwischen

verschiedenen Patientengruppen treffen. Die Aussagekraft und der klinische Nutzen von Relativwerten sind jedoch dadurch eingeschränkt, dass oftmals nicht klar ist, welche Komponente des Quotienten, Zähler oder Nenner, das veränderte Signal-Verhältnis verursacht hat. Wenn die Konzentration beider Komponenten im selben Ausmaß steigt oder fällt, bleibt dies eventuell gänzlich verborgen, weil sich das Signalverhältnis nicht ändert.

Die Höhe der in den Spektren gemessenen Signalintensitäten wird nicht nur durch die Anzahl der jeweils signalerzeugenden Atomkerne bestimmt, auch die Relaxationszeiten spielen eine wichtige Rolle, ebenso wie bei der Bildgebung. Verschiedene Metaboliten besitzen verschiedene T1- und T2-Zeiten. Abhängig von der Echozeit TE und der Repetitionszeit TR der verwendeten Spektroskopiesequenz ergeben sich für verschiedene Metaboliten unterschiedliche Abschwächungsfaktoren R, die die Intensität der gemessenen Metabolitenpeaks S gegenüber den gesuchten Gleichgewichtswerten  $S_0$  verändern:

$$S = S_0 \cdot R$$

Beim Vergleich der Konzentrationswerte verschiedener Metabolite müssen diese Korrekturfaktoren R, die sich bei Kenntnis aller notwendigen Parameter (TR, TE, T1, T2, Flipwinkel) berechnen lassen, berücksichtigt werden. Die spezifischen T1- und T2-Zeiten der Metaboliten können entweder selbst durch Testmessungsreihen bestimmt werden oder man bedient sich der Werte aus der Literatur (Di Costanzo et al., 2007; Gussew et al., 2012; Träber et al., 2004).

#### **4.7.3 Referenz- und Absolutwerte**

Will man Metabolitenintensitäten aus verschiedenen Messungen vergleichen oder Absolutkonzentrationen bestimmen, sind zusätzliche interne oder externe Referenzwerte notwendig (Tofts, Wray, 1988).

Als Referenz kann eine Substanz bekannter chemischer Zusammensetzung und Konzentration dienen, mit der eine Kalibrierung der Metaboliten-Signale möglich ist. Idealerweise wird die Referenzmessung gleichzeitig mit der Aufnahme der Metaboliten-Daten im selben Messdurchgang unter identischen Messbedingungen durchgeführt. Bei der Protonen-MRS bietet es sich an, das Gewebewasser, dessen Konzentration in der Hirnsubstanz recht gut bekannt ist (Ernst et al., 1993), als interne Referenz zu verwenden. Das Referenz-Spektrum des Gewebswassers erhält man, indem die identisch lokalisierte Untersuchungssequenz mit abgeschalteter Wasserunterdrückung wiederholt wird. Da Wasser

mit Abstand die häufigste Molekülsorte im menschlichen Körper ist und somit eine sehr hohe Intensität aufweist, genügt eine Messung von wenigen Sekunden mit wenigen Mittelungen. Im Hirngewebe setzt sich das Wassersignal aus dem Liquor(CSF)-Signal und Anteilen der grauen (GS) sowie weißen Substanz (WS) zusammen, wobei sich diese 3 Kompartimente im Wassergehalt und in den Relaxationszeiten unterscheiden (Ernst et al., 1993). Zu den MRS-Signalen der Metaboliten tragen jedoch praktisch nur die graue und weiße Substanz bei, da die Metabolitenkonzentration im Liquor sehr gering ist. Geeignete Segmentierungsverfahren ermöglichen es, die genaue Zusammensetzung des Zielgewebes (Voxels) zu ermitteln, um die Signalbeiträge der 3 Kompartimente und die Relaxationskorrekturen zu den Linienintensitäten errechnen zu können (Gussew et al., 2012; Kreis et al., 1993; Minati et al., 2010).

Im Falle der Phosphorspektroskopie ist eine externe Referenz hilfreich. Es handelt sich dabei um einen kleinen Behälter (Phantom), der eine chemische Substanz (Phosphor-Verbindung) bekannter Konzentration enthält und für die Dauer der Spektroskopie-Messung neben dem Patientenkopf in die Spule gelegt wird. Diese Anordnung stellt gleichzeitig auch einen Schwachpunkt der Methode dar, da sich die Referenzlösung – anders als bei der internen Gewebswasser-Referenz für die H-MRS – hier am Spulenrand, in einer erheblichen räumlichen Distanz zum Zielvolumen, befindet. Räumliche Inhomogenitäten sowohl der Anregungspulse als auch der Signalempfindlichkeit über den Spulenquerschnitt können zu systematischen Fehlern bei der Kalibrierung der Signale führen. Außerdem kann das Phantom selbst die Magnetfeldhomogenität beeinträchtigen und damit die Spektrenqualität verschlechtern.

Um diese Probleme zu vermeiden, besteht alternativ zur gleichzeitigen Messung von Patient und Phantom in einer Sequenz auch die Möglichkeit, die Referenzmessung des Phantoms in einer separaten Sequenz ohne Patient durchzuführen (Michaelis et al., 1993). Dabei wird am besten ein ausgedehntes Phantom verwendet, dessen Größe ungefähr den Abmessungen eines Kopfes entspricht. Generell ist es beim Vergleich der Spektroskopie-Daten aus separaten Untersuchungen bzw. von verschiedenen Probanden erforderlich, die jeweilige Spulenlast (coil load) zu berücksichtigen, die von der unterschiedlichen Größe (Masse) des Kopfes abhängt, der im Empfindlichkeitsbereich der Spule liegt. Wenn man eine kombinierte Sende/Empfangsspule verwendet, wie es bei unseren Phosphorspektroskopie-Messungen der Fall war, lässt sich das sogenannte Reziprozitäts-Prinzip (Hoult, Richards, 2011) nutzen, das einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen der gemessenen Signalintensität und der Transmitter-Amplitude des 90°-Radiopulses beschreibt.

#### 4.7.4 Phosphor-Phantom

Zur Absolutquantifizierung der Phosphor-MRS wurde ein Phosphor-Phantom verwendet, das eine Lösung aus  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit  $c = 75 \text{ mmol/l}$  enthielt. Leider existieren nach aktuellem Kenntnisstand keine vorgefertigten Phantome der Spulenhersteller, sodass ein geeignetes Phantom selbst angefertigt werden musste. Die Anforderungen an ein solches Phantom sind vielfältig und führten zu einem prolongierten Findungsprozess. Zum einen muss das Phantom flexibel sein, um auch neben dem Patientenkopf in der Kopfspule platziert werden zu können, zum anderen muss es ein ausreichend großes Volumen aufweisen, um ein hohes Phosphor-Signal zu erzeugen. Weiterhin ist eine Grundvoraussetzung, dass das Phantom so wenig wie möglich zu Magnetfeldinhomogenitäten führt, die die Messqualität negativ beeinflussen würden. Günstig dafür sind möglichst dünnwandige Gefäße wie z.B. ein Ballon. Dieser erwies sich aber hinsichtlich der Dichtigkeit und der Signalqualität als unvorteilhaft. Die besten Messergebnisse und geringsten Magnetfeldinterferenzen ergaben sich mit einem handelsüblichen Gefrierbeutel. Er ließ sich gut befüllen, war ausreichend wasserdicht und zeigte nur geringe, durch den Kunststoffverschluss verursachte Artefakte.

#### 4.8 Probanden

Die vorliegende Querschnittsstudie wurde von der lokalen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Die Probanden wurden über lokale Suchtberatungsstellen angeworben, keiner der Probanden war wegen Drogenabusus in klinischer Behandlung. Alle Probanden wurden von erfahrenen Psychologen und Psychiatern befragt hinsichtlich des Ausmaßes und der Vorgeschichte ihres Cannabiskonsums. Zusätzlich durchliefen sie einen psychometrischen Eignungstest, um die Einhaltung der Einschlusskriterien der Studie zu gewährleisten:

- Alter: 18-30 Jahre
- Rechtshändigkeit
- keine neurologischen, psychiatrischen oder systemischen Erkrankungen
- kein Nikotinkonsum am Tag der MR-Untersuchung  
(Zuwerhandlung führte zum Studienausschluss)
- außer Cannabis kein weiterer Drogenkonsum:  
Dies wurde durch einen Urin-Drogentest am Untersuchungstag verifiziert.

Alle Probanden unterzeichneten nach gründlicher Information über den Studienzweck und intensiver Aufklärung über die MR-Untersuchung vor Beginn der Untersuchung eine Einverständniserklärung.

Untersucht wurden insgesamt 21 weibliche Nicht-Konsumentinnen (wN) (Alter  $23 \pm 2$ ) und 26 männliche Nicht-Konsumenten (mN) (Alter  $25 \pm 4$ ), die weniger als 10-mal (Lebenszeit Konsum) Cannabis konsumiert hatten.

In der Konsumenten-Gruppe wurden 5 weibliche Konsumentinnen (wK) (Alter  $24 \pm 4$ ) und 40 männliche Konsumenten (mK) (Alter  $24 \pm 3$ ) untersucht. Alle konsumierten regelmäßig Cannabis, mindestens einen Tag pro Monat in den letzten 24 Monaten.

Die wK Gruppe wurde aufgrund der geringen Anzahl von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Vor der MRT Untersuchung mussten alle metallischen Fremdmaterialien der Studienprobanden entfernt werden, um Artefakte und Messergebnisverfälschungen zu vermeiden. Die Probanden wurden instruiert, während der Untersuchungszeit, die etwa 1h 30min betrug, in der Röhre des MR-Gerätes so ruhig wie möglich zu liegen.

Die Studie wurde unter Berücksichtigung der STROBE Richtlinien für Querschnittsstudien durchgeführt (Von Elm et al., 2007).

| Demographische und<br>Klinische Werte | wN         |        |      | mN         |        |      | mK         |        |      | p-Wert<br>$\Delta$ KN |
|---------------------------------------|------------|--------|------|------------|--------|------|------------|--------|------|-----------------------|
|                                       | Perzentile |        |      | Perzentile |        |      | Perzentile |        |      |                       |
|                                       | 25         | Median | 75   | 25         | Median | 75   | 25         | Median | 75   |                       |
| Anzahl der Probanden                  | 21         |        |      | 26         |        |      | 40         |        |      |                       |
| Alter, Jahre                          | 21.7       | 22.9   | 23.8 | 23.3       | 24.6   | 26.5 | 21.2       | 23.1   | 25.7 | 0.172                 |
| Bildungsjahre                         | 12.0       | 13.0   | 16.0 | 12.0       | 12.8   | 16.5 | 12.0       | 13.0   | 15.8 | 0.991                 |
| Tabakkonsum, py                       | 0.0        | 0.0    | 0.0  | 0.0        | 0.0    | 0.0  | 0.0        | 1.2    | 5.0  | <b>0.001</b>          |
| BDI                                   | 1.0        | 3.0    | 5.0  | 0.0        | 2.0    | 4.0  | 1.5        | 4.0    | 8.0  | 0.143                 |
| CUDIT                                 |            |        |      |            |        |      | 8.5        | 12.0   | 18.5 |                       |
| Konsumdauer, Jahre                    |            |        |      |            |        |      | 0.0        | 2.0    | 4.5  |                       |
| Beginnalter des Konsums               |            |        |      |            |        |      | 15.8       | 17.8   | 20.0 |                       |
| Lebenszeit Joints (x1000)             |            |        |      |            |        |      | 0.4        | 1.0    | 5.5  |                       |
| Konsum Tage/Woche                     |            |        |      |            |        |      | 1.50       | 4.0    | 7.00 |                       |
| Konsum g/Woche                        |            |        |      |            |        |      | 0.33       | 2.6    | 5.25 |                       |

**Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der Studienprobanden**

Die p-Werte wurden anhand des Mann-Whitney U Tests zwischen den Gruppen mN und mK bestimmt. p-Werte < 0.05 sind rot markiert.

## 4.9 Datenverarbeitung

### 4.9.1 Datenerhebung

Sämtliche MR-Untersuchungen wurden an einem 3-Tesla-Ganzkörper-Magnetresonanztomographen (Magnetom Skyra, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. 31P-Spektren wurden mit einer doppelresonanten 1H/31P Kopfspule (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Deutschland) akquiriert. Für die anatomische Bildgebung und die 1H-MRS kam wegen der höheren Signalstärke und der kürzeren Messzeit eine Standard-20-Kanal-1H-Kopfspule des MR-Geräte-Herstellers zum Einsatz.

Die anatomische Bildgebung umfasste 2 Sequenzen: 35 transversale T2-gewichtete Schichten von 4 mm Dicke dienten zur Positionierung der Spektroskopie-Regionen. Ein T1-gewichteter sagittaler Bilddatensatz des gesamten Gehirns (MPRAGE) mit einer isotropen räumlichen Auflösung von 0.9 x 0.9 x 0.9 mm<sup>3</sup> ermöglichte die Segmentierung des Gehirns in graue Substanz, weiße Substanz und Liquorflüssigkeit. Mithilfe der SPM-Software (SPM 8, statistical parametric mapping, The Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College London) wurden - individuell für jeden Probanden - für die 3 Kompartimente 3 getrennte Bilddatensätze berechnet, die in jedem Voxel den prozentualen Anteil  $F_K$  des jeweiligen Kompartimentes ( $K = GS, WS, CSF$ ) am Voxelvolumen enthalten. Auf diese Weise konnten die relevanten Gewebsfraktionen für alle Zielregionen extrahiert werden.

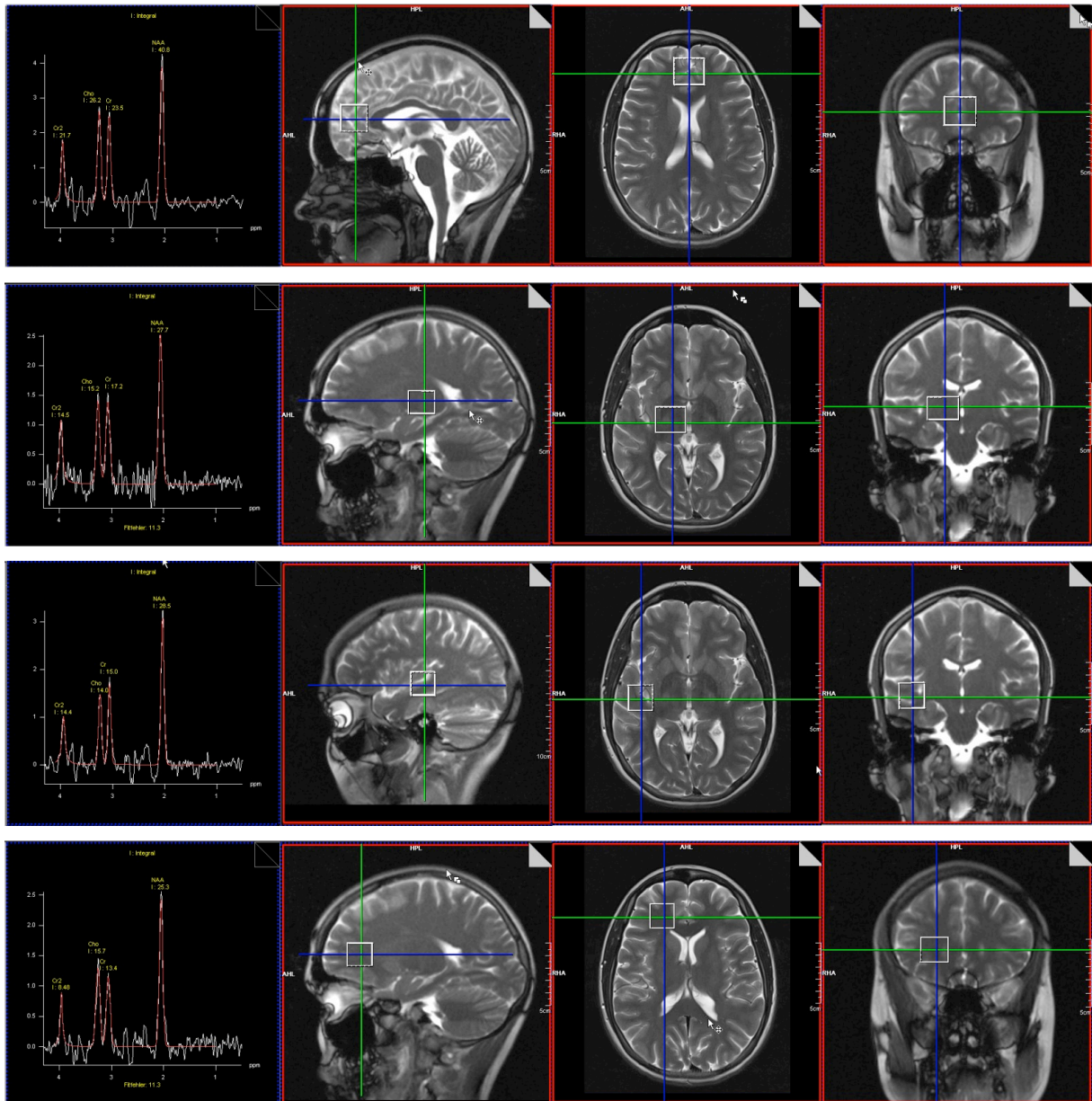
Der Volumenanteil des gesamten Hirngewebes am Voxel ergibt sich aus der Summe von  $F_{GS}$  und  $F_{WS}$ . Allerdings besteht nur ein Teil des Hirngewebes aus in der MR sichtbarem Wasser. Der Rest des Hirngewebes wird oft als strukturelle Substanz oder Trockengewicht (dry weight) bezeichnet. Aus den Volumenfraktionen  $F_K$  erhält man den prozentualen Anteil des Kompartimentes  $f_K$  am gesamten Voxel-Wasser (Molalität) durch folgende Rechnung (Gasparovic et al., 2006):

$$f_K = \frac{F_K \cdot \alpha_K}{F_{GS} \cdot \alpha_{GS} + F_{WS} \cdot \alpha_{WS} + F_{CSF} \cdot \alpha_{CSF}}$$

Für die graue Substanz, die weiße Substanz und den Liquor wurde dabei ein relativer MR-sichtbarer Gewebswasseranteil  $\alpha_K$  von jeweils 78%, 65% und 97% angenommen (Ernst et al., 1993). Der Anteil  $p$  des MR-sichtbaren Wassers im Voxel beträgt dann:

$$p = \alpha_{GS} \cdot f_{GS} + \alpha_{WS} \cdot f_{WS} + \alpha_{CSF} \cdot f_{CSF}$$

Mit dem Wert der Wasserkonzentration in reinem Wasser (55 600 mmol/l) ergibt sich die Wasserkonzentration  $WCONC$  im Voxel aus der Beziehung:  $WCONC = p \cdot 55600 \text{ mmol/l}$



**Bild 10**

Platzierung der VOI für die H-Spektroskopie in den Regionen FGS, r\_TH, r\_TL und r\_FWS



Die Singel-Voxel-Protonenspektroskopie-Daten wurden in 4 verschiedenen Hirnregionen erhoben: in der frontalen grauen Substanz (FGS), in der rechten frontalen weißen Substanz (r\_FWS), im rechten Thalamus (r\_TH) sowie im rechten Temporallappen (r\_TL) (Bild 10). Die durchschnittliche Voxelgröße betrug entsprechend 15 ml, 12 ml, 10ml und 8 ml. Aufgrund des Zeitaufwandes wurden keine Spektren der linken Hemisphäre erhoben. Wir nutzten eine PRESS-Sequenz mit TR= 1500 ms, TE= 135 ms und 80 Akquisitionen. Der Shim-Prozess wurde manuell korrigiert, um eine minimale Linienbreite von ca. 20 Hz zu erreichen. Als interne Referenz nutzten wir Gewebwasser, deswegen wurden für jedes Voxel zusätzliche Spektren ohne Wasserunterdrückung gemessen.

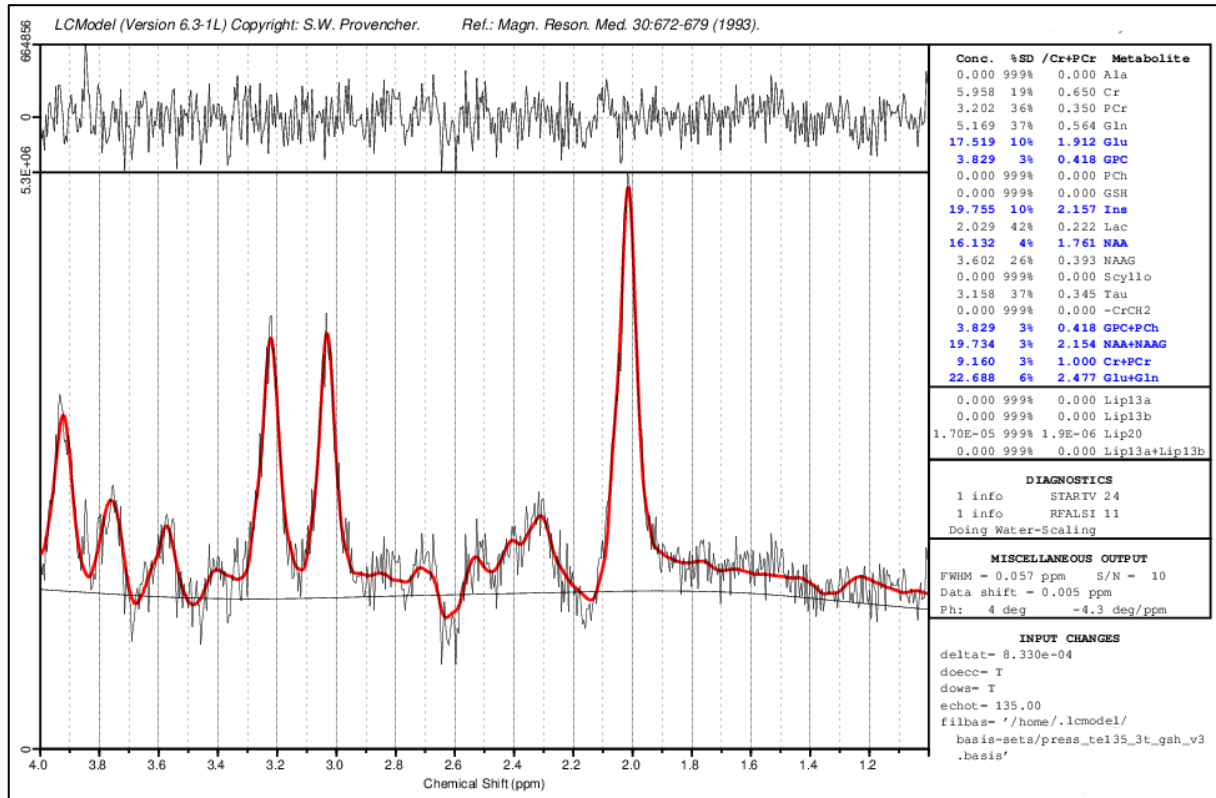
Vor dem Beginn der  $^{31}\text{P}$ -Messung musste der Proband kurzzeitig aus dem Magneten herausgefahren werden, um die Kopfspule zu wechseln. Für die Phosphorspektroskopie wurde eine 3D-chemical-shift-imaging(CSI)-free-induction-decay(FID)-Sequenz (TR = 1200 ms, TE= 2.3 ms, 15 Akquisitionen) verwendet. Gemessen wurde ein axialer Block von 200 mm Dicke, dessen Orientierung mit den transversalen anatomischen T2-Schichten übereinstimmte. Die Matrixgröße betrug  $8 \times 8 \times 8$ , das FOV  $200 \times 200 \text{ mm}^2$ , was eine Voxelgröße von  $25 \times 25 \times 25 \text{ mm}^3$  ergibt. Eine Protonen-Entkopplung mithilfe des WALTZ-4 Schemas (Widmaier et al., 1998) und die Reduktion des Flipwinkels auf  $60^\circ$  bewirkten eine deutliche Steigerung der Signalstärke. Um eine Linienbreite unterhalb von 30 Hz zu erzielen, war ein zeitaufwändiges und sorgfältiges manuelles Shimming des 3D-Volumens notwendig. Die reine Akquisitionszeit betrug 8:42 Minuten. Die Referenzmessung des Phosphor-Phantoms wurde in separaten Scans durchgeführt, um die Negativauswirkungen des Phantoms auf die Magnetfeldhomogenität während der Untersuchung der Probanden zu vermeiden. Das Phantom wurde innerhalb der Kopfspule in der Nähe des fronto-parietalen Übergangs des Kopfes platziert. Zur Kontrolle wurden zusätzliche Aufnahmen ohne Probanden angefertigt, bei denen nur das Phosphor-Phantom in der Kopfspule lag. Die Gesamtuntersuchungszeit betrug in etwa 1 Stunde 30 Minuten.

## **4.9.2 Datenauswertung**

### **Protonen-Spektroskopie**

Die Protonenspektren wurde mithilfe des kommerziellen Softwaretools LCModel (Provencher, 1993) ausgewertet (<http://s-provencher.com/lcmodel.shtml>). Die Werte der Cramer-Rao-Schranke (%Standardabweichung, %SD) dienten zur Erkennung und Aussortierung von Daten niedriger Qualität. Nur Spektren mit einer prozentualen Standardabweichung für Cr und Cho

geringer als 20 % wurden für die weitere Analyse verwendet. Glutamat- und Inositol-Peaks mit einer %SD > 40 % wurden verworfen.



