

Zentralinstitut für Seelische Gesundheit  
Abteilung Neuroradiologie  
Roger Seitz, Assistenzarzt

## **Forschungsförderung durch die Hirnliga e.V.**

Antrags Nr. 2006 - 075 M- MA

Forschungsthema: *Hochfeld- (3T) Diffusionstensor -Bildgebung zur Prüfung von Hypothesen zur Pathophysiologie bei vaskulärer Demenz*

Forschungsinstitution: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim  
Abteilung für Neuroradiologie (Leitung: Prof. Dr. F. Hentschel)

Umfang der Förderung durch die Hirnliga: e.V.: 20 000.- EUR

Forschungszeitraum: 1.10.2006 bis 31. Mai 2007

### Untersuchungs- und Ergebnis-Bericht

#### 1. Fragestellungen der Untersuchung

Die Diffusions-Tensor-Bildgebung ist eine innovative Weiterentwicklung der diffusionsgewichteten MRT-Untersuchung. Die Methode ermöglicht es, das Ausmaß und die Richtungsabhängigkeit der spontanen, temperaturabhängigen Bewegung bzw. der Diffusion von gebundenen und ungebundenen Atomen mit Kernspin darzustellen. Dadurch gelingt es u.a. auch, das Ausmaß und die Richtungsabhängigkeit der Wasserdiffusion (der Bewegung gebundener Atome) zu erfassen, die im menschlichen Gewebe je nach örtlicher Zusammensetzung und Zustand in allen drei Raumrichtungen mehr oder weniger eingeschränkt, d.h. anisotrop ist.

Zwei Messgrößen, mit denen das Ausmaß der Diffusion und der Anisotropie für ein Volumen des Gewebes beschrieben werden kann, sind die mittlere Diffusivität (MD) und die fraktionale Anisotropie (FA). Sie hängen sowohl vom Zustand als auch vom Ort innerhalb des untersuchten Gewebes ab. Diese beiden Messgrößen sind u.a. dazu geeignet, Anteile des limbischen Systems im frontalen Marklager zu untersuchen. Diese Strukturen sind für kognitive Fähigkeiten von Bedeutung. Bei Schädigungen dieser Strukturen ergibt sich eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten, welche durch neuropsychologische Testverfahren beschreibbar ist.

Die physikalischen Grundlagen der Messung der mittleren Diffusivität (MD) und der fraktionalen Anisotropie (FA) sind im Antrag zum Forschungsprojekt unter Punkt 2, auf Seite 2 bis Seite 5 des Antrags, bereits dargelegt und werden hier noch einmal wiederholt.

Mit Hilfe der Magnetresonanz und gepulsten magnetischen Gradientenfeldern lässt sich die Diffusion von Atomen mit Kernspin in einer vorgegebenen Richtung sichtbar machen. Meßbar wird die Diffusion durch den Einsatz definierter Gradienten zur Dephasierung und Rephasierung, die vor den eigentlichen Bildgradienten nacheinander invers geschaltet werden. Dadurch kommt es dort, wo die mr-signalgebenden Atome diffundieren können, zu einem Signalverlust, der von dem sogenannten b-Wert abhängt. In den b-Wert gehen das gyromagnetische Verhältnis, die Gradientenamplitude und die Gradientendauer ein. Das Verhältnis zwischen dem Signal mit Gradientenschaltung ( $S$ ,  $b > 0$ ) und dem Signal ohne Gradientenschaltung ( $S_0$ ,  $b = 0$ ) ergibt sich wie folgt in Abhängigkeit von dem b-Wert und der Diffusionskonstanten ( $D$ ) in Gradientenrichtung (Stejskal EO et al., 1968):

$$(1) \quad S = S_0 * e^{-bD}$$

Praktisch reduziert sich das lokale Bildsignal je nach Stärke der Diffusion und der Gradienten zur De- und Rephasierung. Stellt man den Signalverlust in Abhängigkeit des b-Wertes logarithmisch dar, so erhält man eine von  $S_0$  ausgehende abfallende Gerade, deren negative Steigung der Diffusionskonstanten entspricht:

$$(2) \quad \ln(S) = -D*b + \ln(S_0) \quad \Rightarrow \quad D = -1/b * \ln(S/S_0)$$

Die Diffusionskonstante in Gradientenrichtung kann somit nach Gleichung (2) aus  $S_0$ ,  $b$  und  $S$  berechnet werden. Werden die Gradienten zunächst nicht ( $b=0$ ) und dann jeweils einzeln nacheinander in den drei Raumrichtungen geschaltet, so kann die mittlere Diffusivität als arithmetisches Mittel der drei Diffusionskonstanten gewonnen werden:

$$(3) \quad MD = (D_{xx} + D_{yy} + D_{zz})/3 \quad [\text{mm}^2/\text{s}]$$

Da die Faserverläufe im Hirngewebe räumlich stark unterschiedlich sind, sind die Werte der mittleren Diffusivität bei Messung in nur drei Raumrichtungen stark von der Projektion der Faserverläufe auf die verwendeten Gradientenrichtungen abhängig. Um dieses Problem zu beheben wird ein komplexeres Aufnahmeschema eingesetzt, das Anregungen in sechs unterschiedlichen Gradientenrichtungen ( $b > 0$ ) und ein nicht-diffusions-gewichtetes Bild ( $b = 0$ ) umfaßt. Diese Diffusionsmessungen erlauben die Bestimmung der sechs voneinander unabhängigen Elemente des Diffusionstensors bzw. die Diffusionskonstanten  $D_{xx}$ ,  $D_{yy}$ ,  $D_{zz}$ ,  $D_{xy}$ ,  $D_{xz}$ ,  $D_{yz}$ , aus denen wiederum die restlichen drei abhängigen Tensorelemente  $D_{yx}$ ,  $D_{zx}$ ,  $D_{zy}$  und somit alle Elemente des Diffusionstensors bestimmt werden können. Die für die einzelnen Bildpunkte gemessenen Diffusionstensoren müssen anschließend diagonalisiert werden, um die intrinsischen Eigenschaften der Diffusion in dem untersuchten Bildpunkt zu erhalten (Pierpaoli C et al., 1996). Durch die Verwendung von mehr als sechs Gradientenrichtungen kann das Signal-Rausch-Verhältnis noch verbessert werden.

