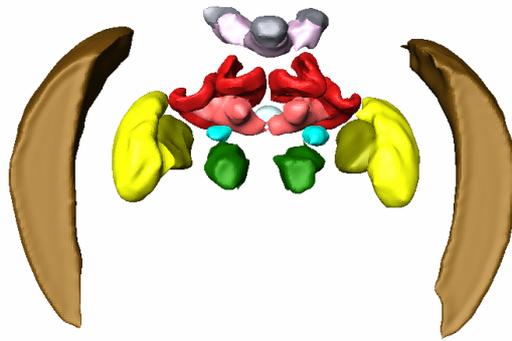


Hochfeld ^1H -NMR-Mikroskopie zur biophysikalischen Grundlagenforschung



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

Daniel Haddad

aus Mutlangen

Würzburg 2003

Eingereicht am: 8. August 2003
bei der Fakultät für Physik und Astronomie

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. A. Haase
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. A. Haase
2. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. H. Fraas
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der NMR-Mikroskopie	4
2.1	Grundlagen der Kernspinresonanz.....	4
2.1.1	Kernspin und äußeres Magnetfeld.....	4
2.1.2	Relaxationsmechanismen	6
2.2	NMR-Bildgebung	8
2.2.1	Schichtgradient	8
2.2.2	Lesegradient.....	9
2.2.3	Phasengradient.....	9
2.3	FID und Echosignal	10
2.3.1	Das Spin-Echo	11
2.3.2	Das Gradienten-Echo.....	11
2.4	NMR-Mikroskopie.....	12
2.4.1	Steigerung des SNR.....	12
2.4.2	Begrenzung der Auflösung durch die Linienbreite	14
2.4.3	Begrenzung der Auflösung durch Diffusion	15
2.4.4	Überprüfung der räumlichen Auflösung.....	17
3	NMR-Experimente	18
3.1	NMR-Spektrometer.....	18
3.2	Durchgeführte NMR-Experimente	18
3.2.1	Das Spin-Echo-Experiment	18
3.2.2	Magnetisierungspräparation	21
3.2.2.1	Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1	21
3.2.2.2	Messung der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2	23
4	NMR-Mikroskopie an Tumorsphäroiden	26
4.1	Einleitung.....	26
4.2	Aufgabenstellung	27
4.3	Material und Methoden.....	28
4.3.1	Tumorsphäroide und Konfrontationskulturen	28
4.3.2	Experimenteller Aufbau	32
4.3.2.1	Die Perfusionsapparatur	32

4.3.2.2 Die Sende- und Empfangsspule	34
4.3.2.3 Probenkopf und Ankoppelnetzwerk.....	36
4.3.3 NMR-Experimente	36
4.4 Ergebnisse und Diskussion	37
4.5 Zusammenfassung.....	45
5 NMR-Mikroskopie an Insekten	47
5.1 Das Gehirn der Honigbiene	47
5.1.1 Einleitung.....	47
5.1.2 Material und Methoden	49
5.1.2.1 Proben und Probenpräparation	49
5.1.2.2 Hardware	49
5.1.2.3 NMR-Experimente	51
5.1.3 Anatomie der Biene	53
5.1.3.1 Der Aufbau des Bienenkopfes.....	53
5.1.3.2 Das Bienenhirn, Anatomie und Funktion.....	54
5.1.4 Ergebnisse und Diskussion.....	56
5.1.4.1 NMR-Bilder des Bienenhirns	56
5.1.4.2 Oberflächenrekonstruktionen und Volume Rendering.....	60
5.1.4.3 Volumenberechnungen.....	63
5.1.4.4 Vergleich mit der konfokalen Lasermikroskopie.....	64
5.1.4.5 Ursprung des Kontrastes in den NMR-Bildern	66
5.2 Die lebende Hummel	69
5.2.1 Material und Methoden	70
5.2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	71
5.3 Die Drosophila	72
5.3.1 Material und Methoden	73
5.3.2 Ergebnisse und Diskussion.....	74
5.4 Zusammenfassung.....	75
6 NMR-Mikroskopie an Delphinen	78
6.1 Einleitung.....	78
6.2 Material und Methoden.....	80
6.2.1 Proben und Probenpräparation	80
6.2.2 Hardware	82

6.2.3 NMR-Experimente	83
6.2.4 Histologische Schnittserien	85
6.3 Ergebnisse und Diskussion	85
6.3.1 Entwicklungsstadien.....	87
6.3.2 Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktionen.....	88
6.3.3 Anatomie und Methodenvergleich	90
6.3.4 Charakterisierung des Kontrastes in den NMR-Bildern.....	103
6.4 Zusammenfassung.....	105
7 Zusammenfassung und Ausblick	108
8 Anhang	115
8.1 Präparation der Tumorsphäroide.....	115
8.2 Probenkopf und Ankoppelnetzwerk.....	115
Literaturverzeichnis	119

Liste der Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
a.u.	relative Einheiten (engl.: arbitrary units)
CNR	Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: Contrast-to-Noise-Ratio)
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
FOV	effektives Mess- bzw. Bildfeld (engl.: Field-of-View)
HF	Hochfrequenz
kLM	konfokale Lasermikroskopie
NMR	magnetische Kernresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
RBA	Rattenhirnaggregat (engl.: Rat Brain Aggregate)
SE	Spin-Echo
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: Signal-to-Noise-Ratio)
TS	Tumorsphäroid

1 Einleitung

Die Methode der magnetische Kernresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance, NMR) basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment des Atomkerns und einem magnetischen Feld, in dem sich der Atomkern befindet. Sie wurde 1937 von Rabi bei Experimenten mit Molekularstrahlen entdeckt [Rab-37, 38, 39]. Im Jahre 1946 wurden die ersten erfolgreichen Experimente zur "Detektion der magnetischen Resonanz mittels elektromagnetischer Effekte" an Materie "normaler Dichte" [Blo-46b] unabhängig voneinander von Bloch [Blo-46] und Purcell [Pur-46] durchgeführt und erlauben seitdem mit Hilfe verschiedener NMR-spektroskopischer Experimente, die chemische Struktur und Umgebung von Molekülen zu untersuchen [Der-87].

Nachdem Lauterbur [Lau-73] und Mansfield [Man-73] im Jahre 1973 erste NMR-Bildgebungsexperimente durchführten, entwickelte sich die Kernspintomographie zu einer wichtigen Untersuchungsmethode in der medizinischen Diagnostik. Der große Vorteil der NMR-Bildgebung liegt dabei in ihrem nicht-invasiven Charakter und der guten Einstellbarkeit des Bildkontrastes. Dieser kann besonders bei der Abbildung von Weichteilgeweben aus dem Innern von Patienten und biologischen Proben anhand verschiedener gewebetypischer NMR-Parameter fast frei gewählt werden. Darüber hinaus lassen sich die unterschiedlichen Gewebe aufgrund des guten Kontrastes nicht nur qualitativ voneinander abgrenzen, sondern auch quantitativ beschreiben. Mit Hilfe der gewebetypischen NMR-Parameter können zudem gewebespezifische Informationen, wie z.B. der Vitalitätsgrad des Gewebes, bestimmt werden.

Als in den '80er Jahren die NMR-Untersuchungen immer wichtiger für den klinischen Alltag wurden, wurde auch der Wunsch nach einer hohen räumlichen Auflösung immer größer, um auch kleinste anatomische Details exakt abbilden zu können. Zusammen mit dem Bestreben, weitere Anwendungsgebiete für die NMR-Bildgebung zu finden, führte dies dazu, dass sich immer mehr Arbeitsgruppen mit der Entwicklung der NMR-Mikroskopie befassten und versuchten, die Ortsauflösung zu verbessern [Zho-92].

Die NMR-Mikroskopie verbindet den Vorteil der NMR, nicht-invasiv Bilder aus dem Innern verschiedenster Objekte gewinnen zu können mit einer hohen räumlichen Auflösung in diesen Bildern. Konkret spricht man von NMR-Mikroskopie bei räumlichen Auflösungen kleiner $(100\ \mu\text{m})^3$. Dabei können im Prinzip alle auch sonst zum Einsatz kommenden NMR-Methoden verwendet werden. Deswegen war das Konzept der NMR-Mikroskopie auch schon in der 1973 von Lauterbur beschriebenen 'makroskopischen' NMR-Bildgebung enthalten [Lau-73]. Erste praktische NMR-Mikroskopie-Experimente wurden jedoch erst in den '80er Jahren durchgeführt, als die technische Entwicklung der NMR-Spektrometer so weit vorangeschritten war, dass diese hohe räumliche Auflösung auch in der Praxis realisiert werden konnte [Hed-84, Lau-86, Lau-86b]. In den letzten Jahren ist die technische Entwicklung der NMR-Spektrometer noch weiter vorangetrieben worden, so dass heute auf allen Hochfeldgeräten isotrope räumliche Auflösungen im Bereich von wenigen zehn bis hin zu

weniger als zehn Mikrometern möglich sind. Deswegen werden heute auch kontinuierlich neue Anwendungsgebiete für die NMR-Mikroskopie gefunden, so dass sie dabei ist sich zu einer Alternative bzw. Ergänzung zu vielen etablierten Untersuchungsmethoden zu entwickeln. Da die NMR-Mikroskopie jedoch bisher nur bedingt als Routineuntersuchungsmethode eingesetzt wird, fehlen in vielen Bereichen konkrete Informationen über die Möglichkeiten und Grenzen ihrer praktischen Anwendbarkeit.

Ziel der vorliegenden im Bereich der biophysikalischen Grundlagenforschung angesiedelten Arbeit war es, die praktische Anwendbarkeit der NMR-Mikroskopie anhand von ausgewählten Beispielen für Anwendungen im Bereich der medizinischen *in-vitro* Forschung, der Neuro- und Entwicklungsbiologie, sowie im Bereich der Insektenforschung und als Alternative bzw. Ergänzung zur konventionellen Histologie zu demonstrieren. Die einzelnen Projekte besaßen deswegen einerseits den Charakter von Machbarkeitsstudien, andererseits war es aber auch wichtig, die jeweiligen Möglichkeiten, Vorteile und Grenzen bei der praktischen, routinemäßigen Anwendung der NMR-Mikroskopie gegenüber etablierten Untersuchungsmethoden zu quantifizieren, um das Potential der NMR-Mikroskopie in diesen neuen Anwendungsgebieten herausstellen zu können.

Bei den durchgeführten Projekten lag die Aufgabe in allen Fällen darin, Details aus dem Innern kleiner biologischer Proben mit der ^1H -NMR-Mikroskopie nicht-invasiv zwei- und dreidimensional abzubilden. Die zu untersuchenden Proben waren für die NMR relativ 'exotisch': prenatale Delphine, das Gehirn der Honigbiene und Konfrontationskulturen von Tumorsphäroiden.

Aus der Vielfalt und der Verschiedenartigkeit der untersuchten Objekte ergibt sich die Gliederung der Arbeit: Nach einem grundlegenden Kapitel über die NMR-Mikroskopie und die Begrenzung des Auflösungsvermögens (Kapitel 2) und einem Kapitel über die Umsetzung der Grundlagen in den verwendeten Experimenten (Kapitel 3), folgen drei Kapitel über die praktische Anwendung der NMR-Mikroskopie auf die oben beschriebenen Proben.

Kapitel 4 beschreibt die Beobachtung von Tumorsphäroiden und ihren Konfrontationskulturen. Kugelförmige Aggregate von Tumorzellen mit Durchmessern von wenigen hundert Mikrometern wachsen dabei im Verlauf von 24 bis 48 Stunden in Aggregate von Rattenhirnzellen ein. Dieser Vorgang kann NMR-mikroskopisch mit Parameterkarten der Relaxationszeitkonstanten T_2 charakterisiert und quantitativ beschrieben werden. Bei den Messungen ist es möglich, vitales Gewebe von nekrotischem zu unterscheiden und die Entstehung eines nekrotischen Bereiches im Zentrum der Tumorsphäroide zu beobachten. Außerdem werden in diesem Kapitel erste Therapiesimulationen mit bestrahlten Tumorzellen vorgestellt.

NMR-Mikroskopie an Insekten ist das Thema von Kapitel 5. Dabei wird vor allem die Struktur des fixierten Gehirns der Honigbiene untersucht und dreidimensional abgebildet. Zur Vermessung des Gehirns, z.B. mit der Methode der konfokalen Lasermikroskopie, war es bisher erforderlich, das Gehirn aus der Kopfkapsel der Biene herauszupräparieren. In der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, das Gehirn in seiner natürlichen Form in

der intakten Kopfkapsel zu visualisieren. Darüber hinaus wird die graphische Weiterverarbeitung der NMR-Messdaten in Form von Oberflächenrekonstruktionen der einzelnen Strukturen des Bienengehirns beschrieben und ein Vergleich der Ergebnisse der NMR-Mikroskopie mit denen der konfokalen Lasermikroskopie vorgenommen. An die Messungen am fixierten Gehirn der Honigbiene schließen sich Bildgebungsexperimente am Gehirn einer lebenden Hummel an. In einer weiteren Kurzstudie wird die Anatomie einer fixierten Fruchtfliege dreidimensional dargestellt.

Die Untersuchung und Darstellung der Anatomie prenataler Delphine wird in Kapitel 6 beschrieben. Bei den verwendeten fixierten Exemplaren, einem Embryo und einem Fetus, handelt es sich um seltene Museumsstücke. Auch hier wird der nicht-invasive Charakter der NMR-Mikroskopie genutzt, um Bilder aus dem Innern der Proben zu gewinnen, ohne diese dabei zu zerstören, was bei einer histologischen Untersuchung unvermeidbar wäre. Aus den NMR-Bildern werden wie beim Gehirn der Biene Oberflächenrekonstruktionen berechnet und die Volumina und Oberflächen der inneren Organe und Strukturen bestimmt. Außerdem wird der Informationsgehalt der aufgenommenen NMR-Bilder detailliert mit dem konventioneller histologischer Schnitte verglichen, um die praktische Anwendbarkeit der NMR-Mikroskopie als nicht-invasive histologische Untersuchungsmethode zu quantifizieren.

Inwieweit feinste Strukturen in den NMR-Bildern zu erkennen sind, hängt neben der räumlichen Auflösung der Bilder vor allem auch vom Kontrast in den Bildern ab. Der Ursprung des Kontrastes kann dabei in fixierten Proben völlig von dem in lebendem Gewebe abweichen. In der existierenden Literatur ist der Ursprung des Kontrastes in fixierten Proben kaum quantitativ untersucht worden und somit weitgehend unbekannt. Deswegen wird beim Bienengehirn und bei den Delphinen außer der Anatomie auch der Einfluss der NMR-Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 sowie der Spindichte auf den Kontrast in den NMR-Bildern untersucht. Dazu werden räumlich hochaufgelöste Karten dieser Parameter akquiriert und miteinander, sowie vor allem mit dem Bildkontrast verglichen. Die Ergebnisse werden ebenfalls in den entsprechenden Kapiteln diskutiert.

2 Grundlagen der NMR-Mikroskopie

In diesem Kapitel wird eine Auswahl der für diese Arbeit relevanten Grundlagen der magnetischen Kernresonanz im allgemeinen und der NMR-Mikroskopie im speziellen beschrieben. Darüber hinaus werden einige Mechanismen erläutert, die das Auflösungsvermögen in der NMR-Mikroskopie begrenzen.

2.1 Grundlagen der Kernspinresonanz

Wasserstoffkerne, also Protonen, weisen im Vergleich zu anderen physiologisch interessanten und NMR-aktiven Atomkernen wie ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P und ^{23}Na ein größeres gyromagnetisches Verhältnis und eine bedeutend größere natürliche Häufigkeit auf. Deswegen induzieren sie das stärkste NMR-Signal und sind damit von besonderem Interesse für die NMR-Mikroskopie, bei der in der Regel nur sehr geringe Signalintensitäten zur Verfügung stehen. Im folgenden sollen daher ausgewählte Grundlagen der ^1H -NMR beschrieben werden.

2.1.1 Kernspin und äußeres Magnetfeld

NMR-aktive Atomkerne besitzen einen von Null verschiedenen Gesamtspin \vec{I} , der sich vektoriell aus der Summe der Spins der einzelnen Nukleonen zusammensetzt. Der Kernspin \vec{I} ist direkt mit dem magnetische Dipolmoment $\vec{\mu}$ verknüpft:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2-1)$$

Bei γ handelt es sich um das sogenannte gyromagnetische Verhältnis, eine für jeden Atomkern charakteristische skalare Größe:

$$\gamma = \frac{g \mu_N}{\hbar} \quad (2-2)$$

Dabei ist g der Landé-Faktor, $\mu_N = e \hbar / 2m_p$ das Kernmagneton mit der Protonenmasse m_p und \hbar das Planck'sche Wirkungsquantum h geteilt durch 2π . Für Protonen beträgt der Wert $\gamma / 2\pi = 42,57 \text{ MHz/T}$.

Aufgrund des magnetischen Dipolmoments spalten die Energieniveaus der Atomkerne im äußeren Magnetfeld \vec{B}_0 in $2I+1$ diskrete Zustände auf, sogenannte Zeeman-Niveaus, deren Anzahl sich aus der zum Kernspin \vec{I} gehörenden Spinquantenzahl I ergibt und die durch die magnetische Quantenzahl m beschrieben werden. Die magnetische Quantenzahl m ist ganzzahlig oder halbzahlig und kann die Werte $-I \leq m \leq +I$ annehmen. Wasserstoffkerne besitzen einen Kernspin \vec{I} vom Betrag $1/2$. Ihre Energieniveaus spalten im äußeren Magnetfeld in zwei

Energiezustände auf, die durch den Zusatzterm $E_m = -\hbar\gamma B_0 m$ mit den magnetischen Quantenzahlen $m = \pm 1/2$ beschrieben werden. Die Energiedifferenz dieser beiden Niveaus beträgt $\Delta E = \hbar\gamma B_0$.

Anschaulich können die beiden Zustände als parallele bzw. antiparallele Ausrichtung der magnetischen Dipole im äußeren Magnetfeld interpretiert werden. Im thermischen Gleichgewicht ist das niedrigere Energieniveau gemäß der Boltzmann-Statistik geringfügig stärker besetzt:

$$\frac{n_{\text{antiparallel}}}{n_{\text{parallel}}} = e^{-\Delta E / kT} \quad (2-3)$$

Hierbei sind $n_{\text{antiparallel/parallel}}$ die Besetzungszahlen pro Volumen, k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur.

Der Unterschied der Besetzungszahlen ist nur sehr gering und beträgt bei Zimmertemperatur und einer Feldstärke von einem Tesla weniger als $10^{-5} n_{\text{parallel}}$. Daraus ergibt sich auch die relativ geringe Empfindlichkeit der Kernspintomographie, z.B. im Vergleich zu optischen Bildgebungsverfahren.

Im klassischen Vektorbild präzedieren die magnetischen Dipolmomente $\vec{\mu}$ der Atomkerne im thermischen Gleichgewicht ohne feste Phasenbeziehung um die Richtung des externen Magnetfeldes \vec{B}_0 . Die charakteristische Präzessionsfrequenz ω_0 ergibt sich aus der Energiedifferenz der Zeeman-Niveaus und wird Larmor-Frequenz genannt:

$$\omega_0 = \frac{\Delta E}{\hbar} = \gamma B_0 \quad (2-4)$$

Aufgrund der Präzessionsbewegung ist makroskopisch nur die resultierende Gleichgewichtsmagnetisierung \vec{M}_0 parallel zur Richtung des externen Magnetfeldes \vec{B}_0 beobachtbar. Sie wird durch den Unterschied Δn zwischen den Besetzungszahlen der Zeeman-Niveaus beschrieben:

$$\vec{M}_0 = \Delta n \cdot \vec{\mu} \frac{\vec{B}_0}{B_0} = \rho_s \frac{\gamma^2 \hbar^2 \frac{1}{2} (\frac{1}{2} + 1)}{3 kT} \vec{B}_0 \quad (2-5)$$

Die Magnetisierung \vec{M}_0 ist proportional zur Dichte ρ_s der Atomkerne und zur Stärke des externen Magnetfeldes \vec{B}_0 .

Das Spinsystem eines Ensembles von Wasserstoffkernen kann durch Anlegen eines elektromagnetischen Wechselfeldes der Frequenz ω_0 zu phasenkohärenten Übergängen zwischen den beiden Zeeman-Energieniveaus angeregt und somit aus dem thermischen Gleichgewicht gebracht werden. Makroskopisch betrachtet wird hierdurch die Magnetisierung \vec{M}_0 aus der Richtung des Magnetfeldes \vec{B}_0 gedreht. Die ausgelenkte

Magnetisierung \vec{M} besitzt weiterhin den Betrag M_0 , zeigt aber nicht mehr in die Richtung von \vec{B}_0 . Dies führt zu einem Drehmoment $\vec{M} \times \vec{B}_0$, das eine Präzessionsbewegung der Magnetisierung \vec{M} um die Richtung des Magnetfeldes \vec{B}_0 bewirkt. In der Praxis verwendet man ein zusätzliches linear polarisiertes elektromagnetisches Wechselfeld, dessen Magnetfeldrichtung senkrecht zu \vec{B}_0 liegt, um den Übergang zwischen den beiden Zeeman-Niveaus anzuregen. Dieses linear polarisierte Wechselfeld lässt sich in zwei entgegengesetzt zirkular polarisierte Wechselfelder der Frequenzen $\pm \omega_0$ zerlegen, wobei sich eine der beiden Komponenten in Richtung der Präzession der Magnetisierung \vec{M} um \vec{B}_0 dreht und im folgenden als \vec{B}_1 bezeichnet wird.

Zur Vereinfachung der Darstellung verwendet man an dieser Stelle üblicherweise ein Koordinatensystem, das mit der Frequenz ω_0 um die Richtung von \vec{B}_0 rotiert. Außerdem wird ohne Beschränkung der Allgemeinheit angenommen, dass das externe Magnetfeld \vec{B}_0 in z-Richtung zeigen soll.

Im rotierenden Koordinatensystem ist das zusätzliche Magnetfeld \vec{B}_1 ortsfest und bewirkt eine Präzession der Magnetisierung \vec{M}_0 mit der Frequenz $\omega_1 = \gamma B_1$ um die Achse des Magnetfeldes \vec{B}_1 . Bei üblichen \vec{B}_1 -Feldstärken reichen kurze Hochfrequenzpulse (HF-Pulse) mit Pulslängen im Mikro- bis Millisekunden Bereich aus, um eine deutliche Auslenkung der Magnetisierung \vec{M}_0 aus der Gleichgewichtslage zu bewirken. Mit einem Puls der Dauer t_p erreicht man eine Auslenkung der Magnetisierung \vec{M}_0 um einen Winkel α :

$$\alpha = t_p \gamma B_1 \quad (2-6)$$

Zum Auslenken der Magnetisierung bis in die transversale xy-Ebene wird ein sogenannter 90°-Puls verwendet, ein 180°-Puls invertiert die Magnetisierung.

Die transversale Komponente der ausgelenkten Magnetisierung \vec{M} kann in einer senkrecht zu \vec{B}_0 platzierten Empfangsspule eine Spannung induzieren, die es ermöglicht, das Verhalten eines Ensembles von Spins nach einer Anregung zu beobachten.

2.1.2 Relaxationsmechanismen

Die angeregte Magnetisierung \vec{M} , die sich aus der Überlagerung der einzelnen Kernmomente ergibt, kehrt mit der Zeit in das thermische Gleichgewicht zurück. Dabei baut sich die longitudinale Magnetisierung M_z wieder bis zu ihrem Gleichgewichtswert M_0 auf und die transversale Magnetisierung M_{xy} nimmt ab. Die beiden zugrundeliegenden Relaxationsprozesse sind voneinander unabhängig:

1. Spin-Gitter-Relaxation

Durch Energieabgabe an die Umgebung kehrt das Spinsystem in den thermischen Gleichgewichtszustand zurück. Dieser Prozess wird durch die longitudinale Relaxationszeit T_1 charakterisiert, die beschreibt, wie sich die z-Komponente der Magnetisierung \vec{M} monoexponentiell ihrem Gleich-

gewichtswert M_0 annähert. Im rotierenden Koordinatensystem wird dies durch folgende Gleichung beschrieben (mit der Ausgangsmagnetisierung $M_z(0)$ direkt nach der Anregung):

$$\begin{aligned} M_z(t) &= M_z(0) \cdot e^{-t/T_1} + M_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1}) \\ &= M_0 + (M_z(0) - M_0) \cdot e^{-t/T_1} \end{aligned} \quad (2-7)$$

2. Spin-Spin-Relaxation

Dieser ebenfalls monoexponentiell verlaufende Prozess wird durch die transversale Relaxationszeit T_2 beschrieben und stellt einen Energieaustausch zwischen einzelnen Spins dar. Durch den gleichzeitig auftretenden Spinflip zweier Spins geht die durch das rotierende Magnetfeld \vec{B}_1 erzeugte Phasenkohärenz der angeregten Spins verloren, was zum Verschwinden der transversalen Komponenten der Magnetisierung \vec{M} führt. Der Zeitverlauf der transversalen Magnetisierung wird im rotierenden Koordinatensystem folgendermaßen beschrieben (mit der Ausgangsmagnetisierung $M_{x,y}(0)$ direkt nach der Anregung):

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0) \cdot e^{-t/T_2} \quad (2-8)$$

Die Bloch-Gleichungen beschreiben klassisch das Verhalten eines Spin-Ensembles im äußeren Magnetfeld \vec{B}_0 . Dabei werden sowohl die Dynamik der Relaxation als auch die Präzession der Magnetisierung \vec{M} beschrieben [Blo-46]:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma (\vec{M} \times \vec{B}_0)_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (2-9)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma (\vec{M} \times \vec{B}_0)_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (2-10)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma (\vec{M} \times \vec{B}_0)_z - \frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2-11)$$

Lokale Magnetfeldinhomogenitäten des externen Magnetfeldes \vec{B}_0 sind gleichbedeutend mit unterschiedlichen Larmor-Frequenzen für benachbarte Spins. Dies bewirkt einen deutlich beschleunigten Verlust der Phasenkohärenz der Spins und somit ein schnelleres Abklingen der transversalen Magnetisierung, das durch die effektive transversale Relaxationszeit T_2^* beschrieben wird:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2,inh.}} \quad (2-12)$$

Der Verlust der Phasenkohärenz der Spins aufgrund von lokalen Magnetfeldinhomogenitäten ist reversibel und kann durch die Refokussierung der Magnetisierung in der xy -Ebene umgekehrt werden. Die Spin-Spin-Relaxation selbst ist ein irreversibler Prozess, der einen Anstieg der Entropie zur Folge hat.

2.2 NMR-Bildgebung

Die Kodierung der Ortsinformation kann in einem NMR-Experiment durch die Verwendung konstanter Magnetfeld-Gradienten erreicht werden. Der Gradient G_i ist hierbei immer der Gradient der z -Komponente des Magnetfeldes entlang einer der drei Raumrichtungen, also z.B. $G_x = \partial B_z / \partial x$. Aus der Überlagerung eines dreidimensionalen Gradientenfeldes \vec{G} mit dem statischen Magnetfeld \vec{B}_0 ergibt sich folgende Ortsabhängigkeit der Resonanzfrequenz der einzelnen Spins:

$$\omega(\vec{r}) = \gamma (B_0 + \vec{G}\vec{r}) = \omega_0 + \gamma \vec{G}\vec{r} \quad (2-13)$$

Dies wiederum bedeutet, dass durch eine entsprechende Wahl der Frequenz des eingestrahlten HF-Pulses nur Spins an bestimmten Orten angeregt werden und dass durch die Wahl der Detektionsfrequenz nur das Signal von Spins an bestimmten Orten akquiriert wird. In der Praxis wird jeweils ein ausgewählter Frequenzbereich zur Anregung und Detektion verwendet.

2.2.1 Schichtgradient

Zur Anregung einer einzelnen Schicht in der Probe wird meist ein frequenzselektiver HF-Puls einer bestimmten Bandbreite eingestrahlt, während ein sogenannter Schichtgradienten G_S (engl. slice gradient) anliegt. Wegen des anliegenden Gradienten hängen die Resonanzfrequenzen der Spins in Richtung des Schichtgradienten linear vom Ort ab. Deswegen werden nur Spins in einer Schicht der Breite Δz angeregt, deren Resonanzfrequenzen innerhalb der Bandbreite $\Delta\omega$ des HF-Pulses liegen (ohne Einschränkung der Allgemeinheit wird hierbei angenommen, dass die Schichtnormale in z -Richtung zeigen soll):

$$\Delta\omega = \gamma G_S \Delta z \quad (2-14)$$

Der benötigte HF-Puls ist in seiner Amplitude moduliert und relativ lang, um eine geringe Bandbreite $\Delta\omega$ zu besitzen. Die Fouriertransformierte der Einhüllenden des Pulses entspricht in etwa dem spektralen Anregungsprofil. Um die gesamte Probe anzuregen, benötigt man HF-Pulse mit möglichst großer spektraler Anregungsbreite. Diese kann durch die Verwendung nicht-frequenzselektiver HF-Pulse mit sehr kurzen Pulsdauern bei großer HF-Leistung realisiert werden.

2.2.2 Lesegradient

Während der Datenaufnahme kann, ebenfalls durch das Anlegen eines Gradienten, eine Ortskodierung erreicht werden. Der sogenannte Lesegradient G_R (engl. read gradient) soll hier in x -Richtung verlaufen und bewirkt eine lineare Ortsabhängigkeit der Resonanzfrequenz:

$$\omega(x) = \omega_0 + \gamma G_R x \quad (2-15)$$

Dabei soll der konstante Gradient G_R an der Stelle $x = 0$ seinen Nulldurchgang besitzen.

Mit Einführung der Größe $k_x = \gamma G_R t$ kann man von den ursprünglich über die Fouriertransformation verbundenen Größen ω und t

$$S(\omega) \propto \int \tilde{S}(t) e^{-i\gamma G_R x t} dt \quad (2-16)$$

zu den Größen x und k übergehen:

$$S(x) \propto \int \tilde{S}(k_x) e^{-ik_x x} dk_x \quad (2-17)$$

In dieser Darstellung ist es auch möglich, ein Bild mit den Signalintensitäten $S(x)$ im Ortsraum zu beschreiben.

2.2.3 Phasengradient

In der dritten Raumrichtung wird das NMR-Signal mit dem sogenannten Phasenkodiergradienten G_P (engl. phase gradient) ortskodiert. Dieser soll hier in die y -Richtung zeigen und wird in einem NMR-Experiment für die Dauer t_P zwischen Schichtauswahl und Datenaufnahme eingesetzt. Während der Phasengradient eingeschaltet ist, präzedieren die Spins mit unterschiedlichen Frequenzen $\omega(y)$ in Abhängigkeit von ihrer Position in y -Richtung. Die Spins erhalten während der Zeit t_P eine ortsabhängige Phase $\varphi(y)$ aufgeprägt:

$$\varphi(y) = \gamma G_P y t_P \quad (2-18)$$

Wiederholt man die Datenaufnahme für mehrere verschiedene Werte des Phasengradienten, so ergeben sich unterschiedliche Phasenänderungen abhängig von der Position in y -Richtung. Da die unterschiedlichen Phasenänderungen entlang dieser Raumrichtung verschiedenen Resonanzfrequenzen entsprechen, kann eine Serie von Akquisitionen mit unterschiedlichen Phasengradienten als ein ortsabhängig frequenzkodiertes NMR-Signal betrachtet werden. Deswegen kann, wie zuvor im Fall des Lesegradienten (Kapitel 2.2.2), die räumliche Verteilung des NMR-Signals durch Fouriertransformation berechnet werden:

$$S(y) \propto \int \tilde{S}(k_y) e^{-ik_y y} dk_y \quad (2-19)$$

Hierbei ist $k_y = \gamma G_P t_P$, um die Signalintensität S wieder als Funktion des Ortes darstellen zu können.

Als Repetitionszeit T_R eines NMR-Bildgebungsexperiments bezeichnet man die Wiederholzeit von einem Phasenkodierschritt zum nächsten. Damit bei jedem einzelnen Phasenkodierschritt wieder ein möglichst großer Anteil der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 zur Verfügung steht, sollte eine ausreichende Relaxation zurück in den Gleichgewichtszustand gewährleistet werden, indem die Repetitionszeit T_R mindestens so groß wie die längste T_1 -Zeit der Probe, besser drei- bis fünfmal so lange, gewählt wird. Bei schnellen Bildgebungssequenzen, die bei jedem Phasenkodierschritt nur einen kleinen Teil der longitudinalen Magnetisierung anregen, kann auf das Ausrelaxieren der Probe zugunsten der Aufnahmegeschwindigkeit verzichtet werden.

Durch die Kombination der drei Bildgebungsgradienten kann eine eindeutige dreidimensionale Ortskodierung des NMR-Signals der gesamten Probe vorgenommen werden. Die Probe wird dazu in beiden Raumrichtungen der angeregten Schicht in eine bestimmte Anzahl von Bildpunkten (N_R , N_P) unterteilt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass während einer einzelnen Akquisition unter einem Lesegradienten nur eine eindimensionale Projektion mit N_R Bildpunkten aufgezeichnet wird. Die Aufnahme der zweiten Dimension eines NMR-Bildes kann nur durch die Wiederholung der Akquisition der eindimensionalen Projektion mit einem anderen Wert des Phasenkodiergradienten erreicht werden. Für jeden der N_P Bildpunkte in dieser Raumrichtung ist dabei die Akquisition einer Einzelprojektion nötig, was bedeutet, dass sich die gesamte Akquisitionszeit aus dem Produkt der Anzahl der Phasenkodierschritte N_P mit der Repetitionszeit T_R ergibt.

2.3 FID und Echosignal

Das NMR-Signal einer Probe kann zum einen direkt nach deren Anregung als sogenannter Free Induction Decay (FID) akquiriert werden. Zum anderen ist es möglich, das NMR-Signal zu einem späteren Zeitpunkt als Echosignal aufzuzeichnen. Wegen des größeren zeitlichen Abstands zwischen HF-Anregungspuls und Akquisition, können bei der Akquisition eines Echosignals etwaige Einschwingvorgänge in der Probe und/oder Totzeiten des Spektrometers abgewartet und deswegen umgangen werden. Außerdem handelt es sich beim Echosignal um ein symmetrisches Signal, so dass dessen Maximum genauer bestimmt werden kann, als dies beim abfallenden FID möglich ist. In der NMR existieren verschiedene Echo-Typen, von denen im folgenden zwei beschrieben werden, das Spin-Echo und das Gradienten-Echo.

2.3.1 Das Spin-Echo

Das sogenannte Spin-Echo stellt die kurzzeitige Phasenkohärenz (vgl. Abschnitt 2.1.2) dar, die nach der Anregung durch die Refokussierung der transversalen Magnetisierung erreicht werden kann. In der Praxis wird im Zeitabstand τ nach einer 90° -Anregung ein 180° -Refokussierungspuls eingesetzt, was die Auffächerung der Phasen der einzelnen Spins invertiert, so dass sich zum Zeitpunkt 2τ nach der Anregung alle Spins wieder in Phase befinden. Der zeitliche Abstand zwischen der Anregung und dem Auftreten des Spin-Echos wird Echozeit T_E genannt. Sie spielt in der NMR eine wichtige Rolle, da die Echoamplitude zum Zeitpunkt T_E gegenüber der Anfangsamplitude allein durch die natürliche Spin-Spin-Relaxation vermindert ist. Für die Signal-Intensität des Spin-Echo-Experiments mit einem 90° -Anregungspuls, der oben beschriebenen Repetitionszeit T_R und der Echozeit T_E ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$S \propto S_0 \left(1 - e^{-T_R/T_1}\right) e^{-T_E/T_2} \quad (2-20)$$

Dabei ist S_0 die maximale Signal-Intensität, die man direkt nach der ersten Anregung einer ausrelaxierten Probe erhält.

2.3.2 Das Gradienten-Echo

Das Gradienten-Echo stellt eine weitere Methode dar, um eine Phasenkohärenz der Spins zu erreichen. Wie im Fall des Phasengradienten (vgl. Abschnitt 2.2.3), wird nach der Anregung der Spins ein Magnetfeldgradient G für eine bestimmte Zeit t eingeschaltet. Er soll hier in y -Richtung zeigen. Solange der Magnetfeldgradient eingeschaltet ist, präzedieren die Spins, wie beschrieben, mit unterschiedlichen Frequenzen $\omega(y)$ (siehe Abschnitt 2.2) in Abhängigkeit von ihrer Position in Richtung des Gradienten. Während der Zeit t bekommen die Spins deshalb, wie oben beschrieben, eine ortsabhängige Phase $\varphi(y)$ aufgeprägt und dephasieren:

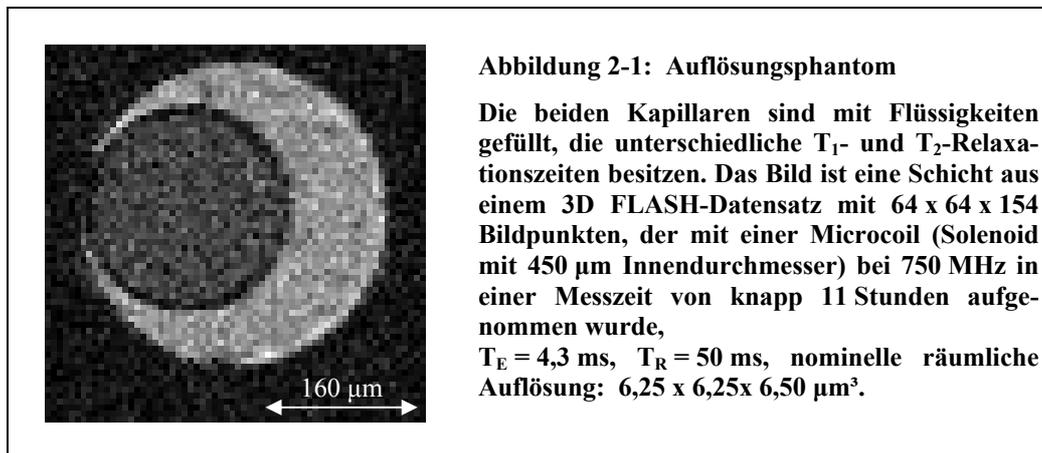
$$\varphi(y) = \gamma G y t \quad (2-21)$$

Wird anschließend der umgekehrte Magnetfeldgradient $-G$ geschaltet, werden den Spins die entgegengesetzten Phasen aufgeprägt und sie rephasieren wieder. Wie zuvor beim Spin-Echo entsteht zum Zeitpunkt $2t$ eine Phasenkohärenz – das sogenannte Gradienten-Echo. Im allgemeinen verwendet man bei Gradienten-Echo-Sequenzen kürzere Echozeiten als bei Spin-Echo-Experimenten, da neben den Magnetfeldgradienten weiterhin auch die probenbedingten Magnetfeldinhomogenitäten zu einer Dephasierung der Spins führen. Die Echoamplitude klingt deswegen mit der Relaxationszeitkonstanten T_2^* ab, d.h. meist deutlich schneller als beim Spin-Echo.

2.4 NMR-Mikroskopie

Wie in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben, verbindet die NMR-Mikroskopie eine hohe räumliche Auflösung mit dem Vorteil der NMR, nicht-invasiv Bilder aus dem Innern verschiedenster Objekte gewinnen zu können. Oft werden daher mit der NMR-Mikroskopie auch biologische und lebende Proben untersucht.

Im engeren Sinne spricht man von NMR-Mikroskopie, wenn räumliche Auflösungen kleiner $(100\ \mu\text{m})^3$ erzielt werden. Aber nicht allein das Auflösungsvermögen ist in der NMR-Mikroskopie wichtig, sondern vor allem auch ein ausgeprägter Kontrast zwischen den interessierenden Gewebetypen. Stimmen alle Voraussetzungen, sind heute isotrope räumliche Auflösungen von wenigen Mikrometern möglich (vgl. Abbildung 2-1). Mit einer anisotropen Voxelgröße konnte bei einer Schichtdicke von $75\ \mu\text{m}$ sogar eine Auflösung von $(1\ \mu\text{m})^2$ in der Bildebene erreicht werden [Lee-01].



Eine hohe räumliche Auflösung ist gleichbedeutend mit kleinen Voxelgrößen, also einer geringen Anzahl von Spins, die zum Signal eines einzelnen Voxels beitragen. Um bei einem kleinen Voxel ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR, engl. Signal-to-Noise-Ratio) zu erhalten, wird oft eine entsprechend große Anzahl von Mittelungen durchgeführt, was zu einer langen Messzeit führt. Neben dem SNR sind Diffusion und Linienverbreiterungsmechanismen weitere wichtige Faktoren, die das Auflösungsvermögen in der NMR-Mikroskopie begrenzen [Hou-84].

2.4.1 Steigerung des SNR

Zur Verbesserung des durch das kleine Voxelvolumen bedingten niedrigen SNR in der NMR-Mikroskopie gibt es mehrere Möglichkeiten. Grundlegend ist die Wahl der entsprechenden Bildgebungssequenz, da diese, zusätzlich zu ihrem Einfluss auf das SNR, vor allem den Bildkontrast bestimmt. Weitere Ansätze, das SNR zu erhöhen, ohne unnötig lange Messzeiten

aufgrund einer großen Zahl von Mittellungen in Kauf nehmen zu müssen, ergeben sich aus dessen Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie die folgende Gleichung zeigt [Abr-61]:

$$SNR \propto V \frac{B_1 B_0^2}{F_n \sqrt{4k_B T \cdot N_R \Delta\nu \cdot (R_{Spule} + R_{Probe})}} \quad (2-22)$$

Dabei sind V das Volumen eines Voxels, B_1 und B_0 die Beträge des linear polarisierten Wechselfeldes und des externen Magnetfeldes, F_n die Rauschzahl des Verstärkers, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur (hier der Spule und der Probe). N_R ist die Anzahl der Bildpunkte in Leserichtung und $\Delta\nu$ der spektralen Abstand zweier benachbarter Bildpunkte in dieser Raumrichtung. Das Produkt $N_R \Delta\nu$ stellt somit die spektrale Bandbreite der Akquisition dar. R_{Spule} und R_{Probe} sind die Verlustwiderstände der Spule und der Probe.

Zur Verbesserung des SNR ist z.B. der Einsatz möglichst kleiner, an die Probe angepasster Spulen besonders effektiv, da B_1 indirekt proportional zur Größe der Spule ist und kleine Spulen deswegen ein um Größenordnungen besseres SNR liefern können [Pec-91].

Da bei kleinen Spulen der Probenverlustwiderstand gegenüber dem Spulenverlustwiderstand vernachlässigbar ist, der letztere aber auch von der Resonanzfrequenz abhängt, ergibt sich insgesamt für das SNR eine Proportionalität zu $B_0^{7/4}$, wenn man dielektrische und magnetische Verluste in der Probe vernachlässigt [Zho-92]. Eine Erhöhung des externen Magnetfeldes führt somit zu einem deutlichen SNR-Gewinn. Allerdings kann durch die Veränderung der NMR-Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 bei hohen Feldern auch der Kontrast in den Bildern negativ beeinflusst werden.

Durch die Verringerung der spektrale Bandbreite $N_R \Delta\nu$ der Akquisition kann ebenfalls ein SNR-Gewinn erzielt werden. Die Anzahl der Bildpunkte N_R in Leserichtung wird meist durch die Größe der Probe und die gewünschte Auflösung vorgegeben. Deswegen muss hier der spektrale Abstand $\Delta\nu$ benachbarter Bildpunkte verringert werden. Allerdings gibt es auch dabei einen Nachteil, da bei kleinen Bandbreiten Chemical-Shift¹-Artefakte verstärkt ins Gewicht fallen. Außerdem verlängern geringere spektrale Bandbreiten die Akquisitions- und meist auch die Echozeiten, weshalb der SNR-Gewinn ggf. durch Relaxationseffekte wieder verloren gehen kann.

Die Verringerung des thermischen Rauschens durch Erniedrigung der Temperatur ist eine weitere Möglichkeit, das SNR zu verbessern. Allerdings ist dies vor allem bei *in-vivo* Experimenten schwierig, da bei diesen Experimente die Probe oft sogar erwärmt werden muss, um entsprechende Umgebungsbedingungen zu schaffen (vgl. Abschnitt 4.3.2.1, Perfusionsapparatur zur Beobachtung der Tumorinvasion).

¹ engl. für Chemische Verschiebung: Verschiebung der Resonanzfrequenz aufgrund der chemischen Umgebung des beobachteten Atomkerns

Von den in Gleichung (2-22) beschriebenen Faktoren bleiben noch die Rauschzahl des Verstärkers und das Volumen der Voxel. Da das SNR indirekt proportional zur Rauschzahl ist, sollte immer ein Verstärker bzw. eine Verstärkerkette mit möglichst geringer Rauschzahl verwendet werden.

Für die erzielbare räumliche Auflösung, d.h. die Größe des Volumens der einzelnen Voxel, muss immer der passende Kompromiss zwischen dem gewünschten Auflösungsvermögen, der zur Verfügung stehenden Messzeit und dem nötigen SNR bzw. Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis (CNR, engl. Contrast-to-Noise-Ratio) gefunden werden. Da das SNR proportional ist zum Volumen der Voxel und der Wurzel der Anzahl der Mittelungen, ergibt sich für ein konstantes SNR, dass die Messzeit indirekt proportional zum Quadrat des Volumens der Voxel ist. Im Fall von kubischen Voxeln ist die Messzeit somit indirekt proportional zur sechsten Potenz der Kantenlänge der Voxel. Bei konstantem Field-of-View (FOV) bedeutet eine höhere Auflösung auch immer eine größere Zahl der Phasenkodierschritte. Allein hieraus resultiert eine längere Messzeit, selbst wenn man bei der Erhöhung des Auflösungsvermögens einen SNR-Verlust in Kauf nehmen kann. Außerdem entstehen durch die für eine höhere räumliche Auflösung notwendigen stärkeren Magnetfeldgradienten weitere Probleme. Die durch das schnelle Schalten der Gradienten erzeugten Wirbelströme und Vibrationen des Gradientensystems nehmen mit der Stärke der Gradienten zu. Deswegen können sie bei höheren Auflösungen auch zu stärkeren Artefakten in den Bildern führen. Diese sind wiederum gerade bei hohen Auflösungen besonders störend, da sie sogar die Auflösung begrenzen können.

2.4.2 Begrenzung der Auflösung durch die Linienbreite

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der die räumliche Auflösung in der NMR-Mikroskopie begrenzt und ebenfalls von der Stärke der verwendeten Magnetfeldgradienten abhängt, ist die spektrale Linienbreite.

Bei der in Leserichtung verwendeten Frequenz-Ortskodierung können zwei benachbarte Voxel im Abstand Δr genau dann eindeutig voneinander getrennt werden, wenn der spektrale Abstand $\Delta \nu$ dieser beiden Voxel größer ist als die Linienbreite $\delta \nu$ der Messung, $\Delta \nu \geq \delta \nu$. Umgeformt ergibt sich daraus für den minimalen Abstand Δr der Voxel:

$$\Delta r \geq \frac{2\pi \delta \nu}{\gamma G_R} \quad (2-23)$$

wobei G_R der Magnetfeldgradienten in Leserichtung ist.

Für den Fall eines homogenen Magnetfeldes im Bereich der Probe und bei Vernachlässigung von Suszeptibilitäts- und Chemical-Shift-Effekten, kann eine Lorentzform für die Linien im Spektrum angenommen werden. Dies führt zur Linienbreite $\delta \nu = 1/(\pi T_2)$, d.h. aus der Relaxationszeit T_2 und der Gradientenstärke lässt sich das theoretisch mögliche räumliche Auflösungsvermögen des NMR-Mikroskops berechnen. In der Praxis wird die Linienbreite

durch Magnetfeld-Inhomogenitäten, Suszeptibilitätsunterschiede und den Chemical-Shift vergrößert, so dass man zum Erreichen einer bestimmten Auflösung stärkere Gradienten benötigt, als nach obiger Formel berechnet.

In Phasenkodierrichtung ergibt sich die Grenze des Auflösungsvermögen nicht aus der Linienbreite, sondern durch Phaseninstabilitäten und wird durch folgende Gleichung beschrieben [Hou-84]:

$$\Delta r \geq \frac{\Delta\Phi}{\gamma \int_0^t G(t') dt'} \quad (2-24)$$

mit $G(t')$ als beliebig geformten Gradientenpuls und $\Delta\Phi$ als der kleinsten detektierbaren Phase.

Die Gleichungen (2-23) und (2-24) zeigen, dass durch entsprechend starke Gradienten eine Auflösungsbegrenzung aufgrund der Linienbreite bzw. der Phaseninstabilitäten weitgehend kompensiert werden kann. Dies funktioniert allerdings nicht unbegrenzt, da stärkere Gradienten den oben angesprochenen SNR-Verlust aufgrund der größeren spektralen Bandbreite und die durch Wirbelströme und Vibrationen bedingten Artefakte verstärken.

2.4.3 Begrenzung der Auflösung durch Diffusion

Spin-Diffusion begrenzt ebenfalls das Auflösungsvermögen und führt zu einer Signalabschwächung, die von der Stärke der angelegten Gradienten abhängt. Dabei variiert der Einfluss der Diffusion auf das NMR-Mikroskopie-Experiment stark mit der verwendeten Ortskodierungsmethode [Zho-92].

Freie Diffusion auf molekularer Ebene unter angelegten Magnetfeldgradienten kann zu einer inkohärenten und irreversiblen Phasen-Dispersion Φ_d der transversalen Magnetisierung beitragen [Ahn-89]:

$$\Phi_d = -\gamma^2 D \int_0^t \left[\int_{t'}^t G(t'') dt'' \right]^2 dt' \quad (2-25)$$

mit der Diffusionskonstanten D für freie Diffusion.

Unter der Annahme einer Gaußverteilung der Phasen $P(\Phi_d)$ ergibt sich für die angeregte Magnetisierung M [Zho-92]:

$$\begin{aligned}
M &= M_0 \int_{-\infty}^{+\infty} P(\Phi_d) \cos \Phi_d d\Phi_d \\
&= M_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \cos \Phi_d \exp\left[-\frac{\Phi_d^2}{2\sigma^2}\right] d\Phi_d \\
&= M_0 \exp\left[\frac{-\sigma^2}{2}\right]
\end{aligned} \tag{2-26}$$

mit σ als der Wurzel des Mittelwertes des Quadrats der Phasendispersion Φ_d zum Zeitpunkt t :

$$\sigma^2 \equiv \langle \Phi_d^2 \rangle = 2\gamma^2 D \int_0^t \left[\int_{t'}^t G(t'') dt'' \right]^2 dt' \tag{2-27}$$

Den Einfluss der Diffusion auf die räumliche Auflösung kann man aus den obigen Gleichungen ableiten. Aus Gleichung (2-26) ergibt sich für die Leserichtung (Frequenz-Ortskodierung), dass das akquirierte NMR-Signal aufgrund der diffusionsbedingten Phasendispersion exponentiell mit $\exp(-\sigma^2/2)$ abfällt. Dieser Signalverlust steigt mit der Dauer und der Stärke der angelegten Gradienten. Außerdem kann man aus Gleichung (2-26) ablesen, dass das NMR-Signal zeitlich durch den Diffusionseffekt moduliert wird, was zu einer Linienverbreiterung in der Frequenz-Domäne führt. Im Gegensatz zur natürlichen, durch T_2 bedingten Linienverbreiterung, kann die diffusionsbedingte Linienverbreiterung nicht mehr durch eine Lorentzfunktion beschrieben werden, da σ^2 proportional zur dritten Potenz der Zeit ist [Zho-92]. Im Rahmen seiner Promotion hat M. Brandl den Einfluss der Diffusion abgeschätzt und berechnet, dass die diffusionsbedingte physikalische Grenze der Ortsauflösung in Leserichtung für Gewebe $2,0 \mu\text{m}$ beträgt (bei einer Gradientenstärke von $1,0 \text{ T/m}$ und einer gewebetypischen Diffusionskonstanten von $0,7 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) [Bra-96].

Aus Gleichung (2-27) ergibt sich ein diffusionsbedingter Fehler in der Phasenkodierung, der die räumliche Auflösung in dieser Richtung begrenzt. Ersetzt man die kleinste detektierbare Phase $\Delta\Phi$ in Gleichung (2-23) durch den Wert der Phasendispersion aus Gleichung (2-27), so ergibt sich als Begrenzung für das Auflösungsvermögen aufgrund des Fehlers bei der Phasenkodierung folgende Formel [Zho-92]:

$$\Delta r = \sqrt{\frac{2}{3} D t_{pe}} \tag{2-28}$$

wobei t_{pe} die Zeit ist, während der der Phasenkodiergradient anliegt.

Insgesamt wirkt sich die freie molekulare Diffusion also hauptsächlich durch Signalabschwächung, Linienverbreiterung und Phaseninkohärenzen auf die NMR-Mikroskopie aus und kann zum "Verwischen" feiner Strukturen führen.

2.4.4 Überprüfung der räumlichen Auflösung

Die Überprüfung der in einem NMR-Mikroskopie-Experiment tatsächlich erreichten Auflösung gestaltet sich schwierig, da das Auflösungsvermögen wie oben beschrieben von unterschiedlichen Faktoren bestimmt wird und in biologischen Proben selten ein Vergleichsmaßstab gleichzeitig mit der Probe am Ort der Probe gemessen werden kann. Befindet sich der Vergleichsmaßstab aber in einem weniger empfindlichen Bereich der Spule als die Probe oder wird zuerst eine Messung am Auflösungsphantom und anschließend eine Messung an der biologischen Probe durchgeführt, so sind die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Linienbreiten, Signalstärken und unterschiedlichem Diffusionsverhalten meist nicht direkt miteinander vergleichbar.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Projekten wurde deswegen versucht, neben den Messungen mit Auflösungsphantomen auch biologische Strukturen bekannter Größe und Form, quasi als internen Standard, zur Verifizierung der tatsächlich erreichten Auflösung heranzuziehen. Die hierdurch abgeschätzte Abweichung der tatsächlichen Größe der untersuchten Strukturen von der gemessenen Größe dieser Strukturen war für das gesamte NMR-Experiment inklusive Instabilitäten der Gradienten-Hardware und Partial Volume Effekten¹ jeweils kleiner als $\pm 4\%$ der tatsächlichen Größe der Strukturen (vgl. Abschnitt 5.1.2.3 und Abschnitt 6.3.2).

¹ Partial Volume Effekte: Aufgrund des endlichen Auflösungsvermögens der NMR-Experimente werden Strukturen, die einen einzelnen Bildpunkte nur zum Teil ausfüllen fälschlicherweise so abgebildet, als würden sie den Bildpunkt entweder komplett oder gar nicht ausfüllen.

3 NMR-Experimente

In diesem Kapitel werden die NMR-Geräte und diejenigen NMR-Experimente beschrieben, die nach einer Optimierungsphase als am Besten geeignet für die jeweiligen Fragestellungen befunden worden waren und deswegen zur Akquisition der in dieser Arbeit aufgenommenen Messdaten eingesetzt worden sind.

Dabei handelt es sich in allen Fällen um Spin-Echo-Experimente, die zwar nicht immer das beste SNR lieferten, aber in allen Fällen das beste Kontrastverhalten aufwiesen. So wurde mit schnellen Gradienten-Echo-Sequenzen, wie der klassischen FLASH-Sequenz [Haa-86] oder auch der TrueFISP-Sequenz [Opp-86], bei einzelnen Probenbildern ein besseres SNR pro Zeiteinheit erzielt, aber in allen Fällen lieferten die langsamen Spin-Echo-Sequenzen ein besseres Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis (CNR) und/oder weniger störende Artefakte in den Bildern.

3.1 NMR-Spektrometer

Die NMR-Experimente wurden an zwei NMR-Spektrometern der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) mit vertikal ausgerichteten, supraleitenden Magneten durchgeführt. Das erste Gerät ist ein AMX 500 wide bore Spektrometer (Innendurchmesser der Bohrung: 89 mm) mit einer Magnetfeldstärke von 11,7 T und einer maximalen Gradientenstärke von 0,66 T/m. Beim zweiten Spektrometer handelt es sich um das Modell Avance 750, ebenfalls in der wide bore Ausführung, mit einer Magnetfeldstärke von 17,6 T und einer maximalen Gradientenstärke von 1,0 T/m. In beiden Fällen gibt der Name des Gerätes die Protonen-Resonanzfrequenz des Spektrometers in MHz an.

Bei beiden Geräten haben die Gradientensysteme einen Innendurchmesser von 40 mm zur Aufnahme des Probenkopfes. Dieses Innenvolumen stellt den gesamten zur Verfügung stehenden Platz für die Spulen, Spulen- und Probenhalterungen und sonstigen Aufbauten des Probenkopfes dar. Die Sendeleistung des Protonenkanals beträgt beim AMX 500 Spektrometer 50 W, beim Avance 750 Spektrometer 300 W. Beide Geräte sind mit Temperatur-Kontrolleinheiten ausgestattet, so dass die gewünschte Proben temperatur immer genau eingestellt werden kann.