**Bild 11**

Ausgabe des LCMoDel-Programms mit Kurven-Fit und Konzentrationsangaben

Um absolute Konzentrationswerte zu bestimmen, benötigt das LCMoDel-Programm als Eingabe für jedes Voxel zwei Spektroskopie-Daten: das Wasser-unterdrückte Spektrum und das im selben Messdurchgang akquirierte Spektrum ohne Wasserunterdrückung. Für die Berechnung korrekter Metabolitenkonzentrationen ist die Kenntnis sowohl der Wasserkonzentration (WCONC) im Gewebe als auch der unterschiedlichen Relaxationszeiten T1 und T2 des Gewebswassers und der Metabolite wichtig. Die output-Daten von LCMoDel (Bild 11) beruhen auf einem default-Wert der Gewebswasser-Konzentration von WCONC= 35 880 mmol/kg. Da die Wasser-Protonen im Gewebe (Relaxationsfaktor  $R_{HW}$ ) wegen ihrer kürzeren T2-Zeit (Tabelle 2) wesentlich schneller relaxieren als die Protonen der Metaboliten (Relaxationsfaktor  $R_{HM}$ ), ist im Programm ein default-Wert von 0.7 als Verhältnis von  $R_{HW}$  zu  $R_{HM}$  angesetzt. Diese beiden pauschalen Korrekturen sind jedoch sehr ungenau. Sie sind für eine TE-Zeit von 30 ms berechnet und berücksichtigen weder die Unterschiede der Relaxationszeiten verschiedener Metabolite noch die variierenden Anteile von GM, WS und

CSF in verschiedenen Voxeln. Daher wurden in unserer Studie mithilfe der Segmentierungsdaten für jedes Auswertungs-VOI individuell für jeden Probanden die WCONC-Werte und für jeden Metaboliten die zugehörigen  $R_{HW}$ - und  $R_{HM}$ -Werte bestimmt. Die Konzentration  $C_{Voxel}^{HM}$  von Protonen(H)-Metabolit M pro Voxelvolumen ergab sich durch folgende Rechnung:

$$C_{Voxel}^{HM} = LCM_{output} \frac{R_{HW}}{R_{HM}} \cdot \frac{1}{0.7} \cdot \frac{WCONC_{Voxel}}{35800}$$

Die Relaxationsfaktoren  $R_H$  für Protonen (H) wurden mithilfe der folgenden Gleichung für Doppel-Spin-Echo-Sequenzen berechnet (Mills et al., 1987):

$$R_H = \exp\left(-\frac{TE}{T2}\right) \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{TR}{T1}\right) + 2 \exp\left(\left[\left(\frac{TE}{2}\right) - TR\right]/T1\right) - 2 \exp\left(\left[\left(\frac{3TE}{2}\right) - TR\right]/T1\right) \right\}$$

Die benötigten T1- und T2-Werte für die verschiedenen Metaboliten (Tabelle 2) wurden durch Mittelung aus mehreren Literaturangaben bestimmt (Bojorquez et al., 2017; Choi et al., 2006; Ethofer et al., 2003; Ganji et al., 2012; Kirov et al., 2010; Li et al., 2008; Lu et al., 2005; Mlynárik et al., 2001; Stanisiz et al., 2005; Träber et al., 2004; Tsai et al., 2007; Wansapura et al., 1999; Wyss et al., 2018; Zaaaroui et al., 2007). Da sich die Relaxationszeiten in den Gewebs-Kompartimenten ( $K = GS, WS, CSF$ ) unterscheiden, gehen auch die verschiedenen Wasserfraktionen  $f_K$  in die Berechnung der Relaxationsfaktoren eines Metaboliten M bzw. des Gewebswassers W ein:

$$R_{HM} = f_{GS} \cdot R_{M\_GS} + f_{WS} \cdot R_{M\_WS} \quad \text{bzw.}$$

$$R_{HW} = f_{GS} \cdot R_{W\_GS} + f_{WS} \cdot R_{W\_WS} + f_{CSF} \cdot R_{W\_CSF}$$

Schließlich wurden endgültige Konzentrationswerte  $C_{Hirn}^{HM}$  in millimol (mMol) pro Liter Hirnmasse errechnet, indem alle Metabolitenwerte um die den Segmentierungsmaps entnommenen Liquorfraktionen ( $f_{CSF}$ ) eines jeden Spektroskopievoxels korrigiert wurden:

$$C_{Hirn}^{HM} = \frac{C_{Voxel}^{HM}}{(1 - f_{CSF})}$$

| T1 (ms) | NAA  | Cr   | Cho  | ml   | Glx  | Gewebwasser | CSF  |
|---------|------|------|------|------|------|-------------|------|
| WM      | 1400 | 1300 | 1100 | 1000 | 1100 | 1000        | 4000 |
| GM      | 1500 | 1400 | 1300 | 1000 | 1100 | 1500        | 4000 |

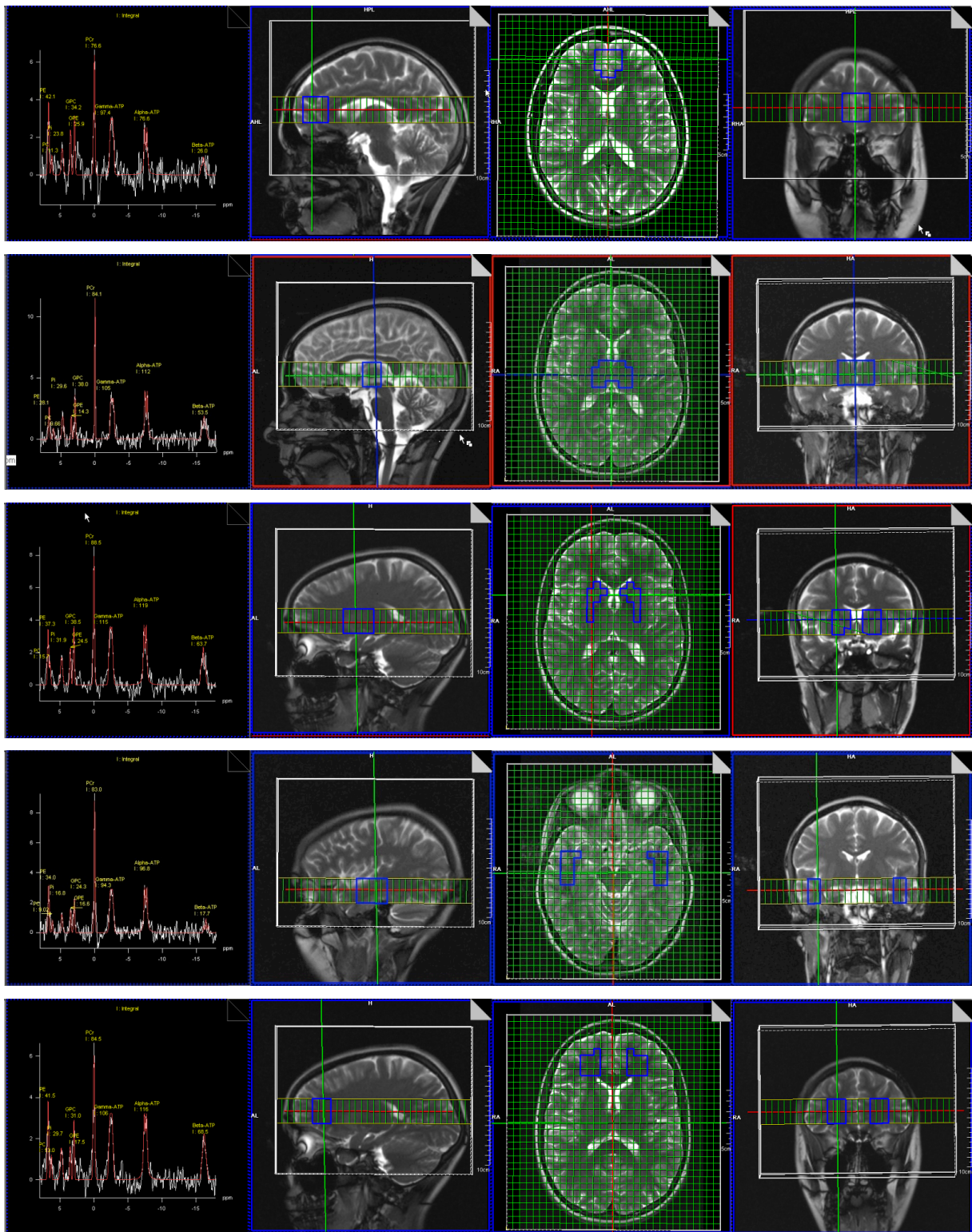
| T2 (ms) | NAA | Cr  | Cho | ml  | Glx | Gewebwasser | CSF  |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|------|
| WM      | 280 | 150 | 200 | 200 | 180 | 75          | 1500 |
| GM      | 250 | 150 | 230 | 200 | 180 | 95          | 1500 |

## Tabelle 2

T1- und T2-Werte, die für die Relaxationskorrektur der Protonen-Metaboliten verwendet wurden

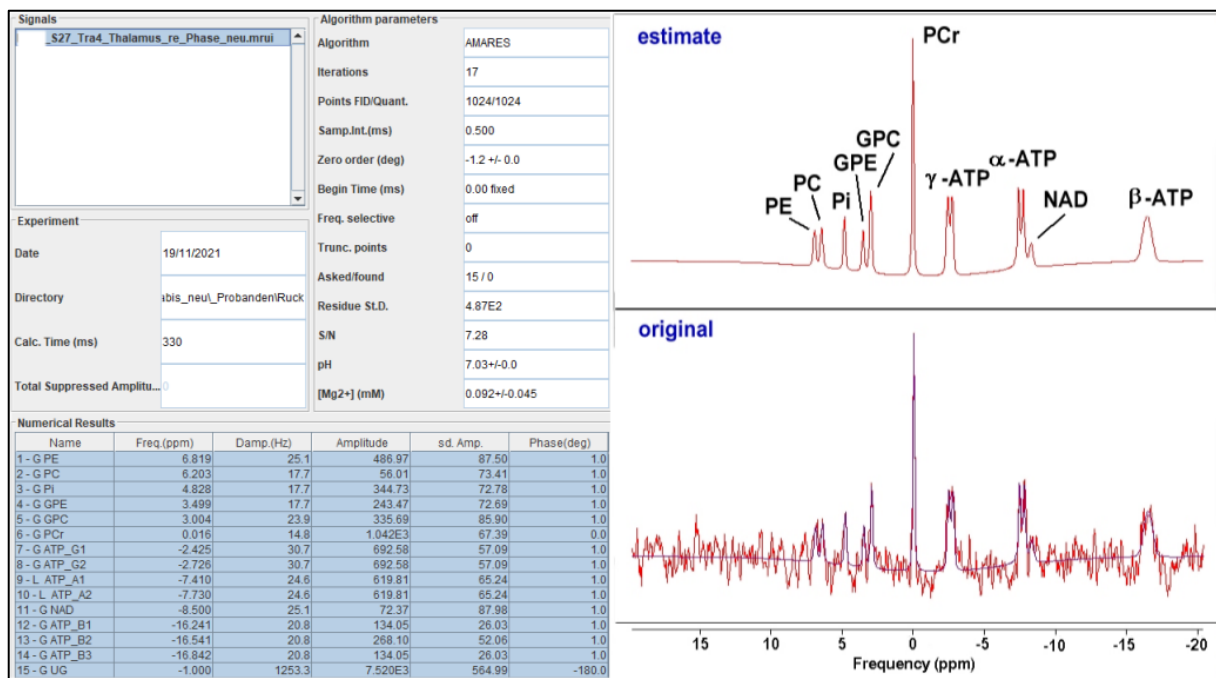
## Phosphor-Spektroskopie

Die Phosphor-CSI Daten wurden auf eine Leonardo-Workstation transferiert (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und auf ein 32x32x8 Gitter interpoliert, was eine Serie aus 8 axialen Schichten mit einer Schichtdicke von 25 mm Schichtdicke ergab (Einzelvoxelgröße  $6.3 \times 6.3 \times 25 \text{ mm}^3 = 1 \text{ ml}$ ). Diesen Schichten wurden als anatomische Referenz die in derselben Orientierung gemessenen T2-gewichteten Schichten unterlegt. Die anatomischen Zielvolumina (VOI, volume of interest) für die Spektrenanalyse wurden durch die Selektierung der entsprechenden Voxel in dem Gitter definiert (Bild 12). Weiterhin wurde bei Bedarf eine Gitterverschiebung innerhalb der Axialebene und in Kopf-Fuß-Richtung vorgenommen, um eine optimale Eingrenzung der VOI anhand der unterlegten anatomischen Bilder zu erreichen. 9 verschiedene VOI wurden so für jeden Probanden bestimmt, ein VOI in der frontalen grauen Substanz (FGS), ein VOI jeweils in der frontalen weißen Substanz links (l\_FWS) und rechts (r\_FWS), analog im Thalamus (l\_TH und r\_TH), in den Basalganglien (l\_BG und r\_BG) und der Temporalregion (l\_TL und r\_TL). Die mittlere Größe der VOI betrug entsprechend 16 ml, 10 ml, 11 ml, 11 ml und 12 ml. Für die Zielregionen FGS, r\_FWS, r\_TH und r\_TL wurde eine möglichst deckungsgleiche Positionierung der Phosphor-VOI und der Protonen-VOI angestrebt.



**Bild 12**

Platzierung der VOI für die P-Spektroskopie in den Regionen FGS, TH, BG, TL und FWS. Auswahl des Zielvolumens der  $^{31}\text{P}$ -Spektroskopie mit der Scanner-Software (Siemens Leonardo Workstation)



**Bild 13**

Ergebnisse des jMRUI-Programms nach Anwendung des AMARES-Algorithmus.

Die quantitativen Analysen der  $^{31}\text{P}$ -Spektren wurden mithilfe des frei verfügbaren jMRUI-Softwaretools (Java-based Magnetic Resonance User Interface, Version 5.1) durchgeführt (Bild 13). Die an der Leonardo-Workstation bearbeiteten Spektroskopie-Daten wurden im .rda-Format exportiert und auf einer Linux-Workstation in jMRUI importiert. Für die Quantifizierung in jMRUI wurde der AMARES-Algorithmus (Vanhamme et al., 1997) genutzt, der die Spektren mit einer Modellfunktion aus frei wählbaren einzelnen Linien anpasst (fittet). Die Modellfunktion beinhaltete 14 Resonanzen für die Metaboliten PE, PC, Pi, GPE, GPC, PCr, ATP, NAD und eine zusätzliche breite makromolekulare Komponente, um die Basislinie des Spektrums zu berücksichtigen. ATP wird durch insgesamt 7 Peaks repräsentiert: Ein Dublett für das  $\gamma$ -ATP, ein Dublett für das  $\alpha$ -ATP und ein Triplett für das  $\beta$ -ATP. Um den Fit-Prozess zu verbessern, wurden einschränkende Bedingungen (prior knowledge) für die Frequenz der Linien, die Dämpfung (Linienbreite), Kopplungskonstanten und Amplitudenverhältnisse festgelegt. Die von AMARES ausgegebenen Integral-Werte der Peaks sind proportional zu der korrespondierenden Metabolitenkonzentration.

Der AMARES-Algorithmus verwendet die Cramer-Rao-Ungleichungswerte (sd.amp) als Fehlerabschätzungen für alle Linien des Spektrums. PCr-Signale wiesen immer relative Fehlerwerte geringer als 20 % auf, wohingegen schwache Signale, wie z.B. NAD und PC, niedrige Intensitäten und hohe Fehlerraten hatten. Peaks mit einem relativen Fehlerwert  $>1$  wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Weitere Nachbearbeitungsschritte waren notwendig, um eine Absolutquantifizierung der Metaboliten zu erhalten:

Zuerst wurden die Signalamplituden Relaxations-korrigiert. Die Korrekturfaktoren ( $R_P$ ) wurden mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

$$S_P = S_{P0} \cdot R_P$$

mit

$$R_P = \frac{\sin(x) \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right\}}{\left\{ 1 - \cos(x) \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right\}} \quad x=60^\circ, TR= 1200 \text{ ms.}$$

$S_P$  stellt dabei die gemessene Phosphor-Peakintensität dar, die durch T1-Relaxation (Tabelle 3) bei reduziertem Flipwinkel ( $x < 90^\circ$ ) verringert ist.  $S_{P0}$  ist der gesuchte Signalwert, der dem Absolutwert der Metabolitenkonzentration entspricht. Die T2-Relaxation spielt aufgrund der gewählten FID-CSI-Sequenz mit minimaler TE-Zeit (2.3 ms) keine Rolle.

Zur Kalibrierung der Phosphor-Signale mit dem Phosphor-Phantom wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Bei der Phantom-Ersetzungsmethode (Michaelis et al., 1993) wurde die Referenzmessung des Phantoms unabhängig von der Probanden-Messung in einer eigenen Untersuchung durchgeführt, bei der nur das Phantom anstelle des Kopfes in der Spule lag. Die variierende Spulenlast aufgrund der verschiedenen Kopfgrößen der Probanden sowie die Lastunterschiede zwischen Phantom und Probanden wurden mithilfe der Radiofrequenz-Transmitter-Amplitude (TRA) ermittelt, die für eine  $90^\circ$ -Anregung notwendig ist. Zusätzlich kam auch das alternative Kalibrierungs-Verfahren zum Einsatz, bei dem das Phantom während der Probanden-Messung neben dem Kopf lag. Der enge Raum neben dem Probanden-Kopf in der Kopfspule und die exzentrische Position des Phantoms führten zu Artefakten und erheblich schwankenden Referenz-Signalwerten. Es zeigte sich jedoch eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Kalibrierungsverfahren, wenn bei der zweiten Methode nicht die individuellen Phantomsignale der Probanden verwendet wurden, sondern der über alle Probandenuntersuchungen gemittelte Durchschnitt der Spulenlast-korrigierten Phantomsignale. Die Kalibrierung mit der Phantom-Referenz erfolgte nach der Beziehung:

$$C_{Voxel}^{P_M} = C_{Voxel}^{P_{Ref}} \cdot \frac{S_{P_M}}{S_{P_{Rref}}} \cdot \frac{R_{P_{Ref}}}{R_{P_M}} \cdot \frac{TRA_M}{TRA_{Ref}} \cdot \frac{V_{Ref}}{V_M}$$

$C_{Voxel}^{P\_M}$  ist die gesuchte Konzentration von Phosphor-Metabolit M pro ml Voxelvolumen,  $C_{Voxel}^{P\_Ref}$  gibt die Phosphor-Konzentration im Phantom (75 mmol/l) an.  $S_{P\_Ref}$  und  $S_{P\_M}$  sind die gemessenen Signalwerte des Phantoms bzw. des Metaboliten M. Unterschiede der Relaxationszeiten und der Spulenbeladung sind in den Faktoren  $R_P$  und  $TRA$  enthalten,  $V$  stellt das Voxelvolumen dar.

Aus den volumenbezogenen Metabolitenwerten  $C_{Voxel}^{P\_M}$  lassen sich durch Berücksichtigung des Liquoranteils ( $f_{CSF}$ ) Konzentrationen pro Liter Hirnsubstanz errechnen:

$$C_{Hirn}^{P\_M} = \frac{C_{Voxel}^{P\_M}}{(1 - f_{CSF})}$$

|                      | PE   | PC   | Pi   | GPE  | GPC  | PCr  | ATP  | NAD  | Phantom |
|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|
| <b>TI (ms)</b>       | 4000 | 3300 | 2200 | 4000 | 2700 | 3500 | 1000 | 1000 | 4000    |
| <b>R<sub>P</sub></b> | 0.36 | 0.4  | 0.51 | 0.36 | 0.46 | 0.39 | 0.71 | 0.71 | 0.36    |

**Tabelle 3**

T1-Werte und berechnete Relaxationsfaktoren ( $R_P$ ) der Phosphor-Metaboliten

### 4.9.3 Parameterberechnungen

Der intrazelluläre pH-Wert wurde errechnet anhand der Chemical-Shift-Differenz  $\delta$  zwischen dem Peak des anorganischen Phosphats (Pi) und dem PCr-Peak nachfolgender Gleichung (Lanza et al., 2011; Rata et al., 2014; Smith et al., 1990) :

$$pH = 6.75 + \log_{10} \left[ \frac{3.27 - \delta}{\delta - 5.63} \right].$$

Die Konzentration des freien zytosolischen  $Mg^{2+}$  wurde abgeschätzt aus der Chemical-Shift-Differenz  $\delta_\beta$  zwischen dem  $\beta$ -ATP- und dem PCr-Peak unter Verwendung folgender Formel (Barker et al., 1999; Halvorson et al., 1992) :

$$pMg = 4.24 - \log_{10} \left[ \frac{(\delta_\beta + 18.58)^{0.42}}{(-15.74 - \delta_\beta)^{0.84}} \right].$$

Die Beziehung zwischen der  $Mg^{2+}$ -Konzentration und dem pMg-Wert lautet:

$$[Mg^{2+}] = -\log_{10} (pMg)$$



#### 4.9.4 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Version 27) erstellt. Für alle Metaboliten sowie für pH und  $Mg^{2+}$  wurden Durchschnittswerte in den drei Probandengruppen bestimmt. Ziel der statistischen Tests war es, signifikante Unterschiede der metabolischen Werte zwischen den drei Gruppen nachzuweisen. Für die P-MRS wurden die Metabolitenwerte von PME, Pi, PDE, PCr, ATP, pH und Mg als abhängige Variablen festgelegt. NAD wurde von den statistischen Analysen ausgeschlossen, weil der kleine Peak nur sehr schwer zu identifizieren war und der NAD-Wert daher eine große Fehlerbreite hatte. Da die P-Spektroskopie Werte aus identischen Regionen sowohl der rechten als auch der linken Hirnhemisphäre lieferte, war für die Phosphor-Metaboliten auch ein Seitenvergleich der Konzentrationswerte möglich.

H-Spektren dagegen wurden nur in der rechten Hemisphäre gemessen. Für die H-MRS wurden die Metabolitenwerte von tNAA, tCr und tCho als abhängige Variablen in der MANOVA gewählt. ml und Glx waren mit der verwendeten Sequenz nur unzureichend zu detektieren. Aufgrund der schwachen Signale und der großen Fehlerbreite wurden sie von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

##### Gruppenvergleich

Konzentrationsdifferenzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden als Relativwerte in % angegeben. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Nicht-Konsumenten ergaben sich aus  $\Delta_{mw} = \frac{(mN-wN)}{wN}$ , Unterschiede zwischen männlichen Cannabiskonsumenten und männlichen Nicht-Konsumenten errechneten sich aus  $\Delta_{KN} = \frac{(mK-mN)}{mN}$ .

Die statistische Analyse basierte auf dem allgemeinen linearen Modell unter Verwendung der multivariaten Varianzanalyse (MANOVA). Als abhängige Variablen wurden die aus den Spektren ermittelten Metabolitenwerte festgelegt, während die Zugehörigkeit zu einer der drei Gruppen (wN, mN, und mK) als ein fester Faktor angesehen wurde. Die statistische Testung erfolgte in drei Stufen:

1. Omnibus-Test (overall effects)

Um den globalen Effekt der Gruppenzugehörigkeit auf die Gesamtheit der eingeschlossenen Metabolitenwerte zu untersuchen, wurde der multivariate Wilks-Lambda Test verwendet. Dieser Test prüft, ob es überhaupt einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen gibt, wobei alle abhängigen Variablen in Kombination betrachtet und nicht voneinander separiert werden.

2. Test der Zwischensubjekt-Effekte

Für jede abhängige Variable folgte eine einzelne univariate Varianzanalyse (ANOVA), um festzustellen, für welche Metaboliten sich signifikante Gruppenunterschiede ergeben.

### 3. Paarweise Vergleiche

Für jede in Punkt 2. signifikant gewordene ANOVA wurde geprüft, zwischen welchen der 3 Gruppen die Unterschiede auftraten, indem für den entsprechenden Metaboliten paarweise Vergleiche zwischen jeweils 2 Gruppen mithilfe des Post-Hoc-Scheffé-Tests durchgeführt wurden.

Aufgrund der gleichzeitigen (multiplen) statistischen Testung für mehrere Hirnregionen am selben Probandenkollektiv ergibt sich das Problem der Alpha-Fehler-Kumulierung. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit steigt, gefundene Gruppenunterschiede fälschlich als signifikant einzustufen. Um diesen Fehler zu vermeiden, wurde die Signifikanzschwelle durch die Bonferroni-Korrektur angepasst. Die Auswertung der Phosphorspektren umfasste 9 Hirnregionen, deswegen wurde  $p < 0.0056$  ( $=0.05/9$ ) als statistisch signifikant betrachtet. Protonenspektren wurden in 4 Hirnregionen gemessen, daraus ergab sich ein korrigiertes Signifikanzniveau von  $p < 0.0125$  ( $= 0.05/4$ ).

## Seitenvergleich

Seitenbezogene Metabolitenunterschiede wurden als relative prozentuale Werte anhand der folgenden Gleichung errechnet:  $\Delta r_l = \frac{(\text{rechts}-\text{links})}{\text{links}}$ .

Für die statistische Auswertung der Seitenunterschiede wurde die multivariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen (RM MANOVA) verwendet. Um hemisphärische Effekte zu untersuchen, wurden die Metabolitenwerte der linken und rechten Hemisphäre als Innersubjektfaktoren, die Gruppenzugehörigkeit als Zwischensubjektfaktor festgelegt. Auch hier bestand der Test aus drei Stufen:

#### 1. Omnibus-Test (overall effects)

Um einen globalen Seitenunterschied für die Gesamtheit der eingeschlossenen Metabolitenwerte zu untersuchen, wurde der multivariate Wilks-Lambda Test verwendet. Dieser Test prüft, ob es einen signifikanten Seitenunterschied gibt, wenn pro Hemisphäre alle Metabolitenwerte für alle 3 Gruppen in Kombination betrachtet werden.

#### 2. Gruppenweiser Seitenvergleich

Für jede der drei Probandengruppe folgte eine einzelne RM MANOVA, um globale signifikante Seitenunterschiede innerhalb der Gruppe festzustellen.

#### 3. Paarweise Metabolitenvergleiche

Zusätzlich wurden innerhalb der Gruppen paarweise Seitenvergleiche mit gepaartem t-Test für jeden einzelnen Metaboliten durchgeführt, um zu prüfen, welche Metaboliten signifikante Seitenunterschiede aufweisen.

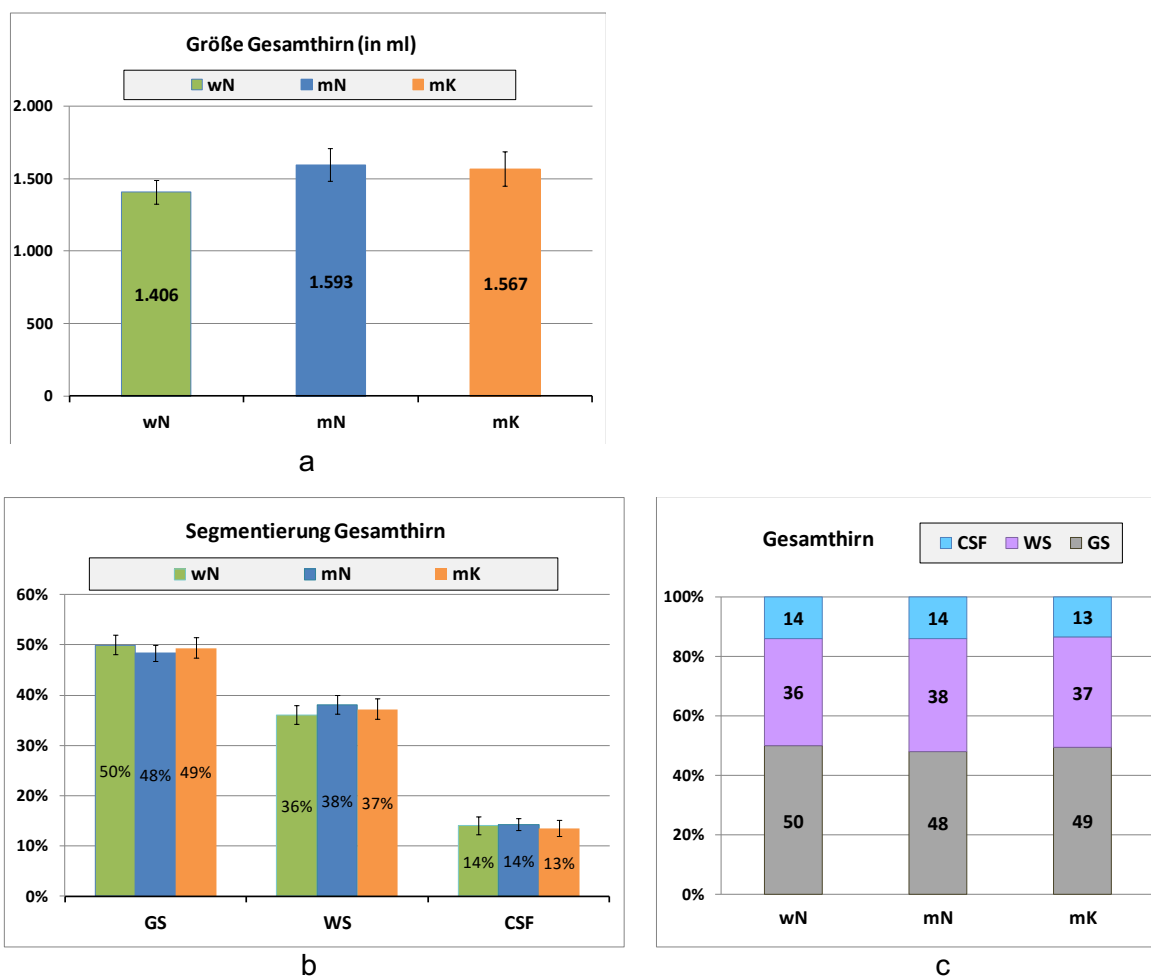
Da insgesamt 4 bilaterale Vergleiche durchgeführt wurden (Thalamus, Basalganglien, Temporallappen und frontale weiße Substanz), belief sich die Signifikanzschwelle nach der Bonferroni-Korrektur auf  $p < 0.0125$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Segmentierungs-Ergebnisse

Die Kenntnis der Volumenanteile von GS, WS und CSF (Segmentierung) in allen untersuchten Regionen des Gehirns ist von großer Bedeutung für die Bestimmung absoluter Metabolitenkonzentrationen. Benötigt wird die Segmentierung insbesondere für die genaue Relaxationskorrektur, da T1 und T2 in den drei Gewebsfraktionen unterschiedlich sind. Zusätzlich muss bei der H-Spektroskopie auch die Konzentration des MR-sichtbaren Wassers (WCONC) in allen Untersuchungsregionen bekannt sein, um eine korrekte Kalibrierung der Signal-Intensitäten zu ermöglichen.