Die Anisotropie kann auch als Abweichung der Form des Tensorellipsoids von der Form einer Kugel (isotrope Diffusion) verstanden werden. Mathematisch ausgedrückt heißt das, daß die Diffusion umso anisotroper ist, je stärker die Eigenwerte des Diffusionstensors voneinander abweichen. Eine der Messgrößen zur Beschreibung der Anisotropie der Diffusion ist die fraktionale Anisotropie (FA), die sich aus den Standardabweichungen der drei Eigenwerte des Diffusionstensors wie folgt ableiten läßt:

$$(4) \quad FA = \frac{\sqrt{3}}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_2 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_3 - \bar{\lambda})^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

Sie hat einen Wertebereich von 0 (Isotropie) bis 1 (maximale Anisotropie).

$\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$  bezeichnen die drei Eigenwerte des Diffusionstensors in dem jeweiligen Bildpunkt.  $\lambda$ -quer bezeichnet den Mittelwert der drei Eigenwerte, der gleichzusetzen ist mit der richtungsgemittelten Diffusionskonstanten (Jellison BJ et al., 2004).

Man geht davon aus, daß eine Verringerung der FA des Hirngewebes einem Verlust von struktureller und funktioneller Intaktheit des Gewebes entspricht. Eine FA-Minderung kann schon dann feststellbar sein, wenn in der strukturellen Bildgebung noch keine Veränderungen zu erkennen sind. In unterschiedlichen Studien wird die Reduktion der Integrität in verschiedenen Lokalisationen der weissen Substanz bei den verschiedensten Krankheitsprozessen, u.a. Schizophrenie (Hao Y et al., 2006), Multipler Sklerose (Rovaris M et al., 2005) und Depression (Nobuhara K et al., 2006) mit Hilfe der DTI bei 1,5 Tesla, nachgewiesen.

Zu bisherigen Studien, welche sich mit einer erhöhten Diffusivität und einer reduzierten fraktionalen Anisotropie im Marklager im Rahmen von normalen altersbedingten Veränderungen und der Entwicklung einer Demenzerkrankung beschäftigen, ist Folgendes zu erwähnen.

In dem größten Teil der bisherigen Studien auf diesem Gebiet, wurde DTI bei 1,5 Tesla angewendet. Dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden:

Altersabhängige Veränderungen der weissen Substanz bestehen in der Abnahme der fraktionalen Anisotropie u. a. im frontobasalen und anterioren Marklager in einer Größenordnung von 0,40 (+/-0,04) für junge Erwachsene (21-39 LJ) und 0,30 (+/-0,05) für ältere Erwachsene (> 60 LJ) (Salat DH et al., 2005).

Bei geringen kognitiven Beeinträchtigungen (MCI) wurden die MD und FA im Hippokampus im Vergleich mit Gesunden untersucht (Müller MJ et al., 2005). Sie fanden eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Zunahme der hippokampalen Diffusivität bei MCI-Patienten ( $n=18$ , MD: 924 +/- 132) im Vergleich mit Gesunden ( $n=18$ , MD: 829 +/- 25). Bezüglich der fraktionalen Anisotropie im Hippokampus wurde ebenfalls ein signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied der Mittelwerte festgestellt (FA bei MCI = 0,34 +/- 0,05 vs. FA bei Gesunden = 0,41 +/- 0,05). Diese Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der im Hippokampus (als Teil des limbischen Systems) gemessenen MD und FA um sensitive frühzeitige Indikatoren einer dementiellen Entwicklung handelt. Ähnliche Ergebnisse wurden für den posterior cingulate fasciculus bei Patienten mit M. Alzheimer ( $n=25$ ) und MCI-Patienten ( $n=17$ ) im Vergleich mit Gesunden ( $n=21$ ) gefunden (Fellgiebel A et al., 2005). Hier ergaben sich signifikante Unterschiede der MD und FA ( $p < 0,05$ ) im Gruppenvergleich zwischen MCI-Patienten und Gesunden und hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) Unterschiede im Vergleich zwischen Patienten mit M. Alzheimer und Gesunden.

Bozzali M et al. (2002) fanden hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) Unterschiede der MD und der FA im frontalen Marklager bei Patienten mit M. Alzheimer ( $n=16$ ) im Vergleich mit Gesunden ( $n=10$ ) (MD bei M. Alzheimer: 0,93 +/- 0,11 vs. MD bei Gesunden: 0,80 +/- 0,05 und FA bei M. Alzheimer: 0,21 +/- 0,03 vs. FA bei Gesunden 0,29 +/- 0,06).

Ebenfalls im frontalen Marklager fanden Sugihara S et al. (2004) hochsignifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede der FA im Gruppenvergleich von Patienten mit vaskulärer Demenz ( $n=20$ ) mit

Gesunden (n=10) (FA bei vaskulärer Demenz: 0,16 +/- 0,06 vs. FA bei Gesunden: 0,44 +/- 0,06).

O'Sullivan M et al. (2001) untersuchten die MD und die FA bei ischämischer Leukoaraiose (n=29) in Regionen der weissen Substanz, die in der strukturellen Bildgebung normal erschienen. Dabei haben sie für das anteriore periventriculäre Marklager hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) Unterschiede im Gruppenvergleich mit Gesunden (n=17) gefunden (MD bei Leukoaraiose: 0,86 +/- 0,04 vs. MD bei Gesunden: 0,81 +/- 0,04 und FA bei Leukoaraiose: 0,29 +/- 0,05 vs. FA bei Gesunden: 0,34 +/- 0,04).

Eine Sonderform der vaskulären Demenz stellt die sogenannte 'Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy' (CADASIL) dar. O'Sullivan M et al. (2004) haben die MD und die FA bei nichtdementen CADASIL-Patienten (n=18) im anterioren periventriculären Marklager im Vergleich mit Gesunden (n=12) bestimmt. Dabei fanden sie hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) Unterschiede für die MD und knapp nicht signifikante Unterschiede für die FA ( $p = 0,06$ ).

Ähnliche Ergebnisse mit hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) Unterschieden im Gruppenvergleich von Patienten und Gesunden wurden bei präsymptomatischem M. Huntington (Reading SA et al., 2005) und Lewy-Body-Demenz (Bozzali M et al., 2005) für die MD und die FA im frontalen Marklager gefunden.

