

BAYERISCHE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE KLASSE

SITZUNGSBERICHTE

JAHRGANG

2001–2003

MÜNCHEN 2004

VERLAG DER BAYERISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN
In Kommission beim Verlag C. H. Beck München

Einblicke in Struktur, Funktion und Stoffwechsel biologischer Systeme mit der Kernspinresonanz

AXEL HAASE

Gesamtsitzung am 26. Oktober 2001

Einleitung

Die Diagnose von Erkrankungen ist eine der wesentlichsten Aufgaben der Medizin und ist die Grundlage jeder Therapie. Das Traumziel jedes Mediziners aber auch Patienten ist es, die Diagnose schnell, schmerzfrei, berührungslos und ohne Nebenwirkungen durchzuführen und dabei alle Details, von anatomischen Veränderungen über Funktionsstörungen bis zu Stoffwechselanomalien in inneren Organen festzustellen. Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts hatten Mediziner nur die Möglichkeit, den Körper chirurgisch zu öffnen.

Im Jahre 1895 fand eine der wichtigsten wissenschaftlichen Revolutionen statt: die Entdeckung von W. C. Röntgen, dass bis dahin unbekannte „X-Strahlen“ Körper durchdringen können und damit Schattenbilder aus ihrem Inneren erzeugt werden¹. Die Diagnose war damit schnell, schmerzfrei und berührungslos. Heute wissen wir um die biologischen Nebenwirkungen der ionisierenden Röntgenstrahlen. Dennoch sind „Röntgenverfahren“ eine der erfolgreichsten Methoden der medizinischen Diagnostik geworden. Im 20. Jahrhundert sind eine Reihe zusätzlicher bildgebender Verfahren hinzugekommen, die ebenso Informationen aus dem Inneren des Körpers bestimmen. Hierzu gehören nuklearmedizinische Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie, Röntgen-Computertomographie, Ultraschall, u. a.

Bemerkenswert ist, dass diese Techniken sehr unterschiedliche, teilweise komplementäre Informationen beinhalten, ihre eigenen Vor- und Nachteile haben und unabhängig voneinander entstanden sind. Eine besondere Rolle spielt die Kernspin-Tomographie, die erst sehr spät in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschrieben wurde und eines der interessantesten Anwendungspotentiale für alle Bereiche der Medizin und Naturwissenschaften verspricht.

Kernspinresonanz (NMR)

Der physikalische Effekt der Kernspinresonanz in Flüssigkeiten und Festkörperproben wurde erstmals im Jahre 1946 von den Physikern F. Bloch² und E. M. Purcell³ beschrieben. Die Grundlage des Experiments war die bereits zuvor bekannte Beobachtung, dass Atomkerne einen Eigendrehimpuls (Kernspin) und damit verbunden auch ein permanentes magnetisches Moment haben. In einem Magnetfeld B präzedieren die magnetischen Kernspins um die Richtung des Magnetfelds. Die Präzessionsfrequenz ist hierbei proportional zum Magnetfeld:

$$[1] \quad \omega = \gamma \cdot B,$$

wobei γ das gyromagnetische Verhältnis ist, eine Größe, die spezifisch für jede Atomkernsorte ist und weitere Aussagen über die physikalischen Eigenschaften von Atomkern zulässt. Ein Kernspinresonanzexperiment (engl.: nuclear magnetic resonance = NMR) wird demnach so durchgeführt, dass eine Probe, die die zu untersuchenden Atomkerne enthält in ein äußeres statisches und möglichst homogenes Magnetfeld verbracht wird und einer hochfrequenten elektromagnetischen Strahlung der Frequenz ω ausgesetzt wird.

Große Bedeutung für alle Bereiche der Naturwissenschaften hat die Methode der NMR erfahren, als in den 50er Jahren Feinstrukturen in Kernspinresonanzsignalen beobachtet wurden, sog. NMR-Spektren. Damit war es möglich, die Struktur und die Dynamik von Molekülen sowie die Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung zu studieren. Heute ist die NMR-Spektroskopie eine der wichtigsten Analyseverfahren der Chemie und Physik und stellt eine herausra-

gende Methode dar, die Strukturen von Biomolekülen zu untersuchen. Hervorragende Verdienste um die Entwicklung und Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Analyse der Molekülstrukturen hatten beispielsweise die Chemiker R. R. Ernst und K. Wüthrich.