Bild 14 bis Bild 17 zeigen die Ergebnisse der Hirn-Segmentierung, die aus den zugrundeliegenden Daten der T1 MPRAGE Sequenz mithilfe des Softwaretools SPM berechnet wurden.



**Bild 14**

Größe des Gesamthirns (a) und Segmentierung in GS, WS, CSF (b, c)

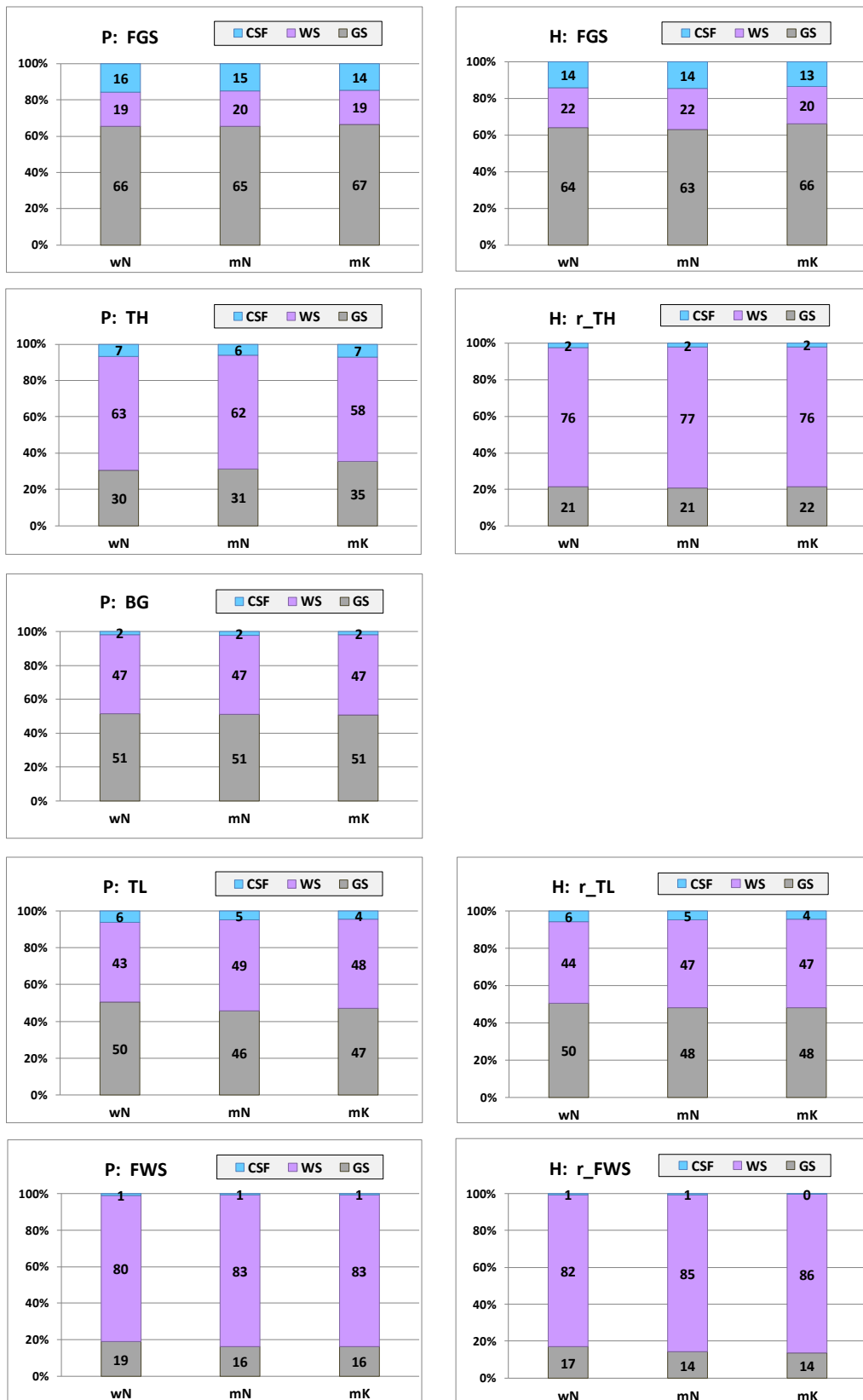
Das mittlere Gesamtvolumen des Gehirns lag bei den weiblichen Studienteilnehmern (wN) ca. 12% niedriger als bei den männlichen (Bild 14a). Zwischen den beiden männlichen Probandengruppen der Nicht-Konsumenten (mN) und der Konsumenten (mK) gab es keinen signifikanten Unterschied bei der Größe des Gesamthirns. Die Segmentierung des **gesamten Gehirns** (Bild 14b,c) liefert die Anteile von GS, WS und CSF für die jeweilige Probandengruppe. Es zeigten sich nur geringe, aber teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei weiblichen Nicht-Konsumenten (wN) war der Anteil der grauen Substanz am gesamten Hirnvolumen um 2 Prozentpunkte höher ( $p = 0.003$ ), der Anteil der weißen Substanz um 2 Prozentpunkte geringer ( $p=0.016$ ) als bei männlichen Nicht-Konsumenten (mN). Männliche Cannabiskonsumenten (mK) wiederum wiesen einen um 1% höheren ( $p=0.021$ ) GS-Anteil und einen entsprechend niedrigeren CSF-Anteil auf als die mN-Gruppe.

Bild 15 und 16 zeigen die Anteile von GS, WS und CSF in den **für die Spektroskopie gewählten Ziel-VOI** für die drei Probandengruppen.

Die Zielvolumina für die H-Spektroskopie und P-Spektroskopie sind nicht exakt deckungsgleich, weil die H-Spektroskopie als Einzelvolumen-Technik nur eine quaderförmige Selektion der VOI erlaubte, während die P-VOI wegen der interpolierten Spektrenmatrix wesentlich genauer abgrenzbar waren. Daher werden die Segmentierungs-Ergebnisse in Bild 15/16 für H-VOI (rechte Spalte) und P-VOI (linke Spalte) getrennt dargestellt. Dabei fällt auf, dass die H-VOI im Thalamus deutlich mehr WS und weniger GS enthalten als die P-VOI. In den übrigen Regionen sind die Segmentierungs-Unterschiede zwischen H-VOI und P-VOI gering.

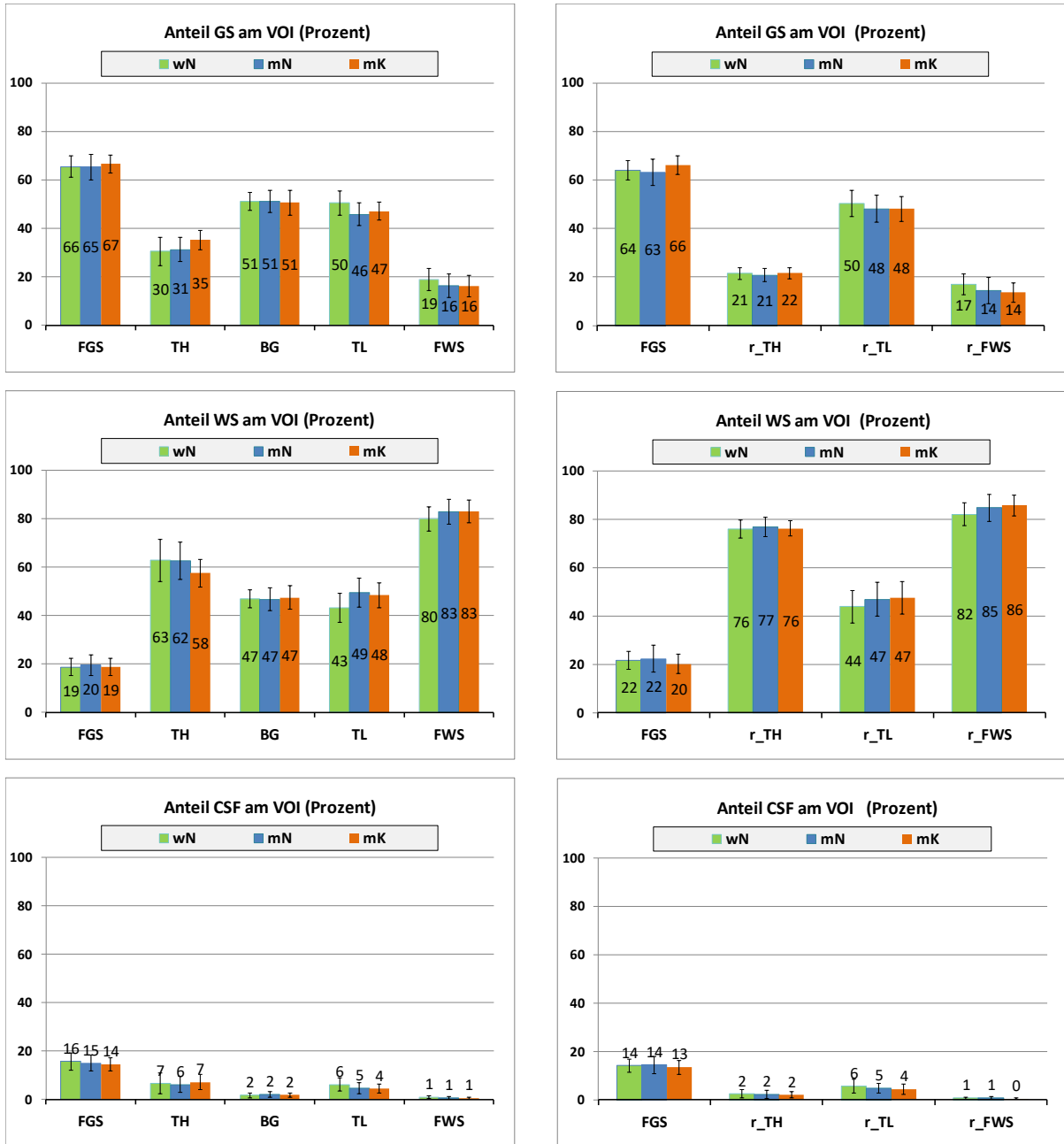
Im Frontallappen bestätigt die Segmentierung die anhand der T2-Bilder visuell gewählte Platzierung der Zielvolumina: FGS-VOI enthalten überwiegend graue Substanz (63-67 %), FWS-VOI zu einem Großteil weiße Substanz (80-86 %).

Während der Thalamus zu überwiegendem Anteil aus weißer Substanz besteht (63-77 %) und einer geringeren Fraktion grauer Substanz (21-35 %) sowie einem kleinen Anteil Liquor (2-7 %), setzt sich der Temporallappen in unserem Zielvolumen ungefähr jeweils zur Hälfte aus grauer Substanz (47-50 %) und aus weißer Substanz (44-49 %) sowie einem kleinen Anteil Liquor (4-6%) zusammen. Generell fanden sich in den Segmentierungs-Daten nur geringe Gruppenunterschiede zwischen wN, mN und mK.



**Bild 15**

Vergleich der VOI von P- und H-Spektroskopie für die 3 Probanden-Gruppen.  
 Links Spalte: Segmentierung der Phosphor-VOI (Mittelwert rechts- und linkshemisphärisch)  
 Rechte Spalte: Segmentierung der Protonen-VOI (Mittelwerte)



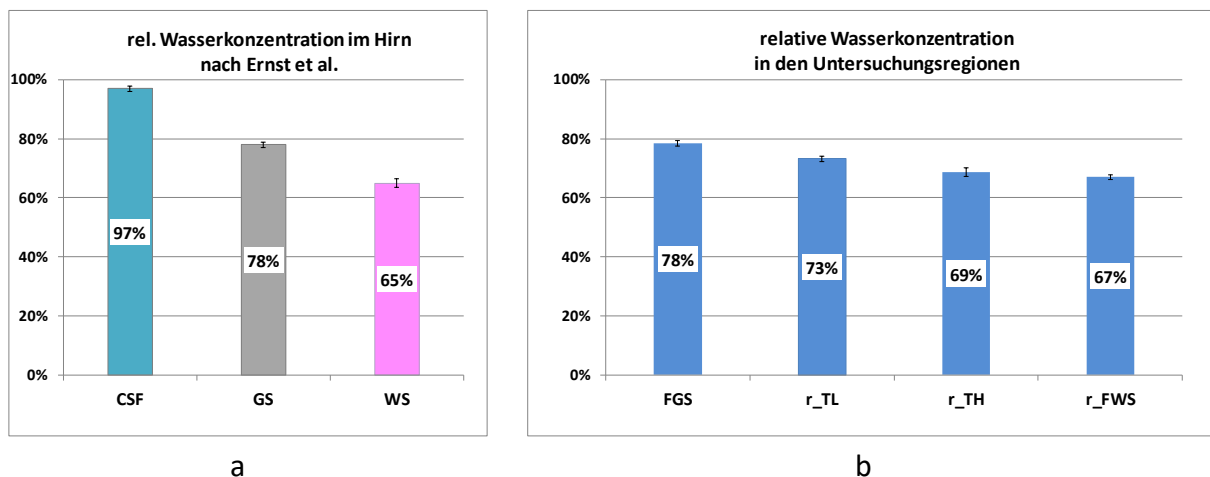
**Bild 16**

Vergleich der VOI von P- und H-Spektroskopie für die 3 Probanden-Gruppen.  
 Linke Spalte: Segmentierung der Phosphor-VOI (Mittelwert rechts- und linkshemisphärisch)  
 Rechte Spalte: Segmentierung der Protonen-VOI (Mittelwerte)

Bild 17a zeigt die relative Wasserkonzentration (WCONC) in den Gewebefractionen GS, WS und CSF, wie sie von Ernst et.al. angegeben wurde. Erwartungsgemäß sind die Werte in der

Liquorfraktion am höchsten (97%), gefolgt von der grauen Substanz (78%) und der weißen Substanz (65%).

Aus diesen Werten und den Ergebnissen der Segmentierung wurden die mittleren Wasserkonzentrationen für alle interessierenden Regionen berechnet. Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probandengruppen. In Bild 17b sind die über die drei Gruppen gemittelten WCONC-Werte für die Zielvolumina der H-Spektren dargestellt. Die frontale graue Substanz enthält den größten relativen Wasseranteil (78%), gefolgt von der temporalen Region (73%), dem Thalamus (69%) und der frontalen weißen Substanz (67%).



**Bild 17**

Relative Wasserkonzentrationen in den unterschiedlichen Gewebsfraktionen des Gehirns (a) sowie in den unterschiedlichen Untersuchungsregionen der H-Spektroskopie, gemittelt über die 3 Probandengruppen (b).

## 5.2 Phosphorspektroskopie-Ergebnisse

Die Statistikanalyse mithilfe der MANOVA zeigte generell signifikante Gruppenunterschiede der Metabolitenkonzentrationen in der frontalen grauen Substanz ( $p=0.008$ ), im rechten Thalamus ( $p=0.007$ ) und in der linken frontalen weißen Substanz ( $p=0.038$ ). Diese Ergebnisse waren nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen jedoch nicht mehr statistisch signifikant. Nichtsdestotrotz zeigen die Daten bemerkenswerte Tendenzen beim Vergleich zwischen den Gruppen mN und wN sowie auch zwischen mN und mK.



### 5.2.1 Unterschiede männlich-weiblich

Die ATP-Werte bei mN waren in fast allen Regionen geringer als bei den wN, am deutlichsten im Thalamusbereich ( $\Delta_{mw} = -9\%$ ) (Bild 18). Die MANOVA offenbarte signifikant erniedrigte Werte für PME ( $p = 0.014$ ) und PCr ( $p = 0.018$ ) (Tabelle 4) im rechten Thalamus (-13 % bzw. -15 %) sowie erhöhte Werte für PCr in der linken frontalen weißen Substanz (+12 %), wenngleich diese Ergebnisse der Bonferroni-Korrektur nicht standhalten konnten.

Männer wiesen tendenziell geringere PME aber höhere PDE-Werte in den meisten Regionen auf. Im Frontallappen und Thalamus stellte sich Pi erniedrigt dar, während der pH in diesen beiden Regionen erhöht war.

### 5.2.2 Unterschiede Konsumenten-Nicht-Konsumenten

In der frontalen grauen und weißen Substanz, im Temporallappen wie auch in den Basalganglien waren die Konzentrationen der meisten Metabolitenwerte bei männlichen Konsumenten niedriger als in der männlichen Kontrollgruppe (Bild 19). In der Thalamusregion waren die Unterschiede diskreter und nicht einheitlich. Bemerkenswert ist, dass Cannabiskonsumenten konsistent reduzierte ATP- und Pi-Spiegel in allen untersuchten Regionen aufwiesen (Bild 19). Die PDE-Werte erschienen bei mK allgemein geringer, mit Ausnahme des Thalamus. Der pH war vor allem in der frontalen grauen Substanz deutlich erniedrigt. Keines dieser Ergebnisse erreichte jedoch eine statistische Signifikanz. In den linken Basalganglien waren die PCr-Werte in der Konsumenten-Gruppe um 10 % niedriger ( $p = 0.015$ ) als in der Kontrollgruppe, aber auch dieses Ergebnis war nach der Bonferroni-Korrektur nicht mehr statistisch signifikant.

### 5.2.3 Seitenunterschiede innerhalb der Gruppen

Die globale statistische Analyse unter Einschluss aller drei Gruppen mithilfe der RM MANOVA zeigte generelle hemisphärische Asymmetrien der Metaboliten im Thalamus ( $p=0.000$ ), in den Basalganglien ( $p=0.003$ ) und in der frontalen weißen Substanz ( $p=0.002$ ) (Tabelle 5), die sich auch nach der Bonferroni-Korrektur als statistisch signifikant erwiesen. Beim separaten Vergleich der Hemisphären innerhalb jeder Gruppe fielen signifikante Seitendifferenzen jedoch nur im Thalamus bei mN ( $p=0.000$ ) und mK ( $p=0.004$ ) auf,  $\Delta_{rl}$  erwies sich hierbei für alle Metaboliten als negativ (Bild 20), d.h. alle Konzentrationswerte waren im rechten Thalamus geringer als im linken.

Betrachtet man die einzelnen Metaboliten, fiel insbesondere auf, dass PCr und Pi generell auf der rechten Seite niedrigere Werte als auf der linken Seite aufwiesen (Bild 20). Im Gegensatz dazu war die ATP-Konzentration in der rechten frontalen weißen Substanz signifikant höher als in der linken.

PME tendierte zu niedrigeren Werten auf der rechten Seite im Thalamus und in den Basalganglien, wohingegen PDE sich in der rechten Hemisphäre, außer im Thalamus, bemerkenswert erhöht darstellte.

Zusammenfassend konnten in allen drei Gruppen hemisphärische Unterschiede vergleichbaren Ausmaßes festgestellt werden. Für PCr waren diese Unterschiede jedoch in der mN Gruppe deutlich höher als in der wN und mK Gruppe, am stärksten wurde dies in der Basalganglienregion sichtbar ( $\Delta rI = -17\%$ ,  $p=0.000$  für mN).

| FGS | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-----|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|     | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = <b>0.008</b>                        |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW ± SD |  |
| PME | 0.574   | 2.68 ± 0.43          | -4% <b>0.740</b>         | 2.58 ± 0.46          | -1% <b>0.978</b>         | 2.55 ± 0.47          |  |
| Pi  | <b>0.007</b>  | 0.68 ± 0.21          | -16% <b>0.170</b>        | 0.57 ± 0.17          | -11% <b>0.444</b>        | 0.51 ± 0.19          |  |
| PDE | 0.067   | 2.85 ± 0.59          | 7% <b>0.483</b>          | 3.05 ± 0.47          | -11% <b>0.067</b>        | 2.72 ± 0.57          |  |
| PCr | 0.589   | 3.59 ± 0.67          | -2% <b>0.905</b>         | 3.51 ± 0.53          | -3% <b>0.853</b>         | 3.42 ± 0.67          |  |
| ATP | <b>0.004</b>  | 3.07 ± 0.51          | -5% <b>0.667</b>         | 2.91 ± 0.52          | -12% <b>0.063</b>        | 2.57 ± 0.64          |  |
| NAD |   | 0.37 ± 0.11          |                          | 0.35 ± 0.13          |                          | 0.34 ± 0.12          |  |
| pH  | 0.137   | 6.98 ± 0.03          | 0.2% <b>0.280</b>        | 7.00 ± 0.03          | -0.2% <b>0.179</b>       | 6.98 ± 0.03          |  |
| Mg  | 0.074   | 0.11 ± 0.02          | -7% <b>0.229</b>         | 0.10 ± 0.01          | -1% <b>0.915</b>         | 0.10 ± 0.01          |  |

| r_TH | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|      | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = <b>0.007</b>                        |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=34)<br>MW ± SD |  |
| PME  | <b>0.010</b>  | 2.30 ± 0.33          | -15% <b>0.014</b>        | 1.96 ± 0.40          | 4% <b>0.680</b>          | 2.05 ± 0.39          |  |
| Pi   | 0.533   | 0.79 ± 0.19          | -5% <b>0.825</b>         | 0.75 ± 0.18          | -3% <b>0.892</b>         | 0.73 ± 0.24          |  |
| PDE  | 0.790   | 2.61 ± 0.46          | -2% <b>0.939</b>         | 2.56 ± 0.36          | 3% <b>0.790</b>          | 2.63 ± 0.39          |  |
| PCr  | <b>0.016</b>  | 3.70 ± 0.50          | -13% <b>0.018</b>        | 3.23 ± 0.52          | 5% <b>0.558</b>          | 3.38 ± 0.60          |  |
| ATP  | <b>0.015</b>  | 2.64 ± 0.51          | -9% <b>0.283</b>         | 2.39 ± 0.46          | -7% <b>0.431</b>         | 2.22 ± 0.58          |  |
| NAD  |   | 0.36 ± 0.15          |                          | 0.37 ± 0.10          |                          | 0.37 ± 0.11          |  |
| pH   | 0.254   | 6.98 ± 0.02          | 0.2% <b>0.264</b>        | 6.99 ± 0.02          | -0.1% <b>0.545</b>       | 6.99 ± 0.03          |  |
| Mg   | 0.157   | 0.10 ± 0.01          | 9% <b>0.163</b>          | 0.11 ± 0.02          | -5% <b>0.469</b>         | 0.10 ± 0.02          |  |

| l_TH | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|      | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = <b>0.391</b>                        |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=40)<br>MW ± SD |  |
| PME  | 0.062   | 2.32 ± 0.31          | -9% <b>0.151</b>         | 2.10 ± 0.39          | -1% <b>0.990</b>         | 2.09 ± 0.40          |  |
| Pi   | 0.643   | 0.84 ± 0.16          | -5% <b>0.799</b>         | 0.79 ± 0.16          | -1% <b>0.977</b>         | 0.78 ± 0.25          |  |
| PDE  | 0.610   | 2.63 ± 0.40          | -1% <b>0.967</b>         | 2.60 ± 0.43          | 4% <b>0.634</b>          | 2.70 ± 0.43          |  |
| PCr  | 0.196   | 3.75 ± 0.53          | -7% <b>0.335</b>         | 3.49 ± 0.51          | -1% <b>0.992</b>         | 3.48 ± 0.64          |  |
| ATP  | 0.131   | 2.66 ± 0.43          | -9% <b>0.391</b>         | 2.43 ± 0.46          | -3% <b>0.852</b>         | 2.35 ± 0.68          |  |
| NAD  |   | 0.39 ± 0.14          |                          | 0.34 ± 0.10          |                          | 0.35 ± 0.10          |  |
| pH   | 0.662   | 6.99 ± 0.02          | 0.0% <b>0.794</b>        | 6.99 ± 0.01          | 0.0% <b>0.987</b>        | 6.99 ± 0.03          |  |
| Mg   | 0.115   | 0.10 ± 0.01          | 5% <b>0.457</b>          | 0.11 ± 0.01          | -6% <b>0.117</b>         | 0.10 ± 0.01          |  |

|     | <b>Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)</b>                     |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-----|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|     | <b>Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.265</b>                        |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=40)<br>MW ± SD |  |
| PME | 0.842   | 2.17 ± 0.37          | 0% 0.994                 | 2.16 ± 0.39          | -2% 0.908                | 2.12 ± 0.31          |  |
| Pi  | 0.063   | 0.61 ± 0.18          | 3% 0.957                 | 0.63 ± 0.16          | -16% 0.099               | 0.53 ± 0.18          |  |
| PDE | 0.899   | 2.66 ± 0.40          | 1% 0.957                 | 2.70 ± 0.45          | -2% 0.901                | 2.65 ± 0.42          |  |
| PCr | 0.218   | 3.48 ± 0.45          | -7% 0.233                | 3.22 ± 0.54          | 2% 0.850                 | 3.30 ± 0.52          |  |
| ATP | 0.025   | 2.68 ± 0.44          | -2% 0.922                | 2.62 ± 0.47          | -10% 0.108               | 2.36 ± 0.54          |  |
| NAD |   | 0.33 ± 0.10          |                          | 0.35 ± 0.11          |                          | 0.37 ± 0.10          |  |
| pH  | 0.657   | 6.99 ± 0.03          | 0.0% 0.982               | 6.99 ± 0.02          | 0.1% 0.800               | 6.99 ± 0.04          |  |
| Mg  | 0.759   | 0.11 ± 0.01          | 1% 0.948                 | 0.11 ± 0.01          | -2% 0.760                | 0.11 ± 0.01          |  |

