
Funktionelle MR-Tomographie am Tumor

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Philipp Mörchel
aus Erlenbach am Main

Würzburg
2010

Eingereicht am: 16.08.2010
bei der Fakultät für Physik und Astronomie

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Jakob
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Flentje
der Dissertation.

1. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Jakob
2. Prüfer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang R. Bauer
3. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Björn Trauzettel
des Promotionskolloquiums.

Tag des Promotionskolloquiums: 01.06.2011
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Physikalische Grundlagen	3
2.1.1. Gleichgewichtsmagnetisierung	3
2.1.2. Anregung	5
2.1.3. Relaxation	5
2.1.4. Blochgleichung	7
2.1.5. NMR-Tomographie	7
2.1.6. Magnetische Suszeptibilität	12
2.1.7. Chemische Verschiebung	15
2.1.8. T_1 -Quantifizierung	16
2.1.9. T_2^* -Quantifizierung	18
2.1.10. Approximationsalgorithmus	19
2.2. Biologische Grundlagen	20
2.2.1. Der Tumor	20
2.2.2. Tumorbehandlung	20
3. Materialien und Methoden	23
3.1. Magnet-Resonanz-Tomograph	23
3.1.1. Bruker Avance 750	23
3.1.2. Gradientensystem	23
3.1.3. HF-Resonator	24
3.2. Tumor- und Tiermodell	24
3.2.1. Anästhesie	24
3.2.2. Histologie Marker	26
3.3. Messprotokoll	26
4. Reoxygenierung	31
4.1. Grundlagen	31
4.1.1. Atemgastransport im Blut	31
4.1.2. Magnetische Eigenschaften des Hämoglobins	34
4.2. BOLD-Messung	37
4.2.1. Messprotokoll und Datenauswertung	38
4.2.2. BOLD Ergebnisse	39
4.2.3. BOLD Diskussion	43
4.3. Messung des absoluten Sauerstoffpartialdrucks	46
4.3.1. Allgemeines zu Perfluorcarbonen	46

4.3.2.	Spin-Gitter-Relaxationsrate und pO_2	47
4.3.3.	^{19}F -Kalibrierungskurven	48
4.3.4.	Messprotokoll und Ergebnisse	49
4.3.5.	Diskussion	53
5.	Perfusion	57
5.1.	Grundlagen	57
5.2.	Messmethoden und Datenauswertung	61
5.3.	Ergebnisse	64
5.4.	Diskussion	66
6.	Vergleich der NMR-Messdaten mit der histologischen Auswertung	69
6.1.	Pimonidazol als histologischer Hypoxiemarker	69
6.2.	Histologische Perfusionsmessung	70
6.3.	Bestimmung der Tumor-Kontroll-Dosis TCD_{50}	72
6.4.	Vergleich der NMR-Messung mit histologischen Daten	72
6.5.	Ergebnisse	73
6.6.	Diskussion	79
7.	Berechnung von Relaxationszeiten über Pulsprogrammsimulationen	83
7.1.	Grundlagen	84
7.2.	Simulation der T_1 -Messung	85
7.2.1.	Flipwinkelvariationen	89
7.2.2.	Variationen im Inversionspulswinkel	93
7.2.3.	Anregungs-Schichtprofile	95
7.2.4.	Signal-Rausch-Verhältnis	98
7.2.5.	Partialvolumen-Effekte	101
7.2.6.	Gleichzeitige Messung von unterschiedlichen T_1 -Relaxationszeiten	104
7.2.7.	Zusammenfassung der Simulationsergebnisse	107
7.3.	Kombinierte T_1/T_2^* Messung	110
7.4.	Phantom und <i>in vivo</i> Messungen	115
7.5.	Ergebnisse	115
7.6.	Diskussion	122
8.	Zusammenfassung	125
9.	Summary	129
A.	Anhang	i
A.1.	Gradientenberechnung und k-Raum	i
A.2.	Wirbelstrom Artefakte	ii
A.3.	Segmentierte T_1 -Messung	ii
A.4.	Herstellung der PFC-Emulsion	iii
A.5.	Berechnung des T_1 -Wertes bei biexponentieller Relaxation	iv
A.6.	Signalmodulation durch chemische Verschiebung	iv
A.7.	Schematischer Ablauf der Pulsprogramm-Simulation	viii

Literaturverzeichnis	xi
Publikationen	xxiii
Danksagung	xxvii
Eidesstattliche Erklärung	xxix

1. Einleitung

Bösartige Tumoren (Krebs) sind nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern [1]. Mehr als 25% aller Todesursachen im Jahr 2007 in Deutschland sind auf bösartige Neubildungen (Tumoren) zurückzuführen – der bedeutendsten Todesursache in den mittleren Jahren [2].

Eine Tumorerkrankung kann durch unterschiedliche Verfahren und deren Kombination behandelt werden (z.B. operatives Entfernen des Tumors, Chemotherapie, Hyperthermie, Stammzelltherapie, Strahlentherapie). Bei der Strahlentherapie, wird das Tumorgewebe mit ionisierenden Röntgenstrahlen beschossen und dadurch zerstört. Besondere Sorgfalt ist bei der sehr komplexen Planung der Bestrahlung geboten, bei der das gesunde umliegende Gewebe so wenig wie möglich geschädigt werden soll, die Intensität im Tumor aber hoch genug sein muss, um diesen vollständig zu zerstören. Um diese Bestrahlungsparameter korrekt bestimmen zu können, sind einige Informationen über den Tumor, wie z.B. die Einteilung in gutartigen und bösartigen Tumor, Größe, Position im Körper, Strahlenresistenz nötig. Diese Tumordaten werden zurzeit mit Verfahren der Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Biopsien und der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) gewonnen. Mit diesen Informationen soll der Tumor eindeutig identifiziert und ein individueller Therapie- und Bestrahlungsplan ausgearbeitet werden. So kann z.B. ein als hypoxisch¹ identifizierter Tumor durch Beatmung mit sauerstoffreichem Gas eventuell besser mit Sauerstoff versorgt werden. Dies wirkt sich positiv auf die Strahlenempfindlichkeit des Tumors aus und setzt somit die nötige Gesamtdosis an ionisierender Strahlung zur Vernichtung des Tumorgewebes herab. Ideal wäre es, wenn die nötigen Parameter zur Tumorklassifizierung nichtinvasiv und ohne für den Organismus schädliche ionisierende Strahlung über die MRT bestimmt werden könnten.

Bis heute sind die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern des Mikromilieus, dem Wachstum und der Strahlenresistenz von Tumoren noch nicht vollständig geklärt. Die Kenntnis der Abhängigkeiten dieser Parameter voneinander ist aber ein wichtiger Schritt zur Entwicklung von effektiveren Therapien und Medikamenten zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Zu diesem Zweck wurde ein multiinstitutionelles Verbundprojekt, bestehend aus vier Universitäten (Technische Universität Dresden, Universität Mainz, Technische Universität München und Universität Würzburg), gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), ins Leben gerufen [3]. Ziel dieses Projekts ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Tumorphoxie, Parametern des Tumormikromilieus und der Strahlensensitivität. Dazu werden standardisierte humane

¹Mit Sauerstoff unterversorgt.

Xenograft-Tumor-Modelle² mit unterschiedlichen Verfahren in den einzelnen Instituten untersucht, die Ergebnisse miteinander verglichen und die gemessenen Parameter auf Korrelationen geprüft.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die Teil dieses Verbundprojekts ist, ist die nichtinvasive orts aufgelöste Messung einzelner radiobiologisch relevanter Parameter *in vivo* mit Hilfe der kernmagnetischen Resonanztomographie. Im Vordergrund steht dabei zum einen die Mikrozirkulation und die davon abhängende Versorgung mit Sauerstoff und zum anderen die Tumorhypoxie und -reoxygenierung als prognostisch relevante und beeinflussbare Faktoren für die Strahlentherapie. Diese Parameter sollen nichtinvasiv erfasst und mit den entsprechenden Daten aus der Histologie, die zurzeit das Standardverfahren zur Bestimmung dieser Parameter darstellt, verglichen werden. Dazu wurden an einem 17.6T-Magnet-Resonanz-Tomographen ein standardisiertes Messprotokoll mit verschiedenen bildgebenden Messverfahren entwickelt, das an unterschiedlichen Xenograft-Tumor-Modellen angewendet wurde. Die Umsetzung dieser Untersuchungen soll letztlich auch auf die klinische Situation am Patienten übertragen werden.

Ein kritischer Faktor bei der Portierung der am Hochfeld entwickelten Verfahren in die Klinik ist die Messzeit. Bei den üblichen klinischen MR-Tomographen mit einer Feldstärke von 1.5T ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich geringer als bei dem hier verwendeten 17.6T-Tomographen³. Um die gleiche Qualität der Messdaten zu erhalten müssen bei einem klinischen Messprotokoll die Anzahl der Mittelungen erhöht und/oder die Auflösung in den Bildern herabgesetzt werden. Da jedoch eine möglichst hohe räumliche Auflösung in den Parametern benötigt wird muss ein Kompromiss zwischen Messzeit (Anzahl der Mittelungen) und Auflösung eingegangen werden, da dem Patient maximal eine Verweildauer von ca. einer Stunde in dem Tomographen zugemutet werden kann. Um den Faktor Zeit etwas zu entschärfen wurde in dieser Arbeit eine neue Messmethode entwickelt, die es erlaubt zwei MR-Relaxationsparameter in nur einer Messung von der Dauer einer herkömmlichen Relaxations-Messung zu akquirieren. Dazu wurden die gemessenen Daten nicht wie üblich über analytische Funktionen, sondern über einen eigens implementierten Algorithmus an die Modellfunktion angepasst. Dieses Messverfahren wurde bezüglich seiner Stabilität in verschiedenen Simulationen und realen Messungen überprüft und mit dem Standardmessverfahren verglichen.

In den folgenden Kapiteln werden kurz die physikalischen und biologischen Grundlagen beschrieben die zum Verständnis dieser Arbeit nötig sind. Kapitel (3) beschreibt die verwendeten Materialien, das Tiermodell und das etablierte Messprotokoll. In Kapitel (4) wird dargestellt, wie die Reaktion von Tumoren auf die Atmung von Carbogengas⁴ orts aufgelöst erfasst werden kann. Die nichtinvasive, quantitative und orts aufgelöste Messung der nativen Mikrozirkulation der Tumoren mit Spin-Labeling-Techniken wird in Kapitel (5) beschrieben. Der Vergleich und die Korrelation der erfassten Parameter untereinander und mit den Daten aus der Histologie erfolgt dann in Kapitel (6). Die neue Messmethode zur simultanen Erfassung von zwei Relaxationszeiten wird in Kapitel (7) beschrieben.

²Humane Tumoren transplantiert auf ein Mäuse-Wirtstier.

³Das Signal in der NMR ist proportional zur Magnetfeldstärke.

⁴Ein Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid

2. Grundlagen

2.1. Physikalische Grundlagen

Die Kernspinresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance, NMR, auch kurz MR genannt) beschreibt die Interaktion nuklearer Spins mit einem externen Magnetfeld. Im Folgenden wird auf die wesentlichen Aspekte der Kernspinresonanz eingegangen, soweit sie zum Verständnis dieser Arbeit notwendig sind [4–7].

2.1.1. Gleichgewichtsmagnetisierung

Ein Atomkern mit ungepaarten Nukleonen besitzt einen nicht verschwindenden inneren Drehimpuls, den Kernspin \vec{I} . Aus der Quantenmechanik sind die Eigenwertgleichungen für den Kernspin bekannt [8]:

$$\begin{aligned} \vec{I}^2 |Im\rangle &= \hbar^2 I(I+1) |Im\rangle \\ I_z |Im\rangle &= \hbar m |Im\rangle \end{aligned} \quad (2.1)$$

Mit dem Kernspin \vec{I} ist ein magnetisches Moment

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.2)$$

verbunden, mit γ als gyromagnetischem Verhältnis des betrachteten Atomkerns. Für den Wasserstoff- bzw. Fluorkern gilt:

$$\frac{\gamma}{2\pi} = \begin{cases} 42.58 \text{ MHz/T} & \text{für } ^1\text{H} \\ 40.08 \text{ MHz/T} & \text{für } ^{19}\text{F} \end{cases} \quad (2.3)$$

Die Eigenwertgleichungen (2.1) ergeben ein diskretes Eigenwertspektrum, womit auch μ nach Gleichung (2.2) nur diskrete Werte annehmen kann. Durch Anlegen eines statischen Magnetfeldes \vec{B}_0 spalten die entarteten Energieniveaus der Atomkerne in $(2I+1)$ Niveaus auf, die von der magnetischen Quantenzahl m indiziert werden. m kann beim Wasserstoff- und Fluorkern die Werte $-1/2$ und $+1/2$ annehmen, mit einer Energiedifferenz zwischen den Niveaus von:

$$\Delta E = \gamma \hbar \left| \vec{B}_0 \right| \quad (2.4)$$

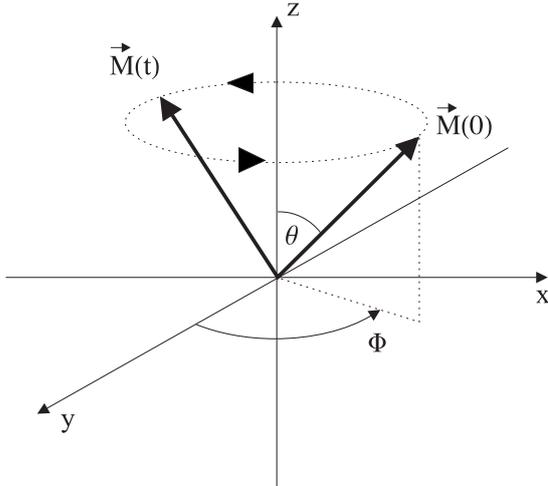


Abbildung 2.1.: Präzessionsbewegung eines Spins in einem konstanten Magnetfeld.

Werden Quanten $\hbar\omega$ genau dieser Energie in das System eingestrahlt, so können Übergänge zwischen den aufgespaltenen Niveaus induziert werden. Dieses Phänomen der resonant induzierten Übergänge bezeichnet man als Kernresonanz (NMR). Durch Gleichsetzen der Quantenenergie mit der Energiedifferenz der Niveaus erhält man die Resonanzfrequenz oder **Larmorfrequenz** des Spinsystems:

$$\omega_0 = \gamma \left| \vec{B}_0 \right| \quad (2.5)$$

Bei einer Messung beobachtet man jedoch nicht das Moment eines einzelnen Spins, sondern das einer großen Zahl identischer Spins, die sich zum Gesamtmoment der Probe addieren. Es ist also zweckmäßig, den Begriff der makroskopischen Magnetisierung \vec{M} einzuführen, der das räumliche Mittel über die Summe der magnetischen Momente $\vec{\mu}_i$ beschreibt:

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_i \vec{\mu}_i \quad (2.6)$$

Da die einzelnen Momente thermodynamisch miteinander in Wechselwirkung stehen, muss zur Beschreibung des Systems in der klassischen Näherung die Boltzmann-Statistik herangezogen werden [9]. Im thermodynamischen Gleichgewicht der Zustände liefert diese eine Nettomagnetisierung von [7]

$$\vec{M}_0 = \frac{\rho_0 \gamma^2 \hbar}{4k_B T} \vec{B}_0 \quad (2.7)$$

mit ρ_0 als Dichte der Spins in der Probe, T der absoluten Temperatur und k_B der Boltzmann-Konstanten. Auch bei hohen Magnetfeldstärken bewegt sich der Besetzungsunterschied der Niveaus, bezogen auf die Gesamtzahl der Teilchen, lediglich in einer Größenordnung von 10^{-5} . Im thermodynamischen Gleichgewicht präzediert der Mittelwert der Magnetisierung \vec{M}_0 mit der Larmorfrequenz um die Richtung von \vec{B}_0 (siehe Abbildung 2.1).¹

¹Die Richtung von \vec{B}_0 wird üblicherweise und ohne Beschränkung der Allgemeinheit als z-Richtung des Koordinatensystems gewählt.

2.1.2. Anregung

Alle Verfahren in der NMR basieren auf einer Messung der in einer Hochfrequenz-Spule induzierten Spannung aufgrund eines oszillierenden, relaxierenden magnetischen Momentes. Da im thermischen Gleichgewicht die einzelnen Spins eines Ensembles keine Phasenkohärenz in der Transversalebene (xy -Ebene) aufweisen und die Longitudinalmagnetisierung einen statischen Vektor (entlang der z -Achse) darstellt, kann in diesem Zustand kein Signal detektiert werden. \vec{M}_0 muss durch eine Störung aus seinem thermodynamischen Gleichgewicht ausgelenkt werden. Dies geschieht durch ein weiteres, senkrecht auf \vec{B}_0 stehendes Magnetfeld, das mit der Resonanzfrequenz des Systems oszilliert. In der NMR wird dieses Wechselfeld durch Hochfrequenz-Pulse (HF-Pulse)² realisiert, die je nach Problemstellung unterschiedliche Gestalt³ haben können. Diese Pulse drehen die Magnetisierung um den Winkel

$$\alpha = \gamma \int_{\tau} B_1(t) dt \quad (2.8)$$

Häufig verwendete Pulse sind der 90° -Puls, der \vec{M}_0 in die Transversalebene dreht, und der 180° -Puls, der die Magnetisierung invertiert.

2.1.3. Relaxation

Nach der Auslenkung relaxiert die Magnetisierung wieder in die Gleichgewichtsposition parallel zu \vec{B}_0 zurück. Dabei spielen zwei Relaxationsmechanismen eine wesentliche Rolle:

Spin-Gitter-Relaxation

Hierbei handelt es sich um eine Wechselwirkung der Spins mit der Umgebung (dem "Gitter"). Rotations- und Translationsbewegungen der umgebenden Moleküle haben fluktuierende Magnetfelder am Ort des angeregten Kernspins zur Folge. Dies führt zu stimulierten Übergängen des Spins, wobei im Mittel mehr Spins von dem energetisch höheren Niveau in das niedrigere wechseln als umgekehrt. Dadurch kommt es zu einer Verringerung des Abstands der Longitudinalmagnetisierung $M_z(t)$ zur Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 [10]:

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.9)$$

Spontane Übergänge sind bei den betrachteten Frequenzen vernachlässigbar [11]. Die Lösung dieser Differenzialgleichung ergibt:

$$M_z(t) = M_z(0)e^{-t/T_1} + M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right) \quad (2.10)$$

²Als HF-Puls bezeichnet man eine kurzzeitige, hochfrequente, elektromagnetische Einstrahlung.