Aus den Ergebnissen der oben genannten Forschungsarbeiten lässt sich folgern, dass die Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) zur Quantifizierung der MD und FA aufgrund ihrer hohen Sensitivität schon frühzeitig strukturelle und funktionelle Veränderungen des Hirngewebes erfassen kann und somit als diagnostisches Instrument in der Früherkennung von Demenz eingesetzt werden kann.

Die Darstellung der Anisotropie der Wasserdiffusion mittels DTI gelingt besonders gut bei starker Diffusionsgewichtung, wie sie bei Anwendung an einem MRT-Gerät mit hohen Gradientenstärken (40mT/m) und hoher statischer Magnetfeldstärke (3 Tesla) gegeben ist.

In bisherigen Studien bei Demenzerkrankungen - sowohl bei M. Alzheimer als auch bei vaskulärer Demenz - wird das frontale Marklager fast ausschließlich mit DTI bei 1,5 Tesla untersucht. In einigen wenigen Studien bei Patienten mit M. Alzheimer, u.a. von Takahashi et al. (2002), wird DTI mit 3 Tesla angewendet. Dabei werden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden gefunden, was u. U. mit der geringen Anzahl von Untersuchungspersonen zusammenhängt.

In der hier berichteten Studie wurde bei Patienten mit vaskulärer Demenz ein MRT-Gerät mit hoher Magnetfeldstärke (3 Tesla) zur Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) eingesetzt.

Ziel der Studie war es dabei, die DTI bei vaskulärer Demenz mit weiteren, bisher am ZI eingesetzten bildgebenden Methoden zur Diagnostik der vaskulären Demenz zu vergleichen.

Eine spezielle Ausrichtung der Arbeiten am ZI liegt in der Quantifizierung mikroangiopathischer Läsionen der weissen Substanz (white matter lesions, WML) mittels eines eigens entwickelten und auf Reliabilität geprüften Scores in der strukturellen Bildgebung. Dabei wurden im diagnostisch relevanten Altersbereich zwischen 55 und 80 Jahren zwischen Patienten mit vaskulärer Demenz und Gesunden signifikante Unterschiede

der Ausprägung der mittleren WML-scores in allen untersuchten Marklagerregionen gefunden. Durch die Quantifizierung der WML wurde die Diagnostik mikroangiopathischer Läsionen von einer erfahrungsbasierten in eine objektive Diagnostik überführt (Hentschel et al., 2005). Außerdem wurde in der Vergangenheit am ZI der diagnostische Beitrag der Magnetization transfer Ratio zur Differenzierung von vaskulärer und Alzheimer-Demenz untersucht (Hentschel et al., 2004).

In der hier berichteten Studie sollte vor allem die von bisherigen Forschungsarbeiten abgeleitete hypothetische Erwartung überprüft werden, dass die bei der Diffusions-Tensor-Bildgebung gewonnenen Messgrößen mittlere Diffusivität (MD) und fraktionale Anisotropie (FA) eine Validität für die Erfassung mikroangiopathischer Veränderungen bei vaskulärer Demenz besitzen. Diese Überprüfung sollte zum Einen dadurch erfolgen, dass die Scores für diese beiden Messgrößen mit dem Scores für die in bisherigen Arbeiten des ZI herangezogene Messgröße WML verglichen werden. Diese Messgröße hat sich als valide Grundlage zur Trennung zwischen Patienten mit vaskulärer Demenz und gesunden Personen erwiesen. Zum Anderen sollte die betreffende Validität der Messgrößen MD und FA durch die Übereinstimmung ihrer Scores mit den Ergebnissen in neuropsychologischen Tests überprüft werden. Die Ergebnisse in den neuropsychologischen Tests stellen insofern ein Kriterium für vaskuläre Demenz dar als sie mit einer Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten als Folge von vaskulärer Demenz in Zusammenhang stehen.

Insgesamt diente die Untersuchung der Überprüfung folgender Hypothesen.

- (1) Die mittlere Diffusivität in den untersuchten Regionen im frontalen Marklager und die fraktionale Anisotropie in den untersuchten Regionen im frontalen Marklager stehen in Zusammenhang mit der durch den WML-Score erfassten Ausprägung subkortikaler vaskulärer mikroangiopathischer Veränderungen.
- (2) Die Zunahme der mittleren Diffusivität in den untersuchten Regionen und die Abnahme der fraktionalen Anisotropie in den untersuchten Regionen stehen in Zusammenhang mit der Abnahme kognitiver Fähigkeiten, welche durch neuropsychologische Testverfahren erfasst werden.
- (3) Der WML-Score korreliert mit den Ergebnissen in neuropsychologischen Testverfahren.

Der Vergleich zwischen den Messgrößen MD und FA einerseits und dem WML-Score andererseits sollte nach der Extremgruppen-Methode erfolgen. Dabei wird nach der Ausprägung des WML-Scores eine Gruppe von Personen mit stark ausgeprägter vaskulärer Schädigung einer Gruppe von Personen mit gering ausgeprägter vaskulärer Schädigung gegenüber gestellt und es wird überprüft, ob sich die durchschnittlichen Ausprägungen der jeweiligen Messgrößen zwischen den beiden Gruppen signifikant unterscheiden. Zusätzlich sollten auf der Basis aller Untersuchungspersonen auch die Korrelationen zwischen dem WML-Score und den übrigen Messgrößen berechnet werden.

Der Vergleich der Messgrößen MD und FA mit den Ergebnissen der neuropsychologischen Testverfahren und der Vergleich des WML-Scores mit den Ergebnissen der neuropsychologischen Testverfahren sollte nach der Strategie der Übereinstimmungs-Validität erfolgen. Dabei werden auf der Basis aller Untersuchungspersonen die Korrelationen

zwischen den betreffenden Messgrößen berechnet. Zusätzlich sollten auf der Basis aller Untersuchungspersonen auch die Korrelationen zwischen dem WML-Score und den übrigen Messgrößen berechnet werden.