Im Jahre 1972 haben dann unabhängig voneinander der Chemiker P. C. Lauterbur⁴ und der Physiker P. Mansfield⁵ eine Variante der NMR beschrieben, mit der bildgebende NMR-Untersuchungen an Flüssigkeiten und Festkörperproben durchgeführt werden konnten. Beide Wissenschaftler wurden mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin des Jahres 2003 ausgezeichnet.

Neben der zuvor beschriebenen NMR-Spektroskopie hat damit die NMR-Bildgebung eine herausragende Rolle bei der medizinischen Diagnostik erlangt. Heute existieren weltweit mehrere 10 000 NMR-Geräte in den Kliniken, die bildgebende Untersuchungen an Patienten vornehmen. Die Methode ist – unter Einhaltung bestimmter Grenzwerte – nebenwirkungsfrei, berührungslos und schmerzfrei und kann nahezu alle Organe im Detail studieren. Die Ortsauflösung liegt etwa bei 1 mm, so dass auch kleine pathologische Veränderungen im Gewebe, Verschlüsse von Blutgefäßen, Entzündungen, Durchblutungsstörungen u. v. m. diagnostiziert werden können.

Die physikalischen Grundlagen der NMR-Bildgebung

Um ein NMR-Bild zu erhalten, benötigt man die Messung der Position r eines Atomkerns in der Messprobe bezüglich des Zentrums ($r = 0$) des Magnetfelds. Hierzu wird zusätzlich zu dem homogenen Magnetfeld B ein konstanter Magnetfeldgradient $G = dB/dr$ eingeschaltet. Man erhält damit ausgehend von Gleichung [1] eine Verschiebung der Frequenz :

$$[2] \quad \Delta\omega = \gamma \cdot dB/dr \cdot dr,$$

wenn der Atomkern um die Strecke dr vom Magnetzentrum entfernt liegt. Magnetfeldgradienten sind relativ einfach entlang aller drei Raumachsen x, y, z einzustellen, so dass man dreidimensional räumliche Information über die Messung von Frequenzverschiebungen erhalten kann.

Die Ortsauflösung der NMR-Bildgebung ist zunächst durch den Einsatz der Magnetfeldgradienten dB/dr bestimmt. Für den klinischen Einsatz werden meist Magnetfelder von 1,5 T und Gradienten von bis zu 30 mT/m verwendet. In Höchstleistungsgeräten, die derzeit (noch) nicht für den Einsatz am Menschen geeignet sind, werden Magnetfelder von bis zu 17 T und Gradienten von 1000 mT/m oder mehr verwendet, so dass hierbei durchaus eine Ortsauflösung von 10 μm und besser zu erzielen ist. In diesem Beitrag werden einige Ergebnisse dieser, in der Literatur allgemein als „NMR-Mikroskopie“ bezeichnet, vorgestellt.

Die NMR-Signalstärke ist neben vielen anderen Parametern abhängig von der Zahl der Atomkerne, die in einem Bildelement gemessen werden. Je höher die Ortsauflösung, um so besser muss demnach die Signalstärke sein. Das höchste NMR-Signal aus biologischem Gewebe ist mit der Kernspinresonanz von ^1H -Atomkernen zu erzielen. Wasserstoff ist das häufigste Element im Gewebe, vorwiegend in Wasser, Fettsäuren und Proteinen gebunden. Deshalb werden NMR-Bilder häufig mit ^1H -NMR-Signalen gemessen und stellen somit die Verteilung von Wasser, Fetten und anderen wasserstoffreichen Substanzen im Gewebe dar. Die NMR bildet demnach Weichteilgewebe besonders gut ab, im Gegensatz zu Röntgenverfahren, in denen Knochen, sehr dichtes Gewebe und Elemente mit höheren Ordnungszahlen vorwiegend sichtbar sind.

NMR-Signale sind weiterhin stark abhängig von vielen zeitabhängigen Prozessen und Bewegungen. Man kann diesen Effekt ausnutzen, um im NMR-Bild, das wie gesagt, die Wasserverteilung im Gewebe darstellt, zusätzlich Bildkontrast einzuführen. NMR-Signale sind zeitabhängige hochfrequente Signale, die durch Relaxationszeiten beschrieben werden. Diese Relaxationszeiten (hier von ^1H -NMR-Signalen) sind abhängig von der Gewebeart, von Verunreinigungen durch para- oder ferromagnetische Substanzen und von der molekularen Beweglichkeit von Wassermolekülen im Gewebe.