³Die Frequenz und Phase des Pulses können während der Einstrahlung variiert werden.

wobei M_0 die Longitudinalmagnetisierung im thermischen Gleichgewicht und $M_z(0)$ den Anteil der Magnetisierung in Richtung \vec{B}_0 direkt nach der Auslenkung darstellen. T_1 ist die probenspezifische Zeitkonstante, mit der das System nach der Anregung relaxiert. Sie liegt bei biologischen Geweben im Bereich von wenigen Millisekunden bis einigen Sekunden. Aufgrund ihrer Wirkung auf die Longitudinalmagnetisierung wird diese Relaxation auch als longitudinale Relaxation bezeichnet.

Spin-Spin-Relaxation

Anders als bei der Spin-Gitter-Relaxation wird bei diesem Relaxationsmechanismus keine Energie mit der Umgebung ausgetauscht. Sie beschreibt den Zerfall der Transversalmagnetisierung aufgrund eines irreversiblen Entropie-Effektes. Direkt nach der Drehung der Spins in die Transversalebene verlieren diese aufgrund von Wechselwirkungen untereinander und Magnetfeldfluktuationen ihre Phasenkohärenz. Das Spinsystem dephasiert und verliert dadurch an Transversalmagnetisierung $M_{xy}(t)$:

$$\frac{dM_{xy}(t)}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \quad (2.11)$$

mit der Lösung:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2} \quad (2.12)$$

und $M_{xy}(0)$ als Magnetisierung nach Beendigung des HF-Pulses. Im biologischen Gewebe reicht T_2 von einigen Millisekunden bis Sekunden. Allgemein gilt $T_1 \geq T_2$ für natürliche Proben [12, 13]. Die exponentielle Beschreibung der transversalen Relaxation gilt streng genommen nur für den Fall, in dem die Wechselwirkungsterme dieses Zerfalls schwach sind. Dies ist in wässrigen Lösungen und biologischem Gewebe aber immer der Fall [11, 14].

Neben der Spin-Spin-Relaxation gibt es noch eine Reihe anderer Mechanismen, die zum Zerfall der transversalen Magnetisierung beitragen. Einen bedeutenden Anteil stellt die Relaxation aufgrund von Magnetfeldinhomogenitäten, die in realen Messungen immer vorhanden sind, dar.

Laut Maxwell gilt für die magnetische Flussdichte \vec{B} in einem Material mit der spezifischen Suszeptibilität χ_m das einem Magnetfeld der Stärke \vec{H} ausgesetzt ist:

$$\vec{B} = \mu_0(1 + \chi_m)\vec{H} \quad (2.13)$$

mit μ_0 als magnetische Permeabilität des Vakuums. In einem Voxel⁴ biologischen Gewebes sind in der Regel mehrere Substanzen mit unterschiedlichen Suszeptibilitäten vorhanden. Damit existieren unterschiedliche Magnetfelder in diesem Voxel, was zu einer beschleunigten Dephasierung der transversalen Magnetisierung aufgrund von intrinsischen Magnetfeldinhomogenitäten führt. Auch die Inhomogenitäten des \vec{B}_0 Feldes über das Probenvolumen tragen zur transversalen Dephasierung bei. Die resultierende Zeitkonstante T_2^* des Signalzerfalls setzt sich aus T_2 und einer zusätzlichen Zeitkonstanten

⁴Ein (in der Regel quaderförmiges) Volumenelement der Probe, dessen Signal einen Bildpunkt in der Magnet-Resonanz-Bildgebung (MRI) darstellt.

T_2' aufgrund der Inhomogenitäten zusammen:

$$\begin{aligned}\frac{1}{T_2^*} &= \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \\ &= \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2\pi}\end{aligned}\quad (2.14)$$

Je höher das B_0 -Feld ist, desto stärker sind diese Effekte ausgeprägt.

Die in der HF-Spule gemessene, induzierte Spannung resultiert aus der mit der Resonanzfrequenz oszillierenden, transversalen Magnetisierung. Aufgrund der Feldinhomogenitäten empfängt die Spule jedoch keine scharfe Frequenzspitze bei der Larmorfrequenz, sondern eine Frequenzverteilung um die Resonanzfrequenz. Das gemessene Signal ist daher eine Überlagerung von exponentiell abfallenden Sinusschwingungen, das mit der Zeitkonstanten T_2^* abklingt. Es wird **Free Induction Decay** (FID) genannt.

2.1.4. Blochgleichung

Die Bewegung des Magnetisierungsvektors im Magnetfeld lässt sich, unter Berücksichtigung der einzelnen Relaxationsmechanismen und der Anregung, durch die empirischen Bloch-Gleichungen beschreiben [6]:

$$\begin{aligned}\frac{dM_x(t)}{dt} &= (\omega_0 - \omega)M_y(t) - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ \frac{dM_y(t)}{dt} &= -(\omega_0 - \omega)M_x(t) + \gamma B_1(t)M_z(t) - \frac{M_y(t)}{T_2} \\ \frac{dM_z(t)}{dt} &= -\gamma B_1 M_y(t) + \frac{M_z(t) - M_0}{T_1}\end{aligned}\quad (2.15)$$

Zur Vereinfachung sind die Blochgleichungen im mit der Larmorfrequenz (ω_0) um \vec{B}_0 rotierenden Koordinatensystem angegeben. Der Anregungspuls ($B_1(t)$) wird hier in x -Richtung eingestrahlt.

2.1.5. NMR-Tomographie

Das Ziel der Kernspintomographie ist es, Informationen über die räumliche Verteilung der Atomkerne in einer Probe zu erhalten. Zur ortskodierten Aufnahme des NMR-Signals wird das homogene, statische Magnetfeld (\vec{B}_0) mit räumlich konstanten Magnetfeldgradienten überlagert [15]. Dies führt zu unterschiedlichen Resonanzfrequenzen eines Kerns, je nach Position im Gradienten — das Signal wird frequenzkodiert. Bei der Verwendung von Gradienten in x -, y - und z -Richtung lässt sich das Signal damit dreidimensional kodieren. Im Folgenden wird beschrieben, wie eine zweidimensionale, ortskodierte Aufnahme realisiert werden kann.

Wird ein Gradient (G_z) in z -Richtung, parallel zu \vec{B}_0 , angelegt, so präzedieren die Spins entlang dieser Richtung mit unterschiedlichen Frequenzen:

$$B_z(z, t) = B_0 + zG_z(z) \quad (2.16)$$

$$\text{mit } G_z \equiv \partial B_z / \partial z$$

$$\omega(z, t) = \omega_0 + \omega_G(z, t) \quad (2.17)$$

$$\text{mit } \omega_G(z, t) = \gamma z G_z(t)$$

Bei geschaltetem G_z wird ein hochfrequenter Anregungspuls definierter Bandbreite in die Probe eingestrahlt. Damit werden nur Spins angeregt, deren Resonanzfrequenz im Frequenzband des Pulses liegen. Durch eine Offsetfrequenz auf dem HF-Puls kann die Schicht in z -Richtung verschoben werden; durch dessen Bandbreite und die Gradientenstärke kann die Schichtdicke variiert werden. Aufgrund seiner Funktion wird der Gradient in z -Richtung auch Schichtselektionsgradient oder **Slicegradient** genannt. Das Anlegen eines Gradienten führt zu einer zusätzlichen Dephasierung der Spins, da das Magnetfeld zwangsläufig inhomogener wird. Diese definierte Dephasierung wird durch Schalten eines negativen Gradienten nach dem Schichtauswahlgradienten wieder rückgängig gemacht (rephasiert)⁵.

Das akquirierte Signal setzt sich aus der Überlagerung aller Spins in der angeregten Schicht zusammen⁶:

$$s(t) = \iint dx dy \rho(x, y) e^{i\phi(x, y, t)} \quad (2.18)$$

Dabei entspricht $\rho(x, y)$ nicht der exakten physikalischen, sondern einer effektiven Spindichte, in die das B_0 -Feld, Spuleneigenschaften sowie Materialkonstanten mit eingehen [7]. Die Phase $\phi(x, y, t)$ hängt von der Überlagerung von B_0 -Feld und Gradientenfeld ab.

Das aufzunehmende FID-Signal oszilliert im MHz-Bereich mit der Larmorfrequenz, was technisch nur sehr schwer exakt aufzuzeichnen wäre. In der Praxis werden lediglich die Differenzen des zu messenden Signals bezüglich der Larmorfrequenz des ungestörten Systems ω_0 akquiriert. Diese Frequenzen liegen im kHz-Bereich und geben die Ortskodierung wieder. Mit anderen Worten: Das Ortssignal wird aus dem FID demoduliert, wobei ω_0 die Trägerfrequenz darstellt. Als Folge der Differenzbildung ist es dann auch physikalisch möglich negative Frequenzen zu messen. Die Phase in Gleichung (2.18) soll sich im Folgenden nur auf den niederfrequenten, ortskodierenden Anteil des Signals beziehen. Sie setzt sich bei ruhenden Spins zusammen aus:

$$\begin{aligned} \phi(x, y, t) &= \phi_x(x, t) + \phi_y(y, t) \\ &= -x\gamma \int_0^{\tau_x} dt G_x(t) - y\gamma \int_0^{\tau_y} dt G_y(t) \end{aligned} \quad (2.19)$$

⁵Die Dephasierung aufgrund von Inhomogenitäten im statischen Magnetfeld bleibt dabei weiterhin bestehen.

⁶Relaxationseffekte seien hier vernachlässigt (d.h. Aufnahmezeit $\ll T_2^*$).

Mit der Substitution

$$k_x = \int_0^{\tau_x} dt \frac{\gamma}{2\pi} G_x(t) \quad k_y = \int_0^{\tau_y} dt \frac{\gamma}{2\pi} G_y(t) \quad (2.20)$$

folgt durch Einsetzen von (2.19) in (2.18):

$$s(k_x, k_y) = \iint dx dy \rho(x, y) e^{-i2\pi x k_x} e^{-i2\pi y k_y} \quad (2.21)$$

Das gemessene Signal ist also die 2D-Fourier-Transformierte [16] der effektiven Spindichte, die proportional zur gesuchten physikalischen Spindichte ist. Dabei sind x und y die beiden Raumrichtungen in der angeregten Schicht und τ_x bzw. τ_y die Schaltzeiten der Gradienten G_x und G_y . Als Bild bezeichnet man den Betrag des komplexen, fourier-transformierten, ortskodierten Signals.

Um eine Probe ortskodiert aufnehmen zu können, müssen k_x und k_y den kompletten Messbereich abdecken. Wie aus Gleichung (2.20) deutlich wird, ist dies durch Variation der Gradientenstärke $G_{x,y}$ und/oder der Zeit $\tau_{x,y}$, in der die Gradienten anliegen, möglich.

Bei der Variation von τ_x und gleichzeitig konstantem G_x spricht man von der **Frequenzkodierung**. Während der digitalen Aufnahme des Signals (Akquisition) wird ein Gradient einer konstanten Stärke angelegt, wodurch die Spins entlang dieses Gradienten unterschiedlich schnell präzedieren. Das Signal wird dann zu diskreten, äquidistanten Zeitpunkten akquiriert, wobei sich die Spins in der angeregten Schicht unterschiedlich lange in dem Gradienten aufhalten; d.h. k_x ändert sich kontinuierlich während der Aufnahme. Dieser Gradient wird, da während seiner Schaltzeit die Daten eingelesen werden, Lesegradient oder **Readgradient** genannt. Um Bildartefakte durch Reflexionen, Induktion und Wirbelströme zu vermeiden wird ein Echo⁷ anstatt des FIDs direkt nach dem Anregungspuls ausgelesen. Dazu werden zwei Gradienten mit entgegengesetztem Vorzeichen (De- und Rephasierer) geschaltet, deren Flächenintegral zur Echomitte null beträgt (siehe Abbildung 2.2).

Umgekehrt ist es möglich, die Schaltzeit τ_y festzuhalten und die Gradientenstärke G_y zu variieren, was als **Phasenkodierung** bezeichnet wird. Vor dem Auslesen des Signals wird ein **Phasenkodiergradient** senkrecht zur Richtung des Lesegradienten für die Zeitdauer τ_y ein- und wieder ausgeschaltet. Dies führt zu einer ortsabhängigen Phasenakkumulation der Spins entlang der y -Richtung. Anders als beim Schichtselektions- und Lesegradient dürfen diese Spins natürlich nicht rephasiert werden, da die Ortsinformation, die in der akkumulierten Phase steckt, sonst verloren geht.

Bei der Akquisition wird jeweils nur eine k -Raumzeile in Leserichtung mit N_r diskreten Datenpunkten aufgenommen. Dabei ist die Phasenkodierung für alle N_r Datenpunkte gleich. Danach wird die Schicht erneut angeregt, der Phasenkodiergradient entsprechend verändert und die nächste k -Raumzeile aufgenommen. So wird durch sukzessive Erhöhung von $-k_{y,max}$ bis $+k_{y,max}$ in N_p Schritten der komplette k -Raum aufgezeichnet.

⁷Allerdings nicht mit der gleichen Amplitude des FID, sondern durch Relaxationseffekte gedämpft.

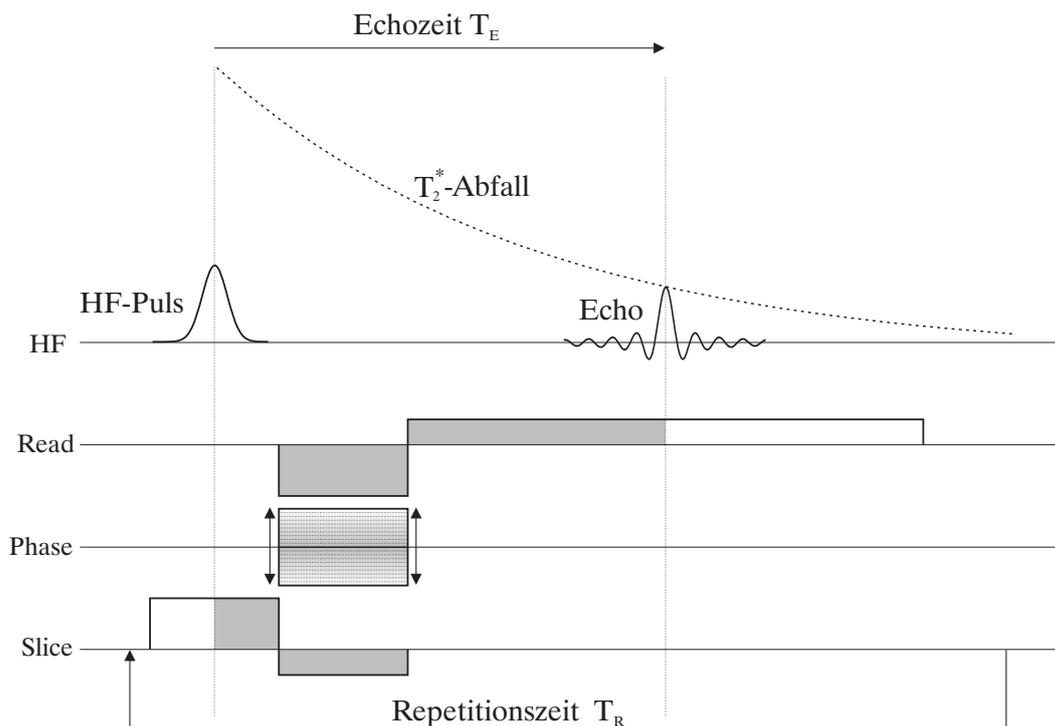


Abbildung 2.2.: Pulssequenz eines Gradientenecho-Experiments. Für die schattierten Bereiche des Lese- bzw. Schichtselektionsgradienten sind die Bedingungen zur Rephasierung der Spins erfüllt. Der Phasenkodiergradient nimmt nach jedem akquirierten Phasenschritt einen anderen Wert an.

Um die Daten vom k -Raum in die Spindichte im Orts-Raum (Bild-Raum) transformieren zu können, verwendet man die schnelle Fourier-Transformation (**F**ast **F**ourier **T**ransformation, FFT). Diese setzt voraus, dass genau $2^n \times 2^n$ diskrete Datenpunkte vorhanden sind. Um dem gerecht zu werden, teilt man den k - und damit auch den Bild-Raum in $N_r \times N_p = 2^n \times 2^n$ Punkte ein⁸.

Die Berechnung der Gradienten und der Zusammenhang zwischen k -Raum und Orts-Raum wird in Anhang A.1 dargestellt.

Im Allgemeinen stimmen die Richtungen der Lese-, Phasen- und Schicht-Kodierung nicht mit den x -, y - und z -Richtungen des ortsfesten Koordinatensystems überein. In diesem Fall werden die Gradientenstärken durch Drehmatrixoperationen an die gewünschte Richtung angepasst. Man bezeichnet die Richtungen daher üblicherweise als Lese-, Phasenkodier- und Schichtselektions-Richtung.

Den zeitlichen Ablauf, in dem die einzelnen Gradienten geschaltet werden, bezeichnet man als Pulssequenz. Dort wird außerdem festgelegt, wann HF-Pulse eingestrahlt werden und wann die Akquisition startet. In Abbildung (2.2) ist die Pulssequenz eines Gradientenecho-Experiments (GE-Experiments) dargestellt. Die Zeit von der Mitte des

⁸Alternativ können auch fehlende Datenpunkte mit Nullen bis zur nächsten Zweierpotenz aufgefüllt werden, was als **Zerofilling** bezeichnet wird.

HF-Pulses bis zur Echomitte wird als Echozeit T_E bezeichnet. Die Repetitionszeit T_R gibt die Zeitdauer an, die für die Akquisition eines Phasenschrittes benötigt wird. Diese Pulsfolge wird N_p mal durchlaufen, bis alle k-Raumzeilen eingelesen wurden.

Spinecho

Beim Spinecho-Experiment (SE-Experiment) wird die komplette longitudinale Magnetisierung durch einen 90° -HF-Puls in die transversale Ebene transferiert. Das Signal relaxiert daraufhin mit der Zerfallskonstanten T_2^* nach Gleichung (2.14). Der Signalverlust aufgrund von lokalen, statischen Magnetfeldinhomogenitäten (T_2') kann durch das Einstrahlen eines 180° -HF-Pulses zu einem Zeitpunkt $T_E/2$ nach dem 90° -Puls aufgehoben werden. Das Spinensemble rephasiert hierbei, da die Inhomogenitäten auf die Spins jetzt in entgegengesetzter Richtung wirken. Zu dem Zeitpunkt T_E ist die Dephasierung durch Magnetfeldinhomogenitäten aufgehoben und es entsteht ein Echo, das detektiert werden kann. Das Echosignal zerfällt in diesem Experiment nur noch mit der Spin-Spin-Relaxationszeit⁹ T_2 .