Über den gemäß Forschungsantrag im Vordergrund stehenden hypothesengeleiteten Vergleich zwischen Diffusionstensor-Bildgebung, WML-Score und neuropsychologischen Testverfahren hinaus wurden in die Untersuchung noch weitere innovative quantitative Untersuchungsansätze einbezogen. Dies sind die Bestimmung des Magnetization transfer Ratio (MTR), dessen diagnostischer Beitrag zur Differenzierung zwischen vaskulärer und Alzheimer-Demenz in der Vergangenheit am ZI untersucht wurde (Hentschel et al., 2004) und die zur Erfassung von Hirngewebeschädigungen geeignete Spektroskopie (single voxel spectroscopy).

## 2. Untersuchungsbedingungen

Es wurden 33 Personen (15 weibliche, 18 männliche) im Alter zwischen 53 und 88 Jahren untersucht. Die Rekrutierung erfolgte aus einem Pool früher an der Gedächtnisambulanz des ZI (mit den Methoden Klinik, Laborklinik, neuropsychologische Testverfahren, MRT-Bildgebung) untersuchter Personen.

Von den untersuchten Personen wurden 2 Personen wegen durch die Untersuchung festgestellter anderweitiger pathologischer Befunde (Zustand nach Schädelhirntrauma mit intracerebraler Kontusionsfolge) ausgeschieden.

Für jede der 31 verbliebenen Untersuchungspersonen lag eine im Konsens festgestellte, klinisch, neuropsychologisch und durch MRT-Bildgebung gestützte diagnostische Zuordnung als "gesund" oder als "Patient" vor.

Da im Zeitraum zwischen der früheren Untersuchung an der Gedächtnisambulanz und der hier berichteten Untersuchung sich Veränderungen des Gesundheits-/Krankheits-Zustandes der Personen ergeben haben können und dann die frühere Einordnung einer Person (als "gesund" oder "Patient") heute keine Gültigkeit mehr besitzen würde, erschien ein Extremgruppen-Vergleich auf der Grundlage der früheren Gruppierung nicht sinnvoll. Statt dessen wurden die 31 verbliebenen Personen aufgrund ihres in der hier berichteten Studie ermittelten WML-Scores, welcher ein Validitäts-Kriterium für vaskuläre Demenz darstellt, in zwei Extremgruppen eingeteilt.

Dabei erfolgte die Gruppen-Trennung am Median des WML-Scores. Dieser lag bei dem Wert 17. Danach ergaben sich folgende Extremgruppen:

- "Hoch-Geschädigte", d.h. Personen mit ausgeprägten subkortikalen vaskulären mikroangiopathischen Veränderungen (WML-Score  $\geq 17$ ), 7 weibliche, 8 männliche Personen im Alter zwischen 66 und 87 Jahren, Durchschnittsalter 79 Jahre, 7 Monate,
- "Niedrig-Geschädigte", d.h. Personen mit gering ausgeprägten subkortikalen vaskulären mikroangiopathischen Veränderungen (WML-Score  $< 17$ ), 7 weibliche, 9 männliche Personen im Alter zwischen 53 und 75 Jahren, Durchschnittsalter 66 Jahre, 8 Monate.

Bei der späteren tabellarischen Darstellung der Ergebnisse wird die Gruppe der "Hoch-Geschädigten" vereinfachend als "Patienten" und die Gruppe der "Niedrig-Geschädigten" vereinfachend als "Gesunde" bezeichnet.

Bei allen Untersuchungspersonen wurden gemäß des unter Punkt 1 dargelegten Untersuchungsprogramms folgende Untersuchungsmethoden angewendet und damit mögliche Messgrößen bestimmt:

- Diffusions-Tensor -Bildgebung,  
isotrope Voxel  $1,8 \times 1,8 \times 1,8 \text{ mm}^3$ ,  $128 \times 128$  Bildmatrix  
56 transversale Schichten, Dauer: 7 min. 30 sec.  
30 Diffusionsrichtungen,  $b = 0$  und  $b = 1000 \text{ s/mm}^2$

Es wurden die im Forschungsantrag unter Punkt 2.1 auf den Seiten 2 bis 4 erläuterten Messgrößen

- Fraktionale Anisotropie FA
- mittlere Diffusivität ADC (apparent diffusion coefficient) bestimmt.

Die Lokalisationen wurden entsprechend der Hypothese einer Unterbrechung von subkortikalen Faserverbindungen im frontalen Marklager in mehreren Schichten, im Corpus callosum, in Thalamus und Gyrus cinguli gewählt. Damit beziehen sich die beiden Messgrößen FA und ADC jeweils auf folgende Lokalisationen:

- Frontales Marklager links
- Frontales Marklager rechts
- Corpus callosum Genu
- Corpus callosum Splenium
- Gyrus cinguli anterior links
- Gyrus cinguli anterior rechts
- Thalamus links
- Thalamus rechts

- Bestimmung des WML- (white matter lesion-) Scores

auf der Grundlage von  
Fluid Attenuated Inversion Recovery  
4 mm Schichtdicke, Distance Factor = 0,  $256 \times 256$  Bildmatrix,  
34 transversale Schichten, Dauer 4 Minuten

- T2-w Magnetization transfer Ratio

Magnetresonanztomographische Untersuchung mit folgenden Einstellungsparametern:  
axiale Schichten, 25 Schichten a 4 mm,  $TR = 6000 \text{ ms}$   
Dauer pro Sequenz: vor und nach MT-Puls jeweils 1 min. 20 sec.

Meßgröße MTR: Ausmaß des Protonenaustauschs zwischen Wassermolekülen und Makromolekülen

- Spektroskopie (single-voxel-spectroscopy, H-Spektroskopie)

zur Erfassung der Konzentration von Metaboliten

Isotrope T1-gew. Sequenz

hoch aufgelöste strukturelle Untersuchung zur multiplanaren Rekonstruktion, Voxelplanung der Single-Voxel-Spektroskopie und Volumetrie mit je nach anatomischer Region unterschiedlichen Voxelvolumina zwischen ca. 3 cm<sup>3</sup> und 4 cm<sup>3</sup>

Mit Bezug auf die jeweils linksseitige Hälfte wurden für die Regionen frontales Marklager, Thalamus, Hippocampus Single-Voxel-Spektren (SVS) mit einer Echozeit von 30 msec aufgenommen (Dauer 5 Minuten)

Hieraus wurden für jede Region die folgenden Signalintensitäten als Messgrößen bestimmt:

SVS-Inositol

SVS-NAA (N-Acetylaspartat)

SVS-Cholin

SVS-Creatin

- Neuropsychologische Testverfahren

MMSE (Minimal Mental State Examination)

TMT-A (Trail Making Test A)

TMT-B (Trail Making Test B)

CDT (Clock Drawing Test )

3. Auswertung

Es wurden folgende Auswertungen vorgenommen.