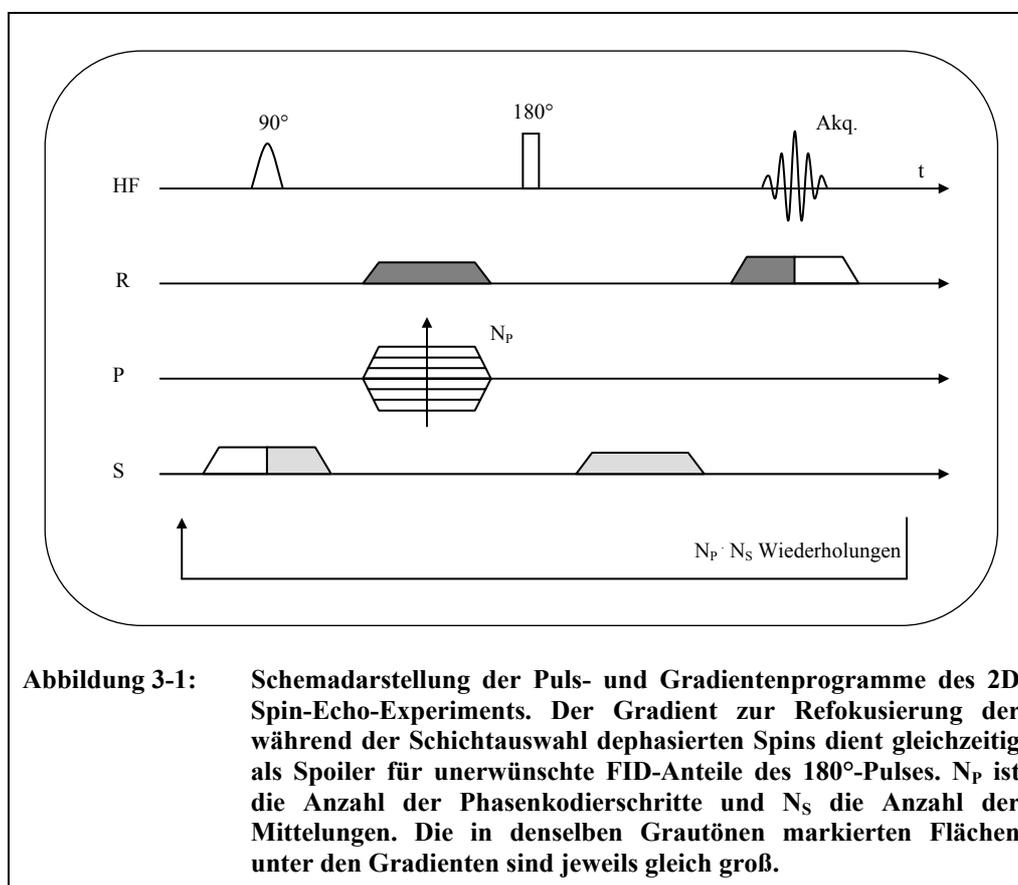
3.2 Durchgeführte NMR-Experimente

3.2.1 Das Spin-Echo-Experiment

Wie im Kapitel 2.3.1 beschrieben, besteht ein Spin-Echo-Experiment aus einem 90°-Anregungspuls und einem 180°-Refokussierungspuls. Als 90°-Puls wurde ein frequenzselektiver Gaußpuls mit einer Bandbreite von 2,5 kHz bei einer Dauer von einer

Millisekunde verwendet. Der 180° -Puls war ein sogenannter Hartpuls, also ein nicht-frequenzselektiver Rechteck-Puls, der, je nach Probe und Spule, eine Dauer von einigen wenigen Mikrosekunden bis zu mehreren zehn Mikrosekunden besaß. Beide Pulse wurden für jede Probe zu Beginn jeder Messzeit neu bestimmt, um ein optimales Pulsprofil in der Probe zu gewährleisten.

Die Echozeit T_E wurde entweder möglichst kurz gewählt, um den Signalverlust aufgrund der Spin-Spin-Relaxation so gering wie möglich zu halten und Bilder mit Spin-Dichte-Kontrast zu erzeugen, oder sie wurde so eingestellt, dass der gewünschte T_2 -Kontrast in den Bildern zu sehen war. Da meist auch eine geringe spektrale Bandbreite für die Akquisition gewählt wurde, um ein möglichst großes SNR zu gewährleisten (vgl. Gleichung (2-22)), lagen die Echozeiten bei fast allen Experimenten im Bereich von 8 bis 20 ms.

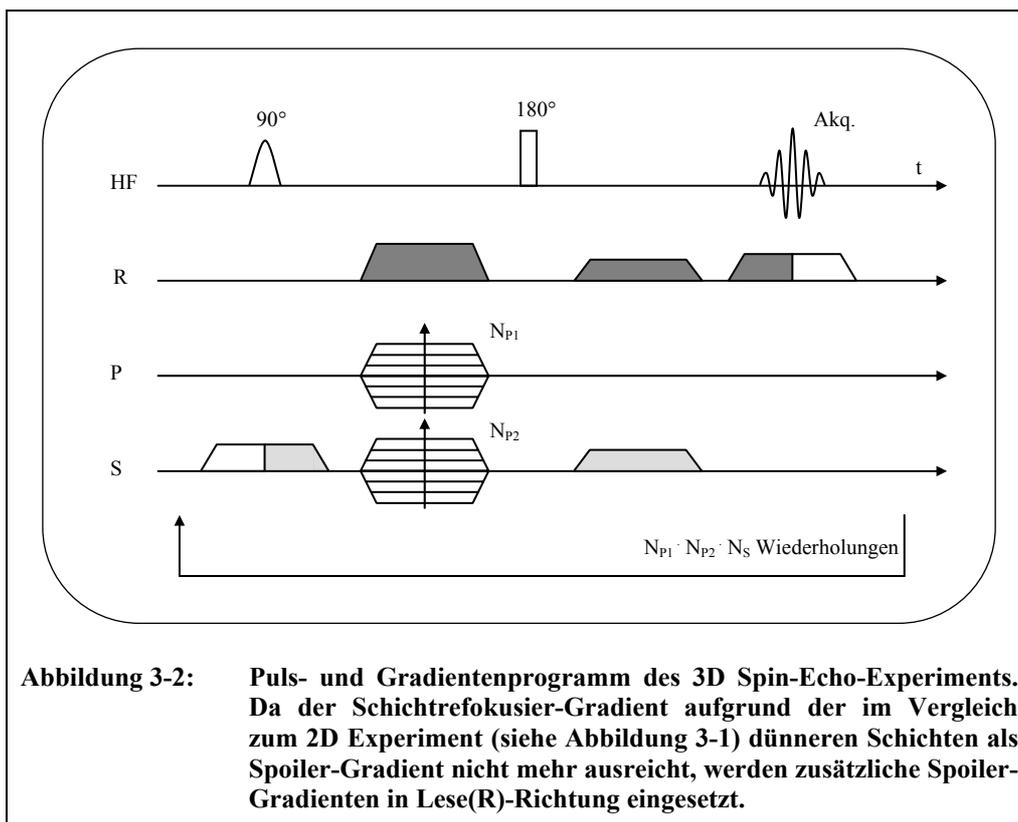


Zur Ortskodierung des NMR-Signals wird der Anregungspuls gesendet, während ein Schichtgradient eingeschaltet ist (vgl. Abbildung 3-1). Nach der Schichtauswahl wird zur Kodierung der zweiten Raumrichtung ein Phasengradient eingesetzt. In der dritten Raumrichtung wird das Signal während der Akquisition durch den Lesegradienten ortskodiert (siehe Kapitel 2.2).

Da alle eingesetzten Gradienten zur Dephasierung der Spins beitragen, dies aber nur bei der Phasenkodierung gewünscht ist, werden alle anderen Dephasierungen durch entgegengesetzt geschaltete Magnetfeldgradienten egalisiert. Die Spins werden durch einen zusätzlichen

Gradienten in der Ausleserichtung während der Phasenkodierung vordephasiert. Während der eigentlichen Akquisition wird diese Vordephasierung durch den Lesegradienten ausgeglichen, was zum Auftreten eines Gradienten-Echos führt. Die effektiven Flächen unter den Gradienten werden dabei so gewählt, dass Spin- und Gradienten-Echo zeitlich zusammenfallen, um ein Echo mit möglichst großer Amplitude zu akquirieren. Die Dephasierung aufgrund des Schichtgradienten wird erst nach dem 180° -Puls durch einen weiteren Gradienten ausgeglichen, da dieser hier auch auf ggf. durch den 180° -Puls erzeugte FID-Anteile wirkt und diese dephasiert. Dieser Gradient übernimmt somit auch die Funktion eines Spoilers für diese unerwünschte Magnetisierung.

Ergänzt man das zweidimensionale Spin-Echo-Experiment um einen weiteren Phasenkodiergradienten (vgl. Abbildung 3-1) in Richtung des Schichtgradienten, so kann man die angeregte Schicht nochmals räumlich unterteilen. Aus der zweidimensionalen Ortskodierung in einer Schicht definierter Dicke wird dann eine dreidimensionale Ortskodierung in dieser Schicht.



Da jeder Phasenkodierschritt einzeln ausgeführt werden muss und eine Dauer von T_R besitzt, ergibt sich für das dreidimensionale Spin-Echo-Experiment eine um den Faktor N_{P2} (Anzahl der Phasenkodierschritte in Schichtrichtung) längere Akquisitionszeit als beim zweidimensionalen Experiment.

Die genauen Parameter der Experimente, wie Echozeit, Repetitionszeit und spektrale Bandbreite der Akquisition, werden in den nachfolgenden Kapiteln im Detail für jede Anwendung separat beschrieben.

3.2.2 Magnetisierungspräparation

"Magnetization prepared NMR microscopy" Experimente [Haa-93] erlauben es, exakte, räumlich hochaufgelöste NMR-Parameterkarten zu akquirieren. Sie bestehen aus einem Präparationsvorexperiment und einem Bildgebungsteil. Im Präparationsteil wird die longitudinale Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 in einen definierten Zustand gebracht, d.h. entsprechend der ausgewählten Sequenz mit dem zu messenden NMR-Parameter gewichtet, und anschließend im Bildgebungsteil mit der gewünschten räumlichen Auflösung ausgelesen. Die Parameter-Gewichtung und die Ortskodierung finden somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt und verfälschen sich deswegen nicht gegenseitig.

Die gemessenen Intensitäten der einzelnen Bildpunkte werden sowohl durch die Präparation, als auch durch die Bildgebungssequenz bestimmt. Variiert man in einer Messreihe systematisch die Gewichtung durch das Vorexperiment, erhält man bei gleichbleibendem Bildgebungsexperiment eine Serie von Bildern, deren Signalintensitäten sich nur aufgrund der unterschiedlichen Gewichtung mit dem zu untersuchenden NMR-Parameter ändern. Eine Verfälschung der NMR-Parameterkarte durch das Bildgebungsexperiment ist deswegen ausgeschlossen.

Unabhängig vom gewählten Präparationsexperiment kann jede beliebige Bildgebungssequenz eingesetzt werden. Somit ist es möglich, die Bildgebungssequenz unabhängig vom zu untersuchenden NMR-Parameter bezüglich Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis in den NMR-Bildern zu optimieren.

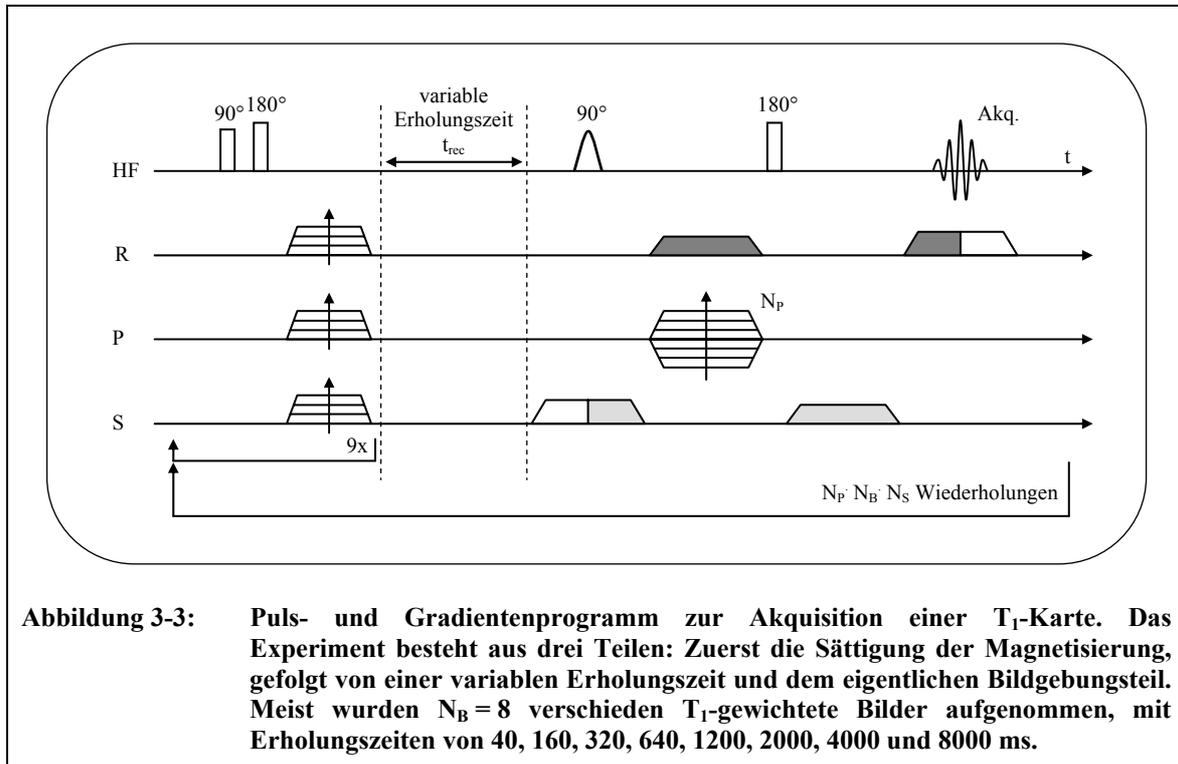
Fittet man die Bilder aus einer Bilderserie mit verschiedenen Gewichtungen auf Pixelbasis an eine Modell-Funktion an, so erhält man eine räumlich aufgelöste Parameterkarte, die dieselbe Auflösung besitzt wie das Bildgebungsexperiment. In dieser Karte entspricht die Intensität der einzelnen Bildpunkte dem lokalen Wert des untersuchten NMR-Parameters.

3.2.2.1 Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

Zur Aufnahme von Parameterkarten der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 wurde als Präparationsteil des NMR-Experiments eine *Saturation-Recovery*-Sequenz [Mar-71] mit variabler Erholungszeit implementiert. Als Bildgebungsteil wurde das oben beschriebene zweidimensionale Spin-Echo-Experiment verwendet (vgl. Kap. 3.2.1).

Im Präparationsteil wurde die longitudinale Gleichgewichtsmagnetisierung zunächst durch neun jeweils aus einem 90° -Puls, einem 180° -Puls und einem Spoiler-Gradienten bestehende Sequenzen vollständig unterdrückt (Saturation). Beide in der Saturation-Sequenz verwendeten Pulse waren nicht frequenzselektiv. Wie im Pulsprogramm in Abbildung 3-3 dargestellt, konnte die longitudinale Magnetisierung anschließend während einer Erholungszeit t_{rec} bis zu

einem bestimmten Wert zurückrelaxieren (Recovery). Von der so präparierten Probe wurde dann im Bildgebungsteil ein räumlich hochaufgelöstes Schichtbild akquiriert. Mit acht verschiedenen langen Erholungszeiten t_{rec} im Präparationsexperiment erhielt man acht verschieden T_1 -gewichtete Bilder. Die Erholungszeiten t_{rec} betragen dabei in der Regel 40, 160, 320, 640, 1200, 2000, 4000 und 8000 ms.



Im Gegensatz zur *Inversion-Recovery*-Methode [Abr-61] bietet die gewählte Magnetisierungspräparation mit dem *Saturation-Recovery*-Experiment mehrere entscheidende Vorteile, vor allem in der NMR-Mikroskopie:

Die Relaxationszeitkonstante T_1 kann mit einem Zwei-Parameter-Fit aus den Messdaten berechnet werden, da die ursprüngliche longitudinale Magnetisierung im *Saturation-Recovery*-Experiment unterdrückt wird. Bei effektiver Sättigung liegt der Wert der longitudinalen Magnetisierung direkt nach der Sättigung $M_z(t = 0 \text{ s})$ immer hinreichend nahe bei Null, so dass aus dem in Gleichung (2-7) beschriebenen Verlauf der Spin-Gitter-Relaxation eine monoexponentielle Kurve wird, die nur noch von den beiden Parametern T_1 und M_0 abhängt:

$$M_z(t) = M_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1}) \quad (3-1)$$

Weil Mikroskopiespulen oft z.B. wegen ihrer geringeren Anzahl an Wicklungen eine inhomogenere B_1 -Feldverteilung besitzen als größere Spulen, ist es teilweise schwer, einen gleichmäßigen Anregungswinkel der HF-Pulse in allen interessierenden Bereichen der Spule

zu realisieren. Trotzdem ist mit der oben beschriebenen Pulssequenz eine effektive Sättigung über einen breiten Frequenzbereich unabhängig von der Repetitionszeit T_R erzielbar. Somit reicht es in der Praxis aus, die obige monoexponentielle Kurve an die Messdaten anzufitten, um nach der Aufnahme von nur acht verschiedenen T_1 -gewichteten NMR-Bildern eine T_1 -Relaxationszeitkarte mit hinreichend guter Genauigkeit zu erhalten. Da die Inversion der Magnetisierung jedoch nicht immer in allen Bereichen der Mikroskopiespule gleichmäßig ausfällt, müsste für den bei der *Inversion-Recovery*-Methode notwendigen Drei-Parameter-Fit eine größere Anzahl von Bildern aufgenommen werden, was zu einer deutlich längeren Messzeit führen würde. Gerade in der NMR-Mikroskopie ist dies, aufgrund der wegen der hohen räumlichen Auflösung ohnehin langen Messzeiten, problematisch.

Als weiterer Vorteil kann beim *Saturation-Recovery*-Experiment auf eine lange Erholungszeit zum Wiederaufbau der longitudinalen Magnetisierung nach der Akquisition verzichtet werden, da diese ohnehin zu Beginn des Experiments unterdrückt wird. Für das *Inversion-Recovery*-Experiment sollte die Repetitionszeit T_R mindestens dreimal so lange wie die T_1 -Zeit der Probe sein, damit das System zwischen den einzelnen Phasenkodierschritten des Bildgebungsexperiments ausreichend ausrelaxieren kann. Hierdurch ergibt sich im Vergleich zur *Saturation-Recovery*-Methode eine weitere deutliche Verlängerung der Messzeit.

Lediglich um die neu aufgenommenen Daten auf der Festplatte des Spektrometers zu speichern, wurde nach der Akquisition jeder k-Raumzeile 50 ms gewartet, bevor erneut mit der Präparation der Magnetisierung begonnen wurde. Daraus ergibt sich für die Akquisition einer T_1 -Karte mit 128 x 128 Bildpunkten, zwei Mittelungen und den oben angegebenen variablen Erholungszeiten t_{rec} eine gesamte Experimentdauer von einer Stunde und zehn Minuten.

Nach der Akquisition der T_1 -gewichteten Bilder wurden diese fouriertransformiert, median gefiltert (Kantenglättungsfilter zur Unterdrückung des Rauschens) und phasenkorrigiert. Der Realteil der phasenkorrigierten Bilder wurde anschließend Pixel für Pixel mit einer Least-Square-Fitroutine an eine monoexponentielle T_1 -Relaxations-Modellkurve angefitet. Da aufgrund des akquirierten Rauschens nur bei den phasenkorrigierten Bildern der Mittelwert der Signalintensität für $t \rightarrow 0$ gegen Null strebt, wurden diese an Stelle von Absolutwert-Bildern verwendet, um den oben beschriebenen Zwei-Parameter-Fit einsetzen zu können.

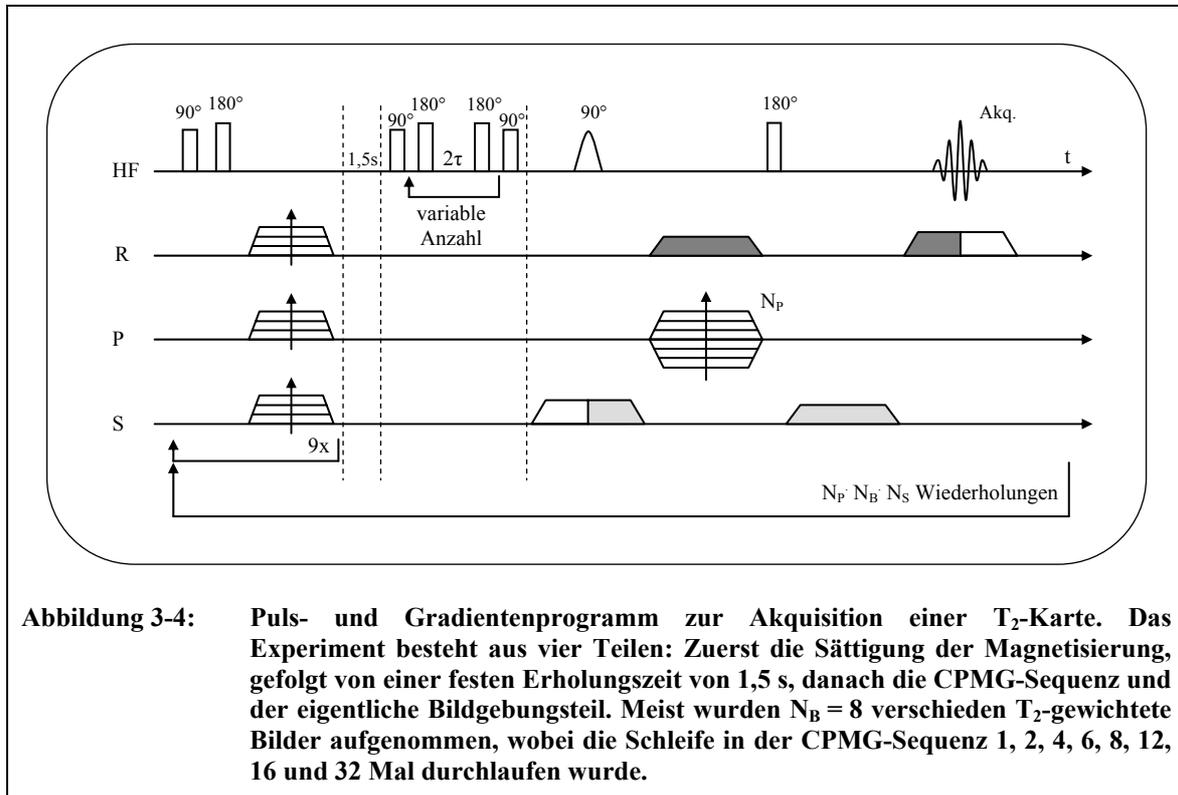
3.2.2.2 Messung der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2

Zur Akquisition einer Parameterkarte der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 wurde ebenfalls ein Magnetisierungspräparations-Experiment verwendet. Als Präparationsteil wurde eine Kombination aus der oben beschriebenen *Saturation-Recovery*-Sequenz mit einer festen Erholungszeit von 1,5 s und der Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)-Sequenz gewählt.

Die CPMG-Sequenz wurde von H.Y. Carr und E.M. Purcell [Car-54] entwickelt und von S. Meiboom und D. Gill [Mei-58] optimiert. Sie dient dazu, den bei der Messung der transversalen Relaxationszeit T_2 auftretenden Diffusionseffekt zu minimieren. Die Sequenz setzt sich aus einem 90° -Anregungspuls und einer Serie von 180° -Refokussierungspulsen

zusammen (jeweils nicht-frequenzselektive Pulse). Dabei wird der zeitliche Abstand der Pulse so gewählt, dass sich immer in der Mitte zwischen zwei aufeinander folgenden 180° -Pulsen ein Spin-Echo (SE) mit der Echozeit $T_E^* = 2\tau$ ausbilden kann:

90° - τ - 180° - τ -SE- τ - 180° - τ -SE- τ - 180° ...



Um eine T_2 -Karte aufzunehmen, wurde also im Präparationsteil des Experiments zuerst durch die *Saturation-Recovery*-Sequenz mit der festen Erholungszeit von 1,5 s eine genau definierte longitudinale Magnetisierung $M_z(t' = 1,5 \text{ s})$ erzeugt. Anschließend wurde diese in der CPMG-Sequenz mit der Relaxationszeitkonstanten T_2 gewichtet. Der dann folgende Bildgebungsteil bestand wie im Fall der T_1 -Karten aus dem oben beschriebenen zweidimensionalen Spin-Echo-Experiment (vgl. Kapitel 3.2.1).

Weil die angeregte transversale Magnetisierung für $t \rightarrow \infty$ gegen Null strebt und $M_z(t' = 1,5 \text{ s})$ bei jeder Präparation den gleichen Wert annahm, konnte der Zeitverlauf der Spin-Spin-Relaxation ebenfalls mit einem monoexponentiellen Zwei-Parameter-Fit aus den T_2 -gewichteten Bilder berechnet werden (vgl. Gleichung (2-8)):

$$M_{x,y}(t) = M_z(t' = 1,5 \text{ s}) \cdot e^{-t/T_2} \quad (3-2)$$

Die unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Bilder mit der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 wurde durch verschieden lange CPMG-Pulsfolgen erreicht. Typischerweise wurde eine Serie

aus acht unterschiedlich T_2 -gewichteten Bildern mit 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32 und 64 180° -Pulsen in der CPMG-Sequenz aufgenommen, was einer effektiven Echozeit $T_{E,\text{eff}}$ von 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160 und 320 ms in der Präparationssequenz entsprach.

Die große Anzahl der 180° -Pulse war bewusst gewählt worden, um die Echozeiten $T_E^* = 2\tau$ in der CPMG-Sequenz relativ kurz halten zu können. Mit der meistens verwendeten Dauer von $\tau = 2,5$ ms war die durch Diffusion im inhomogenen Magnetfeld bedingte Abnahme der Signalintensität vernachlässigbar (siehe [Bra-96]).

Bei zwei Mittelungen, einer Wartezeit von 50 ms zum Speichern der neuen Messdaten zwischen den einzelnen Phasenkodierschritten und den oben angegebenen acht effektiven Echozeiten $T_{E,\text{eff}}$ dauerte die Akquisition einer T_2 -Karte mit 128×128 Bildpunkten 58 Minuten.

Wie bei den T_1 -Karten wurden auch hier nach der Akquisition die T_2 -gewichteten Bilder fouriertransformiert, median gefiltert und phasenkorrigiert. Der Realteil der phasenkorrigierten Bilder wurde anschließend Pixel für Pixel mit einer Least-Square-Fitroutine an eine monoexponentielle Modellkurve der T_2 -Relaxation angefitet. Da bei den T_2 -gewichteten Bildern der Mittelwert der Signalintensität in den phasenkorrigierten Bildern für $t \rightarrow \infty$ gegen Null strebt, konnte auch hier ein Zwei-Parameter-Fit verwendet werden. In Absolutwert-Bildern wäre dieser Mittelwert aufgrund des aufgenommenen Rauschens ungleich Null.

4 NMR-Mikroskopie an Tumorsphäroiden

In diesem Kapitel wird eine Perfusionsapparatur beschrieben, mit der der komplette Invasionsvorgang eines Tumorsphäroiden in ein Rattenhirnaggregat nicht-invasiv mittels NMR-Mikroskopie beobachtet und charakterisiert werden kann. Dabei kann sowohl die Frühphase der Tumordinvasion untersucht, als auch eine Langzeituntersuchung durchgeführt werden. Die Apparatur ist zudem für Serienmessungen geeignet.

Es wurden sehr kleine und zu Beginn der Messung noch nicht nekrotische Tumorsphäroide untersucht. Die Entstehung des nekrotischen Gewebes während des Invasionsprozesses wurde durch Akquisition von T_2 -Parameterkarten beobachtet. Die T_2 -Werte des vitalen Gewebes waren um mehr als 20 % kleiner als die T_2 -Werte der nekrotischen Regionen und zeigten auch eine geringere Schwankungsbreite.

Vor den NMR-Untersuchungen bestrahlte Tumorsphäroide zeigten bei den Messungen ein sehr stark verlangsamtes bzw. gar kein Invasionsverhalten mehr und besaßen auch höhere T_2 -Werte.

4.1 Einleitung

Tumorsphäroide und ihre Konfrontationskulturen sind ein etabliertes *in-vitro* Modell in der Tumorforschung [Sut-70, Mue-87], was hauptsächlich auf der Morphologie der Tumorsphäroide beruht, die der humaner Tumoren sehr ähnlich ist [Dab-59, McA-67]. Das Invasionsverhalten eines Tumors in das ihn umgebende gesunde Gewebe ist in der medizinischen Tumorforschung ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung der Malignität eines Tumors.

In-vitro kann der Invasionsvorgang anhand von Konfrontationskulturen untersucht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Konfrontationskulturen bestanden zum einen aus einem Tumorsphäroiden und zum anderen aus einem Aggregat von Rattenhirnzellen (RBA, aus engl. Rat Brain Aggregate). Für die Kokultivierung wurden der Tumorsphäroid und das Rattenhirnaggregat in so engen Kontakt miteinander gebracht, dass der Tumor in das Rattenhirnaggregat einwachsen konnte.

Erste NMR-mikroskopische Untersuchungen an Tumorsphäroiden sind von L.O. Sillerud und M. Neeman durchgeführt worden [Sil-90, Nee-91]. Sie konnten zeigen, dass sich die Histologie der Tumorsphäroide in der NMR-Relaxationszeitkonstanten T_2 und der Diffusionskonstanten D widerspiegelt. Allerdings wurden diese Studien mit Tumorsphäroiden durchgeführt, deren Durchmesser deutlich größer als ein Millimeter waren. Aufgrund ihrer Größe besaßen diese Tumorsphäroide jedoch schon einen so ausgedehnten nekrotischen Kern, dass ihre Vitalität deutlich vermindert war. Deswegen sind sie für die medizinische Forschung eigentlich ungeeignet.

M. Brandl und M. Szimtenings untersuchten im Rahmen ihrer Promotion bzw. Diplomarbeit bereits kleinere und vitalere Tumorsphäroide und deren Konfrontationskulturen NMR-mikroskopisch [Bra-96, Szi-96]. Die dabei verwendeten Tumorsphäroide besaßen Durchmesser von 0,4 - 1,0 mm. Bei den Messungen zeigte sich, dass vor allem die Relaxationszeitkonstante T_2 dazu geeignet ist, vitales von nekrotischem Gewebe zu unterscheiden.

4.2 Aufgabenstellung

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, sollte in der vorliegenden Arbeit der komplette Invasionsvorgang noch kleinerer und deswegen noch aggressiverer und äußerst vitaler Tumorsphäroide in Rattenhirnaggregate nicht-invasiv mittels NMR-Mikroskopie beobachtet werden. Dazu mussten ein neuer Probenkopf mit Probenhalterung und kombinierter Perfusionsapparatur, eine NMR-Spule und ein Ankoppelnetzwerk gebaut werden. Neben Langzeitmessungen zur Untersuchung der kompletten Tumordinvasion, war vor allem auch die Frühphase des Invasionsvorganges von Interesse, um die Entstehung nekrotischer Bereiche in den Tumoren zu beobachten. Zur Therapiesimulation sollten zusätzlich zu den vitalen auch bestrahlte Tumorsphäroide in Konfrontationskulturen untersucht werden.

Für die Versuche wurden hochvitale Sphäroide aus einer C6-Rattengliosarkom Zell-Linie eingesetzt, bei denen der Invasionsvorgang schon nach weniger als 48 Stunden Kokultivierung abgeschlossen war. Dieser schnell ablaufende Invasionsprozess war aus verschiedenen Gründen erwünscht:

Zum einen sollte der komplette Invasionsvorgang wegen der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Messzeit innerhalb einer Wochenend-Messung beobachtbar sein und zum anderen hatten sich bei der von Szimtenings verwendeten waagrechten Probenanordnung während der Messungen wiederholt kleinste Luftbläschen an den zu untersuchenden Tumorsphäroiden und Konfrontationskulturen anlagert. Die durch die Luftblasen bedingten Suszeptibilitätsunterschiede erzeugten zum Teil so starke Artefakte in den NMR-Bildern, dass der langsamere Invasionsprozess der von ihm verwendeten Tumorsphäroide in die RBAs nur bedingt über einen längeren Zeitraum beobachtbar war.

Zudem mussten die Konfrontationskulturen bei der waagrechten Probenanordnung mit Nylonfiltern eingeklemmt werden, um eine Verschiebung der Konfrontationskulturen durch vorbeifließendes Zellkultur-Medium zu vermeiden. Trotzdem konnte die Verschiebung nicht ganz vermieden werden. Viele Konfrontationskulturen drehten sich vielmehr langsam aus der Beobachtungsschicht heraus, was ebenfalls die effektiv zur Verfügung stehende Messzeit begrenzte, so dass oft nur die Messdaten aus dem ersten Teil der Tumordinvasion verwendbar waren. Daneben waren die Tumorsphäroide durch das Nylongewebe in ihrem Wachstum räumlich eingeschränkt, und der Invasionsprozess war zumindest teilweise dadurch beeinträchtigt, dass die Tumorsphäroide auch am Nylongewebe festwachsen [Szi-96].

Insgesamt musste die neu zu bauende Perfusionsapparatur folgenden Anforderungen genügen:

- Zur Untersuchung der Frühphase der Tumorinvasion musste es möglich sein, unmittelbar nach Beginn der Kokultivierung mit den NMR-Messungen zu beginnen. Um aber daneben auch Langzeituntersuchungen der kompletten Tumorinvasion durchführen zu können, sollte die gesamte Apparatur auch für den Dauerbetrieb von mindestens 48 Stunden geeignet sein.
- Die Wachstumsbedingungen während des gesamten Invasionsvorganges sollten denen in der Zellkultur möglichst ähnlich sein, und die Konfrontationskulturen sollten während der gesamten Dauer der Messungen kontinuierlich mit frischer Nährlösung versorgt werden.
- Etwaige kleine Bewegungen der Konfrontationskulturen sollten soweit möglich vermieden werden oder, falls sie nicht ganz vermieden werden konnten, durch Nachführen der Beobachtungsschicht noch im Verlauf der Messungen ausgeglichen werden.
- Die Anlagerung von Luftblasen an den Konfrontationskulturen sollte vermieden werden.
- Angepasst an das Probenröhrchen musste für die NMR-Untersuchungen eine möglichst kleine Spule mit abgestimmtem Ankoppelnetzwerk gebaut werden.
- Der ganze Aufbau musste stabil auf 37 °C temperierbar sein.

Um den gesamten Invasionsvorgang der sehr kleinen Tumorsphäroide quantitativ NMR-mikroskopisch beobachten zu können, war es zudem nötig, ein NMR-Experiment zu verwenden, das NMR-Parameterbilder mit hoher räumlicher Auflösung in der Bildebene und dünner Schichtdicke liefern konnte. Die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Magnetisierungspräparations-Experimente mit einem intensitätsstarken Spin-Echo-Bildgebungsteil erfüllten diese Anforderung.

4.3 Material und Methoden

4.3.1 Tumorsphäroide und Konfrontationskulturen

Multizelluläre Tumorsphäroide besitzen eine histologische Struktur, die mit der von soliden Tumoren weitgehend übereinstimmt. Sie werden deswegen in der medizinischen Tumorforschung als *in-vitro* Modell für Tumor-Mikroregionen eingesetzt. Ab einem Durchmesser von ca. 500 µm besitzen die Tumorsphäroide in ihrem Innern einen Bereich, in dem die Zellen, aufgrund von Unterversorgung mit Nährstoffen, einen nekrotischen Charakter aufweisen. Diese nekrotische Region ist von einem 50 -100 µm dicken Bereich vitaler Zellen

umgeben. In diesem vitalen Bereich befinden sich gut versorgte proliferierende¹ Zellen, analog der Struktur solider Tumoren [Ton-98]. Neben der Proliferation ist die Tumorzellinvasion ein typisches Merkmal maligner Tumoren [Eng-92]. Zur Untersuchung der zielgerichteten Bewegung der Tumorzellen in das umgebende gesunde Gewebe, der Zerstörung der Wirtszellen und deren Ersetzung durch die Tumorzellen, hat sich die Konfrontationskultur als *in-vitro* Modell etabliert.

Die hier verwendeten Konfrontationskulturen bestanden zum einen aus einem sehr kleinen und deswegen sehr vitalen und aggressiven Tumorsphäroiden und zum anderen aus einer ebenfalls annähernd kugelförmigen Ansammlung von fetalen Rattenhirnzellen, sogenannten Rattenhirnaggregaten. Jeweils unmittelbar nachdem die beiden Zell-Sphäroide in engen Kontakt miteinander gebracht worden waren, begann der Invasionsprozess. Schon wenige Stunden später waren sie fest miteinander verbunden. Insgesamt wurden über 50 Konfrontationskulturen untersucht.

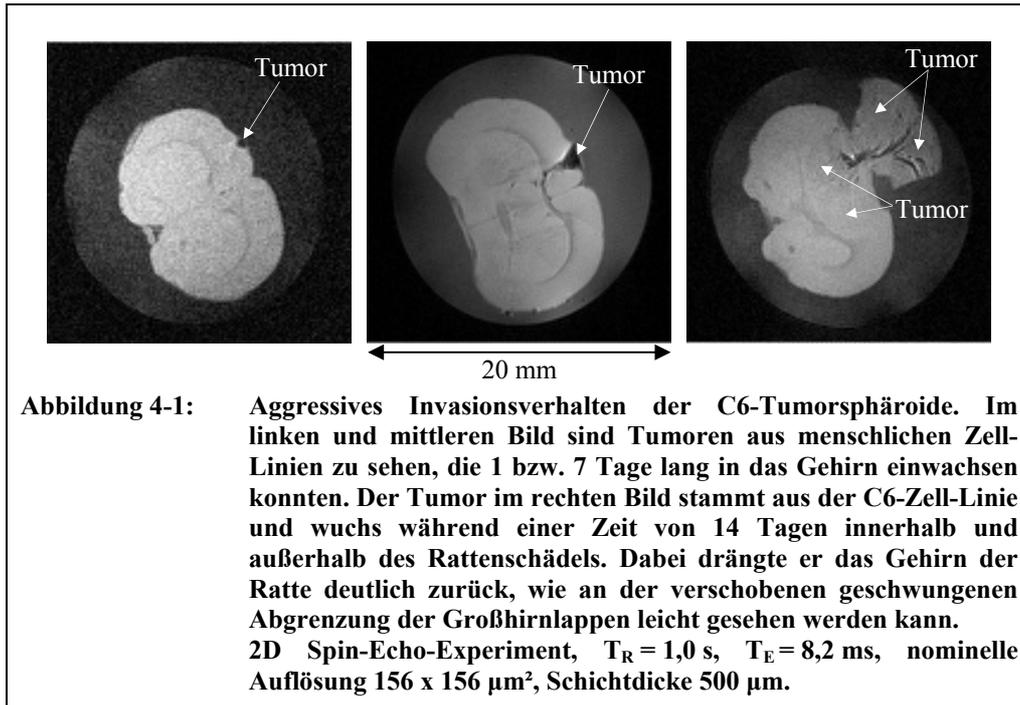
Tumorsphäroide

Die malignen Tumorzellen der verwendeten Tumorsphäroide stammten aus einer C6-Ratten-Gliosarkom Zell-Linie. Die Tumorsphäroide wurden im Tumorbiologie-Labor der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg für den kurzen Zeitraum von nur 3 - 5 Tagen kultiviert und schon bei Durchmessern von 200 - 400 µm für die NMR-Experimente verwendet. Deswegen besaßen sie zu Beginn der Untersuchungen jeweils nur kleine oder noch gar keine nekrotischen Bereiche in ihren Zentren.

Die C6-Tumorsphäroide wurden mit Hilfe der 'Standard Agar Overlay Technique' [Yuh-77] aus einzelnen Tumorzellen gezüchtet. Die Details dazu sind in Anhang 8.1 beschrieben. Hier soll nur das äußerst aggressive Invasionsverhalten der C6-Tumorsphäroide am Beispiel von in Rattenhirnen implantierten Sphäroiden dargestellt werden.

Abbildung 4-1 zeigt zweidimensionale NMR-Schnittbilder von Rattenhirnen, in deren Oberfläche jeweils ein Tumorsphäroid implantiert worden war. Bei dem Tumor im linken Bild (kleiner schwarzer Punkt) handelt es sich um einen Tumorsphäroiden aus menschlichen Tumorzellen, der durch ein Bohrloch in der Schädeldecke der Ratte in eine kleine Verletzung an der Oberfläche des Rattenhirns gesetzt worden war. Die Verletzung war herbeigeführt worden, um sicherzustellen, dass der Tumorsphäroid in das Gehirn der Ratte einwuchs und nicht abgestoßen wurde. Einen Tag nach Implantation des Tumors wurde die Ratte getötet und fixiert. Anschließend wurde das Gehirn der Ratte aus dem Schädel präpariert und mit einer zweidimensionalen Spin-Echo-Sequenz untersucht. Der Tumor im mittleren Bild (durch Pfeil markierter schwarzer Trichter) stammt ebenfalls aus einer menschlichen Zell-Linie. Innerhalb von 7 Tagen nach der Implantation wuchs er trichterförmig an und orientierte sich mit seiner unteren Spitze langsam in Richtung des Balkens (Corpus callosum) und somit der anderen Hirnhemisphäre.

¹ Proliferation: Neubildung von Gewebe, bei Tumoren überschießende, sich verselbständigende Neubildung von Zellen bzw. Gewebe, hier durch Zellwachstum und Zellteilung



Beim Tumor im rechten Bild handelt es sich um einen Tumorsphäroiden aus C6-Zellen. Innerhalb der ersten 14 Tage nach der Implantation wuchs er nicht nur aus dem Bohrloch im Schädel der Ratte heraus und bildete eine Wucherung von knapp der Hälfte des Volumens des Rattenhirns, sondern breitete sich auch deutlich im Schädel der Ratte aus und verdrängte das Gehirn (die beiden Pfeile zeigen auf die Tumorbereiche innerhalb und außerhalb des Schädels). Die bei den weiteren Messungen verwendeten C6-Tumorsphäroide zeigten also ein schnelles und aggressives Invasionsverhalten.

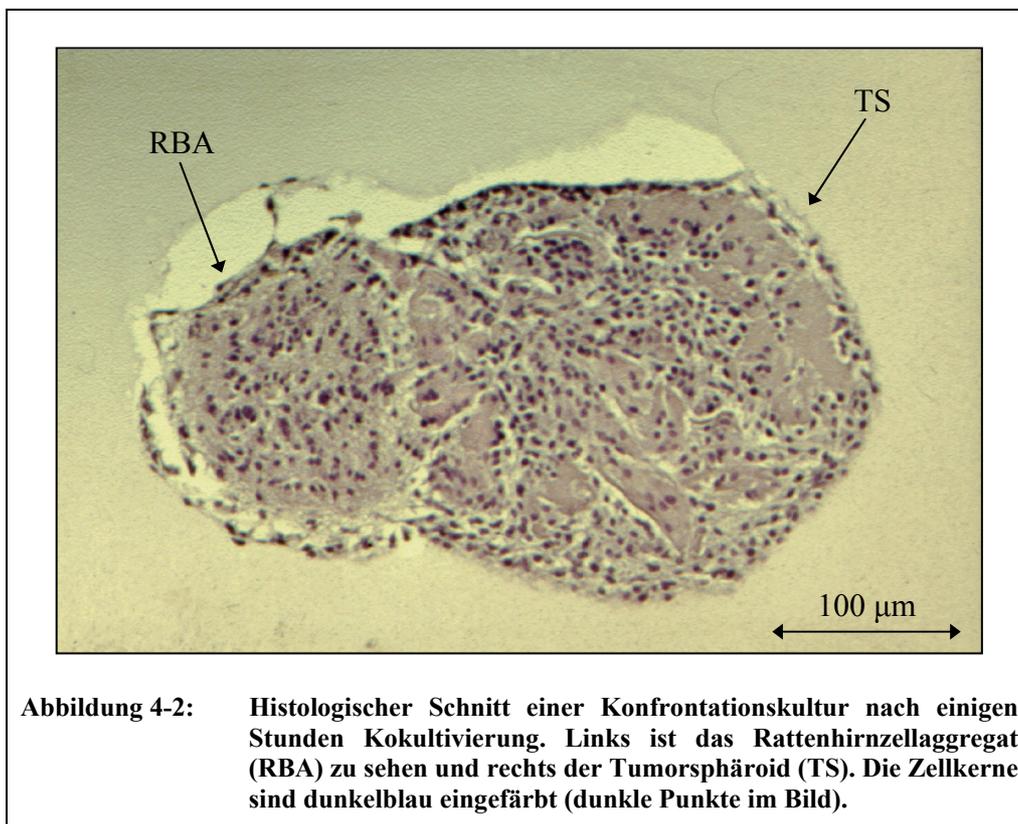
Rattenhirnaggregate (RBA)

Die RBAs, die in den Konfrontationskulturen als Zielgewebe verwendet wurden, waren aus dem Gehirn von 18 Tage alten Rattenfetten gewonnen worden. Die Gehirne wurden dafür zuerst mit einem Skalpell zerkleinert, um anschließend aus den Fragmenten mit der in Anhang 8.1 beschriebenen 'Standard Agar Overlay Technique' Sphäroide zu züchten. Nach insgesamt 18-21 Tagen konnten RBAs mit Durchmessern im Bereich von $180 - 200 \mu\text{m}$ für die Versuche geerntet werden (vgl. Abbildung 4-2). Sie wiesen dabei eine vielschichtige, gehirntypische und voll entwickelte Struktur mit Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten auf [Eng-92b].

Konfrontationskulturen

Für die Kokultivierung wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Zum einen wurden der Tumorsphäroid und das RBA einzeln in das NMR-Röhrchen pipettiert, durch leichtes Schütteln in engen Kontakt miteinander gebracht und danach sofort in das NMR-Spektrometer eingebaut, um umgehend mit den Messungen beginnen und so die frühen Stadien des Invasionsvorganges beobachten zu können. Leider waren kleinere Erschüt-

terungen der frisch zusammengeführten Konfrontationskultur beim Einbau des Probenkopfes in das Spektrometer nicht immer zu vermeiden, so dass sich in einigen Fällen Tumorsphäroid und RBA im NMR-Röhrchen wieder so weit voneinander entfernten, dass der Tumorsphäroid nicht in das RBA einwachsen konnte. Ob eine Konfrontationskultur wirklich zusammenwuchs, konnte erst nach ca. 12 Stunden Kokultivierung mit Sicherheit bestimmt werden.



Bei der zweiten Art der Kokultivierung wurde die Konfrontationskultur zuerst in einer Zellkulturschale angesetzt und dort für einige Stunden belassen, um ein stabiles Zusammenwachsen von Tumorsphäroid und RBA zu gewährleisten. Anschließend wurde die ganze Konfrontationskultur in ein NMR-Röhrchen pipettiert und dann in die Perfusionsapparatur eingebaut. Somit war sichergestellt, dass die Invasion des Tumors stattfand, und die fortgeschrittenen Stadien des Invasionsprozesses konnten in einer kürzeren Messzeit beobachtet werden.

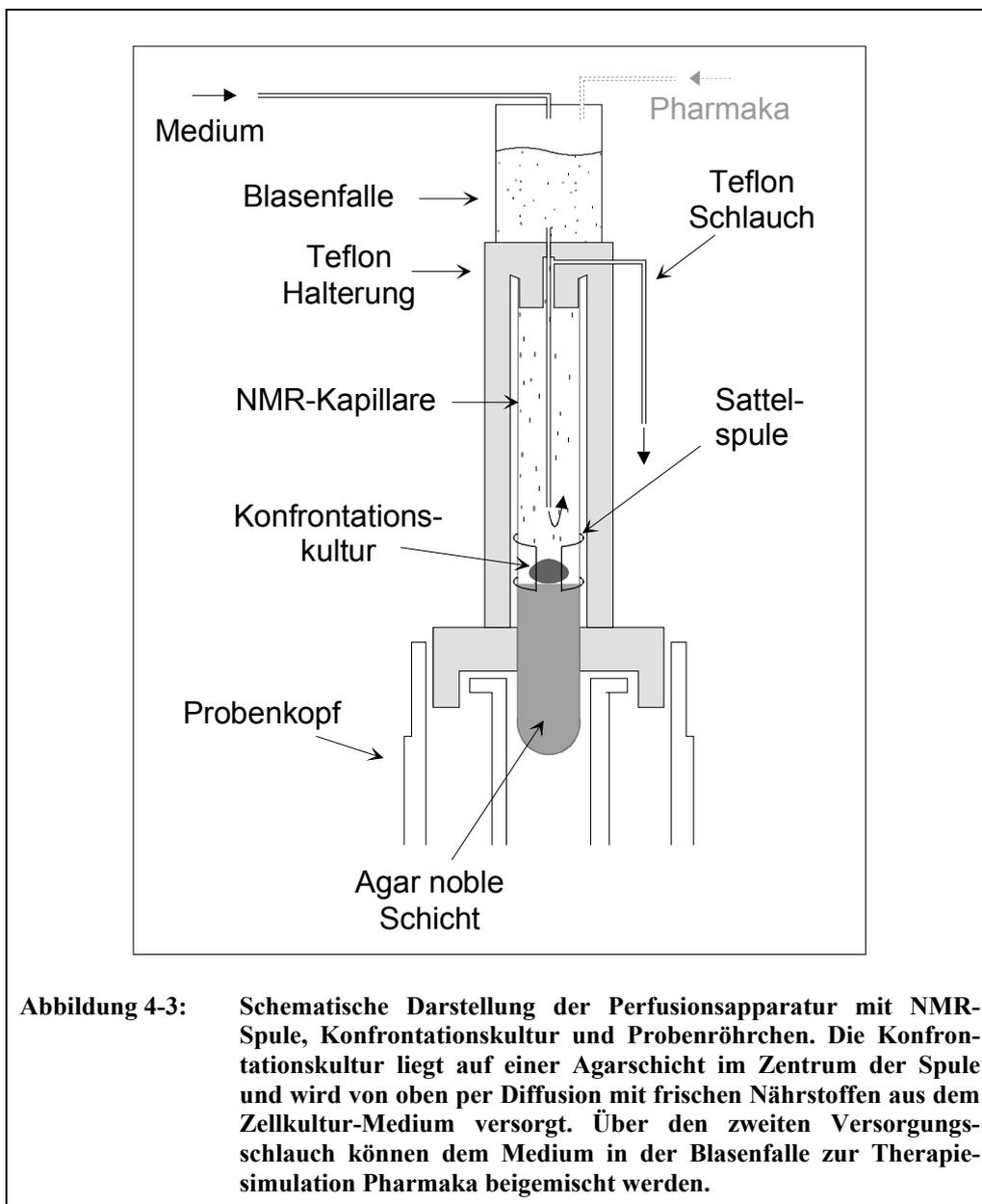
Zur Simulation von Therapieansätzen, und um deren Auswirkung auf den Invasionsvorgang zu beobachten, wurden bei einigen Konfrontationskulturen zuvor bestrahlte Tumorsphäroide verwendet. Dazu wurde mehrere Stunden vor der Kokultivierung eine Zellkulturschale mit Tumorsphäroiden für 2 Minuten mit einer Gesamtdosis von 5 bzw. 9 Gy bestrahlt.

4.3.2 Experimenteller Aufbau

Wie zuvor beschrieben, musste zuerst ein Probenkopf mit Perfusionsapparatur zur Versorgung der Tumorsphäroide, ein Ankoppelnetzwerk, sowie eine passende Spule gebaut werden.

4.3.2.1 Die Perfusionsapparatur

Abbildung 4-3 zeigt eine schematische Darstellung der Perfusionsapparatur. Das zentrale Element der Perfusionsapparatur ist eine NMR-Kapillare, in der der Tumor ungestört und unter kontrollierten Bedingungen wachsen kann.



Um Probleme mit Luftblasen von vorne herein zu vermeiden, wird die NMR-Kapillare senkrecht in die Perfusionsapparatur eingebaut. Frisches Zellkulturmedium zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen wird während der Messung von oben über eine Blasenfalle und einen in die NMR-Kapillare hineinreichenden Teflonschlauch in die Nähe der Konfrontationskultur gepumpt. Der Schlauch endet ca. 1 cm oberhalb der auf einer Agarschicht liegenden Konfrontationskultur. Diese wird dann über die kurze Entfernung hinweg per Diffusion versorgt. Eine ausreichende Versorgung der Konfrontationskultur mit Nährstoffen ist durch den konstant eingestellten Mediumfluss von 1 – 2 ml/h während des gesamten Experiments gewährleistet [Ton-98]. Das verbrauchte Medium fließt zwischen Kapillarwand und Teflonschlauch wieder nach oben und von dort aus durch einen weiteren Schlauch aus der Perfusionsapparatur heraus. Durch diesen Aufbau können störende, durch die Ansammlung kleinster Luftbläschen an der Konfrontationskultur hervorgerufene Suszeptibilitätsartefakte vermieden werden.

Zudem kommt es bei der senkrechten Anordnung des Probenröhrchens und der Nährstoffversorgung der Konfrontationskultur per Diffusion nicht mehr zu Verschiebungen bzw. Bewegungen der Konfrontationskultur durch das sie umspülende Medium. Ihre Fixierung mit Nylongewebe ist somit nicht mehr nötig, wodurch ein freies und ungestörtes Wachstum des Tumors unter Zellkulturbedingungen im NMR-Spektrometer möglich ist. Falls während einer Messung dennoch kleinste Bewegungen der Konfrontationskultur aufgrund ihrer sich kontinuierlich verändernden äußeren Form auftreten, werden diese durch Nachführen der Beobachtungsschicht noch im Verlauf der Messung ausgeglichen.

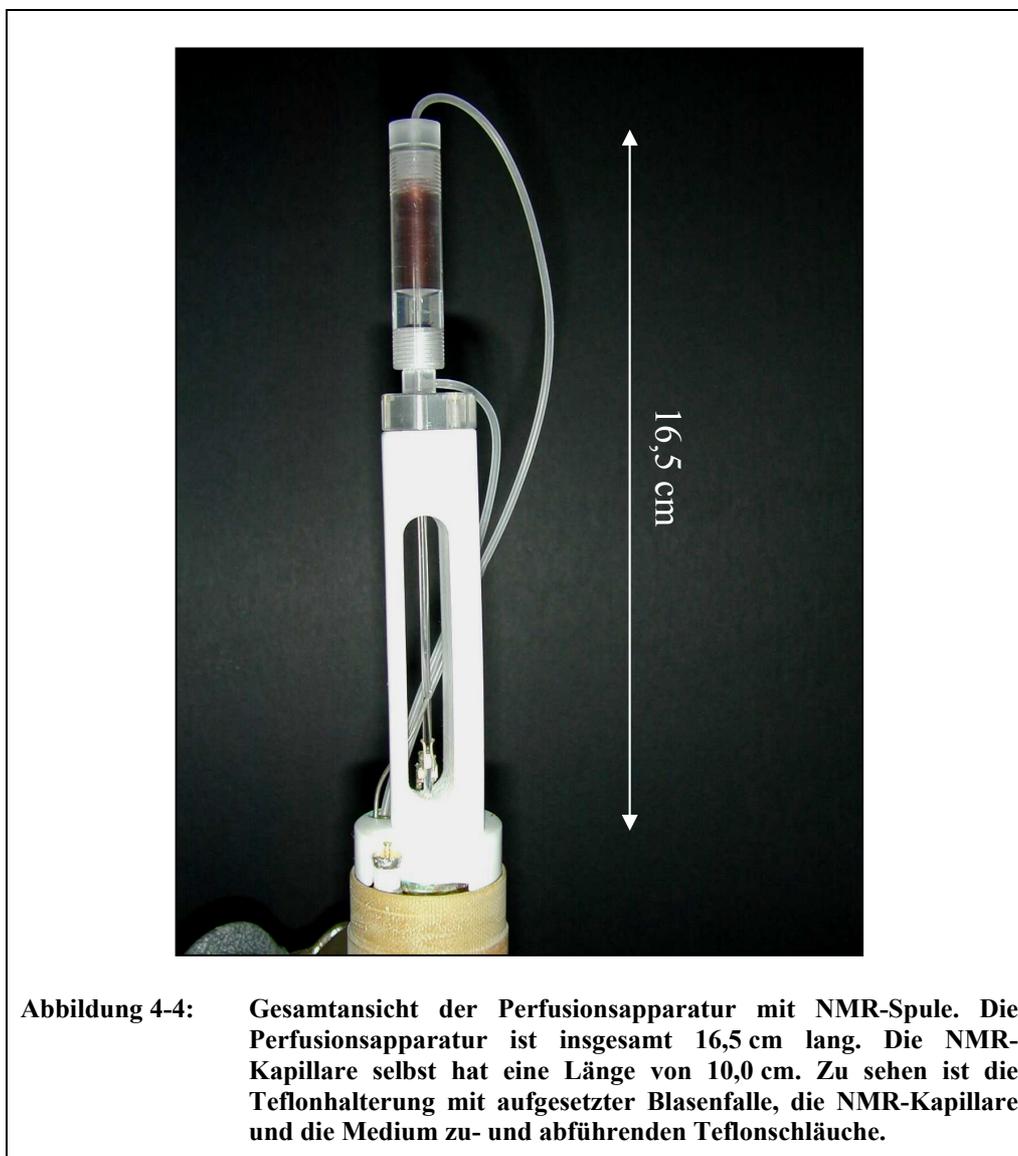
Die NMR-Kapillaren besitzen einen Innendurchmesser von 1,6 mm und einen Außendurchmesser von 2,0 mm. Damit bieten sie den Konfrontationskulturen ausreichend Platz für ungehindertes Wachstum, erlauben andererseits aber auch den Einsatz einer kleinen, an die Größe der Probe angepassten NMR-Spule mit entsprechend hoher Sensitivität, die die gewünschte hohe räumliche Auflösung ermöglicht.