RARE

Die Aufnahmedauer für ein Spinecho-Experiment ist vergleichsweise hoch, da vor jedem erneuten 90° -Anregungspuls gewartet werden muss, bis genügend Längsmagnetisierung für eine erneute Anregung zur Verfügung steht. Um die Aufnahmezeit zu verkürzen, werden bei der RARE-Sequenz (**R**apid **A**cquisition with **R**elaxation **E**nhancement) [17] durch mehrfaches, äquidistantes Schalten von 180° -HF-Pulsen mehrere Echos, mit unterschiedlicher Phasenkodierung, aufgenommen. Damit verkürzt sich die Aufnahmedauer um den Faktor der pro Anregung aufgenommenen Echos. Das so akquirierte Bild weist einen starken T_2 -Kontrast auf, da die Echosignalstärken mit der Spin-Spin-Relaxationszeit abnehmen.

FLASH

Die Transferierung der kompletten Längsmagnetisierung in die transversale Ebene wie beim SE-Experiment führt zu sehr langen Aufnahmezeiten. Ein wesentlich schnelleres Bildgebungsverfahren auf der Basis des Gradientenechos ist das FLASH-Verfahren (**F**ast **L**ow **A**ngle **S**Hot) [18]. Hierbei wird durch kleine Anregungswinkel nur ein Bruchteil der Längsmagnetisierung in die Transversalebene geklappt, mit der dann ein Gradientenecho akquiriert wird. Dadurch steht nach dem HF-Puls noch genügend Längsmagnetisierung zur Verfügung um ohne Wartezeit erneut anzuregen und das nächste Gradientenecho zu akquirieren. Nach einigen HF-Pulsen stellt sich ein Gleichgewicht (Steady-State) zwischen Abnahme der Längsmagnetisierung durch die Anregung, und Anwachsen der Längsmagnetisierung aufgrund der Relaxation ein. Im Steady-State befindet sich das

⁹Bei Vernachlässigung von Diffusionseffekten, die das Signal im Allgemeinen weiter abschwächen.

System bei jedem Phasenschritt in dem gleichen Anfangszustand, so dass die einzelnen Phasenschritte zu einem artefaktfreien Datensatz zusammengefügt werden können.

2.1.6. Magnetische Suszeptibilität

Biologisches Gewebe besteht aus Materialien unterschiedlicher magnetischer Suszeptibilität. Die meisten biologischen und organischen Strukturen sind aus diamagnetischen Atomen aufgebaut, deren Atomkern kein Nettodrehimpuls besitzt. Durch das statische B_0 -Feld werden die Orbitale der Elektronen leicht gestört, was zu einer Induktion eines lokalen magnetischen Dipols führt. Dieses Phänomen bezeichnet man als diamagnetische Suszeptibilität, womit auch der Effekt der chemischen Verschiebung (siehe Kapitel 2.1.7) beschrieben werden kann. In einem Material mit der spezifischen Suszeptibilität χ_m wird eine magnetische Flussdichte \vec{B} nach Gleichung (2.13) induziert. Dabei wird in diamagnetischen Materialien ($\chi_m < 0$) das Magnetfeld leicht abgeschwächt, während in paramagnetischen ($\chi_m > 0$) bzw. ferromagnetischen ($\chi_m \approx 1$) Materialien das Feld verstärkt wird. An den Grenzflächen dieser Materialien unterschiedlicher Suszeptibilität entstehen Magnetfeldinhomogenitäten, deren Stärke proportional zum Suszeptibilitätsprung $\Delta\chi$ ist:

$$\Delta B_0 = \Delta\chi B_0 \quad (2.22)$$

Geometrische Verzerrung

Mathematisch lässt sich die Wirkung der lokalen Veränderung im statischen Magnetfeld (ΔB_0) auf das Signal durch die Gleichung

$$s(k_x, k_y) = \iint dx dy \rho(x, y) e^{-i2\pi k_x \left(x + \frac{\Delta B_0(x, y)}{G_r}\right)} e^{-i2\pi k_y \left(y + \frac{\Delta B_0(x, y)}{G_p}\right)} \quad (2.23)$$

beschreiben [4]. Hier wurde die lokale Frequenzdifferenz $\gamma\Delta B_0(x, y)$ in die Gleichung (2.18) eingesetzt. $\rho(x, y)$ gibt jetzt nicht mehr die physikalische Spindichte der Probe wieder, sondern ein durch Artefakte gestörtes Bild. Wie sich die Artefakte im Bild manifestieren, soll nun genauer untersucht werden.

Betrachtet wird ein Bildpunkt (x_0, y_0) , der durch eine Deltafunktion $\delta(x - x_0, y - y_0)$ repräsentiert wird. Die Verteilung $\delta\rho(x, y)$ des Punktes im Bild erhält man durch eine Fourier-Transformation des Signals $s(k_x, k_y)$:

$$\delta\rho(x, y) = \delta\left(x - \left(x_0 + \frac{\Delta B_0(x_0, y_0)}{G_r}\right), y - \left(y_0 + \frac{\Delta B_0(x_0, y_0)}{G_p}\right)\right) \quad (2.24)$$

Der Bildpunkt wird also um den Betrag $(\Delta B_0(x_0, y_0)/G_r, \Delta B_0(x_0, y_0)/G_p)$ zu seiner physikalischen Position verschoben im rekonstruierten Bild abgebildet (Abbildung (2.3)). Die in dieser Arbeit verwendeten Bildgebungssequenzen verwenden zur Phasenkodierung eine konstante Schaltzeit τ_p bei verschiedenen stark geschalteten Phasenkodiergradienten G_p .

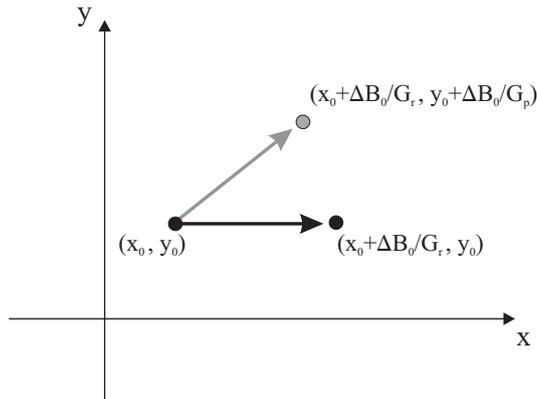


Abbildung 2.3.: Verschiebungsartefakt aufgrund von suszeptibilitätsbedingten Feldinhomogenitäten.

Daher tritt die Verzerrung nur in Leserichtung auf. In Phasenkodierrichtung ergibt sich eine lokale Modulation der Spinphasen mit $e^{i\gamma\Delta B_0\tau_p}$, die durch Phasendifferenz-Bildung ausgeglichen werden kann.

Aus Gleichung (2.24) geht hervor, dass die Verschiebung im Ortsraum proportional zu $\chi_m(x, y)B_0/G_r$ ist. Da das statische B_0 -Feld meist fest vorgegeben ist, sollte zur Minimierung dieses so genannten Displacement-Artefakts die Stärke der Lesegradierten möglichst hoch gewählt werden. Bei vorgegebenem FOV¹⁰ muss dann auch die Bandbreite entsprechend erhöht werden, um das Nyquist-Theorem zu erfüllen (siehe Gleichung A.5).

Diffusion und Magnetfeldinhomogenitäten

Anders als bei den makroskopischen Feldinhomogenitäten, die als statische Magnetfeldinhomogenitäten behandelt werden können, muss bei den mikroskopischen Inhomogenitäten die Diffusion berücksichtigt werden. Von besonderer Bedeutung sind die mikroskopischen Inhomogenitäten in der funktionellen Bildgebung bei der Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Blutes, da sich die Prozesse des Gasaustausches an den Kapillaren in dieser Größenordnung abspielen. Diffundiert ein Spinensemble durch eine durch Magnetfeldinhomogenitäten verursachte Frequenzverteilung, so akkumuliert es eine Phase die abhängig vom Diffusionsweg ist. Da die Spins in einem betrachteten Voxel durch die Brown'sche Molekularbewegung einen völlig zufälligen Weg durch diese Verteilung nehmen, akkumulieren sie auch eine zufällige Phase, die zu einem Verlust der transversalen Magnetisierung und damit zum Signalverlust führt. Die Effekte lassen sich bezüglich der Korrelationszeit der Wassermoleküle im Feld der magnetischen Inhomogenität (τ_D) und der räumlichen Variation der Larmorfrequenz aufgrund der Feldinhomogenität ($\delta\omega$) in drei Regime einteilen [19]. Bei räumlich fixierten Inhomogenitäten entspricht τ_D der Zeit, die ein Teilchen benötigt, um an der Inhomogenität vorbeizudiffundieren, und $\delta\omega$ entspricht der Larmorfrequenz auf der Oberfläche des magnetischen Partikels, der diese Inhomogenität verursacht. Für einen sphärischen

¹⁰englisch: field of view = Bildfeld, Messfeld

Partikel ergeben sich folgende Werte [20]:

$$\begin{aligned}\tau_D &= R^2/D \\ \delta\omega &= \gamma B_{eq}(R)\end{aligned}\tag{2.25}$$

mit R als Radius der Kugel, D dem Diffusionskoeffizienten des Wassers und $B_{eq}(R)$ dem äquatorialen magnetischen Feld auf der Oberfläche des Partikels. Die drei Regime sollen im Folgenden genauer betrachtet werden:

Motional Narrowing ($\delta\omega \cdot \tau_D \ll 1$)

Die Diffusion ist schnell im Vergleich zur räumlichen Variation der Feldinhomogenitäten. Durch die schnelle Bewegung der Spins mittelt sich die akkumulierte Phase beim Durchqueren der durch die Inhomogenität verursachte Frequenzverteilung zu einem Mittelwert. Der Spin hält sich im Mittel genau so lange in Bereichen hoher wie niedriger Feldstärke auf und erfährt damit eine Dephasierung, die dem Mittelwert der Feldinhomogenität entspricht. Dies führt zu einer Verschmälerung der Frequenzverteilung des Spinensembles in dem betrachteten Voxel.

Static Dephasing ($\delta\omega \cdot \tau_D \gg 1$)

Bei, im Vergleich zu den räumlichen Feldfluktuationen, langsamer Diffusion kann die Relaxation über ein Spinensemble, das sich durch eine statische Verteilung von linearen Gradienten bewegt, beschrieben werden. Im Grenzfall von vernachlässigbarer Diffusion kann die komplette Transversalmagnetisierung durch den 180° -Puls eines Spinecho-Experiments wiederhergestellt werden. Zum Signalverlust kommt es aber dennoch, da durch die statische Feldverteilung das Signal im Voxel mit T_2 abfällt (siehe Gleichung 2.14).

Intermediate ($\delta\omega \cdot \tau_D \approx 1$)

Der Bereich zwischen Static Dephasing und Motional Narrowing Regime ist analytisch schwer zu beschreiben. Aber gerade in diesem Bereich spielen sich die Relaxationsprozesse im biologischen Gewebe ab. Um dieses Regime theoretisch beschreiben zu können, wurden numerische Berechnungen, die die Phasenentwicklung zufällig diffundierender Spins in zylindrischen Feldinhomogenitäten simulieren, durchgeführt. Damit konnte der Einfluss verschiedener Parameter auf die Relaxationszeiten untersucht werden [19, 21, 22].

Abbildung (2.4) zeigt das Verhalten der transversalen Relaxation für ein Spinecho- bzw. Gradientenecho-Experiment in Abhängigkeit von der Diffusion. In dem Fall schneller Diffusion ($\delta\omega\tau_D \ll 1$) summiert sich die Phase auf einen Mittelwert, wodurch die Spins nur langsam dephasieren. Damit zerfällt die transversale Magnetisierung auch nur langsam. Dieser Effekt wirkt sowohl auf das Spin- als auch das Gradientenecho-Experiment, wodurch sich die Relaxationsraten immer weiter annähern. Ist die Diffusionsgeschwindigkeit klein ($\delta\omega\tau_D \gg 1$), kann die Transversalmagnetisierung in einem Spinecho-Experiment wieder hergestellt werden. Das Gradientenecho-Experiment erfährt aber durch die Intra-Voxel-Dephasierung einen Signalverlust. Mit steigender Diffusion mitteln sich die Phasen immer weiter zu einem gemeinsamen Mittelwert, wodurch die Relaxationsrate des GE-Experiments mit steigender Diffusionsrate abnimmt. Das SE-Experiment weist

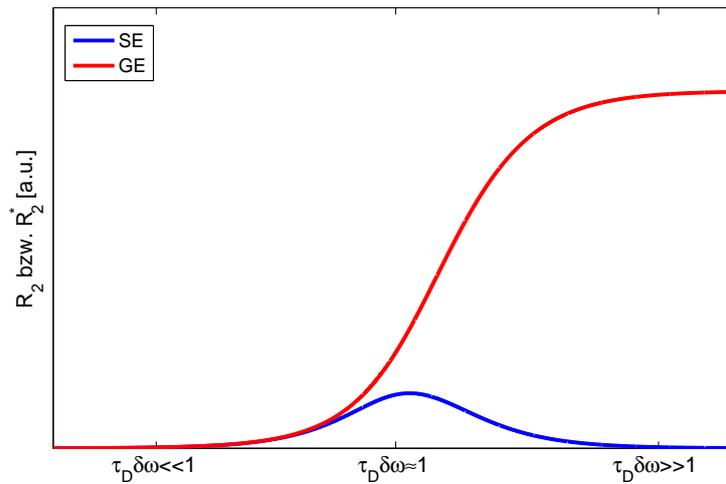


Abbildung 2.4.: Abhängigkeit der transversalen Relaxationsrate ($1/T_2$) von der Diffusionsgeschwindigkeit für ein Spinecho- bzw. Gradientenecho-Experiment (SE bzw. GE) (Logarithmische Auftragung der x -Achse).

bei mittleren Diffusionsraten ein Maximum der Relaxationsrate auf. Hier sind die Spins noch nicht schnell genug, um durch den Motional-Narrowing-Effekt ausreichend gemittelt zu werden, aber schon zu schnell, um durch den 180° -Puls refokussiert werden zu können. Obwohl das SE-Experiment seine maximale Relaxationsrate in dem biologisch interessanten Bereich bei typischen Diffusionsraten von $D \approx 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ hat, ist der Einfluss der Magnetfeldinhomogenitäten auf die Relaxationsrate R_2^* des GE-Experiments wesentlich stärker [19]. Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationsänderungen über Relaxationszeitmessungen in dieser Arbeit GE-Sequenzen verwendet.

2.1.7. Chemische Verschiebung

Wäre die Resonanzfrequenz eines Atomkerns nur von der Magnetfeldstärke und dem gyromagnetischen Verhältnis abhängig wie in Gleichung (2.5) angegeben, dann enthielte die NMR-Spektroskopie nur wenig Informationen für die Chemie oder Medizin. Kerne des gleichen Isotops würden mit derselben Larmorfrequenz präzedieren, selbst wenn sie in unterschiedlichen Molekülen eingebaut sind. Allerdings hängt die Resonanzfrequenz eines Atomkerns unter anderem von seiner chemischen Umgebung ab, was als chemische Verschiebung bezeichnet wird [23]. Dabei wird das am Kern herrschende Magnetfeld durch die umgebenden Elektronen abgeschirmt. Da die Elektronen von Atomkernen bewegte Ladungen darstellen, ist mit ihnen ein magnetisches Moment verbunden. Dieses magnetische Moment wirkt dem statischen Magnetfeld B_0 am Ort des Atomkerns entgegen und schwächt dieses somit ab. Für das Magnetfeld am Ort des Atomkerns gilt:

$$B = B_0(1 - \sigma) \quad (2.26)$$

mit σ als dimensionslose Verschiebungskonstante, die von der chemischen Umgebung, in der sich der Kern befindet, abhängt. Die chemische Verschiebung wird relativ zur Resonanzfrequenz einer Referenzsubstanz in ppm¹¹ angegeben:

$$\delta = \frac{\nu_S - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad (2.27)$$

mit ν_S als Frequenz der untersuchten Substanz und ν_{ref} der Frequenz einer Referenzsubstanz ($\delta = \sigma \times 10^6$). Die Resonanzfrequenz der Referenzsubstanz sollte unabhängig von äußeren Einflüssen (Temperatur, pH-Wert, Eisenkonzentration, Shiftreagenzien, ...) sein und nur eine, möglichst ausgeprägte, Resonanzlinie im Frequenzspektrum fern von anderen Resonanzlinien, die sonst überlappen könnten, aufweisen. Als Referenzsubstanz, die diese Anforderungen erfüllt, hat sich Tetramethylsilan (TMS) durchgesetzt. TMS besteht aus einem zentralen Silicium-Atom (Si) und vier daran gebundenen Methylgruppen (CH₃) und ist chemisch weitgehend inert.

2.1.8. T₁-Quantifizierung

Eine Messung der absoluten T₁-Relaxationszeit ist auf unterschiedliche Arten möglich; z.B. durch eine Variation der Repetitionszeit bzw. des Flipwinkels oder durch ein Saturation-Recovery-Experiment. In der vorliegenden Arbeit wurde die Inversion-Recovery-Methode (IR-Methode) verwendet, die ein sehr robustes und genaues Verfahren zur Messung von T₁-Karten darstellt [24].

Beim IR-Experiment wird die longitudinale Gleichgewichts-Magnetisierung (M_0) durch einen 180°-Präparationspuls invertiert ($-M_0$). Die Magnetisierung relaxiert nach Gleichung (2.10) wieder zurück ins thermische Gleichgewicht:

$$\begin{aligned} M_z(0) &= -M_0 \\ M_z(t) &= M_0 \left(1 - 2 \exp\left(-t/T_1\right) \right) \end{aligned} \quad (2.28)$$

Der jeweilige Wert der longitudinalen Magnetisierung kann durch einen Anregungspuls zur Zeit T_I nach dem Inversionspuls detektiert werden. So ist es möglich, die Relaxationskurve zu bestimmten Zeitpunkten abzutasten und die T₁-Zeit durch eine Anpassung der Modellfunktion (2.28) an die Messdaten zu berechnen¹². Allerdings muss die Longitudinalmagnetisierung vor einer erneuten Inversion vollständig relaxiert sein, um korrekte T₁-Werte zu erhalten¹³, was eine Messung nach diesem Prinzip für *in vivo* Experimente aufgrund des hohen Zeitaufwandes unbrauchbar macht.

Eine Möglichkeit, die IR-Messung zu beschleunigen, stellt die kontinuierliche Abtastung

¹¹englisch: parts per million = Teile von einer Millionen ($\hat{=}10^{-6}$)

¹²Der Vorgang des Anpassens von Parametern einer Modellfunktion an die Messdaten wird im Folgenden auch als **fitten** und das Ergebnis als **Fit** bezeichnet.

¹³Das thermodynamische Gleichgewicht ist nach ca. $5 \times T_1$ wieder erreicht.