(1) Extremgruppen-Vergleich: Die nach dem WML-Score getrennten Gruppen "Hoch-Geschädigte" ("Patienten") und "Niedrig-Geschädigte" ("Gesunde") wurden hinsichtlich der durchschnittlichen Ausprägung der Messgrößen aus folgenden Untersuchungsmethoden verglichen:

- Diffusions-Tensor-Bildgebung

- Spektroskopie (SVS)

- neuropsychologische Testverfahren

Statistische Auswertemethode: t-Test

(2) Ermittlung der Übereinstimmungen zwischen dem WML-Score und den Werten in den neuropsychologischen Testverfahren auf der Grundlage aller Untersuchungspersonen

Statistische Auswertemethode: je nach Datenart Rangkorrelation ( $\rho$ ) nach Spearman oder Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson

(3) Ermittlung der Übereinstimmungen zwischen dem WML-Score und den aus Bildgebungsverfahren gewonnenen Messgrößen FA, ADC, SVS auf der Grundlage aller Untersuchungspersonen

Statistische Auswertemethode: Rangkorrelation nach Spearman

(4) Ermittlung der Übereinstimmungen zwischen den Werten in den neuropsychologischen Testverfahren und den Messgrößen der Diffusions-Tensor-Bildgebung (FA, ADC) und der Spektroskopie

Statistische Auswertemethode: Korrelation nach Pearson oder nach Spearman

Die Auswertung der gewonnenen Bilddaten für die Meßgröße MTR war nicht möglich, da die Untersuchungspersonen sich während der Untersuchung verlagerten und somit die berechneten Differenzbilder eine mangelnde Bildqualität aufwiesen.

#### 4. Ergebnisse

Die zu den vier Auswerte-Schritten gewonnenen Ergebnisse werden im Einzelnen in einem Tabellenwerk im Anhang mitgeteilt.

Hier werden nur die signifikanten Ergebnisse, geordnet nach den verschiedenen Untersuchungsmethoden, Messgrößen und Lokalisationen, in der folgenden tabellarischen Übersicht mitgeteilt.

Die Bedeutung der in der tabellarischen Übersicht verwendeten Abkürzungen zur Bezeichnung der einzelnen Messgrößen ist aus der im vorangehenden Punkt 2 (Untersuchungsbedingungen) erfolgten Auflistung der Messgrößen zu entnehmen.

In der tabellarischen Übersicht sind die Messgrößen aus verschiedenen Untersuchungsmethoden (Diffusionstensor-Bildgebung, Spektroskopie, WML-Score) durch einen Querstrich getrennt

Zur Verdeutlichung der bedeutsamen Ergebnisse werden in der tabellarischen Übersicht nur Korrelations-Koeffizienten mitgeteilt, die mindestens auf dem 5%-Niveau signifikant sind. In zwei Fällen werden (im Hinblick auf eine dort anstehende ergänzende Betrachtung) auch die nicht signifikanten (jeweils auf dem Niveau von 12% Irrtumswahrscheinlichkeit liegenden) Koeffizienten in Klammer mitgeteilt.

In der mit "t-Test, Pat./Ges." überschriebenen Spalte erfolgen Angaben über die mittels der statistischen Auswerte-Methode des t-Tests ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede zwischen der Gruppe der mikroangiopathisch "Hoch-Geschädigten" und der Gruppe der mikroangiopathisch "Niedrig-Geschädigten". Wie es in Punkt 2 (Untersuchungsbedingungen) bereits dargelegt wurde werden zur Vereinfachung bei der tabellarischen Darstellung und bei der Betrachtung der Ergebnisse für die betreffenden Gruppen die Bezeichnungen "Patienten" und "Gesunde" verwendet. Dabei bedeutet  $P > G$ , dass bei der jeweiligen Meßgröße die Gruppe der "Patienten" (Hoch-Geschädigten) eine signifikant höhere durchschnittliche

Ausprägung aufweist als die Gruppe der "Gesunden" (Niedrig-Geschädigten). P<G bedeutet, dass die Gruppe der "Patienten" eine signifikant niedrigere durchschnittliche Ausprägung der Meßgröße aufweist. Zur Vereinfachung wird dabei nur die Richtung der signifikanten Mittelwertsunterschiede mitgeteilt. Die Beträge für die jeweilige durchschnittliche Ausprägung (Arithmetisches Mittel der einzelnen Messgrößen bei den beiden Untersuchungsgruppen und das Signifikanzniveau der Mittelwertsunterschiede zwischen den Gruppen werden im Tabellenwerk im Anhang mitgeteilt.

Signifikante Untersuchungsergebnisse  
(Korrelationen und Mittelwertsunterschiede)

	MMSE	CDT	TMT-A	TMT-B	WML	t-Test Pat./Ges.
FA-Front.Markl. li	.413	-.451	-.385	-.421	-.761	P<G
FA-Front.Markl. re					-.673	P<G
FA-CC Genu	.373				-.732	P<G
FA-CC Splenium		-.594			-.442	P<G
FA-Gyrceingant li	.413	(-.323)	(-.282)	-.416	-.616	P<G
FA-Gyrceingant re		-.656		-.360	-.596	P<G
FA-Thalamus li		-.521	-.334	(-.303)	-.326	P<G
FA-Thalamus re		-.600	-.396	-.332		
ADC-Front.Markl. li					.701	P>G
ADC-Front.Markl. re					.575	P>G
ADC-CC Genu	-.459				.637	P>G
ADC-CC Splenium	(-.316)	.566	.515	.402	.532	P>G
ADC-Gyrceingant li					.481	
ADC Gyrceingant re	-.363	.597	.344	.551	.412	P>G
ADC-Thalamus li		.624	.416	.429	.513	P>G
ADC-Thalamus re		.591				

	MMSE	CDT	TMT-A	TMT-B	WML	t-Test Pat./Ges.
NAA-Front.Markl. li						
NAA-Thalamus li					-.460	P<G
NAA-Hippocampus li						
Crea-Front.Markl. li				-.377	-.393	
Crea-Thalamus li					-.336	
Crea-Hippocampus li					-.688	P<G
Chol-Front.Markl. li	.435	(-.234)	-.483	-.395	-.482	P<G
Chol-Thalamus li					-.353	
Chol-Hippocampus li	.499		-.355		-.589	
Ino-Front. Markl. li					-.357	
Ino Thalamus li						
Ino-Hippocampus li		-.411				
WML-Score	-.589	.359	.483	.545		

Im Folgenden werden die aus der tabellarischen Übersicht zu ersehenden Ergebnisse nach den zuvor erwähnten vier Auswerteschritten betrachtet.