Durch die Lagerung der zu untersuchenden Konfrontationskultur auf einer Agarschicht wird, wie in der Zellkultur, ein Festwachsen der Konfrontationskultur an der Glaswand verhindert, und die Zellaggregate behalten ihre annähernd kugelsymmetrische Form. Außerdem können sie auf diese Weise sehr einfach im Zentrum der Spule positioniert werden und liegen nicht in unmittelbarer Nähe zum gekrümmten Boden der NMR-Kapillare, was aufgrund von Suszeptibilitätsartefakten die Güte der NMR-Bilder beeinträchtigen könnte und wegen der dann asymmetrischen Beladung der Spule auch das Shimmen¹ erschweren würde.

Um während der Messungen möglichst ähnliche Umgebungsbedingungen wie zuvor in der Zellkultur zu schaffen, wird die Perfusionsapparatur während der gesamten Messzeit stabil auf 37°C temperiert. Dies geschieht mit Hilfe eines aufgeheizten Luftstromes, der durch die mit entsprechenden Löchern versehene Bodenplatte der Perfusionsapparatur einströmen kann und dann alle Bestandteile der Apparatur umspült. Die Temperatur in der Perfusionsapparatur wird ständig mit einem Temperaturfühler in der Nähe der NMR-Spule gemessen und, falls

¹ Homogenisierung des statischen Magnetfeldes im Bereich der Probe

nötig, über die Temperaturkontrolleinheit BVT-1000 des Spektrometers automatisch nachgeregelt.

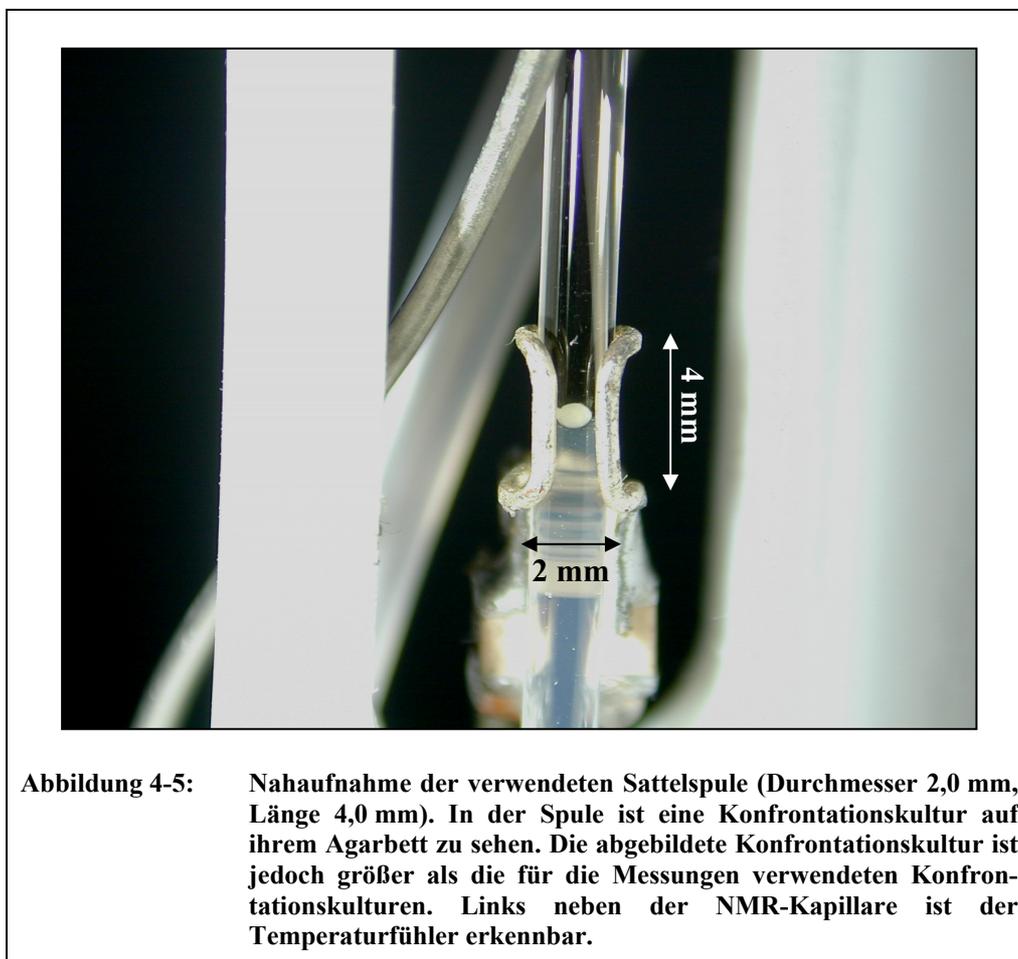


4.3.2.2 Die Sende- und Empfangsspule

Als Sende- und Empfangsspule wird eine Sattelspule eingesetzt, deren Geometrie die Verwendung eines senkrecht stehenden Probenröhrchens erlaubt. Angepasst an die NMR-Kapillare besitzt die Spule einen Innendurchmesser von 2,0 mm und eine Länge von 4,0 mm. Sie wurde aus 0,6 mm starkem versilbertem Kupferdraht gefertigt und so gebaut, dass sie auf das Ankoppelnetzwerk des Probenkopfes aufgesteckt werden kann.

Mit einer mit Medium gefüllten Kapillare beladen, besitzt die Spule bei einer Temperatur von 37 °C eine Resonanzfrequenz von 500 MHz und eine Güte von 157 (in Reflexion gemessen). Entfernt man die Beladung, so steigt die Güte auf einen Wert von 185 an. Diese geringe

Differenz der Güten in beladenem und unbeladenem Zustand ist für Mikroskopiespulen normal, zeigt aber trotzdem, dass die von der Spule erzeugte HF-Leistung auch, wie gewünscht, von der Probe aufgenommen wird. Die Halbwertsbreite des Wasserpeaks kann bei einer gut geshimmten Probe bis auf unter 25 Hz reduziert werden.



Alle Messungen wurden am AMX 500 Spektrometer durchgeführt. Es ist für den Frequenzbereich um 500 MHz mit einem 50 W Sender ausgestattet. Bei der hier verwendeten kleinen Spule war eine wesentlich geringere Sendeleistung nötig, deshalb wurde die Sendeleistung um 15 dB abgeschwächt. In diesem Fall betrug die Dauer eines nicht-frequenzselektiven 90°-Anregungspulses ca. 10,0 μ s. Die Dauer eines nicht-frequenzselektiven 180°-Refokussierungspulses betrug ca. 19,0 μ s. Da das An- und Abschwingen eines HF-Pulses in einer endlichen Zeitspanne passiert und diese Zeitspanne, wenn sie auch sehr kurz ist, bei der verwendeten kleinen Spule gegenüber der Gesamtdauer des Pulses nicht vernachlässigt werden kann, ist es nicht verwunderlich, dass der 180°-Puls kürzer ist als die doppelte Dauer des 90°-Pulses.

Zur Charakterisierung der praktischen Verwendbarkeit der Spule, wurde das erreichbare SNR in den zweidimensionalen 'Standard'-Schichtbildern bestimmt. Es betrug in etwa 9, bei

2 Mittelungen, einer nominellen Auflösung von $(15,6 \mu\text{m})^2$, einer Bildmatrix von 128×128 Punkten und einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$.

4.3.2.3 Probenkopf und Ankoppelnetzwerk

Probenkopf und Perfusionsapparatur wurden so gebaut, dass die Perfusionsapparatur und die Spule oben auf den Probenkopf und das Ankoppelnetzwerk aufgesteckt werden können. Im Gegensatz zur Perfusionsapparatur, die speziell auf die Untersuchung der Tumorinvasion abgestimmt wurde, sind Probenkopf und Ankoppelnetzwerk auch in Verbindung mit anderen Spulen und Aufsätzen verwendbar. Deshalb werden beide im Detail in Anhang 8.2 beschrieben.

4.3.3 NMR-Experimente

Da nach dem Einbau einer frischen Konfrontationskultur in das NMR-Spektrometer möglichst schnell mit der Beobachtung der Tumorinvasion begonnen werden sollte, stand nur relativ wenig Zeit zur Verfügung, um das Magnetfeld im Bereich der Probe zu shimmen und die verwendeten HF-Pulse einzustellen. Deshalb wurden die meisten Messungen mit Linienbreiten zwischen 25 und 40 Hz durchgeführt, obwohl Linienbreiten unter 25 Hz bei längerer Vorbereitungszeit erreichbar waren.

Sobald die HF-Pulse eingestellt waren, wurde mit dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen zweidimensionalen Spin-Echo-Experiment eine Schicht gesucht, die gleichermaßen durch die Mitte des Tumorsphäroiden und des RBA verlief, um das Einwachsen des Tumorsphäroiden in das RBA und die Entstehung bzw. Ausbreitung des nekrotischen Bereiches im Zentrum des Tumorsphäroiden gut beobachten zu können. Bei dem verwendeten FOV von $2,0 \times 2,0 \text{ mm}^2$ und 128×128 Bildpunkten besaßen die Bilder eine nominelle Auflösung von $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ und eine Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$. Die Echozeit T_E betrug $8,7 \text{ ms}$ und die Repetitionszeit T_R $1,0 \text{ s}$.

Wie sich im Laufe der Messungen bestätigte, ließ sich der Invasionsprozess besonders gut anhand von T_2 -Karten verfolgen. Deswegen wurden, nachdem eine passende Schicht durch die Konfrontationskultur gefunden worden war, während der restlichen Messzeit kontinuierlich immer abwechselnd jeweils fünf T_2 -Karten und ein zweidimensionales Schnittbild aufgenommen. Das Experiment zur Akquisition der T_2 -Karten ist im Detail in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben. Mit dem zweidimensionalen Schnittbild wurde noch während der Tumorinvasion die Lage der Beobachtungsschicht durch die Konfrontationskultur kontrolliert. In seltenen Fällen hatte sich die untersuchte Konfrontationskultur wegen der Veränderung ihrer äußeren Form tatsächlich auf ihrem Agarbett bewegt. Diese Bewegung wurde noch während der Messung durch ein Nachführen der Beobachtungsschicht ausgeglichen.

Die Akquisition einer T_2 -Karte dauerte bei vier Mittelungen knapp zwei Stunden, was somit auch der zeitlichen Auflösung der Beobachtung des Invasionsprozesses entsprach. Vier Mittelungen waren nötig, da die verwendeten sehr kleinen Tumorsphäroide ein Gewebe sehr

geringer Dichte besaßen und deswegen erst mit vier Mittelungen ein für das Fitten exakter T_2 -Karten ausreichend hohes SNR erzielt werden konnte. Trotzdem genügte diese zeitliche Auflösung, um den Ablauf der Tumorinvasion beobachten zu können.

Im Präparationsteil der T_2 -Karten wurde nach der Zerstörung der Longitudinal-Magnetisierung eine Erholungszeit von 1,5 s und in der CPMG-Sequenz eine Echozeit T_E^* von 5 ms verwendet. Diese Echozeit entsprach gerade der minimalen Zeit zum Schalten der Pulsphase in der sogenannten 'Hochauflösungs'-Version der Spektrometer-Software. Das im Bildgebungsteil verwendete zweidimensionale Spin-Echo-Experiment besaß wieder eine nominelle räumliche Auflösung von $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ (128 x 128 Bildpunkte) und eine Schichtdicke von 100 μm . Die Echozeit T_E im Bildgebungsteil betrug 8,7 ms. Nach der Akquisition wurden die Messdaten der T_2 -Experimente wie in Unterkapitel 3.2.2.2 beschrieben prozessiert. Anschließend wurde über homogene Bereiche in den T_2 -Karten gemittelt, um die T_2 -Werte für vitales und nekrotisches Gewebe zu bestimmen.

Bei den verwendeten vitalen und aggressiven Tumorsphäroiden dauerte der komplette Invasionsvorgang weniger als 48 Stunden. Zum Abschluss der Beobachtung der Tumordinvasion wurde nach einer Beobachtungszeit von 24, 36 bzw. 48 Stunden eine T_1 -Karte aufgenommen. Der Präparationsteil des T_1 -Experiments wurde wie in Abschnitt 3.2.2.1 dargestellt ausgeführt. Im Bildgebungsteil wurde wieder die oben beschriebene zweidimensionale Spin-Echo-Sequenz mit einer nominellen räumlichen Auflösung von $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ bei 128 x 128 Bildpunkten und einer Schichtdicke von 100 μm verwendet. Die Echozeit T_E betrug 8,7 ms. Die Messdaten der T_1 -Experimente wurden anschließend wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben prozessiert.

4.4 Ergebnisse und Diskussion

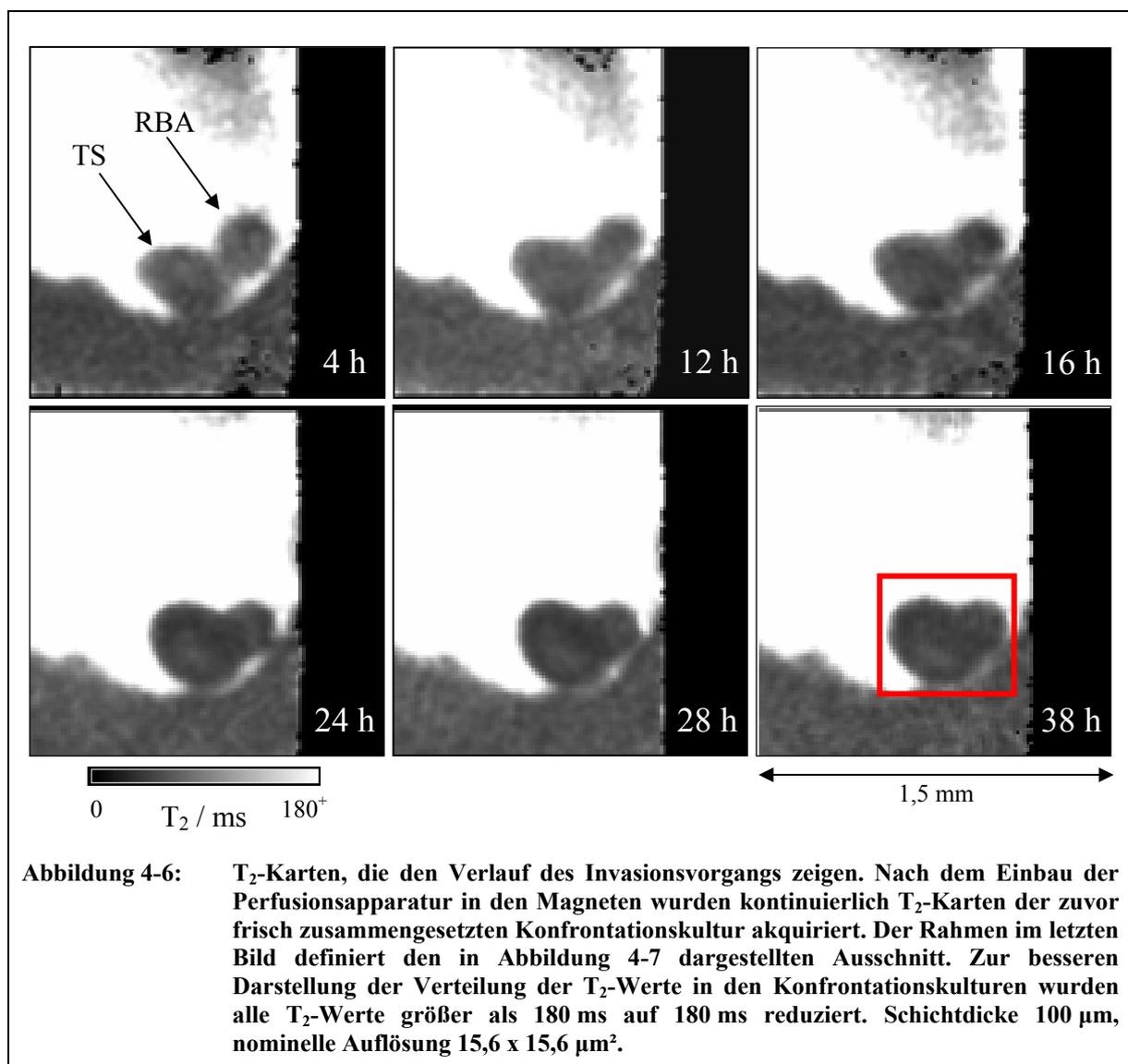
Das Einwachsen des Tumorsphäroiden in das Rattenhirnaggregat konnte in den NMR-Bildern schon anhand der Veränderung der Geometrie der Konfrontationskultur beobachtet werden.

T_2 -Parameterkarten

Mit Hilfe der aufgenommenen T_2 -Karten konnte signifikant zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe unterschieden und so eine genauere Aussage über den Fortschritt des Invasionsprozesses im Innern der Konfrontationskultur getroffen werden. Da die Akquisition einer T_2 -Karte jeweils knapp zwei Stunden dauerte, ist dies auch die zeitliche Auflösung, mit der der Invasionsvorgang beobachtet werden konnte. Diese zeitliche Auflösung war trotz der schnell vonstatten gehenden Tumorinvasion ausreichend (siehe Abbildung 4-6).

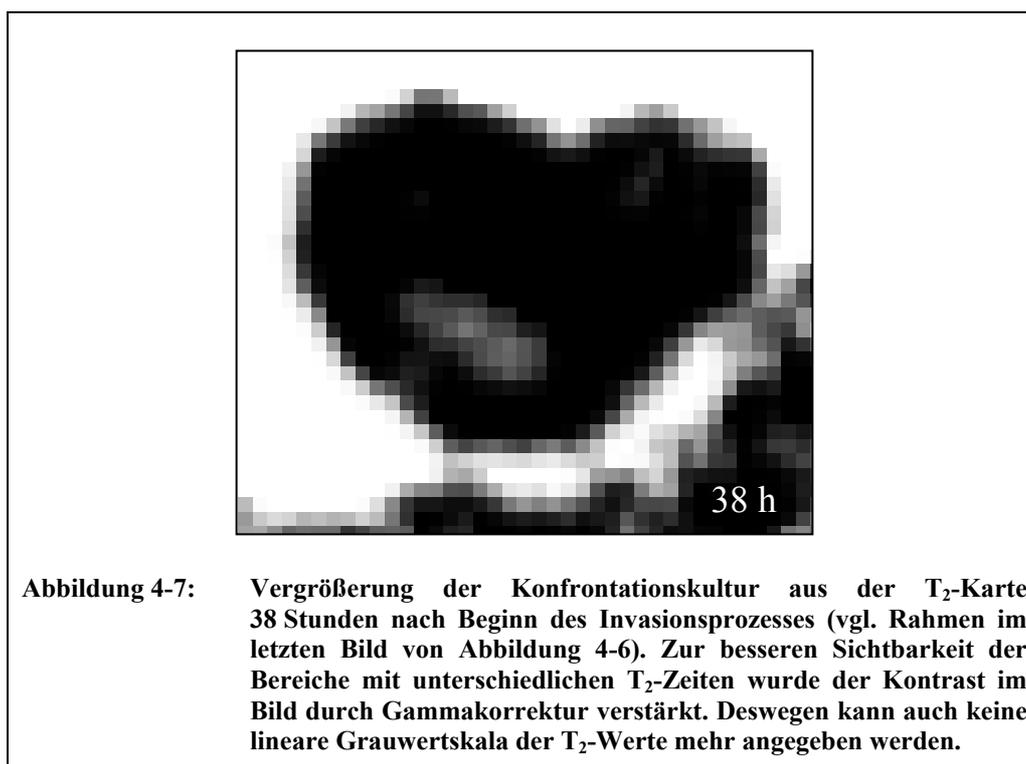
Bei den verwendeten C_6 -Tumorsphäroiden unterschieden sich die T_2 -Werte von vitalen und nekrotischen Regionen um über 20 %. In vitalen Geweberegionen lagen die T_2 -Relaxationswerte im Bereich von $47,6 \pm 4,6$ ms. Nekrotische Regionen hingegen besaßen T_2 -Werte von $61,8 \pm 5,0$ ms. Die angegebenen Werte sind die direkt berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen von mehreren hundert Bildpunkten aus verschiedenen T_2 -Karten von

über 20 Konfrontationskulturen. Um die Reproduzierbarkeit der T_2 -Werte von einer T_2 -Karte zur nächsten charakterisieren zu können, wurden in insgesamt 15 T_2 -Karten von 10 verschiedenen Konfrontationskulturen die jeweiligen Mittelwerte von vitalen und nekrotischen Gewebereichen für jede Parameterkarte einzeln berechnet. Anschließend wurden die beiden Mittelwerte dieser Mittelwerte bestimmt. Für die vitalen Bereiche ergab sich ein Wert von $47,9 \pm 1,0$ ms und für die nekrotischen Regionen ein Wert von $62,0 \pm 1,7$ ms. Die niedrigen Standardabweichungen dieser Werte belegen, dass die berechneten T_2 -Werte innerhalb des zeitlichen Verlaufs der Tumordinvasion einer Konfrontationskultur und von einer Konfrontationskultur zur nächsten gut reproduzierbar sind.



Bei der Unterscheidung zwischen vitalen und nekrotischen Gewebereichen ist zu beachten, dass die Tumoren zu Beginn der Messungen aufgrund ihrer geringen Größe meist noch gar keine nekrotischen Regionen besaßen. Diese bildeten sich erst im Verlauf des Invasions-

prozesses (vgl. Abbildung 4-6). Außerdem dürfen bei den verwendeten äußerst vitalen Tumorsphäroiden die Begriffe 'vital' und 'nekrotisch' nicht absolut betrachtet werden, sondern es handelt sich vielmehr um relative Aussagen. Als 'nekrotisch' identifizierte Bereiche besaßen einen nekrotischen Charakter, d.h. sie waren bei weitem noch nicht komplett abgestorben, waren aber unterversorgt und deswegen weniger vital als diejenigen Bereiche mit 'vitalen' Charakter. Bei besserer Versorgung mit Nährstoffen hätten die nekrotischen Bereiche aber durchaus wieder reaktiviert werden können, vor allem, da sie meistens erst während der Beobachtung der Tumordinvasion neu entstanden waren [Gol-98].



Die Zuordnung in vitale und nekrotische Bereiche aufgrund der unterschiedlichen T_2 -Werte konnte qualitativ durch histologische Untersuchungen bestätigt werden. Aufgrund der geringen Größe der Konfrontationskulturen und ihrer undefinierten äußeren Form, war es bei den histologischen Untersuchungen nicht möglich, die zuvor in den NMR-Messungen verwendete Schicht wiederzufinden, weshalb eine quantitative Aussage hier nicht möglich ist [Ker-00].

Die in den Parameterkarten abgebildeten T_2 -Werte im Nährmedium waren nicht aussagekräftig, da die dort real auftretenden T_2 -Werte von mehreren hundert Millisekunden nicht zuverlässig mit dem verwendeten NMR-Experiment gemessen werden konnten. Um auch diese Werte bestimmen zu können, hätten im Präparationsteil des Experiments längere CPMG-Sequenzen verwendet werden müssen. Darauf wurde verzichtet, weil die verwendete Sequenz eine genauere Messung der T_2 -Werte in den Tumorsphäroiden erlaubte. In den RBAs bewegten sich die T_2 -Werte im Bereich von $60,5 \pm 4,2$ ms und veränderten sich auch

mit fortschreitender Tumorinvasion nicht. Lediglich gegen Ende der Tumorinvasion konnten die RBAs nicht mehr von den Tumorsphäroiden unterschieden werden, weswegen dann auch keine weiteren T_2 -Werte in den RBAs bestimmt werden konnten. Die beobachteten hohen T_2 -Werte ergaben sich aus dem höheren Medium-Anteil in dem weniger dicht gepackten Gewebe der RBAs [Gol-98].

Vergleich mit vorangegangenen Arbeiten

Die Richtigkeit der Zuordnung in vitales und nekrotisches Gewebe, aufgrund der unterschiedlichen T_2 -Werte, war auch schon bei Brandl [Bra-96] durch histologische Untersuchungen bestätigt worden. Um die von Brandl und Szimtenings gemessenen T_2 -Werte mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten vergleichen zu können, bedarf es jedoch einiger Erläuterungen:

Beide verwendeten größere (0,4-1,0 mm im Durchmesser) und deswegen weniger vitale Tumorsphäroide, bei denen schon zu Beginn der Messungen in den zweidimensionalen Schnittbildern ausgedehnte nekrotische Bereiche in den Zentren der Tumorsphäroide zu erkennen waren.

Brandl fixierte die beobachteten Konfrontationskulturen in einer Agar-PBS-Nährlösung. Die zu Beginn der Messung zur Verfügung stehenden Nährstoffe wurden im Verlauf der Messung verstoffwechselt, so dass die Konfrontationskulturen nach einigen Stunden überhaupt nicht mehr mit Nährstoffen versorgt wurden.

Szimtenings versorgte die Konfrontationskulturen in einer waagrecht angeordneten Apparatur zwar kontinuierlich mit frischen Nährstoffen, da bei den durchgeführten Messungen aber während der gesamten Messzeit trotz der beobachteten Bewegung der Konfrontationskultur dieselbe, relativ zum Gradientensystem definierte Schicht verwendet wurde, drehten sich die Konfrontationskulturen während der Messungen praktisch aus dem NMR-Bild heraus. Die zu Beginn einer Messung durch das Zentrum eines Tumorsphäroiden verlaufende Schicht verlief mit Fortschreiten der Messung somit durch immer weiter außen liegende, also vitalere Bereiche des Tumorsphäroiden. Deswegen veränderte sich während der Messungen die Zusammensetzung des Gewebes in der beobachteten Schicht, und die gemessenen T_2 -Werte der als nekrotischen identifizierten Bereiche im Zentrum der Tumorsphäroide näherten sich bei Szimtenings im Verlauf der Messungen immer weiter den T_2 -Werten der vitalen Gewebereiche an [Szi-96].

Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete senkrechte Anordnung des Probenröhrchens konnten die bei Szimtenings aufgrund des vorbeiströmenden Mediums auftretenden Verschiebungen der Konfrontationskulturen vermieden werden. Mit der Aufnahme von Kontrollbildern und dem Nachführen der Beobachtungsschicht wurden selbst die selten auftretenden verbliebenen kleinen Bewegungen der Konfrontationskulturen noch im Verlauf der entsprechenden Messung korrigiert. Somit war es möglich, während der gesamten Messzeit das Zentrum der Konfrontationskulturen zu beobachten und die im Verlauf der

Messungen entstehenden nekrotischen Bereiche anhand ihrer erhöhten T_2 -Werte zu identifizieren.

Um diese T_2 -Werte mit den von Brandl und Szimtenings bestimmten T_2 -Werten vergleichen zu können, sollen hier nur die in den ersten Stunden der von Szimtenings durchgeführten Experimente gemessenen T_2 -Werte betrachtet werden.

Für vitales Gewebe der untersuchten Konfrontationskulturen mit MV3-Sphäroiden ergaben sich daher mittlere T_2 -Werte von $60,1 \pm 5,9$ ms bei Brandl und von $47,3 \pm 4,7$ ms bei Szimtenings. Der mittlere T_2 -Wert für nekrotisches Gewebe betrug bei Brandl $116,2 \pm 21,9$ ms und bei Szimtenings $67,3 \pm 12,5$ ms. Wie man anhand der Varianzen der Mittelwerte bei Brandl und Szimtenings erkennen kann, bewegten sich die in den einzelnen Messungen bestimmten T_2 -Werte für vitales Gewebe relativ dicht um den jeweiligen Mittelwert herum, während die T_2 -Werte der nekrotischen Regionen in einem weiten Bereich schwankten. Bei den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werten fiel die Varianz auch in den nekrotischen Bereichen deutlich geringer aus und die T_2 -Werte für vitales und nekrotisches Gewebe bewegten sich relativ dicht um den jeweiligen Mittelwert.

T_2-Werte	0 Gy	5 Gy	9 Gy	Brandl	Szimtenings
Verteilung (nach 4h)	homogen	"Mini"- Regionen	"Mini"- Regionen	getrennte Bereiche	getrennte Bereiche
Verteilung (nach 24h)	getrennte Bereiche				
'vital' 4h 24h	$47,6 \pm 4,6$ ms	$49,6 \pm 4,2$ ms	$59,2 \pm 5,6$ ms $67,0 \pm 6,8$ ms	$60,1 \pm 5,9$ ms	$47,3 \pm 4,7$ ms
'nekrotisch' 4h 24h	keine $61,8 \pm 5,0$ ms	$60,2 \pm 5,6$ ms	$67,8 \pm 7,2$ ms $77,2 \pm 9,2$ ms	$116,2 \pm 21,9$ ms	$67,3 \pm 12,5$ ms
Tumor- invasion	+	-	-	keine Aussage möglich	+

Tabelle 4-1: Übersicht über die verschiedenen T_2 -Werte der Konfrontationskulturen mit unbestrahlten und bestrahlten Tumorsphäroiden (siehe unten Abschnitt "Therapiesimulation"). Die ersten beiden Zeilen geben die Verteilung der T_2 -Werte in der Schnittebene an. In den folgenden Zeilen stehen die mittleren T_2 -Werte für Gewebe mit vitalem und nekrotischem Charakter. Die letzte Zeile gibt an, ob eine Tumordinvasion beobachtet wurde. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte werden außerdem mit denen von Brandl und Szimtenings verglichen.

In den vitalen Bereichen der Tumorsphäroide stimmen die in der vorliegenden Arbeit gemessenen T_2 -Werte somit hervorragend mit den von Szimtenings an mit Nährstoffen versorgten Tumorsphäroiden gemessenen T_2 -Werten überein.

Die von Brandl an nicht versorgten Tumorsphäroiden bestimmten höheren T_2 -Werte und die in der vorliegenden Arbeit gemessenen niedrigeren T_2 -Werte in den nekrotischen Bereichen

sowie deren geringere Schwankungsbreite befinden sich in sehr gutem Einklang mit dem Gewebemodell, mit dem die kürzeren T_2 -Werte in den vitalen Bereichen erklärt werden.

Übereinstimmung mit dem Gewebemodell

In vitalem Gewebe binden Wassermoleküle an Makromoleküle wie Proteine, Zellmembranen und das Zytoskelett. Die Protonen eines Wassermoleküls unterliegen dabei wegen ihrer schwachen Bindung an die Makromoleküle einer statischen Dipol-Dipol Wechselwirkung, die zu einer Verkürzung der Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxationszeiten im biologischen Gewebe führt [Man-82]. Unter der Annahme eines schnellen Austausches zwischen freiem und gebundenem Wasser wird im Experiment eine mittlere Relaxationszeit gemessen [Zim-57].

Da vitale Zellen einen vollkommen entwickelten und fast identischen makromolekularen Aufbau besitzen und im Zellverband relativ gleichmäßig angeordnet sind, sind für sie kurze und einheitliche NMR-Relaxationszeiten zu erwarten. Nekrotische Zellen hingegen befinden sich nicht alle im gleichen Zustand, sondern durchlaufen verschiedene Stadien des Zellabbaus, von der Auflösung des Zytoskeletts bis hin zur vollständigen Zerstörung der Zellen. Mit dem Fortschreiten des Zellabbaus, dem damit verbundenen Anschwellen der Zellen und dem somit größer werdenden Anteil freier Wassermoleküle, entwickeln sich die Relaxationszeiten des nekrotischen Gewebes deswegen kontinuierlich von den kurzen Werten vitalen Gewebes zu den langen Werten vollständig zerstörter Zellen. Aus dem inhomogenen Gemisch verschiedener Strukturen in nekrotischem Gewebe ergibt sich neben den längeren Relaxationszeiten auch ein größerer Schwankungsbereich der gemessenen Werte. Die gemessenen T_2 -Werte erlauben somit nicht nur zwischen vitalen und nekrotischen Gewebereichen zu unterscheiden, sondern stellen auch ein direktes Maß für den Grad der Veränderung der Zellstruktur dar.

Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten C6-Tumorsphäroide noch sehr klein und deswegen äußerst vital und aggressiv waren, und die nekrotischen Bereiche in den Tumorsphäroiden auch erst während der Kokultivierung frisch entstanden, stimmen die hier gemessenen kleineren T_2 -Werte hervorragend mit dem Gewebemodell überein. Das gleiche gilt für die in dieser Arbeit relativ kleine Varianz der T_2 -Werte, die aufgrund der immer noch hohen Vitalität der Zellen in den nekrotischen Bereichen in etwa genauso groß war, wie die Schwankungsbreite bei den T_2 -Werten des vitalen Gewebes.

Die von Brandl und Szimtenings bei den größeren Tumorsphäroiden beobachteten höheren T_2 -Werte in den nekrotischen Zentren der Tumorsphäroide und die unterschiedlichen Schwankungsbreiten der T_2 -Werte bei vitalen und nekrotischen Zellen stimmen ebenfalls gut mit dem Gewebemodell überein und ergeben sich aus dem stärker nekrotischen Charakter der von ihnen verwendeten Tumorsphäroide.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumorsphäroide waren, wie die niedrigen Werte in den T_2 -Karten zeigen, über die gesamte untersuchte Querschnittsfläche hinweg äußerst vital und behielten diese Vitalität auch weitgehend während der gesamten Dauer des

Invasionsprozesses. Selbst diejenigen Bereiche mit erhöhten T_2 -Werten, die sich im Verlauf des Invasionsprozesses bildeten und als nekrotische Bereiche identifiziert wurden, besaßen im Vergleich zu den Messungen von Brandl und Szimtenings noch so niedrige T_2 -Werte und so geringe Schwankungsbreiten in den T_2 -Werten, dass man auf eine hohe Vitalität dieser 'nekrotischen' Bereiche schließen muss. Die vitale Kugelschale am Rand der von Szimtenings für die Konfrontationskulturen verwendeten Tumorsphäroide wies eine ähnliche Vitalität auf wie das gesamte Gewebe der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Tumorsphäroide. Bei den von Brandl eingesetzten und während der Messungen nicht mit Nährstoffen versorgten Konfrontationskulturen besaß diese 'vitale' Kugelschale sogar T_2 -Werte im Bereich um 60 ms. Infolgedessen ist ihr Vitalitätsgrad während der Messungen vergleichbar mit dem Vitalitätsgrad derjenigen Gewebebereiche der vorliegenden Arbeit, die den 'nekrotischsten' Charakter besaßen. Da Brandl allerdings nur Momentaufnahmen gemacht und den Invasionsvorgang nicht über mehrere Stunden kontinuierlich verfolgt hat, ist es nicht möglich festzustellen, ob die von ihm als 'vital' identifizierten Zellen überhaupt noch ausreichend versorgt waren und proliferierten.

Im Umkehrschluss bestätigt sich hierdurch aber gerade die zuvor formulierte Aussage, dass die in dieser Arbeit als nekrotisch identifizierten Gewebebereiche durchaus nicht aus toten Zellen bestanden, sondern vielmehr Bereiche mit einer geringen Nährstoffunterversorgung darstellten, die erst am Anfang ihrer nekrotischen Entwicklung standen. Mit den hier durchgeführten Experimenten war es also möglich, schon kleine Veränderungen in der Zellstruktur zu detektieren und das Entstehen nekrotischer Bereiche im Innern der Konfrontationskulturen frühzeitig zu erkennen und zu beobachten. Die einzelnen Ergebnisse sind im Überblick in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

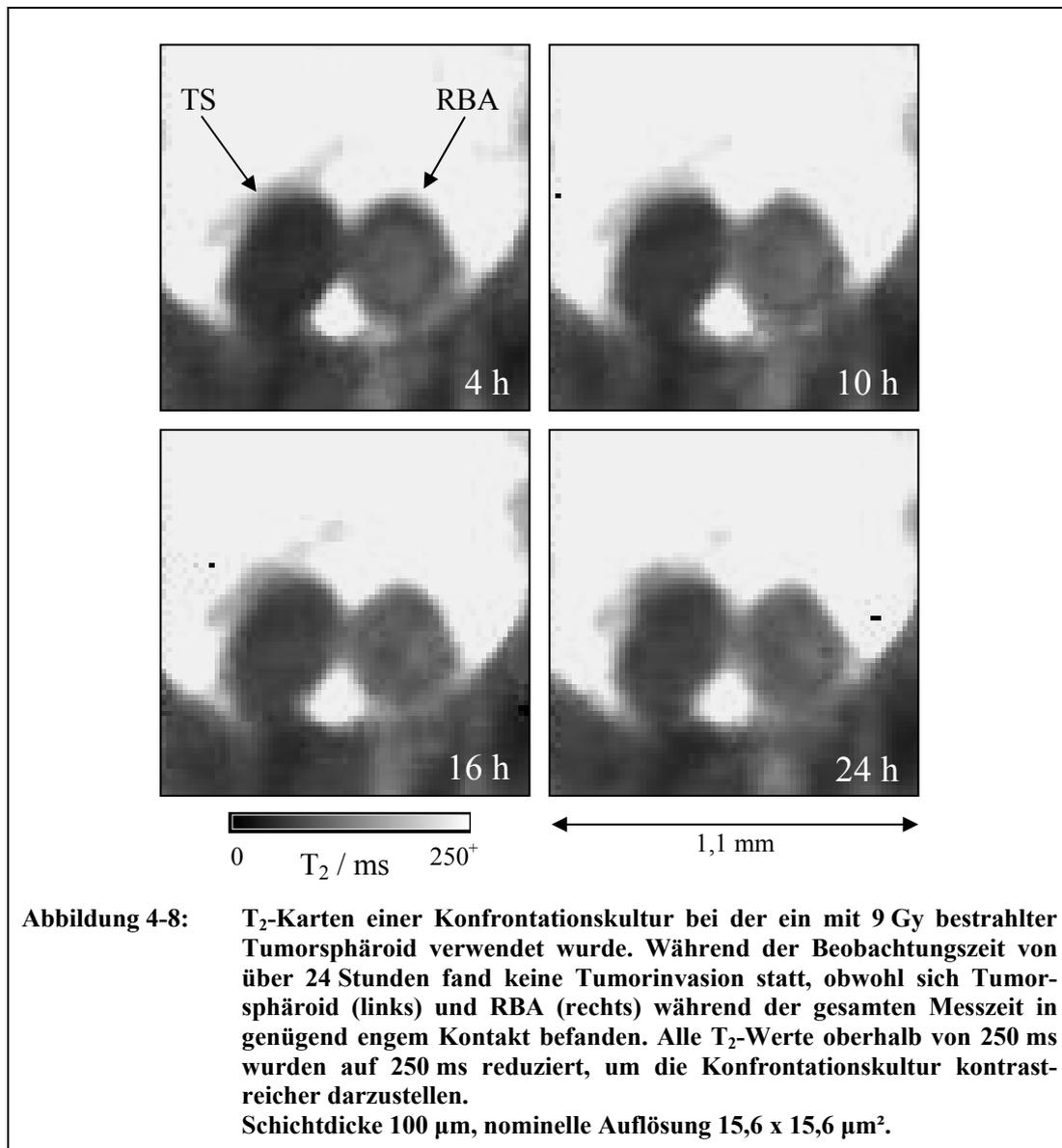
T_1 -Parameterkarten

In den T_1 -Karten konnte bei den verwendeten jungen und kleinen Tumorsphäroiden keine eindeutige Unterscheidung zwischen vitalem bzw. nekrotischem Gewebe vorgenommen werden. Es war lediglich möglich, die Konfrontationskulturen eindeutig von dem sie umgebenden Nährmedium zu unterscheiden. In ihrem Innern besaßen die Konfrontationskulturen räumlich homogen verteilte T_1 -Werte im Bereich von 2,2 bis 2,7 s.

Therapiesimulation

Es sind zwei Ansätze vorgesehen, um mit der für dieses Projekt gebauten Perfusionsapparatur Therapiesimulationen durchführen zu können. Zum einen mündet ein zusätzlicher Versorgungsschlauch in die Blasenfalle oberhalb der NMR-Kapillare (vgl. Abbildung 4-1), der dazu verwendet werden kann, dem Nährmedium kontinuierlich während der gesamten Messzeit oder zu einzelnen, definierten Zeitpunkten Pharmaka beizumischen. Anschließend kann der Einfluss der Pharmaka auf die Tumordinvasion anhand der T_2 -Karten beobachtet werden. Zum anderen können zuvor bestrahlte Tumorsphäroide in den Konfrontationskulturen untersucht werden. Nur die zweite Möglichkeit zur Therapiesimulation wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt. Dafür wurden insgesamt vier Konfrontationskulturen untersucht,

bei denen die Tumorsphäroide zuvor in zwei Fällen mit einer Gesamtdosis von 5 Gy und in den anderen beiden Fällen mit 9 Gy bestrahlt worden waren.



Die Konfrontationskulturen der mit 9 Gy bestrahlten Tumorsphäroide wuchsen während der gesamten Messzeit von 24 Stunden nicht zusammen. Sie besaßen allerdings auch von Beginn an relativ hohe T₂-Werte im gesamten Volumen der Tumorsphäroide. Die Verteilung der T₂-Werte über einen einzelnen Tumorsphäroiden war dabei relativ homogen. Es konnten bei den mit 9 Gy bestrahlten Tumoren schon zu Beginn der Messzeit kleine Geweberegionen mit T₂-Werten von $59,2 \pm 5,6$ ms von Geweberegionen mit T₂-Werten von $67,8 \pm 7,2$ ms unterschieden werden. Die einzelnen Bereiche waren allerdings nicht besonders ausgedehnt und weder auf den Rand noch das Zentrum der Sphäroide beschränkt. Im Verlauf der Messung änderten sich die T₂-Zeiten dieser Bereiche auf $67,0 \pm 6,8$ ms bzw. $77,2 \pm 9,2$ ms. Auffällig waren auch die größeren Schwankungsbreiten der T₂-Werte bei diesen stark

bestrahlten Tumorsphäroiden. Aus dem Vergleich mit den T_2 -Werten der Konfrontationskulturen mit unbestrahlten Tumorsphäroiden ergibt sich, dass die mit 9 Gy bestrahlten Tumorsphäroide schon von Beginn der Kokultivierung an einen so stark nekrotischen Charakter besaßen, dass sie nicht oder nur in sehr geringem Maße proliferierten. Deswegen fand auch keine Tumorinvasion statt.

Bei den mit 5 Gy bestrahlten Tumorsphäroiden konnten ebenfalls von Beginn der Messung an kleine Regionen mit unterschiedlichen T_2 -Werten voneinander abgegrenzt werden. Diese waren relativ homogen über den gesamten Tumorsphäroiden verteilt, so dass sich insgesamt auch eine homogene Verteilung der T_2 -Werte ergab. Es waren Bereiche mit T_2 -Werten von $49,6 \pm 4,2$ ms von Bereichen mit T_2 -Werten von $60,2 \pm 5,6$ ms unterscheidbar. Die T_2 -Zeiten dieser Bereiche stiegen auch im Verlauf der gesamten Messzeit von 24 bzw. 48 Stunden nicht an. Trotzdem wuchsen auch diese Konfrontationskulturen nicht zusammen. Die vitaleren Bereiche der mit 5 Gy bestrahlten Tumorsphäroide hätten alleine wahrscheinlich in das RBA einwachsen können. Aufgrund der zwischen den vitalen Bereichen verteilten nekrotischen Regionen, war der Invasionsvorgang insgesamt aber wohl so stark verlangsamt bzw. komplett verhindert, dass keine Tumorinvasion beobachtet werden konnte. Tabelle 4-1 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse aller Messungen mit bestrahlten und unbestrahlten Tumoren.

4.5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit neu angefertigten Perfusionsapparatur war es möglich, den gesamten Invasionsprozess von Tumorsphäroiden in Rattenhirnaggregate kontinuierlich NMR-mikroskopisch zu beobachten. Vitale und nekrotische Gewebe ließen sich anhand der signifikanten Differenz ihrer T_2 -Werte von mehr als 20 % eindeutig voneinander unterscheiden.

Das Tumorwachstum fand unter Zellkulturbedingungen statt und wurde durch die Messungen nicht beeinträchtigt. Wie die bis zum Abschluss der Messungen gleichbleibend niedrigen T_2 -Werte des vitalen Gewebes belegen, wurden die Konfrontationskulturen während der gesamten Messzeit ausreichend mit Nährstoffen versorgt und behielten ihre ursprüngliche Vitalität. Im Vergleich zu den vorangegangenen Arbeiten konnte die Beobachtung der Tumorinvasion auf kleinere und vitalere Tumorsphäroide ausgedehnt und die Entstehung von nekrotischem Gewebe beobachtet werden. Außerdem konnten Probleme mit Luftblasen durch den senkrechten Aufbau vermieden werden.

Die Apparatur wurde so gebaut, dass sie für Serienmessungen geeignet ist und dass sowohl die Frühphase der Tumorinvasion beobachtbar war, als auch Langzeitmessungen über einen Zeitraum von mehr als 48 Stunden hinweg durchgeführt werden konnten. Während dieses Zeitraums konnte der Invasionsvorgang dank der verwendeten hohen räumlichen Auflösung der NMR-Bilder und Parameterkarten schon aufgrund der Veränderung der äußeren Form der Konfrontationskulturen beobachtet werden.

Die in den Konfrontationskulturen verwendeten kleinen und äußerst aggressiven C6-Tumorsphäroide aus einer Rattengliosarkom Zell-Linie waren zu Beginn der Messungen noch so klein, dass alle Zellen der Tumorsphäroide ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurden und sie noch keine nekrotischen Bereiche in ihrem Innern besaßen.

Dies zeigte sich auch in den akquirierten T_2 -Karten. Zu Beginn der Messungen waren die verschiedenen gemessenen T_2 -Werte alle noch relativ niedrig und homogen über den jeweiligen Tumorsphäroiden verteilt. Im Verlauf der bis zu 48 Stunden dauernden Messungen entstanden kleine Gebiete mit um mehr als 20 % höheren T_2 -Werten, die aufgrund der hohen räumlich Auflösung frühzeitig erkannt und eindeutig von den vitalen Regionen unterschieden werden konnten. Die immer noch hohe Vitalität dieser während der Messungen neu entstandenen 'nekrotischen' Bereiche spiegelte sich in den nur um 20 % erhöhten T_2 -Werten und deren kleiner Varianz wider.

Die gemessenen T_2 -Werte und ihre Varianzen stimmen hervorragend mit den von Brandl und Szimtenings für vitales und nekrotisches Gewebe gemessenen T_2 -Werten überein und befinden sich auch in Einklang mit den aufgrund der Morphologie des nekrotischen Gewebes erwarteten T_2 -Werten. Es war sogar möglich, die Vitalität der entstandenen nekrotischen Bereiche im Vergleich zu den von Brandl und Szimtenings erzielten Werten einzuordnen, was wiederum die hohe Vitalität dieser Regionen bestätigte.

Bei den vor den Messungen bestrahlten Tumorsphäroiden konnte kein bzw. ein so stark verlangsamtes Invasionsverhalten beobachtet werden, dass sie im Laufe der Messungen nicht in die Rattenhirnaggregate einwuchsen. Je nach Grad der Bestrahlung besaßen diese Tumorsphäroide auch entsprechend erhöhte T_2 -Werte und größere Varianzen der T_2 -Werte.

In der Summe dokumentieren die Ergebnisse dieses Kapitels, dass die angefertigte Apparatur in Kombination mit den durchgeführten NMR-Experimenten ein empfindliches Gerät zur nicht-invasiven Charakterisierung der Tumorinvasion und zur Beobachtung und frühzeitigen Erkennung der Entstehung nekrotischer Bereiche ist. Der Vitalitätsgrad des Gewebes wird durch die T_2 -Werte und deren Schwankungsbreite charakterisiert und kann fein abgestuft und räumlich hochaufgelöst bestimmt werden.

5 NMR-Mikroskopie an Insekten

Der nicht-invasive Charakter der NMR-Mikroskopie und der mit ihr erzielbare gute Kontrast in Weichteilgewebe wurde in den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten dazu verwendet, Bilder vom fixierten Gehirn der Honigbiene in der noch intakten Kopfkapsel aufzunehmen. Dabei konnte die natürliche dreidimensionale Struktur des Bienengehirns abgebildet werden, während das Gehirn noch zwischen seinen Aufhängepunkten im Kopf der Biene aufgespannt war. Neben der Aufnahme detaillierter Informationen über die Formen und Volumina der verschiedenen Bereiche des Bienengehirns gelang somit auch die Visualisierung der relativen Ausrichtung der einzelnen Bereiche zueinander und zur umgebenden Kopfkapsel.

Da das Bienengehirn in der Kopfkapsel aufgespannt ist, lieferte die durchgeführte in-situ NMR-Mikroskopie-Studie eine aufgeweitete Stereogeometrie und größere Volumina der einzelnen Gehirnareale als in der Literatur beschrieben. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten NMR-Messungen an Gehirnen in intakten Kopfkapseln, wurden diese Literaturwerte mittels konfokaler Lasermikroskopie an aus der Kopfkapsel herauspräparierten Gehirnen gemessen.

Neben den anatomischen Bildern des Bienengehirns wurden NMR-Parameterkarten der Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 , sowie der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 aufgenommen, um deren Einfluss auf den Kontrast in den NMR-Bildern zu untersuchen. Als dominierend erwiesen sich dabei Unterschiede in der Spin-Dichte des Gewebes.

Zusätzlich zu den Untersuchungen des fixierten Bienengehirns konnten Bilder des Gehirns einer lebenden Hummel aufgenommen werden. Diese Bilder zeigen zwar keine Substrukturen des Gehirns, als Ganzes ist es in den Bildern jedoch deutlich zu erkennen.

In einem Kurzprojekt wurde im Weiteren die komplette Anatomie einer fixierten Drosophila untersucht. Hier konnte ebenfalls das Gehirn als Ganzes, die Grobstruktur des Körpers und vor allem die quer- und längsgestreifte Flugmuskulatur klar abgebildet werden.

5.1 Das Gehirn der Honigbiene

5.1.1 Einleitung

Die Honigbiene ist aufgrund ihrer bemerkenswerten kognitiven Fähigkeiten und der im Vergleich zu Säugetieren simplen Struktur ihres Gehirns ein wichtiges Modell in der Neurobiologie. Zum Beispiel zeigt ihre Fähigkeit, sich Informationen über Position und Güte einer neuen Futterstelle merken und später durch den Schwänzeltanz an andere Bienen weitergeben zu können (vgl. Abbildung 5-1), dass die Biene wichtige Mechanismen zur schnellen neuronalen Verarbeitung dieser Daten besitzt und außerdem über ein schnelles und stabiles Gedächtnis verfügt. In der Neurobiologie wird die Biene deswegen als Modell

verwendet, um die diesen Fähigkeiten zugrunde liegenden Mechanismen und Vorgehensweisen zu untersuchen und zu verstehen. Durch das Studium der Struktur und des Aufbaus des Bienehirns können Funktion und Anatomie miteinander korreliert werden [Tau-01].

Seit dem 19. Jahrhundert wird die Anatomie des Bienehirns untersucht, indem das Gehirn aus der Kopfkapsel der Biene herauspräpariert wird [Duj-50]. Leider wird die dreidimensionale Struktur und Stereogeometrie des Gehirns gegenüber dem natürlichen Zustand in der Kopfkapsel durch das Herauspräparieren und anschließende Fixieren des Gehirns außerhalb der Kopfkapsel verändert. Ein sogenanntes 'Standard-Bienehirn' konnte deswegen bisher nur auf der Basis der Daten der herauspräparierten und somit deformierten Gehirne erstellt werden.

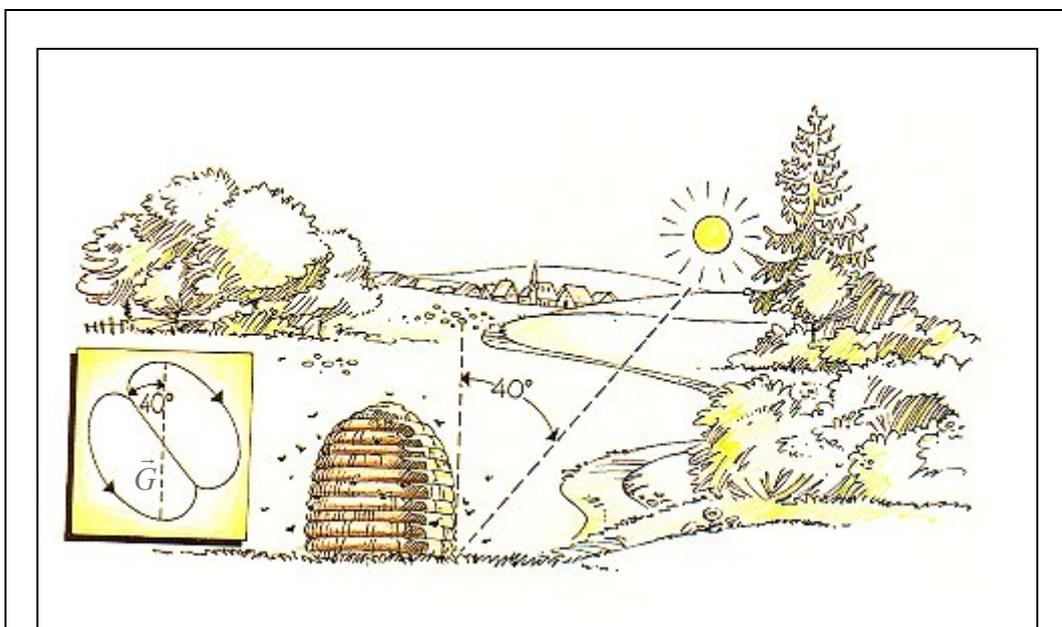


Abbildung 5-1: Kommunikation und Orientierung der Honigbiene. Die Richtung vom Stock zu einer neuen Futterstelle bestimmt die Biene aus dem Winkel zwischen Futterstelle und Sonne. Im Schwänzeltanz wird diese Richtung durch den Winkel zwischen Tanzachse und Richtung der Erdanziehung dargestellt und so den anderen Bienen mitgeteilt. Die Dauer des Tanzes und die Anzahl der Schwänzelsbewegungen beschreiben die Entfernung zur Futterstelle. Quelle: Internet [Int-01]

Um das Standard-Bienehirn an die natürliche Form und Stereogeometrie des in der Kopfkapsel (Kutikula) der Biene aufgespannten Gehirns anpassen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit in-situ NMR-Mikroskopie-Experimente an mit Formalin fixierten Bienenköpfen durchgeführt und dreidimensionale NMR-Bilder des Bienehirns mit hoher räumlicher Auflösung in seiner natürlichen Form in der intakten Kopfkapsel aufgenommen.

Zusätzlich zu den anatomischen Bildern des Bienehirns wurde der in den NMR-Bildern vorhandene gute Kontrast zwischen den einzelnen Gehirnstrukturen anhand von NMR-

Parameterkarten der Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 und der Einfluss der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 untersucht.

5.1.2 Material und Methoden

5.1.2.1 Proben und Probenpräparation

Die Köpfe von acht Arbeiterbienen (Sammlerinnen der *Apis mellifera carnica*, siehe Abbildung 5-2) wurden vom Körper abgetrennt und unter Evakuieren für 30 Minuten mit 4 %iger-Formalin / 0,1 %iger-Triton-X-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Köpfe über Nacht im Kühlschrank bei ca. 4°C in 4 %iger-Formalin-Lösung aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden sie mit iso-osmotischer (450 mOsm/l) Saccharose-Lösung für zwei Stunden gespült und danach in 30 %iger-Ethanol-Lösung aufbewahrt. Die Ethanol-Lösung war zuvor durch zehnmütiges Evakuieren entgast worden. Bei dieser sehr schonenden Präparation kann ein Anschwellen oder Schrumpfen des Gehirns weitgehend vermieden werden, so dass die Volumina der einzelnen Gehirnareale um weniger als 5 % gegenüber dem *in-vivo* Zustand geschrumpft sind [Men-01, Bra-01].