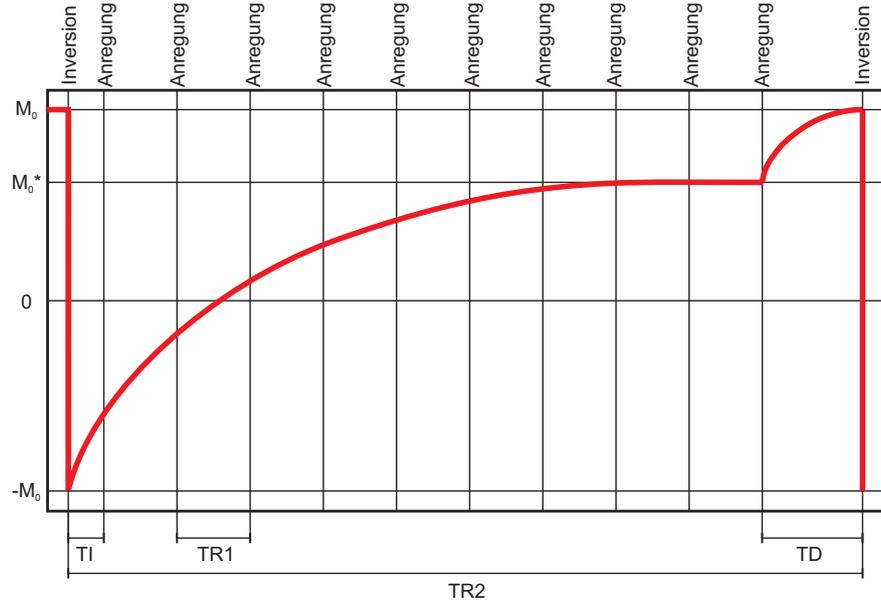


Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung der Abtastsequenz eines T_1 -Signalverlaufs. Nach dem Inversionspuls wird kontinuierlich im Abstand der Repetitionszeit T_{R1} eines FLASH-Moduls die T_1 -Relaxationskurve abgetastet. Nach der Repetitionszeit T_{R2} folgt der nächste Inversionspuls, nachdem das System in der Zeit T_D in das Gleichgewicht zurückgekehrt ist.

des Signals nach dem Inversionspuls mit mehreren FLASH-Modulen¹⁴ dar [25–27]. Damit ist es möglich, den kompletten T_1 -Verlauf mit einer Inversion zu erfassen. Hierbei relaxiert die Magnetisierung jedoch aufgrund der sukzessiv eingestrahlten Anregungspulse der FLASH-Module nicht mehr ungestört nach M_0 , sondern abhängig von den Anregungspulswinkeln und der FLASH-Repetitionszeit, gegen einen kleineren Wert M_0^* . In der Arbeit von Deichmann [27] sind die Korrekturen, um den störenden Einfluss der Anregungspulse auf die Magnetisierung zu eliminieren, beschrieben. Aber auch hier darf der nächste Inversionspuls nicht unmittelbar nach dem letzten FLASH-Modul erfolgen, sondern die Magnetisierung muss zurück zum Gleichgewicht relaxieren (Abbildung 2.5). Nach diesem Schema wird jede k-Raum Zeile des Bildes aufgenommen. Diese Sequenz liefert so viele Bilder wie Anzahl an FLASH-Modulen nach einer Inversion geschaltet wurden. Die Signalintensität eines Bildes ist proportional zur longitudinalen Magnetisierung zum Zeitpunkt T_I der Messung. Die akquirierten Daten werden für jeden Bildpunkt der Zeitserie durch einen Drei-Parameter-Fit an die Funktion

$$M_z(t) = A - B \exp\left(-t/T_1^*\right) \quad (2.29)$$

angefittet. Dabei stellt der berechnete Wert T_1^* die durch die HF-Pulse der FLASH-Module gestörte T_1 -Relaxationszeit dar. T_1 lässt sich nach [27] aus den Fitparametern A , B und T_1^* berechnen:

$$T_1 = T_1^* \left(B/A - 1 \right) \quad (2.30)$$

¹⁴FLASH-Modul: Anregung mit kleinem Pulswinkel und Auslesen eines Echos.

Um den T_1 -Verlauf fitten zu können, müssen die komplexen Messdaten in Realwert-Bilder mit korrektem Vorzeichen umgerechnet werden. Dazu wurde der Mittelwert der Phase über die letzten drei komplexen Bilder eines Datensatzes gebildet. Von allen Bildern des Datensatzes wurde diese Referenzphase abgezogen und der Realwert der so berechneten Bilder (KorrBilder) zum Fitten verwendet:

$$\begin{aligned} \text{RefPhase} &= \frac{\text{Mittelwert letzte 3 Bilder}}{\text{abs}(\text{Mittelwert letzte 3 Bilder})} \\ \text{KorrBilder} &= \text{real}\left(\frac{\text{alle Bilder}}{\text{RefPhase}}\right) \end{aligned} \quad (2.31)$$

Alternativ ist auch ein Fit des Betrages an eine entsprechende Modellfunktion möglich; die Umrechnung des Datensatzes in Realwerte hat sich aber für den Fit nach Deichmann als die stabilere Methode herausgestellt.

Durch die Akquisition mehrerer k-Raum Zeilen des entsprechenden Bildes in einem FLASH-Modul (segmentierte Aufnahme, siehe Anhang A.3) ist es möglich, die Aufnahmezeit der Sequenz weiter zu reduzieren.

2.1.9. T_2^* -Quantifizierung

Die Messung der T_2^* -Relaxationszeit erfolgt durch eine Gradientenecho-Methode wie z.B. der FLASH-Sequenz. Wie im Kapitel (2.1.3) beschrieben, zerfällt das Signal eines FID mit der Zerfallszeit T_2^* . Diese Zerfallskonstante kann durch eine Verlängerung der Echozeit von einzelnen, aufeinanderfolgenden GE-Experimenten aufgezeichnet werden. Dabei werden verschiedene Bilder mit unterschiedlichen Echozeiten aufgenommen und das Signal jedes einzelnen Pixels entlang der Zeitserie mit ansteigender Echozeit an die Funktion

$$S_x(t) = A \exp\left(-t/T_2^*\right) \quad (2.32)$$

gefitet. Eine separate Messung zu den einzelnen Echozeiten ist allerdings sehr zeitaufwendig. Mittels der Multi-Gradientenecho-Sequenz (MGE-Sequenz) ist es möglich, den kompletten T_2^* -Zerfall in einer Messung zu akquirieren. Dazu wurden nach dem Anregungspuls durch aufeinanderfolgendes De- bzw. Rephasieren des Signals eine Reihe von Gradientenechos zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgezeichnet (Abbildung 2.6). In dieser Abbildung sind lediglich die Echos bei positiv geschaltetem Lesegradienten eingezeichnet. Genau genommen rephasieren die Spins auch in der Mitte des negativ geschalteten Gradienten. Da durch die Phasendifferenzen zwischen den „positiven“ und „negativen“ Echos die entstehenden Bilder aber nicht mehr genau deckungsgleich übereinander zum Liegen kommen, wurden in dieser Arbeit ausschließlich die „positiven“ Echos zur Berechnung der T_2^* -Karten herangezogen. Des Weiteren wurden die De- und Rephasierer in Dauer und Amplitude identisch (jedoch mit entgegengesetzten Vorzeichen) geschaltet, um den Einfluss von Wirbelstromartefakten (siehe Anhang A.2) auf die Messung zu minimieren. Durch das symmetrische Schalten der Gradienten kompensieren sich die Wirbelstromartefakte des Lesegradienten.

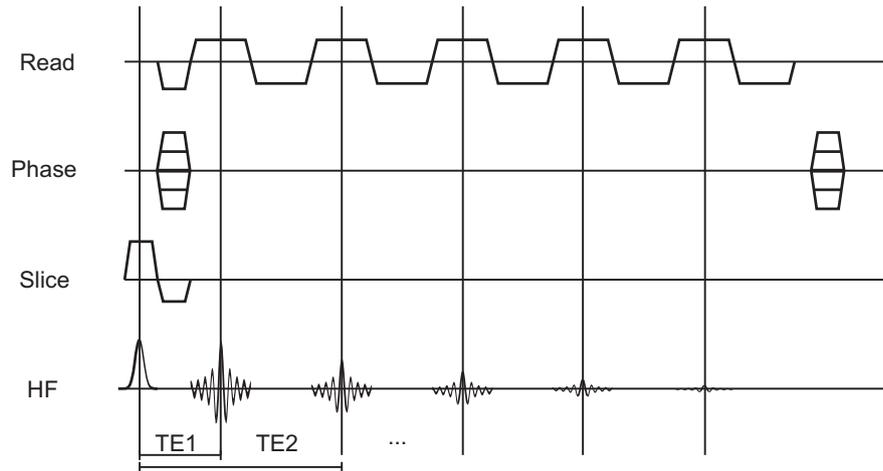


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung des Pulsprogramms einer T_2^* Multi-Gradientenecho-Sequenz. Nach dem Anregungspuls werden zu den Zeitpunkten T_{E1} , T_{E2} , usw. Gradientenechos aufgezeichnet, die mit der Zeitkonstanten T_2^* zerfallen.

Ein weiteres Artefakt, das bei der T_2^* -Messung auftreten kann, entsteht durch den Einfluss von makroskopischen Hintergrundgradienten auf das Signal [28]. Da ein Voxel häufig in der Richtung senkrecht zur Messschicht eine größere Ausdehnung als in der Schicht selbst hat, treten diese Effekte in der Regel in Schichtrichtung auf. Diese Hintergrundgradienten führen zu einer Unterschätzung der T_2^* -Zeit, die umso gravierender ist, je dicker die Schicht im Vergleich zum Hintergrundgradienten gewählt wird. Durch eine Korrektur in der Berechnung des T_2^* -Wertes lässt sich, wie in der Arbeit von Fernandez-Seara [28] beschrieben, der korrekte Wert berechnen. Bei hinreichend gutem Shim der Proben und ausreichend dünnen Messschichten ist dieser Effekt allerdings vernachlässigbar.

2.1.10. Approximationsalgorithmus

Die Relaxationszeitkarten (Relaxationskarten) in dieser Arbeit wurden nach dem Downhill-Simplex-Verfahren [29], das die kleinsten Fehlerquadrate (χ^2) zwischen den Messdaten und einer entsprechenden Modellfunktion (z.B.: Gleichung (2.32) oder (2.29)) durch Anpassung der Modellparameter (Fitparameter) minimiert¹⁵, berechnet. Diese Rechenvorschrift wird im Folgenden auch als **Fitalgorithmus** bezeichnet. Zur Generierung der Relaxationskarten wird der Algorithmus einzeln auf die Zeitserie jedes Bildpunktes des akquirierten Datensatzes angewandt. Zur Verkürzung der Rechenzeit wurde der Bilddatensatz zuvor segmentiert, so dass Datenreihen, die nur Rauschen und kein oder nur ein sehr schwaches Signal enthalten nicht gefittet wurden.

¹⁵engl.: least-square-error fit

2.2. Biologische Grundlagen

In den folgenden Kapiteln wird die Morphologie und Physiologie des Tumors sowie dessen klinische Behandlung durch Bestrahlung besprochen.

2.2.1. Der Tumor

Die Medizin versteht unter dem Begriff Tumor eine Neubildung von Körpergewebe (Neoplasie) durch die Fehlregulation des Zellwachstums. Diese Neubildungen können gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein und jegliche Art von Gewebe betreffen. Maligne Tumoren zeigen invasives und destruierendes Wachstum und können Tochtergeschwülste (Metastasen) bilden. Der Tumor besteht neben den neoplastischen Zellen auch aus Gefäßbindegewebe (Tumorstroma), das sich aus normalen Blutgefäßen, Bindegewebszellen, extrazellulärer Matrix und infiltrierten Entzündungszellen zusammensetzt. Das Tumorstroma versorgt die Tumorzellen mit Nährstoffen und schafft ein Milieu, das Tumorstromawachstum erst ermöglicht und für bestimmte Tumoren eine notwendige Voraussetzung für Invasion und Migration darstellt [30].

Der durch den Blutkreislauf zur Verfügung gestellte Sauerstoff diffundiert lediglich bis zu einem Abstand von ca. 150µm von den Kapillaren in das umliegende Gewebe [31]. Dies setzt ein strukturiertes Gefäßsystem zur optimalen Sauerstoffversorgung voraus. Aufgrund des schnellen Tumorstromawachstums und der langsamer und unkontrolliert wachsenden Gefäßstruktur wird das Tumorgewebe mit Sauerstoff unterversorgt – der Tumor wird hypoxisch [31–33]. Dieser Typ der Hypoxie wird chronische Hypoxie genannt. Von akuter oder perfusions-limitierter Hypoxie spricht man, wenn Blutgefäße aufgrund des unkoordinierten Tumorstromawachstums verschlossen sind. Diese Gefäße können sich wieder öffnen und den Tumor mit Blut und Sauerstoff versorgen [34]. Der Tumor passt sich dem veränderten Mikromilieu an, indem er die Zellteilungsrate herabsetzt und von der aeroben auf die anaerobe Zellatmung wechselt (Pasteur-Effekt). Ein Nebenprodukt der anaeroben Glycolyse ist das Laktat, das sich im hypoxischen Tumor anreichert und dort nachgewiesen werden kann. Allerdings wurden auch Tumore beobachtet, die trotz ausreichender Sauerstoffversorgung in den energetisch ungünstigeren¹⁶ anaeroben Glycolysezyklus wechseln (Warburg-Effekt) [35]. Dies verdeutlicht die inter- und intraindividuelle Heterogenität von Tumoren.

2.2.2. Tumorbehandlung

Eine Tumorerkrankung kann durch unterschiedliche Verfahren und deren Kombination behandelt werden (z.B. operatives Entfernen des Tumors, Chemotherapie, Hyperthermie, Stammzelltherapie, ...). In der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich auf die Strahlentherapie von Tumoren eingegangen, bei der das Tumorgewebe mit ionisie-

¹⁶Bei der aeroben Glycolyse entstehen 36 Moleküle ATP, während in der anaeroben Glycolyse lediglich 2 Moleküle pro Glukosemolekül produziert werden.

render Strahlung beschossen wird. Um dabei das umliegende Gewebe nicht zu stark zu belasten, wird das betroffene Areal von mehreren Seiten bestrahlt, wobei sich die Strahlenläufe im Tumor treffen. Die Strahlendosis und der Strahlengang werden in einem Bestrahlungsplan festgelegt.

Die biologische Wirkung der ionisierenden Strahlung lässt sich in direkte und indirekte Strahlenwirkung einteilen. Die direkte Strahlenwirkung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Energieabsorption in empfindlichen biologischen Molekülen direkt erfolgt (wodurch z.B. DNA-Brüche oder Zerstörung der Zell- oder Kernmembran verursacht werden). Bei der indirekten Strahlenwirkung entstehen freie Wasserradikale¹⁷, die das umliegende biologische Gewebe schädigen. Diese indirekte Strahlenwirkung macht den Hauptwirkanteil der Röntgenstrahlung (60-70%) aus. Je nach Schweregrad der Schädigung kann die Zelle den Schaden entweder reparieren oder den Zelltod (Apoptose) einleiten.

Ziel der Strahlentherapie ist es, das Tumorgewebe so weit zu schädigen, dass es abstirbt. Allerdings erschweren einige Eigenschaften des Tumors die Behandlung. Zum Einen wird die Bildung von strahleninduzierten sekundären Wasserradikalen in hypoxischen Zellen stark vermindert [31, 36–38]. Zum Anderen wirkt das bei der anaeroben Glykolyse entstehende Pyruvat als Radikalfänger, was die Wirkung der Bestrahlung herabsetzt [39]. Folglich ist eine höhere Strahlendosis nötig, um die hypoxischen Tumorzellen abzutöten – diese tödliche Strahlendosis kann bis zu einem Faktor von drei im Vergleich zu normalem Gewebe ansteigen [40]. Auch können Medikamente, die die Therapie unterstützen sollen, aufgrund der unzureichenden Gefäßstruktur nur sehr schlecht oder gar nicht zum Tumor transportiert werden. Es wird daher versucht, die hypoxischen Tumoreareale besser mit Sauerstoff zu versorgen, um die Strahlenempfindlichkeit zu erhöhen. Dies kann durch Gabe von Medikamenten, die die Durchblutung verbessern bzw. die Sauerstoffkonzentration im Blut erhöhen (z.B. Nitromidazol oder Erythropoetin) oder durch Beatmung mit sauerstoffreichen Gasen wie reinem Sauerstoff oder Carbogen¹⁸ erfolgen [41].

¹⁷Spaltung des Wassermoleküls in die Radikale H^+ und OH^- .

¹⁸Eine Gasmischung aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd.

3. Materialien und Methoden

3.1. Magnet-Resonanz-Tomograph

3.1.1. Bruker Avance 750

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen erfolgten an einem Avance 750 Magnet-Resonanz-Tomographen der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland). Die mit flüssigem Stickstoff und Helium gekühlte, supraleitende Spule des Tomographen erzeugt ein statisches Magnetfeld von 17.6T, was einer Protonen-Larmorfrequenz von 750MHz entspricht. Die Achse des Magnetfeldes ist senkrecht orientiert.

Um Magnetfeldverzerrungen, die durch das Einbringen des Gradientensystems, der Hochfrequenzspule und der Probe entstehen zu korrigieren, verfügt der Tomograph über ein Shimsystem. Durch Anpassen des Stroms durch die verschiedenen Shimspulen ist es möglich Feldkorrekturen bis zur vierten Ordnung durchzuführen.

Die anwenderseitige Steuerung der Experimente erfolgt über einen Linux-PC. Die Steuer- und Auswertesoftware Paravision 3.0.2 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) erlaubt das Erstellen und Manipulieren von Pulsprogrammen und die Akquisition und Rekonstruktion der NMR-Daten.

3.1.2. Gradientensystem

Verwendet wurden zwei verschiedene wassergekühlte Gradientensysteme. Beide Systeme besitzen eine aktive Schirmung, die Wirbelstromeffekte während der Gradientenschaltvorgänge reduziert. Das Micro 2.5-System schaltet einen maximalen Magnetfeldgradienten von 993mT/m in jede Raumrichtung, und kann Resonatoren mit einem Durchmesser von 40mm aufnehmen. Das Mini 5.0-System besitzt eine maximale Gradientenstärke von 200mT/m und bietet Platz für Spulendurchmesser bis 57mm. Durch den an den Wasserkreislauf angeschlossenen, mit einer zusätzlichen Heizeinheit versehenen Umwälzkühler (UWK 45, Haake, Karlsruhe, Deutschland) lässt sich die Betriebstemperatur des Gradientenrohrs einstellen und konstant halten.

3.1.3. HF-Resonator

Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein am Lehrstuhl angefertigter linearer Protonen-Birdcageresonator verwendet. Der Einsatz von Oberflächenspulen, welche im Vergleich zu Volumenspulen ein besseres SNR¹ erzielen würden, bietet sich grundsätzlich für die Messung von exponierten Proben, wie die subkutan transplantierten Tumoren an. Da aber die Messung der Perfusion eine globale Anregung des Probenvolumens fordert (siehe Kapitel 5), wurden für die Experimente ausschließlich Volumenspulen verwendet.