Besonders interessant ist die Beobachtung, dass pathologische Veränderungen im Gewebe (z. B. Tumoren) zu deutlich veränderten NMR-Relaxationszeiten führen. Diese Beobachtung, die erst das Interesse an medizinischer NMR-Bildgebung begründete, hat bereits im Jahre 1970 der Biophysiker R. Damadian⁶ gemacht, dessen Entdeckung leider nicht mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

Auch die – gewebeabhängig – unterschiedliche Diffusionskonstante von Wasser kann als Kontrastparameter herangezogen werden. Schließlich ist das Signal noch abhängig von der Flussgeschwindigkeit im Gewebe, so dass Blutgefäße ebenso gut erfasst werden können, wie die Perfusion und Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Betont werden muss, dass alle genannten Kontrastparameter durch das NMR-Verfahren selbst ausgewählt werden können – Kontrastmittel, wie sie in Röntgenverfahren häufig zum Einsatz kommen, sind nicht nötig. NMR-spezifische Kontrastmittel können aber dennoch zusätzlich eingesetzt werden, um weitere, mehr funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

Einige exemplarische neuere Anwendungen

Haupteinsatzgebiet der NMR-Bildgebung ist die medizinische Diagnostik. Die Erfolge gerade im Bereich der Untersuchungen des Gehirns (siehe Abbildung 1) und Rückenmarks, der Gelenke, von Herz und Kreislauf sind enorm, sollen hier aber nicht behandelt werden. Hier muss auf die umfangreiche Spezialliteratur der Radiologie, Neurologie u. a. verwiesen werden. Derzeit noch wenig verbreitet, aber mit höchsten Zukunftspotential ist die „NMR-Mikroskopie“ an Kleintieren, Pflanzen und weiteren biologischen Proben.

a) NMR-Bilder von fixierten Proben

Die naturwissenschaftlichen Sammlungen und Museen sind voll von seltenen Proben. Die Exemplare sind meist in Formalin fixiert und können über Jahrzehnte ohne Schaden aufbewahrt werden. Anatomische Untersuchungen konnten bisher nur durch Gewebeschnitte erfolgen, mit dem Resultat, dass die meist wertvollen und seltenen Proben unwiederbringlich zerstört wurden. Hier setzt die NMR-Mikroskopie an, die diese Proben ohne Berührung, ohne Zerstörung und dennoch dreidimensional im Detail untersuchen kann. Ein Beispiel sind Messungen an Delphinembryos die wir gemeinsam mit Prof. Oelschläger, Institut der Anatomie, Universität Frankfurt an Proben aus dem Senckenbergmuseum Frankfurt in den vergangenen 3 Jahren durchgeführt haben. Die Embryos wurden in den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gesammelt, als

Delphinjagden noch möglich waren. Ziel war, die Entwicklung (anhand vieler Embryos) der inneren Organe zu dokumentieren, ohne die seltenen und wertvollen Exemplare zu zerstören. Die Abbildung 2 enthält ein Beispielergebnis aus diesen Untersuchungen. Die Auswertungen sind derzeit noch im Gange.

b) Herz-, Kreislaufforschung an Kleintieren und transgenen Tieren

Herz-, Kreislauferkrankungen sind in den westlichen Ländern eine der häufigsten Todesursachen. In der biomedizinischen Forschung ist deshalb die Untersuchung von Tiermodellen zu Herzerkrankungen und Gefäßveränderungen ein wichtiges Anliegen. Bei Kleintieren (Ratten und Mäusen) sind zahlreiche Modelle für typische Erkrankungen des Menschen in den vergangenen Jahrzehnten entwickelt worden, wie z. B. Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Bluthochdruck, etc. Meist sind dies chronisch verlaufende Erkrankungen, die medikamentös behandelt werden. Im Tierversuch sollten deshalb Untersuchungen so verlaufen, dass die Diagnose und die Therapie an individuellen Tieren im zeitlichen Verlauf untersucht werden kann. Hierzu eignet sich in besonderer Weise die NMR-Mikroskopie, insbesondere weil durch den Einsatz höchster Magnetfelder nun die Ortsauflösung mit Werten um 10 bis 70 μm in einen Bereich gekommen ist, der die Darstellung einzelner Blutgefäße, Gefäßwände und sogar Herzmuskelfasern sichtbar macht^{7,8,9} (siehe Abbildungen 3,4).