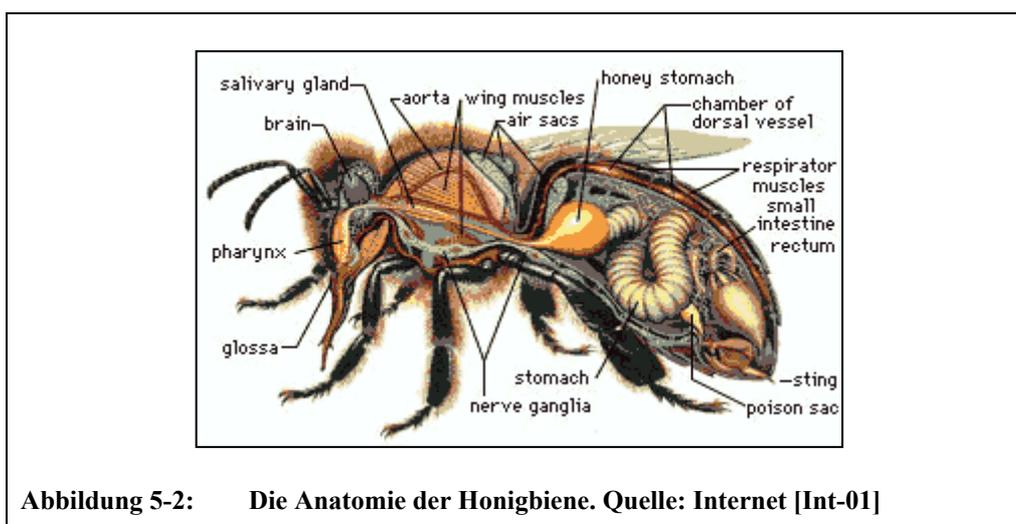


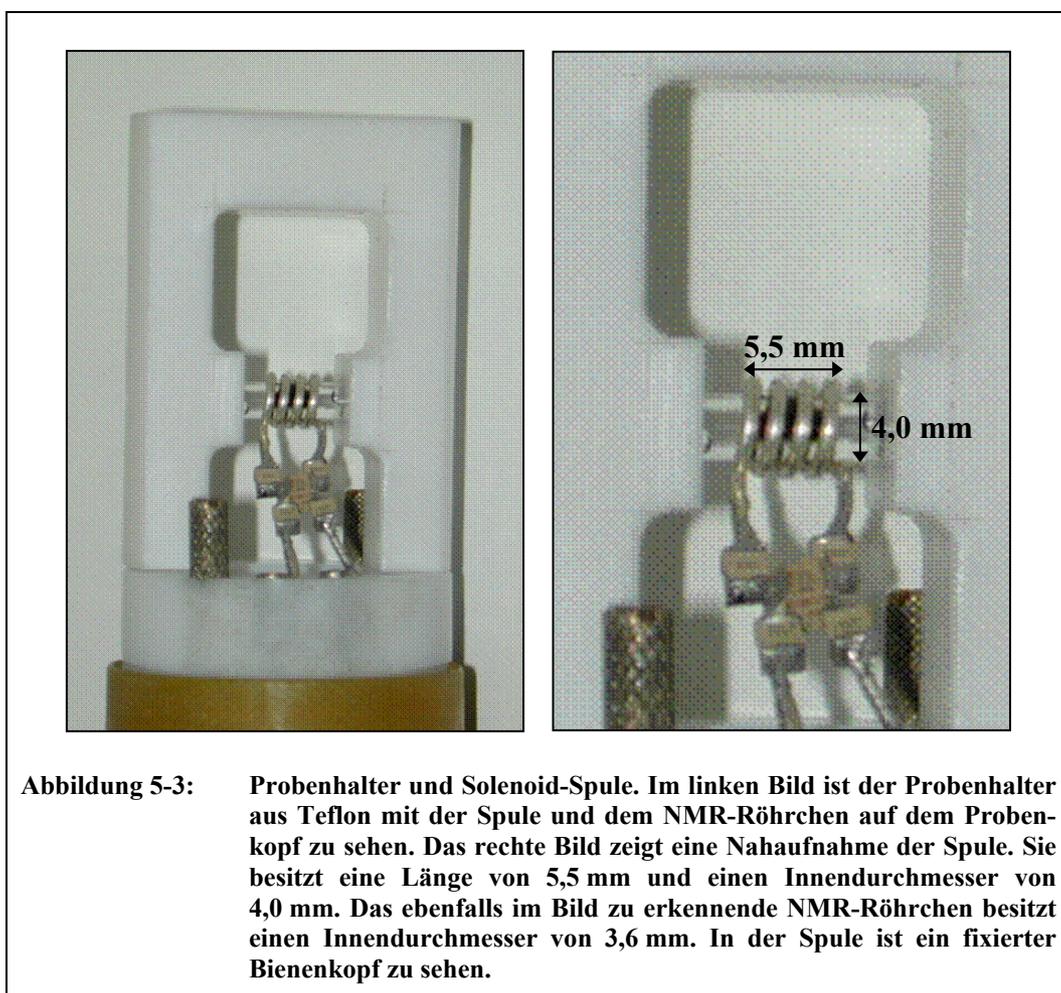
Abbildung 5-2: Die Anatomie der Honigbiene. Quelle: Internet [Int-01]

Vor den Messungen wurden die Mandibeln (Mundwerkzeuge) entfernt, damit die Köpfe in die NMR-Röhrchen mit einem Innendurchmesser von nur 3,6 mm hineinpassten. Für die Messungen wurden die Köpfe erneut in iso-osmotischer Saccharose-Lösung überführt, um ein Anschwellen oder Schrumpfen des Gehirns während der Messungen zu vermeiden, und anschließend für zehn Minuten evakuiert, um etwaige angelagerte Luftbläschen zu entfernen.

5.1.2.2 Hardware

Alle NMR-Experimente wurden am AMX 500 Spektrometer (vgl. Abschnitt 3.1) durchgeführt. Für die Experimente wurden ein speziell angepasster Probenkopf und eine Solenoid-Spule verwendet.

Der ursprünglich von Bernhard Kalusche gebaute Probenkopf besitzt einen ^1H - und einen ^{13}C -Kanal [Kal-99]. Beide Kanäle sind komplett getrennt, werden linear betrieben und bestehen aus einem auf die jeweilige Wellenlänge bei 11,7 T abgestimmten Balun (von engl. *balanced-to-unbalanced unit*) mit passendem Ankoppelnetzwerk. Die sogenannten triaxialen Baluns dienen zum symmetrischen Ankoppeln an die Spule [Che-89]. Jedes Ankoppelnetzwerk enthält neben Chipkondensatoren (ATC, USA) mit festen Kapazitäten auch zwei variabel einstellbare Kondensatoren mit Kapazitäten im Bereich von 2-20 pF (Tronser, Deutschland). Mit Hilfe dieser Trimmer können Spule und Ankoppelnetzwerk im Magneten auf die gewünschte Resonanzfrequenz ('getuned') und eine Eingangsimpedanz von $50\ \Omega$ ('gematched') abgestimmt werden.



Der Probenkopf wurde für die Bienenmessungen so umgebaut, dass Spule und Probenkammer kontinuierlich mit vortemperiertem Gas umspült werden können. Dazu wurde in das zentrale Trägerrohr des Probenkopfes ein Heizstab und ein Dewar eingebaut [Sch-01]. Das obere, offene Ende des Dewars befindet sich knapp unterhalb der Spule, an das untere Ende kann ein Schlauch angeschlossen werden, um Luft oder ein Gasmisch durch den Dewar zu leiten. Während der Messungen wurde in einem Vorratsbehälter außerhalb des Magneten flüssiger Stickstoff mit konstanter Rate verdampft und in den Probenkopf geleitet. Dort wurde das

Stickstoffgas dann mit dem eingebauten Heizstab auf 5 °C erwärmt, so dass Spule und Probe während der gesamten Messzeit konstant auf diese Temperatur gekühlt wurden. Die Messung und Kontrolle der Temperatur erfolgte mittels eines Temperaturfühlers direkt unterhalb der Spule. Je nach Bedarf wurde die Stromstärke durch den Heizstab von der Temperaturkontrollereinheit BVT-1000 des Spektrometers nachgeregelt. Der Probenhalter aus Teflon wurde so gebaut, dass er mit seiner zentralen Bohrung über die Solenoid-Spule auf den Probenkopf aufgesteckt werden kann. Das NMR-Röhrchen kann dann von der Seite her in die Spule gesteckt werden (vgl. Abbildung 5-3).

Die verwendete Solenoid-Spule besitzt vier Windungen aus versilbertem Kupferdraht, einen Innendurchmesser von 4,0 mm und eine Gesamtlänge von 5,5 mm. Die Gesamtlänge ergibt sich aus der Drahtdicke von 1,0 mm und dem von Houtt und Richardson [Hou-76] berechneten optimalen Abstand zwischen den Windungen, der Hälfte der Drahtdicke. Der Solenoid wurde gewählt, da dieser Spulentyp die größte Empfindlichkeit besitzt und somit für die kleinen Proben und das geringe Signal in der NMR-Mikroskopie besonders geeignet ist [Pec-95]. Die Gesamtlänge des Spulendrahtes beträgt knapp 7 cm, bei 500 MHz also weniger als ein Achtel der Vakuumwellenlänge (60 cm) bzw. ungefähr ein Sechstel der Wellenlänge im versilberten Kupferleiter (die Wellenlänge im Kupferleiter beträgt ca. $\frac{2}{3}$ der Vakuumwellenlänge).

5.1.2.3 NMR-Experimente

Zweidimensionale Spin-Echo-Bilder (vgl. Kapitel 3.2.1) wurden mit einer nominellen Auflösung von $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ und einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$ aufgenommen. Diese Auflösung ergibt sich aus dem FOV von $4,0 \times 4,0 \text{ mm}^2$ und der verwendeten Bildmatrix mit 256×256 Punkten. Die Echozeit T_E betrug $14,3 \text{ ms}$ und die Repetitionszeit T_R $1,0 \text{ s}$. Neben der Abbildung der anatomischen Grobstruktur des Bienehirns, die teilweise erst bei diesen relativ dicken Schichten gut zu erkennen war, boten die zweidimensionalen Schichtbilder die Möglichkeit, die optimale koronale Schicht durch das Zentrum des Bienehirns zu finden, die die spätere Ausrichtung der dreidimensionalen Experimente bestimmte.

Die dreidimensionalen Spin-Echo-Datensätze wurden mit einem FOV von $4,0 \times 4,0 \times 0,9 \text{ mm}^3$ und Matrizen mit bis zu $256 \times 256 \times 60$ Bildpunkten aufgenommen. Sie stellen somit das gesamte Gehirn der Biene mit einer nominellen Auflösung von $15,6 \times 15,6 \times 30,0 \mu\text{m}^3$ dar. Bei der Prozessierung der Daten wurde in allen drei Raumdimensionen ein Zero-Filling mit einem Faktor zwei vorgenommen, so dass die prozessierten Bilder eine Voxel-Größe von $7,8 \times 7,8 \times 15,0 \mu\text{m}^3$ besitzen.

Der beste Kontrast für das gesamte Gehirn ergab sich bei den dreidimensionalen Experimenten bei einer Echozeit $T_E = 14,3 \text{ ms}$ und einer Repetitionszeit $T_R = 1,5 \text{ s}$. Um verschiedene Strukturen des Gehirns besonders kontrastreich darzustellen, wurden die Echozeit T_E im Bereich von $8,2$ bis 25 ms und die Repetitionszeit T_R im Bereich von $1,0$ bis $1,5 \text{ s}$ variiert. Bei den normalerweise verwendeten vier Mittelungen ergaben sich Messzeiten von bis zu 28 Stunden für einen einzelnen dreidimensionalen Datensatz.

Einer der dreidimensionalen Datensätze des Bienenhirns wurde manuell segmentiert. Manuelle Segmentierung bedeutet in diesem Zusammenhang, einzelne Bildpunkte in den Schichtbildern des dreidimensionalen Datensatzes von Hand gewissen Gehirnarealen zuzuordnen und mit einer zuvor festgelegten Farbe zu markieren. Dadurch entsteht eine Maske dieser Strukturen, die über den eigentlichen Datensatz gelegt werden kann. Nachdem jede Schicht des Datensatzes auf diese Art segmentiert worden war, wurden mit Hilfe von Polygon-Oberflächenmodellen die dreidimensionalen Oberflächen der einzelnen anatomischen Strukturen aus den Segmentationsmasken rekonstruiert. Anschließend konnten aus diesen Rekonstruktionen die Volumina der einzelnen Strukturen berechnet werden.

Außerdem wurden von den Datensätzen auch sogenannte 'Volume Renderings' erstellt, die direkt ein dreidimensionales Bild des gesamten Datensatzes darstellen. Dabei wird für jeden einzelnen Bildpunkt die Absorption und Transmission für eine virtuelle Lichtquelle berechnet. Die graphische Darstellung und Auswertung der NMR-Daten wurde mit der Graphiksoftware Amira durchgeführt.

Neben den anatomischen Bildern wurden auch NMR-Parameterkarten aufgenommen. Im einzelnen wurde die Verteilung der T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten und die Verteilung der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 untersucht, um Informationen über das Verhalten der NMR-Parameter in den unterschiedlichen Typen des fixierten Gewebes zu erhalten. Die Parameterkarten wurden mit der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Magnetisierungspräparationsmethode akquiriert.

Für die T_1 -Parameterkarten wurden acht mit verschiedenen Erholungszeiten gewichtete Schichtbilder wie in Unterkapitel 3.2.2.1 beschrieben aufgenommen. Bei den Experimenten zur Akquisition der T_2 -Karten wurden ebenfalls acht, durch unterschiedlich lange Schleifen in der CPMG-Präparationssequenz verschieden gewichtete Schichtbilder akquiriert (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Alle Parameterkarten wurden mit demselben zweidimensionalen Spin-Echo-Bildgebungsexperiment (vgl. Abschnitt 3.2.1) mit einer nominellen Auflösung von $31,2 \times 31,2 \mu\text{m}^2$ und einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$ aufgenommen. Die Echozeit T_E im Bildgebungsteil betrug jeweils $8,7 \text{ ms}$.

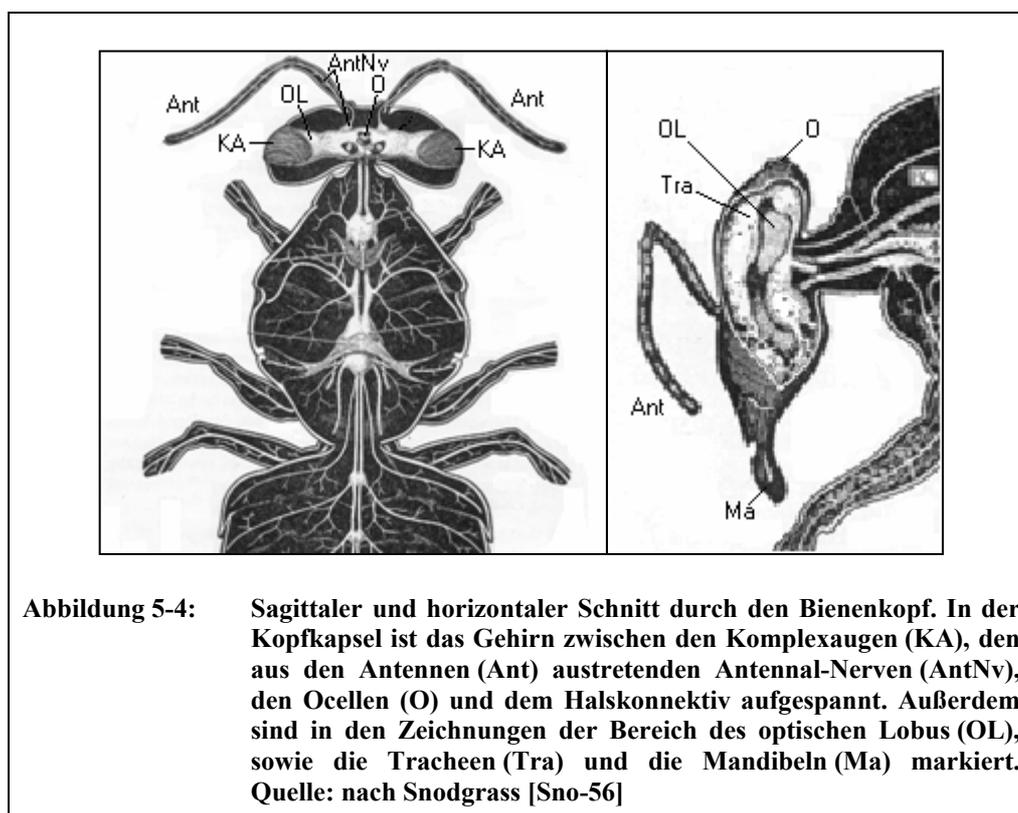
Neben den Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 wurde die Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 untersucht, da sie als Maß für die Spin-Dichte des Gewebes herangezogen werden kann. Dafür musste jedoch keine zusätzliche Messung durchgeführt werden, da das Experiment zur Akquisition der T_1 -Parameterkarte als zweites Ergebnis eine Karte der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 liefert (siehe Kapitel 3.2.2.1). Eigentlich müsste bei dieser M_0 -Karte aufgrund der verwendeten Pulssequenz eine T_2 -Korrektur für jedes Pixel durchgeführt werden. Wie sich später in den T_2 -Karten zeigt, kann diese allerdings vernachlässigt werden, da alle T_2 -Werte im Bereich des Bienenhirns sehr eng beieinander liegen.

5.1.3 Anatomie der Biene

In diesem Unterkapitel soll kurz auf die für die NMR-Experimente relevanten Details des Bienenkopfes und des Bienenhirns eingegangen werden. Die Anatomie und Physiologie der Biene selbst ist schon seit langem bekannt [Sno-56, Mob-85], aber auch die Struktur des Bienenhirns wurde schon im 19. Jahrhundert beschrieben [Duj-50].

5.1.3.1 Der Aufbau des Bienenkopfes

Am Kopf der Honigbiene sieht man von außen die großen Komplexaugen, die Antennen (Fühler), die drei als Ocellen bezeichneten simplen Augen, die äußeren Mandibeln (Mundwerkzeuge) und die aus Chitin bestehende Kopfkapsel (Kutikula) selbst. Die Komplexaugen sitzen an den beiden Seiten (lateral) des Kopfes, die Antennen ragen nach vorne aus dem Kopf heraus, die Mandibeln nach vorne unten und die Ocellen sitzen oben (dorsal) auf der Kopfkapsel der Biene [Sno-56].



Im Innern der Kutikula befinden sich neben dem Gehirn unter anderem das ebenfalls aus Chitin bestehende innere Skelett, diverse Drüsen und Muskeln, der innere Teil der Mandibeln mit dem Schlund und die Tracheen, dünnwandige Luftsäcke, die vom Körper der Biene ausgehend in den Kopf hineinragen und das Gewebe mit Sauerstoff versorgen. Vor allem das Gehirn ist von einer großen Anzahl dieser Tracheen umgeben. Außerdem ist es im Kopf zwischen den Komplexaugen, den aus den Antennen kommenden Nerven, den Ocellen und dem sogenannten Halskonnektiv aufgespannt (vgl. Abbildung 5-4).

Die extra- und intrazelluläre Flüssigkeit im Kopf der Biene besteht zum Großteil aus Wasser und darin gelösten Stoffen wie Ionen und Proteinen. Die Osmolarität der extra-zellulären Flüssigkeit beträgt ca. 480 mOsm/l [Men-01].

5.1.3.2 Das Bienenhirn, Anatomie und Funktion

Das Bienenhirn besteht aus mehreren funktionellen Bereichen, die jeweils eine Feinstruktur besitzen. Die Hauptstrukturen sind die sogenannten optischen Loben, die Antennal-Loben und die Pilzkörper (siehe Abbildung 5-5). Diese Strukturen werden als Neuropile bezeichnet und bestehen aus Neuronen, die über Synapsen miteinander verbunden sind. Trakte werden die Bahnen genannt, in denen Axone (Fortsätze der Nervenzellen) die Neuropile mit anderen Neuropilen, mit Muskeln und mit sensorischen Organen wie den Komplexaugen verbinden. Die Neuropile unterscheiden sich auf zwei Arten vom restlichen Hirngewebe. Zum einen besitzen sie eine deutlich höhere Membrandichte, da die Nervenenden an den Synapsen stark verzweigt sind, zum anderen herrscht in den Synapsen eine höhere Proteindichte als im übrigen Hirngewebe vor.

In den beiden optischen Loben geschieht der größte Teil der Verarbeitung visueller Informationen. Sie befinden sich jeweils an der Außenseite des Gehirns in direkter Nähe zu den Komplexaugen, über die die visuellen Informationen aufgenommen werden. Die Verbindung zwischen den optischen Loben und den Komplexaugen wird durch ein strahlenförmig angeordnetes Gewebe, die Lamina, mit einer Vielzahl dünner, röhrenförmiger Kanäle realisiert. Die optischen Loben lassen sich in Medulla und Lobula unterteilen, wobei es sich bei der Medulla um die größere, weiter außen liegende Struktur handelt (Farbcode und Zuordnung sind in Tabelle 5-1 für Abbildung 5-5 und Abbildung 5-6 angegeben). Die Bilddaten wurden in enger Zusammenarbeit mit R. Brandt ausgewertet, daher wird die Lamina hier, wie von ihm vorgeschlagen, als separate Struktur behandelt und nicht wie sonst üblich als drittes Ganglion der optischen Loben betrachtet [Bra-01].

Olfaktorische Reize werden hauptsächlich in den Antennal-Loben im vorderen Bereich des Bienenhirns verarbeitet (siehe Abbildung 5-5: grüne Strukturen). Die beiden Antennal-Loben sind über die Antennal-Nerven direkt mit den Antennen der Biene verbunden und bestehen aus einem Cluster von sogenannten Glomeruli. Bei den Glomeruli handelt es sich um kugelförmige Strukturen mit Durchmessern von 15 - 30 μm [Fla-89].

Die optischen Loben und die Antennal-Loben sind mit den als β -Loben bezeichneten Strukturen verbunden, die das untere Ende der Pilzkörper bilden. Die Pilzkörper, in Abbildung 5-5 hell- und dunkelrot dargestellt, sind eine wichtige Struktur im Zentrum des Bienenhirns. Sie bestehen aus den α -Loben und β -Loben, den Pedunkeln (hellrot) und den paarweise angeordneten Calyces (dunkelrot). Die am unteren Ende der Pilzkörper sitzenden β -Loben gehen nach oben in die Pedunkel über (vgl. Abbildung 5-6), die sich anschließend aufspalten, um die medianen und lateralen Calyces zu bilden (siehe Abbildung 5-5 Strukturen in dunkelrot). Die α -Loben befinden sich am vorderen Ende der Pilzkörper und gehen ebenfalls in die Pedunkel über (vgl. Abbildung 5-6: Nr. 5).

Neuropil	Farbe	Nr. in Abbildung 5-6
Medullae	gelb	7
Lobulae	gelb	6
Antennal Loben	grün	1
mediale Calyces	dunkelrot	3
laterale Calyces	dunkelrot	2
Pedunkel + β -Loben	hellrot	4
α -Loben	hellrot	5
medianer Ocellartrakt	grau	8
laterale Ocellen	rosa	9
Komplexaugen	braun	10
Protocerebral-Lobus	weiß	-

Tabelle 5-1: Farbcodes und Nummerierung der verschiedenen Gehirnstrukturen in den nachfolgenden Abbildungen.

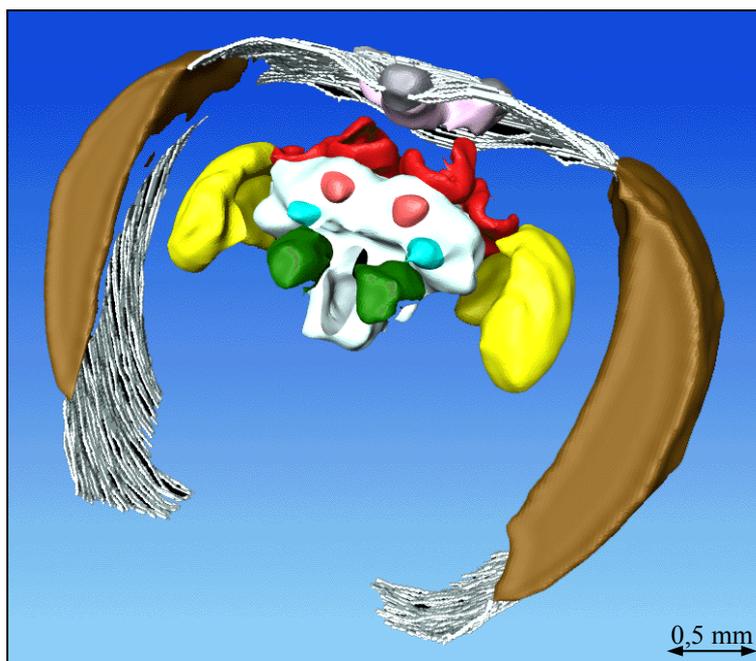


Abbildung 5-5: Oberflächenrekonstruktion eines manuell segmentierten 3D NMR-Datensatzes. Die nominelle räumliche Auflösung der Messung lag bei $15,6 \times 15,6 \times 30,0 \mu\text{m}^3$. Die im Bild sichtbaren rekonstruierten Strukturen sind die aus Medulla und Lobula bestehenden optischen Loben (gelb), die Antennal-Loben (grün), die α -Loben (hell-rot), die paarweise angeordneten Calyces (dunkel-rot), die lateralen Ocellen (rosa), der mediane Ocellartrakt, die optischen Tuberkel (türkis) und der Protocerebral-Lobus (weiß). Außerdem sind die Komplexaugen (braun) und Teile der Kopfkapsel (grau-weiße 'Fasern') dargestellt. In Abbildung 5-11 sind die Oberflächenrekonstruktionen unter weiteren Blickwinkeln dargestellt.

Die Pilzkörper wurden schon im 19. Jahrhundert entdeckt [Duj-50]. Sie besitzen nicht nur eine außergewöhnliche Form, sondern sind auch wegen der sehr eng gepackten und parallel verlaufenden Axone intrinsischer Neuronen eine der auffälligsten Strukturen des Bienengehirns. Die dicht gepackten Axone sind vor allem im unteren Teil der Pilzkörper und dort in den Pedunkeln zu finden. Neuere Studien haben ergeben, dass die Calyces an den oberen Enden der Pilzkörper dreigeteilt sind. Die Neuropile dieser drei Bereiche werden Lippe, Kragen und basaler Ring genannt [Mob-82]. Die in diesen drei Regionen endenden sensorischen Faserbahnen können direkt bis zu ihren Ursprungsorten zurückverfolgt werden. Die Faserstränge aus den optischen Loben enden zum Beispiel im Kragen, die aus den Antennal-Loben in der Lippe.

Obwohl die Calyces mit einer Dicke von nur 30-40 μm relativ kleine Strukturen sind, besitzen sie große Oberflächen und sind bei der neuronalen Datenverarbeitung äußerst wichtig. Da sie mit fast allen anderen Strukturen des Bienengehirns quervernetzt sind, scheinen sie ein Zentrum für diejenigen komplexen Gehirnfunktionen zu sein, die das Lernen, das Gedächtnis und das Sozialverhalten betreffen [Men-88]. Das Verhältnis des Volumens der Pilzkörper zum Volumen des gesamten Gehirns der Biene scheint sogar ein Indikator zu sein für die Komplexität und den Entwicklungsgrad des Sozialverhaltens. Aufgrund der besonderen Rolle der olfaktorischen Kommunikation in der Organisation des Bienenvolkes, werden vergrößerte Pilzkörper als Hinweis auf eine Weiterentwicklung und Verfeinerung der Verarbeitung und Kodierung olfaktorischer Informationen gewertet [How-74].

Die sogenannten Ocellen stellen eine weitere Struktur dar, die in Abbildung 5-5 zu sehen ist. Sie befinden sich direkt unterhalb des oberen Teils der Kopfkapsel und bestehen aus den beiden lateralen Ocellen (rosa eingefärbt) und dem medianen Ocellartrakt (grau dargestellt). Die Ocellen liefern Informationen über die Lichtintensität und können als drittes Auge betrachtet werden.

Außerdem sind in Abbildung 5-5 die Komplexaugen (Strukturen in braun), der Protocerebrallobus (große Struktur in weiß), in den die anderen Teile des Gehirns zum Teil eingebettet sind, und Teile der Kopfkapsel (grau-weiße faserartige Struktur) dargestellt.

5.1.4 Ergebnisse und Diskussion

5.1.4.1 NMR-Bilder des Bienengehirns

Die komplexe Anatomie des Bienengehirns wird in den NMR-Bildern sehr gut wiedergegeben. Mit der verwendeten Auflösung war es möglich, folgende Strukturen und zum Teil auch deren Substrukturen in der noch intakten Kopfkapsel der Biene abzubilden: die optischen Loben, die Antennal-Loben, die Pilzkörper, die Komplexaugen und die Ocellen.

Wie aus den Bildern klar hervorgeht, ist das Gehirn der Biene in der Kopfkapsel zwischen den Komplexaugen an beiden Seiten, den aus den Antennen heraustretenden Nerven an der Vorderseite, den Ocellen im oberen Teil und dem Halskonnektiv im hinteren Teil der Kopfkapsel aufgespannt. Diese äußerst stabile Aufhängung des Gehirns ermöglicht es der

Biene auch größere Erschütterungen des Kopfes bzw. des Körpers vom Gehirn zu entkoppeln. Selbst starke Stöße können das 'stoßgedämpfte' Gehirn nicht erreichen und seine Leistungsfähigkeit wird somit nicht beeinträchtigt.

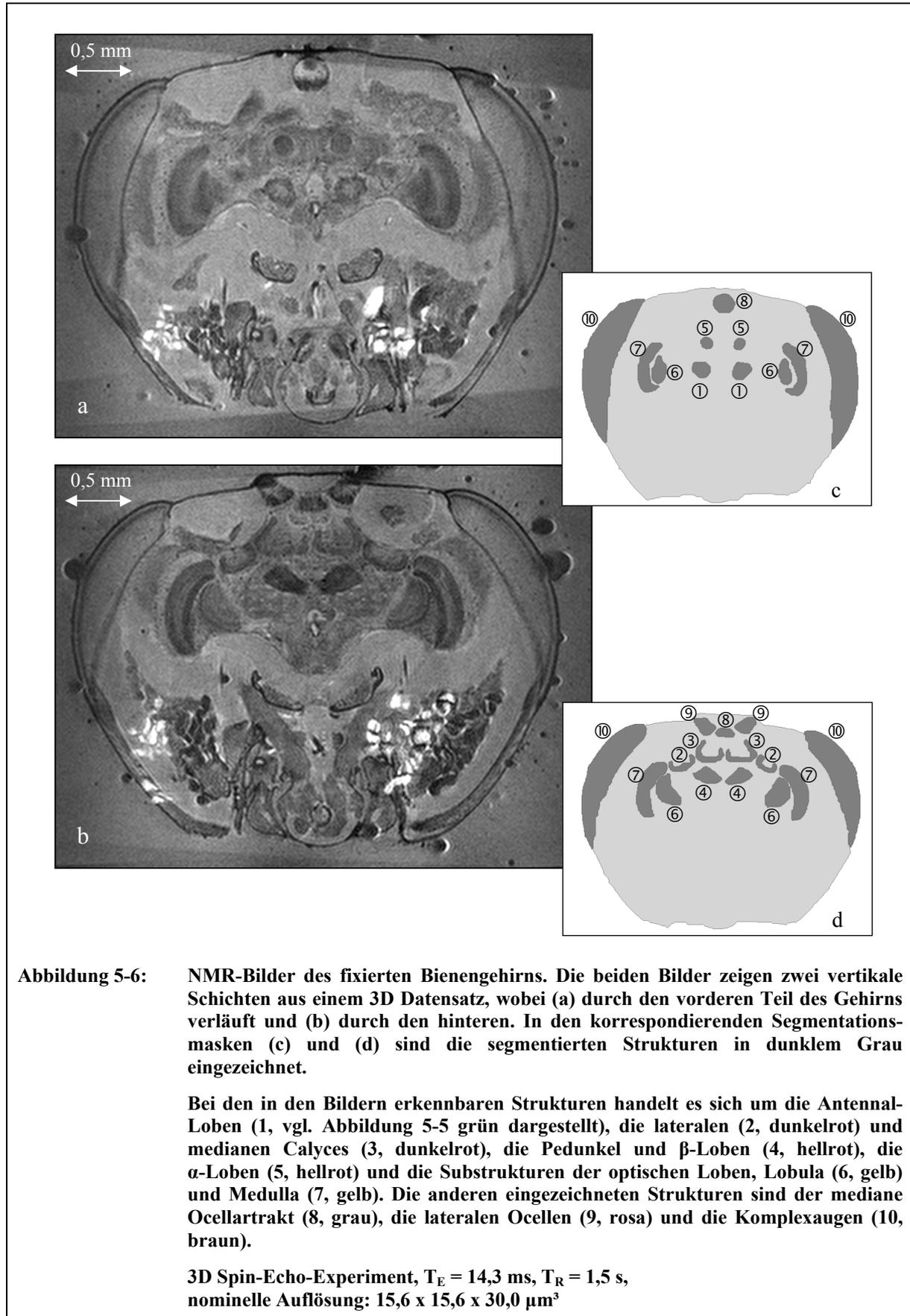
Die optischen Loben sind die größten Strukturen des Bienengehirns und sind in den zwei- wie in den dreidimensionalen NMR-Bildern sehr gut zu sehen und eindeutig vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden. Medulla und Lobula (vgl. Abbildung 5-6, Nr. 7,6) sind klar als separate Strukturen zu erkennen, und sogar Substrukturen der beiden zeichnen sich in den Bildern ab (Röhren in der Medulla und Schichten in der Lobula).

Wechselt man von der optischen zur olfaktorischen neuronalen Datenverarbeitung, so sind die Antennal-Loben von Interesse, die in den NMR-Bildern ebenfalls deutlich im vorderen Bereich des Gehirns zu erkennen sind (siehe Abbildung 5-6, Nr. 1). Die Glomeruli jedoch, aus denen die Antennal-Loben aufgebaut sind, besitzen Durchmesser im Bereich der Auflösungsgrenze der NMR-Bilder. Deswegen sind dort auch nur einzelne größere Glomeruli auszumachen.

Im Gegensatz dazu sind die paarweise angeordneten Calyces mit einer Dicke von 30-40 μm deutlich in den NMR-Bildern zu erkennen und gut vom umgebenden Gewebe abzugrenzen (siehe Abbildung 5-6, Nr. 2,3). Die an die Calyces anschließenden Bereiche der Pilzkörper, die Pedunkel, werden ebenso wie die aus ihnen hervorgehenden α - und β -Loben klar in den NMR-Bildern abgebildet (siehe Abbildung 5-6, Nr. 4,5).

Oberhalb der Calyces sind die Ocellen in der oberen Region des Bienenkopfes zu erkennen. Auch hier ist es möglich, Substrukturen zu identifizieren: die beiden lateralen Ocellen und den medianen Ocellartrakt (siehe Abbildung 5-6, Nr. 8,9).

Abbildung 5-7 zeigt sechs weitere NMR-Bilder aus dem dreidimensionalen Datensatz, aus dem auch die Bilder in Abbildung 5-6 stammen. Sie sind von den Antennal-Loben bis zum Halskonnektiv entlang der Längsachse der Biene sortiert und bieten so einen Eindruck über Form und Verlauf der einzelnen Gehirnstrukturen im Kopf der Biene.



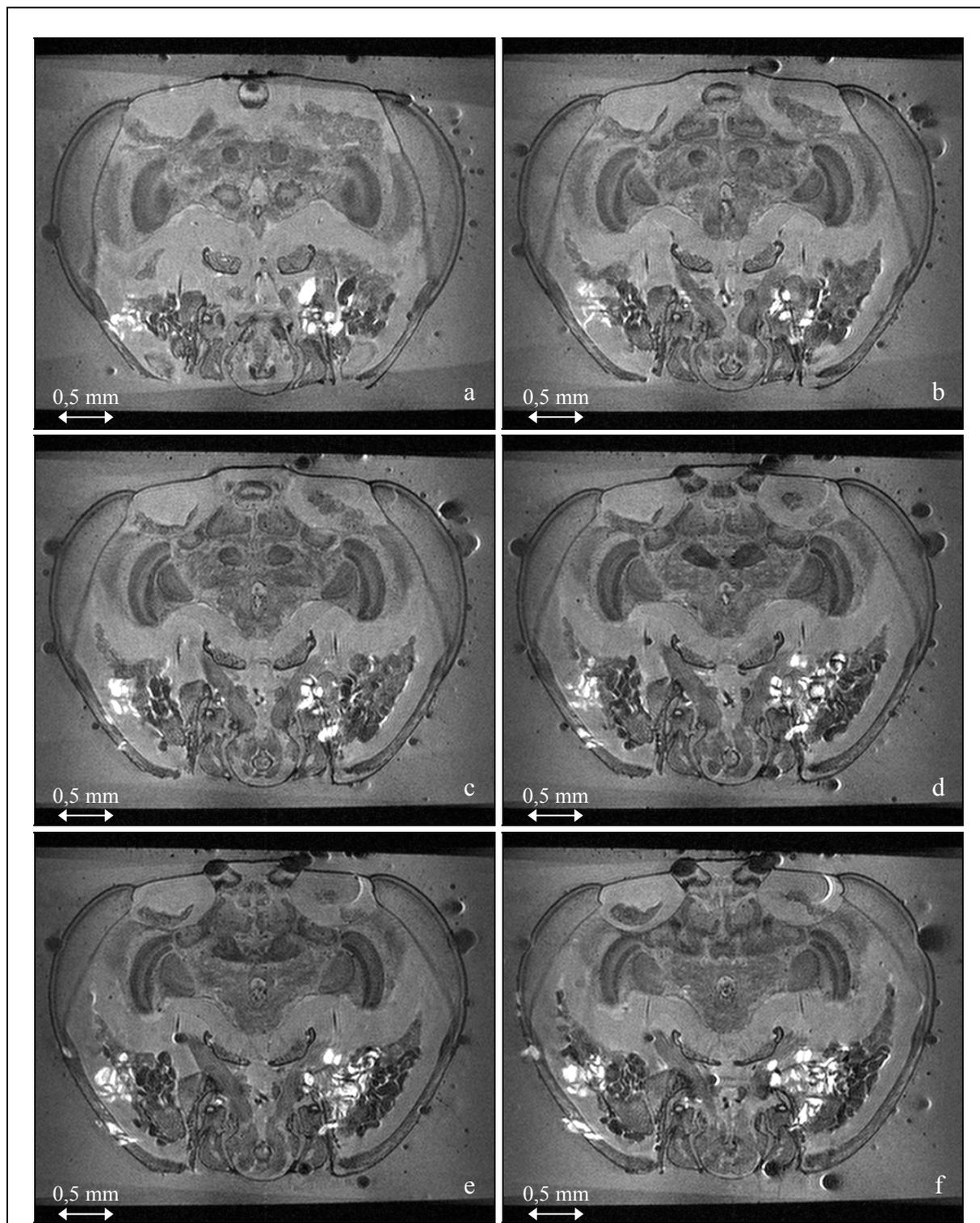
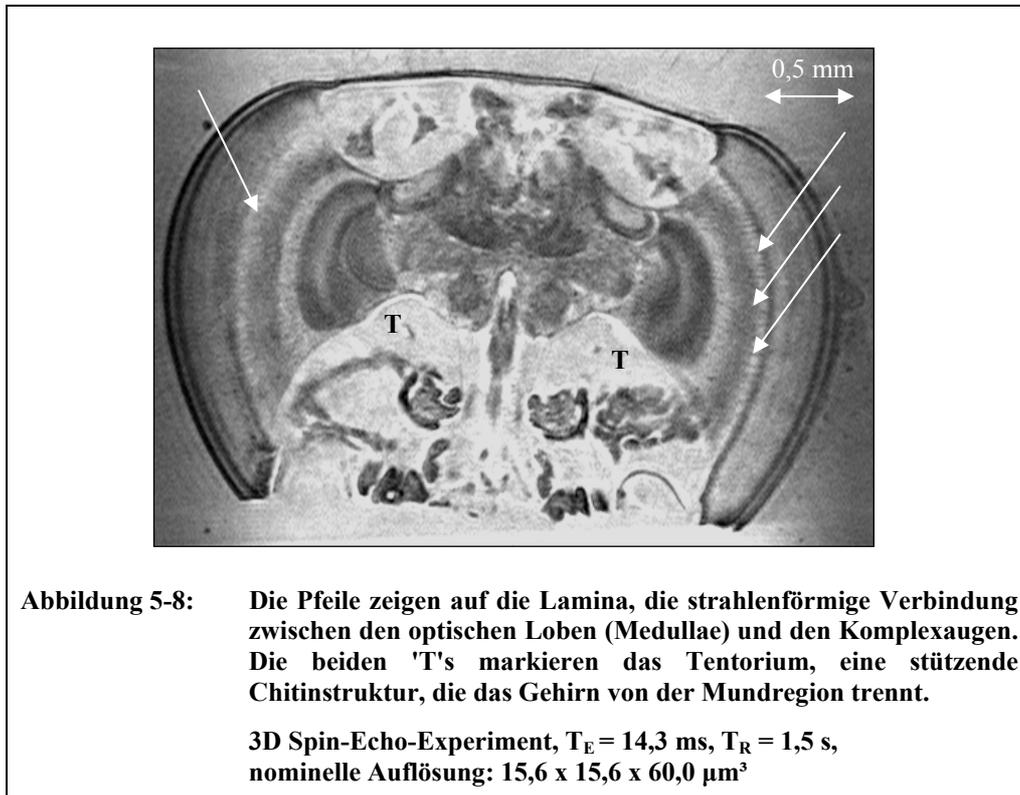


Abbildung 5-7: NMR-Bilder des Bienenhirns. Mehrere Schichten eines 3D Datensatzes entlang der Längsachse der Biene (von vorne nach hinten). Vor allem der Übergang der α -Loben in die Pedunkel und, nach deren Teilung, in die Calyces ist gut nachvollziehbar.

3D Spin-Echo-Experiment, $T_E = 14,3$ ms, $T_R = 1,5$ s,
 nominelle Auflösung: $15,6 \times 15,6 \times 30,0 \mu\text{m}^3$

Weitere sehr feine Strukturen, wie die in Abbildung 5-8 gezeigte strahlenförmige Struktur der Lamina, die eine Verbindung zwischen den optischen Loben und den Komplexaugen darstellt, sind in den NMR-Bilder ebenfalls klar aufgelöst. Dies gilt ebenso für größere Strukturen, wie die Komplexaugen selbst, schützende und stützende Chitinplatten (z.B. das Tentorium, das das Gehirn von der Mundregion trennt) und die Kutikula.



Außerdem kann man in der Mundregion der Biene mehrere Futterdrüsen deutlich erkennen (vgl. Abbildung 5-6). In den weiter außen liegenden und hier nicht gezeigten NMR-Bildern sind weitere der im Kopf der Biene vorhandenen Drüsen und Muskeln abgebildet.

Dank des nicht-invasiven Charakters der NMR-Messungen, konnten alle dargestellten Gehirnstrukturen in der noch intakten Kopfkapsel der Biene visualisiert werden. Sie sind deswegen in ihrer natürlichen Form und Position zu sehen, ohne dass im Vorfeld der Messungen Deformationen durch das Herauspräparieren des Gehirns aus der Kopfkapsel verursacht worden sind. Einzig eine kleine Schrumpfung des Gewebes von weniger als 5 % muss aufgrund der Formalin-Fixierung in Betracht gezogen werden [Men-01].

5.1.4.2 Oberflächenrekonstruktionen und Volume Rendering

Um einen besseren Eindruck der dreidimensionalen Geometrie des Bienenhirns in der Kopfkapsel zu erhalten, wurden eine dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der einzelnen Gehirnareale und ein direktes 'Volume Rendering' eines ganzen dreidimensionalen Datensatzes durchgeführt.

Aufgrund des guten Kontrastes in den NMR-Bildern war es prinzipiell möglich, die einzelnen Strukturen des Gehirns zu segmentieren, d.h. die einzelnen Bildpunkte wie in Unterkapitel 5.1.2.3 beschrieben bestimmten Gehirnstrukturen zuzuordnen. Da die verschiedenen Strukturen allerdings Grauwerte im selben Bereich der Farbpalette besitzen, konnte die Segmentierung der Daten nur von Hand durchgeführt werden. Ein vollautomatischer Segmentierungsalgorithmus hätte zwar die Grenzen der einzelnen Strukturen erkannt, die Flächen innerhalb dieser Grenzen allerdings aufgrund ihrer ähnlichen Grauwerte einem einzigen Gewebe zugeordnet. Aus den segmentierten Daten konnten anschließend die schon in Abbildung 5-5 gezeigten Oberflächenrekonstruktionen berechnet werden.

Das Ergebnis des direkten 'Volume Rendering' desselben dreidimensionalen Datensatzes ist in Abbildung 5-9 zu sehen. Die semi-transparente Darstellung der Bilddaten erlaubt es, die dreidimensionale Form und Stereogeometrie des kompletten Bienengehirns in einem Bild zu betrachten. Diese Darstellung vermittelt neben der räumliche Anordnung der einzelnen funktionellen Bereiche des Bienengehirns in der Kopfkapsel auch einen Eindruck über mögliche Bahnen neuronaler Verbindungen.

Einen weiteren Eindruck des räumlichen Aufbaus des Gehirns bietet Abbildung 5-10. Hier sind die dreidimensionalen Oberflächenrekonstruktionen dem 'Volume Rendering' überlagert worden. Obwohl die deckend dargestellten Oberflächenrekonstruktionen einen Teil der hinter ihnen liegenden Strukturen verdecken, betont diese Überlagerung die segmentierten Strukturen und vermittelt einen detaillierteren Eindruck über deren Einpassung und Befestigung in der Kopfkapsel. Außerdem können in dieser Darstellung die Volumen- und Oberflächen-Verhältnisse der einzelnen Strukturen besser abgeschätzt werden. Genauere Eindrücke über die Stereogeometrie des Bienengehirns kann man aus Filmsequenzen der einzelnen Schichtbilder eines dreidimensionalen Datensatzes und rotierenden Oberflächenrekonstruktionen erhalten (vgl. Abbildung 5-11).

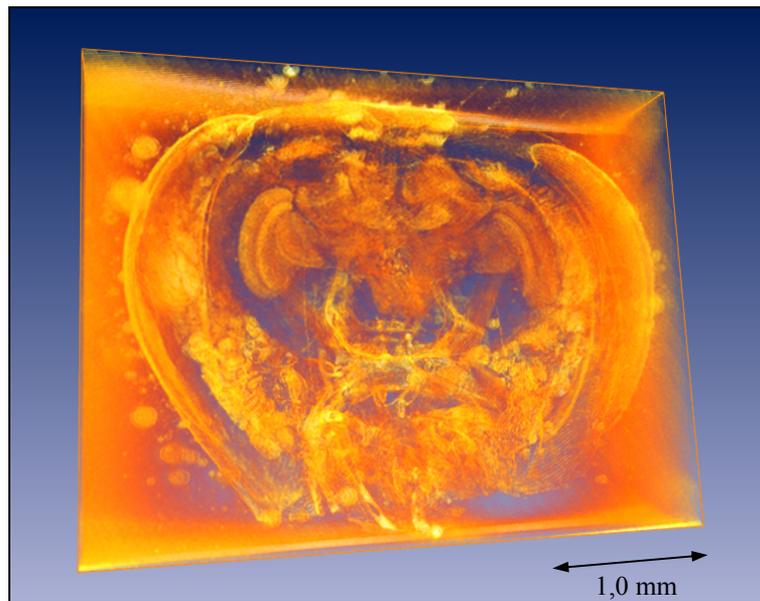


Abbildung 5-9: 'Volume Rendering' des Bienehirns. Diese semi-transparente Darstellung eines kompletten 3D Datensatzes erlaubt eine gute Einschätzung der Stereo-Geometrie des Bienehirns. Außerdem sind feine Grenzen, wie z.B. zwischen den beiden halbmondförmigen Substrukturen der Medullae hier deutlich sichtbar.

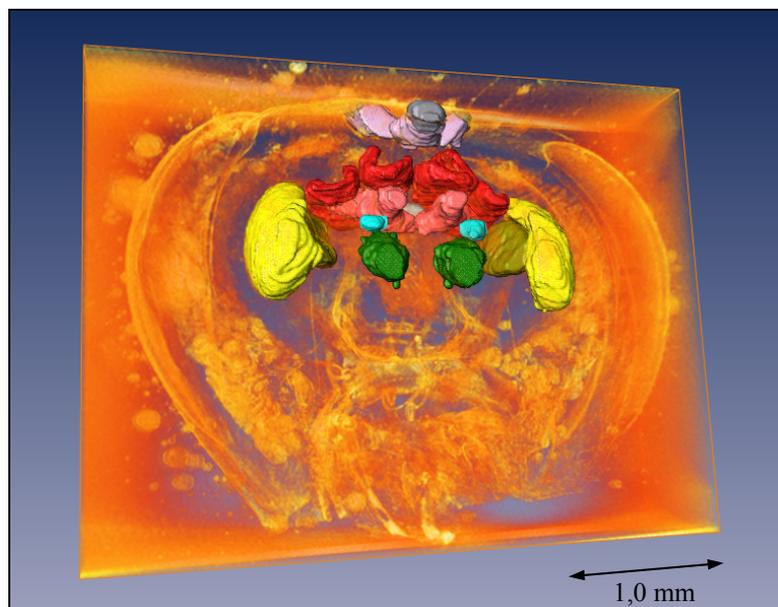
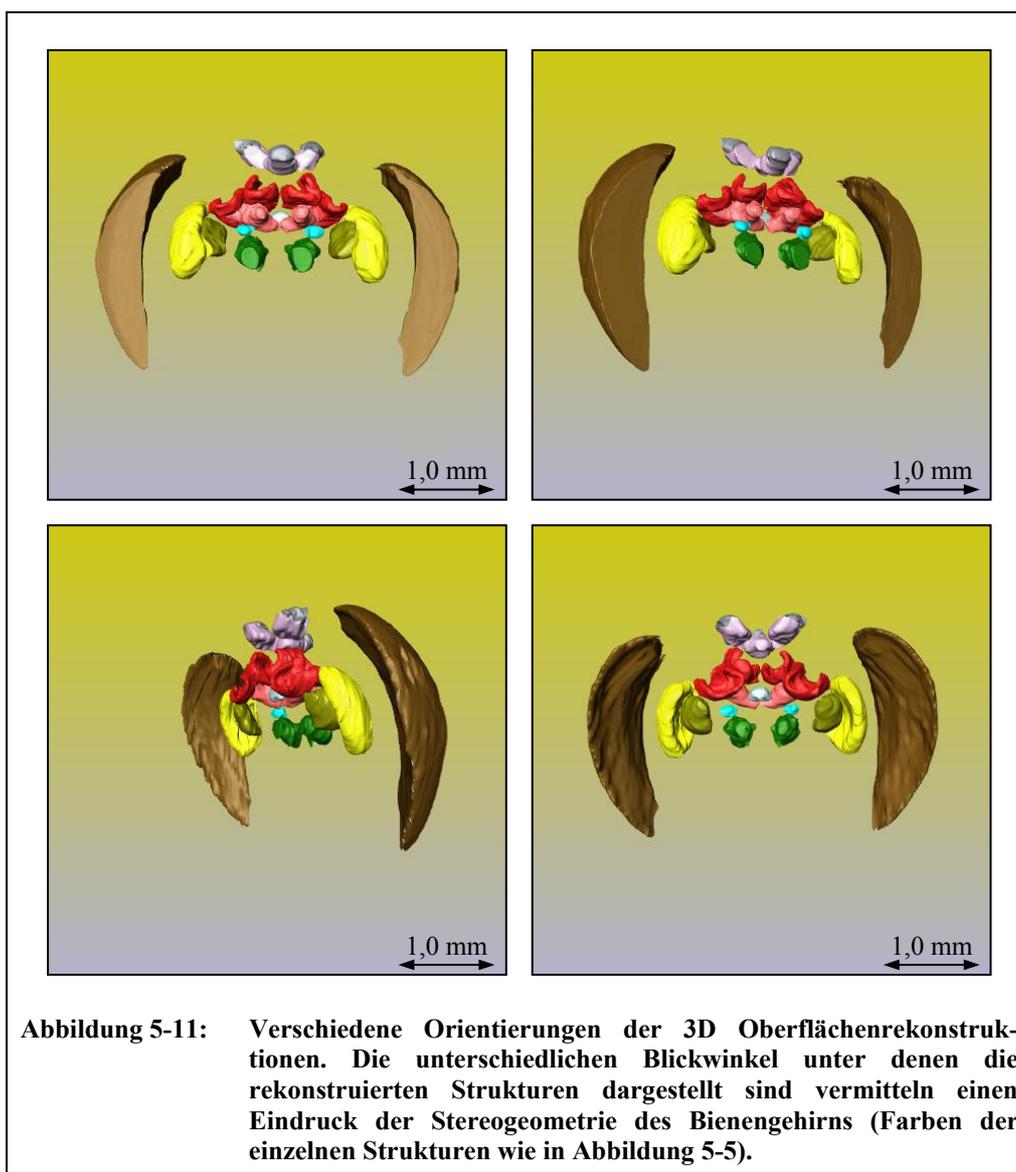


Abbildung 5-10: Überlagerung von Oberflächenrekonstruktionen und 'Volume Rendering'. Diese überlagerte Darstellung vermittelt einen sehr guten Eindruck der Position und Ausrichtung des Gehirns in der Kopfkapsel, auch wenn die deckend dargestellten Strukturen die hinter ihnen liegenden Bereiche zum Teil verdecken.



5.1.4.3 Volumenberechnungen

Die auf Basis der segmentierten Strukturen berechneten Werte der Volumina der einzelnen Gehirnbereiche sind in Tabelle 5-2 als Mittelwerte der beiden Hemisphären angegeben. Der relative Fehler in den berechneten Werten der einzelnen Strukturen vor dem Mitteln ist mit $\pm 10\%$ abgeschätzt worden. Er ergab sich aus dem intrinsischen Fehler der NMR-Messung und der manuellen Durchführung der Segmentierung. Der intrinsische Fehler der NMR-Messungen ist kleiner als $\pm 4\%$ und wurde durch Messungen mit einem Auflösungsphantom bestimmt. Er ist eine Folge von nicht exakt linearen Magnetfeld-Gradienten und Partial-Volume-Effekten aufgrund des endlichen Auflösungsvermögens.

Der Fehler der manuellen Segmentierung wurde empirisch bestimmt und liegt bei $\pm 5\%$. Er setzt sich zusammen aus einem Unterschied von weniger als $\pm 2,5\%$ zwischen den Ergebnissen zweier Personen, die die NMR-Daten unabhängig voneinander segmentierten

und einer relativen Schwankungsbreite von ebenfalls weniger als $\pm 2,5\%$, die berechnet wurde, indem ein Segmentator die rechte Lobula 22 mal segmentierte. Die rechte Lobula wurde gewählt, da es sich bei ihr um eine Struktur mittlerer Größe handelt.

Da die Standardabweichungen des Mittelwertes der Volumina von 19 manuell segmentierten Datensätzen von verschiedenen Bienen, die mit der Methode der konfokalen Lasermikroskopie mit einer Auflösung von $4,0 \times 4,0 \times 8,0 \mu\text{m}^3$ akquiriert worden waren [Bra-03], zu relativen Fehlern im Bereich von $\pm 15\%$ führten, wurde geschlossen, dass die intrinsische Genauigkeit der NMR-Messungen mehr als ausreichend war, um eine im Rahmen des abgeschätzten Fehlers exakte Segmentierung durchzuführen.

Die Oberflächen der einzelnen Gehirnstrukturen wurden zwar bestimmt, sie spielen hier jedoch nur eine untergeordnete Rolle und sind auch in der Literatur nicht beschrieben, weil bei Insekten im Gegensatz zu Säugetieren die Größe der Oberfläche bzw. das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen einer Gehirnstruktur nichts über die Komplexität dieser Gehirnstruktur und die Komplexität der von ihr verarbeiteten Daten und wahrgenommenen Kontrollaufgaben aussagt. Zudem sind die rekonstruierten Oberflächen schwer exakt zu quantifizieren, da sie stark vom Glättungsgrad abhängen, der beim Berechnen der Oberflächen verwendet wird.