|     | <b>Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)</b>                     |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-----|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|     | <b>Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.213</b>                        |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=40)<br>MW ± SD |  |
| PME | 0.395   | 2.41 ± 0.41          | -5% 0.567                | 2.30 ± 0.30          | -1% 0.985                | 2.29 ± 0.34          |  |
| Pi  | 0.244   | 0.72 ± 0.22          | -3% 0.926                | 0.69 ± 0.19          | -9% 0.488                | 0.63 ± 0.21          |  |
| PDE | 0.569   | 2.42 ± 0.39          | 5% 0.613                 | 2.54 ± 0.44          | -3% 0.698                | 2.46 ± 0.41          |  |
| PCr | 0.015   | 3.68 ± 0.41          | 6% 0.398                 | 3.88 ± 0.53          | -10% 0.015               | 3.50 ± 0.55          |  |
| ATP | 0.157   | 2.69 ± 0.47          | -8% 0.365                | 2.49 ± 0.38          | -2% 0.928                | 2.44 ± 0.54          |  |
| NAD |   | 0.33 ± 0.10          |                          | 0.38 ± 0.13          |                          | 0.31 ± 0.10          |  |
| pH  | 0.499   | 7.00 ± 0.03          | 0.0% 0.958               | 7.00 ± 0.03          | -0.1% 0.710              | 6.99 ± 0.03          |  |
| Mg  | 0.870   | 0.11 ± 0.01          | 2% 0.884                 | 0.11 ± 0.02          | 0% 0.995                 | 0.11 ± 0.02          |  |

|     | <b>Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)</b>                     |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-----|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|     | <b>Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.070</b>                        |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|     | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW ± SD |  |
| PME | 0.150   | 2.03 ± 0.39          | 7% 0.502                 | 2.18 ± 0.47          | 4% 0.764                 | 2.25 ± 0.38          |  |
| Pi  | 0.277   | 0.59 ± 0.19          | -1% 0.981                | 0.58 ± 0.20          | -10% 0.453               | 0.53 ± 0.15          |  |
| PDE | 0.102   | 2.03 ± 0.54          | 16% 0.103                | 2.36 ± 0.52          | -7% 0.487                | 2.20 ± 0.51          |  |
| PCr | 0.338   | 3.50 ± 0.64          | 8% 0.461                 | 3.78 ± 0.92          | 0% 1.000                 | 3.79 ± 0.70          |  |
| ATP | 0.315   | 2.34 ± 0.47          | 0% 1.000                 | 2.34 ± 0.51          | -7% 0.423                | 2.18 ± 0.50          |  |
| NAD |   | 0.25 ± 0.10          |                          | 0.31 ± 0.11          |                          | 0.34 ± 0.11          |  |
| pH  | 0.776   | 7.01 ± 0.03          | 0.0% 1.000               | 7.00 ± 0.03          | -0.1% 0.825              | 7.00 ± 0.04          |  |
| Mg  | 0.289   | 0.12 ± 0.02          | -4% 0.656                | 0.11 ± 0.02          | -3% 0.823                | 0.11 ± 0.02          |  |

| I_TL | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|      | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.772                               |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW ± SD |  |
| PME  | 0.526   | 2.13 ± 0.40          | 0% 1.000                 | 2.13 ± 0.49          | 4% 0.631                 | 2.23 ± 0.31          |  |
| Pi   | 0.363   | 0.62 ± 0.20          | 7% 0.819                 | 0.67 ± 0.26          | -12% 0.366               | 0.59 ± 0.20          |  |
| PDE  | 0.516   | 1.90 ± 0.39          | 4% 0.798                 | 1.98 ± 0.38          | -6% 0.518                | 1.86 ± 0.43          |  |
| PCr  | 0.449   | 3.62 ± 0.60          | 8% 0.449                 | 3.91 ± 0.81          | -3% 0.792                | 3.78 ± 0.82          |  |
| ATP  | 0.662   | 2.34 ± 0.43          | -5% 0.734                | 2.23 ± 0.47          | 0% 1.000                 | 2.18 ± 0.52          |  |
| NAD  |   | 0.29 ± 0.11          |                          | 0.34 ± 0.11          |                          | 0.29 ± 0.09          |  |
| pH   | 0.832   | 7.00 ± 0.03          | 0.1% 0.844               | 7.00 ± 0.03          | 0.0% 0.987               | 7.00 ± 0.03          |  |
| Mg   | 0.861   | 0.11 ± 0.02          | 2% 0.870                 | 0.11 ± 0.01          | -1% 0.923                | 0.11 ± 0.02          |  |

| r_FWS | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|       | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.222                               |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|       | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|       | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW ± SD |  |
| PME   | 0.708   | 2.26 ± 0.30          | 4% 0.744                 | 2.35 ± 0.41          | -3% 0.800                | 2.28 ± 0.40          |  |
| Pi    | 0.101   | 0.61 ± 0.18          | 2% 0.979                 | 0.62 ± 0.18          | -15% 0.154               | 0.53 ± 0.19          |  |
| PDE   | 0.164   | 2.49 ± 0.55          | 7% 0.491                 | 2.66 ± 0.54          | -9% 0.169                | 2.43 ± 0.40          |  |
| PCr   | 0.744   | 3.30 ± 0.61          | 4% 0.746                 | 3.42 ± 0.51          | -2% 0.897                | 3.36 ± 0.50          |  |
| ATP   | 0.027   | 2.70 ± 0.46          | -1% 0.984                | 2.68 ± 0.50          | -11% 0.084               | 2.38 ± 0.55          |  |
| NAD   |   | 0.30 ± 0.13          |                          | 0.35 ± 0.15          |                          | 0.31 ± 0.10          |  |
| pH    | 0.718   | 6.99 ± 0.04          | 0.0% 0.995               | 6.99 ± 0.02          | -0.1% 0.815              | 6.98 ± 0.03          |  |
| Mg    | 0.582   | 0.11 ± 0.01          | -4% 0.635                | 0.11 ± 0.01          | 0% 0.991                 | 0.11 ± 0.01          |  |

| I_FWS | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|       | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.038                               |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|       | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|       | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW ± SD |  |
| PME   | 0.903   | 2.21 ± 0.31          | 1% 0.988                 | 2.23 ± 0.45          | -2% 0.906                | 2.19 ± 0.34          |  |
| Pi    | 0.213   | 0.64 ± 0.23          | -7% 0.785                | 0.59 ± 0.22          | -9% 0.587                | 0.55 ± 0.18          |  |
| PDE   | 0.227   | 2.11 ± 0.50          | 7% 0.426                 | 2.27 ± 0.29          | 1% 0.958                 | 2.30 ± 0.42          |  |
| PCr   | 0.012   | 3.31 ± 0.40          | 12% 0.018                | 3.73 ± 0.46          | -8% 0.077                | 3.44 ± 0.54          |  |
| ATP   | 0.112   | 2.42 ± 0.54          | -1% 0.984                | 2.39 ± 0.41          | -9% 0.236                | 2.18 ± 0.50          |  |
| NAD   |   | 0.30 ± 0.10          |                          | 0.31 ± 0.13          |                          | 0.32 ± 0.11          |  |
| pH    | 0.561   | 6.99 ± 0.04          | 0.1% 0.767               | 7.00 ± 0.03          | 0.0% 0.955               | 7.00 ± 0.05          |  |
| Mg    | 0.169   | 0.11 ± 0.02          | -5% 0.439                | 0.11 ± 0.02          | -2% 0.868                | 0.11 ± 0.02          |  |

#### **Tabelle 4: Ergebnisse der 31P-MRS, Vergleich zwischen den Gruppen**

Absolute Konzentrationswerte (in mmol/kg) und pH bei bilateral platzierten VOI für wN, mN, und mK. Die links- und rechtsseitige Hälfte der frontalen grauen Substanz wurde nicht seitengetrennt ausgewertet.

$\Delta_{mw}$  stellt die Differenz der Metabolitenwerte zwischen mN und wN dar:  $\Delta_{mw} = \frac{(mN-wN)}{wN}$

$\Delta_{KN}$  errechnet sich als Differenz der Metabolitenwerte zwischen mK und mN:  $\Delta_{KN} = \frac{(mK-mN)}{mN}$

Der Wilks-Lambda-Test widerspiegelt den multivariaten Gesamteffekt der drei Gruppen auf alle 7 Metaboliten, die in die MANOVA einbezogen wurden. NAD wurde wegen unzureichender Datenqualität ausgeschlossen. Die omnibus-p-Werte resultieren aus separaten ANOVAS für jeden einzelnen Metaboliten, wieder über alle 3 Gruppen hinweg. Der Post-Hoc-Scheffé-Test wurde für die paarweisen Vergleiche der Gruppen angewendet.  $p < 0.05$  wurde in rot markiert.



**Bild 18**

Ergebnisse der 31P-MRS:

Relative Gruppendifferenzen der Metabolitenkonzentrationen zwischen männlichen (mN) und weiblichen (wN) Nicht-Konsumenten:  $\Delta mw = \frac{(mN-wN)}{wN}$ .



**Bild 19**

Ergebnisse der <sup>31</sup>P-MRS:

Relative Gruppendifferenz der Metaboliten zwischen männlichen Konsumenten (mK) und

männlichen Nicht-Konsumenten (mN):  $\Delta KN = \frac{(mK - mN)}{mN}$ .



| TH  | Gesamt-Seitenvergleich rechts/links aller 3 Gruppen (multivariat) |            |       |                |                 |            |                |            |            |       |        |                 |            |                 |
|-----|---|------------|-------|----------------|-----------------|------------|----------------|------------|------------|-------|--------|-----------------|------------|-----------------|
|     | Statistik: RM MANOVA: p = 0.000*                                  |            |       |                |                 |            |                |            |            |       |        |                 |            |                 |
|     | paarweiser Seiten-Vergleich pro Gruppe (RM MANOVA):               |            |       |                |                 |            |                |            |            |       |        |                 |            |                 |
|     | wN: p = 0.281   |            |       | mN: p = 0.000* |                 |            | mK: p = 0.004* |            |            |       |        |                 |            |                 |
|     | r - l   |            | Δrl   |                | p-Wert (t-Test) |            |                | r - l      |            | Δrl   |        | p-Wert (t-Test) |            |                 |
|     | abs. Diff.  | rel. Diff. |       |                | abs. Diff.      | rel. Diff. |                | abs. Diff. | rel. Diff. |       |        | abs. Diff.      | rel. Diff. | p-Wert (t-Test) |
| PME | -0.02   | -1%        | 0.844 |                | -0.14           | -7%        | 0.013          |            | -0.04      | -2%   | 0.382  |                 |            |                 |
| Pi  | -0.04   | -5%        | 0.213 |                | -0.04           | -5%        | 0.168          |            | -0.06      | -7%   | 0.012* |                 |            |                 |
| PDE | -0.02   | -1%        | 0.771 |                | -0.03           | -1%        | 0.567          |            | -0.07      | -3%   | 0.189  |                 |            |                 |
| PCr | -0.05   | -1%        | 0.373 |                | -0.27           | -8%        | 0.000*         |            | -0.10      | -3%   | 0.002* |                 |            |                 |
| ATP | -0.02   | -1%        | 0.706 |                | -0.04           | -2%        | 0.510          |            | -0.13      | -6%   | 0.054  |                 |            |                 |
| NAD | -0.04   |            |       |                | 0.02            |            |                |            | 0.02       |       |        |                 |            |                 |
| pH  | -0.01   | -0.1%      | 0.280 |                | 0.00            | 0.0%       | 0.838          |            | -0.01      | -0.1% | 0.177  |                 |            |                 |
| Mg  | -0.01   | -5%        | 0.081 |                | 0.00            | -1%        | 0.696          |            | 0.00       | 0%    | 0.890  |                 |            |                 |

| BG  | Gesamt-Seitenvergleich rechts/links aller 3 Gruppen (multivariat) |            |       |               |                 |            |               |            |            |      |        |                 |            |                 |
|-----|---|------------|-------|---------------|-----------------|------------|---------------|------------|------------|------|--------|-----------------|------------|-----------------|
|     | Statistik: RM MANOVA: p = 0.003*                                  |            |       |               |                 |            |               |            |            |      |        |                 |            |                 |
|     | paarweiser Seiten-Vergleich pro Gruppe (RM MANOVA):               |            |       |               |                 |            |               |            |            |      |        |                 |            |                 |
|     | wN: p = 0.147   |            |       | mN: p = 0.050 |                 |            | mK: p = 0.068 |            |            |      |        |                 |            |                 |
|     | r - l   |            | Δrl   |               | p-Wert (t-Test) |            |               | r - l      |            | Δrl  |        | p-Wert (t-Test) |            |                 |
|     | abs. Diff.  | rel. Diff. |       |               | abs. Diff.      | rel. Diff. |               | abs. Diff. | rel. Diff. |      |        | abs. Diff.      | rel. Diff. | p-Wert (t-Test) |
| PME | -0.24   | -10%       | 0.049 |               | -0.14           | -6%        | 0.134         |            | -0.17      | -7%  | 0.014  |                 |            |                 |
| Pi  | -0.11   | -15%       | 0.063 |               | -0.06           | -10%       | 0.212         |            | -0.10      | -16% | 0.004* |                 |            |                 |
| PDE | 0.24  | 10%        | 0.017 |               | 0.16            | 6%         | 0.304         |            | 0.19       | 8%   | 0.020  |                 |            |                 |
| PCr | -0.20   | -5%        | 0.017 |               | -0.66           | -17%       | 0.000*        |            | -0.20      | -6%  | 0.015  |                 |            |                 |
| ATP | -0.01   | 0%         | 0.940 |               | 0.13            | 6%         | 0.125         |            | -0.08      | -3%  | 0.240  |                 |            |                 |
| NAD | 0.00  |            |       |               | -0.04           |            |               |            | 0.05       |      |        |                 |            |                 |
| pH  | -0.01   | -0.2%      | 0.224 |               | -0.01           | -0.1%      | 0.234         |            | 0.00       | 0.0% | 0.579  |                 |            |                 |
| Mg  | 0.00  | 1%         | 0.809 |               | 0.00            | 0%         | 0.915         |            | 0.00       | -2%  | 0.425  |                 |            |                 |

| TL  | Gesamt-Seitenvergleich rechts/links aller 3 Gruppen (multivariat) |            |       |               |                 |            |               |            |            |      |        |                 |            |                 |
|-----|---|------------|-------|---------------|-----------------|------------|---------------|------------|------------|------|--------|-----------------|------------|-----------------|
|     | Statistik: RM MANOVA: p = 0.306                                   |            |       |               |                 |            |               |            |            |      |        |                 |            |                 |
|     | paarweiser Seiten-Vergleich pro Gruppe (RM MANOVA):               |            |       |               |                 |            |               |            |            |      |        |                 |            |                 |
|     | wN: p = 0.725   |            |       | mN: p = 0.354 |                 |            | mK: p = 0.098 |            |            |      |        |                 |            |                 |
|     | r - l   |            | Δrl   |               | p-Wert (t-Test) |            |               | r - l      |            | Δrl  |        | p-Wert (t-Test) |            |                 |
|     | abs. Diff.  | rel. Diff. |       |               | abs. Diff.      | rel. Diff. |               | abs. Diff. | rel. Diff. |      |        | abs. Diff.      | rel. Diff. | p-Wert (t-Test) |
| PME | -0.09   | -4%        | 0.422 |               | 0.05            | 2%         | 0.677         |            | 0.03       | 1%   | 0.673  |                 |            |                 |
| Pi  | -0.03   | -5%        | 0.627 |               | -0.08           | -12%       | 0.156         |            | -0.05      | -10% | 0.080  |                 |            |                 |
| PDE | 0.13  | 7%         | 0.177 |               | 0.38            | 19%        | 0.007*        |            | 0.34       | 18%  | 0.000* |                 |            |                 |
| PCr | -0.12   | -3%        | 0.331 |               | -0.13           | -3%        | 0.409         |            | 0.01       | 0%   | 0.920  |                 |            |                 |
| ATP | 0.00  | 0%         | 0.980 |               | 0.11            | 5%         | 0.335         |            | 0.00       | -3%  | 0.306  |                 |            |                 |
| NAD | -0.04   |            |       |               | -0.02           |            |               |            | 0.05       |      |        |                 |            |                 |
| pH  | 0.01  | 0.1%       | 0.456 |               | 0.00            | 0.0%       | 0.740         |            | 0.00       | 0.0% | 0.829  |                 |            |                 |
| Mg  | 0.01  | 9%         | 0.085 |               | 0.00            | 2%         | 0.700         |            | 0.00       | 0%   | 0.880  |                 |            |                 |

| FWS        | Gesamt-Seitenvergleich rechts/links aller 3 Gruppen (multivariat) |                 |            |               |                 |            |               |                 |        |
|------------|---|-----------------|------------|---------------|-----------------|------------|---------------|-----------------|--------|
|            | Statistik: RM MANOVA: p = 0.002*                                  |                 |            |               |                 |            |               |                 |        |
|            | paarweiser Seiten-Vergleich pro Gruppe (RM MANOVA):               |                 |            |               |                 |            |               |                 |        |
|            | wN: p = 0.105   |                 |            | mN: p = 0.082 |                 |            | mK: p = 0.074 |                 |        |
| r - l      | Δrl   |                 | r - l      | Δrl           |                 | r - l      | Δrl           |                 |        |
| abs. Diff. | rel. Diff.  | p-Wert (t-Test) | abs. Diff. | rel. Diff.    | p-Wert (t-Test) | abs. Diff. | rel. Diff.    | p-Wert (t-Test) |        |
| PME        | 0.05  | 2%              | 0.650      | 0.12          | 5%              | 0.339      | 0.09          | 4%              | 0.146  |
| Pi         | -0.04   | -6%             | 0.452      | 0.02          | 3%              | 0.761      | -0.02         | -4%             | 0.586  |
| PDE        | 0.38  | 18%             | 0.008*     | 0.39          | 17%             | 0.001*     | 0.13          | 6%              | 0.144  |
| PCr        | -0.01   | 0%              | 0.913      | -0.30         | -8%             | 0.004*     | -0.09         | -3%             | 0.192  |
| ATP        | 0.29  | 12%             | 0.021      | 0.28          | 12%             | 0.001*     | 0.20          | 9%              | 0.003* |
| NAD        | 0.00  |                 |            | 0.04          |                 |            | -0.02         |                 |        |
| pH         | 0.00  | -0.1%           | 0.820      | -0.01         | -0.2%           | 0.156      | -0.02         | -0.3%           | 0.014  |
| Mg         | -0.01   | -5%             | 0.225      | 0.00          | -3%             | 0.380      | 0.00          | -1%             | 0.812  |

**Tabelle 5: Ergebnisse der 31P-MRS, Interhemisphärenvergleich**

Unterschiede der Konzentrationen und des pH-Werts zwischen linker und rechter Hemisphäre für wN,mN und mK. Relative Seitendifferenzen Δrl wurden berechnet nach:

$$\Delta rl = \frac{(\text{rechts-links})}{\text{links}}$$

Für die frontale graue Substanz konnte keine Seitendifferenz festgestellt werden, da keine seitenseparate Auswertung erfolgte. Die RM MANVOA stellt den globalen Einfluss aller drei Gruppen auf alle sieben Metaboliten dar, die in die MANOVA einbezogen wurden. NAD wurde wegen unzureichender Datenqualität ausgeschlossen. Eine gepaarte RM MANOVA wurde verwendet, um die hemisphärischen Unterschiede für jede Gruppe separat zu analysieren. Seitendifferenzen für jeden einzelnen Metaboliten wurden mithilfe des gepaarten Student's-t-Test bestimmt. p-Werte < 0.05 wurden in rot markiert.



**Bild 20**

Ergebnisse der <sup>31</sup>P-MRS:

Relative hemisphärische Unterschiede  $\Delta r_l$  der Metaboliten Werte für wN, mN und mK:

$$\Delta r_l = \frac{(\text{rechts} - \text{links})}{\text{links}} \cdot * \text{ weist auf einen p-Wert} < 0.05 \text{ hin.}$$

### 5.3 Protonenspektroskopie-Ergebnisse

Die statistische Analyse mit der MANOVA zeigte nur in der frontalen grauen Substanz (Tabelle 6) signifikante Gruppenunterschiede ( $p=0.047$ ), dieses Ergebnis war jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr statistisch signifikant.

#### 5.3.1 Unterschiede männlich-weiblich

Unter den Nicht-Konsumenten tendierten Männer generell zu höheren Protonen-Metabolitenspiegeln als Frauen (Bild 21A), am stärksten ausgeprägt bei Cho in der frontalen grauen Substanz ( $\Delta mw = +12\%$ ).

#### 5.3.2 Unterschiede Konsumenten-Nicht-Konsumenten

Verglichen zu den mN tendierten die Protonen-Metaboliten der mK generell zu leicht erniedrigten Konzentrationen (Bild 21B), ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

| FGS  | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                          |                                  |                          |                                  |                          |  |
|------|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|--|
|      | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: $p = 0.047$                             |                          |                                  |                          |                                  |                          |  |
|      | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                          |                                  |                          |                                  |                          |  |
|      | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=21)<br>MW $\pm$ SD | $\Delta mw$<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW $\pm$ SD | $\Delta KN$<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=40)<br>MW $\pm$ SD |  |
| tNAA | 0.728   | 22.6 $\pm$ 3.5           | 1% 0.990                         | 22.7 $\pm$ 3.1           | -3% 0.759                        | 22.1 $\pm$ 3.0           |  |
| tCr  | 0.484   | 15.5 $\pm$ 2.4           | 4% 0.651                         | 16.1 $\pm$ 2.8           | 1% 0.984                         | 16.2 $\pm$ 1.8           |  |
| tCho | 0.029   | 4.1 $\pm$ 0.8            | 12% 0.057                        | 4.6 $\pm$ 0.8            | -1% 0.973                        | 4.5 $\pm$ 0.5            |  |
| Glx  | –   | 28.7 $\pm$ 5.7           | 1% –                             | 28.9 $\pm$ 6.1           | 3% –                             | 29.7 $\pm$ 4.7           |  |
| ml   | –   | 18.0 $\pm$ 3.5           | 4% –                             | 18.8 $\pm$ 4.9           | -2% –                            | 18.5 $\pm$ 3.6           |  |

| r_TH | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                          |                                  |                          |                                  |                          |  |
|------|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|--|
|      | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: $p = 0.463$                             |                          |                                  |                          |                                  |                          |  |
|      | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                          |                                  |                          |                                  |                          |  |
|      | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=20)<br>MW $\pm$ SD | $\Delta mw$<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW $\pm$ SD | $\Delta KN$<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW $\pm$ SD |  |
| tNAA | 0.550   | 13.5 $\pm$ 1.9           | 2% 0.924                         | 13.7 $\pm$ 2.3           | -4% 0.559                        | 13.1 $\pm$ 1.8           |  |
| tCr  | 0.357   | 7.9 $\pm$ 1.3            | 6% 0.376                         | 8.4 $\pm$ 1.2            | -3% 0.606                        | 8.1 $\pm$ 1.0            |  |
| tCho | 0.247   | 2.4 $\pm$ 0.3            | 7% 0.247                         | 2.6 $\pm$ 0.4            | -3% 0.692                        | 2.5 $\pm$ 0.3            |  |
| Glx  | –   | 7.6 $\pm$ 2.2            | 18% –                            | 9.0 $\pm$ 3.0            | -15% –                           | 7.7 $\pm$ 2.2            |  |
| ml   | –   | 7.7 $\pm$ 2.8            | 29% –                            | 9.9 $\pm$ 2.8            | -18% –                           | 8.1 $\pm$ 2.2            |  |

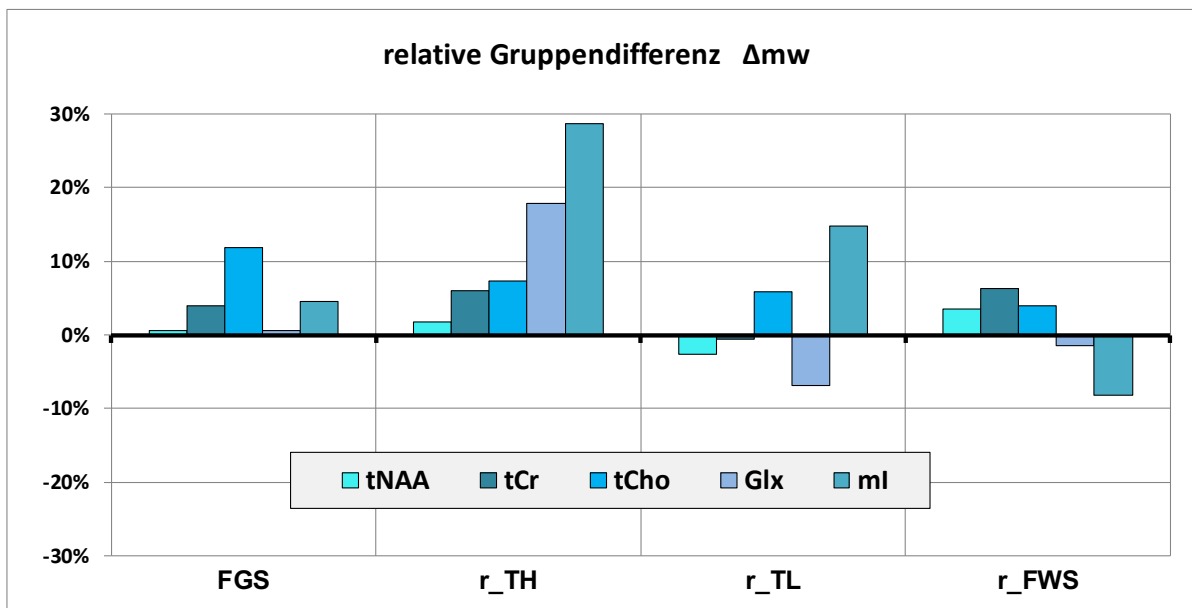
| r_TL | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|      | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.487                               |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|      | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=20)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=26)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=40)<br>MW ± SD |  |
| tNAA | 0.459   | 15.8 ± 3.1           | -3% <b>0.865</b>         | 15.4 ± 2.8           | -3% <b>0.786</b>         | 15.0 ± 2.3           |  |
| tCr  | 0.944   | 10.0 ± 2.0           | -1% <b>0.995</b>         | 9.9 ± 1.9            | 2% <b>0.947</b>          | 10.1 ± 2.0           |  |
| tCho | 0.629   | 2.9 ± 0.7            | 6% <b>0.691</b>          | 3.1 ± 0.6            | 0% <b>0.998</b>          | 3.0 ± 0.7            |  |
| Glx  | –   | 17.2 ± 4.6           | -9% –                    | 15.7 ± 4.9           | -8% –                    | 14.5 ± 4.8           |  |
| ml   | –   | 10.6 ± 2.1           | 15% –                    | 12.2 ± 4.0           | -9% –                    | 11.1 ± 3.5           |  |

| r_FWS | Gesamt-Vergleich der 3 Gruppen (multivariat)                            |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|-------|---|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--|
|       | Statistik MANOVA: Wilks-Lambda: p = 0.578                               |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|       | Paarweiser Vergleich zwischen jeweils 2 Gruppen (post-hoc Scheffé-Test) |                      |                          |                      |                          |                      |  |
|       | omnibus<br>p-Wert   | wN (n=19)<br>MW ± SD | Δmw<br>rel. diff. p-Wert | mN (n=25)<br>MW ± SD | ΔKN<br>rel. diff. p-Wert | mK (n=39)<br>MW ± SD |  |
| tNAA  | 0.282   | 14.7 ± 1.6           | 4% <b>0.501</b>          | 15.2 ± 1.7           | -4% <b>0.312</b>         | 14.7 ± 1.2           |  |
| tCr   | 0.247   | 8.2 ± 1.0            | 6% <b>0.255</b>          | 8.7 ± 1.1            | -2% <b>0.822</b>         | 8.5 ± 1.0            |  |
| tCho  | 0.698   | 2.7 ± 0.5            | 4% <b>0.699</b>          | 2.9 ± 0.4            | -2% <b>0.894</b>         | 2.8 ± 0.4            |  |
| Glx   | –   | 14.3 ± 3.2           | -1% –                    | 14.3 ± 2.0           | -8% –                    | 13.0 ± 2.4           |  |
| ml    | –   | 10.3 ± 2.6           | -8% –                    | 9.4 ± 2.4            | 8% –                     | 10.2 ± 3.4           |  |

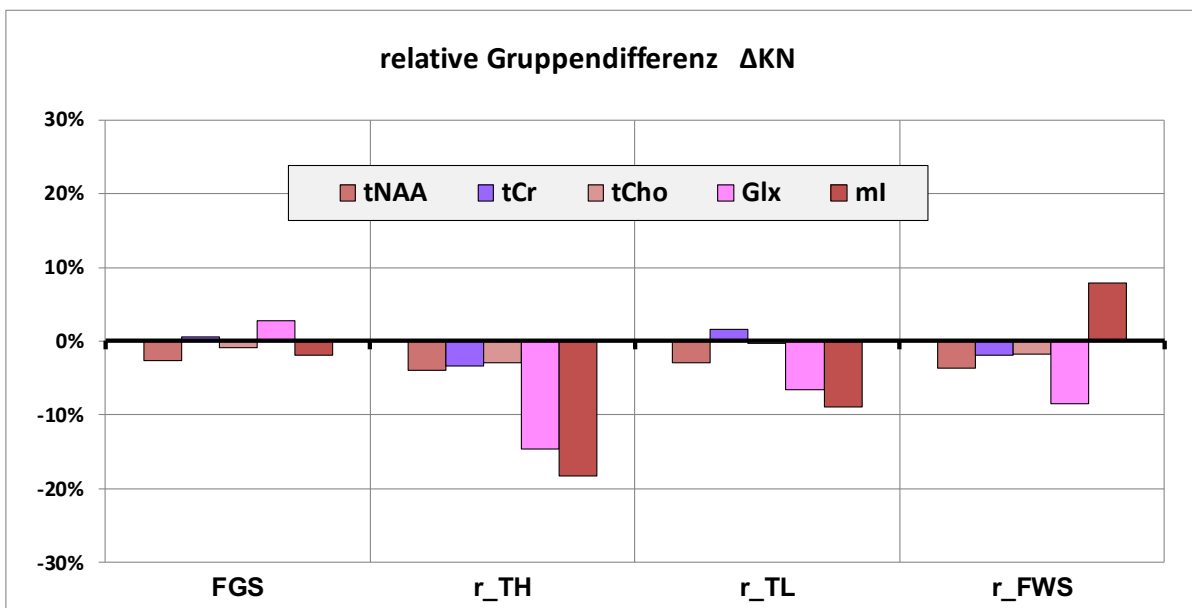
**Tabelle 6: Ergebnisse der 1H-MRS, Vergleich zwischen den Gruppen**

Absolute Durchschnittskonzentrationen (in mmol/kg) für wN, mN und mK. Relative Gruppendifferenz der Metaboliten zwischen männlichen Konsumenten (mK) und männlichen Nicht-Konsumenten (mN):  $\Delta_{KN} = \frac{(mK - mN)}{mN}$ . Der Wilks-Lambda-Test widerspiegelt den Gesamteffekt der drei Gruppen auf alle drei Metaboliten, die in die MANOVA einbezogen wurden. Glx und ml wurde wegen unzureichender Datenqualität ausgeschlossen. Der Post-Hoc-Scheffé-Test wurde für die paarweisen Vergleiche der Gruppen angewendet. p < 0.05 wurde in rot markiert.