Die Ergebnisse zu Auswerteschritt 1 (Extremgruppen-Vergleich) sind in der letzten Spalte der tabellarischen Übersicht mitgeteilt.

Danach entsprechen die Ergebnisse für die gemäß der im Forschungsantrag dargelegten Hypothese neu eingesetzte Untersuchungstechnik der Diffusionstensor-Bildgebung voll den hypothetischen Erwartungen. Denn von den mit dieser Methode ermittelten 16 Messgrößen (8 für Fraktionale Anisotropie FA und 8 für mittlere Diffusivität ADC) weisen 13 eine signifikant unterschiedliche durchschnittliche Ausprägung zwischen "Patienten" und "Gesunden" auf. Von den 12 (4 x 3) Messgrößen der über die im Forschungsantrag dargelegten Hypothesen hinausgehend eingesetzten Spektroskopie weisen die Signalintensität NAA für den Bereich Thalamus links, die Signalintensität Creatin für den Bereich Hippocampus links und die Signalintensität Cholin für den Bereich Frontales Marklager links signifikante Mittelwertsunterschiede zwischen den nach dem WML-Score getrennten Gruppen "Patienten" und "Gesunde" auf. Für die Signalintensität Inositol findet sich in keiner der untersuchten Regionen ein signifikanter Mittelwertsunterschied.

Über die beiden Untersuchungsverfahren Diffusionstensor-Bildgebung und Spektroskopie hinweg finden sich signifikante Gruppenunterschiede für das Frontale Marklager links (bei FA, ADC, SVS-Cholin) und für den Thalamus links (FA, ADC und SVS-NAA).

Die Ergebnisse zu Auswerteschritt 2 (Übereinstimmungen zwischen dem WML-Score und den Werten in den neuropsychologischen Testverfahren) finden sich in der letzten Zeile der tabellarischen Übersicht.

Danach korreliert der WML-Score mit allen vier eingesetzten neuropsychologischen Testverfahren signifikant, am höchsten mit dem Testverfahren MMSE (Minimal Mental State Examination) in der Höhe von  $-.589$ . Auch diese Ergebnisse entsprechen der im Forschungsantrag dargelegten hypothetischen Erwartung aufgrund der Ergebnisse früher am ZI durchgeführter Studien (Hentschel et al. 2005).

Die Ergebnisse zu Auswerteschritt 3 (Übereinstimmungen zwischen dem WML-Score und den aus Bildgebungsverfahren (FA, ADC und SVS) ermittelten Messgrößen) finden sich in der tabellarischen Übersicht in der zweiten Spalte von rechts.

Die Ergebnisse entsprechen völlig den bereits kommentierten Ergebnissen für den Auswerteschritt 1. Zusätzlich finden sich noch Korrelationen bei weiteren fünf Messgrößen, für welche bei Auswerteschritt 1 keine Mittelwertsunterschiede festgestellt wurden, nämlich bei ADC-Gyrus cinguli links, SVS-Creatin Frontales Marklager links, SVS-Creatin Thalamus links, SVS-Cholin Thalamus links, SVS-Cholin Hippocampus links, SVS-Inositol Frontales Marklager links.

Die Ergebnisse zu Auswerteschritt 4 (Übereinstimmungen zwischen den Werten in den neuropsychologischen Testverfahren und den aus der Diffusionstensor-Bildgebung und der Spektroskopie ermittelten Messgrößen) finden sich in den ersten vier Spalten der tabellarischen Übersicht.

Danach bestehen signifikante Ergebnisse nicht bei allen Messgrößen sondern nur bei Messgrößen für bestimmte Lokalisationen. Die deutlichsten Zusammenhänge mit den neuropsychologischen Testverfahren zeigen die Messgrößen FA-Frontales Marklager links (von 4 möglichen Korrelationen sind alle 4 signifikant), ADC-Gyrus cinguli rechts (von 4 möglichen Korrelationen sind alle 4 signifikant), ADC-Corpus callosum Splenium (3 signifikante Korrelationen und 1 Korrelationstendenz), SVS-Cholin Frontales Marklager links (3 signifikante Korrelationen und 1 Korrelationstendenz), ADC-Thalamus links (3 signifikante Korrelationen), FA-Thalamus rechts (3 signifikante Korrelationen), FA-Thalamus links (2 signifikante Korrelationen und 1 Korrelationstendenz).

Die höchste Anzahl von signifikanten Korrelationen mit den neu eingesetzten Untersuchungstechniken und auch die höchsten Beträge der Korrelationen finden sich für das neuropsychologische Testverfahren CDT (Clock Drawing Test). Dabei bestehen die höchsten Korrelationen mit den Messgrößen FA-Gyrus cinguli rechts ( $.656$ ) und ADC-Thalamus links ( $.624$ ).

Zur Mitteilung der Ergebnisse wird abschließend noch folgende Besonderheit der vorliegenden Studie herausgestellt. Die Hypothese über den Zusammenhang zwischen dem bereits in bisherigen Studien mehrfach herangezogenen WML-Score und den in dieser Studie neu herangezogenen Messgrößen aus Bildgebungsverfahren wurde nach zwei unterschiedlichen Strategien der Datenauswertung überprüft, nämlich nach dem Mittelwertsvergleich (Auswerteschritt 1) und nach der Korrelationsrechnung (Auswerteschritt 3).