Neuropil	Volumen NMR [$10^7 \mu\text{m}^3$]	Volumen kLM [$10^7 \mu\text{m}^3$]	Verhältnis Volumen NMR/kLM
Medulla	5,99 \pm 0,42	5,73 \pm 0,62	1,05
Lobula	1,95 \pm 0,14	1,65 \pm 0,14	1,18
Antennal Lobus	1,40 \pm 0,10	1,08 \pm 0,15	1,29
medianer Calyx	1,52 \pm 0,11	1,24 \pm 0,13	1,23
lateraler Calyx	1,76 \pm 0,13	1,35 \pm 0,14	1,30
Pilzkörper ohne Calyces	1,30 \pm 0,09	1,58 \pm 0,15	0,82

Tabelle 5-2: Berechnete Volumina der in den NMR-Bildern segmentierten Gehirnstrukturen und Vergleich dieser Werte mit den Ergebnissen der konfokalen Lasermikroskopie (kLM) [Bra-03]. Die Werte sind jeweils über beide Hemisphären des Bienehirns gemittelt.

5.1.4.4 Vergleich mit der konfokalen Lasermikroskopie

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie an Bienen gleichen Alters aus demselben Bienenvolk ergeben sich bei den NMR-Messungen für fast alle Gehirnstrukturen größere Volumina. Je nach Struktur sind die Volumina um 4,5 - 30,0 % größer als bei der konfokalen Lasermikroskopie (vgl. Tabelle 5-2). Der Median der Werte liegt bei 22,9 %. Einzig das besonders dichte Gewebe im unteren Teil der Pilzkörper (ohne Calyces) besitzt kleinere Werte. Diese könnten allerdings auch auf Fehler bei der Segmentierung der NMR-Bilder oder der Bilder der konfokalen Lasermikroskopie zurückzuführen sein. Dieses Gewebe erscheint in den Bildern zwar meistens dunkler als seine

Umgebung, es ist jedoch stark verzweigt und deswegen beim Segmentieren nicht immer eindeutig gegenüber seiner Umgebung abgrenzbar.

Die mittels NMR-Mikroskopie bestimmten größeren Volumina ergeben sich zum einen aus der geringeren Schrumpfung des Gewebes während der Fixierung des Gehirns in der unbeschädigten Kopfkapsel, in der das Bienenhirn unter einer relativ großen Zugspannung steht, und zum anderen aus der Schrumpfung des Gehirns nach der Fixierung, bei dessen Präparation außerhalb der Kopfkapsel für die Messungen mit der konfokalen Lasermikroskopie. Die bei dieser Präparation auftretende Schrumpfung des Gehirns ist eine direkte Folge der Dehydrierung des Gewebes.

Volumenunterschiede zwischen einzelnen Individuen eines Bienenvolkes tragen ebenfalls zu den unterschiedlichen Ergebnissen von konfokaler Lasermikroskopie und NMR-Mikroskopie bei. Da sich die durch Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen der einzelnen Strukturen definierten Bereiche aber bei den meisten Strukturen nur sehr wenig bzw. gar nicht überlappen, lassen sich die mit der NMR-Mikroskopie gemessenen größeren Volumina nicht ausschließlich durch inter-individuelle Volumenunterschiede erklären. Zudem ist der Größenspolymorphismus bei Bienen nicht besonders ausgeprägt [Ryb-01].

Außerdem wird die Stereogeometrie des Gehirns durch das Herauspräparieren des Gehirns aus der Kopfkapsel der Biene verändert. Das ist in Abbildung 5-12 deutlich zu erkennen, in der die Oberflächenrekonstruktionen der Messungen der konfokalen Lasermikroskopie mit denen der NMR-Mikroskopie verglichen werden. Im Detail zeigt die Abbildung, dass die verschiedenen Teilbereiche des herauspräparierten Gehirns viel enger beieinander liegen und nicht mehr auseinandergezogen sind, wie sie es zuvor im Kopf der Biene waren.

Medulla und Lobula zum Beispiel sind in den NMR-Bildern um mehr als ihre halbe Dicke weiter nach außen gekippt als in den Bildern der konfokalen Lasermikroskopie. Besonders die ventralen (unteren) Enden der beiden Strukturen befinden sich in den NMR-Bildern deutlich näher an den Komplexaugen. Außerdem liegen die Antennal-Loben in den NMR-Bildern näher am vorderen Teil der Kopfkapsel und die Calyces befinden sich in einer aufrechteren Position als in den Bildern der konfokalen Lasermikroskopie.

In der in Abbildung 5-12 dargestellten Überlagerung der beiden dreidimensionalen Datensätze kann man z.B. eine lineare Verschiebung der linken Medulla um 130 μm messen. Dieser Wert ergibt sich nicht allein aus der Verschiebung der Medulla gegenüber dem Gehirn als Ganzes, sondern stellt vielmehr die Summe dar, aus den Verschiebungen der näher am Zentrum des Gehirns liegenden Strukturen und der Verschiebung der Medulla selbst. Für die rechte Lobula ergibt sich so sogar eine lineare Verschiebung von 160 μm .

Auch wenn die durch das Herauspräparieren des Gehirns aus der Kopfkapsel hervorgerufenen Deformationen des Gehirns nicht direkt auszuwerten sind, erreichen sie doch knapp 10 % der Gesamtausdehnung des Gehirns und sind daher auf keinen Fall vernachlässigbar.

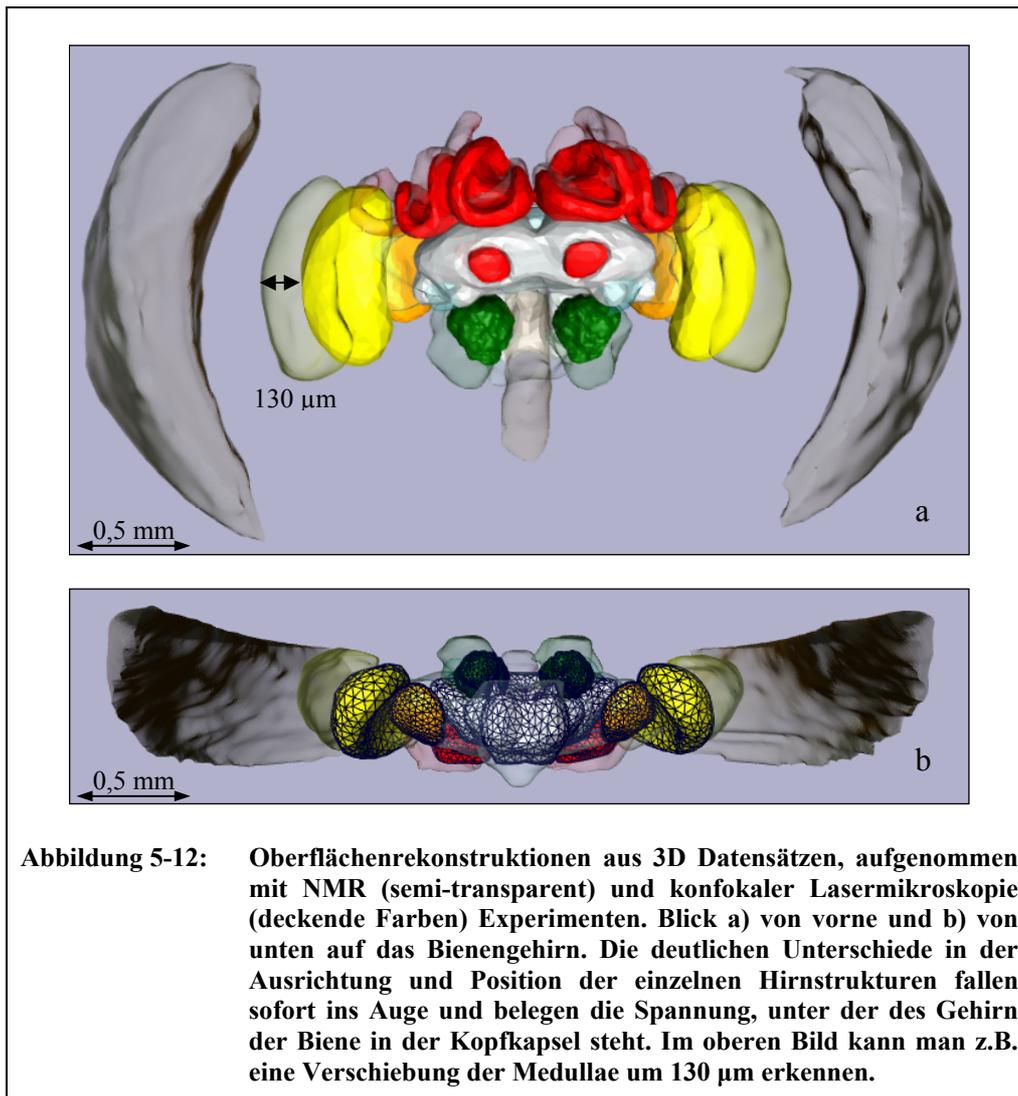


Abbildung 5-12: Oberflächenrekonstruktionen aus 3D Datensätzen, aufgenommen mit NMR (semi-transparent) und konfokaler Lasermikroskopie (deckende Farben) Experimenten. Blick a) von vorne und b) von unten auf das Bienehirn. Die deutlichen Unterschiede in der Ausrichtung und Position der einzelnen Hirnstrukturen fallen sofort ins Auge und belegen die Spannung, unter der das Gehirn der Biene in der Kopfkapsel steht. Im oberen Bild kann man z.B. eine Verschiebung der Medullae um 130 µm erkennen.

5.1.4.5 Ursprung des Kontrastes in den NMR-Bildern

Neben der Akquisition anatomischer Bilder und der Berechnung von Oberflächenrekonstruktionen der verschiedenen Gehirnstrukturen, wurde der spezifische Kontrast dieser Strukturen in den NMR-Bildern untersucht. Zwei verschiedene Gewebe sind in den NMR-Bildern genau dann unterscheidbar, wenn genügend Kontrast zwischen ihnen vorhanden ist. Dafür ist es notwendig, dass sich die beiden Gewebe in mindestens einem NMR-Parameter unterscheiden oder, dass eine Grenzfläche zwischen den Geweben existiert, die aufgrund ihrer abweichenden Werte der NMR-Parameter eine Abgrenzung der beiden Gewebe voneinander ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Spin-Dichte des Gewebes und der beiden Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 auf den Kontrast in den Bildern untersucht. Dazu wurden räumlich aufgelöste T_1 - und T_2 -Parameterkarten sowie eine Karte der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 als Maß für die Spin-Dichte des Gewebes akquiriert.

Die in Abbildung 5-13 dargestellten NMR-Parameterkarten zeigen vor allem starke M_0 -Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen. Außerdem können verschiedene Gewebe auch gut anhand ihrer T_1 -Werte voneinander abgegrenzt werden. Allerdings sind nur sehr geringe Unterschiede in den T_2 -Werten des gesamten Bienenhirns beobachtbar.

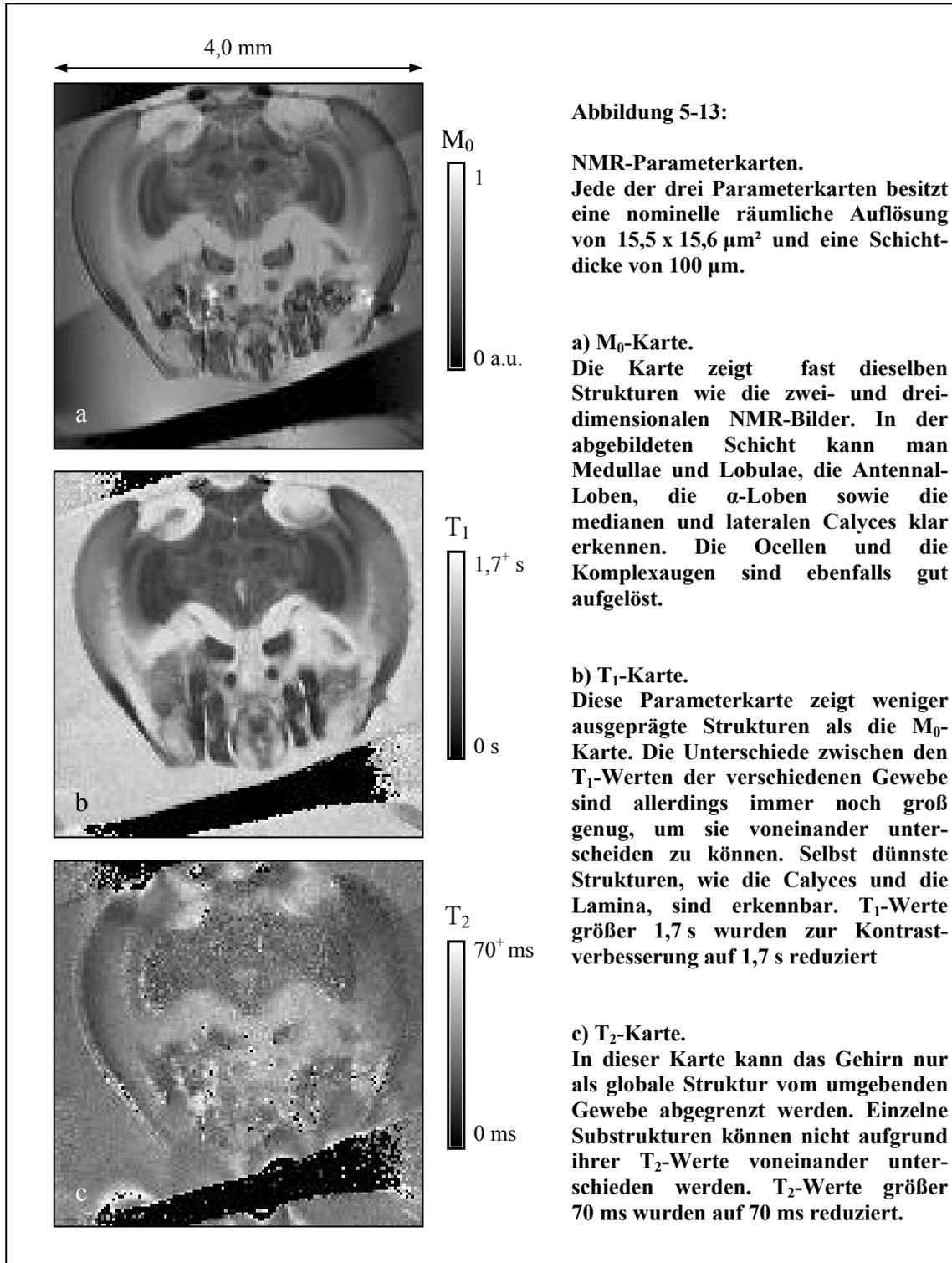
In den M_0 -Karten ist eine große Anzahl der kleinen Gehirnstrukturen detailliert zu erkennen (vgl. Abbildung 5-13a). Sie erscheinen in den M_0 -Karten so, wie sie auch in den zwei- und dreidimensionalen NMR-Bildern zu sehen sind. Wieder kann man Medulla und Lobula voneinander unterscheiden, die dünnen Calyces sind klar erkennbar, wie auch die Antennal-Loben und die α -Loben. Es sind auch wieder die stützenden Chitin-Strukturen (vor allem das Tentorium, das das Gehirn von der Mundregion separiert), die Komplexaugen und die Ocellen zu sehen. In hier nicht abgebildeten Schichten kann man daneben noch die Pedunkel und die β -Loben sehen.

Der Kontrast in den T_1 -Karten ist nicht so stark ausgeprägt wie der Kontrast in den M_0 -Karten, aber auch hier kann man die Hauptstrukturen des Bienenhirns erkennen und voneinander unterscheiden. Sogar das dünne strahlenförmig angeordnete Gewebe der Lamina, das die Komplexaugen mit den optischen Loben verbindet, ist in den T_1 -Karten zu sehen (siehe Abbildung 5-13b).

Im Gegensatz dazu zeigen die T_2 -Karten das gesamte Gehirn als eine einheitliche Struktur, die sich deutlich von den Komplexaugen und den chitinösen Strukturen unterscheiden lässt. Substrukturen des Bienenhirns sind in den T_2 -Karten jedoch nicht auszumachen (vgl. Abbildung 5-13c).

Aus den aufgenommenen NMR-Parameterkarten geht außerdem hervor, dass in dichtem Gewebe, wie es z.B. in den Pedunkeln zu finden ist, zwar eine schnelle Spin-Gitter-Relaxation stattfindet, dieses Gewebe jedoch trotzdem nur ein geringes Signal liefert. Da das detektierte Gesamtsignal neben den ^1H -Kernen des Gewebes vor allem auch von den ^1H -Kernen in der 30 %igen-Ethanol-Aufbewahrungslösung herrührt und der Anteil dieser Lösung in dichtem Gewebe wie den Pedunkeln vergleichsweise gering ist, weisen die M_0 -Karten in diesen Geweben geringere Werte auf. Da der durch M_0 -Unterschiede bedingte Anteil des Kontrastes in den Bildern deutlich überwiegt, erscheinen dichte Strukturen in den Bildern dunkel.

Neben den hier untersuchten NMR-Parametern könnte vor allem auch die Diffusion einen Einfluss auf den Kontrast in den NMR-Bildern haben. Eine Untersuchung dieses Einflusses wurde von F. Schaupp im Rahmen seiner Diplomarbeit vorgenommen. Allerdings konnte er keinen signifikanten Effekt feststellen [Sch-01].



Berücksichtigt man die in Gleichungen (2-20) beschriebene Abhängigkeit der Signalintensität beim Spin-Echo von den Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2

$$S \propto S_0 \left(1 - e^{-T_R/T_1}\right) e^{-T_E/T_2} \quad (5-1)$$

und die aus Gleichung (2-22) folgende indirekte Proportionalität des SNRs zur spektralen Bandbreite der Akquisition $N_R \Delta\nu$,

$$SNR \propto \frac{1}{\sqrt{N_R \Delta\nu}} \quad (5-2)$$

so wird insgesamt die ursprünglich am Spektrometer bestimmte 'beste' Kombination aus Echozeit T_E , Repetitionszeit T_R und Bandbreite $N_R \Delta\nu$ bestätigt.

Bei den beschriebenen Experimenten wurde für die Akquisition eine geringe spektrale Bandbreite von 20,8 kHz gewählt, um ein möglichst großes SNR zu gewährleisten. In Kombination mit der für die hohe räumliche Auflösung notwendigen großen Anzahl von Bildpunkten in Leserichtung $N_R = 256$ ergeben sich deswegen bei den verwendeten Experimenten minimale Echozeiten im Bereich von 14 bis 17 ms. Diese langen Echozeiten führen zwar zu einem kleinen Signalverlust aufgrund von T_2 -Relaxation zwischen Anregung und Akquisition, den Kontrast in den Bildern beeinflussen sie allerdings nicht, da die T_2 -Zeiten in allen Bereichen des Gehirns relativ ähnlich sind.

Bei der Repetitionszeit T_R wurde mit 1,5 s ein Kompromiss gefunden zwischen einer möglichst ausrelaxierten Probe und der T_1 -Wichtung der Bilder. Die verwendete Repetitionszeit liegt für die meisten Bildpunkte im Gehirn der Biene gerade zwischen dem ein- und dem zweifachen der T_1 -Werte dieser Bildpunkte. Zum einen kann somit nach jeder Akquisition wieder ein Großteil der Longitudinalmagnetisierung aufgebaut werden, um ein ausreichend starkes Signal aus jedem Bildpunkt zu erhalten und den dominierenden M_0 -Kontrast auszunutzen, zum anderen ist die Probe nach dieser Zeit noch nicht völlig ausrelaxiert, so dass in den Bildern zu einem gewissen Anteil auch ein durch T_1 -Unterschiede bedingter Kontrast zu sehen ist.

5.2 Die lebende Hummel

Nachdem die NMR-Experimente an fixierten Bienenköpfen zu detailreichen Bildern mit hoher räumlicher Auflösung geführt hatten, stellte sich die Frage, welche Bilder von nicht fixierten Gehirnen zu erhalten wären. Allerdings waren die Köpfe der lebenden Bienen zu breit, um in die Solenoid-Spule zu passen und im Gegensatz zu den fixierten Proben, konnten sie auch nicht seitlich in die Spule geschoben werden. Bei im Streufeld der Spule aufgenommenen Bildern wurde jeweils nur der vordere Teil des Gehirns abgebildet. Deswegen wurde zur Akquisition von *in-vivo* NMR-Bildern des Insektengehirns anstatt einer Biene eine lebende Hummel verwendet, deren Kopf klein genug war, um in die Spule zu passen.

5.2.1 Material und Methoden

Die Messungen wurden mit der in Kapitel 5.1.2.2 beschriebenen Solenoid-Spule am AMX 500 Spektrometer durchgeführt. Der Kopf der untersuchten lebenden Hummel (*Bombus terrestris*) war nur geringfügig kleiner als die Köpfe der fixierten Bienen und passte deswegen exakt in die Spule. Ansonsten ist die Anatomie der Hummel und vor allem die Struktur ihres Gehirns derjenigen der Biene sehr ähnlich [Ryb-01].

Zur Positionierung des lebenden Insekts in der Spule wurde eine neue Probenhalterung angefertigt, bei der auf einer Seite auf Höhe der Spule ein an beiden Enden offenes PVC-Röhrchen so eingesteckt werden konnte, dass dieses um seine Längsachse frei drehbar war und in jedem beliebigen Abstand zur Spule fixiert werden konnte (siehe Abbildung 5-14c). Um den Kopf der Hummel stabil über die gesamte Messdauer hinweg in der Spule platzieren zu können, wurde er in ein mit flüssigem Agar-Agar gefülltes PVC-Röhrchen gesteckt, das einen Innendurchmesser von 3,9 mm und einen Außendurchmesser von 4,0 mm besaß und somit gerade in die Spule passte (vgl. Abbildung 5-14a,c). Da der Großteil der Atmung bei der Hummel über Tracheenöffnungen im Rumpf erfolgt, war die Atmung der Hummel während der Messung nicht wesentlich eingeschränkt [Ryb-01]. Nach dem Erkalten des Agar-Agars war der Kopf der Hummel zwar fest mit dem PVC-Röhrchen verbunden, die Hummel konnte ihren Kopf allerdings immer noch zusammen mit dem PVC-Röhrchen bewegen. Um die Bewegungsmöglichkeiten der Hummel während der NMR-Messung weiter einzuschränken, wurde die Hummel in das größere PVC-Röhrchen gelegt und dort am Rumpf mit einem dünnen Klebestreifen befestigt (vgl. Abbildung 5-14b). Der Kopf der Hummel mit dem kleineren PVC-Röhrchen ragte dabei aus dem größeren PVC-Röhrchen heraus. Anschließend wurde der Kopf der Hummel mit Hilfe der beiden PVC-Röhrchen so gut wie möglich im Zentrum der Spule positioniert und für die Dauer der Messung fixiert. Außerdem wurden Spule, 'Patientenliege' und Hummel während der gesamten Messzeit auf 8 °C gekühlt. Die Hummel fällt bei einer so niedrigen Temperatur in eine Kältestarre und bewegte sich deswegen während der gesamten Messdauer so gut wie nicht mehr [Ryb-01].

Neben der Fixierung des Kopfes der Hummel in der Spule, diente der den Kopf umgebende Agar-Agar auch dazu, den starken Suszeptibilitätssprung an der Grenze zwischen Luft und Chitin zu verkleinern, um störende Artefakte in den Bildern zu verringern bzw. zu vermeiden.

Zur NMR-Bildgebung wurden die bei der fixierten Biene ebenfalls verwendeten zwei- und dreidimensionalen Spin-Echo-Experimente (vgl. Kapitel 3.2.1) mit einem FOV von 4,0 x 4,0 mm² bei einer nominellen räumlichen Auflösung von 31,3 x 31,3 µm² und einer Schichtdicke bzw. nominellen Auflösung in der dritten Raumdimension von 100 µm eingesetzt. Die verwendeten Echozeiten T_E lagen im Bereich von 4,3 – 15 ms, wobei bei Echozeiten von 8,7 ms der beste Kontrast in den Bildern zu beobachten war. Die ausgewählte Repetitionszeit T_R betrug 1,0 s, um möglichst viele Messungen mit unterschiedlichen experimentellen Parametern in möglichst kurzer Zeit durchführen zu können. Die Akquisition eines zweidimensionalen Spin-Echo-Bildes dauerte bei zwei Mittelungen knapp 4,5 Minuten. Ein dreidimensionaler Datensatz konnte mit vier Mittelungen und einer Anregungs-

schichtdicke von 3,3 mm in weniger als 4 ¾ Stunden akquiriert werden. Bei der Auswertung der Messdaten wurde ein Zero-Filling mit dem Faktor zwei in allen Raumrichtungen durchgeführt.

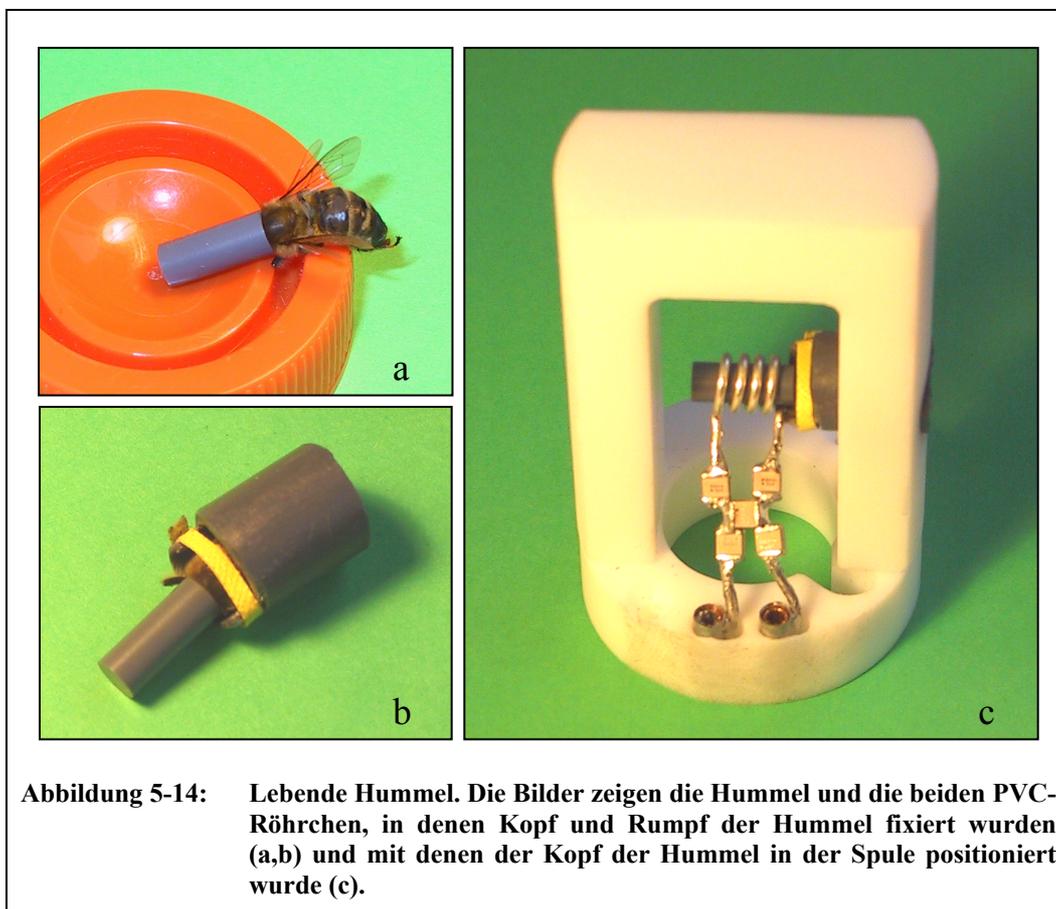


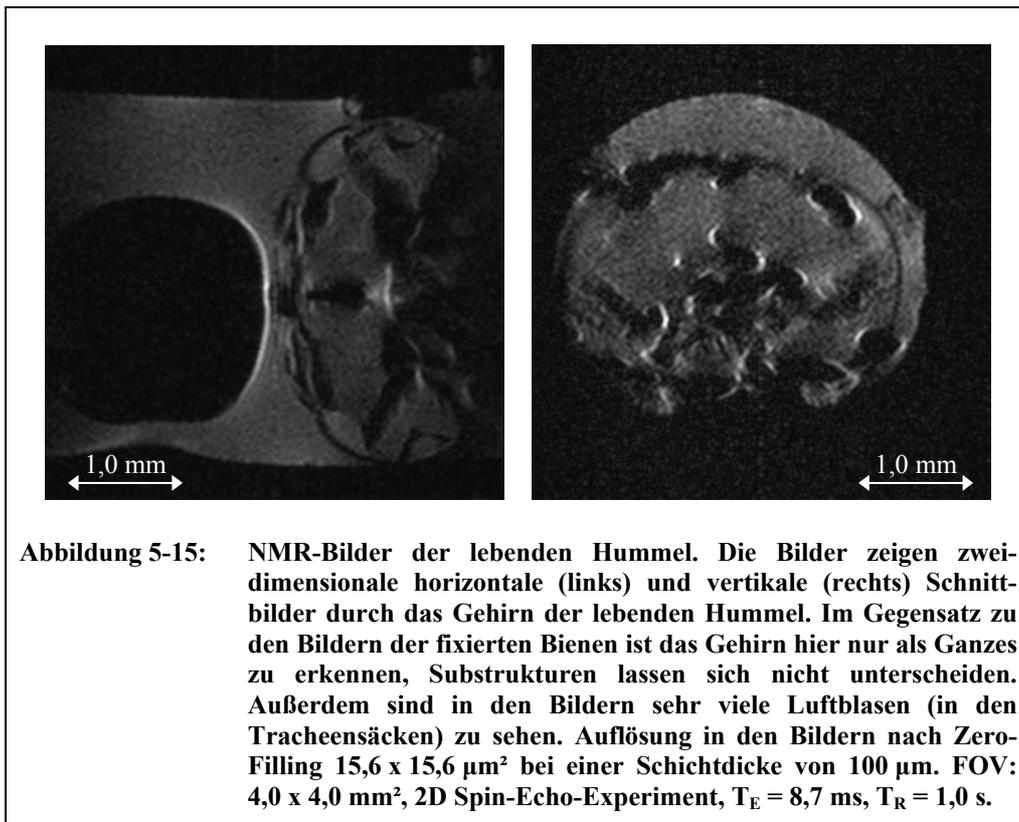
Abbildung 5-14: Lebende Hummel. Die Bilder zeigen die Hummel und die beiden PVC-Röhrchen, in denen Kopf und Rumpf der Hummel fixiert wurden (a,b) und mit denen der Kopf der Hummel in der Spule positioniert wurde (c).

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Als grundlegendes Ergebnis ist festzuhalten, dass die untersuchte Hummel die gesamte Messzeit von 8 Stunden ohne Beeinträchtigungen überstand und nach den Messungen noch in der Lage war zu fliegen.

Abbildung 5-15 zeigt zweidimensionale NMR-Schnittbilder der lebenden Hummel. Im linken Bild ist ein horizontaler Schnitt durch den Kopf der Hummel abgebildet, im rechten Bild ein vertikaler Schnitt. Das Gehirn der Hummel ist im Gegensatz zu den Bildern der fixierten Bienen nur als Ganzes zu erkennen. Substrukturen wie Medulla und Lobula, die in den Bildern der fixierten Bienen deutlich zu sehen waren, sind hier nur zu erahnen.

Trotzdem ist die Qualität dieser Bilder bzw. entsprechender Bilder lebender Bienen ausreichend, um z.B. den Grad der Schrumpfung und Deformation des Bienehirns während der Fixierung bestimmen zu können.



In den Bildern sind außerdem eine Reihe von Lufteinschlüssen verschiedener Größen zu erkennen. Diese führen leider zu störenden Artefakten, die einzelne Gehirnbereiche in den Bildern überdecken und deswegen zu einem Informationsverlust führen. Andererseits weisen sie aber auch darauf hin, dass die Hummel auch während der Messung atmete und sich somit immer genügend Luft in den Tracheensäcken der Hummel befand, um ihr Überleben zu gewährleisten.

Die hier gezeigten Bilder mit ihrem nur geringen Grad an anatomischen Details befinden sich in gutem Einklang mit den kürzlich veröffentlichten Bildern von Jasanoff et al. [Jas-02], die bei ihren NMR-Messungen an lebenden Schmeißfliegen ebenfalls nur das Gehirn der Fliegen als Ganzes klar erkennbar abbilden konnten. Einzelne große Strukturen, wie die Medulla und die Lobula, wurden von den Autoren zwar durch den Vergleich mit histologischen Schnitten identifiziert, sind jedoch in den entsprechenden NMR-Bildern trotz speziell an die lebenden Fliegen angepasster NMR-Spule kaum besser voneinander zu unterscheiden, als es in den in Abbildung 5-15 gezeigten Bildern der lebenden Hummel der Fall ist.

5.3 Die Drosophila

Zum Abschluss der NMR-Messungen an Insekten soll ein Kurzprojekt vorgestellt werden, bei dem die Anatomie und das Gehirn der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) per NMR-

Mikroskopie visualisiert werden sollten. Die Drosophila ist in etwa so groß wie das Gehirn einer Biene und sollte in fixiertem Zustand untersucht werden.

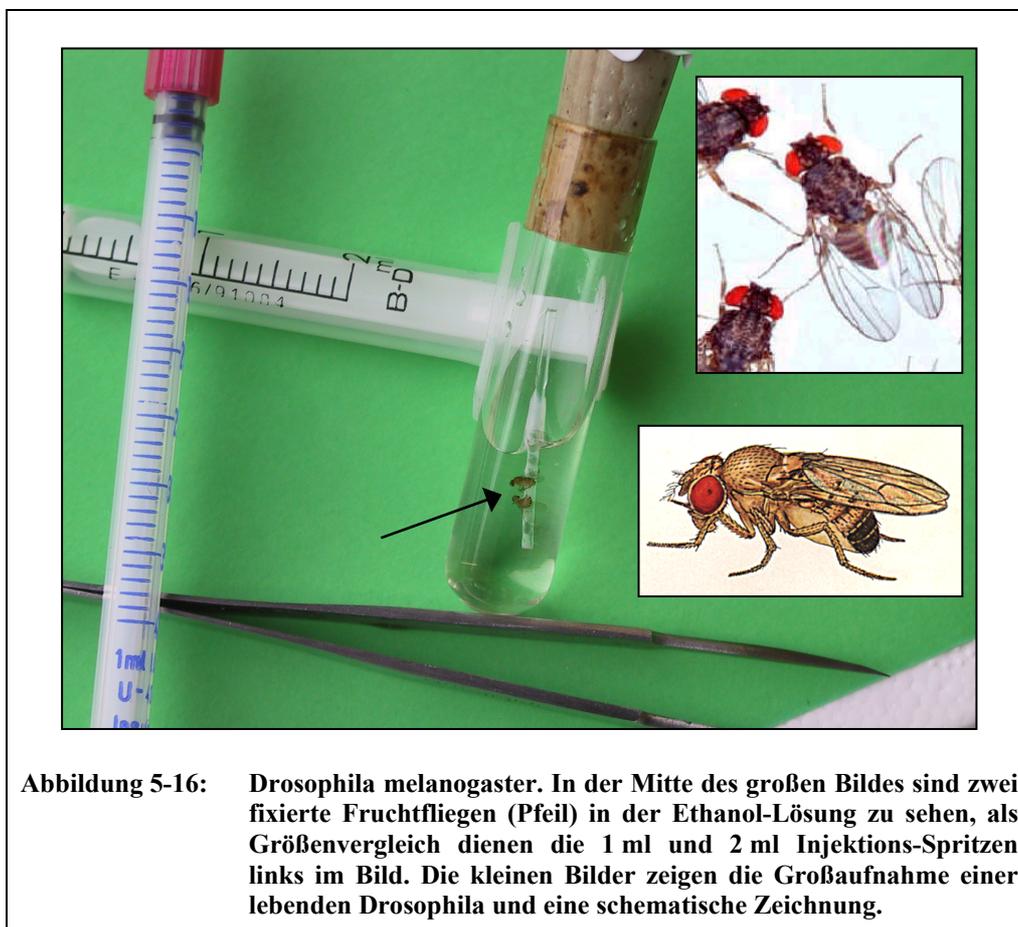


Abbildung 5-16: *Drosophila melanogaster*. In der Mitte des großen Bildes sind zwei fixierte Fruchtfliegen (Pfeil) in der Ethanol-Lösung zu sehen, als Größenvergleich dienen die 1 ml und 2 ml Injektions-Spritzen links im Bild. Die kleinen Bilder zeigen die Großaufnahme einer lebenden *Drosophila* und eine schematische Zeichnung.

5.3.1 Material und Methoden

Zur Fixierung wurde die ganze Fruchtfliege über Nacht in 4 %ige-Formalin-Lösung getaucht. Um das Eindringen des Formalins zu erleichtern, war zuvor der Rüssel der Fruchtfliege entfernt worden. Nach dem Fixieren der *Drosophila* wurde die Formalin-Lösung gegen 30 %ige-Ethanol-Lösung ausgetauscht.

Aufgrund der geringen Größe der Fruchtfliege wurde für die Messungen eine empfindlichere Solenoid-Spule mit einem Innendurchmesser von 2,0 mm für das AMX 500 Spektrometer gebaut. Bei 500 MHz besaß diese Spule in beladenem Zustand eine Güte von 154, die – wie bei Mikroskopiespulen zu erwarten – bei Entfernung der Beladung nur geringfügig anstieg. Bei einer Abschwächung von 15 dB (maximale Sendeleistung: 50 W) betrug die 180°-Pulslänge 13,5 μ s. Für die Messungen wurde die *Drosophila* mit der Ethanol-Lösung in eine NMR-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm und einem Außendurchmesser von 2,0 mm überführt.

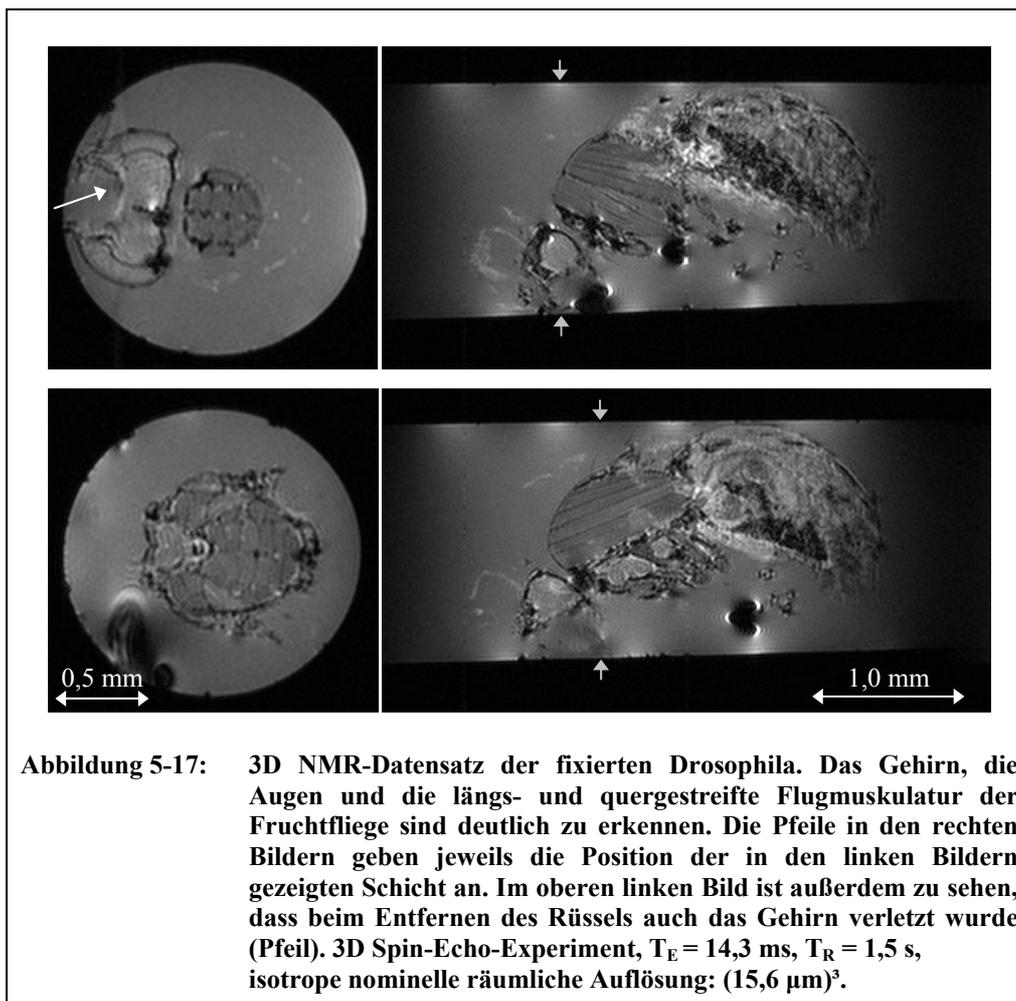
Zur Orientierung in der Fruchtfliege wurde wie bei der Biene das in Kapitel 3.2.1 beschriebene zweidimensionale Spin-Echo-Experiment mit einer nominellen räumlichen Auflösung von $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ und einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$ verwendet. Die eigentliche Messung wurde mit einer isotropen nominellen räumlichen Auflösung von $(15,6 \mu\text{m})^3$ und dem ebenfalls in Kapitel 3.2.1 beschriebenen dreidimensionalen Spin-Echo-Experiment durchgeführt (FOV: $4,0 \times 4,0 \times 2,0 \text{ mm}^3$). Die Echozeit T_E betrug $14,3 \text{ ms}$ und die Repetitionszeit T_R $1,5 \text{ s}$. Bei vier Mittelungen ergab sich somit eine Messzeit von knapp $56,5 \text{ Stunden}$. Aufgrund der geringen Drift des Magnetfeldes am AMX 500 Spektrometer von nur ca. 3 Hz während der gesamten Messzeit, stellte diese lange Messzeit kein Problem dar. Bei der Auswertung der Messdaten wurde wie zuvor ein Zero-Filling mit dem Faktor zwei verwendet.

5.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die in Abbildung 5-17 gezeigten NMR-Bilder der fixierten Drosophila weisen einen guten Kontrast auf und zeigen deutlich die Grobanatomie der Fruchtfliege, die sich in Kopf, Rumpf, Hinterleib und Beine aufgliedern lässt. Im Kopf ist das Gehirn als globale Struktur zu erkennen, in einigen Bildern kann man sogar sehen, dass beim Entfernen des Rüssels auch ein Teil des Gehirns mit entfernt worden ist (vgl. Abbildung 5-17, Bild oben links). Neben dem Gehirn im Zentrum des Kopfes sind in den Bildern zu beiden Seiten des Kopfes die Augen der Fruchtfliege klar zu erkennen.

Im Rumpf der Drosophila kann man in verschiedenen Schichten die längs- und quergestreifte Flugmuskulatur deutlich ausmachen und vom umgebenden Gewebe abgrenzen. Einzelne Muskelbündel erscheinen dabei als ausgedehnte plattenartige Strukturen.

Außerdem wird in den Bildern deutlich, dass der Hinterleib der Fruchtfliege aus erheblich weicherem Gewebe besteht als Rumpf und Kopf, die von einer harten Chitinhülle umgeben sind.



5.4 Zusammenfassung

Die gezeigten NMR-Bilder der verschiedenen Insekten belegen eindeutig, dass es möglich ist, anatomische Strukturen innerhalb der intakten Chitinhülle NMR-mikroskopisch mit gutem Kontrast räumlich hochaufgelöst abzubilden.

Bei der fixierten Biene konnten feinste Strukturen visualisiert werden, deren Größe nur knapp oberhalb des nominellen räumlichen Auflösungsvermögens der Experimente lag. Die einzelnen Substrukturen des Gehirns waren dabei so deutlich voneinander abgegrenzt, dass sie manuell segmentiert werden konnten, um anschließend dreidimensionale Oberflächenrekonstruktionen und die Volumina der Strukturen zu berechnen. Damit war es hier erstmalig möglich, das Gehirn der Biene in seiner natürlichen, aufgespannten Form in der intakten Kopfkapsel der Biene abzubilden. Neben detaillierten Informationen über Form und Volumen der einzelnen Gehirnbereiche konnten somit auch Informationen über die Ausrichtung der Strukturen zueinander und zur Kopfkapsel gewonnen werden.

Durch das Fixieren des Gehirns in der intakten Kopfkapsel konnte eine nur geringe Schrumpfung des Gehirns erreicht werden. Zudem war es zur Durchführung der NMR-Messungen nicht notwendig, das Gehirn aus der Kopfkapsel zu entnehmen, so dass die dabei zwangsläufig auftretenden Deformationen gänzlich vermieden werden konnten. Auch auf die für andere Messmethoden notwendige zusätzliche Präparation des Gehirns außerhalb der Kopfkapsel konnte verzichtet werden, wodurch die dabei auftretende weitere Schrumpfung des Gewebes ebenfalls verhindert werden konnte. Im Vergleich zu Messungen mit der Methode der konfokalen Lasermikroskopie an aus der Kopfkapsel herauspräparierten, dehydrierten Gehirnen ergaben sich deswegen hier signifikant größere Volumina der meisten Gehirnareale und eine aufgeweitete und nach außen geneigte Stereogeometrie des gesamten Gehirns. Beide Aspekte sind zur Etablierung eines Standard-Modells des Bienenhirns in dessen natürlicher Form innerhalb der intakten Kopfkapsel von großer Bedeutung. Die bereits existierenden Daten von herauspräparierten Gehirnen, die mit anderen bildgebenden Verfahren gewonnen wurden, können durch nicht-affine Transformationsalgorithmen ebenfalls in das neue 'Standard-Bienenhirn' überführt werden.

Neben der Visualisierung der feinen Strukturen des Bienenhirns gelang auch eine NMR-mikroskopische Abbildung der Anatomie der *Drosophila*. Da die ganze Fruchtfliege jedoch nur ungefähr so groß ist wie das Gehirn der Biene, war es hier nur möglich, größere Strukturen wie das gesamte Gehirn oder die Flugmuskulatur zu visualisieren. Diese sind allerdings ebenfalls klar und deutlich in den NMR-Bildern zu erkennen und vom umgebenden Gewebe eindeutig zu unterscheiden.

Im Gegensatz zu den klar abgegrenzten Strukturen und Substrukturen bei den fixierten Proben, war es bei der lebenden Hummel lediglich möglich, große Bereiche wie das Gehirn als Ganzes vom umgebenden Gewebe abzugrenzen. Substrukturen in der Größenordnung des räumlichen Auflösungsvermögens waren nicht erkennbar. Trotzdem können die aufgenommenen Bilder sinnvoll verwendet werden, z.B. um den Grad der Schrumpfung des Gewebes bei der Fixierung zu quantifizieren. Zukünftige Untersuchungen der NMR-Parameter des Gehirns noch lebender Insekten müssen jedoch zeigen, ob es möglich ist, einen ausreichend ausgeprägten Kontrast in den NMR-Bildern zu erzielen, um das Insektenhirn mit seinen Substrukturen *in-vivo* hochaufgelöst abzubilden. Dieser Kontrast kann ggf. durch den Einsatz von NMR-Kontrastmitteln erzielt werden.

Die an der fixierten Biene akquirierten NMR-Parameterkarten haben gezeigt, dass der exzellente Kontrast in den Bildern hauptsächlich auf Unterschieden in der Spin-Dichte und der Spin-Gitter-Relaxation des Gewebes beruht. Die räumlich hochaufgelöste Visualisierung der feinen Strukturen des Bienenhirns war nur aufgrund dieses ausgeprägten Kontrastverhaltens möglich. Besonders die Calyces und die feine, strahlenförmig aufgebaute Lamina sind Beispiele für Strukturen in der Größenordnung des Auflösungsvermögens.

Die unterschiedlichen Kontraste in den Bildern fixierter und lebender Proben werfen die Frage auf, ob der Ursprung des akquirierten NMR-Signals hauptsächlich im Gewebe der Probe zu finden ist, oder ob das Signal hauptsächlich vom Fixans herrührt, und das NMR-Bild

somit eher eine Negativ-Aufnahme des untersuchten Gewebes darstellt. Diese Frage kann möglicherweise durch den Vergleich von NMR-Bildern einer einzelnen Probe vor und nach deren Fixierung beantwortet werden. Außerdem könnte die Durchführung der Fixierung frischen Gewebes im Magneten erlauben, den Fixationsprozess NMR-mikroskopisch zu beobachten und somit weitere Informationen zur Klärung der Frage nach dem Ursprung des NMR-Signals liefern.

Insgesamt ergibt sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen daher nicht nur, dass anatomische Strukturen in der intakten Chitinhülle mittels NMR kontrastreich und räumlich hochaufgelöst abgebildet werden können, sie führen vielmehr zu neuen, interessanten Fragestellungen für weitere NMR-Mikroskopie Projekte an Insekten.

6 NMR-Mikroskopie an Delphinen

Die zerstörungsfreie Visualisierung der Anatomie zweier prenataler Delphine ist das Thema dieses Kapitels. Bei den beiden untersuchten Exemplaren, einem Embryo und einem Fetus, handelt es sich um seltene Museumsstücke. In den akquirierten Bildern beider Tiere wird die prenatale Anatomie der Delphine detailliert wiedergegeben. Wegen des ausgeprägten Kontrastes in den Bildern konnten zahlreiche anatomische Strukturen bis hin zu den verschiedenen Kompartimenten des Gehirns bei beiden Delphinen manuell segmentiert werden. Mit Oberflächenrekonstruktionen dieser Strukturen konnten zudem die entsprechenden Volumina und Oberflächen berechnet werden.

Der Kontrast in den NMR-Bildern wurde anhand von NMR-Parameterkarten der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 , sowie der Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 untersucht. Wie bei der Biene sind Unterschiede in der Spin-Dichte des Gewebes ausschlaggebend.

Durch den Vergleich der akquirierten NMR-Bilder mit Bildern aus konventionellen histologischen Schnittserien konnte die Anwendbarkeit der NMR-Mikroskopie als alternative bzw. ergänzende Untersuchungsmethode neben der klassischen Histologie differenziert beschrieben werden.

6.1 Einleitung

Wale sind hervorragende und verspielte Schwimmer, die sehr gut an ihren ozeanischen Lebensraum angepasst sind. Gleichzeitig sind sie aber auch warmblütige Säugetiere, die gezwungen sind, regelmäßig an die Wasseroberfläche zurückzukehren, um zu atmen. Sie lassen sich in Barten- und Zahnwale unterteilen, die sich wiederum in mehrere Familien untergliedern. Die Delphine bilden eine Familie der Zahnwale, der auch die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten prenatalen Exemplare angehören.

Seit ihrer Rückkehr ins Wasser vor 55 Millionen Jahren unterschied sich die Evolution der Delphine und der Wale im allgemeinen deutlich von der Entwicklung ihrer Vorfahren unter den Landbewohnern, den Huftieren. In der Evolution der Wale fand eine lange Reihe von Veränderungen statt, die vor allem auch zu morphologischen Besonderheiten des Gehirns der Wale geführt haben, die man nicht bei anderen Säugetieren findet. So kann neben einer Vergrößerung des gesamten Gehirns auch ein allometrisches Wachstum (relatives Größenwachstum) und eine Spezialisierung bestimmter Gehirnareale, z.B. zur Sonarorientierung festgestellt werden.

Für adulte Wale sind diese und andere Besonderheiten ihrer Anatomie ausführlich in verschiedenen Publikationen beschrieben worden (Übersichtsartikel [Oel-00], NMR-Untersuchung [Mar-01]), über die prenatale Anatomie der Wale existieren bisher jedoch nur wenige Publikationen (Übersichtsartikel [Rei-02]). Dabei kann gerade die genaue Kenntnis der prenatalen Entwicklung der Wale dazu beitragen, die Besonderheiten in der Evolution der Wale zu verstehen [Rid-86,90, Gle-88, Man-98].

Die Gründe für die geringe Anzahl der an prenatalen Walen durchgeführten Untersuchungen liegen hauptsächlich in der geringen Verfügbarkeit prenataler Wale und der zeitintensiven Präparation dieser Exemplare für die konventionelle Histologie. Außerdem impliziert eine konventionelle histologische Untersuchung die Zerstörung dieser seltenen Museumsstücke und kann für jedes einzelne Exemplar auch nur histologische Schnitte in einer einzigen Schichtrichtung liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einsatzmöglichkeiten der NMR-Mikroskopie zur Untersuchung und Charakterisierung prenataler Wale anhand zweier fixierter prenataler Delphine überprüft. Der NMR-Mikroskopie wurde wegen des mit ihr erzielbaren hervorragenden Kontrastes in Weichteilgewebe gegenüber der Röntgen-Computertomographie der Vorzug gegeben, da die verschiedenen zu visualisierenden Weichteilgewebe nur sehr geringe Dichteunterschiede aufweisen und sich deswegen in der Röntgen-Computertomographie nur schwer voneinander trennen lassen [Rau-83]. Außerdem bietet die nicht-invasive NMR-Mikroskopie gegenüber invasiven Methoden, wie den histologischen Schnittserien, den Vorteil, dass das äußerst empfindliche Gewebe der prenatalen Delphine während der Messungen weder deformiert noch in sonst einer Weise verändert oder gar beschädigt wird. Darüber hinaus können nach der Akquisition eines einzelnen echt dreidimensionalen NMR-Mikroskopie-Datensatzes lückenlose und versatzfreie zweidimensionale Bilderserien entlang jeder beliebigen Raumrichtung durch den entsprechenden Delphin realisiert werden. Oberflächenrekonstruktionen einzelner segmentierter Organe erleichtern auch hier das Verständnis der inneren dreidimensionalen Struktur der untersuchten Objekte.

Für dieses Projekt sind ein später Delphin-Embryo und ein früher Delphin-Fetus ausgewählt worden, um die beiden Hauptstadien in der prenatalen Entwicklung der Delphine zu visualisieren. Außerdem finden gerade beim Übergang vom Embryo zum Fetus besonders wichtige und teilweise nur bei den Walen vorkommende Transformationen statt. Der Embryo besitzt weitgehend noch den allgemeinen Bauplan eines Säugetiers mit einem hohen Anteil unspezialisierten Gewebes, wie das auch bei anderen Säugetieren zu beobachten ist (von-Baer-Gesetz [Bae-28]). Im Gegensatz dazu befindet sich der Fetus schon im Übergangsstadium zwischen der allgemeinen Säugetier-Struktur und dem spezialisierten inneren Aufbau der Wale. Der auf die Vorfahren der Zahnwale zurückgehende Riechkolben ist z.B. noch vorhanden, bildet sich aber mit fortschreitender prenataler Entwicklung bald zurück. Die Nase besitzt dagegen schon die typische wal-/delphinartige Struktur und auch die Form des Körpers und die Morphologie der beiden Vorderflossen (Flipper) und der Schwanzflosse (Fluke) entsprechen schon ganz dem speziellen Bauplan der Wale.

Die beiden ausgewählten prenatalen Delphine erlauben also, gerade denjenigen Moment in der Evolution der Wale zu betrachten, an dem die Struktur des Säugetier-Embryos in die des Zahnwal-Fetus übergeht, d.h. gerade hier sind die Anpassungen der frühen Wale an ihren neuen ozeanischen Lebensraum zu beobachten. Unterschiede im Zeitpunkt und im Ablauf einzelner Entwicklungen beim Übergang vom Delphin-Embryo zum Fetus im Vergleich zum auf dem Land lebenden Säugetier-Embryo können deswegen auf eine evolutionär bedingte Anpassung an den neuen ozeanischen Lebensraum hindeuten.

Aufgrund des hohen Wassergehalts der meisten Organe in den beiden Entwicklungsstadien ist das Gewebe besonders fragil und empfindlich. Das spricht wegen des erhöhten Risikos der Zerstörung des Gewebes bei einer konventionellen invasiven histologischen Untersuchung ebenfalls für eine nicht-invasive NMR-mikroskopische Untersuchung. Allerdings kann sich die Visualisierung der verschiedenen Gewebe in NMR-Bildern, gerade aufgrund der nur geringen strukturellen Unterschiede der Gewebe in diesen Stadien, als äußerst schwierig erweisen. Andererseits können dadurch die praktischen Einsatzmöglichkeiten der NMR-Mikroskopie zur Untersuchung pränataler Wale besser eingeschätzt werden, da alle hier erzielbaren Ergebnisse auch bei pränatalen Walen in späteren Entwicklungsstadien mit differenzierteren Gewebetypen wiederholbar sind.