Besonders interessant ist die Untersuchung von transgenen Tiermodellen. Hierbei werden einzelne Gene (meist in Modellen der Maus) ausgeschaltet („knock-out-Modelle“) oder überexprimiert. Die Folgen dieser genetischen Veränderungen auf die Morphologie, die Funktion und den Stoffwechsel einzelner Organe können dann im Detail auch über den gesamten Lebenslauf des Tieres mit NMR-Methoden verfolgt werden. Deshalb wird die NMR gerade nachdem das Genom von zunehmend mehr Tieren und Pflanzen aufgeklärt wurde und man sich nun für die Funktion der Gene interessiert, eine zentrale Messmethodik sein.

c) NMR an intakten Pflanzen

Es gibt zahlreiche Verfahren zur bildgebenden Untersuchungen an Pflanzen. Die NMR-Mikroskopie wird erst seit einigen Jahren auch an Pflanzen eingesetzt, wobei sich allerdings bisher nur wenige Labors

weltweit mit dieser Thematik beschäftigen. Ein Grund ist sicher die deutlich schwächere Ortsauflösung der NMR, verglichen mit Lichtmikroskopie oder Elektronenmikroskopie, die im Bereich der Botanik häufiger eingesetzt werden. Die Vorteile der NMR betreffen aber die Nichtinvasivität, so dass intakte Pflanzen (meist sogar in ihrer natürlichen Umgebung) untersucht werden können. Damit ist es möglich, neben der anatomischen Information auch zeitabhängige Prozesse, wie den Wassertransport, die Ionenverteilung und den -transport und Stoffwechselprozesse zu ermitteln^{10,11}. In der Abbildung 5 ist zu erkennen, dass im Vergleich mit der Lichtmikroskopie die NMR alle wesentlichen Details aus dem Pflanzengewebe sichtbar macht. Hinzu kommt, dass mit geeigneten NMR-Techniken die Wasser- und Metabolitenverteilung (hier: Zucker) visualisiert werden können (Abbildung 6).

Die Flussgeschwindigkeiten in den Fernleitbahnen der Pflanzen, Xylem und Phloem sind ebenfalls mit genügender Genauigkeit zu quantifizieren, so dass auch kleinere Änderungen der Flussgeschwindigkeit bei variierenden Beleuchtungsbedingungen, die die Transpiration der Pflanze ändern, zu ermitteln sind (Abbildung 7).

Die NMR-Mikroskopie stellt damit zusätzlich zu den bisherigen bildgebenden Verfahren eine wertvolle Methodik dar. So kann zudem mit anderen Untersuchungsverfahren, wie Sonden zur Messung von Ionen und Drücken, Druckmessungen mit der Scholanderbombe, etc. kombiniert werden.

Ausblick

Die technische Entwicklung der NMR-Bildgebung ist auch 30 Jahre nach ihrer Entdeckung noch nicht abgeschlossen. Dies gilt auch für die Anwendungspotentiale in der Medizin und in den gesamten Naturwissenschaften. So war die begrenzte Orts- und Zeitaufklärung lange Zeit ein Problem. Selbst die Entwicklung schneller NMR-Verfahren¹² hat zwar die Beobachtung schneller Bewegungen, wie die des Herzens möglich gemacht. Noch schnellere Vorgänge, wie sie beispielsweise bei Stoffwechseländerungen im Gehirn auftreten, können nur unter Einschränkungen untersucht werden. Auch hier werden neue technische Ansätze auch neue Anwendungen möglich machen.

So gibt es seit Kurzem die Möglichkeit, NMR-Signale zeitgleich in mehreren –NMR–Signalketten aufzunehmen^{13,14}. Hierbei müssen (ähnlich, wie dies in der Computertechnik, in der Sonographie oder anderen bildgebenden Verfahren bekannt ist) in massiver Zahl parallele Signalaufnahme- und Verstärkerketten aufgebaut und die Messdaten miteinander verknüpft werden. Im Endergebnis können dann bis zu 1000 Bilder pro Sekunde aufgenommen oder die Bildauflösung um mindestens eine Größenordnung verbessert werden.