Für die Fluor-Messungen wurde ein, ebenfalls am Lehrstuhl angefertigter, Crosscage-Resonator verwendet. Hierbei handelt es sich im Prinzip um zwei koaxial ineinander gesteckte Birdcage Spulen, die um 90° zueinander verdreht sind. Die Kanäle der beiden Spulen lassen sich auf die Protonen- bzw. Fluorfrequenz bei 17.6T abstimmen. Damit ist eine Messung des ¹⁹F- bzw. ¹H-Signals einer Probe ohne Umbau der Spule und somit ein exaktes räumliches Vergleichen der Aufnahmen möglich.

3.2. Tumor- und Tiermodell

Alle Tierversuche wurden unter Beachtung der europäischen Richtlinien für die Versorgung und Verwendung von Labortieren durchgeführt. Für die Experimente lag eine Tierversuchsgenehmigung der Regierungspräsidien Dresden und Unterfranken vor.

Die Tumoren wurden in der TU-Dresden sieben bis 14 Wochen alten immunsuppressierten NMRI (nu/nu) Nacktmäusen in den hinteren linken Unterschenkel transplantiert. Die Mäuse stammen aus der spezifiziert-pathogenfreien (SPF) Zucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät der TU Dresden. Sie wurden bei 26°C und einer relativen Luftfeuchte von 60% bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Zwei Tage vor der Tumortransplantation wurden die Tiere zur weiteren Immunsuppression mit 4Gy (200kV; 0.5mm Cu; 1.3Gy/min) ganzkörperbestrahlt. Nach ein bis zwei Wochen hatten die Tumoren einen Durchmesser von etwa 7mm erreicht und konnten mit Methoden der NMR untersucht werden.

Untersucht wurden neun verschiedene standardisierte Tumorlinien humaner Xenograft-Plattenepithelkarzinome² aus dem Kopf-Hals-Bereich. Die gemessenen Tumorlinien, deren Herkunft aus dem Wirtsorganismus und die Institution, die diese Plattenepithelkarzinome zur Verfügung stellt, sind in Tabelle (3.1) zusammengefasst.

3.2.1. Anästhesie

Um die Tiere keinem unnötigen Stress auszusetzen, was nicht repräsentative Ergebnisse liefern würde, und um sie im Tomographen ruhig zu halten, wurden die Mäuse nar-

¹engl.: signal-to-noise ratio = Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

²engl.: squamous cell carcinoma, SCC.

Tumorlinie	Ursprungsorgan	Tumorgrading	VDT Median [Tage]	Institut
Cal33	Primärtumor der Zunge	G1	4.26	(1)
FaDu	Primärtumor des Hypopharynx	G4	4.48	(2)
HSC4	Primärtumor der Zunge	G2	3.8	(3)
SAS	Primärtumor der Zunge	G4	4.15	(3)
UT-SCC-5	Tumor der Zunge	G3	6.79	(4)
UT-SCC-8	Primärtumor des Kehlkopfs	G3	6.23	(4)
UT-SCC-15	rezidiver Tumor der Zunge	G2	6.03	(4)
UT-SCC-45	Primärtumor des Mundbodens	G4	6.91	(4)
XF354	Primärtumor des Mundbodens	G3	8.69	(5)

Tabelle 3.1.: *Untersuchte Tumorlinien mit Beschreibung deren Herkunft aus dem Wirtorganismus (Ursprungsorgan). Tumorgrading = histologisches Tumorgrading nach der American Joint Commission on Cancer, VDT = Volumenverdopplungszeit. Institut: (1) = Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; (2) = American Type Culture Collection HTB-43, Rockville, MD, USA; (3) = Japan Health Sciences Foundation; (4) = The University of Turku, Finland; (5) = Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.*

kotisiert. Die Narkose muss dabei tief genug sein, damit die Tiere nicht während der Messung aufwachen, darf aber auch nicht zu tief sein, so dass die Physiologie zu stark beeinflusst wird, was wiederum die Messdaten verfälschen würde. Eine Untersuchung der gebräuchlichsten Anästhetika bei Kleintieren hat gezeigt, dass Isofluran insgesamt den geringsten Einfluss auf die Physiologie des Tieres hat [42]. Das Narkosegas Isofluran wird mittels eines Vaporisators (Isoflurane Vapor, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) in regelbarer Konzentration mit dem Atemgas gemischt und der Maus über eine Atemmaske verabreicht. Als Inhalationsanästhetikum hat Isofluran den Vorteil, dass die Tiefe der Narkose schnell und einfach am Vaporisator je nach Bedarf nachjustiert werden kann. Die Narkose wurde mit 4% Isofluran eingeleitet und unter 2% Isofluran bei einem Atemgas-Volumenfluss von 2l/min aufrechterhalten. Isofluran besitzt eine atemdepressive Wirkung, was zu einer Schnappatmung der Maus führt. Dabei führt die Maus tiefe, kurze Atemzüge im Abstand von einigen Sekunden aus. Eine Überwachung der Atmung und des Herzschlags der Mäuse erfolgte über einen Drucksensor (Respiration Sensor, Graseby Medical Limited, Watford, UK), der in Höhe des Herzens der Maus positioniert ist. Die Druckwellen von Atem- und Herzbewegung werden durch diesen Sensor an ein Piezoelement weitergeleitet, das diese Daten als elektrische Signale an eine EKG-Einheit schickt. Mit dieser Einheit wird die Tiefe der Narkose durch Kontrolle der Atempauselänge konstant gehalten.

Die Temperatur der Maus im Tomographen wurde über ein Infrarot-Tempertursensor (Optex BA-30TV, ASM GmbH, Moosinning, Deutschland) kontrolliert und mit Hilfe

des Gradientenkühl- bzw. -heizsystems reguliert. Dabei wurde die Temperatur zwischen 36.5°C und 37.5°C gehalten.

3.2.2. Histologie Marker

Um die mittels NMR gewonnenen *in vivo* Daten mit den Daten aus der Histologie am selben Tumor vergleichen zu können, wurden vor Einbringen der Maus in den Tomographen die Histologiemarker Pimonidazol (Hypoxyprobe-Kit, Chemicon Europe Limited, Hampshire, UK) und BrdU (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) durch Injektion verabreicht. Nach der NMR-Messung wurde der Marker Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) eine Minute vor zervikaler Dislokation injiziert.

Pimonidazol

ist ein Hypoxiemarker; dabei handelt es sich um Imidazolderivate, die in Abwesenheit von Sauerstoff irreversibel an Membranproteine der Zelle binden [43].

Bromdesoxyuridin (BrdU)

wird zur Markierung proliferierender Zellen³ in vitalem Gewebe eingesetzt.

Hoechst 33342

ist ein DNA-Marker. Durch die Blutgefäße wird er im Körper verteilt und diffundiert in die Zellen des angrenzenden Gewebes. Wird die Blutzirkulation nach einer kurzen Zeit gestoppt, lassen sich bluttransportierende von verschlossenen Gefäßen durch eine immunhistologische Färbung des Hoechst 33342 unterscheiden.

Einzelheiten zu den Histologiemarkern und der histologischen Datenerfassung sind in [44] und [45] zu finden.

Das tumortragende Bein wurde sofort nach dem Tod amputiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das entnommene Gewebe wurde dann auf Trockeneis nach Dresden geschickt, wo die histologische Aufarbeitung des Materials erfolgte.

3.3. Messprotokoll

Die Maus muss, wie oben beschrieben, narkotisiert werden um repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Allerdings ist die Zeitspanne, die eine Maus in Narkose schadlos übersteht, auf ca. vier bis fünf Stunden beschränkt. Es ist daher erforderlich ein möglichst effektives Messprotokoll zu erarbeiten, um die Parameter des Tumormikromilieus an einem Tier in der vorgegebenen Messzeit akquirieren zu können. Gemessen wurden die Parameter Reoxygenierung, Perfusion und Laktatverteilung, wobei in dieser Arbeit nur die Messmethodik und Ergebnisse der ersten beiden Parameter dargestellt werden. Das genaue Messverfahren und die Ergebnisse der Laktatmessungen sind in [46] zu finden.

³Zellen in der Wachstums- bzw. Teilungsphase.

Im Einzelnen wurde das Messprotokoll wie folgt etabliert:

- Einleitung der Narkose.
- Injektion der Histologiemarker Pimonidazol und BrdU.
- Einbringen und positionieren der Maus in den Tomographen, so dass sich der Tumor im Isozentrum der Spule befindet.
- Abstimmen der Spulenfrequenz und -impedanz.
- Abstimmen des Shims, auf den Tumor und das unmittelbar umliegende Muskelgewebe. Dazu wurde die FASTMAP-Sequenz [47] verwendet. Der Shim wurde mit einer PRESS-Sequenz [48] in einem $3 \times 3 \times 3 \text{mm}^3$ großen Voxel im Zentrum des Tumors kontrolliert. Bei allen Messungen lag die Linienbreite des Wassersignals (FWHM⁴) in diesem Voxel unter 45Hz.
- Messung der räumlichen Verteilung der Laktatkonzentration.
- Messung der Perfusion.
- Messung der Reoxygenierung.
- Aufnahme eines anatomischen Übersichtsbildes mit einer RARE-Sequenz.
- Entnahme der Maus aus dem Tomographen.
- Injektion des Perfusionsmarkers Hoechst 33342.
- Zervikale Dislokation eine Minute nach Injektion des Perfusionsmarkers.
- Amputation und Schockfrieren des tumortragenden Beines in flüssigem Stickstoff.
- Lagerung in einem Tiefkühlschrank bei -80°C bis zum Transport nach Dresden auf Trockeneis.

Aufgrund der unterschiedlichen magnetischen Suszeptibilität von Tumorgewebe und Luft entsteht an deren Grenzfläche ein Suszeptibilitätssprung. Dieser führt zu einem beschleunigten Signalabfall, was vor allem bei der Messung von T_2^* -Karten ein Problem darstellt. Dieser Suszeptibilitätssprung wurde bei den Messungen verringert, indem um den Tumor und das Bein der Maus eine dünne Schicht von ca. 1mm Knete gewickelt wurde. Das Konzept der Suszeptibilitätsanpassung ist in ähnlicher Weise bereits in der Literatur beschrieben [49, 50]. Die Knetmasse wird selbst hergestellt und besteht aus einer Mischung aus Deuterium, Kochsalz, Alaunsalz und Mehl. Es wurde hier Deuterium anstatt von Wasser verwendet, weil dieses kein Signal in der NMR liefert. Dadurch kann das FOV klein und die Messzeit kurz gehalten werden, da es keine Einfaltungsartefakte durch ein Signal aus der Knetmasse gibt. In Abbildung (3.1) sind vergrößerte Ausschnitte von FLASH-Aufnahmen zweier Tumoren zu verschiedenen Echozeiten dargestellt. Der Tumor in der zweiten Bildreihe (3.1c und 3.1d) wurde mit Knete ummantelt, der in der ersten Reihe nicht. Der Tumor mit dieser Suszeptibilitätsanpassung zeigt einen deutlich geringeren Signalverlust an der Knete-Gewebe-Grenzfläche als der Tumor ohne

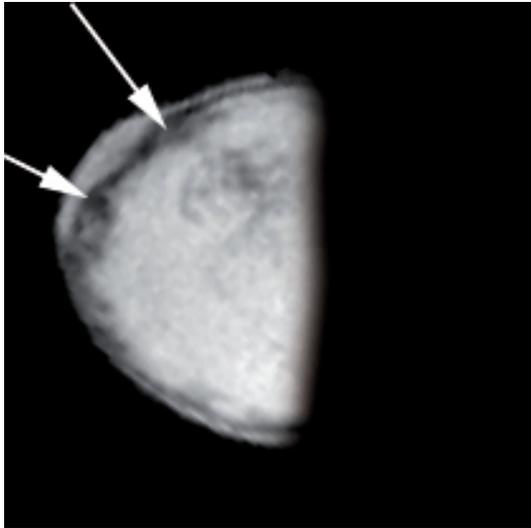
⁴engl.: full width half maximum.

Kneteummantelung an der Luft-Gewebe Grenzfläche (Pfeile in Abbildung (3.1a und 3.1b)).

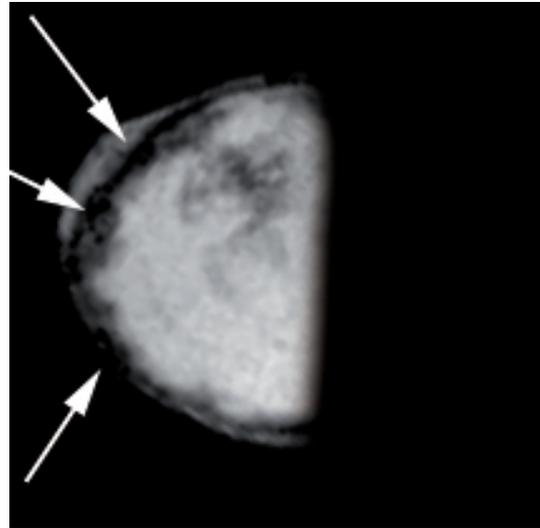
Da die Maus in vertikaler Richtung mit dem Kopf nach oben im NMR-Tomographen positioniert wurde, war eine Untersuchung des Einflusses dieser unnatürlichen Haltung auf die Physiologie nötig. Dazu wurden drei Mäusen die Histologiemarker wie im Protokoll beschrieben verabreicht. Eine Maus durchlief das Protokoll im Tomographen in vertikaler Positionierung, eine Maus außerhalb des Tomographen in gleicher Positionierung und die dritte Maus außerhalb des Tomographen in horizontaler Position. Alle Mäuse trugen Tumoren derselben Linie und mit ungefähr gleichem Durchmesser. Die Tumoren wurden anschließend nach Dresden zur histologischen Aufarbeitung geschickt. In den histologischen Daten zur Physiologie (hypoxische Bereiche, Perfusion, Darstellung von Thromben) war kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Positionierungen zu erkennen.

Zum besseren Verständnis der folgenden Bilddaten ist in Abbildung (3.2) eine anatomische RARE-Aufnahme axial durch das Mäusebein und das Zentrum des Tumors dargestellt. Der hellere Tumor grenzt sich deutlich von dem dunkleren Muskelgewebe ab. Die Knochen liefern in dieser Aufnahme kein Signal und sind als schwarze Bereiche im Muskelgewebe zu erkennen. In manchen Aufnahmen wurde zur Bestimmung der Laktatkonzentration ein rundes Referenzphantom neben den Tumor gelegt, was als heller Kreis in den Bildern zu erkennen ist.

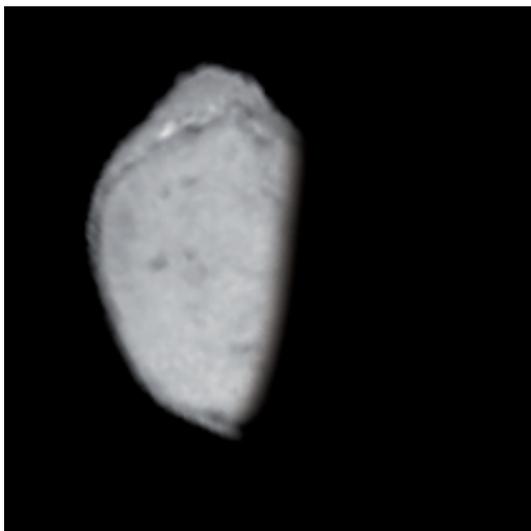
Sämtliche Bilddatensätze in dieser Arbeit wurden mit einem FOV von $16 \times 16 \text{mm}^2$ aufgenommen und von der nativen Bildmatrix, die bei den jeweiligen Messungen angegeben ist, auf eine Bildmatrixgröße von 256×256 Bildpunkten interpoliert.



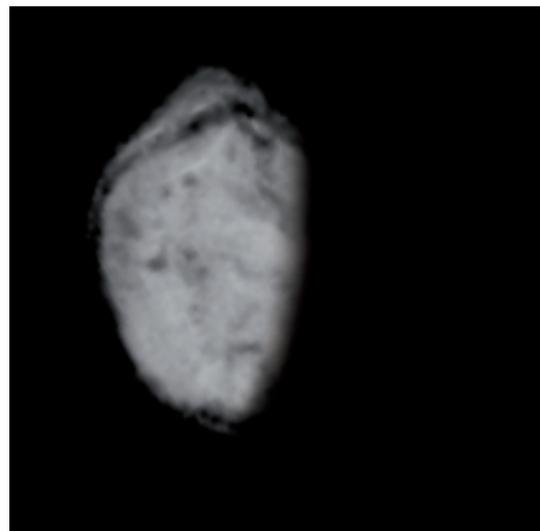
(a) Ohne Knete, $T_E=3\text{ms}$.



(b) Ohne Knete, $T_E=6\text{ms}$.



(c) Mit Knete, $T_E=3\text{ms}$.



(d) Mit Knete, $T_E=6\text{ms}$.

Abbildung 3.1.: Vergrößerte Ausschnitte von FLASH-Aufnahmen zweier Tumoren zu verschiedenen Echozeiten (T_E). Der Tumor in der zweiten Bildreihe (c) und (d) wurde mit Knete ummantelt, der in der ersten Reihe nicht. Der Tumor mit dieser Suszeptibilitätsanpassung zeigt einen deutlich geringeren Signalverlust an der Knete-Gewebe Grenzfläche als der Tumor ohne Anpassung an der Luft-Gewebe-Grenzfläche (Pfeile in Abbildung (a) und (b)).