Neben der reinen Visualisierung der Anatomie der Delphine wurden die mit der NMR-Mikroskopie erzielten Ergebnisse auch mit histologischen Schnittserien von drei Delphinen in ähnlichen Entwicklungsstadien verglichen, um die praktische Verwendbarkeit der NMR-Mikroskopie zur Untersuchung und Charakterisierung fixierter pränataler Wale zu demonstrieren. Außerdem wurde, wie im vorhergehenden Kapitel über NMR-Mikroskopie an Insekten, anhand von M_0 -, T_1 - und T_2 -Parameterkarten der Einfluss dieser NMR-Parameter auf den Kontrast in den aufgenommenen Bildern untersucht. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse lassen sich heranziehen, um den sinnvollen Einsatz der NMR-Mikroskopie zur Untersuchung fixierter Wale im Voraus abschätzen zu können.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Proben und Probenpräparation

Für die NMR-Untersuchungen wurden ein später Embryo des Flecken- oder Schlankdelphins (*Stenella attenuata*) und ein früher Fetus des gemeinen Delphins (*Delphinus delphis*) verwendet. Diese seltenen Exemplare waren trächtigen Delphinweibchen entnommen worden, die sich in den 1970er Jahren in den Netzen von Thunfisch-Fischern verfangen hatten, um die pränatale Entwicklung der Delphine zu dokumentieren. Nach der Entnahme des Embryo bzw. des Fetus wurden diese mit 4 %iger Formalin-Lösung fixiert. Beide Präparate wurden später vom National Marine Fishery Service, San Diego, CA, USA, zu Forschungszwecken an die Dr. Senckenbergische Anatomie (Anatomie III) der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main weitergegeben.

Der untersuchte späte Embryo des Schlankdelphins besitzt eine Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 12,5 mm. Er wurde nach der ursprünglichen Formalin-Fixierung am 29. April 1973 in Ethanol-Lösung aufbewahrt. Die NMR-Messungen erfolgten ebenfalls in dieser Aufbewahrungslösung, um den Zustand des Embryos nicht zu beeinflussen.

Tier	Spezies	Lösung	SSL	Untersuchungsmethode
Embryo Nr. 1	<i>Stenella attenuata</i>	Ethanol (70 %)	12,5 mm	NMR
Embryo Nr. 2	<i>Stenella coeruleoalba</i> ¹	k.A.	11,0 mm	transversale Schnitte [Kam-74], dort keine näheren Angaben
Fetus Nr. 1	<i>Delphinus delphis</i>	Formalin (4 %)	38,0 mm	NMR
Fetus Nr. 2	<i>Stenella attenuata</i>	Ethanol (70 %)	43,5 mm	transversale Schnitte 10 µm, Paraffin- Einbettung, Azan-Färbung
Fetus Nr. 3	<i>Delphinus delphis</i>	Ethanol (70 %)	40,5 mm	transversale Schnitte 10 µm, Paraffin- Einbettung, Azan-Färbung

Tabelle 6-1: Überblick über die untersuchten prenatale Delphine. Mit Lösung ist die Aufbewahrungslösung der fixierten Delphine und mit SSL deren Scheitel-Steiß-Länge bezeichnet. Die SSL kann zur Einschätzung des Entwicklungsstadiums der einzelnen Tiere herangezogen werden.

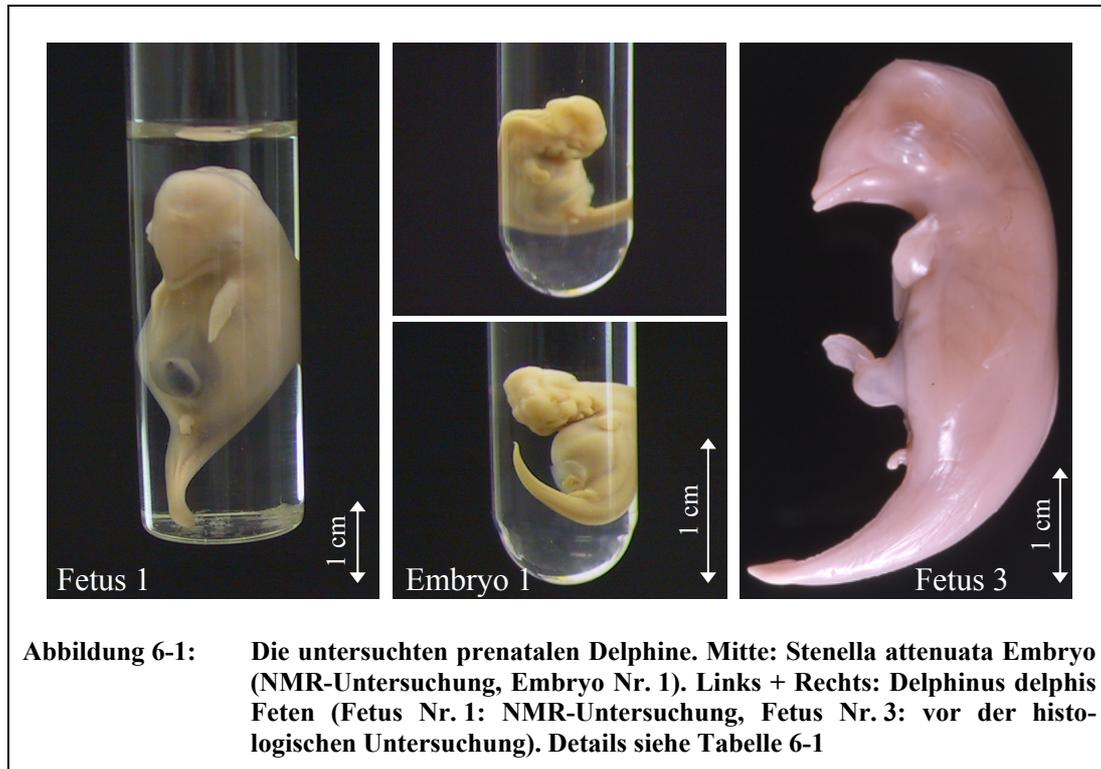
Schlankdelphine besitzen einen verhältnismäßig langen und schlanken Körper mit einer am Rücken grauen und am Bauch hellgrauen Färbung. Mit zunehmendem Alter zeigen die Schlankdelphine eine immer stärkere Fleckenmusterung am ganzen Körper, die Neugeborenen sind noch ungefleckt. Die neugeborenen Schlankdelphine besitzen eine durchschnittliche Körperlänge von 87 cm, ausgewachsene Männchen erreichen meist eine Länge von ca. 2,20 m und eine Masse von über 100 kg. Der Lebensraum der Schlankdelphine beschränkt sich auf alle tropischen und subtropischen Ozeane. Schlankdelphine treten dort in Gruppen von einigen wenigen bis zu einigen tausend Tieren auf. Sie ernähren sich hauptsächlich im Oberflächenwasser von Kalmaren, Fregattenmakrelen und fliegenden Fischen [Mar-91].

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte frühe Fetus des gemeinen Delphins besitzt eine Scheitel-Steiß-Länge von 38 mm. Seine Mutter verfieng sich am 21. Mai 1977 in den Netzen der Thunfisch-Fischer. Der Fetus befand sich seit seiner Fixierung in 4 %iger Formalin-Lösung. Die NMR-Experimente wurden ebenfalls in dieser Original-Lösung durchgeführt.

Auch der gemeine Delphin besitzt einen relativ schlanken und stromlinienförmigen Körperbau, ähnlich dem der Schlankdelphine. Die gemeinen Delphine zählen zu den häufigsten Delphinen der Erde und können in allen tropischen, subtropischen und gemäßigt warmen Gewässern angetroffen werden, z.B. auch im Mittelmeer. Der dortige Bestand gilt jedoch aufgrund zahlreicher Fänge als bedroht. Gemeine Delphine leben in größeren sozialen Gruppen, sogenannten Schulen, von mehreren zehn bis mehreren tausend Individuen und sind auch gemeinsam mit anderen Walarten zu beobachten. Die Schnauze, der Rücken und die Körperforsätze des gemeinen Delphins sind dunkelbraun bis schwarz gefärbt, die Bauchseite ist weiß. Die vorderen Flankenflächen sind gelb bis lederfarben und die hinteren Flanken und Seiten des Schwanzstieles hellgrau gemasert. Ausgewachsene Männchen werden im

¹ *Stenella coeruleoalba*: Blau-Weiß-Gestreifter-Delphin, Gattung *Stenella*, wie *Stenella attenuata*

Durchschnitt bis zu 2,40 m lang und besitzen eine Masse von ca. 75 kg. Einzelne Tiere können aber durchaus bis zu 2,60 m lang und bis zu 135 kg schwer werden. Neugeborene Tiere sind 80 bis 85 cm lang. Die Nahrung der gemeinen Delphine besteht aus einer großen Vielfalt von Kalmaren und Fischen, besonders schwarmbildenden Arten wie Sardinen, Sardellen, Heringen und Pilchards [Mar-91].



6.2.2 Hardware

Die NMR-Experimente wurden zum einen am AMX 500 Spektrometer bei 11,7 T und zum anderen am Avance 750 Spektrometer bei 17,7 T durchgeführt. Ein Teil der Experimente am Avance 750 Spektrometer fand schon während dessen Testphase beim Hersteller Bruker in Rheinstetten bei Karlsruhe statt.

Am AMX 500 Spektrometer wurden verschiedene am Lehrstuhl gebaute Birdcage-Resonatoren mit Durchmessern von 20 – 28 mm und Längen von 30 – 42 mm verwendet. Die Resonatoren wurden zum Teil linear und zum Teil in Quadratur betrieben.

Die Experimente am Avance 750 Spektrometer wurden mit einem Birdcage-Resonator der Firma Bruker und einem am Lehrstuhl gebauten durchgeführt. Beide besaßen einen Durchmesser von 20 mm, eine Länge von 40 mm und konnten nur linear betrieben werden.

Bei allen durchgeführten Experimenten wurde die Temperatur des Resonators und der Probe während der gesamten Messzeit konstant gehalten, am AMX 500 Spektrometer auf 10 °C und

am Avance 750 Spektrometer auf 15 °C. Bei letzterem war die Kühlung der Probe während der Testphase in Rheinstetten nur über die Gradientenkühlung realisierbar. Um zu starke Spannungen im Gradientenrohr aufgrund großer Temperaturdifferenzen zu vermeiden, wurden die Proben deswegen nur auf 15 °C gekühlt.

6.2.3 NMR-Experimente

Wie zuvor bei den Messungen an Insekten (vgl. Kapitel 5) wurden zu Beginn jeder Messzeit zweidimensionale Spin-Echo-Experimente durchgeführt (siehe Unterkapitel 3.2.1), um den gewünschten Kontrast in den NMR-Bildern einzustellen und eine optimale sagittale Schicht durch den jeweiligen Delphin zu bestimmen.

Zweidimensionale Experimente

Beim Embryo Nr. 1 (siehe Tabelle 6-1) wurden dabei Matrizen bis zu einer Größe von 256 x 256 Bildpunkten verwendet (FOV: 15,0 x 15,0 mm²), die zu einer nominellen räumlichen Auflösung in der Schicht von 58,6 x 58,6 µm² führten. Die Schichtdicke wurde von 100 µm bis zu 1 mm variiert.

Für den Fetus Nr. 1 (vgl. Tabelle 6-1) wurden asymmetrische Matrizen mit 640 x 256 Bildpunkten verwendet (FOV: 50,0 x 20,0 mm²), die in der angeregten Schicht zu einer isotropen nominellen Auflösung von 78,1 x 78,1 µm² führten. Die Schichtdicke in diesen zweidimensionalen Experimenten betrug ebenfalls zwischen 100 µm und 1 mm.

Je nach gewünschtem Kontrast in den Bildern wurden Echozeiten T_E von 8,2 bis 21,0 ms verwendet. Die Repetitionszeiten T_R lagen im Bereich von 1,0 bis 2,0 s. Für die Abbildung der Delphine als Ganzes wurden eine Echozeit T_E von 14,3 ms und eine Repetitionszeit T_R von 1,5 s ausgewählt, da diese Zeiten zu einem über weite Bereiche gut ausgeprägten Kontrast in den Bildern führten, auch wenn damit nicht alle Strukturen optimal dargestellt werden konnten.

Um am Avance 750 Spektrometer den optimalen Kontrast in den Bildern zu bestimmen, wurde für jeden Delphin eine Serie von jeweils 64 zweidimensionalen Einzelbildern automatisiert akquiriert. Dabei wurden alle Bilder mit unterschiedlichen Kombinationen von Echozeit T_E und Repetitionszeit T_R aufgenommen. Insgesamt wurden acht verschiedene Repetitionszeiten T_R mit jeweils acht verschiedenen Echozeiten T_E getestet. Die Echozeiten T_E wurden im Bereich von 3,2 bis 25 ms gewählt und die Repetitionszeiten im Bereich von 100 ms bis 2,5 s. Je nach Kombination von Echo- und Repetitionszeit wurden einzelne Strukturen besonders deutlich abgebildet. Das Signal aus der Leber z.B. konnte so zwischen sehr hohen und sehr niedrigen Intensitätswerten variiert werden. Ähnlich wie am AMX 500 Spektrometer wurden die Delphine als Ganzes bei Echozeiten T_E von 15 ms und Repetitionszeiten von 1,5 s besonders klar abgebildet. Die Leber erscheint in den Bildern bei diesen Parametern jedoch so dunkel, dass man kaum eine innere Struktur erkennen kann.

Neben den genannten Spin-Echo-Experimenten, wurden vor allem am Avance 750 Spektrometer auch mehrere andere NMR-Bildgebungsexperimente getestet, z.B. schnelle und langsame Gradienten-Echo-Sequenzen und Turbo-Spin-Echo-Sequenzen. Diese führten allerdings alle zu weniger klaren oder durch störende Artefakte nur bedingt verwendbaren Bildern. Deshalb wurden diese Bilder später nicht zur Berechnung der Oberflächen und Volumina der inneren Organe herangezogen.

Dreidimensionale Experimente

Nachdem mit Hilfe der zweidimensionalen Datensätze eine optimale sagittale Schicht durch die Delphine bestimmt und die entsprechende Kombination von Echo- und Repetitionszeit ausgewählt worden war, wurden dreidimensionale Spin-Echo-Experimente (vgl. Unterkapitel 3.2.1) durchgeführt, um die gesamte Anatomie der Delphine zu visualisieren.

Für den Embryo wurde dafür zum einen ein isotropes FOV von $(25 \text{ mm})^3$ und eine Matrix von 256^3 Bildpunkten verwendet und zum anderen ein FOV von $30 \times 15 \times 15 \text{ mm}^3$ mit einer Matrix von $512 \times 256 \times 128$ Bildpunkten. Im ersten Fall ergab sich eine isotrope nominelle räumliche Auflösung von $(97,7 \text{ }\mu\text{m})^3$, im zweiten Fall lag diese bei $58,6 \times 58,6 \times 117,2 \text{ }\mu\text{m}^3$.

Beim Fetus wurde ein FOV von $50 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ und eine Matrix mit $640 \times 256 \times 256$ Bildpunkten verwendet, was zu einer isotropen nominellen räumlichen Auflösung von $(78,1 \text{ }\mu\text{m})^3$ führte.

Die Echo- und Repetitionszeiten T_E und T_R lagen bei beiden Delphinen wie bei den zweidimensionalen Experimenten im Bereich von 8,2 bis 21 ms bzw. 1,0 bis 2,0 s. Bei der Abbildung der ganzen Tiere wurden die oben beschriebenen Werte von $T_E = 15 \text{ ms}$ und $T_R = 1,5 \text{ s}$ verwendet, um auch hier wieder einen guten Kontrast über einen möglichst großen Bereich zu erzielen.

Aufgrund der für die NMR-Mikroskopie doch beachtlichen Größe der Objekte und der immer noch relativ hohen räumlichen Auflösung, ergaben sich somit schon bei Messungen mit nur vier Mittelungen Messzeiten von mehreren Tagen. Deswegen wurde bisher auch auf eine noch bessere räumliche Auflösung verzichtet.

An Stelle der in Unterkapitel 3.2.1 für das dreidimensionale Spin-Echo-Experiment beschriebenen zusätzlichen Spoiler-Gradienten, wurden am Avance 750 Spektrometer nach der Akquisition jeder einzelnen k-Raumzeile bzw. jeder Mittelung Spoiler-Gradienten für die Dauer von 1,0 ms in allen drei Raumrichtungen geschaltet, um eine etwaige noch vorhandene Transversal-Magnetisierung zu dephasieren.

Nach der Akquisition der zwei- und dreidimensionalen Datensätze wurde eine Basislinienkorrektur der Messdaten vorgenommen, ein Zero-Filling um den Faktor zwei durchgeführt und die Messdaten wurden fouriertransformiert. Anschließend wurden aus den Absolutwerten der Intensitäten in den einzelnen Bildpunkten Bilder mit 256 verschiedenen Grauwerten berechnet. Durch das Zero-Filling ergaben sich in den Bildern Voxel-Auflösungen von bis zu $29,3 \times 29,3 \times 58,6 \text{ }\mu\text{m}^3$ beim Embryo und $(39,1 \text{ }\mu\text{m})^3$ beim Fetus.

Die graphische Verarbeitung der Bilddaten erfolgte mit der Graphik-Software Amira. Die dreidimensionalen Datensätze wurden zuerst in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Prof. Oelschläger (Dr. Senckenbergische Anatomie III, Uniklinikum Frankfurt am Main) manuell segmentiert. Auf der Basis eines Polygon-Modells wurden danach dreidimensionale Oberflächenrekonstruktionen der segmentierten Strukturen berechnet. Mit Hilfe der rekonstruierten Oberflächen konnten deren Größen und die von ihnen eingeschlossenen Volumina bestimmt werden.

NMR-Parameterkarten

Zur Bestimmung des Einflusses der NMR-Parameter Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 , Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 und Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 auf den Kontrast in den NMR-Bildern wurden räumlich hochaufgelöste Karten dieser Parameter mit den in Unterkapitel 3.2.2 beschriebenen Magnetisierungspräparations-Experimenten akquiriert. Wie zuvor bei den NMR-mikroskopischen Messungen am Gehirn der Biene, konnte aufgrund der später festgestellten deutlichen Dominanz des M_0 -Kontrastes in den Bildern auf die T_2 -Korrektur der M_0 -Karte verzichtet werden.

Die Parameterkarten wurden mit einer Schichtdicke von 200 μm und nominellen räumlichen Auflösungen in der Schicht von 58,6 x 58,6 μm^2 beim Embryo und 351,6 x 351,6 μm^2 beim Fetus aufgenommen.

Die Echozeit T_E im Bildgebungsteil betrug in den T_1 - wie in den T_2 -Experimenten beim Embryo 5,2 ms und beim Fetus 8,3 ms. Die Echozeit T_E^* in der CPMG-Präparationssequenz der T_2 -Karten betrug bei beiden Delphinen 5,0 ms. Die Wartezeit nach der Akquisition wurde bei allen Experimenten auf 50 ms gesetzt. Es wurde jeweils zweimal gemittelt. Die Akquisition beider Parameterkarten nahm bei beiden Proben 2 Stunden und 10 Minuten in Anspruch.

6.2.4 Histologische Schnittserien

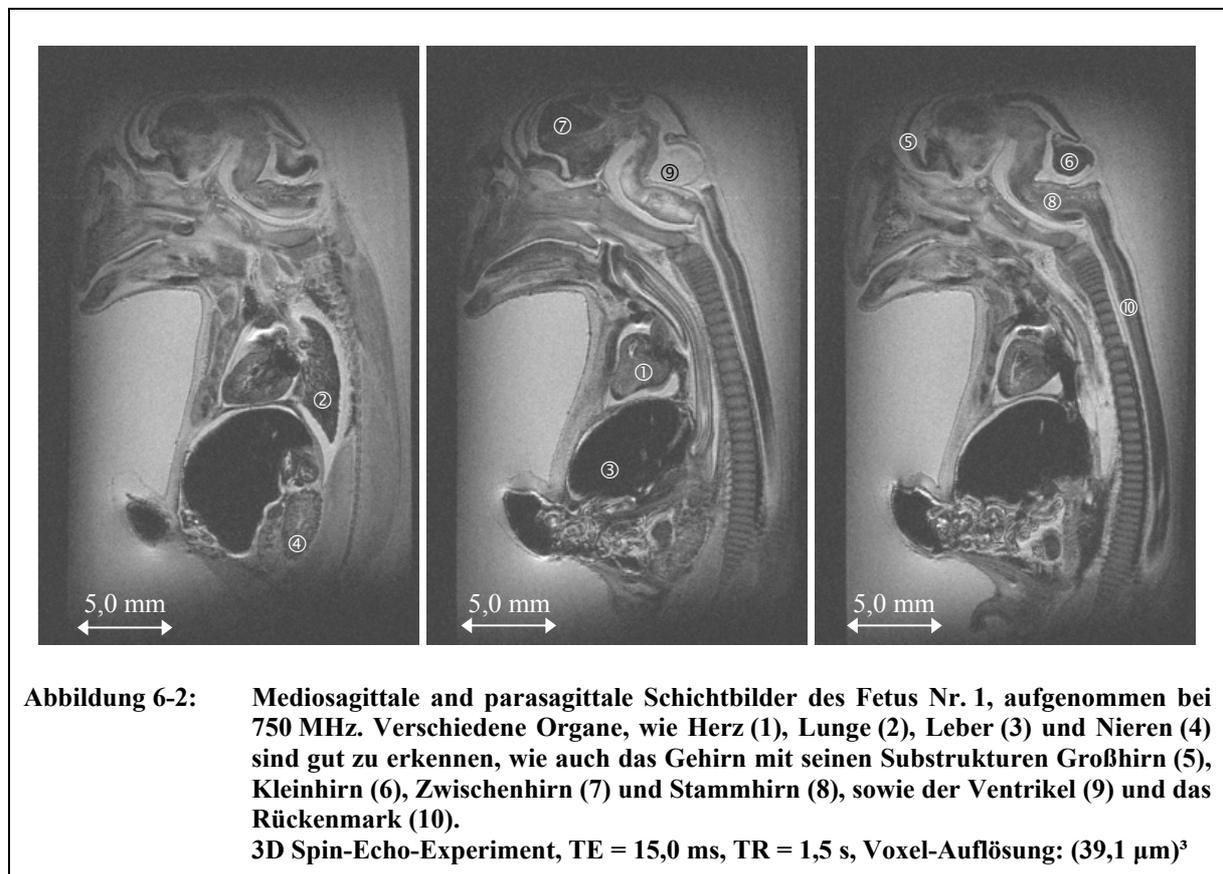
Um einerseits die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen einordnen und mit den Ergebnissen konventioneller histologischer Schnittserien vergleichen zu können, andererseits aber die in der vorliegenden Arbeit untersuchten seltenen Museumstücke nicht zu zerstören, wurden schon vorhandene Schnittserien von drei anderen prenatalen Delphinen in ähnlichen Entwicklungsstadien als Vergleichsobjekte herangezogen. Die genauen Daten aller Delphine sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst. Die Ergebnisse des Vergleichs der histologischen Schnittserien mit den NMR-Experimenten werden in Abschnitt 6.3.3 im Detail beschrieben.

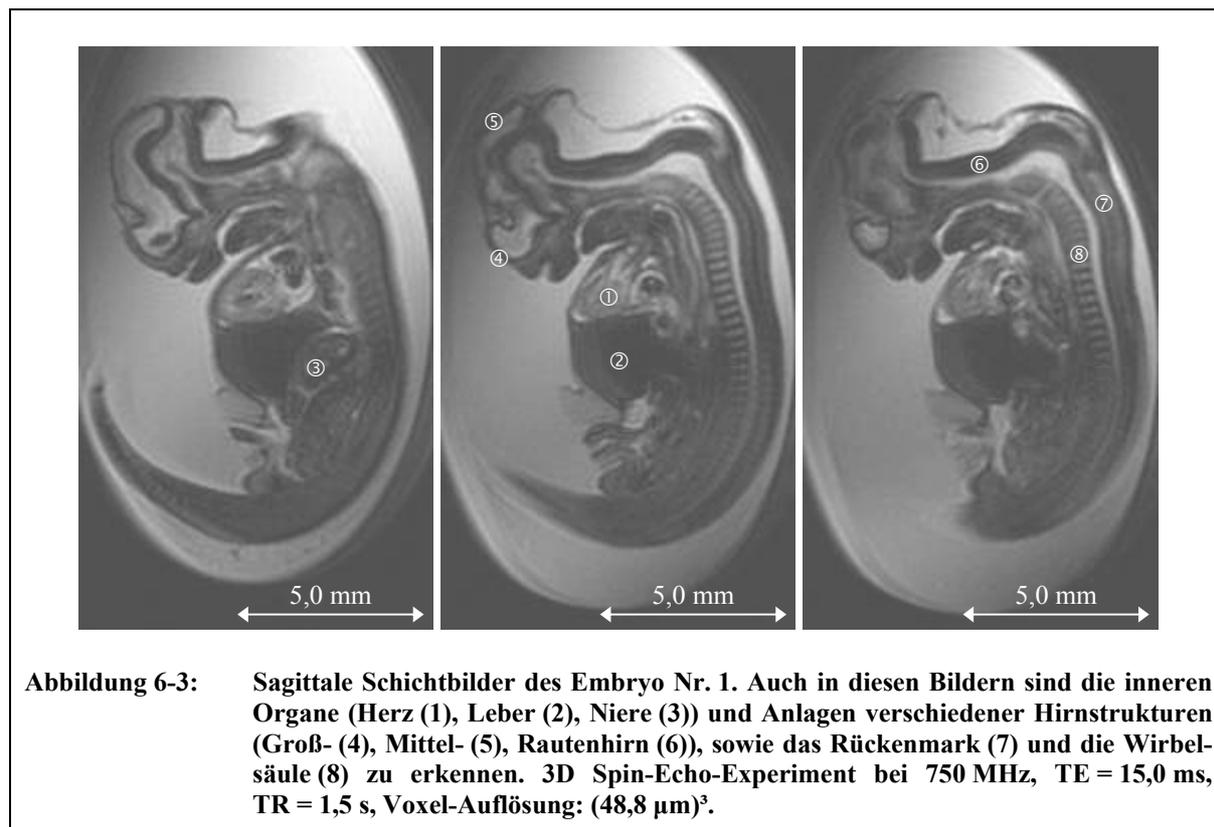
6.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Anatomie der prenatalen Delphine wird in den NMR-Bildern detailreich wiedergespiegelt. Mit der erreichten räumlichen Auflösung konnten diverse Organe wie Herz, Lunge, Leber und

Nieren klar erkennbar und deutlich gegenüber dem umgebenden Gewebe abgegrenzt visualisiert werden. In den NMR-Bildern beider Delphine kann man die Ober- und Unterkiefer erkennen und sehen, wie die Schädelbasis in den Nasenbereich übergeht. Das Gehirn und seine Hauptbestandteile sind sowohl in den NMR-Bildern als auch in den histologischen Schnitten klar zu erkennen (siehe Abbildung 6-2, Abbildung 6-3, Abbildung 6-6 und Abbildung 6-7).

Im Falle des Fetus Nr. 1 waren in den NMR-Bildern diverse kleinere Strukturen, wie z.B. die Substruktur des Herzens zu erkennen (siehe Abbildung 6-2). Außerdem kann man Teile des Darms unterscheiden, die in die Nabelschnur übergehen. Der Genitalbereich ist ebenfalls deutlich zu sehen. In diesem Entwicklungsstadium ist es trotzdem schwierig, das Geschlecht des Tieres zu bestimmen, da der Phallus bei beiden Geschlechtern noch aus dem Körper herausragt [Ste-00].





6.3.1 Entwicklungsstadien

Embryo Nr. 1

Der C-förmige Körper des Embryos Nr. 1 weist noch Kiemenbögen auf. Neben der Wirbelsäule sind in den Bildern die Anlagen für die Flipper und die Augen sowie die noch nicht vollständig zurückgebildeten hinteren Extremitäten zu sehen. Außerdem ist die Kopfreion noch weit nach vorne geneigt und steht noch in Kontakt mit der Vorwölbung des Brustkorbs im Bereich des Herzens. Aufgrund all dieser Beobachtungen kann der Embryo Nr. 1 in das von Štěrba et al. [Ste-00] definierte Entwicklungsstadium S4 eingeordnet werden, das allgemein bei Säugetieren dem Stadium 16 bzw. 17 entspricht [Oel-02]. Die ovale Form des NMR-Röhrchens in den Bildern des Embryos Nr. 1 (vgl. Abbildung 6-6) ergibt sich aus der doppelt obliquen Orientierung der ausgewählten Schicht durch das zylindrische Proben-Röhrchen.

Fetus Nr. 1

Am Präparat selbst (vgl. Abbildung 6-1) und in den NMR-Bildern kann man sehen, dass der Fetus Nr. 1, obwohl seine Schnabel-Schwanzflossen-Achse noch nicht hergestellt ist, schon das typische Aussehen eines Delphins mit komplett zurückgebildeten hinteren Extremitäten und verlängerter Schnauze besitzt. Die Rückenfinne und die Fluke sind in Ansätzen zu erkennen, die Flipper sind schon fast voll ausgebildet und weisen die typische Form auf. Die Längsachse des Tieres ist immer noch leicht gebogen und der Kopf steht noch fast in rechtem

Winkel zum Körper, ist jedoch schon von der Vorwölbung des Herzens abgehoben. Auch wenn die Augenlider schon geöffnet sind, kann man den Fetus Nr. 1 deswegen noch in ein Entwicklungsstadium zwischen den Stadien S6 und S7 [Ste-00] einordnen (Stadium 23 in der allgemeinen Säugetier-Entwicklung [Oel-02]).

6.3.2 Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktionen

Dank des guten Kontrastes in den NMR-Bildern war es möglich, eine Reihe von Organen und anatomischen Strukturen aus dem Innern der beiden untersuchten Delphine manuell zu segmentieren. Manuelle Segmentierung bedeutet wie in Abschnitt 5.1.2.3 beschrieben, dass einzelne Bereiche eines zweidimensionalen Schnittbildes von Hand den entsprechenden anatomischen Strukturen zugeordnet werden, wodurch eine Maske entsteht, die über den eigentlichen Datensatz gelegt werden kann. Nach der Segmentierung jeder einzelnen Schicht der dreidimensionalen Datensätze der Delphine wurden auf der Basis eines Polygon-Modells die Oberflächen der segmentierten anatomischen Strukturen rekonstruiert.

Einige Oberflächenrekonstruktionen sind in Abbildung 6-4 und Abbildung 6-5 dargestellt. Aus den Rekonstruktionen wurden außerdem das von ihnen eingeschlossene Volumen und der Flächeninhalt der Oberflächen berechnet (vgl. Tabelle 6-2).

Leider sind in der über Wale existierenden Literatur weder Werte für die Oberflächen der einzelnen Organe zu finden, noch Werte für deren Volumina. Ein Vergleich der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte mit der Literatur ist also nicht möglich. Auch ein Vergleich mit den Werten menschlicher Embryonen und Feten erscheint nicht sinnvoll, da sich die Chronologie der prenatalen Entwicklungsstadien und die Morphologie der einzelnen Organe zu stark unterscheiden.

Wie beim Gehirn der Honigbiene (vgl. Abschnitt 5.1.2.3), kann der relative Fehler für die berechneten Werte der einzelnen Strukturen mit $\pm 10\%$ abgeschätzt werden, da sich der relative Fehler wieder aus dem intrinsischen Fehler der NMR-Messung von weniger als $\pm 4\%$ und der manuellen Durchführung der Segmentierung von $\pm 5\%$ ergibt.

Die Segmentationsmasken können auch wieder als schematische anatomische Skizzen der einzelnen Organe verwendet werden. Um die Identifizierung der großen Anzahl unterschiedlicher Strukturen zu erleichtern, sind die Masken hier beim Delphin in Farbe den NMR-Bildern überlagert dargestellt. Abbildung 6-7 zeigt den Vergleich der NMR-Bilder des Delphin-Fetus Nr. 1 mit entsprechenden histologischen Schnitten des Fetus Nr. 3 und den Segmentationsmasken.

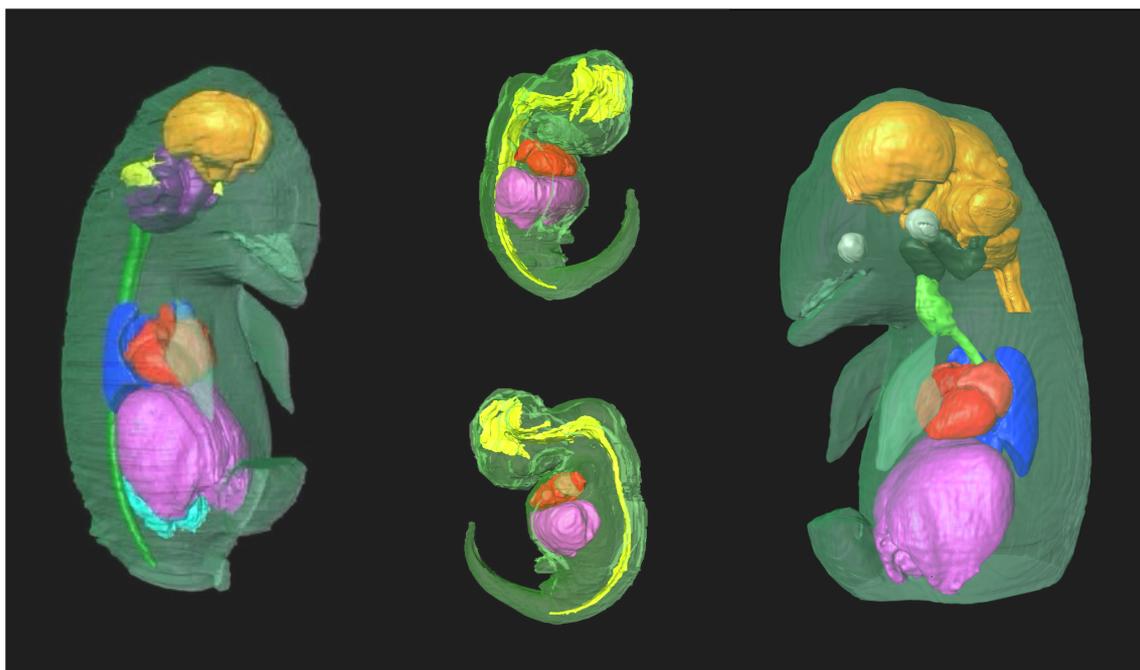
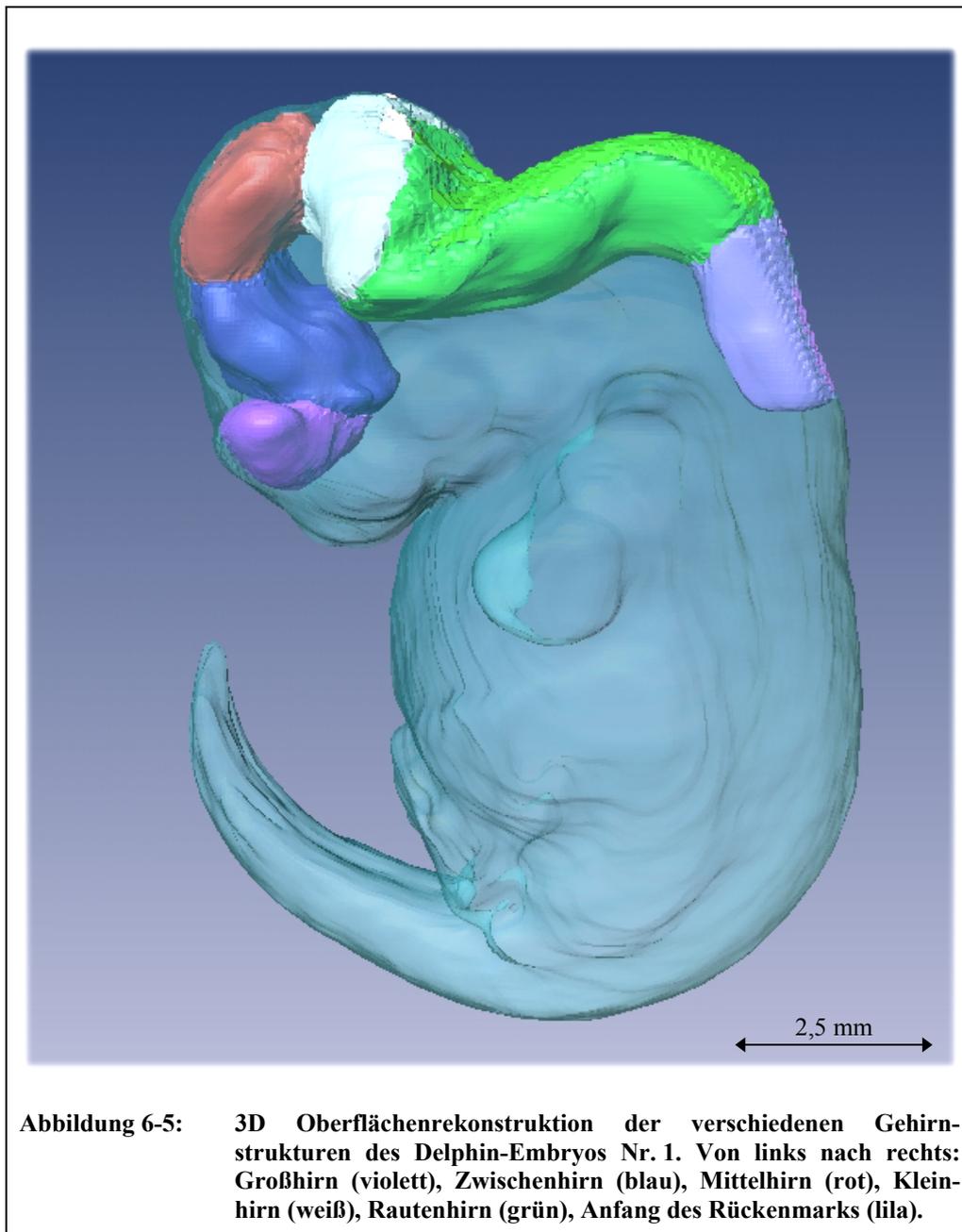


Abbildung 6-4: 3D Oberflächenrekonstruktionen der segmentierten Strukturen in den 3D NMR-Datensätzen des Embryos Nr. 1 (Mitte) und des Fetus Nr. 1 (links + rechts). Beim Embryo in der Mitte ist das Herz (rot), die Leber (violett) und Nervengewebe (gelb) dargestellt. Die Bilder des Fetus (links und rechts) zeigen Rekonstruktionen aus zwei verschiedenen Datensätzen. Dargestellt sind die Hauptkammern (dunkelrot) und Vorhöfe (hellrot) des Herzens, Lunge (blau), Leber (violett) und Nieren (türkis). Im Bereich des Kopfes sind außerdem Augen (hellgrau), Ohren (dunkelgrau), Luftröhre und Kehlkopf (hellgrün), Gehirn (links: orange, gelb, dunkelviolett, rechts: orange) und Rückenmark (dunkelgrün) zu sehen.

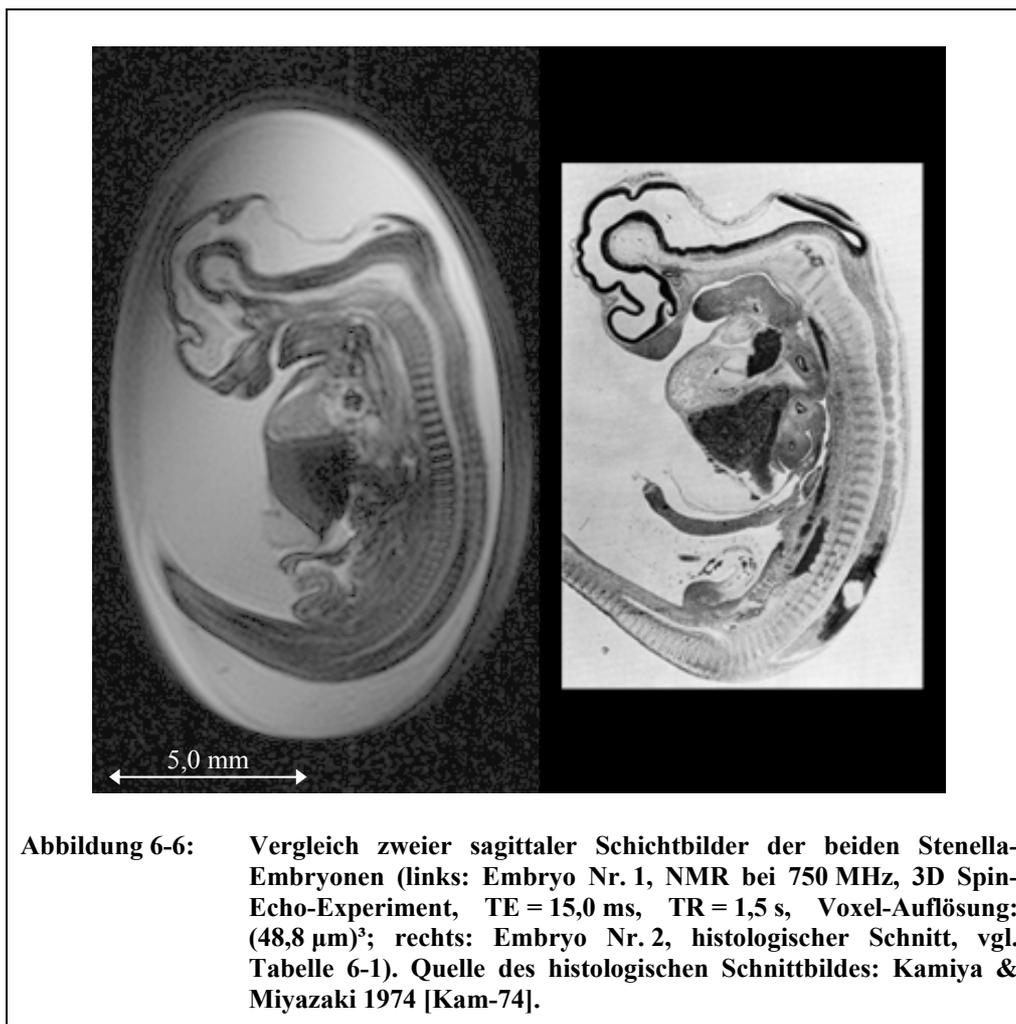
Organ / Struktur	Volumen / mm ³	Oberfläche /mm ²
Gehirn (gesamt)	254,8 ± 25,5	354,4 ± 35,4
Augen	5,1 ± 0,5	18,5 ± 1,9
oberer Respirationstrakt	1,6 ± 0,2	16,1 ± 1,6
Luftröhre	7,7 ± 0,8	38,7 ± 3,9
linker Lungenflügel	25,0 ± 2,5	59,1 ± 5,9
rechter Lungenflügel	26,8 ± 2,7	63,3 ± 6,3
Herz – Vorhöfe	18,7 ± 1,9	55,4 ± 5,5
Herz – Ventrikel	30,9 ± 3,1	65,2 ± 6,5
Leber	182,0 ± 18,2	207,2 ± 20,7
Nieren	50,2 ± 5,0	137,5 ± 13,8
Blutgefäße (Aorta, etc.)	11,2 ± 1,1	62,3 ± 6,2

Tabelle 6-2: Volumina und Oberflächen der segmentierten Organe und Strukturen beim Fetus Nr. 1 (vgl. Abbildung 6-7).



6.3.3 Anatomie und Methodenvergleich

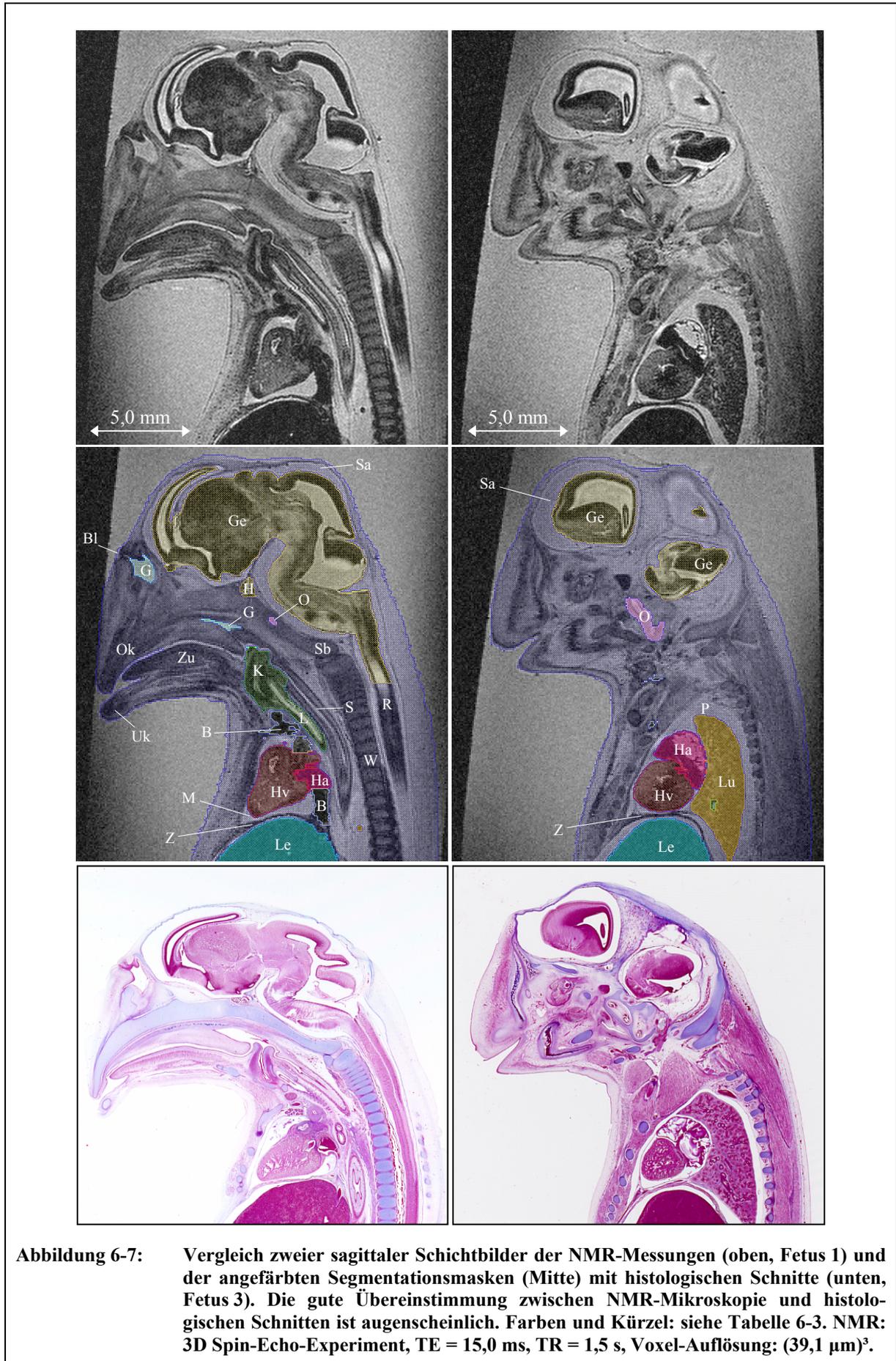
Obwohl die histologischen Schnitte und die NMR-Bilder unterschiedliche Feten und Embryonen zeigen und unterschiedliche Schichtdicken besitzen, besteht doch eine eindrucksvolle Übereinstimmung in den morphologischen Details der entsprechenden Präparate. Besonders deutlich kann man dies z.B. am Blasloch und den darunter liegenden Atemwegen in den in Abbildung 6-7 dargestellten Bildern des Kopfes und des Gehirns der Feten erkennen. Außerdem ist auch das Erscheinungsbild des gesamten Gehirns bei beiden Untersuchungsmethoden sehr ähnlich.



Im Folgenden soll eine detaillierte Beschreibung der einzelnen in den NMR-Bildern abgebildeten Körperregionen und Organe wiedergegeben werden und ein Vergleich der NMR-Daten des Fetus Nr. 1 mit konventionellen histologischen Schnitten des Fetus Nr. 3 vorgenommen werden:

Äußere Körperform

Die Körperform des mittels NMR-Mikroskopie untersuchten Fetus Nr. 1 unterscheidet sich leicht von der Körperform des Fetus Nr. 3 aus der histologischen Schnittserie (vgl. Tabelle 6-1). Dies ergibt sich hauptsächlich aus inter-individuellen Unterschieden, der aufrechten Position, in der sich Fetus Nr. 1 im NMR-Röhrchen befand, das kaum größer war als der Fetus selbst, und aus Deformationen des Fetus Nr. 3, die beim Schneiden der histologischen Mikro-Schichten durch den Druck der Klinge auf das fragile Gewebe entstanden sind. Diese durch die verschiedenen Präparationsmethoden hervorgerufenen Unterschiede in der äußeren Form der beiden Feten sind nicht in allen, sondern vor allem in den zentralen Schichten durch die Feten zu erkennen. Diese Unterschiede sind deswegen von besonderem Interesse, da sie ein mittels NMR-Mikroskopie überprüfbares Maß für die Gleichmäßigkeit der durch den Schneideprozess bedingten Deformationen innerhalb einer einzelnen histologischen Schnittserie darstellen.



Kürzel	Organ / Struktur	Kürzel	Organ / Struktur
B	Blutgefäße (Aorta, Vena cava)	M	Mediastinum
Bl	Blasloch	O	Ohr (rosa)
G	Nasengang	Ok	Oberkiefer
Ge	Gehirn (gelb)	R	Rachen
H	Hypophyse	S	Speiseröhre
Ha	Herz – Vorhöfe (hellrot)	Sa	Subarachnoidalraum
Hv	Herz–Ventrikel (dunkelrot)	Sb	Schädelbasis
K	Kehlkopf (grün)	Uk	Unterkiefer
L	Luftröhre (grün)	W	Wirbelsäule
Le	Leber (türkis)	Z	Zwerchfell
Lu	Lunge (orange)	Zu	Zunge

Tabelle 6-3: Liste der in Abbildung 6-7 verwendeten Abkürzungen und Farben.

Die Deformation der äußeren Körperform kann auch beim Vergleich der Embryonen Nr. 1 und 2 (vgl. Abbildung 6-6) festgestellt werden. Da in der Veröffentlichung von Kamiya und Miyazaki [Kam-74] jedoch nur ein einzelnes Schichtbild abgebildet ist, kann hier keine Aussage darüber getroffen werden, ob die durch den Schneideprozess bedingten Deformationen in allen Schichten gleich ausfallen.

Herz

Das Herz der Wale ist weitgehend so aufgebaut wie das Herz anderer Säugetiere [Pon-02]. Es sitzt auf dem Zwerchfell auf und befindet sich im unteren Teil des Mediastinums, einer Art drittem Hohlraum im Brustkorb zwischen den beiden Pleura-Hohlräumen. Die Substrukturen des Herzens, wie die beiden Hauptkammern (Ventrikel) und die Anlagen der Vorhöfe des embryonalen Herzens, sind mit die kleinsten in den NMR-Bildern zu erkennenden Strukturen (siehe Abbildung 6-7).

Da beim Fetus Nr. 1 die Blutgefäße und Vorhöfe mit geronnenem Blut gefüllt sind, welches in den verwendeten Experimenten zu niedriger Signalintensität in den Bildern führt, war eine exakte Abgrenzung der Vorhöfe voneinander und von den Blutgefäßen bei der manuellen Segmentierung des Herzens nur bedingt möglich. Die obere und untere Hohlvene (Vena cava) und die aufsteigende Aorta konnten jedoch eindeutig bestimmt werden. Insgesamt könnten die Oberflächen- und Volumenberechnungen aufgrund der geringen Signalintensität in diesem Bereich jedoch mit größeren Fehlern behaftet sein als in anderen Regionen.

Trotzdem war es in den NMR-Bildern möglich, die dicke Muskelschicht (Myokard) zu visualisieren, die den Hohlraum der Ventrikel umgibt, da die Menge des eingeschlossenen Blutes ausreichend klein war. Außerdem kann man die papillären Muskeln erkennen, die mit den Herzklappen und den benachbarten Substrukturen verbunden sind.

Aufgrund der Stärke des (Binde-)Gewebes, aus dem die Vorhöfe, der Herzmuskel und die Blutgefäße bestehen, ist beim Herzen nahezu keine Schrumpfung durch die Fixierung zu beobachten.

Leber

Die Leber ist eines der größten Organe des Fetus Nr. 1 und befindet sich in der ventral (vorderen) oberen Hälfte des Bauchraumes vor dem Magen und dem Dünndarm. Die Leber der Wale besteht aus einem größeren rechten und einem kleineren linken Lappen [Rob-94]. In der vorliegenden Arbeit konnten diese beiden Lappen weder in den histologischen Schnitten noch in den NMR-Bildern voneinander abgegrenzt werden. Die Leber erschien vielmehr als ein großes, homogenes Organ.

Das manuelle Segmentieren der Leber war relativ unkompliziert, da bei den verwendeten Experimenten die Leber selbst nur wenig Signal lieferte, während die sie umgebende Flüssigkeit in den Bildern hell erschien. Das niedrige NMR-Signal der Leber hängt mit dem hohen Eisenanteil im Blut zusammen. Der Eisenanteil in der Leber ist besonders hoch, da in ihr während der embryonalen und fetalen Entwicklung rote Blutkörperchen gebildet werden.

Aufgrund des gewählten Kontrastes und der hohen Blutkonzentration in der Leber ergibt sich, dass die Leber in den Bildern genauso dunkel erscheint wie die untere Vena cava, die vom rückwärtigen Teil der Leber umschlossen wird. Beide sind deswegen in den Bildern nicht eindeutig voneinander zu trennen, was bei den Volumen- und Oberflächenberechnungen berücksichtigt werden muss. Abgesehen davon sollten die berechneten Oberflächen und Volumina sehr exakt sein, da der Stoffwechsel der Leber in der fetalen Entwicklung äußerst aktiv ist und sich das Gewebe deswegen in einem relativ ausgereiften Zustand befindet und somit bei der Fixierung nur wenig geschrumpft sein sollte.

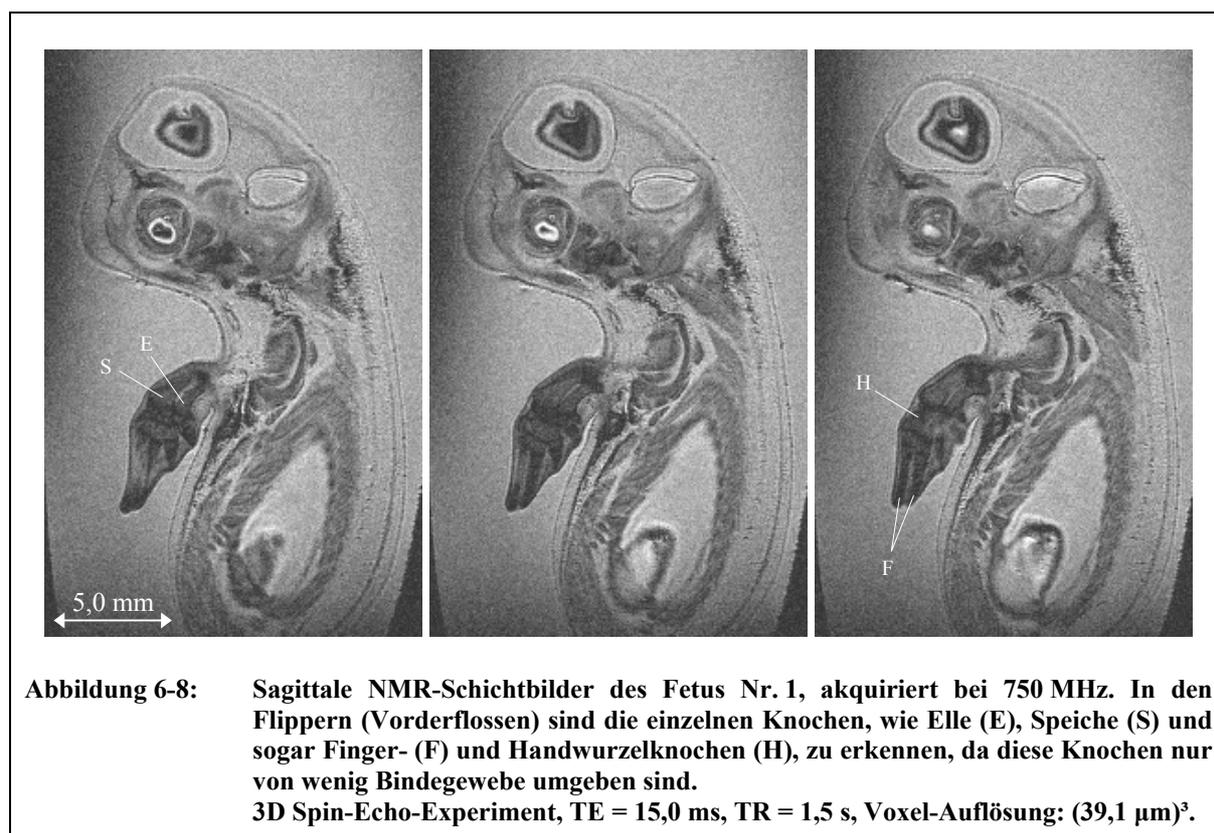
Nieren

Die Nieren der Wale befinden sich hinter der Leber. Sie bestehen aus einer großen Anzahl sogenannter Renculi, kleiner, voneinander unabhängig funktionierender Einheiten [Pab-99], die sich im Bereich des räumlichen Auflösungsvermögens der NMR-Experimente bewegen und deswegen nur in einzelnen Bildern mit speziellem Kontrast zu sehen sind. Die manuelle Segmentierung der Nieren als ganzes Organ verlief dagegen relativ einfach.