Literatur

- 1 W. C. Röntgen: Über eine neue Art von Strahlen. Sitzungsber. Phys. Med. Ges. Würzburg, 11–17 (1895).
- 2 F. Bloch: Nuclear Induction. Phys. Rev. 70, 461–474 (1946).
- 3 E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound: Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. Phys. Rev. 69, 37–38 (1946).
- 4 P. C. Lauterbur: Image Formation by Induced Local Interaction: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. Nature 243, 190–191 (1973).
- 5 P. Mansfield, P. K. Grannell: NMR 'Diffraction' in Solids. J. Phys. C6, L422–426 (1973).
- 6 R. Damadian: Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. Science 171, 1151 (1971).
- 7 F. Wiesmann, A. Frydrychowicz, R. Illinger, E. Rommel, A. Haase, S. Neubauer: Analysis of Right Ventricular Morphology and Function in Healthy Mice and a Murine Model of Heart Failure by In-Vivo MRI. Am J Physiol. 283, H1065–1071 (2002).
- 8 F. Wiesmann, J. Ruff, S. Engelhardt, L. Hein, C. Dienesch, A. Leupold, R. Illinger, A. Frydrychowicz, K.-H. Hiller, E. Rommel, A. Haase, M. J. Lohse, S. Neubauer: Dobutamine stress magnetic resonance microimaging in mice: Acute changes of cardiac and function in normal and failing murine hearts. Circ. Res. 88, 563–569 (2001).
- 9 F. Wiesmann, J. Ruff, K.-H. Hiller, E. Rommel, A. Haase, S. Neubauer: Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(2), H652–H657 (2000).
- 10 A. D. Peuke, M. Rokitta, U. Zimmermann, L. Schreiber, A. Haase: Simultaneous Measurement of Water Flow Velocity and Solute Transport in Xylem and Phloem of Adult Plants of *Ricinus communis* Over a Daily Time Course by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry; Plant Cell & Environment. 24, 491–503 (2001).
- 11 M. Rokitta, A. D. Peuke, U. Zimmermann, A. Haase: Dynamic Studies of Phloem and Xylem Flow in Fully Differentiated Plants by Fast Nuclear-Magnetic-Resonance Microimaging. Protoplasma 209, 126–131 (1999).

- 12 A. Haase: Snapshot FLASH MRI, Applications to T1, T2, and Chemical-Shift Imaging. *Magn. Reson. Med.* 13, 77–89 (1990).
- 13 M. A. Griswold, P. M. Jakob, Q. Chen, J. Goldfarb, W. J. Manning, R. R. Edelman, D. K. Sodickson: Resolution Enhancement in Single-Shot Imaging Using Simultaneous Acquisition of Spatial Harmonics (SMASH). *Magn. Reson. Med.* 41, 1236–1245 (1999).
- 14 M. A. Griswold, P. M. Jakob, R. Heidemann, M. Nittka, V. Jellus, J. Wang, B. Kiefer, A. Haase: Generalized autocalibrating partially parallel acquisitions (GRAPPA). *Magn. Reson. Med.* 47, 1202–1210 (2002).