Dabei analysiert der Mittelwertsvergleich nur Unterschiede zwischen Extremgruppen, während die Korrelationsrechnung auch innerhalb der Extremgruppen bestehende

Unterschiede (Binnenvarianz) berücksichtigt. Nach den übereinstimmenden Ergebnissen zwischen den Auswerteschritten 1 und 3 sind die neu eingesetzten Untersuchungstechniken nicht nur geeignet, Unterschiede zwischen Extremgruppen aufzuzeigen, sondern auch geeignet, Zusammenhänge zwischen feiner abgestuften Ausprägungen der Messgrößen darzustellen.

Dass bestimmte Messgrößen, für welche sich beim Mittelwertsvergleich keine signifikanten Unterschiede finden, bei der Berechnung der Korrelation einen signifikanten Zusammenhang mit dem WML-Score aufweisen, dürfte auf die bei Auswerteschritt 3 gegebene Zusammenfassung aller Untersuchungspersonen in eine gemeinsame Untersuchungsgruppe zurückgehen. Dies führt zu einer Steigerung der in die Berechnung eingehenden Gesamtvarianz, was sich steigernd auf die Höhe von Zusammenhangsmaßen (wie Korrelationskoeffizienten) auswirkt.

Zusätzlich sprechen die festgestellten Korrelationen für eine hohe Zuverlässigkeit (d.h. Messgenauigkeit) der korrelierten Messgrößen, was in der folgenden Diskussion der Ergebnisse noch einmal angesprochen wird.

Von Interesse sind auch die beim Auswerteschritt 3 ermittelten Beträge der Korrelationskoeffizienten bzw. die Frage, welche Messgrößen der neu eingesetzten Untersuchungstechniken den stärksten Zusammenhang mit dem bisher eingesetzten WML-Score aufweisen. Es sind dies die Messgrößen FA-Frontales Marklager links (-.761), FA-Corpus callosum Genu (-.732), ADC-Frontales Marklager links (.701), ADC-Corpus callosum Genu (.637) und SVS-Creatin Hippocampus links (-.688). Dies bedeutet beispielsweise, dass durch die Messgröße FA-Frontales Marklager links 58 % ( $(.761)^2 = .579$ ) der Varianz, d.h. der interindividuellen Unterschiede, der Ausprägung des WML-Scores aufgeklärt wird, was bedeutet, dass 58 % der Varianz jeder der beiden Messgrößen auf die gleichen (organischen) Ursachen zurückzuführen ist.

## 5. Diskussion der Ergebnisse

Hierzu ist zunächst noch einmal festzustellen, dass die für den WML-Score ermittelten Ergebnisse in hohem Maße den Ergebnissen früher am ZI durchgeführter Studien entsprechen und damit in überzeugender Weise die Validität und die Zuverlässigkeit dieser am ZI entwickelten Messgröße zur Erfassung mikroangiopathischer Läsionen bestätigen.

Zusätzlich werden die Erkenntnisse zur Validität des WML-Scores durch seine in dieser Studie festgestellten Übereinstimmungen mit bestimmten Messgrößen der Diffusionstensor-Bildgebung und der Spektroskopie erweitert. Diese Übereinstimmungen bestätigen dann gleichzeitig die im Forschungsantrag aufgrund anderweitiger Studien getroffene Schlußfolgerung, dass insbesondere die Diffusionstensor-Bildgebung valide Beiträge zur Erfassung subkortikaler vaskulärer mikroangiopathischer Veränderungen und damit auch zur Diagnostik vaskulärer Demenz leisten kann. Letzteres gilt nach den Ergebnissen dieser Studie auch für bestimmte Messgrößen der Spektroskopie.

Dabei bestehen Übereinstimmungen der Messgrößen aus Diffusionstensor-Bildgebung und aus Spektroskopie nicht nur gegenüber dem Validitäts-Kriterium des WML-Scores sondern (für Messgrößen bestimmter Lokalisationen) auch gegenüber den Ergebnissen neuropsychologischer Testverfahren als Validitäts-Kriterien.

Eine untersuchungstechnische Besonderheit der Studie wurde durch die apparative Grundausstattung des ZI ermöglicht, nämlich dadurch, dass am ZI ein MRT-Gerät mit 3 Tesla Magnetfeldstärke zur Verfügung steht. Im Unterschied zu den in der bisherigen Forschung überwiegend eingesetzten MRT-Geräten mit 1,5 Tesla werden bei 3 Tesla höhere Signalintensitäten erfaßt, wodurch eine feinere räumliche Auflösung ermöglicht wird. Die daraus resultierende Steigerung der Sensibilität und der Zuverlässigkeit der Meßverfahren und Meßgrößen dürfte zu den deutlichen Ergebnissen der Studie beigetragen haben.

Eine weitere methodische Besonderheit der Studie liegt in der komplexen Planung und in der technisch und zeitlich aufwendigen Durchführung der auf verschiedene Lokalisationen bezogenen Einzelmessungen.

Durch den Einsatz verschiedener Untersuchungstechniken entspricht die Studie dem Muster einer sog. "multi-method-study" und der damit möglichen vergleichenden Betrachtung nach Übereinstimmungen und Unterschieden zwischen verschiedenen Untersuchungstechniken. Eine Besonderheit liegt dabei in der variierenden Kombination von verschiedenen Untersuchungstechniken und verschiedenen Lokalisationen. Dadurch erweitert sich die Studie zur "Mehr-Methoden-/ Mehr-Bereichs-Studie", wodurch die Möglichkeit besteht, methodenübergreifende, lokalisationsübergreifende und methoden-/lokalisations-spezifische Ergebnisse zu analysieren.

Die vergleichende Betrachtung weist dann auch auf die zwischen verschiedenen Meßgrößen bestehenden Unterschiede in der Validität zur Erfassung der Pathogenese bei vaskulärer Demenz. Eine hohe diesbezügliche Validität besitzen gemäß den Ergebnissen der hier berichteten Studie außer dem dafür bereits bewährten WML-Score vor allem die Meßgrößen FA-Frontales Marklager links, ADC-Corpus callosum Splenium und ADC-Gyrus cinguli rechts. Eine geringe Validität zur Erfassung der Pathogenese bei vaskulärer Demenz besitzen gemäß den Ergebnissen dieser Studie die Meßgrößen SVS-NAA Frontales Marklager links, SVS-NAA Hippocampus links und SVS-Inositol Thalamus links.