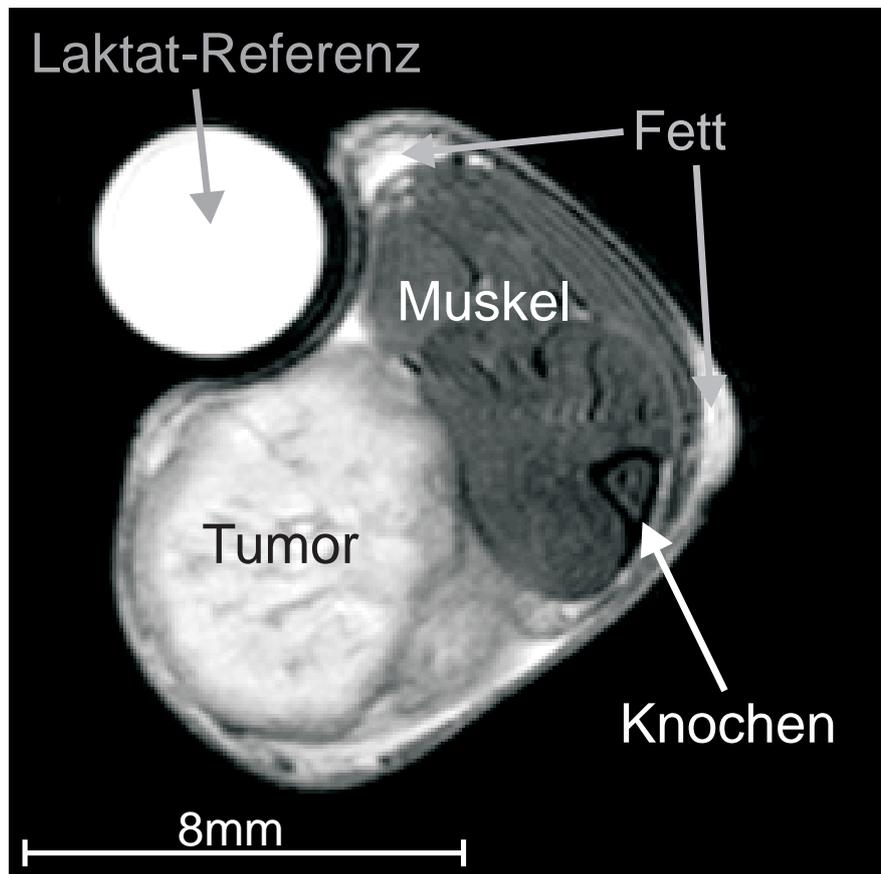


Abbildung 3.2.: RARE-Aufnahme durch das Zentrum eines Tumors am Unterschenkel der Maus. Der helle Tumor grenzt sich deutlich vom dunklen Muskelgewebe ab. Subkutanes Fett stellt sich als helle Bereiche in den peripheren Arealen dar. Der Schienbeinknochen ist als sehr dunkles Dreieck zu erkennen. Der helle Kreis oben links stellt ein Laktat-Referenz-Phantom zur Bestimmung der Laktatkonzentration dar (Laktatwerte wurden in dieser Arbeit nicht erfasst; siehe [46]). Folgende Messparameter wurden verwendet: $T_R = 4s$, RARE-Faktor = 8, $T_{Eff} = 30ms$, $FOV = 16 \times 16mm^2$, Bildmatrix = 128×128 Bildpunkte, Auflösung = $125 \times 125 \mu m^2$, Schichtdicke = 0.8mm, Mittelungen = 8, Aufnahmedauer = ca. 8.5min. Das Bild wurde auf eine Größe von 256×256 Bildpunkten interpoliert.

4. Reoxygenierung

Wie in Kapitel (2.2.2) beschrieben, ist ein hypoxischer Tumor strahlenresistenter als ein mit ausreichend Sauerstoff versorgter. Ein einfacher Ansatz, die Sauerstoffkonzentration und damit auch die Strahlenempfindlichkeit im Gewebe zu erhöhen, ist eine Beatmung mit sauerstoffreichem Gas [51–59]. Allerdings führt der Einsatz von 100%-igem Sauerstoff zu einer Verengung der Blutgefäße (Vasokonstriktion), was in dem unstrukturierten Gefäßsystem des Tumors zum Verschluss von Kapillaren und damit zu einem entgegengesetzten Effekt führen kann. Beim Carbogengas, einer Mischung aus 5% CO₂ und 95% Sauerstoff, wird der vasokonstriktive Effekt von Sauerstoff durch die vasodilative Wirkung des CO₂ weitestgehend kompensiert [59–61]. Damit kann das Tumorgewebe besser mit Sauerstoff versorgt werden, ohne das regionale Blutvolumen (RBV) zu stark zu verändern und ohne die Gefäßstruktur übermäßig zu beeinflussen. Aber nicht alle Tumoren reagieren auf eine Begasung mit Carbogen mit einer besseren Oxygenierung des Tumorgewebes. Einige reagieren kaum, andere werden sogar schlechter mit Sauerstoff versorgt [61–64]. Ziel dieser Untersuchung war es, Tumorlinien zu identifizieren, die insgesamt positiv bzw. negativ auf einen Atemgaswechsel reagieren. Somit könnten Patienten identifiziert werden, die bei einer strahlentherapeutischen Behandlung von einer Beatmung mit Carbogen profitieren würden. Auch kann der individuelle Tumor bezüglich seiner Reoxygenierbarkeit durch einen Atemgaswechsel *in vivo* vor einer Therapie untersucht werden.

Im Folgenden werden zwei Methoden zur *in vivo* Messung der Reoxygenierung vorgestellt. Der BOLD-Effekt bietet eine Methode zur Messung der Reoxygenierung ohne Verabreichung von Markersubstanzen und ist damit nichtinvasiv. Die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit von Perfluorcarbonen ermöglicht eine direkte Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe, erfordert aber eine Injektion dieser Substanz.

4.1. Grundlagen

4.1.1. Atemgastransport im Blut

Eine wesentliche Aufgabe des Blutkreislaufes ist der Transport von Sauerstoff zu, und der Abtransport von CO₂ von den Zellen. Das Blutgefäßsystem teilt sich dazu in feine Kapillaren auf, an denen der Austausch durch Diffusion in beide Richtungen (Gewebe \rightleftharpoons Kapillaren) stattfindet. Das Blut als Transportmedium ist eine Suspension, die aus dem gelblichem Plasma und den darin suspendierten roten Blutzellen (Erythrozyten), weißen Blutzellen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) besteht.

Der Transport von Gasen im Blut erfolgt im Wesentlichen auf zwei Arten: Zum Einen als physikalisch gelöstes Gas im Wasser des Blutplasmas und zum Anderen chemisch reversibel an das Hämoglobin der Erythrozyten gebunden.

Physikalisch gelöstes Gas im Blut

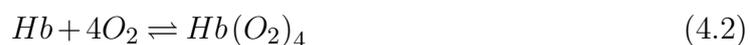
Sauerstoff ist in polaren Lösungsmitteln wie dem Plasmawasser schlecht löslich. Ein Liter Blutplasma löst und transportiert bei einem Sauerstoffpartialdruck von 100mmHg¹ nur 3ml Sauerstoff² [65]. Die Konzentration eines Gases in Flüssigkeit ist mit dem Partialdruck über das Henry-Gesetz verknüpft. Es besagt, dass die Konzentration eines Gases in einer Flüssigkeit direkt proportional zum Partialdruck des entsprechenden Gases über der Flüssigkeit ist:

$$\begin{aligned} [O_2] &= pO_2 \cdot \alpha_{O_2} \\ [CO_2] &= pCO_2 \cdot \alpha_{CO_2} \end{aligned} \quad (4.1)$$

Die gasspezifischen Löslichkeitskoeffizienten (α_{O_2} und α_{CO_2}) sind dabei von der Temperatur und dem Lösungsmittel abhängig. Unter Normalbedingungen ist der Anteil von in Wasser gelöster Kohlensäure 30-mal höher als der von Sauerstoff. Die physikalisch gelöste Menge an O_2 kann den Sauerstoffbedarf der Zellen bei Weitem nicht decken. Deshalb wird der Sauerstoff zum Transport chemisch reversibel an das Hämoglobin (Hb) der Erythrozyten gebunden. Aber trotz der schlechten Löslichkeit müssen die Gase beim Austausch mit dem Blut an den Alveolen der Lunge und an den Zellen im Plasma physikalisch gelöst vorliegen, um die Kapillarwände zu durchdringen.

Chemische Bindung an das Hämoglobin

Hämoglobin (Abbildung 4.1) ist ein kugelförmiges Molekül, das aus vier Untereinheiten, von denen jede eine Hämgruppe trägt, besteht. Etwa ein Drittel der Erythrozyten-Zellmasse besteht aus Hämoglobin. Zum Transport wird der Sauerstoff reversibel an das Hämeisen angelagert. Es wirkt als Lösungsvermittler zwischen dem unpolaren Sauerstoff und dem polaren Plasmawasser. Den Vorgang der Anlagerung eines Sauerstoffmoleküls an das Eisen einer Hämoglobinuntereinheit bezeichnet man als **Oxygenierung**, die Abgabe des Sauerstoffs als **Desoxygenierung**:

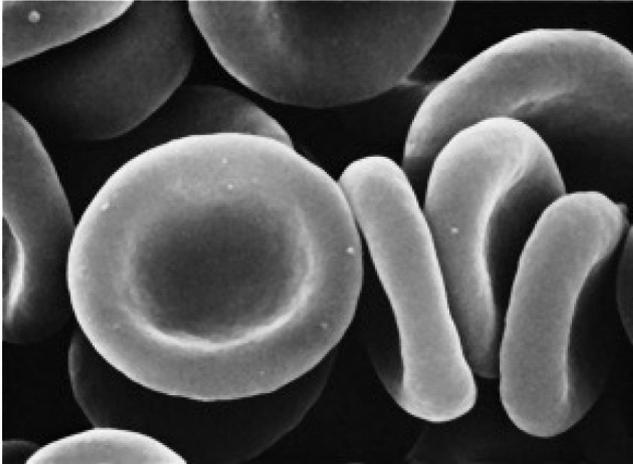


Durch das Transporterprotein Hämoglobin kann im Vergleich zum physikalisch gelösten Sauerstoff die 70-fache Menge transportiert werden. *In vivo* können an 1g Hämoglobin 1.34ml O_2 (= 0.060mmol) gebunden werden.³ Pro Liter Blut werden damit bei einem

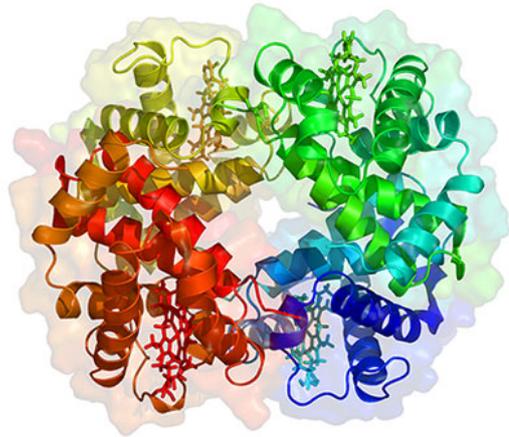
¹mmHg = Millimeter Quecksilbersäule (1mmHg $\hat{=}$ 133.322Pa).

²Ein Mol eines idealen Gases nimmt unter Normalbedingungen 22.4l ein (das Molvolumen $V_m = 22.4\text{mol/l}$)

³Der Wert 1.34 wird als Hüfner'sche Zahl bezeichnet und wurde empirisch ermittelt.



(a) Entnommen aus [66]



(b) Entnommen aus [67]

Abbildung 4.1.: (a) Abbildung von Erythrozyten. (b) Hämoglobin Molekül mit seinen vier Untereinheiten und den Hämgruppen.

typischen Hämoglobingehalt von 160g/l ca. 200-210ml O₂ befördert.

Der Anteil der Erythrozyten am Blutvolumen wird als **Hämatokrit** bezeichnet:

$$Hct = \frac{V_{Erythrozyten}}{V_{Blut}} \quad [\%] \quad (4.3)$$

Er beträgt beim Menschen zwischen 42% und 47% [68]. Die Hämoglobinsättigung oder **Oxygenierung (Y)** gibt an, wie viel Prozent des Hämoglobins bei einem gegebenen Sauerstoffpartialdruck mit O₂-Molekülen beladen sind:

$$Y = \frac{Hb(O_2)_4}{Hb(O_2)_4 + Hb} \quad (4.4)$$

Ein Maß für die Oxygenierung (oder auch Sauerstoffaffinität) ist der Sauerstoffpartialdruck, der eine Hämoglobinsättigung von 50% herbeiführt (**Halbsättigungsdruck, P₅₀**). Unter Normalbedingungen liegt der P₅₀ des Menschen bei ca. 27mmHg. Die Sättigungskurve beschreibt einen sigmoiden Verlauf (Abbildung 4.2). Ursächlich für diesen Verlauf ist, dass je mehr O₂-Moleküle ein Hämoglobin-Komplex aufgenommen hat, jedes weitere mit einer höheren Affinität aufgenommen wird. Z.B. wird das vierte und letzte Sauerstoffmolekül mehrere hundertmal schneller aufgenommen als das erste. Dies führt zu einem anfangs langsamen, dann steilen Anstieg der Sauerstoffsättigung schon bei niedrigen Partialdrücken. Hin zu höheren O₂-Partialdrücken erreicht die Kurve schnell eine Sättigung. Die Abgabe der O₂-Moleküle im Gewebe erfolgt umgekehrt umso einfacher je weniger Sauerstoff an das Hämoglobin gebunden ist. Durch diesen s-förmigen Verlauf ist eine optimale Versorgung von Gewebszellen sichergestellt, denn bei den dort vorherrschenden niedrigen Sauerstoffpartialdrücken von 15-30mmHg im Kapillarbereich kann der Sauerstoff leicht abgegeben werden. In der Lunge beträgt der

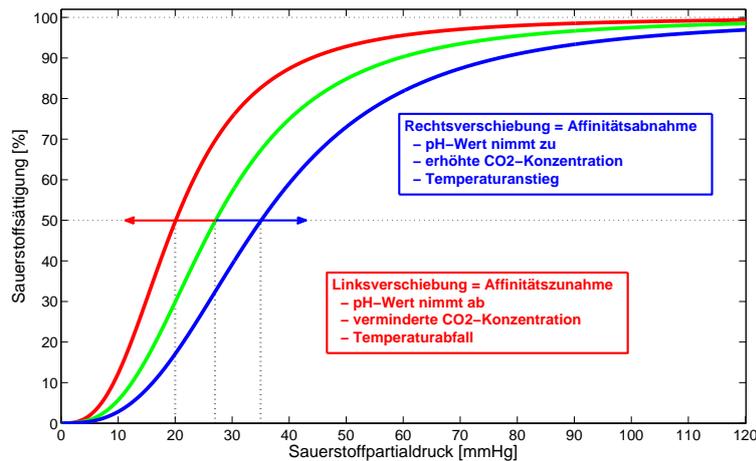


Abbildung 4.2.: Verlauf der Sauerstoffsättigung bei gegebenem Sauerstoffpartialdruck in Abhängigkeit vom pH-Wert, dem CO₂-Gehalt und der Temperatur. Berechnet nach [69].

pO₂ ca. 100mmHg, was zu einer 98%-igen Sättigung des Blutsauerstoffs führt. Damit ist das arterielle Blut bei Säugetieren zu nahezu 100% mit Sauerstoff gesättigt. Das Plateau der Sättigungskurve gewährleistet eine hohe Blutoxygenierung auch wenn Schwankungen in der Sauerstoffversorgung, z.B. durch Funktionsstörungen der Lunge, auftreten sollten. Veränderungen der Temperatur, des pH-Wertes oder des CO₂-Partialdrucks können die Sättigungskurve nach rechts oder links verschieben [65]. Die Verschiebung aufgrund der Einflüsse des pH-Wertes und der CO₂-Konzentration werden unter dem Begriff **Bohreffekt** zusammengefasst [70]. Im Muskel kommt es bei Aktivität zu einer Temperaturerhöhung und saurem Milieu, was eine Rechtsverschiebung der Kurve und damit eine Abnahme der Sauerstoffaffinität verursacht, wodurch wiederum mehr Sauerstoff in das Muskelgewebe freigesetzt wird.

4.1.2. Magnetische Eigenschaften des Hämoglobins

Jede der vier Hämgruppen des Hämoglobins enthält als aktives Zentrum ein zweiwertiges Eisenatom (Fe²⁺). Im desoxygenierten Zustand (*Hb*) besitzt das Fe²⁺ vier ungepaarte Elektronen, einen Spinzustand von $S = 2$ und ist paramagnetisch. Das oxygenierte Hämoglobin (*HbO₂*) dagegen besitzt keine freien Elektronen, weist den Spinzustand $S = 0$ auf und ist diamagnetisch. Zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Blut besteht also ein Suszeptibilitätsunterschied. Schon 1936 wurden die magnetischen Eigenschaften des Hämoglobins von Pauling und Coryell untersucht. Sie stellten dabei fest, dass sich die Suszeptibilitäten von venösem und arteriellem Blut um bis zu 20% unterscheiden [71]. Thulborn et al. haben diesen Unterschied der Volumensuszeptibilität zwischen desoxygeniertem und vollständig oxygeniertem Blut zu $\Delta\chi = \chi_{desoxy} - \chi_{oxy} = 0.08 \cdot 10^{-6}$ bestimmt [72]. Dieses $\Delta\chi$ führt bei der Kernspintomographie zu einer Änderung der transversalen Relaxationsrate in Abhängigkeit von der Blutsauerstoffsättigung. Dieser

Effekt wird daher **BOLD-Effekt** (Blood Oxygen Level Dependend) genannt. Ogawa et al. zeigten als erste, dass der Kontrast von Venen im Gehirn von Ratten bei T_2^* -gewichteten Experimenten stark vom Oxygenierungsgrad des Blutes beeinflusst wird [73–75].