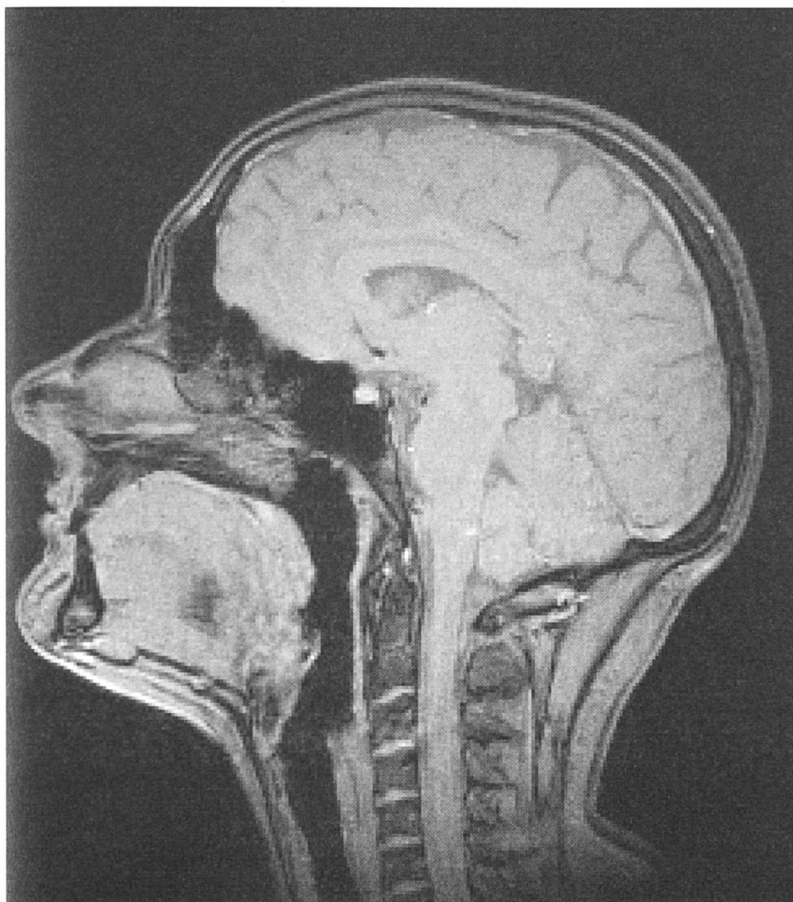


Abbildung 1: NMR-Querschnittsbild durch den Kopf eines gesunden Probanden, aufgenommen mit einem 1,5 T NMR-Gerät. Die Ortsauflösung beträgt hierbei 1 mm, bei einer Schichtdicke von 5 mm.



Abbildung 2: Dreidimensionales NMR-Bild eines Delphinembryos. Besonders gut zu sehen sind die inneren Organe (von oben nach unten): Gehirn, Rückenmark, Herz, Leber. Die Messdaten wurden an einem 11.7T NMR-Gerät aufgenommen. Die Ortsauflösung beträgt 100 μm .

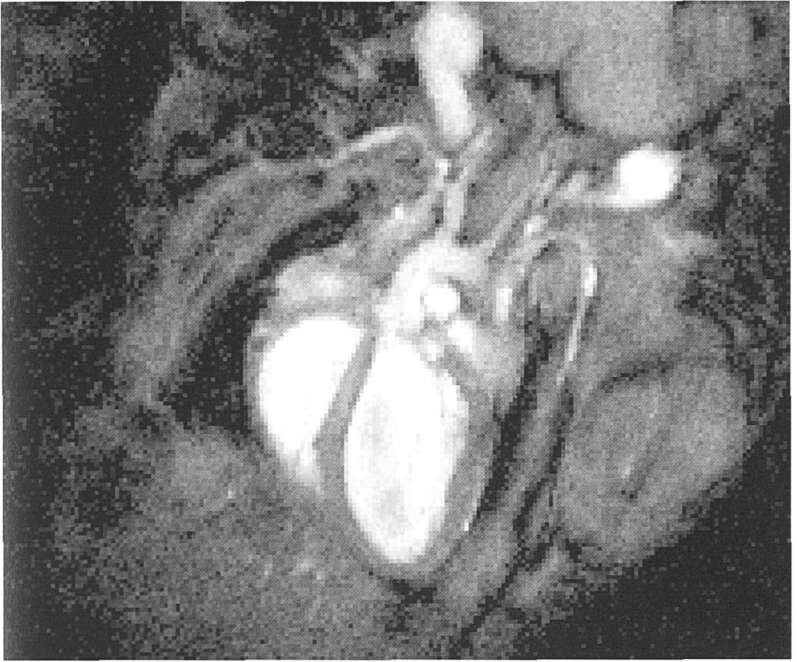


Abbildung 3: NMR-Querschnittsbild durch das Herz einer lebenden Maus. Das Bild ist Teil eines Films, der vom schlagenden Herzen aufgenommen wurde. Sichtbar sind die linke und rechte Herzkammer, die Herzmuskulatur sowie Blutgefäße. Die Aufnahme wurde an einem 7 T NMR-Gerät durchgeführt. Die Ortsauflösung beträgt 70 μm .