(A)



(B)



### Bild 21

(A) Relative Gruppendifferenz zwischen den Metabolitenkonzentrationen von mN und wN:

$$\Delta m_w = \frac{(mN - wN)}{wN}$$

(B) Relative Gruppendifferenz zwischen den Metabolitenkonzentrationen von mK und mN:

$$\Delta K_N = \frac{(mK - mN)}{mN}$$

## 5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend fanden wir substantielle Unterschiede der Metabolitenkonzentrationen im Gehirn junger männlicher Cannabiskonsumenten im Vergleich zu männlichen Nicht-Konsumenten, jedoch waren diese Ergebnisse nach der Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche nicht mehr statistisch signifikant, da eine Vielzahl an Hirnregionen gleichzeitig untersucht wurde.

Die mK zeigten eine Erniedrigung hochenergetischer Metaboliten, insbesondere ATP (0% bis 12 %) und Pi (-1% bis -16%) in allen ausgewerteten Regionen. PCr-Konzentrationen waren nur in den linken Basalganglien und in der linken frontalen weißen Substanz deutlich reduziert. Weiterhin konnte ein leichter pH-Abfall in der frontalen grauen Substanz festgestellt werden. Für die Protonen-Metaboliten (tNAA, tCr und tCho) tendierten die mK zu leicht niedrigeren Werten als die mN.

Auch beim zusätzlich durchgeführten Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Nicht-Konsumenten zeigten sich einige Unterschiede der Metaboliten-Werte. Eine generelle ATP Konzentrations-Erniedrigung (0% bis -9%) wurde bei mN im Vergleich zu wN beobachtet. Protonen Metaboliten tendierten bei Männern generell zu höheren Werten.

Interhemisphärische Vergleiche offenbarten statistisch signifikante Seitenasymmetrien der Phosphor-Metaboliten zwischen rechter und linker Hemisphäre. Die PCr- und Pi-Spiegel waren generell niedriger in der rechten Hemisphäre, am deutlichsten in den Basalganglien (bis zu -17 %). Wir konnten keine konsistenten Lateralisierungsunterschiede zwischen den Gruppen feststellen, bis auf PCr, das bei männlichen Nicht-Konsumenten eine erheblich größere Asymmetrie als bei weiblichen Nicht-Konsumenten sowie männlichen Konsumenten aufwies.

## 6 Diskussion

Ein Überblick über die MR-Literatur hinsichtlich Cannabiskonsums zeigt deutlich den Mangel an wissenschaftlichen Daten (Sneider et al., 2013). Bis jetzt wurden lediglich einige wenige <sup>1</sup>H-MRS Studien publiziert, die die Neurometabolitenkonzentrationen bei Cannabiskonsumern untersuchten; <sup>31</sup>P-MRS Daten fehlen jedoch weitestgehend. Die zugrundeliegende Studie stellt den ersten Versuch einer Kombination von <sup>1</sup>H-MRS und <sup>31</sup>P-MRS dar, um den Neurometabolismus bei jungen Cannabiskonsumern durch eine Absolutquantifizierung mehrerer Metaboliten in verschiedenen Hirnregionen zu analysieren. Die bisher publizierten Protonenspektroskopie-Studien haben sich auf Regionen wie den Frontallappen, Basalganglien, Hippocampus und den Temporallappen fokussiert. Sie verglichen die Metabolitenwerte zwischen Konsumenten und Nicht-Konsumenten.

Ein erniedrigter NAA-Spiegel ist hierbei das häufigste Ergebnis (Chang et al., 2006a; Hermann et al., 2007; Prescott et al., 2011; Sung et al., 2013). Insbesondere bei den jüngsten Studienteilnehmern wurden erniedrigte NAA-Spiegel in der Frontallappenregion, unter Einbeziehung des dorsolateralen präfrontalen Cortex, des vorderen Gyrus Cinguli, des Gyrus frontalis inferior und der frontalen grauen Substanz gefunden. Die Ergebnisse werden durch unsere Studie bestätigt, die einen leichten, aber nicht signifikanten Abfall der NAA- und Cholin-Spiegel in allen untersuchten Regionen bei männlichen Cannabiskonsumern fand.

N-Acetyl-Aspartat (NAA) ist das Molekül mit der zweithöchsten Konzentration im menschlichen Gehirn nach der Aminosäure Glutamat. Seine physiologische Funktion ist zum jetzigen Zeitpunkt immer noch nicht eindeutig geklärt (Von Jonquieres et al., 2018). Es kann im erwachsenen Gehirn sowohl in Neuronen nachgewiesen werden (Simmons et al., 1991) als auch in Oligodendrozyten und in Myelin (Nordengen et al., 2015).

Als ein Bestandteil bei der Energiegewinnung durch die Aminosäure Glutamat korreliert es mit der neuronalen mitochondrialen Funktion und seiner Integrität (Paslakis et al., 2014). Im Gesamtaspekt kann diese Erniedrigung des NAA-Spiegels bei Cannabiskonsumern in sowohl unserer als auch den vorausgegangenen Studien als Bekräftigung der Hypothese des neurotoxischen Effekts von Cannabis auf das Hirngewebe angesehen werden.

Cholin besitzt viele Funktionen im menschlichen Gehirn und im Gehirn anderer Organismen. Seine Schlüsselfunktion besteht darin, als ein synthetischer Vorläufer sowohl für Phospholipide zu dienen, die Zellmembranen bilden, als auch für die Neurotransmitter Acetylcholin und Trimethylglycin. Erniedrigtes Cholin steht im Zusammenhang mit einer verringerten Membranerneuerungsrate oder einer beschleunigten zellulären / neuronalen Seneszenz. Infolgedessen kann eine verringerte Acetylcholin Konzentration auftreten, die die neuronale Integrität, die Kognition, den Metabolismus und das Bewusstsein beeinträchtigt (Woolf, 2006), und weiterhin als prädisponierender Faktor für neurodegenerative



Erkrankungen, z.B. die Alzheimer Erkrankung, gilt (Cohen et al., 1995; Cohen et al., 2015; Soreq, 2015).

In unserer Studie wurde ein beachtenswerter, jedoch nicht statistisch signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Protonen-Metaboliten in verschiedenen Hirnregionen gefunden. Männer (mN) wiesen hierbei generell höhere Konzentrationen als Frauen (wN) auf, insbesondere für Creatin und Cholin. Diese Ergebnisse können im Rahmen der bekannten geschlechtsabhängigen funktionellen als auch strukturellen Hirnunterschiede interpretiert werden (Cosgrove et al., 2007), jedoch sind zusätzlich die Einflüsse des Menstruationszyklus zu berücksichtigen (Baxter Jr et al., 1987; Harada et al., 2011; Hjelmervik et al., 2018; Hsieh et al., 2012).

Das bedeutendste Ergebnis unserer <sup>31</sup>P-MRS Messungen ist die auffällige Reduktion von ATP und Pi bei mK im Vergleich zu mN. Die PDE Werte waren hauptsächlich im Frontal- und Temporallappen reduziert. Eine Erniedrigung der PCr-Werte wurde in den linken Basalganglien, im Temporallappen und in der frontalen weißen Substanz gefunden. ATP wird durch mehrere Redoxreaktionen an der inneren Mitochondrienmembran synthetisiert und ist essenziell für die zelluläre Energieversorgung, insbesondere die der Hirnneuronen. PCr dient als zelluläres Energiereservoir, welches bei Bedarf schnell ATP durch Hydrolyse bereitstellen kann. Ein Abfall der Hochenergiemetaboliten (ATP, Pi), wie er bei mK im Vergleich zu mN beobachtet wurde, könnte als mitochondriale Dysfunktion interpretiert werden und somit einen Energiemangel in Neuronen, Axonen und Neurogliazellen hervorrufen. Da PDE hauptsächlich die Phospholipidabbau-Produkte darstellt (Pettegrew et al., 1987), können die erniedrigten PDE-Spiegel im Frontal- und Temporallappen mit einem erniedrigten Zellmembranumsatz erklärt werden und eher im Rahmen einer gestörten Phospholipidsynthese als einem beschleunigten Phospholipidabbau gesehen werden (Lee et al., 2012; Van Der Knaap et al., 1990). Der Temporallappen beinhaltet viele wichtige cerebrale Funktionalitäten wie beispielsweise den primären auditiven Cortex und das Wernicke-Areal, die eine wichtige Rolle bei Spracherkennung und Sprachbildung spielen; die konkreten Aufgaben und anatomischen Lokalisationen werden jedoch kontrovers diskutiert (Binder, 2017; Tremblay, Dick, 2016). Die Reduktion der Metabolitenkonzentrationen (ausgenommen PME) im Temporallappen unterstreicht zusätzlich die fMRI-Ergebnisse von Winton-Brown et al. (Winton-Brown et al., 2011), welche eine Abschwächung der temporalen auditiven Aktivierung nach THC-Gabe beinhalten. Die Studie zeigte ebenso eine Zunahme der psychotischen Symptome in Abhängigkeit der abgeschwächten temporalen auditiven Aktivierung. In unserer Studie konnten jedoch keine Anzeichen einer Psychose bei den Probanden festgestellt werden.

Weiterhin zeigte sich ein geringer pH-Abfall ( $\Delta\text{KN} = -0.2\%$ ) in der frontalen grauen Substanz, ähnlich zu bereits publizierten pH-Erniedrigungen im Frontallappen bei Patienten mit bipolaren Störungen (Kato et al., 1998). Die pH-Reduktion könnte als Ergebnis des oben erwähnten

Energiemangels angesehen werden, der konsekutiv zu einer gesteigerten anaeroben Glykolyse mit erhöhten Laktat-Konzentrationen und somit erniedrigten pH-Werten führt. Da in der Studie keine erhöhten Laktat-Peaks in den Protonenspektren beobachtet wurden, sind diese Laktat-Erhöhungen mutmaßlich sehr gering und liegen unterhalb der Detektierungsschwelle der MRS.

Zusammenfassend weisen die <sup>31</sup>P-MRS-Ergebnisse auf eine Energieminderversorgung und einen erniedrigten Zellmembranumsatz, insbesondere im Bereich des Frontallappens und der Basalganglien, hin. Wie bereits in weiteren Studien gezeigt wurde, ist der Frontallappen ein wichtiger Bestandteil des neuronalen Netzwerks, welches für soziale (Koshiyama et al., 2018) und kognitive (Daianu et al., 2016; Ishibashi et al., 2018) Funktionen zuständig ist, sowie auch für die allgemeine Intelligenz (Ohtani et al., 2014). Die Basalganglien stehen in Zusammenhang mit der Kontrolle von Bewegungen, aber ebenso auch einer Vielzahl von kognitiven und affektiven Aufgaben (Bostan et al., 2018; Cotterill, 2001; Ford et al., 2017). Generell können die Ergebnisse unserer Studie mit den Ergebnissen von FDG-PET-Studien korreliert werden (Parkar et al., 2010), die eine verringerte Glukoseaufnahme in verschiedenen Hirnregionen bei jungen Cannabiskonsumenten nachweisen konnten.

Die strukturelle T2-Bildgebung konnte keine sichtbaren Korrelate der metabolischen Veränderungen darstellen, die wir bei Cannabiskonsumenten gefunden haben, jedoch wurden in weiteren Studien strukturelle Hirnveränderungen auf zellulärer Ebene nachgewiesen, beispielsweise in Bezug auf die Integrität der weißen Substanz (Orr et al., 2016), die Struktur des Corpus callosums (Rigucci et al., 2016), die Dichte der grauen Substanz (Demirakca et al., 2011) und die Hirngewebszusammensetzung (Matochik et al., 2005). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es leider keine Studien, die eine mikroskopische Analyse des Hirngewebes bei Cannabiskonsumenten durchführten. Aus diesem Grund sind weitere MRT-Studien vonnöten, um herauszufinden, ob z.B. White Matter Lesions (WML) im Langzeitverlauf auftreten.

Der Einfluss des Geschlechts auf die Phosphor-Metaboliten zeigte insgesamt ein inhomogenes Muster. Die Hauptauswirkungen wurden im Thalamus gefunden, wo die mN überwiegend niedrigere Werte als die wN aufwiesen. Die ATP-Spiegel waren bei Männern in allen untersuchten Hirnregionen generell niedriger als bei Frauen. Wie bereits eingangs bei den Protonen Metaboliten erwähnt, können die geschlechtsspezifischen Unterschiede jedoch auch teils der hormonellen Situation geschuldet sein.

In jeder unserer 3 Probanden Gruppen konnten signifikante Asymmetrien der Phosphor-Metabolite im interhemispärischen Vergleich festgestellt werden. Grundsätzlich waren die Konzentrationen von PCr, Pi und PME links höher als rechts, während die PDE-Spiegel links niedriger waren. Die Ergebnisse lassen sich mit einem intensivierten Energiemetabolismus und einer erhöhten Membranumsatzrate der linken Hemisphäre, im Vergleich zur rechten

Hemisphäre, vereinbaren. Diese Seitenunterschiede können im Rahmen der funktionellen und strukturellen Lateralisierung des Gehirns interpretiert werden. Die zugrundeliegende Studie untersuchte nur Rechtshänder, deswegen ist von einer dominanten linken Hemisphäre auszugehen. Komplexe Aufgaben wie die Steuerung von Verhaltensmustern, Bewegungen, Sprache und Kognition sind primär in der dominanten Hemisphäre lokalisiert (Helmstaedter et al., 1994; Ridding, Flavel, 2006; Zago et al., 2017), was konsekutiv zu einer seitenasymmetrischen Verteilung sowohl des Energie- als auch des Membranmetabolismus führt, im Einklang mit unseren Studienergebnissen.

Erwähnenswert ist außerdem, dass das Ausmaß der asymmetrischen Metabolitenverteilung in allen 3 Probanden Gruppen ungefähr ähnlich war, außer für PCr. Die Seitenunterschiede bzgl. PCr waren bei wN und mK relativ gering. Bei mN war der PCr-Spiegel jedoch deutlich höher auf der rechten als auf der dominanten linken Seite, insbesondere im Bereich der Basalganglien. Verhaltensstudien haben eine reduzierte linkshemisphärische Sprachdominanz bei Schizophreniepatienten aufzeigen können, sowie bei gesunden schizotypen Probanden (Herzig et al., 2015). Da Cannabis als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Psychose gilt, könnte somit der Cannabiskonsum die Lateralisierung für spezifische Metaboliten beeinflussen. Auch die reduzierte Asymmetrie im Hinblick auf PCr bei mK im Vergleich zu mN könnte in diesem Kontext interpretiert werden.

Zusammenfassend ergab die kombinierte Protonen- und Phosphorspektroskopie eine Erniedrigung hochenergetischer Phosphate im Frontallappen und in den Basalganglien beidseits bei jungen Cannabiskonsumern im Vergleich zu Nicht-Konsumenten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass funktionelle Hirnerkrankungen bei Langzeit-Cannabiskonsumern durch eine Störung des Energiemetabolismus des Gehirns hervorgerufen werden könnten, die die neuronale Integrität, Motorik, Sensorik und auch das Gedächtnis negativ beeinflusst. Einige der Ergebnisse lassen zudem Hinweise auf eine beschleunigte neuronale Seneszenz erkennen. Weitere spektroskopiebasierte Langzeitstudien sind erforderlich, um die Daten im weiteren Zeitverlauf zu evaluieren und um festzustellen, ob die gefundenen Ergebnisse einen prädisponierenden Faktor für neurodegenerative Erkrankungen darstellen.

## Limitierungen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der zugrundeliegenden Studie in Bezug auf die Wirkungen des Cannabiskonsums ist es erforderlich, zusätzlich den möglichen Einfluss des Zigarettenrauchens zu betrachten. Der Nikotinkonsum (in pack years, py) war nicht ausgeglichen zwischen den verschiedenen Probandengruppen verteilt, sondern stark mit dem Cannabiskonsum assoziiert (Tabelle 1). Generell lässt sich somit nicht sicher ausschließen, dass der Nikotinkonsum zu den in der Studie gefundenen Unterschieden der Metabolitenkonzentrationen zwischen mN und mK beigetragen hat.

Andererseits gibt es zum jetzigen Zeitpunkt meines Wissens keine weitere vergleichbare <sup>31</sup>P-MRS-Studie, die den Einfluss von Nikotin auf den Hirnstoffwechsel bei jungen Erwachsenen untersucht hat, sondern lediglich <sup>1</sup>H-MRS-Studien, die sich vornehmlich auf den anterioren cingulären Cortex fokussiert haben, mit teils inkonsistenten Messergebnissen (Hellem et al., 2015).

Gegen einen wesentlichen Einfluss des Nikotinkonsums auf die gemessenen Metabolitenkonzentrationen spricht die Tatsache, dass die Halbwertszeit von Nikotin im Gehirn nur ca. 1 bis 2 Stunden beträgt (Dager, Friedman, 2000; Paulson, Vigdis, 2020; Rose et al., 2003) und die Nikotin-bedingte Verminderung des cerebralen Blutflusses und des Metabolismus entsprechend zeitlich begrenzt ist. THC dagegen weist eine deutlich längere Halbwertszeit von 5-13 Tagen auf (Sharma et al., 2012). Des Weiteren war der Nikotinkonsum in der mK-Gruppe relativ gering mit einem Median von 1.2 py (Tabelle 1). Um den möglichen Einfluss des Nikotins weiter zu reduzieren, waren die Probanden dazu angehalten, vor der MR-Messung am Untersuchungstag nicht zu rauchen; eine Missachtung des Verbots führte zum direkten Studienausschluss.

Für weitere Studien besteht generell die Notwendigkeit einer verbesserten Standardisierung der Untersuchungskohorte. Insbesondere muss auch auf eine homogenere Verteilung des Nikotinkonsums in allen zu untersuchenden Probandengruppen geachtet werden. Im Rahmen des weltweit zunehmenden Cannabiskonsums, für medizinische als auch nicht-medizinische Zwecke, besteht somit die Notwendigkeit weiterer Forschung mit großen Probandenkollektiven.

## 7 Literaturverzeichnis

1. (UNODC) UNODaC (2018) World drugs report, Vienna. United Nations Publications
2. Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielińska M, Aschner M (2010) Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol* 6:263-276
3. Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-343
4. Bachert P, Schröder L (2003) [Magnetic resonance imaging spectroscopy. Part 1: Basics]. *Radiologe* 43:1113-1126; quiz 1127-1118
5. Bachert P, Lichy MP (2004) [Magnetic resonance spectroscopy. Part 2: Application in diagnosis and clinical research]. *Radiologe* 44:81-95; quiz 96-87
6. Backens M (2010) [Basic principles of MR spectroscopy]. *Radiologe* 50:767-774
7. Baltzer PA, Dietzel M (2013) Breast lesions: diagnosis by using proton MR spectroscopy at 1.5 and 3.0 T--systematic review and meta-analysis. *Radiology* 267:735-746
8. Barker PB, Butterworth EJ, Boska MD, Nelson J, Welch KM (1999) Magnesium and pH imaging of the human brain at 3.0 Tesla. *Magn Reson Med* 41:400-406
9. Battisti RA, Roodenrys S, Johnstone SJ, Respondek C, Hermens DF, Solowij N (2010) Chronic use of cannabis and poor neural efficiency in verbal memory ability. *Psychopharmacology (Berl)* 209:319-330
10. Baxter Jr LR, Mazziotta JC, Phelps ME, Selin CE, Guze BH, Fairbanks L (1987) Cerebral glucose metabolic rates in normal human females versus normal males. *Psychiatry research* 21:237-245
11. Bayindir Y, Firat AK, Kayabas U, Alkan A, Yetkin F, Karakas HM, Yologlu S (2012) Increased membrane turnover in the brain in cutaneous anthrax without central nervous system disorder: a magnetic resonance spectroscopy study. *Med Hypotheses* 79:43-46
12. Binder JR (2017) Current Controversies on Wernicke's Area and its Role in Language. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17:58
13. Bittšanský M, Výbohová D, Dobrota D (2012) Proton magnetic resonance spectroscopy and its diagnostically important metabolites in the brain. *Gen Physiol Biophys* 31:101-112
14. Bloch F (1946) Nuclear induction. *Physical review* 70:460
15. Block RI, O'Leary DS, Hichwa RD, Augustinack JC, Boles Ponto LL, Ghoneim MM, Arndt S, Hurtig RR, Watkins GL, Hall JA, Nathan PE, Andreasen NC (2002) Effects of frequent marijuana use on memory-related regional cerebral blood flow. *Pharmacol Biochem Behav* 72:237-250
16. Bojorquez JZ, Bricq S, Acquitter C, Brunotte F, Walker PM, Lalande A (2017) What are normal relaxation times of tissues at 3 T? *Magnetic resonance imaging* 35:69-80
17. Bostan AC, Dum RP, Strick PL (2018) Functional Anatomy of Basal Ganglia Circuits with the Cerebral Cortex and the Cerebellum. *Prog Neurol Surg* 33:50-61
18. Bottomley PA (1987) Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 508:333-348
19. Busa WB, Nuccitelli R (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol* 246:R409-438

20. Cerdá M, Wall M, Feng T, Keyes KM, Sarvet A, Schulenberg J, O'Malley PM, Pacula RL, Galea S, Hasin DS (2017) Association of State Recreational Marijuana Laws With Adolescent Marijuana Use. *JAMA Pediatr* 171:142-149
21. Chang L, Cloak C, Yakupov R, Ernst T (2006a) Combined and independent effects of chronic marijuana use and HIV on brain metabolites. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:65-76
22. Chang L, Yakupov R, Cloak C, Ernst T (2006b) Marijuana use is associated with a reorganized visual-attention network and cerebellar hypoactivation. *Brain* 129:1096-1112
23. Choi C, Coupland NJ, Bhardwaj PP, Kalra S, Casault CA, Reid K, Allen PS (2006) T2 measurement and quantification of glutamate in human brain in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 56:971-977
24. Cichocka M, Kozub J, Urbanik A (2015) PH Measurements of the Brain Using Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy ((<sup>31</sup>)PMRS) in Healthy Men - Comparison of Two Analysis Methods. *Pol J Radiol* 80:509-514
25. Cohen BM, Renshaw PF, Stoll AL, Wurtman RJ, Yurgelun-Todd D, Babb SM (1995) Decreased brain choline uptake in older adults. An in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Jama* 274:902-907
26. Cohen EJ, Quarta E, Fulgenzi G, Minciocchi D (2015) Acetylcholine, GABA and neuronal networks: a working hypothesis for compensations in the dystrophic brain. *Brain Res Bull* 110:1-13
27. Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK (2007) Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biological psychiatry* 62:847-855
28. Cotterill RM (2001) Cooperation of the basal ganglia, cerebellum, sensory cerebrum and hippocampus: possible implications for cognition, consciousness, intelligence and creativity. *Prog Neurobiol* 64:1-33
29. Coupland NJ, Ogilvie CJ, Hegadoren KM, Seres P, Hanstock CC, Allen PS (2005) Decreased prefrontal Myo-inositol in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 57:1526-1534
30. Crean RD, Crane NA, Mason BJ (2011) An evidence based review of acute and long-term effects of cannabis use on executive cognitive functions. *J Addict Med* 5:1-8
31. Dager SR, Friedman SD (2000) Brain imaging and the effects of caffeine and nicotine. *Ann Med* 32:592-599
32. Daianu M, Mendez MF, Baboyan VG, Jin Y, Melrose RJ, Jimenez EE, Thompson PM (2016) An advanced white matter tract analysis in frontotemporal dementia and early-onset Alzheimer's disease. *Brain Imaging Behav* 10:1038-1053
33. De Stefano N, Mortilla M (2007) Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Brain Metabolic Disorders. *Clinical Neuroradiology* 17:223-229
34. Demirakca T, Sartorius A, Ende G, Meyer N, Welzel H, Skopp G, Mann K, Hermann D (2011) Diminished gray matter in the hippocampus of cannabis users: possible protective effects of cannabidiol. *Drug Alcohol Depend* 114:242-245
35. Di Costanzo A, Trojsi F, Tosetti M, Schirmer T, Lechner SM, Popolizio T, Scarabino T (2007) Proton MR spectroscopy of the brain at 3 T: an update. *European radiology* 17:1651-1662
36. Ernst T, Kreis R, Ross B (1993) Absolute quantitation of water and metabolites in the human brain. I. Compartments and water. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 102:1-8