Zur mathematischen Beschreibung des BOLD-Effektes werden die Blutanteile in zwei Gruppen unterteilt: Das Blutplasma, dessen Suszeptibilität sich praktisch nicht von der des Wassers unterscheidet und den roten Blutkörperchen mit einer oxygenierungsabhängigen Suszeptibilität. Die restlichen Blutbestandteile (wie z.B. Thrombozyten) können aufgrund ihres geringen Volumenanteils am Blut vernachlässigt werden. Damit ergibt sich die Suszeptibilität des Blutes zu:

$$\chi_{blut} = Hct \left(Y \chi_{oxy} + (1 - Y) \chi_{desoxy} \right) + (1 - Hct) \chi_{plasma} \quad (4.5)$$

Eine Änderung des Oxygenierungsgrades hat eine Änderung in der Suszeptibilität des Blutes zur Folge:

$$\Delta \chi_{blut} = \Delta Y \left(\chi_{desoxy} - \chi_{oxy} \right) Hct. \quad (4.6)$$

Der niedrige Anteil des physikalisch im Blut gelösten paramagnetischen Sauerstoffs wurde dabei vernachlässigt. Arteriell Blut, welches zu nahezu 100% mit O_2 gesättigt und damit diamagnetisch ist, weist die gleiche Suszeptibilität wie das umliegende Gewebe (χ_{gew}) auf [73]. Damit ergibt sich für den Suszeptibilitätsunterschied zwischen Gewebe und Kapillare, abhängig vom Oxygenierungsgrad:

$$\begin{aligned} \Delta \chi_{kap} &= \chi_{blut}(Y) - \chi_{gew} \\ &= Hct(1 - Y) \left(\chi_{desoxy} - \chi_{oxy} \right) \\ &= Hct(1 - Y) 0.08 \cdot 10^{-6} \end{aligned} \quad (4.7)$$

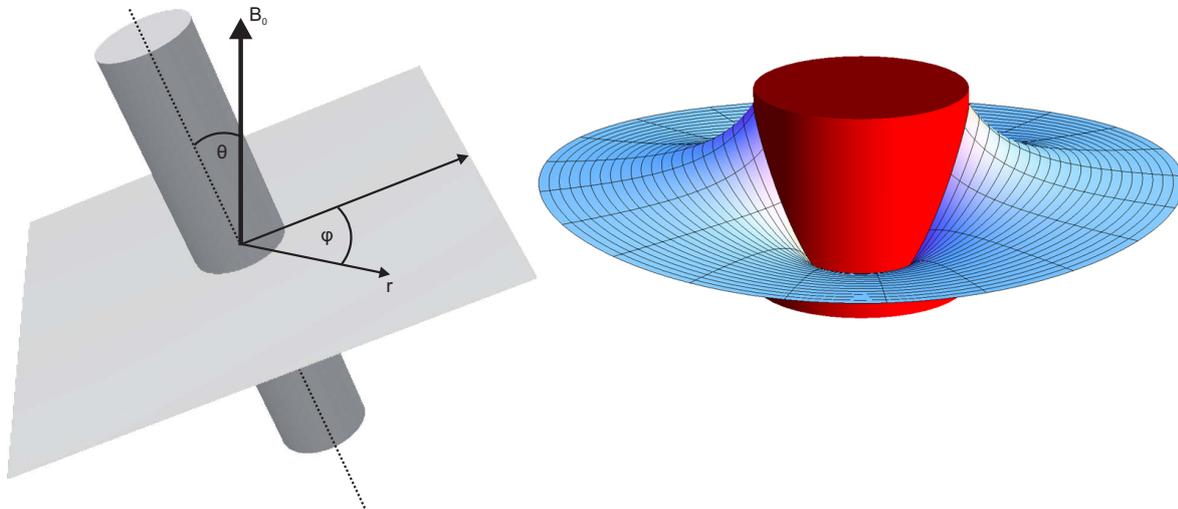
Solche Suszeptibilitätssprünge an Grenzflächen führen in einem statischen Magnetfeld zu großräumigen lokalen Feldstörungen, die in Form und Amplitude von dem Radius der Kapillare und der Orientierung bezüglich des Magnetfeldes abhängen. Für einen unendlich langen Zylinder mit Radius R , der mit dem statischen Magnetfeld (B_z) den Winkel θ einschließt, ergibt sich im Extravasalraum ($r > R$) folgender Ausdruck für die Störung des Magnetfeldes am Ort r (Abbildung 4.3):

$$\Delta B_z(r, \varphi, \theta) = 2\pi \Delta \chi_{kap} B_0 \left(\frac{R}{r} \right)^2 \sin^2(\theta) \cos(2\varphi) \quad (4.8)$$

Im Intravasalraum hängt ΔB_z lediglich von der Orientierung θ der Kapillare bezüglich des Magnetfeldes ab:

$$\Delta B_z(\theta) = 2\pi \Delta \chi_{kap} B_0 \left(\cos^2(\theta) - \frac{1}{3} \right) \quad (4.9)$$

Schließt die Kapillare mit dem Magnetfeld B_z einen Winkel von ca. 55° ein, so wird das Magnetfeld im Intravasalraum nicht gestört (Abbildung 4.4).

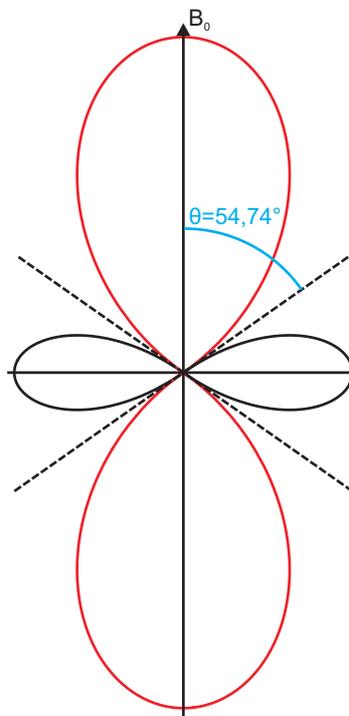


(a) Orientierung der Kapillare im Magnetfeld B_0 .

(b) Qualitative Darstellung von ΔB außerhalb einer Kapillare mit senkrechter Orientierung zum Magnetfeld B_0 ($\theta = 90^\circ$).

Abbildung 4.3.: Darstellung der Störung des statischen Magnetfeldes durch eine mit Blut gefüllte Kapillare.

Abbildung 4.4: Magnetfeldstörung im Intrasalraum in Abhängigkeit von der Kapillarorientierung θ . Die rote Kurve stellt eine Felderhöhung dar, während auf der schwarz gezeichneten Linie die Feldstörung negative Werte annimmt. Auf den gestrichelten Linien schließt die Kapillarorientierung mit dem Magnetfeld B_z einen Winkel von ca. 54.74° ein, bei dem das Magnetfeld im Intrasalraum nicht gestört wird.



Im biologischen Gewebe variieren die Kapillardichte und -größe; auch die Orientierung der Kapillaren im Gewebe ist im Allgemeinen zufällig verteilt. Der Einfluss dieser Parameter auf die T_2^* -Relaxationszeit wurde in einigen Arbeiten [19, 22, 76, 77] genauer untersucht. Über Monte-Carlo-Simulationen von zufällig im Raum verteilten, geraden, zylinderförmigen Kapillaren konnte ein Ausdruck für die Relaxationsrate R_2' entwickelt werden⁴:

$$R_2' = \alpha RBV Hct \left(\Delta\chi B_0 (1 - Y) \right)^\gamma \quad (4.10)$$

mit α und γ als numerisch zu bestimmende Faktoren, in die die Diffusion der Spins, die Gefäßgröße, Gefäßorientierung im Feld und Gefäßdichte im Gewebe eingehen.

Die dargestellten Magnetfeldvariationen führen, aufgrund der in Kapitel (2.1.6) besprochenen Mechanismen, zu einer Verkürzung der T_2^* -Zeit. Eine absolute Quantifizierung der Sauerstoffsättigung oder gar des Sauerstoffpartialdrucks ist jedoch schwierig, da eine Variation der T_2^* -Relaxationszeit nicht ausschließlich durch eine pO_2 -Änderung hervorgerufen wird. Problematisch stellt sich auch die dazu nötige Bestimmung der Parameter α und γ aus Gleichung (4.10) dar, die für jeden Gewebetyp unterschiedlich ist und zudem von der Orientierung des Gewebes im Magnetfeld abhängt, wenn die Kapillarenorientierung nicht zufällig verteilt ist. Wie bereits im Kapitel (4.1.1) beschrieben, hängt die Sauerstoffsättigung von mehreren physiologischen Parametern ab, die sich während einer Messung ändern können. Daneben beeinflussen weitere Parameter wie das regionale Blutvolumen (RBV) und die Perfusion oder der Blutfluss die T_2^* -Relaxationsrate [64, 78]. So führt beispielsweise eine erhöhte Perfusion bei gleichbleibender Metabolisierungsrate zu einem Anstieg der Blutoxygenierung im venösen Blut, was sich in einem T_2^* -Anstieg bemerkbar macht. Vergrößert sich das RBV z.B. durch die vasodilative Wirkung des CO_2 in Carbogen, so führt dies zu einem größeren τ_D (Abbildung 2.4) und damit einer verkürzten T_2^* -Zeit. Die Verabreichung von Atemgasen mit hohem Sauerstoffanteil verlängert wiederum die T_2^* -Relaxationszeit (vorausgesetzt das RBV ändert sich nicht), da dem Organismus bei gleicher Metabolisierungsrate mehr O_2 zur Verfügung steht, wodurch der Anteil an paramagnetischem Desoxyhämoglobin im Blut sinkt. Trotz der großen Anzahl von Abhängigkeiten konnte in zahlreichen Untersuchungen und Simulationen bestätigt werden, dass eine T_2^* -Änderung bei Stimulation oder einem Atemgaswechsel hauptsächlich auf eine Änderung der Blutoxygenierung zurückzuführen ist [22, 37, 64, 76, 79–85]. Zusammengefasst bewirkt also eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Blut eine Verlängerung der T_2^* -Relaxationszeit.

4.2. BOLD-Messung

Um den Effekt eines Atemgaswechsels auf den Tumor untersuchen zu können, wurden T_2^* -Differenzkarten (**Reoxygenierungskarten**) aus T_2^* -Daten bei Beatmung mit Raumluft bzw. Carbogen berechnet. Diese T_2^* -Karten zur Messung des BOLD-Effekts wurden aus den Messdaten einer Multi-Gradientenecho-Sequenz gewonnen (siehe Kapitel 2.1.9).

⁴mit $1/T_2^* = R_2^* = R_2 + R_2'$, wobei R_2' die Dephasierung aufgrund des Desoxyhämoglobins beschreibt und R_2 die sonstigen Dephasierungseffekte zusammenfasst.

4.2.1. Messprotokoll und Datenauswertung

Durch den guten Fastmap-Shim mit einer Linienbreite von weniger als 45Hz und einer Schichtdicke von lediglich 0.6mm ist der Effekt von Hintergrundgradienten vernachlässigbar und eine Korrektur wie in Kapitel (2.1.9) beschrieben nicht nötig. Zudem wird die Reoxygenierung als relativer Differenzwert berechnet, wodurch konstante Artefakte herausfallen.

Zur computergestützten Analyse wurde Auswertesoftware in den Programmiersprachen Matlab R2009b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) und C implementiert, die den Fit für jeden Bildpunkt durchführt und die gesuchten Größen M_0^* und T_2^* als Parameterkarte ausgibt. Bei der Implementierung des Approximationsalgorithmus (Fitalgorithmus) war zu beachten, dass die eingelesenen Messwerte als Betragswerte des komplexen Signals vorliegen und dadurch das T_2^* -Signal nicht gegen null, sondern gegen einen konstanten Wert, der durch den Betrag des Rauschens gegeben ist, relaxiert. Der implementierte Fitalgorithmus berücksichtigt diesen Rausch-Offset indem er nur Messwerte oberhalb dieses Offsets in die Berechnung von T_2^* einbezieht. Datenpunkte mit einer schlechten Güte des Fits (Ausreißer im χ^2 -Wert) wurden verworfen. Die Reoxygenierungskarten werden als relative Differenz von T_2^* unter Carbogenatmung zu dem Wert bei Atmung von Raumluft in Prozent angegeben:

$$Reox = \frac{T_2^*(Carbogen) - T_2^*(Raumluft)}{T_2^*(Raumluft)} 100\% \quad (4.11)$$

Falls ein Datenpunkt der Messung unter Carbogen- oder Raumluft-Atmung verworfen wurde, so wurde dieser Datenpunkt auch bei der Berechnung der Reoxygenierungskarte verworfen.

Durch den hohen Auslastungsgrad⁵ des Gradientensystems während der Multi-Gradientenecho-Sequenz heizt sich das Gradientenrohr, und damit auch die Spule und Probe trotz der aktiven Wasserkühlung des Systems auf. Eine Aufnahme während solcher Temperaturvariationen führt zu Bildartefakten und damit zu unbrauchbaren T_2^* -Daten. Um diese Temperaturartefakte zu vermeiden, wurden die Multi-Gradientenecho-Aufnahmen kontinuierlich achtmal hintereinander durchgeführt. Dabei stellt sich ein thermisches Gleichgewicht im Gradientenrohr bereits nach der Akquisition des ersten Datensatzes ein. Die ersten vier Messungen wurden unter Beatmung der Maus mit Raumluft aufgenommen. Zu Beginn der fünften Messung wurde dann das Atemgas automatisch auf Carbogen umgeschaltet. Während der Dauer dieser Messung reagiert die Maus auf den Atemgaswechsel, wodurch gewährleistet ist, dass sich der Organismus bei der sechsten Messung vollständig auf die Atmung von Carbogen umgestellt hat und sich das Messsystem weiterhin in einem thermischen Gleichgewicht befindet. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte aus den T_2^* -Karten der Messungen Nummer zwei, drei, vier für Raumluft bzw. sechs, sieben, acht für Carbogen verwendet. Auch hier wurden Datenpunkte, die in einer der drei Messungen zur Berechnung des Mittelwertes verworfen wurde, nicht berücksichtigt. Die so gewonnenen Reoxygenierungskarten lassen

⁵engl.: duty-cycle

Parameter	Wert
Anregungspuls (Name, Bandbreite, Pulswinkel)	Sinc, 3500Hz, 10°
T_R	160ms
T_E	2.75ms
Bildmatrix	128 × 128
Field of View	16mm × 16mm
Bildaufföslung	125µm × 125µm
Schichtdicke	0.6mm
Anzahl Bilder	32
Anzahl Mittelungen	16
Aufnahmedauer	ca. 4.5min

Tabelle 4.1.: Messparameter zur Reoxygenierungsbestimmung.

sich gut mit der räumlichen Verteilung der histologischen Marker (z.B. hypoxische Areale und Perfusion), die am gleichen Tumor erhoben wurden, vergleichen (siehe Kapitel 6). Um aber ganze Tumorkerne, deren Parameter unter Umständen nicht immer an ein und demselben Tier gemessen wurden, miteinander vergleichen zu können, ist eine Einteilung in ROIs⁶ und Berechnung von Mittelwerten notwendig. Hierbei wurde der Tumor in die Bereiche kompletter Tumor, Tumorkern und Tumorschale eingeteilt. Der Tumorkern, im Zentrum des Tumors, hat einen Durchmesser von ca. 1/3 des kompletten Tumors, die Tumorschale entspricht dem Bereich außerhalb des Kerns. Eine ROI über das Muskelgewebe wurde in räumlicher Nähe zum Tumor gewählt (in diesem Bereich ist der Shim durch den Fastmap noch ausreichend gut), wobei Bereiche, die Knochen enthalten, ausgespart wurden. Diese Mittelwerte einzelner Tumoren wurden dann zu Mittelwert und Standardabweichung einer Tumorkerne zusammengefasst und mit den histologischen Parametern verglichen.

Die Messparameter der verwendeten Multiecho-Sequenz zur Bestimmung der T_2^* -Relaxationszeiten sind in Tabelle (4.1) zusammengefasst.

4.2.2. BOLD Ergebnisse

Abbildung (4.5) zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer Messreihe von Reoxygenierungswerten mit drei Atemgaswechseln zwischen Raumluft und Carbogen in einer ROI eines Tumors der Linie UT-SCC-45, die gut reoxygeniert werden konnte. Wie zu erkennen ist, erfolgt die Reaktion auf den Atemgaswechsel von Raumluft zu Carbogen innerhalb der

⁶engl.: region of interest = Zielbereich, Messfeld.

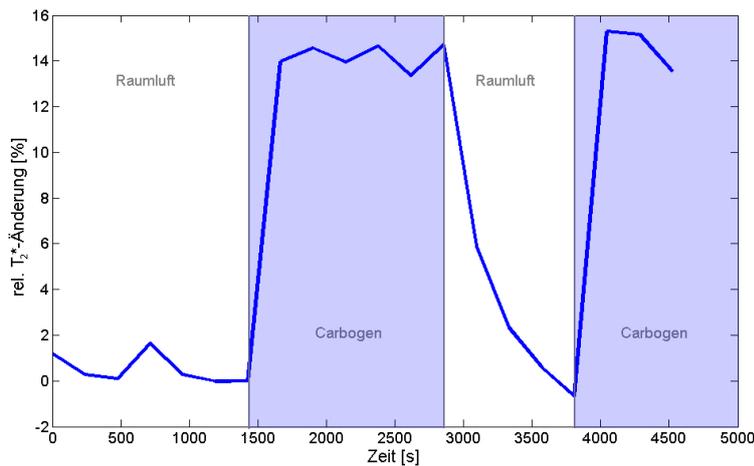


Abbildung 4.5.: T_2^* -Änderung beim Atemgaswechsel. Beispielhafte Darstellung der Reoxygenierung nach Gleichung (4.11) für eine ausgewählte ROI eines Tumors der Linie UT-SCC-45, die gut reoxygeniert werden konnte. Das Atemgas wurde dreimal zwischen Raumluft und Carbogen gewechselt während durchgehend T_2^* -Karten aufgenommen wurden (Dauer einer Aufnahme ca. 4.5min). Als Referenzpunkt für die Berechnung der relativen Differenz wurde der letzte Messpunkt der ersten Raumluft-Messreihe gewählt.

Zeitspanne einer Akquisition (ca. 4.5min). Beim Wechsel zurück zu Raumluft verläuft die Reaktion träger. Die Amplitude der Antwort auf den Gaswechsel liegt in diesem reoxygenierbaren Tumorareal im Bereich von ca. 15%.

Abbildung (4.6) zeigt den relativen T_2^* -Unterschied beim Atemgaswechsel für die ROIs Muskel, kompletter Tumor, Tumorschale und Tumorkern für verschiedene Tumorlinien. Aufgetragen sind vier Messpunkte bei Atmung von Raumluft und vier Messpunkte bei Atmung von Carbogen (bei der Tumorlinie FaDu sind jeweils fünf Messpunkte aufgetragen). Der letzte Wert vor dem Atemgaswechsel wurde als Referenzpunkt gewählt, zu dem die anderen Werte relativ in Prozent berechnet wurden. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Reoxygenierungsantwort auf den Wechsel zu Carbogen zwischen den einzelnen Tumorlinien zu erkennen. Der FaDu-Tumor wird besser oxygeniert, beim HSC4 zeigt sich kaum eine Änderung in der Sauerstoffversorgung und der UT-SCC4-Tumor wird schlechter mit O_2 versorgt. Auch die einzelnen Tumorregionen (Kern und Schale) zeigen unterschiedliches Verhalten in der Reaktion auf den Gaswechsel. Der Muskel wird durchweg besser mit Sauerstoff versorgt.