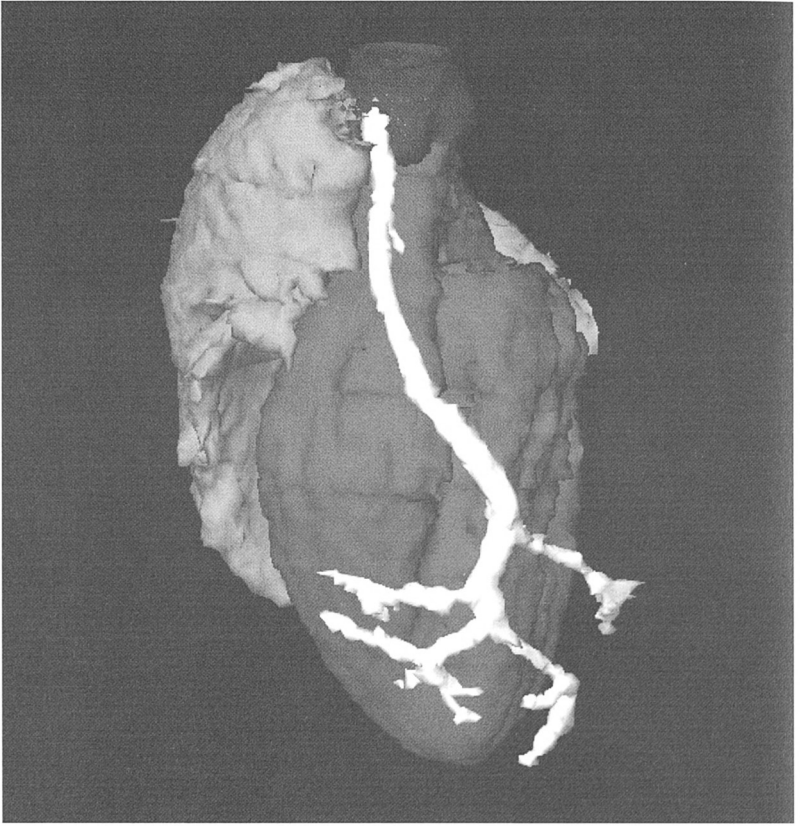


Abbildung 4: Dreidimensionales NMR-Bild des Herzens einer lebenden Maus, aufgenommen mit einem 7T NMR-Gerät. Zu sehen ist im Vordergrund ein Ast der Herzkranzgefäße, sowie die segmentierte linke und rechte Herzkammer.

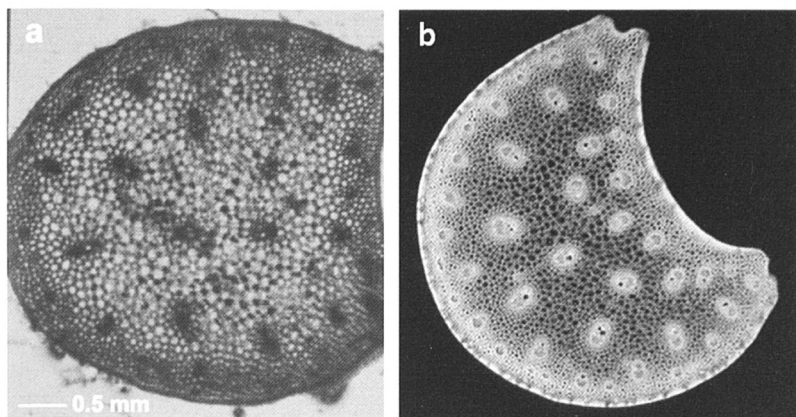


Abbildung 5: (a) Querschnittsbild eines Pflanzenstengels (Mais) aufgenommen mit Lichtmikroskopie. (b) NMR-Querschnittsbild aus der in (a) gezeigten Pflanzenregion, aufgenommen in einem 7 T NMR-Gerät.