Schädel und Skelett

In den NMR-Bildern sind der Schädel sowie weitere Skelettstrukturen wie die Wirbelsäule zu erkennen. Bei den verwendeten Spin-Echo-Experimenten kann allerdings nur wenig Kontrast zwischen fetalem Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe erzeugt werden, da sich diese Gewebetypen nur geringfügig in ihren Spin-Dichten unterscheiden. Da man diese Gewebe somit in den NMR-Bildern nur schwer voneinander abgrenzen kann, ist es hier meistens nötig, angefärbte histologische Schnitte zu verwenden, um zusätzliche Informationen zu erhalten (vgl. Abbildung 6-7).

In speziellen Fällen jedoch, wie z.B. den Knochen in den Flippern und den Rippen, kann man die einzelnen knöchernen Strukturen in den NMR-Bildern erkennen und eindeutig voneinander unterscheiden, da sie an dieser Stelle nur von sehr wenig Muskel- und Bindegewebe umgeben sind. Im speziellen Fall der Flipper sind neben Elle (Ulna) und Speiche (Radius) sogar die Handwurzel- und die Fingerknochen der Delphine zu erkennen (siehe Abbildung 6-8).

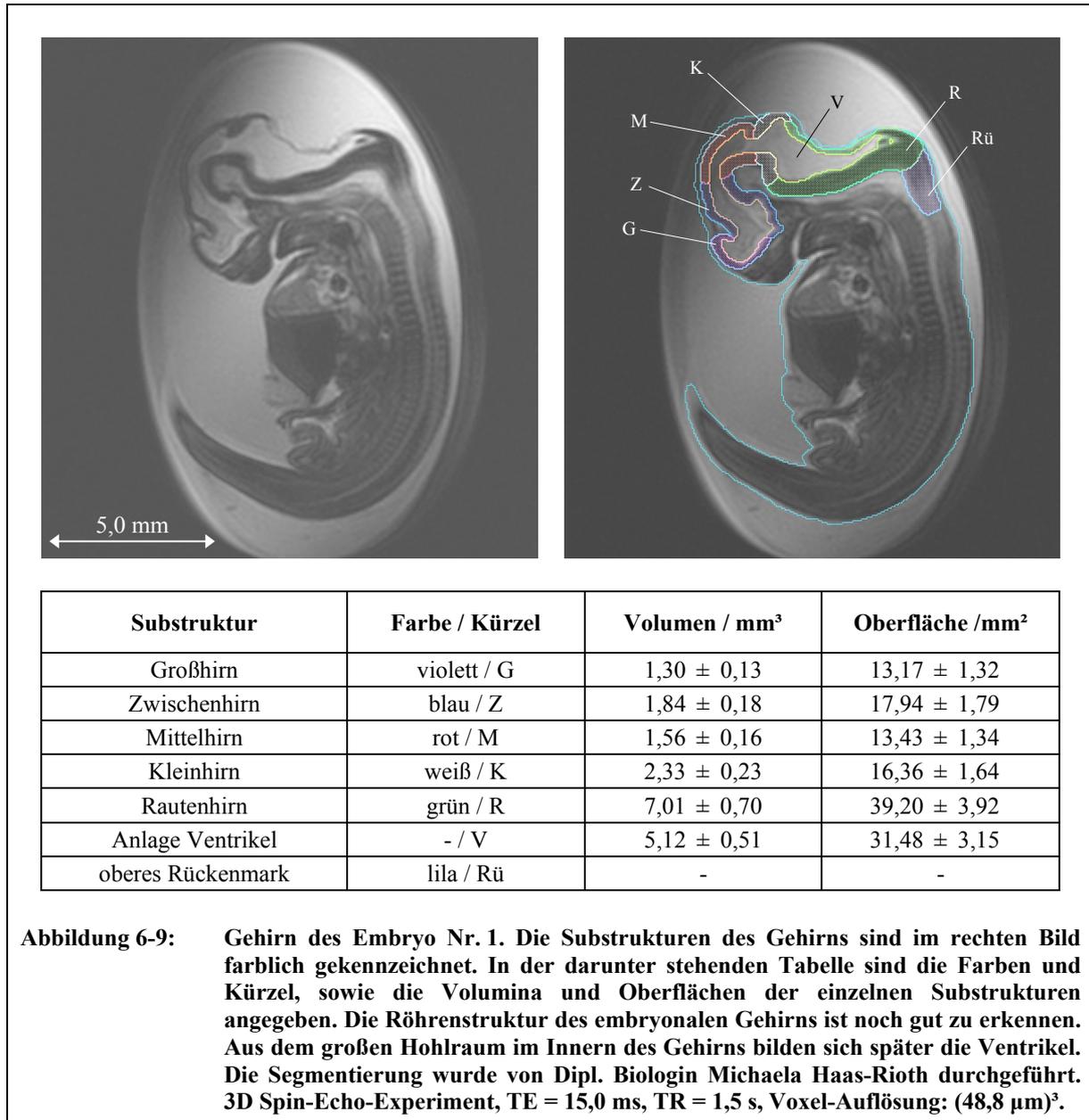


Mit anderen Bildgebungssequenzen bzw. Experimentparametern ist es allerdings möglich Gewebe ähnlicher Spin-Dichte in NMR-Bildern zu unterscheiden. Knochen, Knorpel und Bindegewebe sind wahrscheinlich in diffusionsgewichteten Bildern besser voneinander unterscheidbar.

Gehirn

Im Schädel und der Wirbelsäule des Embryos Nr. 1 sind verschiedene Bereiche des Zentralnervensystems zu erkennen. Das Gehirn des Embryos ist noch röhrenförmig und ähnelt dem anderer Säugetier-Embryos der gleichen Größe. Aufgrund des ausgeprägten Längenwachstums des Gehirns ist dieses teilweise schon gefaltet (vgl. Abbildung 6-9). Die Gehirnwand ist noch relativ dünn und das Vorderhirn (Prosencephalon, untergliedert in Großhirn (Telencephalon) und Zwischenhirn (Diencephalon)) ist noch klein und macht weniger als ein Drittel des Gehirnvolumens aus. Das restliche Volumen des Gehirns besteht

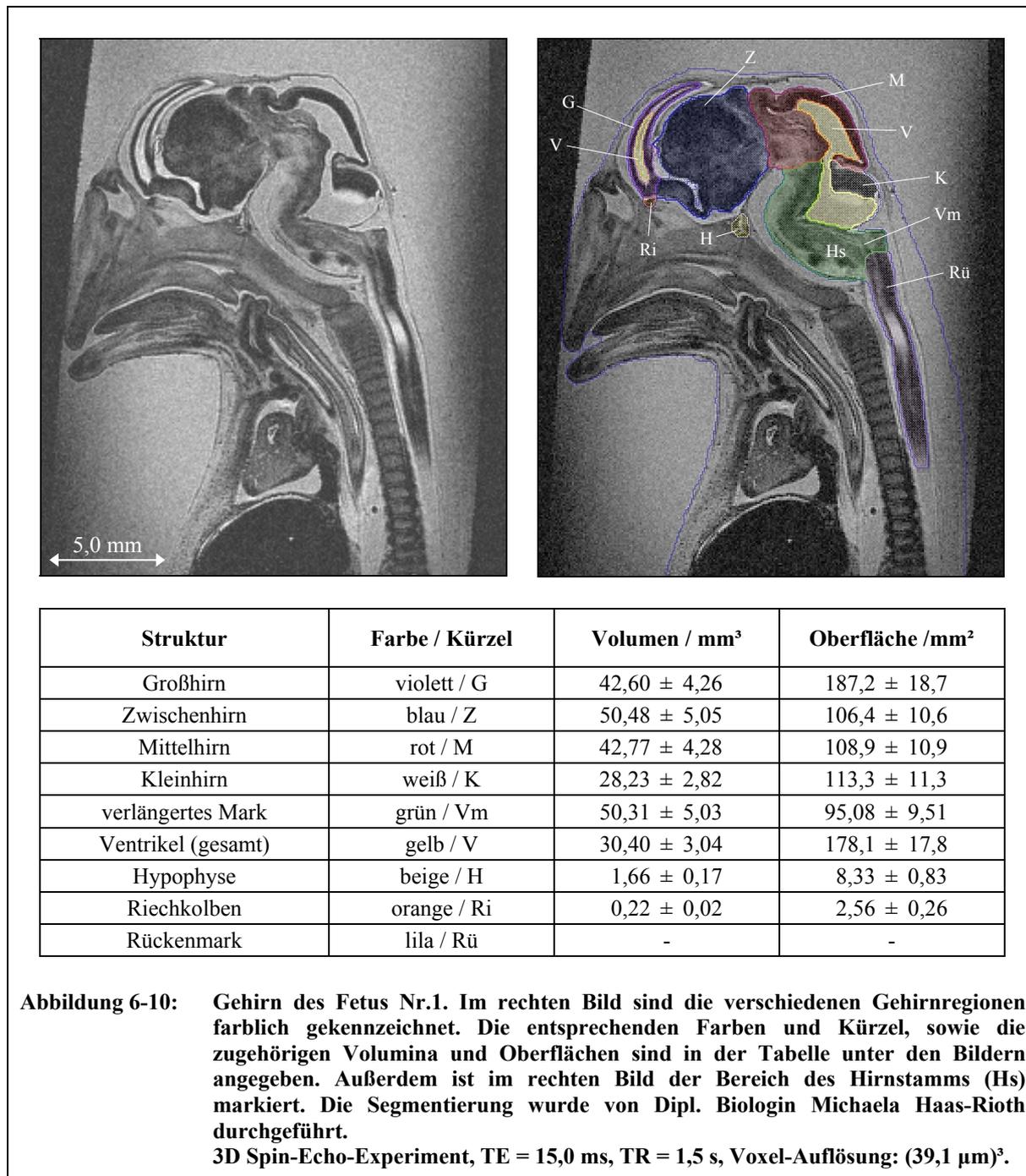
aus Rautenhirn bzw. Rautengrube (Rhombencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon), Kleinhirn (Metencephalon) und verlängertem Mark (Myelencephalon) [Oel-98].



Das Gehirn des Fetus Nr. 1 entspricht in seiner groben Form und Struktur dem von Zahnwalen in ähnlichen Entwicklungsstadien [Kam-74b, Oel-98]. Aufgrund des deutlichen Längenwachstums der verschiedenen Gehirnregionen, die zu starken Faltungen führen, erscheint das Gehirn als sehr viel kompaktere Struktur als beim Embryo Nr. 1. Außerdem ist die Gehirnwand deutlich dicker ausgeprägt und verringert dadurch gleichzeitig das Volumen des Ventrikelsystems.

Die Unterteilung des Gehirns in Großhirn (Telencephalon), Zwischenhirn (Diencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon), Kleinhirn (Metencephalon) und verlängertes Mark (Myelence-

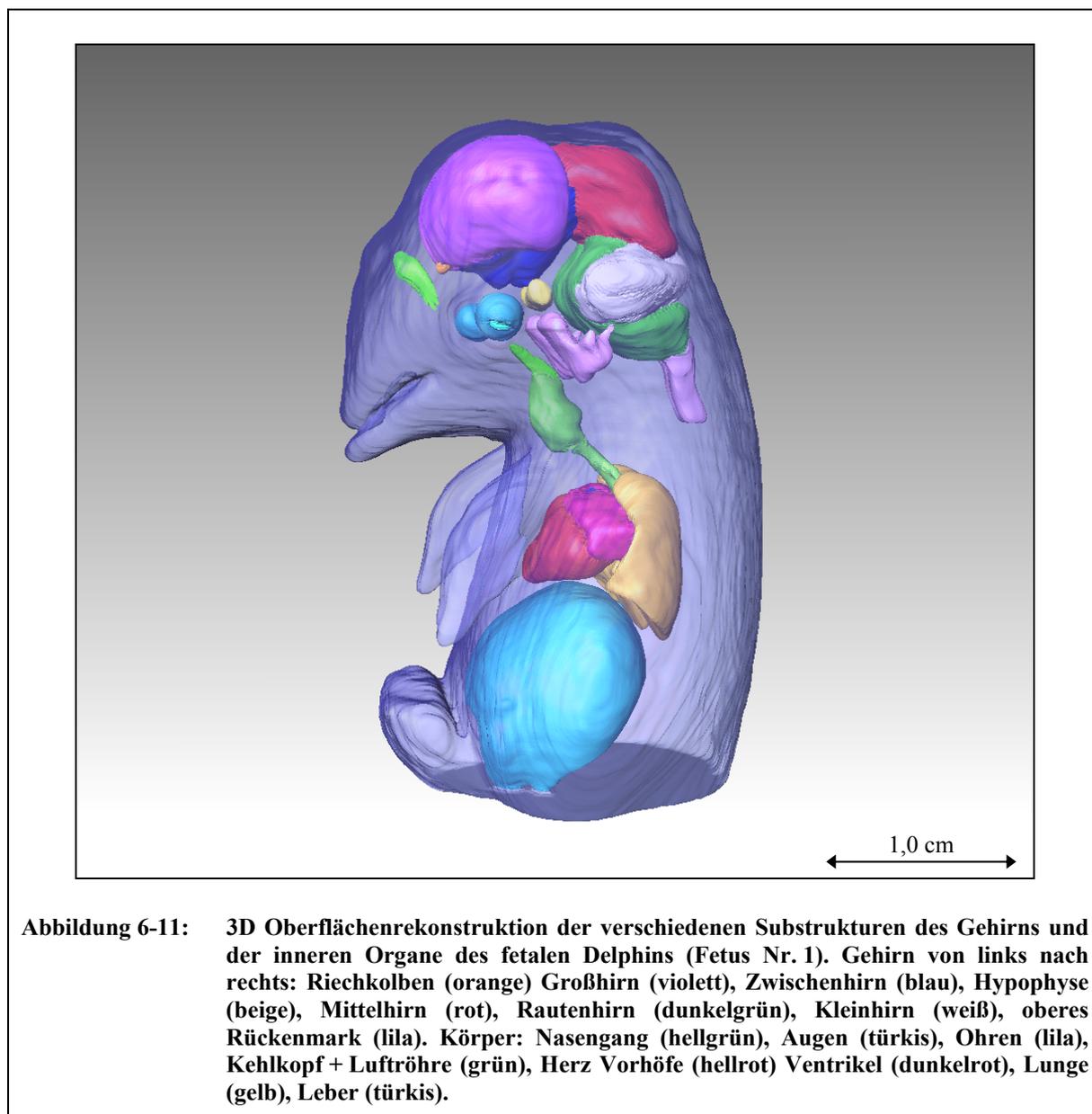
phalon) ist in den NMR-Bildern sehr gut zu erkennen (vgl. Abbildung 6-2, Abbildung 6-10). Im Kopf kann man außerdem die Nervenfasern mit den größten Durchmessern sehen, z.B. die Gehör und Gleichgewichtsnerven (vgl. Abbildung 6-14).



Da es wegen der begrenzten räumlichen Auflösung in den NMR-Bildern teilweise schwierig ist, einzelne Gehirnstrukturen von dem sie umgebenden Gewebe (Hirnhäute) abzugrenzen, beinhalten einige der manuell segmentierten Strukturen (Hypophyse, Kleinhirn, Rautenhirn)

auch die Hirnhäute und erscheinen in den Oberflächenrekonstruktionen deswegen etwas zu groß.

Aufgrund der besonderen Bedeutung der speziellen Merkmale des frühen fetalen Gehirns für die Erforschung der Stammesgeschichte der Zahnwale soll hier auf einige außergewöhnliche Details des Delphingehirns eingegangen werden (vgl. Abbildung 6-10).

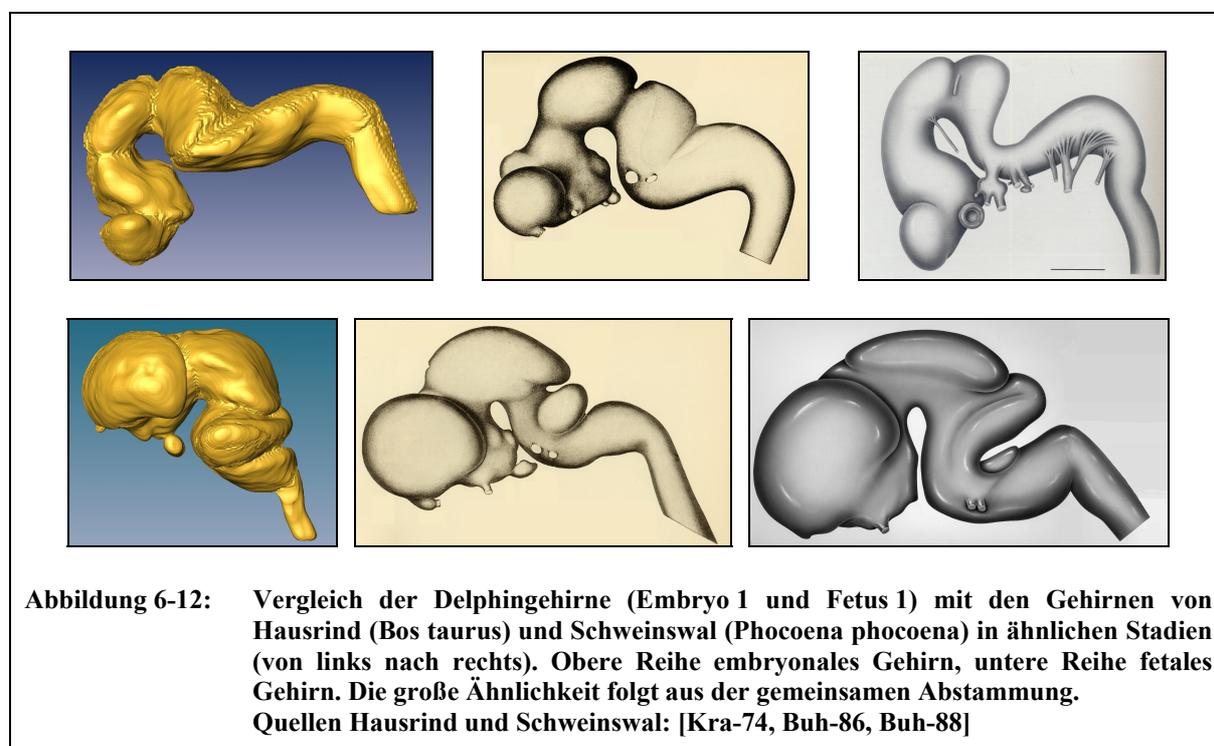


Im untersuchten Fetus Nr. 1 ist z.B. wie oben beschrieben noch der Riechkolben zu sehen, während diese Struktur in adulten Walen vollkommen verschwunden ist [Oel-98]. Die Gehirnhälften sind relativ klein und ihre Wände sind noch ziemlich dünn, werden aber später weiter differenzieren, um die Großhirnrinde zu bilden, die die größte Struktur im Gehirn des adulten Delphins darstellt. Sowohl in den NMR-Bildern, als auch in den histologischen

Schnitten haben die beiden Großhirnhälften begonnen, caudalwärts (nach hinten Richtung Schwanzflosse) zu wachsen und alle angrenzenden Gehirnbereiche zu umschließen. Außerdem ist die deutlich zu beobachtende Verdickung des Gehirnstammes aufgrund der nach innen wachsenden auf- und absteigenden Nervenfaserbündeln ein weiteres charakteristisches Merkmal der Zahnwale.

Aufgrund des hohen Wassergehalts des Gewebes, zeigt embryonales und frühes fetales Gewebe, besonders Nervengewebe, ein ausgeprägtes Schrumpfungsverhalten während der Fixierung und der Präparation für die histologischen Schnittserien. Deswegen kann man z.B. in den histologischen Schnitten um die Großhirn-Hemisphären herum einen deutlich größeren Zwischenraum (Subarachnoidalraum) zwischen den Hirnhäuten und dem eigentlichen Hirngewebe erkennen als in den NMR-Bildern (vgl. Abbildung 6-7). Die zusätzliche Dehydrierung des Gewebes bei der Präparation für die histologischen Schnitte in Form einer Alkohol-Zwischenmedium-Paraffin-Austauschserie führt wahrscheinlich zu einer zusätzlichen Schrumpfung des extrem empfindlichen Nervengewebes, während das umgebende, aus Bindegewebe, Knorpel und Knochen bestehende, stabilere Gewebe dieser zusätzlichen Schrumpfung nicht unterliegt [Bli-68].

Abbildung 6-12 zeigt Oberflächenrekonstruktionen der Gehirne der beiden Delphine im Vergleich mit Oberflächendarstellungen von Gehirnen des Hausrinds und des Schweinswals in ähnlichen Entwicklungsstadien. Die große Ähnlichkeit in der äußeren Form der Gehirne der unterschiedlichen Tiere weist auf ihre gemeinsame Abstammung hin.



Atemwege

Bei den Feten Nr. 1 und Nr. 3 sind die Nasengänge aufgrund ihrer mit Flüssigkeit gefüllten Hohlräume sowohl in den NMR-Bildern als auch in den histologischen Schnitten klar zu erkennen. Sie befinden sich relativ zur Schädelbasis in einer nahezu vertikalen Position vor dem Gehirn, genau wie beim adulten Delphin (vgl. Abbildung 6-13). Dorsal (rückwärtig) vom Nasenschädel besitzt jeder Nasengang zwei schmale Fortsätze, einen nach vorne und einen nach hinten gerichteten. Der nach vorne ragende Fortsatz scheint die Anlage des Praemaxilla-Sacks darzustellen, während der nach hinten reichende Fortsatz wahrscheinlich das Ende der Anlage des Nasofrontal-Sacks ist. Obwohl die Vestibular-Säcke die größten nasalen Hohlräume des adulten Delphins sind, waren ihre Anlagen in den Bildern nicht zu sehen. Da diese großen und wichtigen Nasensäcke an der Erzeugung und Aussendung der Sonarwellen beteiligt sind [Cra-96] ist es überraschend, dass sie im Gegensatz zu anderen Strukturen, wie z.B. dem Nasenskelett, noch kaum entwickelt sind.

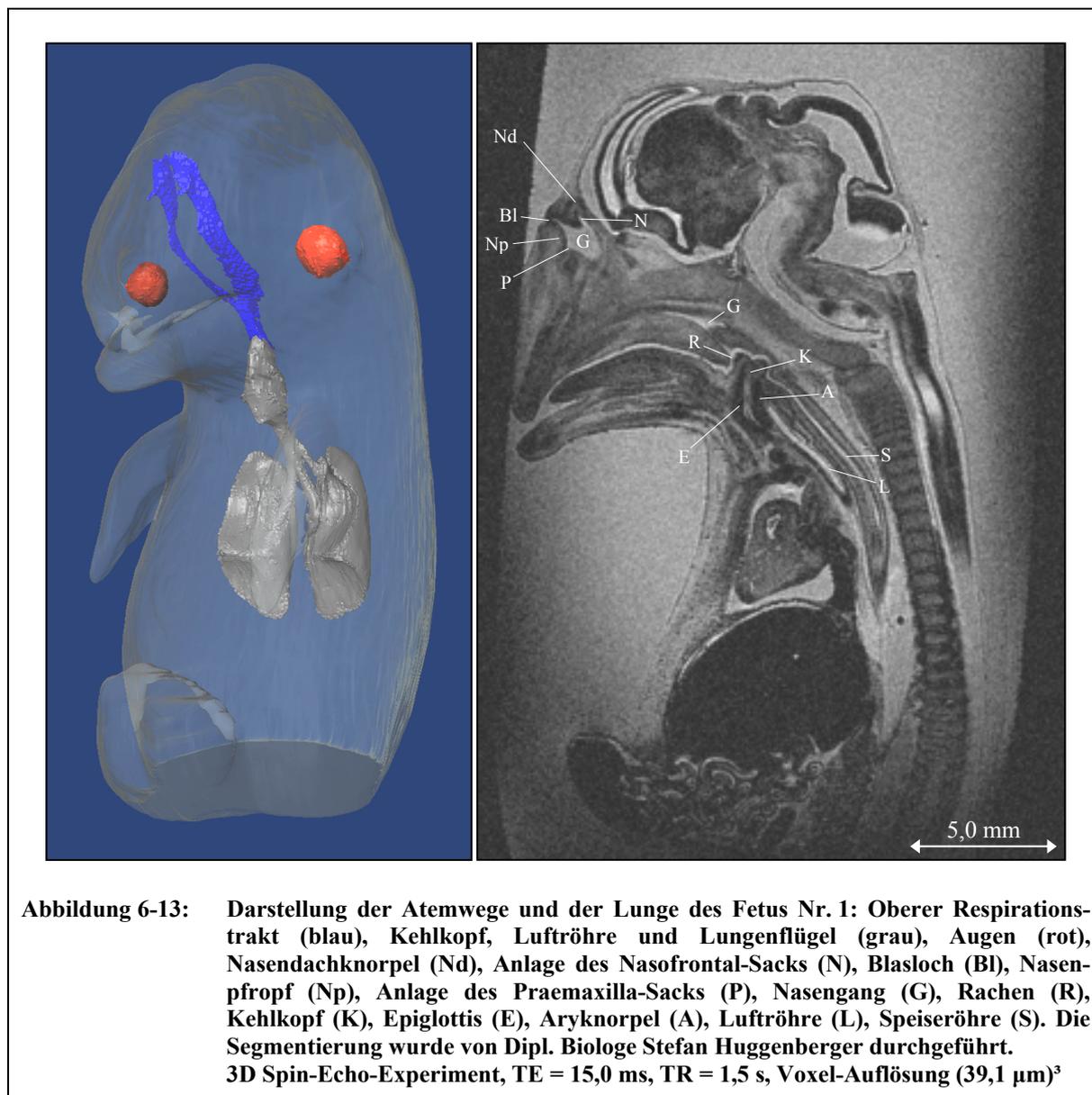
Die in adulten Delphinen zum Teil zurückgebildeten Nasenknorpel [Kli-99] sind in einigen NMR-Bildern zu sehen. Allerdings ist Knorpel, wie zuvor beschrieben, nur schwer von Knochen und Bindegewebe zu unterscheiden. Die Komplexität dieser Strukturen kann in den akquirierten NMR-Bildern daher nur bedingt beobachtet werden.

Die Hohlräume des Kehlkopfes (Larynx) und der Luftröhre (Trachea) sind in den NMR-Bildern wieder deutlich zu erkennen, während die meisten Knorpel dieser beiden Strukturen nur in den histologischen Schnitten eindeutig identifizierbar sind. Mit Ausnahme der breiten Verbindung des Nasenrachenraumes (Nasopharynx), der sowohl in den NMR-Bildern als auch in den histologischen Schnitten zu erkennen ist, scheint dieses Gewebe auch kaum geschrumpft zu sein. Bei der manuellen Segmentierung der dreidimensionalen NMR-Datensätze wurde deswegen an der distalen (von der Körpermitte abgewandten) Spitze des verlängerten Kehlkopfes eine künstliche Grenzlinie zwischen dem oberen Respirationstrakt und dem Rachen (Pharynx) eingefügt, um Nasengang und Rachen voneinander abzugrenzen. Die beobachtete deutliche Verlängerung des Kehlkopfes durch die beiden Knorpel Kehldeckel (Epiglottis) und Stellknorpel (Aryknorpel) ist ein weiteres typisches Merkmal der Zahnwale, das eine vollständige Trennung der Luftröhre von der Speiseröhre sicherstellt [Rei-94].

Lunge

Bei den Zahnwalen befindet sich die Lunge im rückwärtigen Teil des Thorax (Brustkorb). Das Zwerchfell ist schräg zur Schnabel-Schwanzflossen-Achse ausgerichtet [Rey-02]. Beide Eigenschaften sind wahrscheinlich Anpassungen an das durch den hohen Druck von außen verursachte Zusammenpressen des Brustkorbs während der tiefen Tauchgänge, zu denen Wale in der Lage sind [Koo-69]. Im NMR-mikroskopisch untersuchten Fetus Nr. 1 befinden sich die beiden Lungenflügel schon in ihrer endgültigen (dorsalen) Position, sind jedoch noch relativ klein, so dass der mit Flüssigkeit gefüllte und immer noch sehr breite 'Pleura-Hohlraum' ein starkes Signal liefert, während das Lungengewebe selbst nur ein Signal geringer Intensität erzeugt. Andererseits war die manuelle Segmentierung der Lunge gerade

deswegen vergleichsweise einfach und eindeutig. Da die Lungen bei Säugetieren erst in der späten fetalen Entwicklung bis zur Innenwand des Brustkorbs heranreichen und den Pleura-Hohlraum auf den bei adulten Tieren vorhandenen Pleura-Spalt reduzieren [Dun-90], ist der breite in den NMR-Bildern zu sehende Pleura-Hohlraum wahrscheinlich kein während der Fixierung aufgetretenes Schrumpfungartefakt.



Dass bei Zahnwalen der rechte Lungenflügel größer ist als der linke [Arv-77], bestätigen die beim Fetus Nr.1 aus den Oberflächenrekonstruktionen der Lungenflügel berechneten Oberflächen und Volumina in Tabelle 6-2.

Außerdem kann man in den NMR-Bildern sehen, dass die Lunge des Fetus Nr. 1 nicht aus einzelnen Lappen besteht, ein weiteres Merkmal, das die Wale von anderen Säugetieren, auch dem Menschen, unterscheidet [Rob-94].

Da die Streckung und die Längsdehnung des Körpers beim untersuchten Fetus Nr. 1 noch nicht abgeschlossen sind, ist dessen Leber im Vergleich zum gesamten Körper noch sehr groß, weshalb das Zwerchfell noch nicht so schräg zur Körperlängsachse ausgerichtet ist wie bei adulten Delphinen.

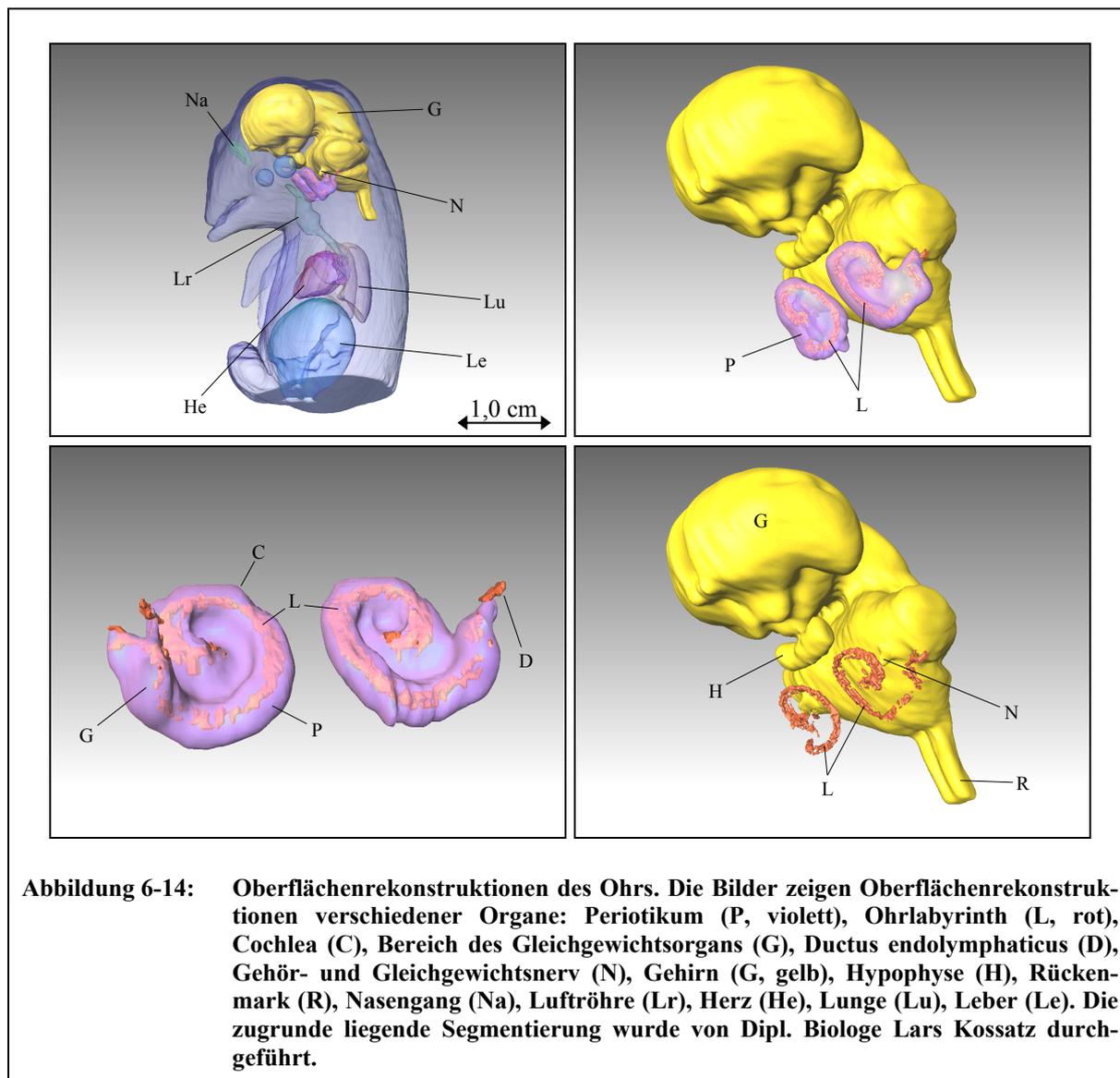
Ohr

Die Ohren der Delphine befinden sich seitlich in der Schädelbasis und bestehen bei adulten Tieren aus den sogenannten tympanischen und periotischen Knochen [Oel-90]. In den NMR-Bildern des Fetus Nr. 1 sind bereits die periotischen Knochen in ihrem fetalen Stadium zu erkennen (siehe Abbildung 6-14). Da die tympanischen Knochen später als Dermalknochen ohne vorhergehende Knorpelphase entstehen, sind sie hier nicht zu sehen.

Die Cochlea (Innenohrschnecke) und der nach hinten ragende Fortsatz, der später die knöcherne Verbindung zwischen Ohrknochen und Schädel darstellt, sind ebenfalls in den NMR-Bildern des Fetus Nr. 1 zu sehen. Die Entkoppelung der Ohrknochen von der Schädelbasis ist in diesem frühen fetalen Stadium noch nicht realisiert. Sie stellt ein weiteres typisches Merkmal der Zahnwale dar und ist eine Anpassung an das Hören unter Wasser [Oel-90].

In den NMR-Bildern kann man in der Cochlea deutlich das mit Flüssigkeit (die Endolymphe) gefüllte Ohrlabyrinth und einen Teil des Endolymphkanals (Ductus endolymphaticus) sehen (vgl. Abbildung 6-14). Deswegen ist es auch möglich, in den dreidimensionalen Oberflächenrekonstruktionen des Ohrs die Bögen der Cochlea zu erkennen. Im Gegensatz dazu liefern die äußeren schon stärker verknöcherten Bereiche des Periotikums nicht genügend Signal, um in den NMR-Bildern sichtbar zu sein. Daher erscheint es in den histologischen Schnitten größer als in den NMR-Bildern.

Die Mittelohrknöchelchen (Hammer, Amboss und Steigbügel) sind nur in den histologischen Schnitten zu erkennen und nicht in den NMR-Bildern - wahrscheinlich, weil der Hohlraum des späteren Mittelohrs immer noch mit äußerst weichem Bindegewebe, dem späteren Corpus spongiosum, angefüllt ist [Gra-89]. Dieses embryonale Bindegewebe umgibt die Mittelohrknöchelchen und 'maskiert' sie in den NMR-Bildern [Oel-02]. Aus diesem Grund sind die Oberflächen- und Volumenberechnungen am Ohr nicht sinnvoll durchzuführen.



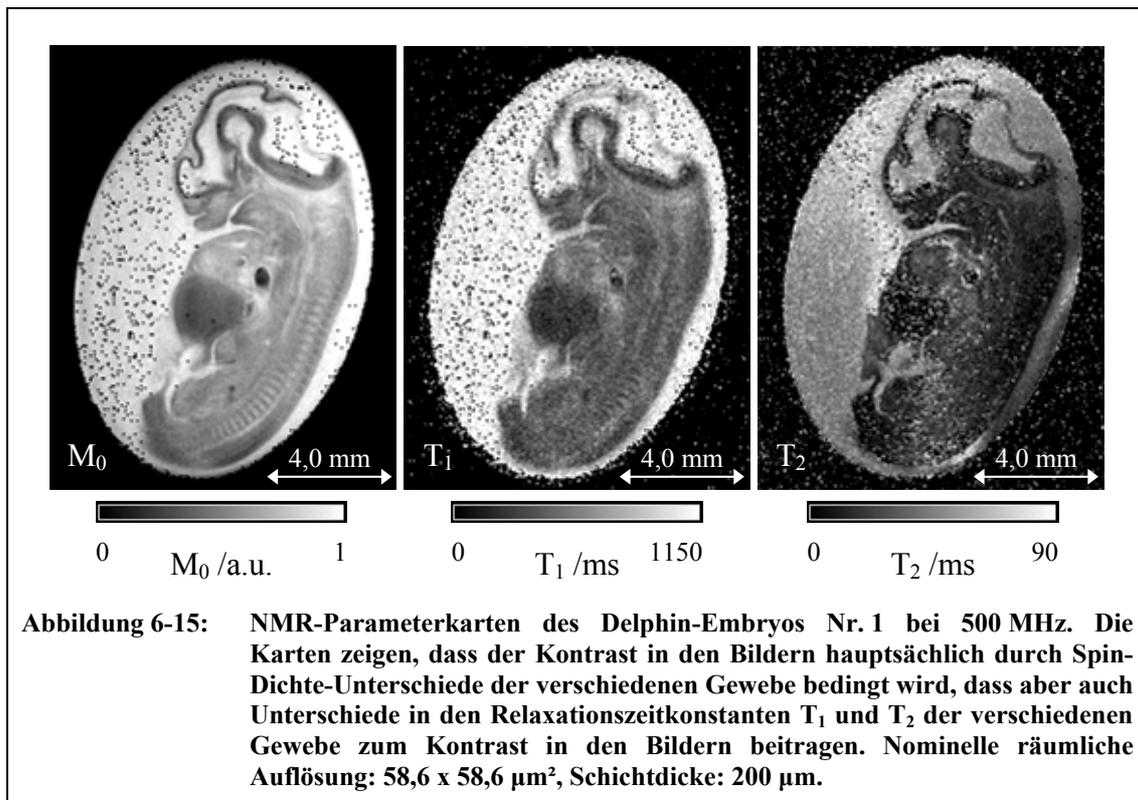
6.3.4 Charakterisierung des Kontrastes in den NMR-Bildern

Der Kontrast in NMR-Bildern fixierter Proben unterscheidet sich vom Kontrast in den Bildern lebenden Gewebes. Wie schon bei der Honigbiene angesprochen (vgl. Unterkapitel 5.1.4.5), entsteht Kontrast zwischen zwei Gewebetypen genau dann, wenn sie sich in mindestens einem ihrer NMR-Parameter unterscheiden. Um den Einfluss der NMR-Parameter Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 und der Spin-Dichte auf den Kontrast in den NMR-Bildern der Delphine zu untersuchen, wurden räumlich hochaufgelöste T_1 -, T_2 -, und M_0 -Karten aufgenommen.

Wie die in Abbildung 6-15 dargestellten Parameterkarten des Embryos Nr. 1 zeigen, beruht der Kontrast in den NMR-Bildern der Delphine hauptsächlich auf Spin-Dichte-Unterschieden zwischen den verschiedenen Gewebetypen. Die M_0 -Karten als Maß für den Einfluss der Spin-Dichte zeigen schon nahezu alle in den NMR-Bildern beobachteten Details. Die

Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 tragen zwar auch zum Kontrast in den Bildern bei, allerdings zu einem geringeren Anteil. Durch teilweise große Unterschiede in den Werten der Relaxationszeitkonstanten aneinandergrenzender Gewebe in feinen Strukturen wird insgesamt der Eindruck eines schärferen Bildes erzeugt. Aufgrund relativ großer Unterschiede in den T_2 -Werten benachbarter Gewebe, ist deren T_2 -Kontrast ausgeprägter als der T_1 -Kontrast. Die Unterschiede in den T_1 -Werten der einzelnen Strukturen fallen zwar geringer aus, sie sind aber immer noch deutlich genug, um sogar kleinere Strukturen als in der T_2 -Karte erkennen zu können. Daher ist in der T_1 -Karte eine größere Anzahl feiner Strukturen unterscheidbar.

Wie schon bei der Visualisierung des Bienengehirns, bestätigt sich auch hier die zuvor bestimmte 'beste' Kombination aus Echozeit T_E und Repetitionszeit T_R . Die für die dreidimensionalen Datensätze verwendete Repetitionszeit von 1,5 s stellt einen Kompromiss dar zwischen einer möglichst ausrelaxierten Probe und der T_1 -Wichtung der Bilder. Im Vergleich zu den Bildern des Bienengehirns wurde hier jedoch ein etwas stärkerer T_1 -Kontrast gewählt. Darüber hinaus bewirkt die relativ lange Echozeit von 15 ms einen T_2 -Kontrast in den Bildern. Die Ausnutzung der relaxationszeitbedingten Kontraste bedeutet zwar einen geringen Signalverlust, der im vorliegenden Fall aber wegen des ausreichend starken Signals in Kauf genommen werden kann.



Die Parameterkarten zeigen, dass der Ursprung des Kontrastes in den NMR-Bildern berücksichtigt werden sollte, wenn die Vorteile und Grenzen der NMR-Mikroskopie für deren Einsatz in einer speziellen Studie abgeschätzt werden sollen. Bei Geweben mit deutlichen

Unterschieden in ihren Spin-Dichten kann die NMR-Mikroskopie detailreiche und räumlich hochaufgelöste Bilder liefern. Wenn die Gewebe jedoch ähnliche Spin-Dichten besitzen, wie das z.B. bei Knorpel und Bindegewebe der Fall ist, so sind diese in den akquirierten Bildern nur schwer voneinander zu unterscheiden. Gegebenenfalls kann der Einsatzbereich der NMR-Mikroskopie durch die Verwendung anderer NMR-Sequenzen, unter Ausnutzung weiterer Kontrastmechanismen, sogar noch vergrößert werden.

6.4 Zusammenfassung

Das in diesem Kapitel vorgestellte Projekt ist eine der wenigen Studien, die sich mit prenatalen Delphinen beschäftigen. Die Zahl der an prenatalen Delphinen durchgeführten NMR-mikroskopischen Untersuchungen ist nochmals deutlich geringer, so dass das durchgeführte Projekt auch den Charakter einer Machbarkeits-Studie besaß. Im Vergleich zu den bisher durchgeführten NMR-Studien an prenatalen Delphinen [z.B. Mar-01] waren die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Delphine wesentlich jünger und somit auch kleiner und fragiler. Durch den Einsatz der NMR-Mikroskopie konnten beide Präparate darüber hinaus mit einer deutlich höheren räumlichen Auflösung untersucht werden als das bei den in der Literatur beschriebenen NMR-Untersuchungen an prenatalen Delphinen der Fall war, was die Visualisierung auch kleinster anatomischer Strukturen erlaubte.

In den akquirierten NMR-Bildern des späten Delphin-Embryos und des frühen Delphin-Fetus ist deren Anatomie klar zu erkennen. Die detailreiche Visualisierung der prenatalen Delphine und die größtenteils eindeutige Abgrenzung der anatomischen Strukturen von dem sie umgebenden Gewebe erlaubte sogar eine komplette Segmentierung der wichtigsten Organe. Die Größe der Oberflächen und Volumina der segmentierten Organe konnte anschließend anhand der aus den segmentierten Datensätzen berechneten dreidimensionalen Oberflächenrekonstruktionen bestimmt werden.

Somit war es möglich, den Aufbau und die innere Struktur der beiden prenatalen Delphine räumlich hochaufgelöst zu untersuchen, ohne diese seltenen Museumsstücke dabei durch die Messung zu verändern oder zu beschädigen.

Natürlich zeigt der Vergleich der Ergebnisse der NMR-mikroskopischen Untersuchung mit den Ergebnissen der herkömmlichen histologischen Untersuchungen, dass letztere es erlauben zusätzliche morphologische Details zu visualisieren. Unter einem Mikroskop ist es möglich, in einem histologischen Schnitt einzelne Zellen und sogar deren Zellkerne zu erkennen. Die Markierung verschiedener Gewebetypen und Organe mit Hilfe diverser Farbstoffe vereinfacht außerdem die Unterscheidbarkeit und das Verständnis komplexer Strukturen. Diese zusätzlichen Details können allerdings nur dargestellt werden, wenn dabei die untersuchten seltenen Objekte aufgeschnitten oder ganz zerstört werden.

Darüber hinaus zeigen die untersuchten histologischen Schnitte, dass deren Präparation, das Anfärben des Gewebes und der Schneidprozess teilweise zu zusätzlichen Artefakten führen,

die bei den NMR-mikroskopischen Untersuchungen vermieden werden konnten. Bei den Schnittserien konnten z.B. zusätzliche Schrumpfung des Gewebes nach der ursprünglichen Fixierung und Deformationen des Gewebes durch den Druck der Klinge beim Schneiden beobachtet werden. Das Anfärben des Gewebes mit einem bestimmten Farbstoff ist ebenfalls ein irreversibler Prozess. Weil die meisten Farbstoffe zudem nicht miteinander kombinierbar sind, kann jede Probe nur ein einziges Mal und auf genau eine bestimmte Weise angefärbt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, zahlreiche Details anatomischer Strukturen zu visualisieren, ohne die seltenen Museumsstücke zu zerstören, stellt die NMR-Mikroskopie in der Entwicklungsbiologie der Wale eine alternative und ergänzende Untersuchungsmethode zur konventionellen Histologie dar. Je nach Fragestellung des speziellen Projektes kann entschieden werden, ob die aus den NMR-Bildern ablesbaren Informationen ausreichen, oder die bessere räumliche Auflösung der histologischen Schnitte und eine entsprechende Anfärbung des Gewebes nötig sind.

Dabei ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass die NMR es ermöglicht, eine einzelne Probe mehrfach zu untersuchen und dass dabei auch ohne Kontrastmittel unterschiedliche Kontraste erzielt werden können. Durch die Verwendung von NMR-Kontrastmitteln kann der Einsatzbereich der NMR-Mikroskopie in der Entwicklungsbiologie zusätzlich vergrößert werden [Joh-02].

Zudem konnten in der vorliegenden Arbeit durch die Akquisition und anschließende Segmentierung echter dreidimensionaler Datensätze Oberflächenrekonstruktionen der verschiedenen Organe berechnet werden. Da bei konventionellen histologischen Untersuchungen größere Proben meist in mehrere Blöcke unterteilt werden, kann Versatz zwischen den einzelnen Blöcken auftreten. Außerdem müssen die oben erwähnten beim Schneideprozess auftretenden zusätzlichen Deformationen nicht in allen Blöcken gleich stark ausfallen. Deswegen ist hier die NMR-Mikroskopie im Rahmen ihres räumlichen Auflösungsvermögens der konventionellen Histologie überlegen.

Weil eine NMR-mikroskopische Untersuchung darüber hinaus in kürzerer Zeit durchgeführt werden kann als eine histologische Untersuchung mit ihrer zeitintensiven Präparation, kann die NMR-Mikroskopie auch dazu eingesetzt werden, eine große Anzahl pränataler Wale in kurzer Zeit zu untersuchen. Aus den akquirierten NMR-Bildern können dann direkt Aussagen über die Entwicklung der pränatalen Wale getroffen werden, die sich auf deren Grobstruktur bzw. auf Strukturen im Rahmen des räumlichen Auflösungsvermögens der NMR-Experimente beziehen. Zusätzlich kann anhand der NMR-Bilder eine Auswahl aus den untersuchten Proben getroffen werden, die sich in besonders interessanten Stadien befinden und einen guten Erhaltungsgrad des Gewebes zeigen. Diese kleine Anzahl von Proben kann mittels konventioneller Histologie weiter untersucht werden, um zusätzliche Informationen zu erhalten. Die Summe der Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden basiert somit auf den Beobachtungen einer möglichst großen Zahl verschiedener Entwicklungsstadien und liefert

folglich ein vollständigeres Bild der prenatalen morphologischen Entwicklung, als dies mit einer einzelnen Untersuchungsmethode in derselben Zeit möglich wäre.

Je nach Beschaffenheit des zu untersuchenden Gewebes können die mit der NMR-Mikroskopie erzielbaren Resultate auch schon vor der Durchführung einer kompletten Studie durch die Akquisition einzelner NMR-Parameterkarten abgeschätzt werden. Wie aus den in der vorliegenden Arbeit akquirierten NMR-Parameterkarten bestimmt werden konnte, beruhte der Kontrast in den NMR-Bildern der fixierten prenatalen Delphine hauptsächlich auf Spin-Dichte-Unterschieden der verschiedenen Gewebe. Die Unterschiede der Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 dieser Gewebe trugen auch zum Kontrast in den Bildern bei, besaßen aber einen deutlich geringeren Einfluss. Das gewählte Spin-Echo-Experiment ist sehr sensitiv auf Spin-Dichte-Unterschiede und erlaubte zum Beispiel die verschiedenen Gehirnbereiche klar voneinander abgegrenzt zu visualisieren. Weil sich bei den fixierten Delphinen Regionen mit Knochen, Knorpel und Bindegewebe in keinem der drei untersuchten NMR-Parameter unterschieden, war es mit dem gewählten NMR-Experiment nur bedingt möglich, diese Gewebe voneinander abzugrenzen. Somit kann schon im Vorfeld einer Studie bestimmt werden, ob der Einsatz der NMR-Mikroskopie zu den gewünschten Ergebnissen führen wird, oder ob für die spezielle Fragestellung besser die konventionelle Histologie eingesetzt werden sollte. Dritte Methoden, wie die Röntgen-Computertomographie, sind bei den geringen Dichteunterschieden dieser prenatalen Gewebe ebenfalls nur bedingt einsetzbar.

Weiterführende Untersuchungen mit Kontrastmitteln und anderen NMR-Sequenzen müssen zeigen, wie die Anwendbarkeit der NMR-Mikroskopie in der Entwicklungsbiologie vergrößert werden kann. Die Unterscheidung von Knochen, Knorpel und Bindegewebe könnte z.B. in diffusionsgewichteten NMR-Bildern möglich sein.

Insgesamt ist dabei immer wieder zu betonen, daß die NMR-Mikroskopie die innere Struktur der untersuchten seltenen Museumsstücke nicht-invasiv abbilden kann, während eine konventionelle histologische Untersuchung immer die Integrität dieser Exemplare zerstört.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Dank der technischen Weiterentwicklung der NMR-Geräte in den letzten Jahren sind heute isotrope räumlichen Auflösungen von wenigen Mikrometern mit modernen NMR-Spektrometern routinemäßig realisierbar. Deshalb befindet sich die ^1H -NMR-Mikroskopie gerade jetzt am Beginn einer Entwicklung, bei der sich zahlreiche neue Anwendungsgebiete der NMR-Mikroskopie ergeben. Besonders im Bereich der medizinischen in-vitro Forschung und der Biologie liegen vielfältige neue Möglichkeiten für den Einsatz der NMR-Mikroskopie bei der Untersuchung kleiner biologischer Proben. Dies beruht hauptsächlich auf dem für Weichteilgewebe fast frei einstellbaren Kontrast in den Bildern und dem nicht-invasiven Charakter der NMR. Aufgrund der erzielbaren hohen räumlichen Auflösung und dem ausgeprägten Kontrast in den NMR-Bildern kann die NMR-Mikroskopie heute z.B. schon bei vielen Fragestellungen mit der konventionellen Histologie konkurrieren. Andererseits sind die Möglichkeiten und Grenzen der NMR-Mikroskopie bezüglich ihrer praktischen Anwendbarkeit bisher nur wenig untersucht worden. Es muss daher erst noch gezeigt werden, auf welchen Gebieten sie als Alternative bzw. Ergänzung zu den bestehenden Routineuntersuchungsmethoden etabliert werden kann und worin die speziellen Vorteile dieser Methode gegenüber anderen Methoden im praktischen Einsatz liegen.

Die vorliegende Arbeit ist im Bereich der biophysikalischen Grundlagenforschung angesiedelt und sollte die praktische Anwendbarkeit der NMR-Mikroskopie auf neuen medizinischen und biologischen Anwendungsgebieten anhand von ausgewählten Beispielen aus diesen Bereichen demonstrieren. Daraus ergibt sich ebenfalls, dass die einzelnen Projekte immer auch den Charakter von Machbarkeitsstudien besaßen, die aufzeigen sollten welche Möglichkeiten und Vorteile die NMR-Mikroskopie im Vergleich zu etablierten Untersuchungsmethoden bietet. Andererseits wurden dabei aber auch immer die Grenzen der NMR-Mikroskopie untersucht, um in den neuen Anwendungsgebieten nicht nur prinzipiell die Durchführbarkeit von NMR-Mikroskopieexperimenten zu demonstrieren, sondern konkret den praktischen Nutzen der Anwendung der NMR-Mikroskopie in diesen Gebieten zu beschreiben.

Im Detail sollten unterschiedliche lebende und fixierte biologische Proben mittels NMR-Mikroskopie zerstörungsfrei und räumlich hochaufgelöst dargestellt werden. Dabei variierte die spezielle Zielsetzung von der Visualisierung der Invasion eines Tumorsphäroiden in ein Zellaggregat anhand von T_2 -Parameterkarten (Zeitkonstante der Spin-Spin-Relaxation) über die dreidimensionale Darstellung des Gehirns der Honigbiene in der intakten Kopfkapsel bis hin zur Abbildung der Anatomie prenataler Delphine.

Für alle durchgeführten Projekte war der nicht-invasive Charakter der NMR-Experimente von entscheidender Bedeutung. Die zu beobachtende Tumordinvasion sollte nicht durch die Messung beeinflusst werden, das Bienehirn sollte möglichst naturgetreu abgebildet

werden, und die untersuchten Delphine sind seltene Museumsstücke, die nicht zerstört werden durften.

Die verschiedenen Proben wurden mit der jeweils bestmöglichen räumlichen Auflösung visualisiert, die sich entweder durch das minimal nötige Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) oder durch die zur Verfügung stehende Messzeit ergab. Um einzelne feine Strukturen in den Bildern auflösen zu können, mussten sowohl das SNR als auch das Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis optimiert werden.

Tumorsphäroide

Das erste Projekt befasste sich mit der Beobachtung des Invasionsprozesses von Tumorsphäroiden in Aggregate aus fetalen Rattenhirnzellen (Konfrontationskulturen). Tumorsphäroide sind ein wichtiges in-vitro Modell in der Tumorforschung, da sie eine ähnliche Morphologie besitzen wie menschliche Tumoren.

Zur Beobachtung der Tumordinvasion wurde eine neue Perfusionsapparatur mit senkrecht angeordnetem Probenröhrchen konstruiert. Dadurch konnten Probleme aus vorangegangenen Arbeiten gelöst und Serienmessungen realisiert werden. Mit der neuen Apparatur war es möglich, die gesamte Tumordinvasion – vom ersten Kontakt der Tumorzellen mit den Rattenhirnzellen bis zum Abschluss des bis zu 48 Stunden dauernden Invasionsvorgangs – kontinuierlich mit der NMR-Mikroskopie unter Zellkulturbedingungen zu beobachten. Außerdem konnten Therapiesimulationen mit bestrahlten Tumorsphäroiden durchgeführt werden. Der Einsatz von Pharmaka während der Tumordinvasion ist mit der entwickelten Perfusionsapparatur ebenfalls möglich.

Aufgrund der erreichten hohen nominellen räumlichen Auflösung von $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ in der Bildebene bei einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$, konnte der Invasionsprozess schon anhand der Veränderung der äußeren Form der Konfrontationskulturen beobachtet werden. Darüber hinaus war es mit den akquirierten T_2 -Parameterkarten der gleichen räumlichen Auflösung möglich, vitales von nekrotischem Gewebe zu unterscheiden. Die nekrotischen Gewebereiche besaßen signifikant höhere T_2 -Werte, die um über 20 % größer waren als die T_2 -Werte vitaler Bereiche.