Damit ist auch eine Fragestellung für zukünftige Forschungen angesprochen, nämlich die nach einer bestimmten Kombination verschiedener in eine Untersuchungsbatterie aufzunehmender Meßgrößen, welche die bestmögliche Diagnose des Krankheits-Zustandes bei vaskulärer Demenz erlaubt. Zur Entwicklung einer höchstmöglich validen und gleichzeitig untersuchungsökonomischen Kombination von Meßgrößen können als Grundlage für die Zuordnung von Personen zur Gruppe der Patienten die statistische Auswertemethode der Diskriminanzanalyse, als Grundlage für die Vorhersage kontinuierlich abgestufter individueller Ausprägungen mikroangiopathischer Veränderungen die statistischen Auswertemethoden der multiplen Korrelation und multiplen Regression herangezogen werden. Dabei könnten in solche zukünftigen Analysen vor allem diejenigen Meßgrößen einbezogen werden, welche nach den hier berichteten Ergebnissen die höchste Validität besitzen. Neben der Möglichkeit, die Berechnung von Diskriminanzfunktionen, multiplen Korrelationen und multipler Regression auf der Grundlage von Daten aus zukünftigen Untersuchungen bei weiteren Personen durchzuführen, besteht auch die Möglichkeit, dazu eine über das im Forschungsantrag zu der hier berichteten Studie dargelegte und finanziell unterstützte Forschungsprogramm hinausgehende Auswertung der in der hier berichteten Studie gewonnenen Daten vorzunehmen.

Zur Bewertung der Ergebnisse der hier berichteten Studie wird noch einmal erwähnt, daß im Unterschied zu sonstigen vergleichbaren Untersuchungen (vgl. dazu auch die im Forschungsantrag zum Stand der Forschung erwähnten Arbeiten) hier nicht nur ein Mittelwertsvergleich vorgenommen wird, sondern auch korrelative Zusammenhänge ermittelt werden. Dabei finden sich bei einigen der neu herangezogenen Meßgrößen, insbesondere solchen der Diffusionstensor-Bildgebung, durchaus beachtliche (über .600 liegende) Korrelationen mit dem als Kriterium für die Ausprägung von subkortikaler vaskulärer Enzephalopathie herangezogenen WML-Score. Dies spricht auch für die Zuverlässigkeit der betreffenden Meßgrößen, was bei den bekannten Schwierigkeiten der ROI-basierten Auswertung beachtlich erscheint und nahe legt, daß diese Auswertung mit hoher Genauigkeit gelungen ist.

Es ist zu erwarten, daß im Falle einer gewichteten Kombination mehrerer Meßgrößen im Rahmen einer multiplen Korrelation die Höhe des korrelativen Zusammenhangs noch gesteigert wird.

Die Möglichkeit, aufgrund bestimmter Meßgrößen bzw. ihrer Kombination nicht nur die Zugehörigkeit zur Gruppe der Patienten diagnostizieren zu können, sondern auch auf einem noch niedrigeren (vor der Diagnose "Patient" liegenden) Niveau mikroangiopathischer Veränderungen kontinuierlich abgestufte Ausprägungsgrade zu erkennen, ist von hoher Bedeutung für die Früherkennung von Demenz und für die Diagnostik von fortschreitenden Entwicklungen.

Abschließend und zusammenfassend wird noch einmal festgestellt, dass die hier berichtete Studie einerseits die bisher am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit durchgeführten Arbeiten zur Diagnostik dementieller Erkrankungen kontinuierlich fortführt und die Ergebnisse dieser Studie die bisher am Zentralinstitut gewonnenen Ergebnisse bestätigen und damit erhärten. Zusätzlich finden sich aber auch beachtliche Hinweise darauf, dass bestimmten weiteren Meßgrößen der Diffusionstensor-Bildgebung und auch der Spektroskopie eine Validität zur Erfassung subkortikaler vaskulärer Enzephalopathie zukommt. Aus der durch die korrelativen Übereinstimmungen aufgewiesenen Sensibilität der betreffenden Meßgrößen ist auch ein praktischer Nutzen für die Früherkennung mikroangiopathischer Veränderungen und für die Feststellung intraindividuelle Veränderungen bei fortschreitenden Krankheitsentwicklungen zu erwarten.

Es bleibt weiteren Forschungen überlassen, unter Einbezug der bisher am Zentralinstitut eingesetzten und der in dieser Untersuchung neu herangezogenen und als valide aufgewiesenen Meßgrößen bei Anwendung komplexer statistischer Auswerteverfahren eine Untersuchungsbatterie gewichteter Messgrößen zur Diagnose dementieller Erkrankungen zu entwickeln. Eine besondere Fragestellung liegt dabei darin, unterschiedliche Diskriminanzfunktionen und unterschiedliche multiple Korrelationen und Regressionsgleichungen herauszufinden, welche eine diskriminante Differentialdiagnostik zwischen verschiedenen Arten dementieller Erkrankung erlauben. Dazu bedarf es aber zunächst weiterer Untersuchungen bei Patienten mit (diagnostisch anderweitig gesicherten) verschiedenen Arten der Demenz und bei gesunden Personen.

## 6. Literatur

Takahashi, S., Yonezawa H., Takahashi J. et al. Selective reduction of diffusion anisotropy in white matter of Alzheimer disease brains measured by 3.0 Tesla magnetic resonance imaging. *Neurosci Lett* 2002, 332 (1); 45 - 48.

Hentschel F. Kreis M., Damian M., Krumm B. Does magnetization transfer ratio (MTR) contribute to the diagnosis and differential diagnosis of the dementias? *Röfo*, 2004; 176 (12): 1743 - 1749

Hentschel F., Kreis M., Damian M. et al. Quantification of microangiopathic lesions in brain parenchyma and age-adjusted mean scores for the diagnostic separation of normal from pathological values in senile dementia. *Röfo* 2005; 177 (6): 864-871.

Takahashi S., Yonezawa H., Takahashi J. et al. Selective reduction of diffusion anisotropy in white matter of Alzheimer disease brains measured by 3.0 Tesla magnetic resonance imaging. *Neurosci Lett* 2002, 332 (1): 45 - 48.