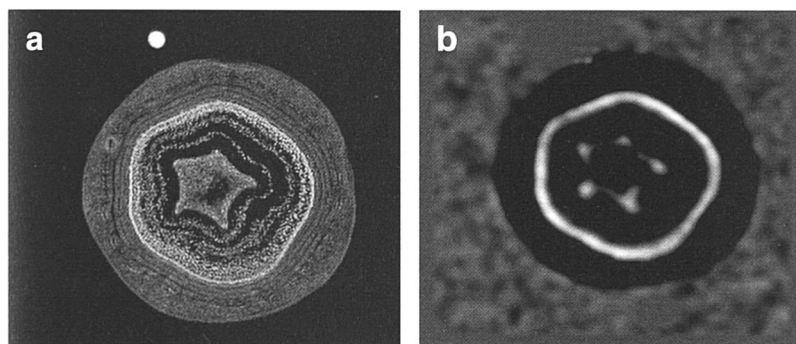


Abbildung 6: NMR-Querschnittsbilder eines Pflanzenstengels (*Rhizinus Communis*). In (a) ist die Verteilung von Wasser im Gewebe, in (b) die Verteilung von Zucker abgebildet. Besonders auffällig ist die hohe Zuckerkonzentration in den (punktförmig dargestellten) Phloemregionen.

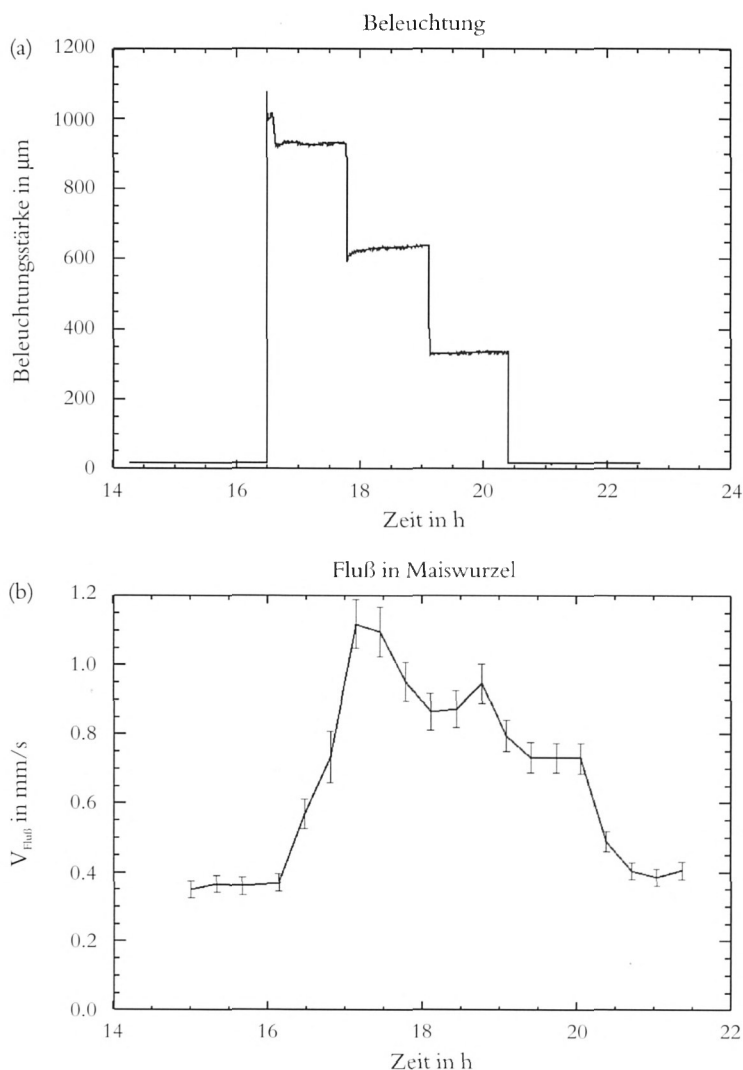


Abbildung 7: (a) Protokoll eines Beleuchtungsexperiments einer Maispflanze im NMR-Magneten. Die Beleuchtungsstärke wurde um 16.30 Uhr auf $950 \mu\text{E}$ eingestellt und danach im 1-Stunden-Intervallen stufenförmig abgeschaltet. (b) Die Flussgeschwindigkeit von Wasser in den Xylemgefäßen der Maiswurzel wurde mit bildgebenden NMR-Methoden bestimmt. Vom Basiswert $0,35 \text{ mm/s}$ im unbeleuchteten Zustand steigt die Geschwindigkeit auf $1,1 \text{ mm/s}$ und nimmt anschließend parallel zum Beleuchtungsprotokoll wieder ab.