Im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten am Lehrstuhl mit Tumorsphäroiden wurden kleinere und vitalere C6-Tumorsphäroide einer Rattengliosarkom-Zell-Linie untersucht, die zu Beginn der Messungen noch so klein und vital waren, dass sie keine nekrotischen Bereiche besaßen. Diese entstanden erst im Verlauf des Tumordinvasionsprozesses in die Rattenhirnaggregate. Die hohe Vitalität der verwendeten aggressiven Tumorsphäroide spiegelt sich in den gemessenen niedrigeren T_2 -Werten ihres vitalen Gewebes wider. Anhand der gleichbleibend niedrigen T_2 -Werte in diesen Bereichen konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurden und ihre ursprüngliche hohe Vitalität während der gesamten Tumordinvasion beibehielten. Die Entstehung kleiner nekrotischer Gebiete in den Tumorsphäroiden wurde anhand des Anstiegs der T_2 -Werte in diesen Bereichen frühzeitig erkannt und quantifiziert und konnte somit NMR-mikroskopisch

beobachtet werden. Obwohl diese Bereiche aufgrund ihrer erhöhten T_2 -Werte eindeutig von vitaleren Bereichen unterschieden werden konnten, besaßen sie immer noch eine hohe Vitalität, wie sich an ihren zwar signifikant, aber trotzdem um nur 20 % erhöhten T_2 -Werten und deren geringer Varianz zeigt.

Alle in dieser Arbeit für vitales und nekrotisches Gewebe gemessenen T_2 -Werte und ihre Varianzen passen hervorragend zu den in der Literatur beschriebenen und unter ähnlichen Bedingungen bestimmten T_2 -Werten und entsprechen auch den aufgrund der Morphologie des nekrotischen Gewebes erwarteten Werten.

Therapiesimulationen mit zuvor bestrahlten Tumorsphäroiden runden das erste Projekt dieser Arbeit ab. Bei diesen Messungen konnte ein so stark verlangsamtes Tumorwachstum beobachtet werden, dass die Tumorsphäroide während der gesamten Messzeit von bis zu 48 Stunden nicht in die Rattenhirnaggregate einwuchsen. Außerdem wiesen diese Tumorsphäroide entsprechend dem Grad der Bestrahlung erhöhte T_2 -Werte und größere Varianzen in diesen Werten auf. Die bestimmten T_2 -Werte stiegen darüber hinaus während der Messzeit kontinuierlich an, was auf einen fortschreitenden Gewebeerfall hindeutet.

Insgesamt stellt die neu angefertigte Perfusionsapparatur in Verbindung mit den akquirierten T_2 -Parameterkarten ein empfindliches Instrument zur Charakterisierung des Invasionsprozesses von Tumoren dar. Anhand der T_2 -Werte des Gewebes und deren Varianz kann der Vitalitätsgrad des Gewebes räumlich hochaufgelöst quantitativ gemessen und die Entstehung nekrotischer Bereiche frühzeitig erkannt und beobachtet werden.

Insekten

Das zweite in dieser Arbeit durchgeführte Projekt war die Anwendung der NMR-Mikroskopie bei Insekten. Die erzielten Ergebnisse belegen, dass es möglich ist, anatomische Strukturen innerhalb der intakten Chitinhülle mittels NMR-Mikroskopie abzubilden.

Bei fixierten Bienen konnten feinste Strukturen in der Kopfkapsel visualisiert werden, deren Größe nur knapp oberhalb der nominellen räumlichen Auflösung der NMR-Bilder ($15,6 \times 15,6 \times 30,0 \mu\text{m}^3$) lag. In den Bildern waren die Substrukturen des Gehirns der Biene so klar zu erkennen und eindeutig voneinander zu unterscheiden, dass sie manuell segmentiert werden konnten. Aus den Segmentationsmasken konnten anschließend mit Hilfe von dreidimensionalen Oberflächenrekonstruktionen die Volumina der einzelnen Strukturen berechnet werden.

In dieser Arbeit konnte das Gehirn der Biene zum ersten Mal in seiner natürlichen Form in der intakten Kopfkapsel der Biene abgebildet werden. Somit konnten neben detaillierten Informationen über Form und Volumen der einzelnen Gehirnbereiche auch Informationen über die Ausrichtung der Strukturen zueinander und zur Kopfkapsel gewonnen werden. Der Vergleich mit Messungen der konfokalen Lasermikroskopie an aus der Kopfkapsel herauspräparierten, dehydrierten Bienengehirn ergab, dass das Bienengehirn in der Kopfkapsel nach außen gezogen wird und entsprechend aufgeweitet ist. Wegen der Fixierung des Gehirns unter

dieser Zugspannung und der für die NMR-Messungen ausreichenden schonenderen Präparation des Gewebes, wurden aus den NMR-Bildern größere Volumina für die einzelnen Substrukturen des Bienenhirns bestimmt. Die Berücksichtigung der veränderten Stereo-geometrie und der kleinen, aber signifikanten Volumenunterschiede ist äußerst wichtig für die Erstellung eines 'Standard-Bienenhirns', das das Gehirn in der intakten Kopfkapsel wiedergibt.

Der Ursprung des Kontrastes in Bildern von fixierten Geweben kann sich deutlich von dem in nicht fixiertem Gewebe unterscheiden und ist in der existierenden Literatur bisher kaum beschrieben worden. Deswegen wurde neben der Visualisierung der Anatomie des Bienenhirns auch der Einfluss der Spin-Dichte sowie der Spin-Gitter- und der Spin-Spin-Relaxation auf den Kontrast in den NMR-Bildern untersucht. Dazu wurden räumlich hochaufgelöste NMR-Parameterkarten der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 und der Relaxationszeitkonstanten T_1 und T_2 akquiriert. Aus diesen Karten ging eindeutig hervor, dass der Kontrast in den NMR-Bildern hauptsächlich auf Spin-Dichte-Unterschieden des Gewebes beruht. Die Spin-Gitter-Relaxation besitzt einen geringeren Einfluss und die Spin-Spin-Relaxation trägt nur marginal zum Kontrast in den Bildern bei.

Neben dem fixierten Bienenhirn wurde das Gehirn einer lebenden Hummel NMR-mikroskopisch untersucht (nominelle räumliche Auflösung $15,6 \times 15,6 \mu\text{m}^2$ bei einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$). Hier war es allerdings nur möglich, das Gehirn als Ganzes vom umgebenden Gewebe abzugrenzen. Trotzdem können die akquirierten Bilder sinnvoll eingesetzt werden, da mit ihnen der Grad der Schrumpfung des Gewebes bei der Fixierung bestimmt werden kann und außerdem demonstriert werden konnte, dass mehrstündige NMR-Messungen an lebenden Insekten durchführbar sind. Weitere NMR-Untersuchungen an lebenden Insekten müssen zeigen, ob es, ggf. durch den Einsatz von Kontrastmitteln, möglich ist, das Insektenhirn in-vivo hochaufgelöst abzubilden und dabei einen Kontrast zu erzielen, der eine Visualisierung der Substrukturen des Gehirns erlaubt.

Außer den Gehirnen der Honigbiene und der Hummel wurde auch die Anatomie von fixierten Fruchtfliegen untersucht und mit einer nominellen räumlichen Auflösung von $(15,6 \mu\text{m})^3$ abgebildet. Weil die *Drosophila* selbst nur etwa so groß ist wie das Gehirn der Biene, konnten in diesem Fall nur große Strukturen, wie zum Beispiel das gesamte Gehirn, visualisiert werden. Zudem kann man in den Bildern die längsgestreifte Flugmuskulatur von der quergestreiften unterscheiden, sowie die Facettenaugen und den unterschiedlichen Aufbau von Vorder- und Hinterleib sehen.

Insgesamt konnten in den NMR-Bildern aus dem Innern der Insekten eine hohe räumliche Auflösung und ein guter Kontrast realisiert werden. Welche Strukturen im einzelnen in den Bildern zu erkennen waren, hing stark von der Präparation der Insekten ab.

Delphine

Ziel des dritten Projekts dieser Arbeit war die zerstörungsfreien Visualisierung der Anatomie zweier pränataler Delphine. Das kleinere der beiden untersuchten seltenen Museumsstücke

befand sich noch in der embryonalen Phase der Entwicklung, während das größere schon das fetale Stadium erreicht hatte (Scheitel-Steiß-Längen: 12,5 und 38 mm). Weil es sich bei dieser Studie um eine der wenigen an prenatalen Delphinen durchgeführten Untersuchungen handelte, besaß sie auch den Charakter einer Machbarkeits-Studie, die die Einsatzmöglichkeiten der NMR-Mikroskopie für diese Objekte aufzeigen sollte.

Die räumlich hochaufgelöste Visualisierung der Anatomie gelang in vollem Umfang. Beim Embryo konnte eine nominelle räumliche Auflösung von $58,6 \times 58,6 \times 117,2 \mu\text{m}^3$ und beim Fetus von $(78,1 \mu\text{m})^3$ realisiert werden. Dabei konnte ein so ausgeprägter Kontrast in den Bildern erzielt werden, dass eine manuelle Segmentierung zahlreicher Organe und Gehirnareale bei beiden Tieren möglich war. Anhand der segmentierten Daten wurden die entsprechenden Volumina und Oberflächen dieser Strukturen berechnet. Da bei konventionellen histologischen Untersuchungen erst in jüngster Zeit ebenfalls dreidimensionale Oberflächenrekonstruktionen zur quantitativen Erfassung der Daten eingesetzt werden, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit nur qualitativ mit den Ergebnissen entsprechender Studien verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass in den konventionellen histologischen Schnitten zusätzliche morphologische Details zu erkennen sind, die zum einen nur durch ein spezielles Anfärben des Gewebes sichtbar gemacht werden können und zum anderen unterhalb der räumlichen Auflösung der durchgeführten NMR-Experimente liegen.

Trotzdem besitzt auch die NMR-Mikroskopie gegenüber der konventionellen Histologie entscheidende Vorteile, da eine histologische Untersuchung die seltenen Proben zwangsläufig zerstört und die Färbereagenzien normalerweise nicht untereinander kombinierbar sind, so dass auch hierbei irreversibel in die Probe eingegriffen wird. Darüber hinaus erlaubt die NMR-Mikroskopie eine echte dreidimensionale Abbildung der Probe, während Schnittserien immer nur entlang einer Achse der Probe durchgeführt werden können.

Desweiteren verursacht die Präparation der Proben für die histologischen Schnitte und der Schneidprozess selbst zusätzliche Artefakte, wie in den in dieser Arbeit zu Vergleichszwecken herangezogenen histologischen Schnitten zu sehen ist. Da diese Artefakte bei NMR-Untersuchungen vermieden werden können, ist die NMR-Mikroskopie im Rahmen ihres Auflösungsvermögens der konventionellen Histologie in vielen Fällen überlegen.

Aufgrund ihrer zeitintensiven Präparation nehmen histologische Untersuchungen einen längeren Zeitraum in Anspruch als NMR-mikroskopische Studien. Deswegen kann die NMR-Mikroskopie im Fall der prenatalen Wale auch dazu eingesetzt werden, eine größere Anzahl der vorhandenen Exemplare in kurzer Zeit zu untersuchen. Aussagen über Strukturen im Rahmen des Auflösungsvermögens der NMR-Experimente können sofort getroffen werden. Zudem liefern die NMR-Bilder Informationen über die genauen Entwicklungsstadien und den Erhaltungsgrad der einzelnen Proben. Darauf basierend kann dann eine kleine Anzahl von Proben ausgewählt werden, die anschließend mittels konventioneller Histologie weiter untersucht werden.

Anhand von NMR-Parameterkarten konnte gezeigt werden, dass in den akquirierten NMR-Bildern vor allem Gewebe deutlich zu erkennen sind, die sich in ihren Spin-Dichten von ihrer

Umgebung unterscheiden, da auch in diesem Fall der durch die Spin-Dichte bedingte Kontrast dominierte. Unterschiedliche T_1 -Werte für die diversen Gewebetypen trugen ebenfalls zum Kontrast in den Bildern bei. Im Gegensatz zu den Messungen an der Biene konnte hier auch ein Einfluss der Spin-Spin-Relaxation auf den Kontrast festgestellt werden. Daher sind in den Bildern des Embryos und des Fetus die verschiedenen Gehirnbereiche und die inneren Organe klar auszumachen und deutlich von dem sie umgebenden Gewebe abgegrenzt, während Knochen, Knorpel und Bindegewebe ähnliche Spin-Dichten besitzen und deswegen nur schwer voneinander unterscheidbar sind. Somit kann im Vorfeld einer Studie durch die Akquisition von NMR-Parameterkarten entschieden werden, ob die NMR-Mikroskopie zu den gewünschten Ergebnissen führen wird, oder ob die konventionelle Histologie als Untersuchungsmethode herangezogen werden sollte.

Weitere Experimente mit anderen NMR-Bildgebungssequenzen und unterschiedlich gewichteten Bildern müssen zeigen, ob der hier beschriebene Anwendungsbereich der NMR-Mikroskopie bei prenatalen Walen und fixierten Proben im allgemeinen erweitert werden kann. In diesem Zusammenhang sind vor allem Verfahren mit Diffusionswichtung interessant, da mit ihnen ggf. Knochen, Knorpel und Bindegewebe unterscheidbar werden. Aber auch durch die Verwendung von NMR-Kontrastmitteln kann möglicherweise der Einsatzbereich der NMR-Mikroskopie in der Entwicklungsbiologie vergrößert werden, da diese die Relaxationszeitkonstanten der einzelnen Gewebe verändern und somit zu einem neuen Kontrast in den Bildern führen können. Um einen möglichst effektiven Einsatz eines Kontrastmittels zu gewährleisten, ist es notwendig, seine Gewebespezifität, seine Auswirkung auf die Relaxationsmechanismen der Probe sowie den Einfluss der verschiedenen NMR-Parameter des Gewebes auf den Bildkontrast zu bestimmen. Sind diese Faktoren bekannt, kann der Kontrast mit einem entsprechenden Kontrastmittel gezielt optimiert werden.

Die durchgeführten Untersuchungen deuten vor allem auf Spin-Dichte-Unterschiede als dominierende Ursache des Kontrastes in den NMR-Bildern von fixierten Geweben hin. Allerdings stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob der Großteil des akquirierten Signals in diesen Geweben aus dem Gewebe der Proben stammt, oder ob der Ursprung des Signals vielmehr im Fixans der Proben liegt. In letzterem Fall wären die NMR-Bilder eine Art Negativ-Aufnahme des abgebildeten Gewebes.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente konnten somit zahlreiche Fragen bezüglich mikroskopischer Details der verschiedenen untersuchten Proben nicht-invasiv beantworten und führen gleichzeitig zu neuen interessanten Fragestellungen bezüglich der NMR-Mikroskopie an fixierten Proben.

Darüber hinaus konnte die praktische Anwendbarkeit der NMR-Mikroskopie als Alternative bzw. Ergänzung zu herkömmlichen Untersuchungsmethoden bei der Visualisierung des Bienehirns und der Anatomie der prenatalen Delphine demonstriert werden. Durch die Untersuchung der speziellen Vorteile und Grenzen der Anwendung der NMR-Mikroskopie gegenüber herkömmlichen Untersuchungsmethoden konnte konkret der praktische Nutzen ihres Einsatzes aufgezeigt und Ergebnisse erzielt werden, die sonst nicht erzielbar wären.

Gerade der Einsatz der NMR-Mikroskopie in Form der NMR-Histologie stellt einen vielversprechenden Weg zur Etablierung der NMR-Mikroskopie als Routineuntersuchungsmethode dar. Als ebenso erfolgreich hat sich die Anwendung der NMR-Mikroskopie als Untersuchungsmethode bei der Beobachtung der Tumorinvasion erwiesen, so dass sie auch in der medizinischen in-vitro Forschung und Therapiesimulation als sinnvolle Alternative zu den vorhandenen Methoden angesehen werden kann. Anhand der ausgewählten Anwendungsbeispiele ist es in dieser Arbeit somit gelungen, neue, konkrete Einsatzmöglichkeiten für die NMR-Mikroskopie zu eröffnen und ihre praktische Anwendbarkeit als Untersuchungsmethode für Fragestellungen im Bereich der medizinischen in-vitro Forschung und verschiedener neuro- und entwicklungsbiologischer Bereiche zu demonstrieren.

8 Anhang

8.1 Präparation der Tumorsphäroide

Die Formierung der C6-Tumorsphäroide aus einzelnen Tumorzellen erfolgte mit Hilfe der Standard Agar Overlay Technique [Yuh-77]. Dazu wurden zunächst C6-Zellen als Zell-Monolayer in 80 cm² Plastik-Kulturflaschen (Nunc Roskilde, Dänemark) gezüchtet. Die Kulturflaschen waren mit Wachstumsmedium Dulbecco's MEM gefüllt, dem 10 %ige FCS (fetales Kälber Serum) Lösung sowie die vierfache Menge der vorgeschriebenen Konzentration nicht-essentieller Aminosäuren, L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin und 100 mg/ml Streptomycin zugegeben worden waren. Das Wachstumsmedium wurde inklusiv der Zusätze von den Flow Laboratories (Glasgow, Schottland) bezogen. Die Monolayer-Kulturen wurden so lange im Brutschrank unter standardisierten Zellkultur-Bedingungen (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) gezüchtet, bis der Boden der Kulturflasche vollständig mit Zellen bedeckt war (ca. fünf Millionen Zellen).

Geerntet wurden die Zellen durch Zugabe von vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %iges Trypsin, 0,02 %iges EDTA), die die adhäsiven Proteine der Zellmembran zerstört, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen.

Anschließend wurde die Zellsuspension in 80 cm² Kulturflaschen überführt, deren Böden gleichmäßig mit 0,75 %igem Agar-Medium (Agar noble, Difco, Detroit, USA) bedeckt waren. Das Anhaften der Zellen an diesem Substrat und somit an den Kulturflaschen wurde durch die gerüstartige Struktur der Agarose effektiv unterbunden. Dies begünstigte wiederum die Anlagerung der Zellen untereinander, die so dreidimensionale Sphäroide aufbauen konnten. Zur Nährstoffversorgung der ausgesäten Zellen wurden diese mit 15 ml des oben beschriebenen Mediums bedeckt. Nach weiteren 3–5 Tagen unter standardisierten Zellkultur-Bedingungen konnten Sphäroide mit Durchmessern von 200 - 400 µm geerntet werden.

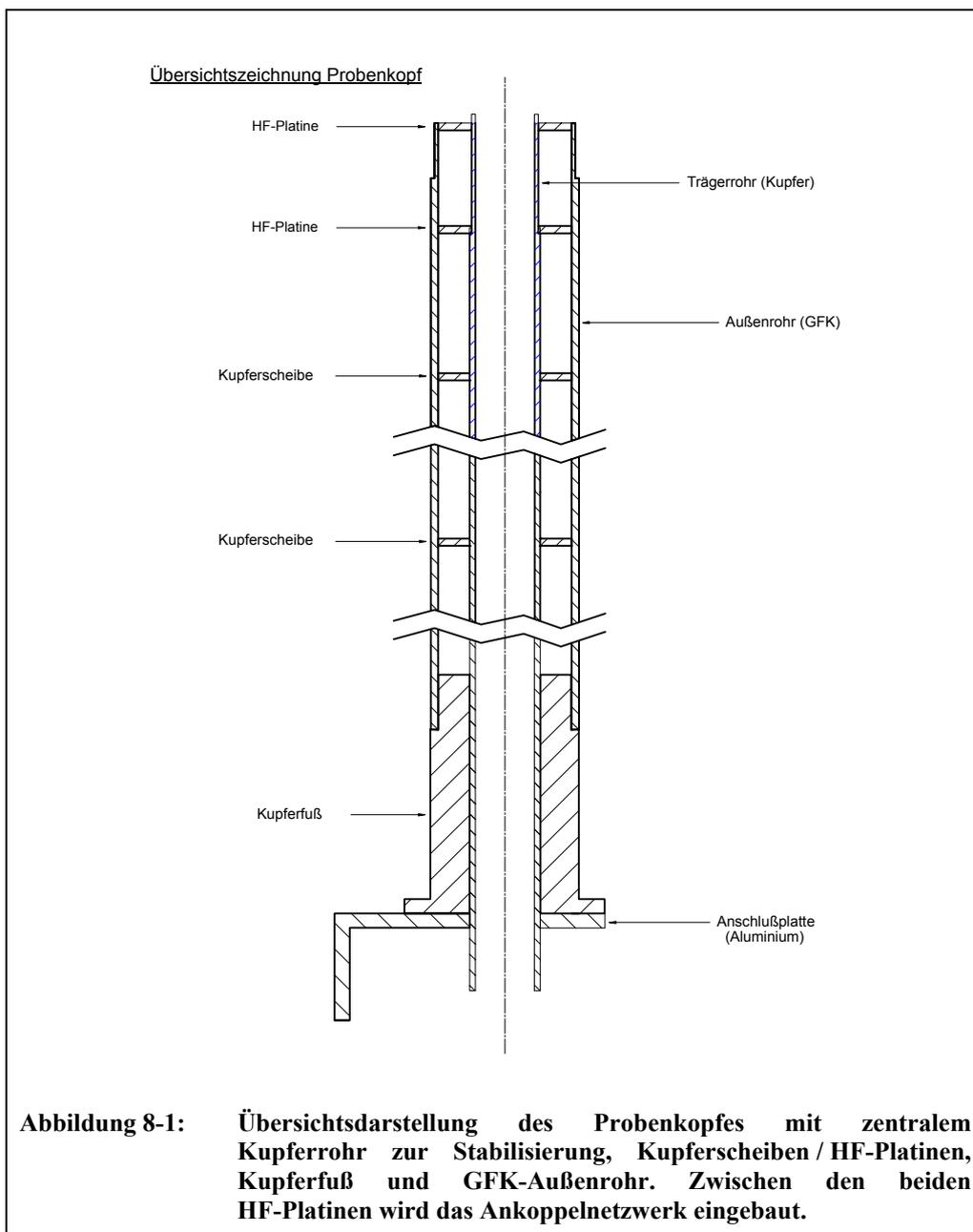
8.2 Probenkopf und Ankoppelnetzwerk

Der Probenkopf und das Ankoppelnetzwerk wurden so konstruiert, dass die Perfusionsapparatur und die Spule oben auf den Probenkopf und das Ankoppelnetzwerk aufgesteckt werden können. Außerdem können sie durch die Steckverbindung auch mit anderen Spulen und Aufsätzen betrieben werden.

Der Probenkopf besteht aus einem zentralen Kupferrohr mit angelöteten Kupferscheiben und einer GFK-Abdeckung (siehe Abbildung 8-1). Das zentrale Kupferrohr bietet die nötige Stabilität bei geringem Eigenvolumen und stellt gleichzeitig eine elektrische Masse über die gesamte Länge des Probenkopfes dar. Die Kupferscheiben dienen ebenfalls der Stabilisierung,

stützen die GFK-Abdeckung und stellen zusätzlich eine Führung für die Messkanäle, Perfusionsschläuche, etc. dar.

In das zentrale Kupferrohr kann ein Dewar mit einem luft- bzw. gasumspülten Heizstab eingeschoben werden, um die Temperatur der Probe zu variieren. Die Temperaturkontrolleinheit BVT-1000 des Spektrometers misst die Temperatur der Probe über einen neben der Spule endenden Temperaturfühler und regelt den Strom für den Heizstab automatisch entsprechend der eingestellten Soll-Temperatur.

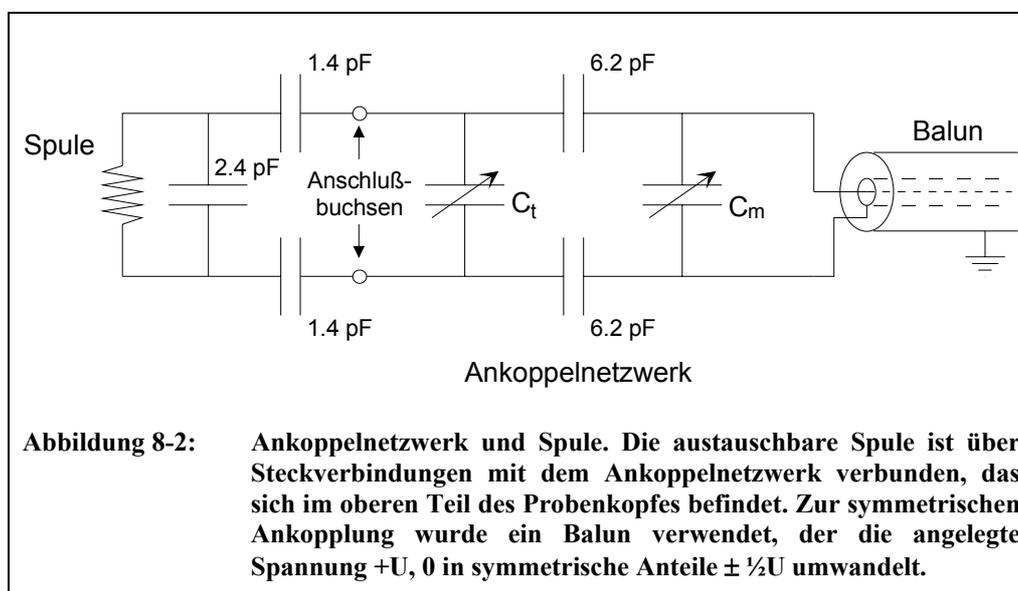


Der ^1H -Messkanal wurden auf der gesamten Länge an das zentrale Kupferrohr angelötet, um einen guten elektrischen Kontakt zu gewährleisten. Desweiteren wurden auch die Schläuche

der Perfusionsapparatur, der Thermofühler und die Nylonstäbe, die zum externen Bedienen der Tune- und Matchkondensatoren des Ankoppelnetzwerkes verwendet werden, durch Bohrungen in den Kupferscheiben geführt.

Der obere Bereich des Probenkopfes enthält das Ankoppelnetzwerk für die NMR-Messspulen sowie Führungsstifte, auf die diese Spulen reproduzierbar aufgesteckt werden können. So ist es möglich, verschiedene Spulen und Spulentypen mit einem einzelnen Probenkopf zu verwenden und schnell und einfach gegeneinander auszutauschen. Zwei der Führungsstifte dienen zusätzlich als elektrische Leitung zwischen Spule und Ankoppelnetzwerk. Die obersten beiden Scheiben (siehe Abbildung 8-1) des Probenkopfes bestehen aus beidseitig mit Kupfer beschichtete HF-Platinen. Sie sind direkt ober- und unterhalb des Ankoppelnetzwerkes angebracht und schirmen dieses elektrisch gegenüber der Umgebung ab.

Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Raumes wurde eine kapazitive Ankopplung an die Spule gewählt. Das Ankoppelnetzwerk ist aus einem variablen Tune- und einem variablen Matchkondensator (jeweils 0.8 – 20 pF), die parallel geschaltet sind, sowie zwei zu den variablen Kondensatoren in Serie geschalteten 6.2 pF Kondensatoren (siehe Abbildung 8-2) aufgebaut. Um symmetrisch an die Spule anzukoppeln, wurde nach dem Ankoppelnetzwerk ein triaxialer Balun (engl.: *balanced-to-unbalanced unit*) eingebaut. Durch die symmetrische Ankopplung verringern sich die dielektrischen Verluste zwischen Probe und Spule, womit eine deutliche Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht werden kann. [Déc-85]



Der triaxiale Balun besteht aus einem semirigidem Koaxialkabel, über das erst ein Teflonschlauch und dann ein dünnes Kupferrohr als dritter koaxialer Leiter geschoben wurden. Dieses Kupferrohr besitzt eine Länge von einem Viertel der Resonanzwellenlänge des Protonenkanals und ist auf der gesamten Länge mit dem zentralen Kupferrohr des Probenkopfes verlötet und somit geerdet. Das aus dem Kupfermantel herausragende Ende des

Koaxialkabel ist ebenfalls komplett mit dem zentralen Kupferrohr des Probenkopfes und außerdem mit dem Ende des Kupfermantels verlötet. Der Balun verschiebt die an seinen Eingang angelegte Spannung U gerade um $-\frac{1}{2}U$, so dass an seinem Ausgang $+\frac{1}{2}U$ am Mittelleiter und $-\frac{1}{2}U$ am inneren Mantel anliegen.

Der Fuß des Probenkopfes besteht aus einem durchbohrten Kupferblock, um den guten elektrischen Anschluss an das Gradientenrohr und den Magneten zu gewährleisten. An dieser Stelle sind auch die beiden BNC Buchsen zum Anschluss des Probenkopfes an das Spektrometer angebracht.

Literaturverzeichnis

- [Abr-61] A. Abragam
The Principles of Nuclear Magnetism
Oxford Univ. Press, London / New York, 1961
- [Ahn-89] C.B. Ahn, Z.H. Cho
A generalized formulation of diffusion effects in μm resolution nuclear magnetic resonance imaging
Med. Phys., Vol. 16 Issue 1, 22-28, 1989
- [Arv-77] L. Arvy
Asymmetry in cetaceans
Investigations on Cetacea 8, 161-212, 1977
- [Bae-28] K.E. von Baer
Entwicklungsgeschichte der Thiere, Beobachtung und Reflexion
Bornträger, Königsberg, 1828
Zitat nach: M.K. Richardson, H.H.A. Oelschläger
Time, pattern, and heterochrony: a study of hyperphalangy in the dolphin embryo flipper
Evolution and Development 4, 435-444, 2002
- [Bli-68] S.M. Blinkov, I.I. Glezer
Das Zentralnervensystem in Zahlen und Tabellen
Fischer Verlag, 1968
- [Blo-46] F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard
Nuclear induction
Phys. Rev. **69**, 127, 1946
- [Blo-46b] F. Bloch,
Nuclear induction
Phys. Rev. **70**, 460-474, 1946
- [Bra-92] M. Brandl
Physikalische Grenzen der Ortsauflösung in der NMR-Mikroskopie
Diplomarbeit, Universität Würzburg, 1992
- [Bra-94] M. Brandl, A. Haase
Molecular diffusion in NMR microscopy
J. Magn. Reson., B **103**, 162-167, 1994
- [Bra-95] M. Brandl, J.C. Tonn, K. Kotitschke, R. Goldbrunner, S. Kerkau, A. Haase
Quantitative NMR microscopy of multicellular tumor spheroids and co-cultures
Magn. Reson. Med., **34**, 596-603, 1995
- [Bra-96] M. Brandl
Quantitative NMR-Mikroskopie an den Grenzen der physikalischen Ortsauflösung
Dissertation, Julius-Maximilian-Universität Würzburg, 1996
- [Bra-01] R. Brandt
persönliche Mitteilung
Neurobiologie, FU Berlin, 2001
- [Bra-03] R. Brandt, et al.
Konfokal Laser Microscopy: Imaging of the Honeybee Brain
in Vorbereitung
- [Buh-86] E.H. Buhl
Entwicklungsgeschichte des Zentralen Nervensystems bei Zahnwalen (Odontoceti) unter besonderer Berücksichtigung des Schweinswals Phocoena phocoena
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Universität Frankfurt a.M., 1986
- [Buh-88] E.H. Buhl, H.H.A. Oelschläger
Morphogenesis of the brain in the harbour porpoise
J. Comp. Neurol. 277, 109-125, 1988
- [Car-54] H.Y. Carr, E.M. Purcell
Effects of diffusion on free precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments
Phys. Rev., **94**, 630-639, 1954

- [Che-89] C.N. Chen, D.I. Hoult
Biomedical Magnetic Resonance Technology
Adam Hilger, Bristol, New York, 1989
- [Cra-96] T.W. Cranford, M. Amundin, K.S. Norris
Functional morphology and homology in the odontocete nasal complex: Implications for sound generation
Journal of Morphology 228, 223-285, 1996
- [Dab-59] K. Dabrowska-Piaskowska
Observations on the histoformative capacities of tumor cell dissociated by digestion with trypsin
Exp. Cell. Res. **16**, 315-323, 1959
- [Déc-85] M. Décorps, et al.,
An inductively coupled, series-tuned NMR probe
J. Magn. Reson., **65**, 100 (1985)
- [Der-87] A.E. Derome
Modern NMR techniques for chemistry research
Pergamon Press, 1987
- [Duj-50] F. Dujardin
Mémoire sur le système nerveux des insectes
Ann. Sci. Nat. B **14**:195-206
- [Dun-90] H.-R. Duncker
Respirationstrakt
in "Human-Embryologie" Ed.: K.V Hinrichsen, Springer Verlag, Berlin, 571-606, 1990
- [Eng-92] O. Engebraaten,
Biology and experimental therapy of invasive glioma cells in tissue culture
Dissertation, Universität Bergen, Norwegen, 1992
- [Eng-92b] O. Engebraaten,
Tumor cell invasion in synergistic and heterologous systems
in R. Bjerkvig (Ed.): Spheroid Culture in Cancer Research, 107-132, CRC Press, Boca Raton, 1992
- [Fla-89] D. Flanagan, A.R. Mercer
An atlas and 3-D reconstruction of the antennal lobes in the worker honey bee
Int. J. Insect Morphol. Embryol. **18**, 145-159, 1989
- [Gle-88] I.I. Glezer, P.R. Hof, P.J. Morgane
*Comparative analysis of calcium-binding protein-immunoreactive neuronal populations in the auditory and visual systems of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the macaque monkey (*Macaca fascicularis*)*
J. Chem. Neuroanat. **15**, 203-237, 1988
- [Gol-98] Dr. R. Goldbrunner
persönliche Mitteilung
Tumorbiologielabor und Neurochirurgische Klinik, Universitätsklinikum Würzburg, 1998
- [Gra-89] H. Gray
Gray's Anatomy
37th edition, Ed.: P.L. Williams, Churchill Livingstone, New York, 1989
- [Haa-86] A. Haase, J. Frahm, D. Matthaei, W. Haenicke, K.-D. Merboldt
FLASH Imaging. Rapid NMR Imaging Using Low Flip-Angle Pulses
J. Magn. Reson. **67**, 258-266, 1986
- [Haa-93] A. Haase, M. Brandl, E. Kuchenbrod, A. Link
Magnetization-prepared NMR microscopy
J. Magn. Reson., A **105**, 230-233, 1993
- [Hah-50] E.L. Hahn
Spin Echoes
Phys. Rev. **80**, 580-594, 1950
- [Hed-84] L.K. Hedges
Ph. D. Dissertation
Department of Physics, State University of New York at Stony Brook, 1984
- [Hou-76] D. Hoult, R.E. Richards
The Signal-to-Noise-Ratio of the Nuclear Magnetic Resonance Experiment
J. Magn. Reson., **24**, 71-85, 1976
- [Hou-84] W.V. House
IEEE Trans. Nucl. Sci., NS-31, 570, 1984

- [How-74] P.E. Howse
Design and function of the insect brain
in L.B. Browne (ed): *Experimental Analysis of Insect Behaviour*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, pp. 180-195, 1974
- [Int-01] www.echter-honig.de
- [Jas-02] Hartmut Münch, IMKERMEISTER, Kommandanturstraße 14, 30169 HANNOVER
A. Jasanoff, P.Z. Sun
In vivo magnetic resonance microscopy of brain structure in unanesthetized flies
J. Magn. Reson. **158**, 79-85, 2002
- [Joh-02] G.A. Johnson
Structural and Morphological MR Microscopy: Limits and Potential
Proc. 10th ISMRM, Honolulu, 2002
- [Kal-99] Bernhard Kalusche
NMR Spektroskopie und spektroskopische Bildgebung in der Pflanzenphysiologie
Dissertation, Julius-Maximilian-Universität Würzburg, 1999
- [Kam-74] T. Kamiya, N. Miyazaki
A malformed embryo of *stenella coeruleoalba*
Sci. Rep. Whales Res. Inst., No. 26, 259-262, 1974
- [Kam-74b] T. Kamiya, P. Pirlot
Brain Morphogenesis in Stenella coeruleoalba
Sci. Rep. Whales Res. Inst., No. 26, 245-253, 1974
- [Ker-00] Siggie Kerkau
persönliche Mitteilung
Tumorbiologielabor, Universitätsklinikum Würzburg, 2000
- [Kli-99] M. Klima
Development of the cetacean nasal skull
Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology 149, 1-143, 1999
- [Koo-69] L.G. Kooyman, H.T. Andersen
Deep diving
in "The Biology of Marine Mammals", Ed.: H.T. Andersen, Academic Press, New York and London, 65-94, 1969
- [Kra-74] K.H. Krabbe
Studies on the morphogenesis of the brain in Hyracoidea Ungulata, Carnivora and Pinnipedia (in *Morphogenesis of the Vertebrate Brain IV*), Einaar Muksgaard, Copenhagen, 1974
- [Lau-73] P.C. Lauterbur
Image Formation by induced local interactions: examples employing Nuclear Magnetic Resonance
Nature, **242**, 190-191, 1973
- [Lau-86] P.C. Lauterbur, L.K. Hedges
Abstracts of the 23rd Congress Ampere on Magnetic Resonance, pp. 24, Rome, Italy, 1986
- [Lau-86b] P.C. Lauterbur
New Directions in NMR Zeugmatographic Imaging
in "NMR in Biology and Medicine", Herausgeber (Eds): S. Chien, C. Ho
Raven Press, pp. 135-140, New York, 1986
- [Lee-01] S.-C. Lee, K. Kim, J. Kim, S. Lee, J.H. Yi, S.W. Kim, K.-S. Ha, C. Cheong
One Micrometer Resolution NMR Microscopy
J. Magn. Reson., **150**, 207-213, 2001
- [Man-73] P. Mansfield, P.K. Grannel
NMR 'diffraction' in solids?
J. Phys., C 6, L422-L426, 1973
- [Man-82] P. Mansfield, P.G. Morris
NMR Imaging in Biomedicine,
Academic Press, Inc., London, 1982
- [Man-98] P. Manger, M. Sum, M. Szymanski, S. Ridgway, L. Krubitzer
Modular subdivisions of dolphin insular cortex: does evolutionary history repeat itself?
J. Cogn. Neurosci. 10, 153-166, 1998
- [Mar-01] L. Marino, K.D. Sudheimer, T.L. Murphy, K.K. Davis, D.A. Pabst, W.A. McLellan, J.K. Rilling, J.I. Johnson
Anatomy and Three-Dimensional Reconstructions of the Brain of a Bottlenose Dolphin

- (*Tursiops truncatus*) From Magnetic Resonance Images
The Anatomical Record, 2001
- [Mar-71] J.L. Markley, W.J. Horsley, M.P. Klein
Spin-Lattice Relaxation Measurements in Slowly Relaxing Complex Spectra
J. Chem. Phys., **55**, 3604, 1971
- [Mar-91] A.R. Martin
Wale und Delphine
Mosaik Verlag, München, 1991
- [McA-67] R.M. McAllister, et al.
Colonial growth in agar of cells derived from adenovirus-induced hamster tumors
J. Natl. Cancer Inst. **39**, 43-53, 1967
- [Mei-58] S. Meiboom, D. Gill
Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times
Rev. Sci. Instr., **29**, 688-691, 1958
- [Men-88] R. Menzel, B. Michelsen, P. Ruffer, M. Sugawa
Neuropharmacology of learning and memorain honey bees
in G. Herting and H.C. Spatz (eds): Synaptic Transmission and Plasticity in Nervous Systems;
New York: Springer-Verlag, pp.335-350, 1988
- [Men-01] R. Menzel
persönliche Mitteilung
Neurobiologie, FU Berlin, 2001
- [Mob-82] P.G. Mobbs
The brain of the honeybee Apis mellifera:
1. The connections and spatial organization of the mushroom bodies
Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.] **298**, 309-354, 1982
- [Mob-85] P.G. Mobbs
Brain Structure
Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, **5**, 1985
- [Mue-87] W. Mueller-Klieser
Multicellular spheroids
J. Cancer Res. Clin. Oncol. **113**, 101-122, 1987
- [Nee-91] M. Neeman, K.A. Jarrett, L.O. Sillerud, J.P. Freyer
Self-diffusin of water in multicellular spheroids measured by Magnetic Resonance Imaging
Cancer Research, **51**, 4072-4079, 1991
- [Oel-90] H.A. Oelschläger
Evolutionary morphology and acoustics in the dolphin skull
in "Sensory Abilities in Cetaceans", Eds.: J. Thomas, R. Kastelein, Plenum Press, New York,
137-162, 1990
- [Oel-98] H.H.A. Oelschläger, B. Kemp
Ontogenesis of the Sperm Whale Brain
The Journal of Comparative Neurology **399**, 210-228, 1998
- [Oel-00] H.H.A. Oelschläger
Morphological and functional adaptations of the toothed whale head to aquatic life
Historical Biology **14**, 33-39, 2000
- [Oel-02] Prof. Dr. H.H.A. Oelschläger
persönliche Mitteilung
Dr. Senckenbergische Anatomie (III), Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt a.M.,
2002
- [Opp-86] A. Oppelt, R. Graumann, H. Barfuß, H. Fischer, W. Hartl, W. Schajor
FISP – a new fast MRI sequence
Elektromedica (Engl. Ed.) **54**, 15-18, 1986
- [Pab-99] D.A. Pabst, S.A. Rommel, W.A. McLellan
The functional morphology of marine mammals
in "Biology of Marine Mammals", Eds.: J.E. Reynolds, S.A. Rommel, Smithsonian Institution
Press, Washington and London, 15-72, 1999
- [Pec-91] T.L. Peck
Ph. D. Dissertation
Dept. of Electrical Engineering, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, 1991
- [Pec-95] T.L. Peck, R.L. Margin, P.C. Lauterbur
Design and analysis fo microcoils for NMR microscopy
J. Magn. Reson., **B 108**, 114-124, 1995

- [Pon-02] P.J. Ponganis
Circulatory system
in "Encyclopedia of Marine Mammals", Eds.: W.F. Perrin, B. Würsig, J.G.M. Thewissen,
Academic Press, San Diego, 229-231, 2002
- [Pur-46] E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound
Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid
Phys. Rev., **69**, 37-38, 1946
- [Rab-37] I.I. Rabi
Space Quantization in a Gyating Magnetic Field
Physical Review 51: 652-654, 1937
- [Rab-38] I.I. Rabi, J.R. Zacharias, S. Millman, and P. Kusch.
A new method of measuring nuclear magnetic moment
Physical Review 53: 318, 1938
- [Rab-39] I.I. Rabi, S. Millman, and P. Kusch.
The molecular beam resonance method for measuring nuclear magnetic moments
Physical Review 55:526-535, 1939
- [Rau-83] W. Rauschnig, K. Bergström, P. Pech
Correlative craniospinal anatomy studies by computed tomography and cryomicrotomy
J. Comput. Assist. Tomogr. 7, 9-13, 1983
- [Rei-94] J.S. Reidenberg, J.T. Laitman
Anatomy of the hyoid apparatus in Odontoceti (toothed whales): specializations of their skeleton and musculature compared with those of terrestrial mammals
The Anatomical Record 240, 598-624, 1994
- [Rei-02] J.S. Reidenberg, J.T. Laitman
Prenatal development in cetaceans
in "Encyclopedia of Marine Mammals" Eds.: W.F. Perrin, B. Würsig, J.G.M. Thewissen,
Academic Press, San Diego, 998-1007, 2002
- [Rey-02] J.E. Reynolds, S.A. Rommel, M.E. Bolen
Anatomical dissection: thorax and abdomen
in "Encyclopedia of Marine Mammals", Eds.: W.F. Perrin, B. Würsig, J.G.M. Thewissen,
Academic Press, San Diego, 21-30, 2002
- [Rid-86] S.H. Ridgway,
The central nervous system of the bottlenose dolphin
in: " Dolphin cognition and behaviour: a comparative approach ", Eds.: R.J. Schusterman, J.A. Thomas, F.G. Wood, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, New Jersey, 31-60, 1986
- [Rid-90] S.H. Ridgway,
The central nervous system of the bottlenose dolphin
in: " The bottlenose dolphin ", Eds.: S. Leatherwood, R. Reeves, Academic Press, San Diego, 69-97, 1990
- [Rob-94] D. Robineau
Anatomie
in "Handbuch der Säugetiere Europas, Teil IA: Wale und Delphine 1", Eds.: D. Robineau, R. Duguay, M. Klima, Aula Verlag, Wiesbaden, 83-102, 1994
- [Ryb-01] J. Rybak
persönliche Mitteilung
Biozentrum, Julius-Maximilian-Universität Würzburg, 2001
- [Sch-01] F. Schaupp
In situ Imaging of the Bee Brain with NMR-Microscopy
Diplomarbeit, Julius-Maximilian-Universität Würzburg, Freie Universität Berlin, 2001
- [Sil-90] L.O. Sillerud, J.P. Freyer, M. Neeman, M.A. Mattingly
Proton NMR microscopy of multicellular tumor spheroid morphology
Magn. Reson. Med., **16**, 380-389, 1990
- [Sno-56] R.E. Snodgrass
Anatomy of the Honey Bee
Comstock Publishing Associates, 1956
- [Ste-00] P. Štěrba, M. Klima, B. Schildger
Embryology of dolphins
Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Vol. 157, 1-133, 2000
- [Sut-70] R.M. Sutherland, W.R. Inch, J.A. McCredie, J. Kruuv
A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumour model
Int. J. Radiat. Biol. **18**, 491-495, 1970

- [Tau-01] J. Tautz
persönliche Mitteilung
Biozentrum, Universität Würzburg, 2001
- [Ton-98] Prof. Dr. J.-C. Tonn
persönliche Mitteilung
Tumorbiologielabor und Neurochirurgische Klinik, Universitätsklinikum Würzburg, 1998
- [Yuh-77] J.M. Yuhas, A.P. Li, A.O. Martinez, A.J. Ladman
A simplified method for production and growth of multicellular spheroids
Cancer Res. **37**, 1977
- [Zho-92] X. Zhou, P.C. Lauterbur
NMR Microscopy Using Projection Reconstruction
in "Magnetic Resonance Microscopy", Eds: B. Blümich, W. Kuhn, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1992
- [Zim-57] J.R. Zimmerman, W.E. Brittin
Nuclear Magnetic Resonance studies in multiple phase systems: lifetime of water in absorbing phase of silica gel
J. Phys. Chem., **61**, 1328-1333, 1957

Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

D. Haddad, F. Schaupp, R. Brandt, G. Manz, R. Menzel, A. Haase:
NMR Imaging of the Honeybee Brain
eingereicht bei: Journal of Insect Science

D. Haddad, S. Huggenberger, M. Haas-Rioth, L.S. Kossatz, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
Magnetic resonance microscopy of prenatal dolphins: a documentation of internal structures
and comparison with routine histology
in Vorbereitung

Konferenzbeiträge - Vorträge:

D. Haddad, J.C. Tonn, S. Kerkau and A. Haase:
A Vertical Setup for Early Stage and Long Term NMR Microscopy on Confrontation
Cultures of Tumor Spheroids with Rat Brain Aggregates
Proc. ESMRMB 17th Annual Meeting, Paris, 2000

D. Haddad, F. Schaupp, G. Manz, R. Brandt, R. Menzel, A. Haase:
NMR microscopic Imaging of the Honey-Bee Brain
Proc. GdCh-Jahrestagung Chemie, Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie,
Würzburg, 2001

D. Haddad, A. Porea, M. Schmidt, M. Haas-Rioth, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
Embryonal and fetal brain development in bovines, a MR-Histology study
Proc. ESMRMB 20th Annual Meeting, Rotterdam, 2003

Konferenzbeiträge – eingeladener Vortrag:

D. Haddad:
Ausgewählte Beispiele der NMR Mikroskopie
4. Doktoranden-Schulung der Deutschen Sektion der ISMRM, Würzburg, 2002

Konferenzbeiträge - Poster:

D. Haddad, F. Schaupp, G. Manz, R. Brandt, R. Menzel, A. Haase:
NMR microscopic Imaging of the Honey-Bee Brain
Proc. 6th ICMRM, Nottingham, 2001

D. Haddad, V. Behr, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
3D-NMR Imaging of Dolphin Embryos and Fetuses
Proc. 6th ICMRM, Nottingham, 2001

- D. Haddad, V. Behr, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
3D-NMR Imaging of Dolphin Embryos and Fetuses
Wal-Symposium, Senckenberg Museum Frankfurt a.M., 2001
- D. Haddad, V.C. Behr, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
High Field 3D-NMR Imaging of Dolphin Embryos and Fetuses
Proc. ISMRM 10th Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, 2002
- D. Haddad, V.C. Behr, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
High-Field NMR-Microscopy of Dolphin Embryos and Fetuses
Proc. ESMRMB 19th Annual Meeting, Cannes, 2002
- D. Haddad, M. Haas-Rioth, L.S. Kossatz, S. Huggenberger, V. Behr, H.H.A. Oelschläger, A. Haase
High-Field NMR-Microscopy of prenatal Dolphins
Proc. 17th ECS Conference, Las Palmas, Gran Canaria, 2003
- M. Haas-Rioth, D. Haddad, A. Haase, H.H.A. Oelschläger:
Embryology of the Dolphin Brain by 3D-NMR Microscopy
Proc. 17th ECS Conference, Las Palmas, Gran Canaria, 2003
- L.S. Kossatz, D. Haddad, A. Haase, H.H.A. Oelschläger:
3D-Reconstruction of the Ear Region in the early fetal Common Dolphin (*Delphinus Delphis*)
based on MRI, Proc. 17th ECS Conference, Las Palmas, Gran Canaria, 2003
- V.C. Behr, D. Gareis, M. Oechsner, T. Neuberger, D. Haddad, C. Faber, A. Haase:
Resonator Designs for Very High Field ¹H and X-Nuclei in-vivo and ex-vivo Microscopic
MRI Experiments, Proc. ISMRM 11th Annual Meeting, Toronto, 2003
- V.C. Behr, I. Wieland, M. Oechsner, D. Gareis, T. Neuberger, D. Haddad, A. Haase, C. Faber:
Resonators for in-vivo and ex-vivo MRI at field strengths up to 17.6T
Proc. ESMRMB 20th Annual Meeting, Rotterdam, 2003
- D. Haddad, A. Porea, M. Schmidt, M. Haas-Rioth, H.H.A. Oelschläger, A. Haase:
MR-Histology: Embryonal and Fetal Brain Development in Bovines
Proc. 7th ICMRM, Snowbird, Utah, 2003
- V.C. Behr, I. Wieland, M. Oechsner, D. Gareis, T. Neuberger, D. Haddad, A. Haase, C. Faber:
Resonator Designs and Results for Microscopic in-vivo and ex-vivo MRI at Highest
Field Strengths up to 17.6T, Proc. 7th ICMRM, Snowbird, Utah, 2003

Danksagung

Herzlichen Dank an all diejenigen Menschen, die mich in den letzten Jahren auf die eine oder andere Weise unterstützt haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. Axel Haase für eine interessante und vielseitige Themenstellung, sowie einen großen Freiraum bei der Arbeit. Außerdem für seine stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft nicht nur in der Uni, sondern auch auf diversen EPV Seminarwochen. Besonders aber dafür, dass er sich immer wieder für 'exotische' Proben begeistern ließ.

Prof. Dr. J.C. Tonn und seiner Arbeitsgruppe im Tumorbiologielabor der Neurochirurgischen Klinik des Uniklinikums Würzburg für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe. Dabei möchte ich speziell **Siggi Kerkau** und **Dr. Sven Wagner** für die langjährige Versorgung mit Tumorsphäroiden und RBAs danken, sowie **Dr. Roland Goldbrunner**, für das Vermitteln des nötigen Grundwissens über Tumoren.

Professor Dr. R. Menzel, Frank Schaupp, Dr. Robert Brandt und **Gisela Manz** aus dem Institut für Neurobiologie der Freien Universität Berlin für eine erfolgreiche Kooperation bei der Untersuchung des Bienenhirns. Vor allem Frank, der die Idee das Bienenhirn mittels NMR zu untersuchen nach Würzburg brachte und hier seine Diplomarbeit machte, sowie Robert, der uns das Post-Processing der Messdaten mit Amira beibrachte, trugen zum Erfolg der Kooperation bei. Ebenfalls dazu beigetragen hat **Dr. Jürgen Rybak** aus dem Biozentrum Würzburg, der mir immer bereitwillig meine Fragen bzgl. der Anatomie und Physiologie der Biene beantwortete und mich mit lebenden Bienen und Hummeln versorgte.

Prof. Dr. E. Buchner und **Reinhard Wolf**, ebenfalls aus dem Biozentrum Würzburg, die mir trotz extrem kurzer Vorwarnzeit fixierte Fruchtfliegen zur Verfügung stellten und sich sehr für neue Einsatzgebiete der NMR-Mikroskopie interessierten.

Prof. Dr. H.H.A. Oelschläger und seinen Mitarbeitern **Stefan Huggenberger, Lars Sv. Kossatz** und **Michaela Haas-Rioth** von der Dr. Senckenbergischen Anatomie der Uniklinik Frankfurt für eine hervorragende Zusammenarbeit in einer angenehmen Atmosphäre, viele Segmentationen und 3D-Darstellungen, sowie die Beantwortung meiner zahllosen Fragen über Wale im allgemeinen und Delphine im besonderen.

Anna Schmidt und **Irene Ramoz**, den beiden Sekretärinnen bei EPV, für die freundliche und kompetente Beantwortung und Lösung meiner administrativen Fragen und Problemchen.

Sabine Voll und **Elsbeth Fekete** für die praktische Hilfe in allen "Labordingen".

Dr. Eberhard Rommel, Dr. Titus Lanz und **Dr. Alexander Weisser** für hilfreiche Tipps beim Spulen- und Probenkopfbau.

Meinen KorrekturleserInnen **Peter Schmitt, Gabriela Cocora, Ilja Kaufmann, Armin Porea, Volker Behr, Thomas Neuberger** und **meiner Mutter** für viele konstruktive Vorschläge und sinnvolle Kürzungen, die unter anderem die Lesbarkeit der Arbeit deutlich verbessert haben.

Meinen Mitstreitern bei den MicroCoils, am AMX und am "750er", allen SU's, meinen verschiedenen Büromitbewohnern, sowie allen EPV'lern für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Stimmung und angenehme Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl.

Meiner Familie und meiner Freundin für die permanente Unterstützung und Motivation. Vor allem auch für diverse Aufmunterungen nach langen Messnächten an nicht immer einwandfrei funktionierenden Spektrometern.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Adresse
geboren
Familienstand

Daniel Roland Haddad

Methfesselstrasse 11, 97074 Würzburg
am 19. Oktober 1970 in Mutlangen, Kreis Schwäbisch Gmünd
ledig, keine Kinder

Schulbildung

1977-1981 Grundschole Gottmadingen
1981 Friedrich-Wöhler-Gymnasium Singen
1981-1990 Hanns-Seidel-Gymnasium Hösbach
Juni 1990 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Akademischer Werdegang

Nov. 1990 bis Apr. 1997 Studium der Physik an der Universität Würzburg
Sep. 1993 bis Jul. 1994 Studienaufenthalt an der Université Joseph Fourier, Grenoble, Frankreich Abschluss: Maîtrise de Physique
3½-monatiges Industriepraktikum bei Wheelabrator Allevard
Feb. 1996 bis Dez. 1996 Visiting Scientist bei Professor Myer Bloom an der University of British Columbia im Rahmen eines Forschungsprogrammes des 'Canadian Institut of Advanced Research'
Feb. 1996 bis März 1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. T. Bayerl am Lehrstuhl für Experimentelle Physik V der Universität Würzburg, Thema: "Dynamics of Model Membrane Systems studied by Solid State Proton NMR"
Durchführung der Diplomarbeit in den Labors von Prof. M.Bloom an der University of British Columbia, Vancouver, Kanada
Juni 1997 bis Mai 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. J.-Ch. Tonn, Tumorbiologielabor, Neurochirurgische Klinik der Universität Würzburg
Juni 2000 bis Okt. 2001 Stipendiat im Rahmen des Graduiertenkollegs "Magnetische Kernresonanz in vivo und in vitro für biologische und medizinische Grundlagenforschung"
Nov. 2001 bis Dez. 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 355, Medizinische Univ.-Klinik Würzburg
seit Januar 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Experimentelle Physik V (Biophysik), Physikalisches Institut, Universität Würzburg
seit Juni 1997 Promotion bei Prof. Dr. A. Haase am Lehrstuhl für Experimentelle Physik V der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf dem Gebiet der NMR Mikroskopie

Ehrenwörtliche Erklärung

gemäß §6 Abs. 1 Ziff. 3 und 7
der Promotionsordnung der Fakultät
für Physik und Astronomie der
Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation selbständig und ohne die Hilfe eines Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

Die Dissertation wurde bisher weder vollständig noch teilweise einer anderen Hochschule mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Am 13. Juli 1994 wurde mir von der Université Joseph Fourier in Grenoble die "Maîtrise de Physique" verliehen. Am 11. Juni 1997 wurde mir von der Universität Würzburg der akademische Grad "Diplom-Physiker (Univ.*)" verliehen. Weitere akademische Grade habe ich bisher weder erworben noch versucht zu erwerben.

Würzburg, den 8. August 2003

Daniel Haddad