37. Ethofer T, Mader I, Seeger U, Helms G, Erb M, Grodd W, Ludolph A, Klose U (2003) Comparison of longitudinal metabolite relaxation times in different regions of the human brain at 1.5 and 3 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 50:1296-1301
38. Ford TC, Hayley AC, Downey LA, Parrott AC (2017) Cannabis: An Overview of its Adverse Acute and Chronic Effects and its Implications. *Curr Drug Abuse Rev* 10:6-18
39. Ganji SK, Banerjee A, Patel AM, Zhao YD, Dimitrov IE, Browning JD, Sherwood Brown E, Maher EA, Choi C (2012) T2 measurement of J-coupled metabolites in the human brain at 3T. *NMR in biomedicine* 25:523-529
40. Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299-318
41. Gonzalez R, Swanson JM (2012) Long-term effects of adolescent-onset and persistent use of cannabis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15970-15971
42. Gruber SA, Yurgelun-Todd DA (2005) Neuroimaging of marijuana smokers during inhibitory processing: a pilot investigation. *Brain Res Cogn Brain Res* 23:107-118
43. Gussew A, Erdtel M, Hiepe P, Rzanny R, Reichenbach JR (2012) Absolute quantitation of brain metabolites with respect to heterogeneous tissue compositions in 1 H-MR spectroscopic volumes. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 25:321-333
44. Halvorson HR, Vande Linde AM, Helpert JA, Welch KM (1992) Assessment of magnesium concentrations by 31P NMR in vivo. *NMR Biomed* 5:53-58
45. Harada M, Kubo H, Nose A, Nishitani H, Matsuda T (2011) Measurement of variation in the human cerebral GABA level by in vivo MEGA-editing proton MR spectroscopy using a clinical 3 T instrument and its dependence on brain region and the female menstrual cycle. *Hum Brain Mapp* 32:828-833
46. Hasin DS, Saha TD, Kerridge BT, Goldstein RB, Chou SP, Zhang H, Jung J, Pickering RP, Ruan WJ, Smith SM, Huang B, Grant BF (2015) Prevalence of Marijuana Use Disorders in the United States Between 2001-2002 and 2012-2013. *JAMA Psychiatry* 72:1235-1242
47. Hellem T, Shi X, Latendresse G, Renshaw PF (2015) The Utility of Magnetic Resonance Spectroscopy for Understanding Substance Use Disorders: A Systematic Review of the Literature. *J Am Psychiatr Nurses Assoc* 21:244-275
48. Helmstaedter C, Kurthen M, Linke DB, Elger CE (1994) Right hemisphere restitution of language and memory functions in right hemisphere language-dominant patients with left temporal lobe epilepsy. *Brain* 117 ( Pt 4):729-737
49. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583
50. Hermann D, Sartorius A, Welzel H, Walter S, Skopp G, Ende G, Mann K (2007) Dorsolateral prefrontal cortex N-acetylaspartate/total creatine (NAA/tCr) loss in male recreational cannabis users. *Biol Psychiatry* 61:1281-1289
51. Herzig DA, Sullivan S, Lewis G, Corcoran R, Drake R, Evans J, Nutt D, Mohr C (2015) Hemispheric language asymmetry in first episode psychosis and schizotypy: the role of cannabis consumption and cognitive disorganization. *Schizophrenia bulletin* 41:S455-S464

52. Hetherington HP, Spencer DD, Vaughan JT, Pan JW (2001) Quantitative (31)P spectroscopic imaging of human brain at 4 Tesla: assessment of gray and white matter differences of phosphocreatine and ATP. *Magn Reson Med* 45:46-52
53. Hjelmervik H, Hausmann M, Craven AR, Hirnstein M, Hugdahl K, Specht K (2018) Sex- and sex hormone-related variations in energy-metabolic frontal brain asymmetries: A magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroimage* 172:817-825
54. Hoult DI, Richards RE (2011) The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. 1976. *J Magn Reson* 213:329-343
55. Hsieh TC, Lin WY, Ding HJ, Sun SS, Wu YC, Yen KY, Kao CH (2012) Sex-and age-related differences in brain FDG metabolism of healthy adults: an SPM analysis. *Journal of Neuroimaging* 22:21-27
56. Ishibashi M, Kimura N, Aso Y, Matsubara E (2018) Effects of white matter lesions on brain perfusion in patients with mild cognitive impairment. *Clin Neurol Neurosurg* 168:7-11
57. Jezzard P, Buxton RB (2006) The clinical potential of functional magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 23:787-793
58. Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Inubushi T (1992) Brain phosphorous metabolism in depressive disorders detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord* 26:223-230
59. Kato T, Murashita J, Kamiya A, Shioiri T, Kato N, Inubushi T (1998) Decreased brain intracellular pH measured by 31P-MRS in bipolar disorder: a confirmation in drug-free patients and correlation with white matter hyperintensity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248:301-306
60. Kemp GJ, Meyerspeer M, Moser E (2007) Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by 31P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed* 20:555-565
61. Kirov II, Liu S, Fleysher R, Fleysher L, Babb JS, Herbert J, Gonen O (2010) Brain metabolite proton T2 mapping at 3.0 T in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Radiology* 254:858-866
62. Kobus T, Wright AJ, Weiland E, Heerschap A, Scheenen TW (2015) Metabolite ratios in 1H MR spectroscopic imaging of the prostate. *Magn Reson Med* 73:1-12
63. Koshiyama D, Fukunaga M, Okada N, Morita K, Nemoto K, Yamashita F, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Kelly S, Jahanshad N, Kudo N, Azechi H, Watanabe Y, Donohoe G, Thompson PM, Kasai K, Hashimoto R (2018) Role of frontal white matter and corpus callosum on social function in schizophrenia. *Schizophr Res* 202:180-187
64. Kreis R, Ernst T, Ross B (1993) Absolute quantitation of water and metabolites in the human brain. II. Metabolite concentrations. *Journal of magnetic resonance, Series B* 102:9-19
65. Lanza IR, Bhagra S, Nair KS, Port JD (2011) Measurement of human skeletal muscle oxidative capacity by 31P-MR spectroscopy: a cross-validation with in vitro measurements. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 34:1143-1150
66. Laufs A, Livingstone R, Nowotny B, Nowotny P, Wickrath F, Giani G, Bunke J, Roden M, Hwang JH (2014) Quantitative liver 31P magnetic resonance spectroscopy at 3T on a clinical scanner. *Magn Reson Med* 71:1670-1675
67. Lauterbur PC (1973) Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *nature* 242:190-191



68. Lee J-H, Komoroski R, Chu W-J, Dudley J (2012). Methods and Applications of Phosphorus NMR Spectroscopy In Vivo. In, pp. 115-160.
69. Lei H, Zhu XH, Zhang XL, Ugurbil K, Chen W (2003) In vivo  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance spectroscopy of human brain at 7 T: an initial experience. *Magn Reson Med* 49:199-205
70. Li Y, Srinivasan R, Ratiney H, Lu Y, Chang SM, Nelson SJ (2008) Comparison of T1 and T2 metabolite relaxation times in glioma and normal brain at 3T. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 28:342-350
71. Lu H, Nagae-Poetscher LM, Golay X, Lin D, Pomper M, Van Zijl PC (2005) Routine clinical brain MRI sequences for use at 3.0 Tesla. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 22:13-22
72. Luyten PR, Marien AH, Sutsma B, Den Hollander JA (1986) Solvent-suppressed spatially resolved spectroscopy. An approach to high-resolution NMR on a whole-body MR system. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 67:148-155
73. Mandal PK, Akolkar H (2011) A new experimental approach and signal processing scheme for the detection and quantitation of  $^{31}\text{P}$  brain neurochemicals from in vivo MRS studies using dual tuned ( $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ ) head coil. *Biochem Biophys Res Commun* 412:302-306
74. Mansfield P, Grannell PK (1973) NMR'diffraction'in solids? *Journal of Physics C: solid state physics* 6:L422
75. Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689
76. Matochik JA, Eldreth DA, Cadet JL, Bolla KI (2005) Altered brain tissue composition in heavy marijuana users. *Drug Alcohol Depend* 77:23-30
77. Meier MH, Caspi A, Ambler A, Harrington H, Houts R, Keefe RS, McDonald K, Ward A, Poulton R, Moffitt TE (2012) Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2657-2664
78. Michaelis T, Merboldt K, Bruhn H, Hänicke W, Frahm J (1993) Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectra. *Radiology* 187:219-227
79. Mills T, Ortendahl D, Hylton N, Crooks L, Carlson J, Kaufman L (1987) Partial flip angle MR imaging. *Radiology* 162:531-539
80. Minati L, Aquino D, Bruzzone MG, Erbetta A (2010) Quantitation of normal metabolite concentrations in six brain regions by in-vivo  $^1\text{H}$ -MR spectroscopy. *Journal of medical physics/Association of Medical Physicists of India* 35:154
81. Mlynárik V, Gruber S, Moser E (2001) Proton T 1 and T 2 relaxation times of human brain metabolites at 3 Tesla. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo* 14:325-331
82. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* 81:89-131
83. Mueller-Lisse UG, Scherr M (2003) [ $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy of the prostate]. *Radiologe* 43:481-488
84. Nordengen K, Heuser C, Rinholm JE, Matalon R, Gundersen V (2015) Localisation of N-acetylaspartate in oligodendrocytes/myelin. *Brain Struct Funct* 220:899-917

85. Ohtani T, Nestor PG, Bouix S, Saito Y, Hosokawa T, Kubicki M (2014) Medial frontal white and gray matter contributions to general intelligence. *PLoS One* 9:e112691
86. Orr JM, Paschall CJ, Banich MT (2016) Recreational marijuana use impacts white matter integrity and subcortical (but not cortical) morphometry. *Neuroimage Clin* 12:47-56
87. Parkar SR, Ramanathan S, Nair N, Batra SA, Adarkar SA, Pandit AG, Kund P, Baghel NS (2010) Cannabis dependence: Effects of cannabis consumption on inter-regional cerebral metabolic relationships in an Indian population. *Indian J Psychiatry* 52:236-242
88. Paslakis G, Träber F, Roberz J, Block W, Jessen F (2014) N-acetyl-aspartate (NAA) as a correlate of pharmacological treatment in psychiatric disorders: a systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol* 24:1659-1675
89. Paulson OB, Vigdis I (2020) Cigarette smoking and cerebral blood flow in a cohort of middle-aged adults. *J Cereb Blood Flow Metab* 40:904-905
90. Petroff OA, Prichard JW, Behar KL, Alger JR, den Hollander JA, Shulman RG (1985) Cerebral intracellular pH by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 35:781-788
91. Pettegrew JW, Kopp SJ, Minshew NJ, Glonek T, Feliksik JM, Tow JP, Cohen MM (1987) <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance studies of phosphoglyceride metabolism in developing and degenerating brain: preliminary observations. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:419-430
92. Pilchova I, Klacanova K, Tatarkova Z, Kaplan P, Racay P (2017) The Involvement of Mg<sup>2+</sup> in Regulation of Cellular and Mitochondrial Functions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017:6797460
93. Pope HG, Jr., Yurgelun-Todd D (1996) The residual cognitive effects of heavy marijuana use in college students. *Jama* 275:521-527
94. Pope HG, Jr., Gruber AJ, Hudson JI, Huestis MA, Yurgelun-Todd D (2001) Neuropsychological performance in long-term cannabis users. *Arch Gen Psychiatry* 58:909-915
95. Považan M, Hangel G, Strasser B, Gruber S, Chmelik M, Trattinig S, Bogner W (2015) Mapping of brain macromolecules and their use for spectral processing of (1)H-MRSI data with an ultra-short acquisition delay at 7 T. *Neuroimage* 121:126-135
96. Prescott AP, Locatelli AE, Renshaw PF, Yurgelun-Todd DA (2011) Neurochemical alterations in adolescent chronic marijuana smokers: a proton MRS study. *Neuroimage* 57:69-75
97. Proctor W, Yu F (1950) The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Physical Review* 77:717
98. Provencher SW (2001) Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo* 14:260-264
99. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical review* 69:37
100. Qayyum A (2009) MR spectroscopy of the liver: principles and clinical applications. *Radiographics* 29:1653-1664
101. Ramsey NF (1999) Early history of magnetic resonance. *Physics in perspective* 1:123-135

102. Rata M, Giles SL, deSouza NM, Leach MO, Payne GS (2014) Comparison of three reference methods for the measurement of intracellular pH using <sup>31</sup>P MRS in healthy volunteers and patients with lymphoma. *NMR in Biomedicine* 27:158-162
103. Ridding MC, Flavel SC (2006) Induction of plasticity in the dominant and non-dominant motor cortices of humans. *Exp Brain Res* 171:551-557
104. Rigucci S, Marques TR, Di Forti M, Taylor H, Dell'Acqua F, Mondelli V, Bonaccorso S, Simmons A, David AS, Girardi P, Pariante CM, Murray RM, Dazzan P (2016) Effect of high-potency cannabis on corpus callosum microstructure. *Psychol Med* 46:841-854
105. Romero MF, Rossano AJ (2019) Acid-Base Basics. *Semin Nephrol* 39:316-327
106. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Mathew RJ, London ED, Hawk TC, Turkington TG, Coleman RE (2003) PET studies of the influences of nicotine on neural systems in cigarette smokers. *Am J Psychiatry* 160:323-333
107. Sanaei Nezhad F, Anton A, Michou E, Jung J, Parkes LM, Williams SR (2018) Quantification of GABA, glutamate and glutamine in a single measurement at 3 T using GABA-edited MEGA-PRESS. *NMR in Biomedicine* 31:e3847
108. Sharma P, Murthy P, Bharath MM (2012) Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry* 7:149-156
109. Simmons ML, Frondoza CG, Coyle JT (1991) Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience* 45:37-45
110. Smith S, Martin P, Davies J, Edwards R, Stevens A (1990) The assessment of treatment response in non-Hodgkin's lymphoma by image guided <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. *British journal of cancer* 61:485-490
111. Sneider JT, Mashhoon Y, Silveri MM (2013) A Review of Magnetic Resonance Spectroscopy Studies in Marijuana using Adolescents and Adults. *J Addict Res Ther Suppl* 4
112. Solowij N, Jones KA, Rozman ME, Davis SM, Ciarrochi J, Heaven PC, Lubman DI, Yücel M (2011) Verbal learning and memory in adolescent cannabis users, alcohol users and non-users. *Psychopharmacology (Berl)* 216:131-144
113. Soreq H (2015) Checks and balances on cholinergic signaling in brain and body function. *Trends Neurosci* 38:448-458
114. Stanisz GJ, Odrobina EE, Pun J, Escaravage M, Graham SJ, Bronskill MJ, Henkelman RM (2005) T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 54:507-512
115. Stefan D, Di Cesare F, Andrasescu A, Popa E, Lazariev A, Vescovo E, Strbak O, Williams S, Starcuk Z, Cabanas M (2009) Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. *Measurement Science and Technology* 20:104035
116. Sung YH, Carey PD, Stein DJ, Ferrett HL, Spottiswoode BS, Renshaw PF, Yurgelun-Todd DA (2013) Decreased frontal N-acetylaspartate levels in adolescents concurrently using both methamphetamine and marijuana. *Behav Brain Res* 246:154-161
117. Terry GE, Hirvonen J, Liow JS, Zoghbi SS, Gladding R, Tauscher JT, Schaus JM, Phebus L, Felder CC, Morse CL, Donohue SR, Pike VW, Halldin C, Innis RB (2010) Imaging and quantitation of cannabinoid CB1 receptors in human and monkey brains using (18)F-labeled inverse agonist radioligands. *J Nucl Med* 51:112-120
118. Tofts PS, Wray S (1988) A critical assessment of methods of measuring metabolite concentrations by NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 1:1-10

119. Träber F, Block W, Lamerichs R, Gieseke J, Schild HH (2004) 1H metabolite relaxation times at 3.0 tesla: Measurements of T1 and T2 values in normal brain and determination of regional differences in transverse relaxation. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 19:537-545
120. Tremblay P, Dick A (2016) Broca and Wernicke are dead, or moving past the classic model of language neurobiology. *Brain and Language* 162:60-71
121. Tsai SY, Posse S, Lin YR, Ko CW, Otazo R, Chung HW, Lin FH (2007) Fast mapping of the T2 relaxation time of cerebral metabolites using proton echo-planar spectroscopic imaging (PEPSI). *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 57:859-865
122. van der Graaf M (2010) In vivo magnetic resonance spectroscopy: basic methodology and clinical applications. *Eur Biophys J* 39:527-540
123. van der Knaap MS, van der Grond J, van Rijen PC, Faber JA, Valk J, Willemsse K (1990) Age-dependent changes in localized proton and phosphorus MR spectroscopy of the brain. *Radiology* 176:509-515
124. Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S (1997) Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* 129:35-43
125. Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP (2007) The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Annals of internal medicine* 147:573-577
126. von Jonquieres G, Spencer ZHT, Rowlands BD, Klugmann CB, Bongers A, Harasta AE, Parley KE, Cederholm J, Teahan O, Pickford R, Delerue F, Ittner LM, Fröhlich D, McLean CA, Don AS, Schneider M, Housley GD, Rae CD, Klugmann M (2018) Uncoupling N-acetylaspartate from brain pathology: implications for Canavan disease gene therapy. *Acta Neuropathol* 135:95-113
127. Wang X, Salibi N, Fayad LM, Barker PB (2014) Proton magnetic resonance spectroscopy of skeletal muscle: a comparison of two quantitation techniques. *J Magn Reson* 243:81-84
128. Wansapura JP, Holland SK, Dunn RS, Ball Jr WS (1999) NMR relaxation times in the human brain at 3.0 tesla. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 9:531-538
129. Wasser JS, Vogel L, Guthrie SS, Stolowich N, Chari M (1997) 31P-NMR determinations of cytosolic phosphodiesterases in turtle hearts. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118:1193-1200
130. Weinmann H-J, Brasch R, Press W, Wesbey G (2005) 6.4 Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *Classic Pap Mod Diagn Radiol* 416
131. Whitlow CT, Liguori A, Livengood LB, Hart SL, Mussat-Whitlow BJ, Lamborn CM, Laurienti PJ, Porrino LJ (2004) Long-term heavy marijuana users make costly decisions on a gambling task. *Drug Alcohol Depend* 76:107-111
132. Widmaier S, Breuer J, Jung WI, Dietze GJ, Lutz O (1998) 31P/1H WALTZ-4 broadband decoupling at 1.5 T: different versions of the composite pulse and consequences when using a surface coil. *Magn Reson Imaging* 16:845-849
133. Winton-Brown TT, Allen P, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Fusar-Poli P, Crippa JA, Seal ML, Martin-Santos R, Ffytche D, Zuardi AW, Atakan Z, McGuire PK (2011)

- Modulation of auditory and visual processing by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* 36:1340-1348
134. Woolf NJ (2006) Acetylcholine, cognition, and consciousness. *J Mol Neurosci* 30:219-222
  135. Wüthrich K (2001) The way to NMR structures of proteins. *Nature structural biology* 8:923-925
  136. Wüthrich K (2003) NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 42:3340-3363
  137. Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-1213
  138. Wyss PO, Bianchini C, Scheidegger M, Giapitzakis IA, Hock A, Fuchs A, Henning A (2018) In vivo estimation of transverse relaxation time constant (T2) of 17 human brain metabolites at 3T. *Magnetic resonance in medicine* 80:452-461
  139. Zaaraoui W, Fleysher L, Fleysher R, Liu S, Soher BJ, Gonen O (2007) Human brain-structure resolved T2 relaxation times of proton metabolites at 3 tesla. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 57:983-989
  140. Zago L, Hervé PY, Genuer R, Laurent A, Mazoyer B, Tzourio-Mazoyer N, Joliot M (2017) Predicting hemispheric dominance for language production in healthy individuals using support vector machine. *Hum Brain Mapp* 38:5871-5889

## 8 Anhang

Anhang-Bilder 1a – 1d zeigen die Ergebnisse der **31P**-MRS:

Boxplots angeordnet nach Regionen, Metaboliten und Probanden Gruppen,

\* weist auf einen p-Wert < 0.05 hin.

Anhang-Bilder 2a – 2b zeigen die Ergebnisse der **31P**-MRS:

Absolutwerte der Konzentrationen und Standardabweichung pro Metabolit

Anhang-Bilder 3a – 3b zeigen die Ergebnisse der **31P**-MRS:

Gruppendifferenzen männlich-weiblich ( $\Delta_{mw}$ ) und Konsumenten - Nicht-Konsumenten ( $\Delta_{NK}$ ),

$\Sigma ROI$  = Summe über alle Regionen einer Hemisphäre

Anhang-Bild 4 zeigt die Ergebnisse der **31P**-MRS:

Seitendifferenzen rechts-links ( $\Delta_{rl}$ ), angeordnet nach Regionen,

$\Sigma ROI$  = Summe über alle Regionen einer Hemisphäre

Anhang-Bilder 5a – 5b zeigen die Ergebnisse der **1H**-MRS:

Boxplots angeordnet nach Regionen, Metaboliten und Probanden Gruppen.

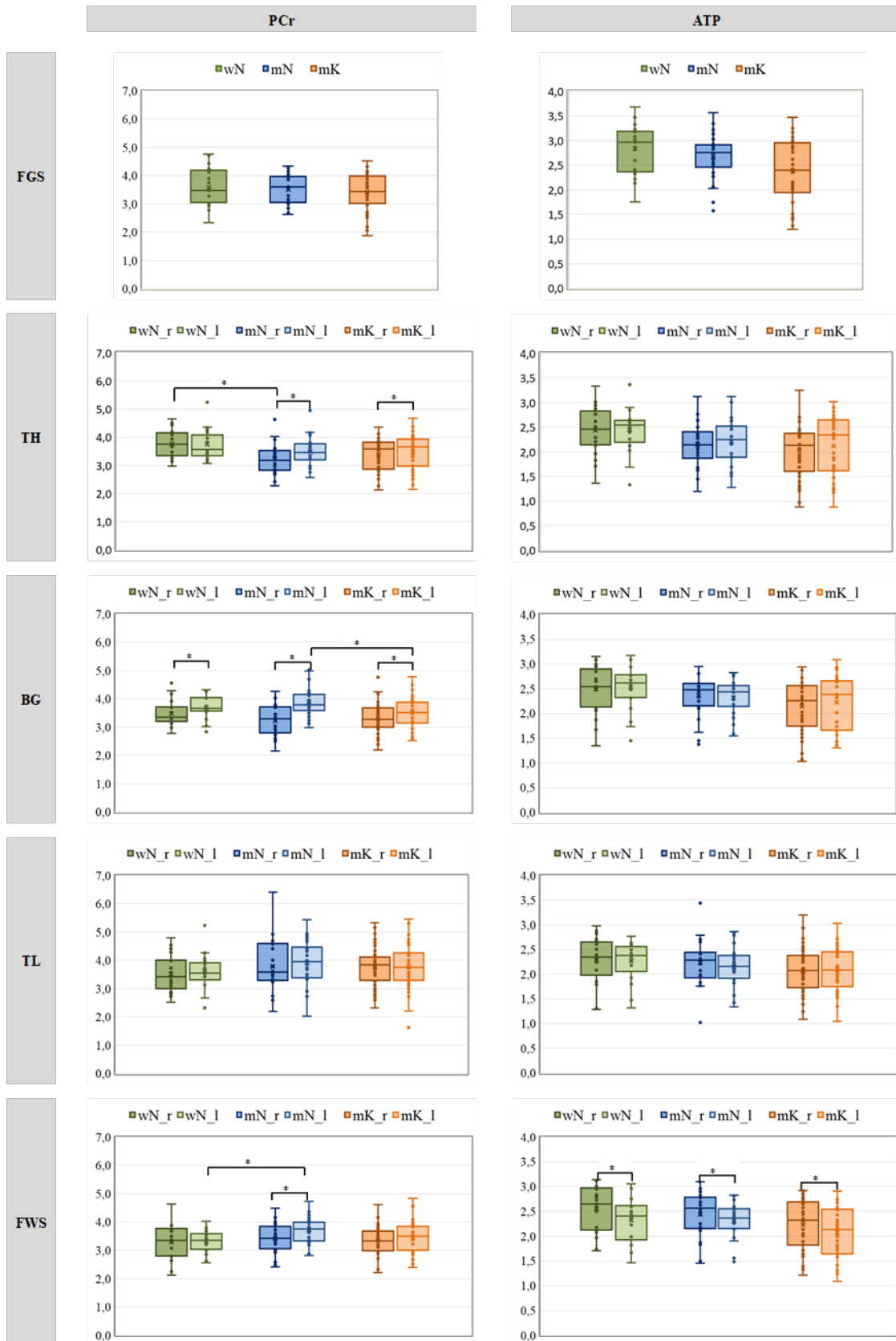
Anhang-Bilder 6 zeigt die Ergebnisse der **1H**-MRS:

Absolutwerte der Konzentrationen und Standardabweichung pro Metabolit

Anhang-Bilder 7 zeigt die Ergebnisse der **1H**-MRS:

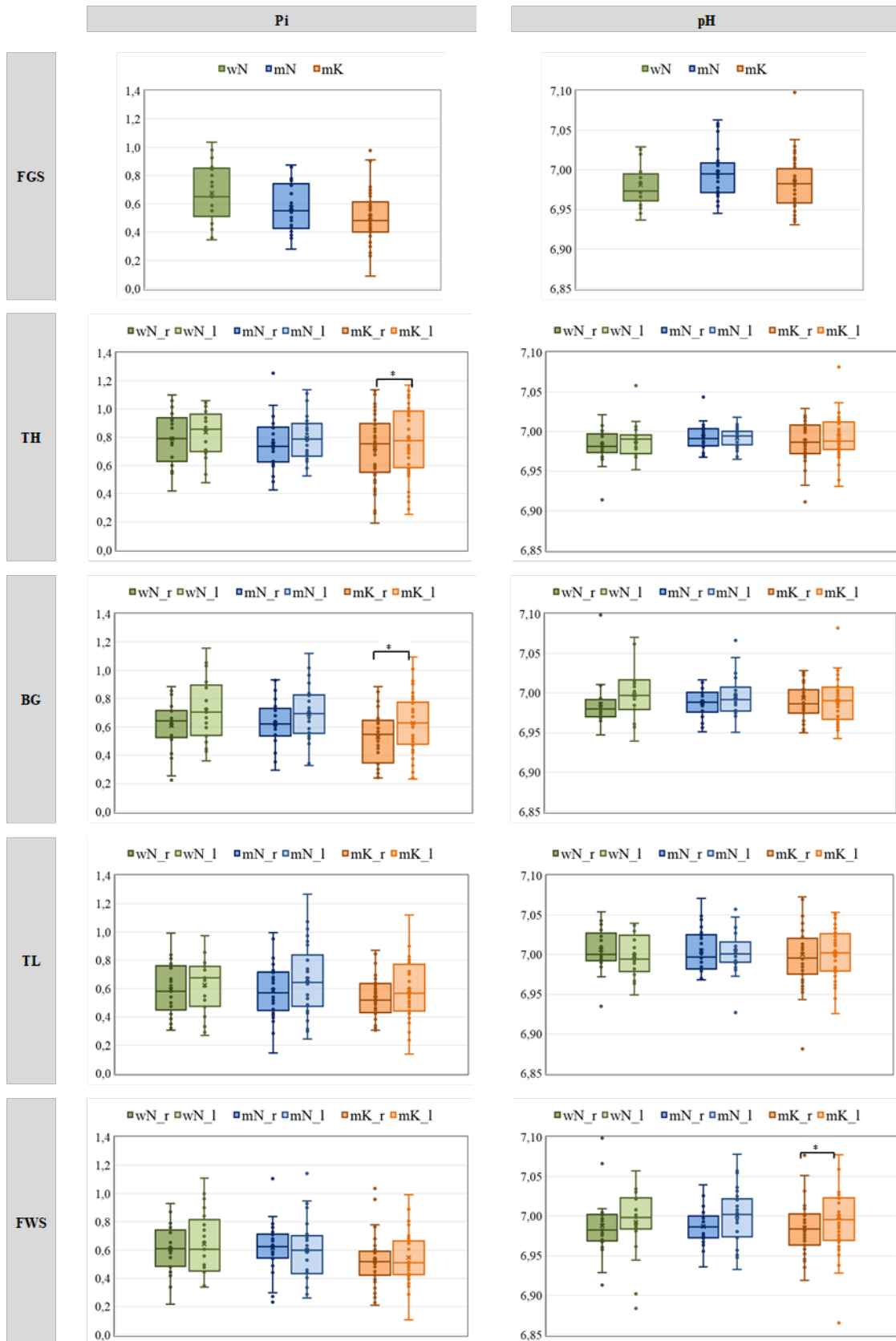
Gruppendifferenzen männlich-weiblich ( $\Delta_{mw}$ ) und Konsumenten - Nicht-Konsumenten ( $\Delta_{NK}$ )

31P - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg



Anhang-Bild 1a

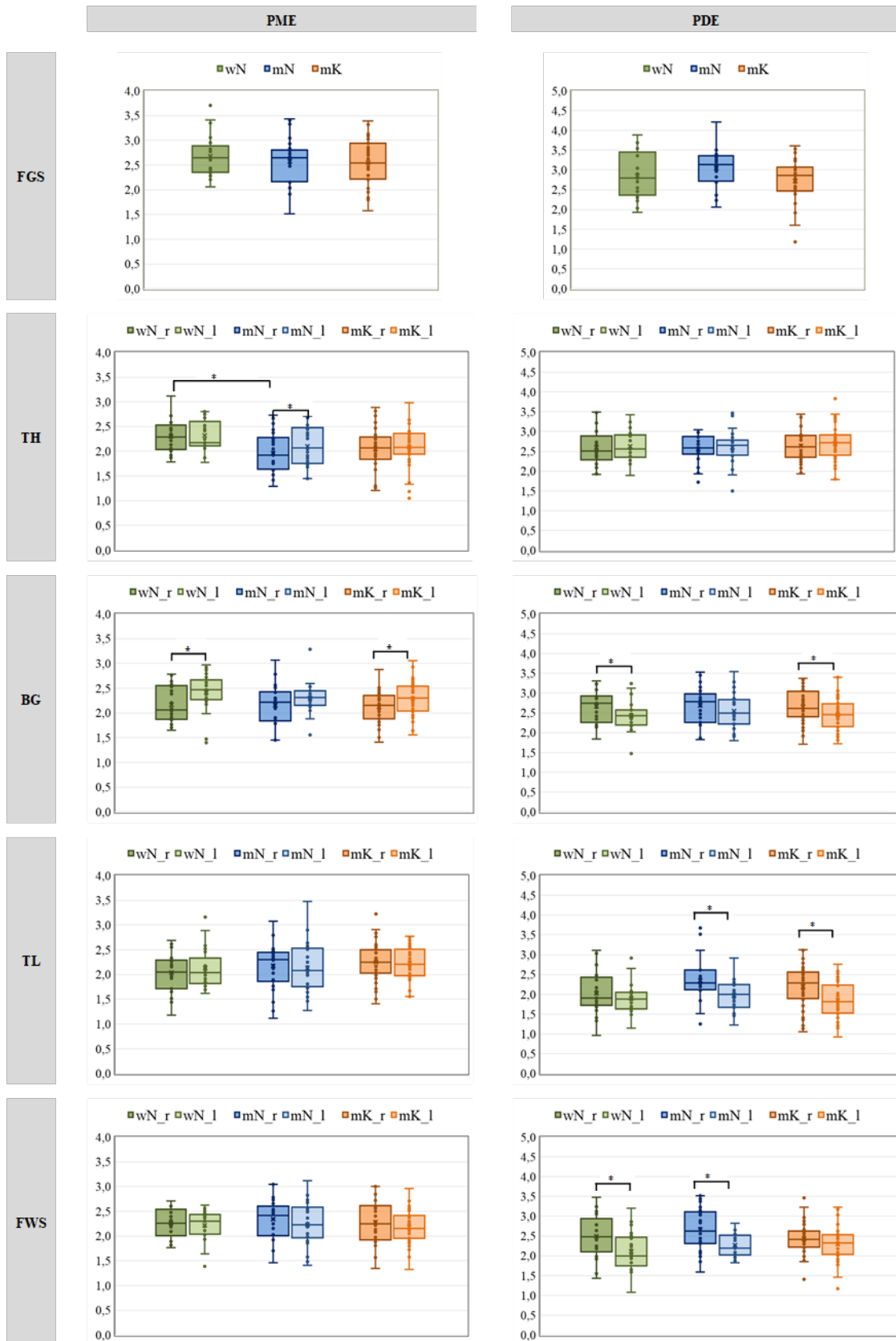
31P - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg



Anhang-Bild 1b

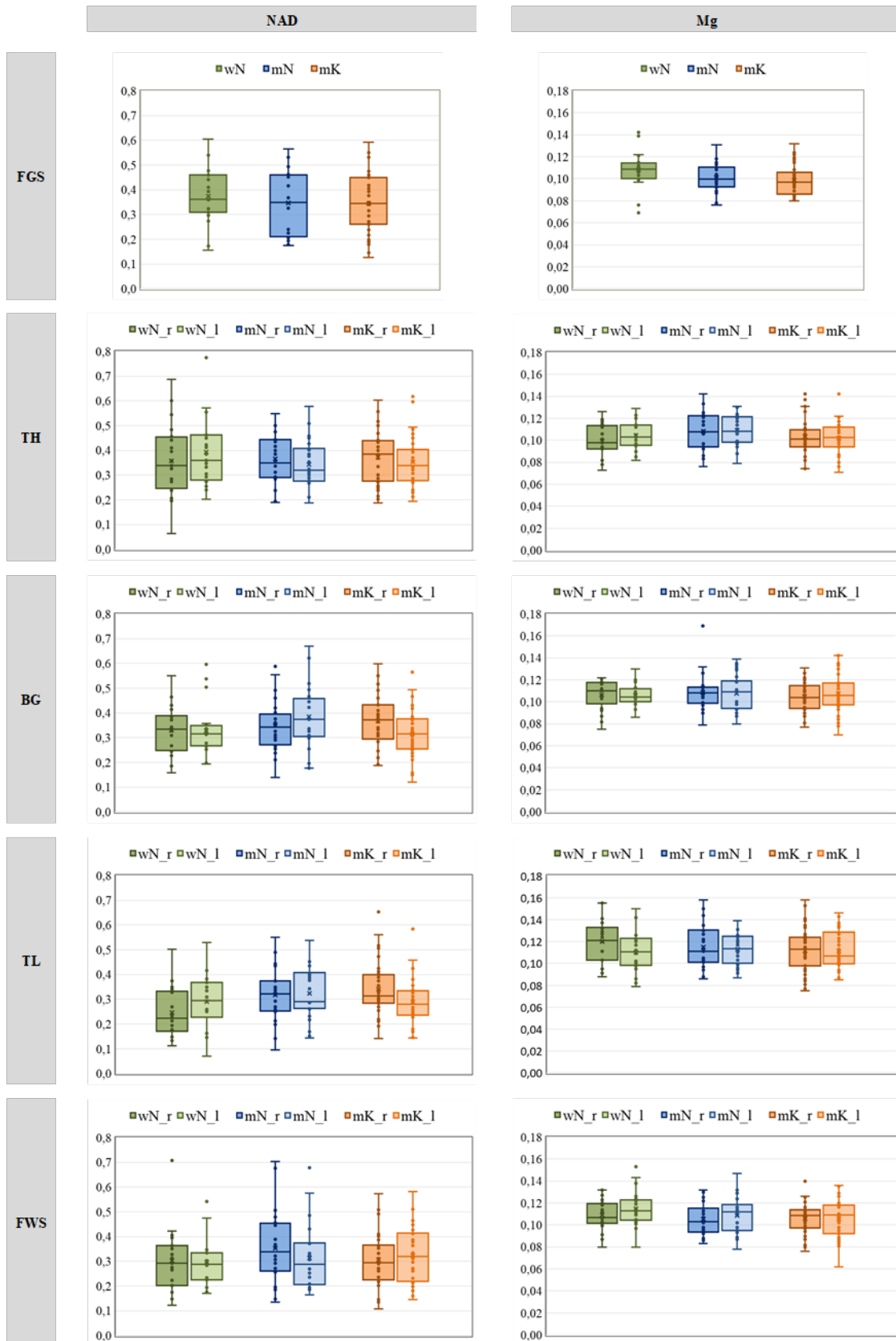


31P - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg



Anhang-Bild 1c

31P - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg

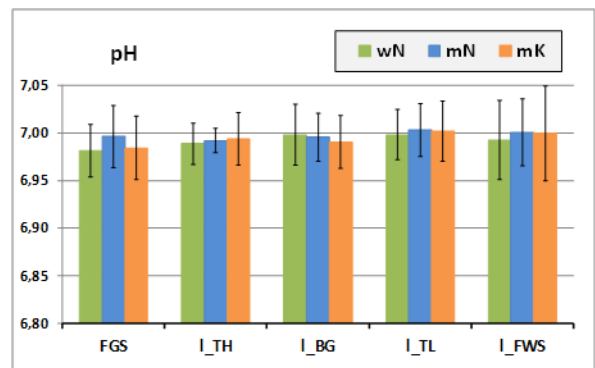
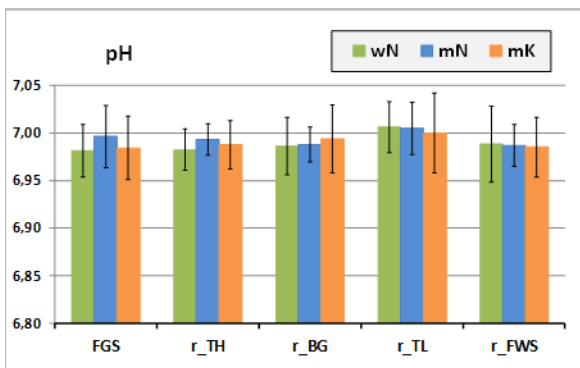
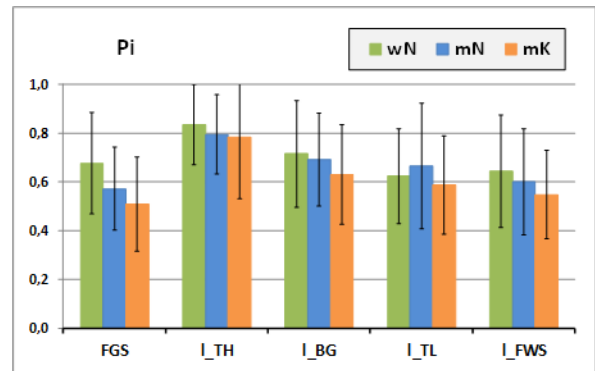
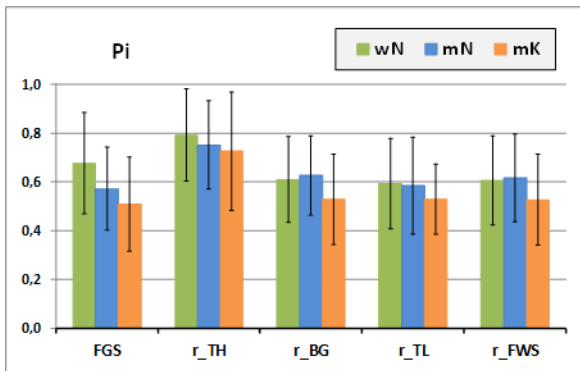
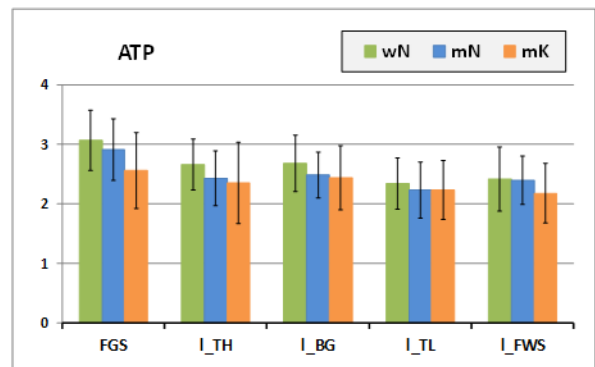
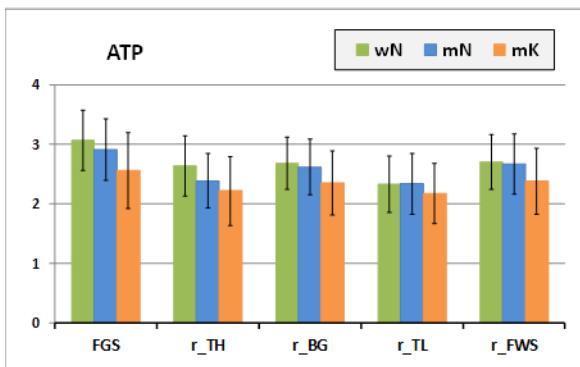
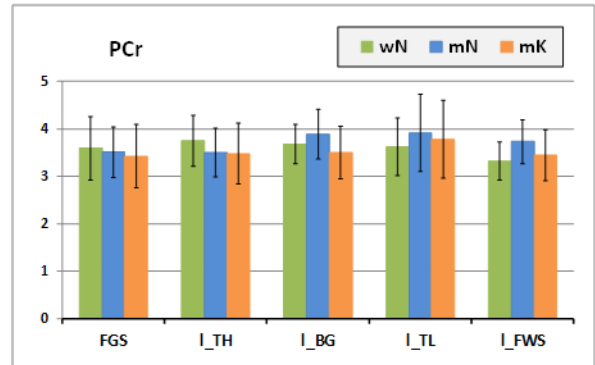
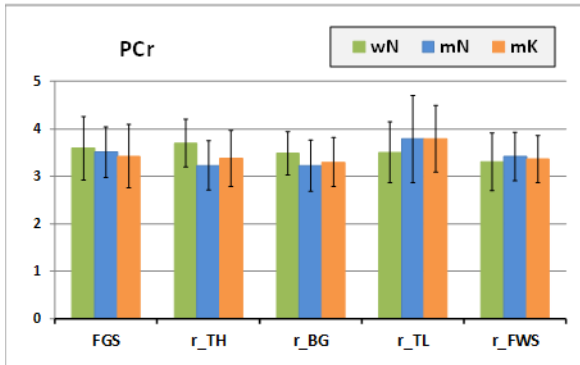


Anhang-Bild 1d

31P - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg

rechts

links

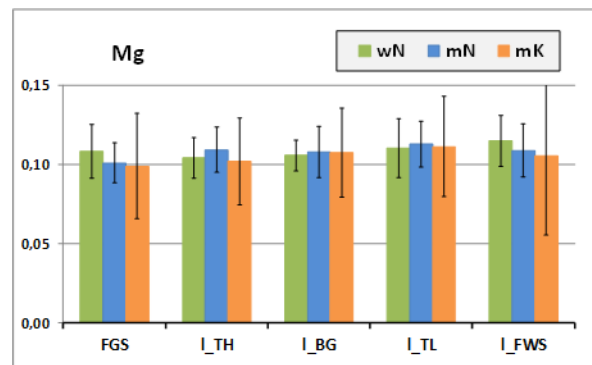
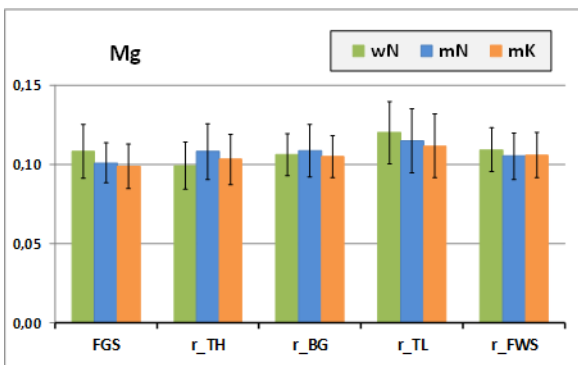
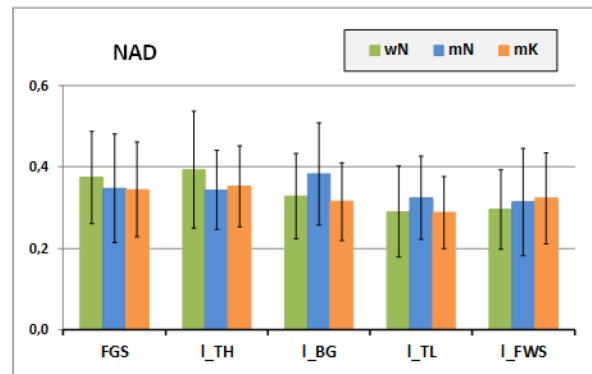
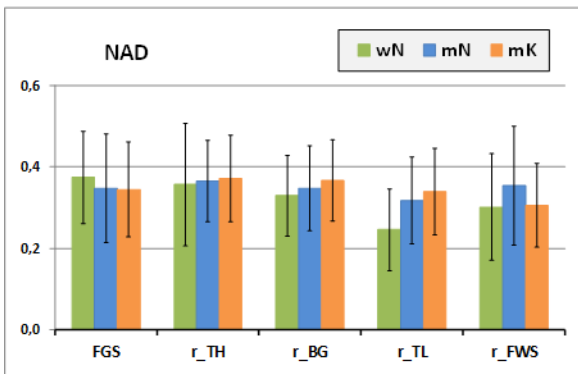
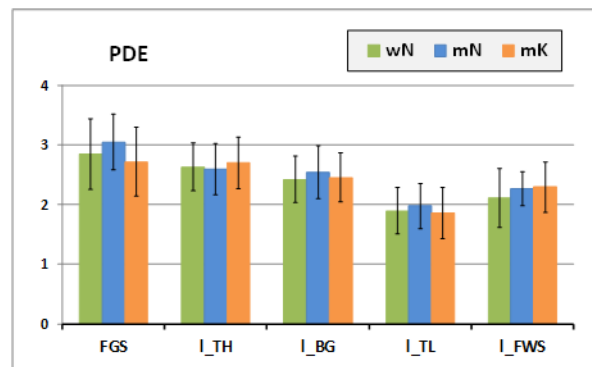
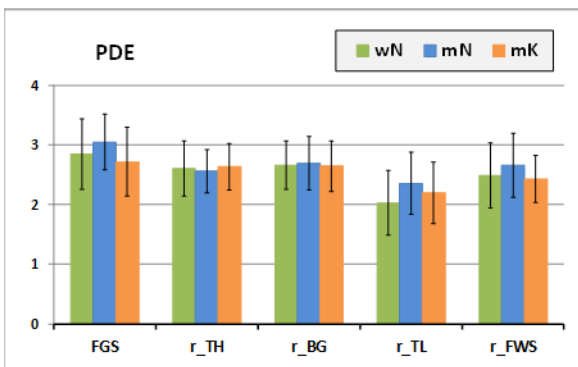
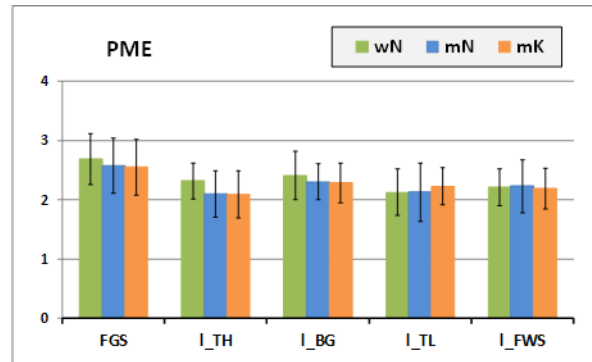
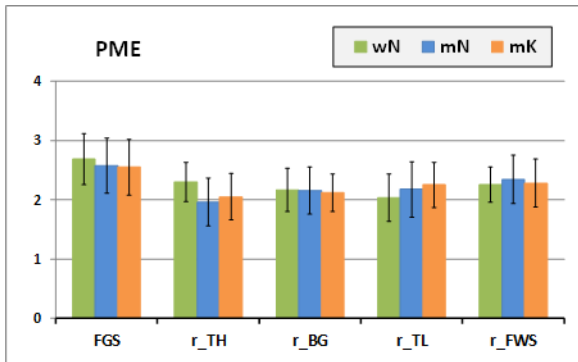


Anhang-Bild 2a

31P - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg

rechts

links

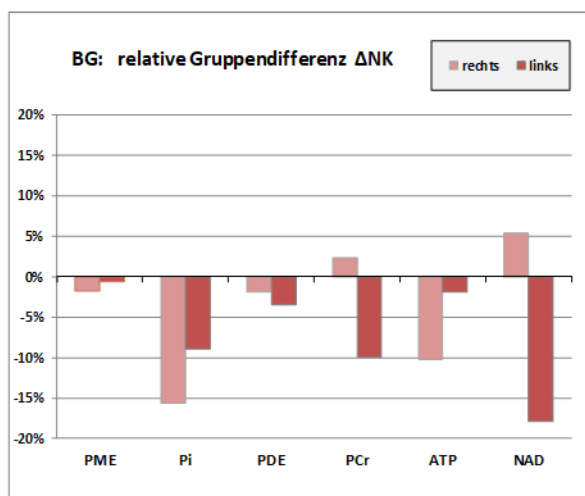
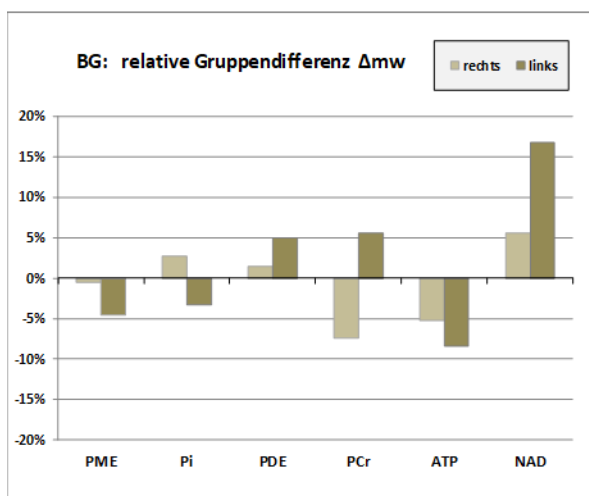
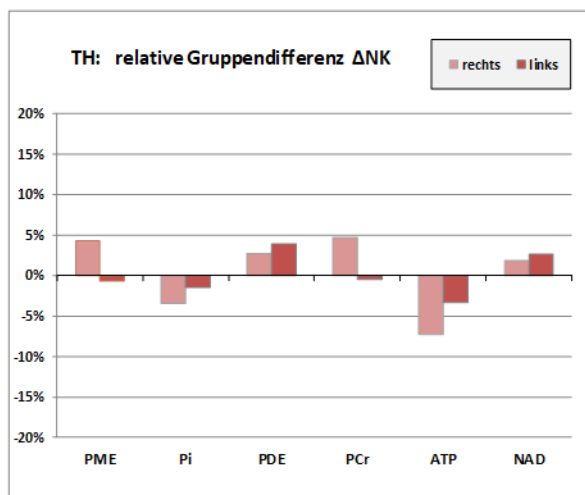
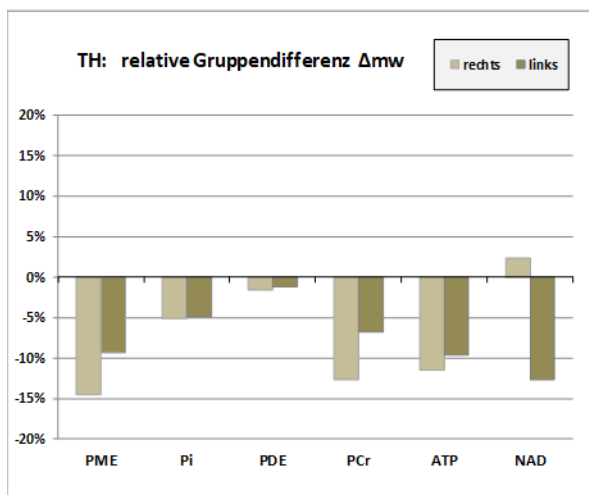
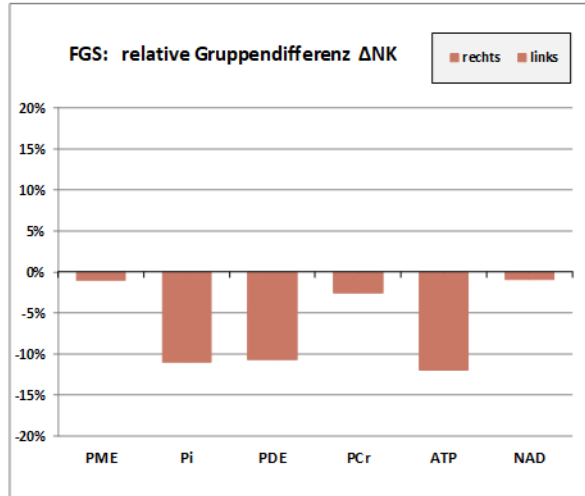
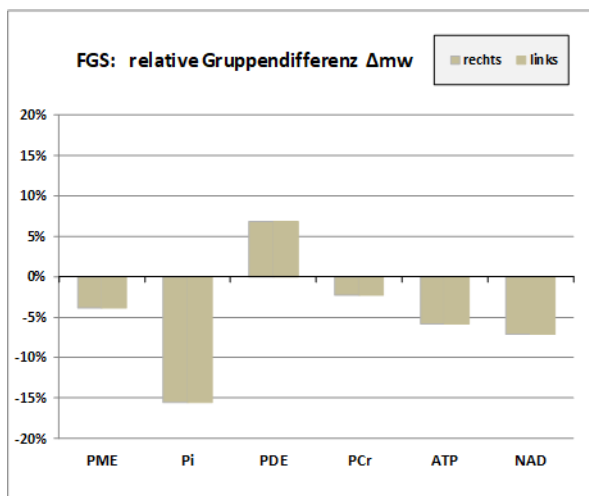


Anhang-Bild 2b

### 31P - Metaboliten: relative Gruppendifferenz

$$\Delta m_w = (m_N - w_N) / w_N$$

$$\Delta N_K = (m_K - m_N) / m_N$$

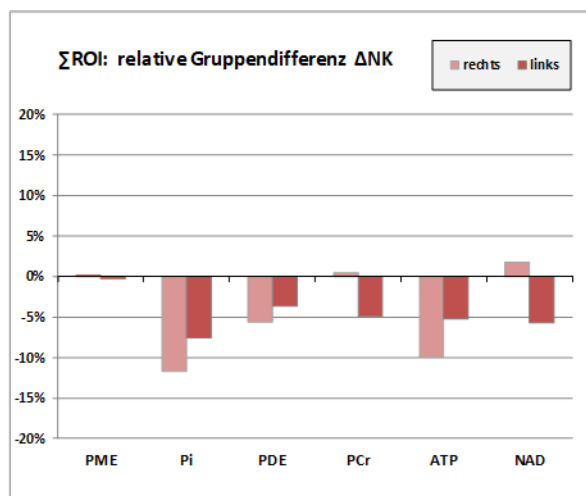
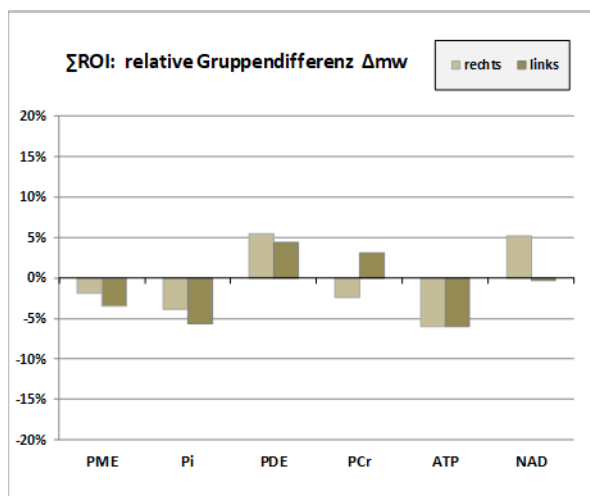
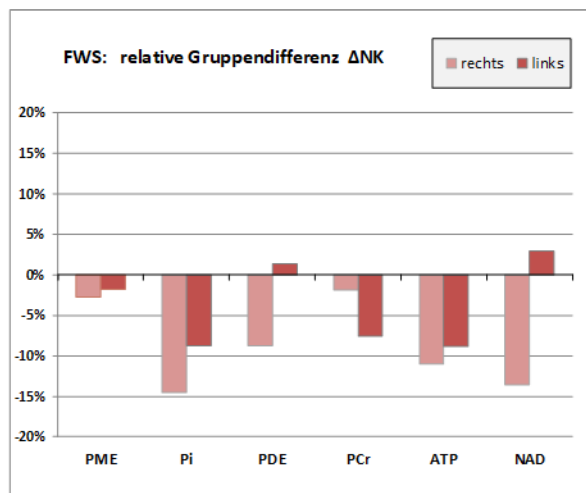
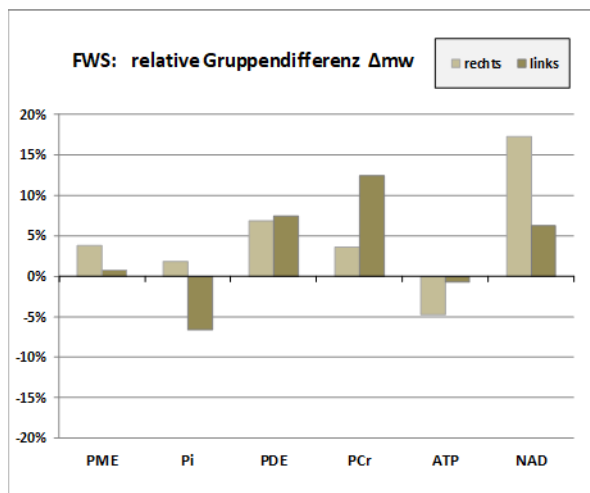
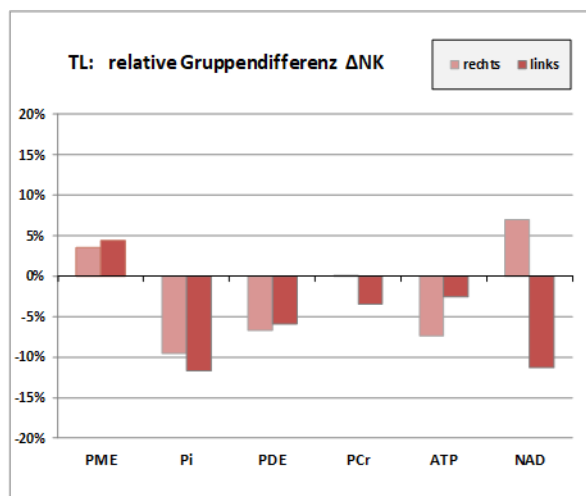
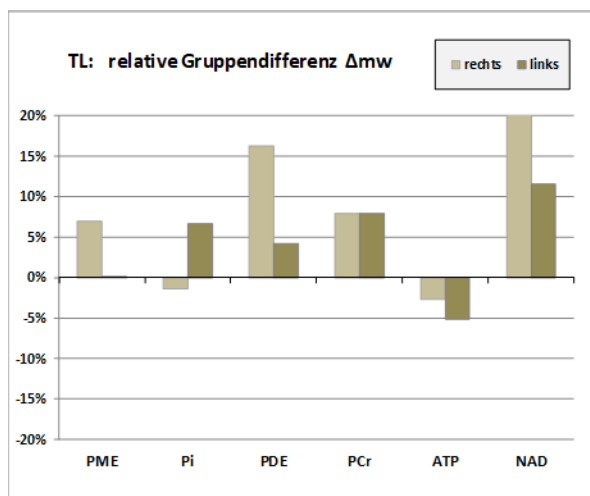


Anhang-Bild 3a

### 31P - Metaboliten: relative Gruppendifferenz

$$\Delta m_w = (m_N - w_N) / w_N$$

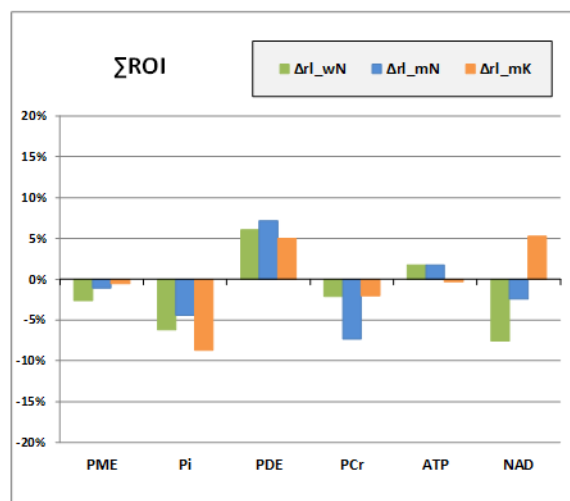
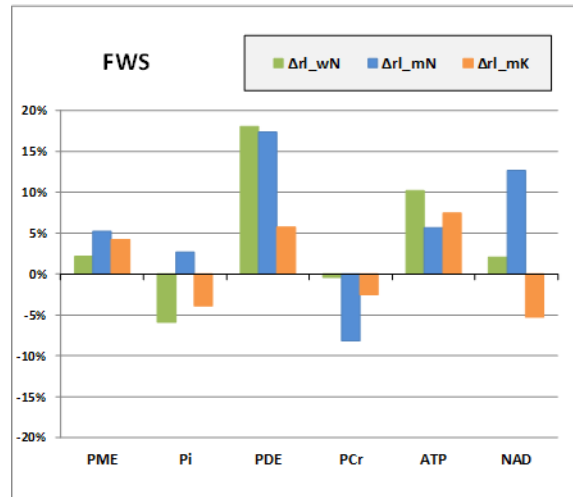
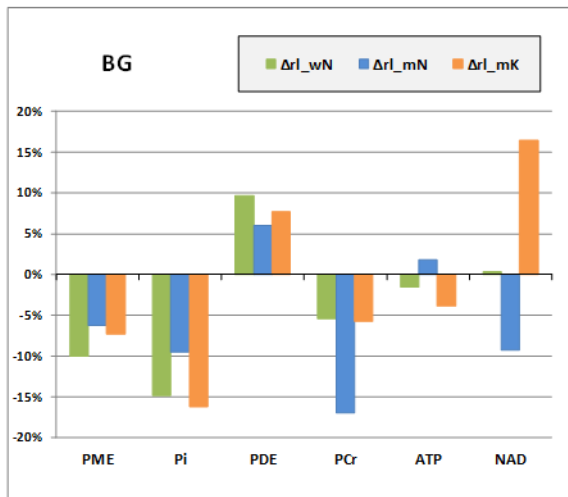
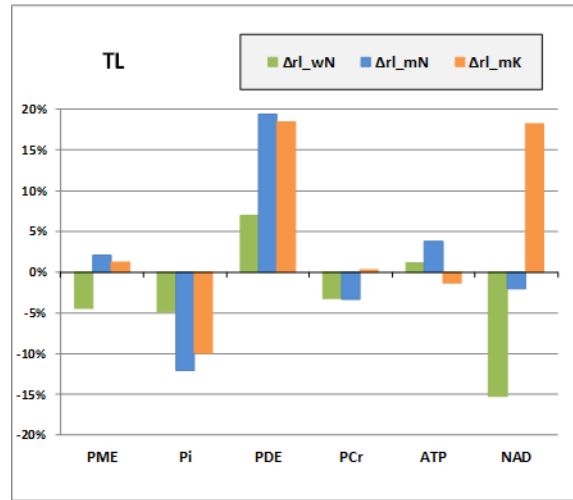
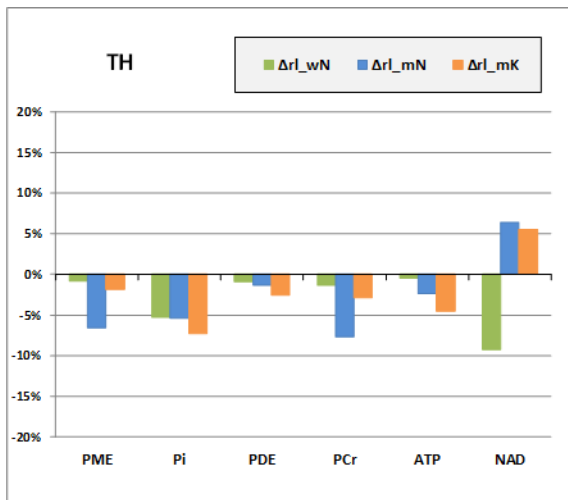
$$\Delta n_K = (m_K - m_N) / m_N$$



Anhang-Bild 3b

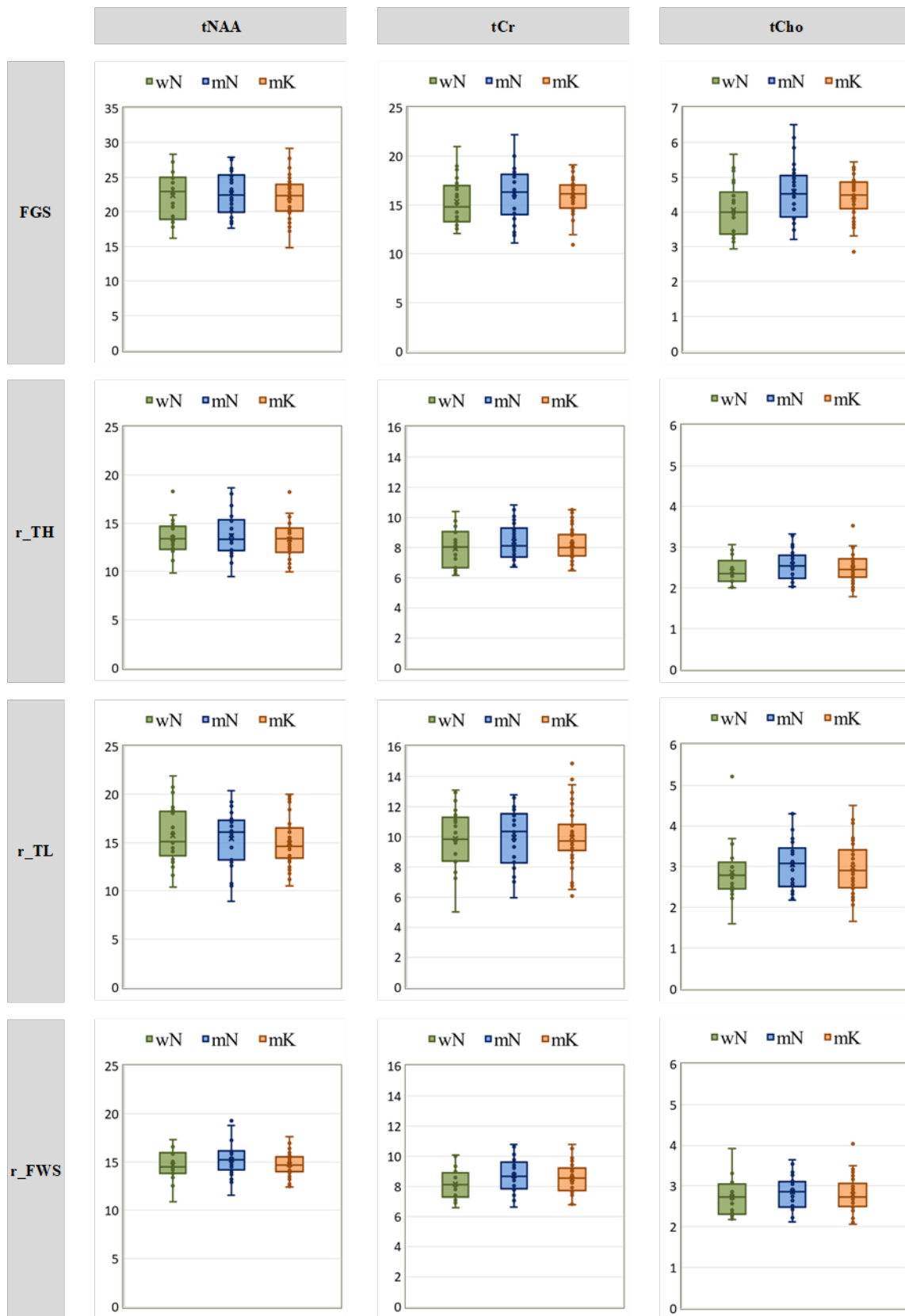
### 31P - Metaboliten: relative Seitendifferenz

$$\Delta r_l = (r_e - l_i) / r_e$$



Anhang-Bild 4

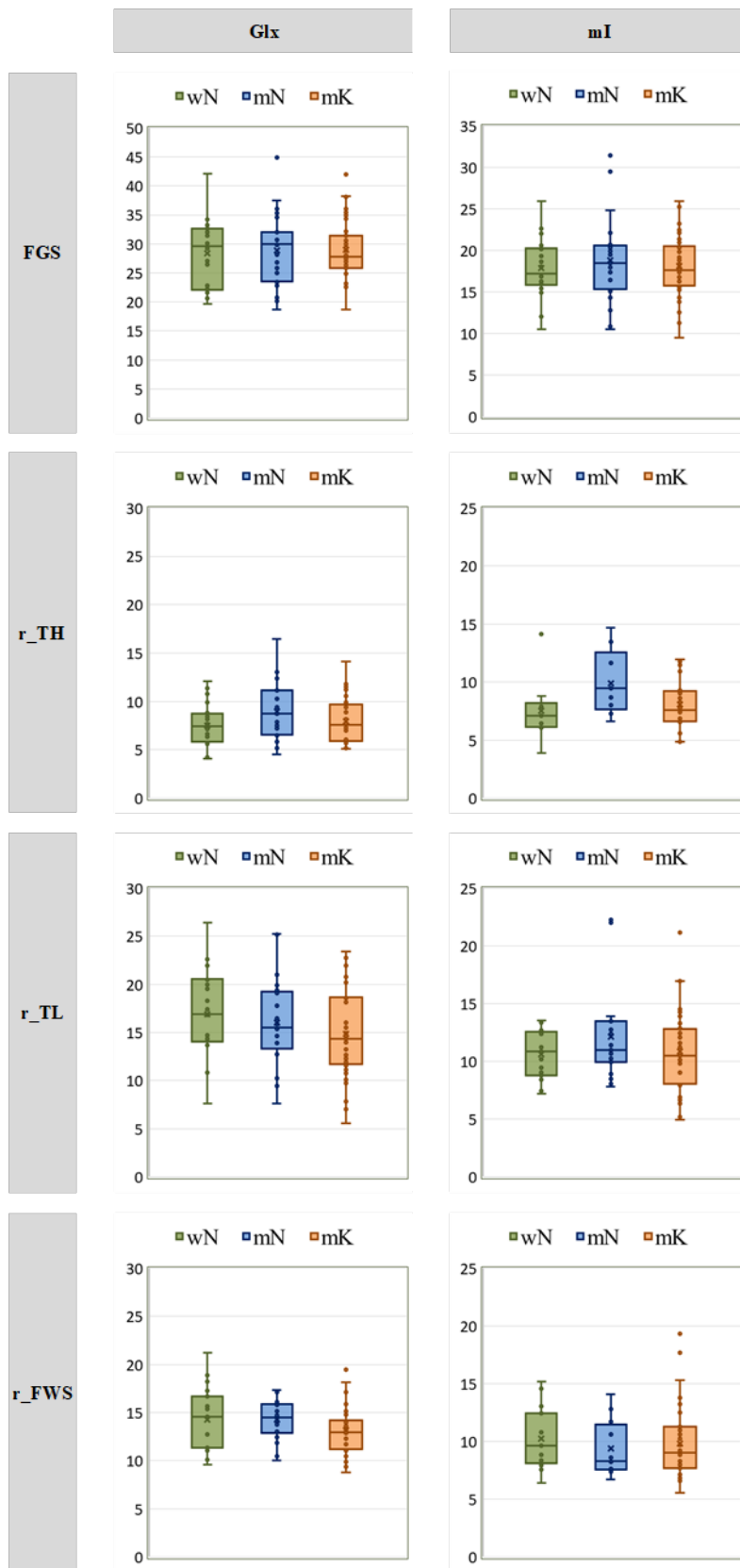
1H - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg



Anhang-Bild 5a

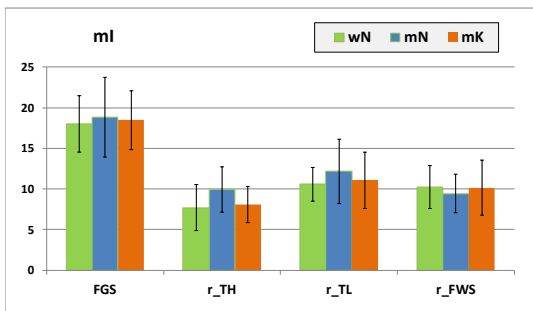
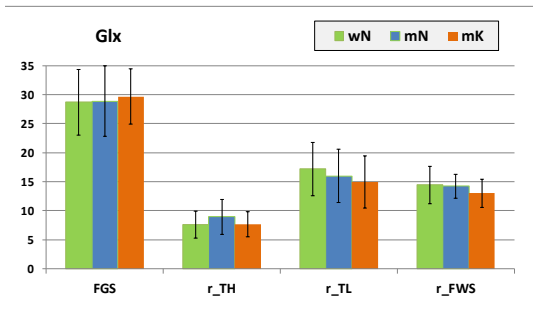
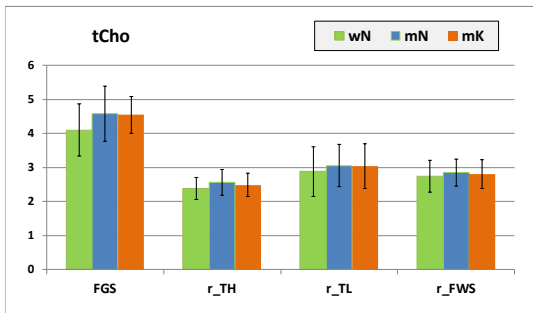
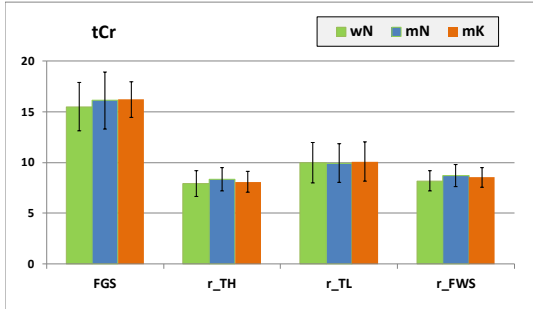
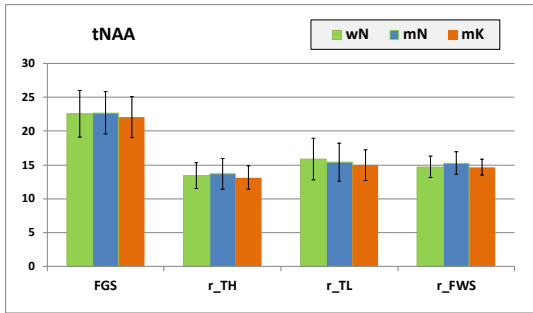


1H - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg



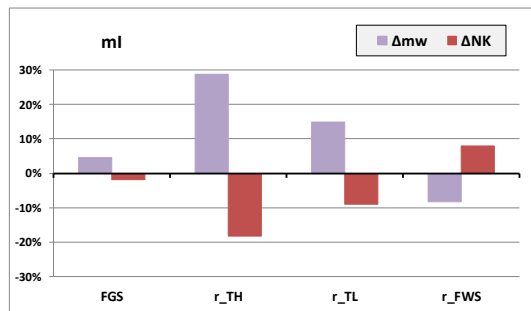
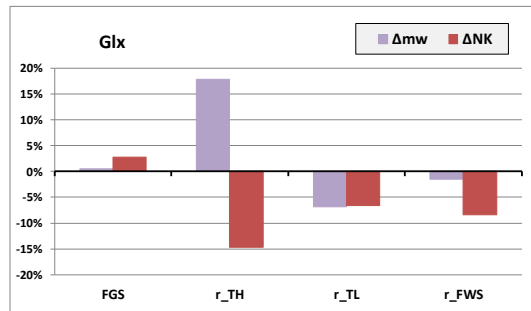
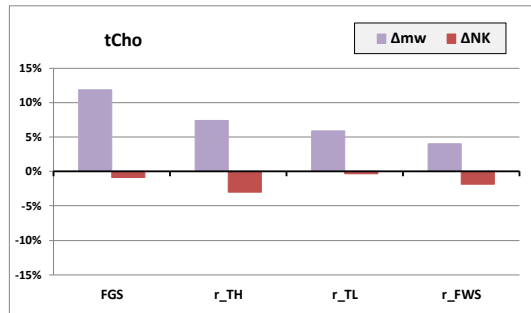
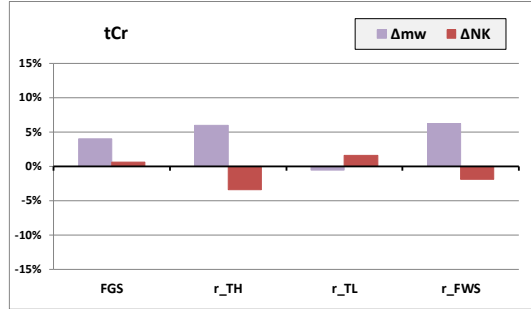
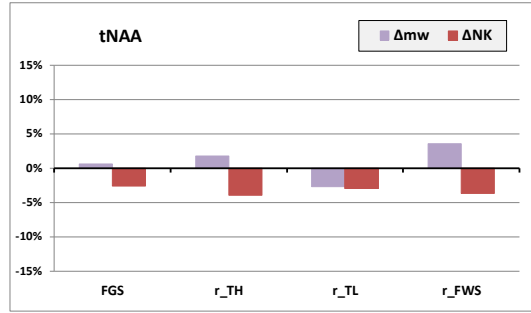
Anhang-Bild 5b

1H - Metaboliten - Konzentration in mmol/kg



Anhang-Bild 6

1H - Metaboliten - relative Gruppendifferenz



Anhang-Bild 7

## 9 Publikationen

Die Dissertation beruht auf der zugrundeliegenden Studie (siehe unten), die sich aktuell im Einreichungsprozess befindet.

### **Impact of cannabis use on brain metabolism using $^{31}\text{P}$ and $^1\text{H}$ magnetic resonance spectroscopy**

Maximilian Fenzl,<sup>1</sup> Martin Backens,<sup>1</sup> Silviu Bodea,<sup>2</sup> Miriam Wittmann,<sup>3</sup> Florian Werler,<sup>4</sup> Jule Brielmaier,<sup>5</sup> Robert Christian Wolf,<sup>4</sup> Wolfgang Reith<sup>1</sup>

- 1 Institute of Neuroradiology, Saarland University, 66421 Homburg, Germany
- 2 Helmholtz Zentrum Munich, German Research Center for Environmental Health Institute of Biological and Medical Imaging, 85748 Munich, Germany
- 3 Department of Psychiatry and Psychotherapy, Saarland University, 66421 Homburg, Germany
- 4 Department of General Psychiatry at the Center for Psychosocial Medicine, Heidelberg University, 69115 Heidelberg, Germany
- 5 Department of Obstetrics and Gynecology, RKH Clinic Ludwigsburg, 71640 Ludwigsburg, Germany

## 10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Reith für die Überlassung des Dissertationsthemas und die stets sehr hilfreiche Beratung und konstruktive Unterstützung. Die zugrundeliegende Studie stellte die erste in diesem Themenbereich am Universitätsklinikum des Saarlandes dar und öffnet hoffentlich weitere Forschungsanwendungen in der Zukunft.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Martin Backens. Sein unermüdlicher und sehr zeitintensiver Einsatz für die Realisierung dieser komplexen Studie kann an dieser Stelle nicht genug wertgeschätzt werden. Sein physikalisches Expertenwissen und seine stets kompetente, umfangreiche und sympathische Betreuung ließen sowohl die Studie als auch die Dissertation zu einem außergewöhnlichen Forschungsprojekt werden.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Silviu Bodea bedanken für die motivierte Mitarbeit und Unterstützung bei der Auswertung der Studie. Die Zusammenarbeit hat sehr viel Spaß gemacht und ich hoffe, er bleibt der medizinischen Forschung weiterhin verbunden.

Ein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter der Abteilung der Neuroradiologie für ihre Geduld und ihr Verständnis, wenn unsere Untersuchungen manchmal länger dauerten und den klinischen Alltag verzögerten.

Das Arbeitsklima war stets angenehm und hochprofessionell, alle Beteiligten waren hochmotiviert, die bestmöglichen Daten mit dieser komplexen Untersuchungstechnik zu akquirieren. Einen herzlichen Dank an alle Studienteilnehmer, die zuverlässig und interessiert zu den Untersuchungsterminen erschienen sind und die 1.5h lange Untersuchung im MRT tolerierten.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer hinter mir stand und mich in schwierigen Zeiten unterstützt hat, sodass ich die Promotion letztlich abschließen konnte. Der Weg hierhin war kein leichter, aber er ist geschafft.

## **11 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

**Tag der Promotion:** 28.11.2022  
**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger  
**Berichterstatter:** Prof. Dr. Wolfgang Reith  
Prof. Dr. Sven Gottschling