In Abbildung (4.7) sind typische T_2^* -Mittelwertkarten bei Atmung von Raumluft bzw. Carbogen und die daraus berechnete Reoxygenierungskarte exemplarisch für einen Tumor der Linie FaDu dargestellt. In der Reoxygenierungskarte wird deutlich, dass das Muskelgewebe von dem Atemgaswechsel hinsichtlich einer besseren Sauerstoffversorgung profitiert (grün), während der Tumor in den zentralen Bereichen schlechter mit Sauerstoff versorgt wird (rot). Auffällig ist auch, dass Bereiche, die negativ auf die Beatmung mit Carbogen reagieren, von solchen mit einem positiven Effekt umgeben sind. Zudem sind die zusammenhängenden roten Flächen in ihrer räumlichen Ausdehnung wesentlich

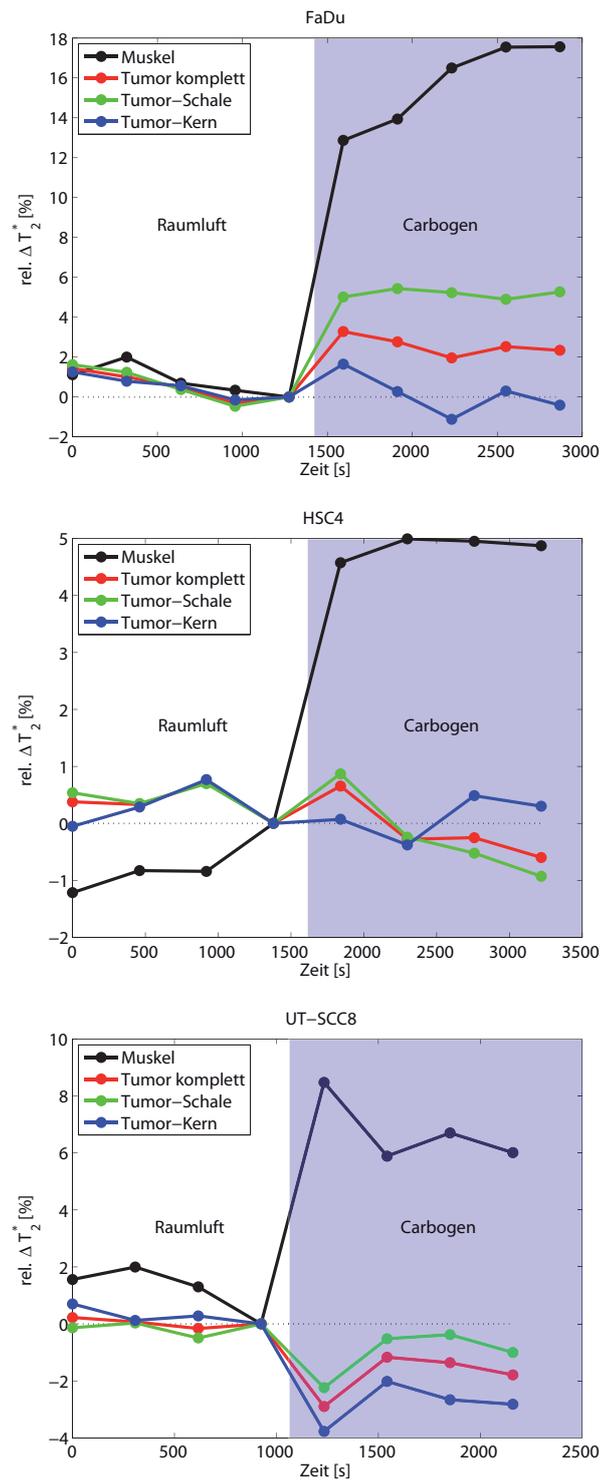


Abbildung 4.6.: Die Tumoren der einzelnen Linien reagieren sehr unterschiedlich auf den Atemgaswechsel. Der FaDu-Tumor wird besser oxygeniert, beim HSC4 zeigt sich kaum eine Änderung in der Sauerstoffversorgung und der UT-SCC4 wird schlechter mit O_2 versorgt. Auch die einzelnen Tumorregionen (Kern und Schale) zeigen Abweichungen in der Reaktion auf den Gaswechsel, wohingegen der Muskel durchweg besser mit Sauerstoff versorgt wird.

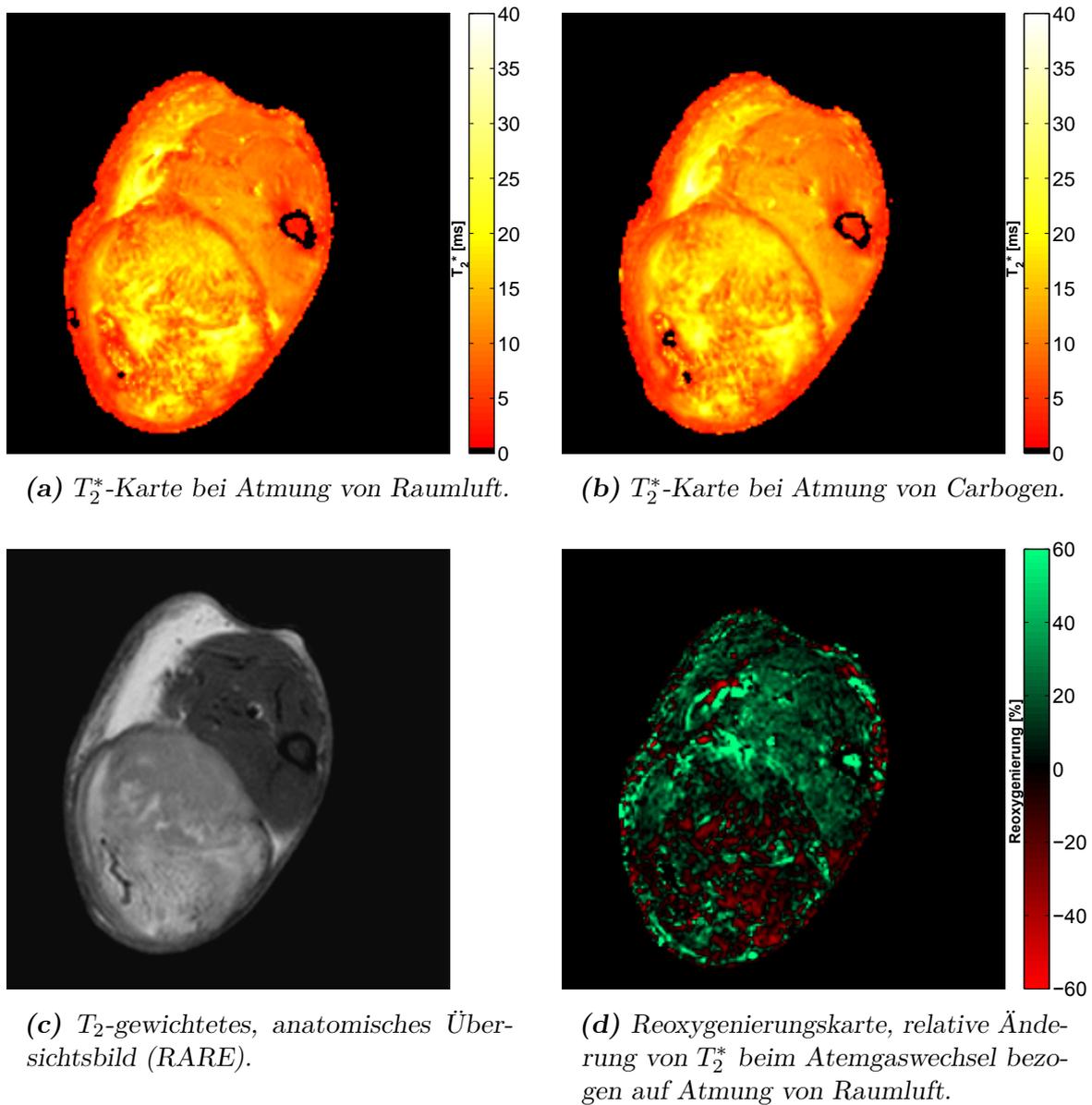


Abbildung 4.7.: T_2^* -Karten bei Atmung von Raumluft bzw. Carbogen und die daraus berechnete Reoxygenierungskarte. Dargestellt sind die Karten für einen Schnitt durch das Zentrum eines FaDu-Tumors und das angrenzende Muskelgewebe.

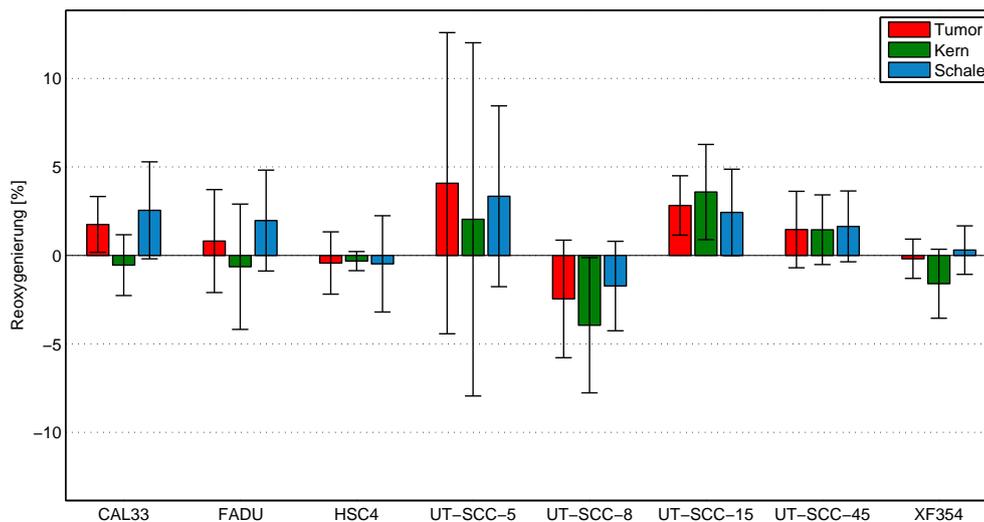


Abbildung 4.8.: Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Tumorlinien. Dargestellt sind die Mittelwerte für eine ROI über den kompletten Tumor, den inneren Bereich des Tumors (Kern) und den äußeren Tumorbereich (Schale).

kleiner als die grünen.

Pro Linie wurden für mehrere Tumoren Reoxygenierungswerte gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen ROIs für die verschiedenen Tumorlinien im Diagramm (4.8) und Tabelle (4.2) zusammengefasst. Es lassen sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorlinien erkennen. Auch innerhalb einer Tumorlinie gibt es signifikante Reoxygenierungsunterschiede zwischen Tumorkern und -schale. So reagiert der FaDu Tumor insgesamt leicht positiv auf eine Beatmung mit Carbogen. Der Tumorkern weist allerdings, wie in Abbildung (4.7) schon zu erkennen ist, einen negativen Reoxygenierungseffekt auf, wohingegen die Tumorschale sehr gut reoxygeniert werden kann. Die Linien UT-SCC-5, UT-SCC-15, UT-SCC-45 und CAL33 reagieren auf den Atemgaswechsel mit einer erhöhten Oxygenierung, während ein UT-SCC-8 Tumor eine deutlich negative Reaktion zeigt. Die Oxygenierungsantwort der XF354 und HSC4 Tumoren ist schwach negativ.

Ein Vergleich der Reoxygenierung mit den Daten aus der Histologie und den Perfusionmessungen ist in Kapitel (6) zu finden.

4.2.3. BOLD Diskussion

Die hier gemessene ausgeprägte Heterogenität der untersuchten Tumorlinien in der Reaktion auf den Atemgaswechsel wurde auch in anderen Tumorlinien beobachtet [86]. Die hohe Standardabweichung in den Reoxygenierungswerten einer Linie verdeutlicht die große intertumorale Heterogenität innerhalb einer Tumorlinie, was auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde [43, 87, 88]. Eine eindeutige Zuordnung eines individuellen Tumors zu einer spezifischen Gruppe alleine durch den Parameter Reoxygenierung ist dadurch nur schwer möglich.

Tumorlinie	gemessene Tumoren	Tumor komplett	Tumor Kern	Tumor Schale
CAL33	2	1.75 ± 1.58	-0.55 ± 1.72	2.55 ± 2.74
FaDu	5	0.81 ± 2.91	-0.64 ± 3.54	1.92 ± 2.85
HSC4	7	0.43 ± 1.76	-0.32 ± 0.54	-0.48 ± 2.72
UT-SCC-5	3	4.08 ± 8.51	2.04 ± 9.98	3.34 ± 5.11
UT-SCC-8	5	-2.46 ± 3.32	-3.95 ± 3.82	-1.73 ± 2.53
UT-SCC-15	3	2.82 ± 1.68	3.58 ± 2.69	2.43 ± 2.44
UT-SCC-45	5	1.46 ± 2.16	1.45 ± 1.97	1.64 ± 2.00
XF354	4	-0.19 ± 1.11	-1.60 ± 1.95	0.30 ± 1.37

Tabelle 4.2.: Reoxygenierungsmittelwerte und Standardabweichung der untersuchten Tumorlinien in [%] bezogen auf Raumluft-Atmung.

Unter normalen Bedingungen führt eine Beatmung mit sauerstoffreichen Gasen immer zu einer Verlängerung von T_2^* und damit zu einem positiven Reoxygenierungseffekt. In der Reoxygenierungskarte aus Abbildung (4.7) sind jedoch, besonders im Tumorzentrum, negative Reoxygenierungswerte erkennbar, die sich mit dem beschriebenen BOLD-Modell nicht ohne Weiteres erklären lassen. Auch im Diagramm (4.8) sind ganze Tumorlinien mit negativen Antworten auf den Gaswechsel zu Carbogen zu finden. Solche negativen Werte wurden schon in früheren Arbeiten beobachtet [61–64] und sind auf den Steal-Effekt [89] zurückgeführt worden: Der Tumor und das gesunde Gewebe werden von demselben zu- und ableitenden Gefäßsystem versorgt. Einige Arterien teilen sich in einen den Tumor und einen das umliegende Gewebe versorgenden Ast auf. Diese Aufteilung setzt sich in den Geweben bis zur Kapillarebene fort, um schließlich wieder in einer Vene zusammenzuzießen. Es entsteht somit ein paralleles Netzwerk von kommunizierenden Gefäßen durch Tumor- und Normalgewebe. Vasoaktive Substanzen können den Durchmesser von gesunden Gefäßen verändern. Da der Tumor durch sein gestörtes Wachstum unter anderem Gefäße ausbildet, die diese Fähigkeit der aktiven Vasoregulation verloren haben, hängen die Tumorperfusion und das RBV im Tumor von der Vasoaktivität des umliegenden Gewebes ab. Erweitert sich das Gefäßsystem eines solchen Netzwerks im gesunden Gewebe aufgrund der vasodilatativen Wirkung des CO_2 im verabreichten Carbogen-Gas, so wird dem Tumor Blutvolumen entzogen (Steal-Effekt). Bei gleicher Stoffwechselrate des Tumors sinkt der pO_2 -Wert und damit auch die T_2^* -Relaxationszeit. Außerdem fällt der Wasseranteil in diesem Gewebeareal ab, was wiederum zu einem Abfall der T_2^* -Zeit führt. Demzufolge steigt im umliegenden Gewebe aufgrund des höheren Wasseranteils der T_2^* -Wert. Der beschriebene Steal-Effekt beschränkt sich nicht nur auf Tumor- und Normalgewebe, er tritt im Tumor auf kleinerer Ebene genauso auf, wo vasoaktive und gestörte Gefäßsysteme von einer Arteriole versorgt werden oder über eine Venole abfließen. In Abbildung (4.7) ist das daran zu erkennen, dass Tumorbereiche, die negativ auf den Atemgaswechsel

reagieren, praktisch immer von Bereichen mit einer positiven Antwort umgeben sind. Auch der entgegengesetzte Fall kann eintreten: Bei einer Gefäßverengung des gesunden Gewebes durch die vasokonstriktive Wirkung des O_2 kann der Tumor unter Umständen besser mit Blut und Sauerstoff versorgt werden. Diesem Effekt wirkt entgegen, dass bei vergrößertem Durchmesser der Blutgefäße dies zu einem größeren τ_D (Abbildung 2.4) und damit einer verkürzten T_2^* -Zeit führt. Eine weitere Erklärung der negativen Reoxygenierungswerte bietet der Umstand, dass in den meisten Tumoren nur 20% bis 80% der Kapillare gleichzeitig perfundiert sind [90]. Durch das vasoaktive Gas können sich einzelne Gefäße öffnen und andere schließen. Wird ein zuvor geschlossenes Gefäß perfundiert, so steigt dort der Desoxyhämoglobin-Anteil. Dies kann die T_2^* -Zeit in diesem Bereich verkürzen, was sich in der Reoxygenierungskarte darstellt, als ob der Tumor hier schlechter mit Sauerstoff versorgt wird, obwohl das Gegenteil der Fall ist.

Diese komplexen, zum Teil entgegengesetzt wirkenden Reaktionspfade erklären die große inter- als auch intratumorale Heterogenität in der Reaktion dieses Gewebes auf einen Atemgaswechsel. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es mit diesem Messverfahren jedoch möglich ist individuelle Tumoren, die durch eine Begasung mit Carbogen besser mit Sauerstoff versorgt werden können, zu identifizieren. Zu klären bleibt die Frage, ob ein insgesamt positiver Reoxygenierungseffekt des Tumors bei negativer Reoxygenierung im Tumorkern und positiver Reoxygenierung in der Schale (wie bei der FaDu- oder CAL33-Tumorlinie) die Strahlensensitivität des Tumors insgesamt erhöht oder verringert. Des Weiteren ist noch unklar, ob ein eventuell nur schwacher Reoxygenierungseffekt des Tumors die erhöhte Strahlenempfindlichkeit aufgrund der gestiegenen O_2 -Konzentration des umliegenden Gewebes aufwiegt.

4.3. Messung des absoluten Sauerstoffpartialdrucks

Die Messung der longitudinalen Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxationszeit) von Perfluorcarbonen bietet einen Zugang zur Bestimmung des absoluten Sauerstoffpartialdrucks in biologischem Gewebe [91–95]. Ein Nachteil dieser Messmethode ist aber ihre Invasivität durch die Injektion von Perfluorcarbon. An zwei Tumoren wurde dieses Verfahren zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks angewendet und mit den Reoxygenierungsdaten, die mittels BOLD-Messung erfasst wurden, verglichen.

4.3.1. Allgemeines zu Perfluorcarbonen

Der Fluorkern besitzt, wie der Wasserstoffkern, einen Kernspin von $1/2$ und ist damit mit der NMR detektierbar. Seine relative Empfindlichkeit liegt bezogen auf ^1H bei 83.3%. ^{19}F ist damit nach ^1H das Element, das am meisten Signal in der NMR liefert. Zudem liegt die natürliche Häufigkeit von ^{19}F bei 100%, d.h. es existieren keine natürlichen Isotope. Im Organismus kommt Fluor nur in sehr geringen Mengen in Knochen und den Zähnen vor. Da es sich hierbei um Festkörper handelt, die eine extrem kurze transversale Relaxationszeit haben, ist bei den in dieser Arbeit verwendeten Bildgebungsverfahren mit keinem natürlichen Fluor-Signal aus dem Körper zu rechnen. Jegliches detektierbare Fluorsignal ist dem injizierten Marker zuzuschreiben.

Perfluorcarbone sind organische Verbindungen, bei denen meist alle Wasserstoffatome durch Fluoratome ersetzt wurden. Bei der Fluorierung sind hohe Energien nötig, wodurch in Nebenreaktionen zahlreiche Verunreinigungen entstehen. Der aufwendige Reinigungsprozess erklärt die hohen Kosten der Reinsubstanzen. PFCs sind in Reinform hydrophob, inert und werden vom Organismus nicht metabolisiert [91, 96]. Aufgrund ihres hydrophoben Verhaltens kann die Reinsubstanz nicht intravenös (i.v.) verabreicht werden. Es würden sich Thromben bilden, was zum Tod führt. Eine intravenöse Injektion ist nur in Form einer Wasser-PFC-Emulsion möglich. Die Herstellung der Emulsion ist in Anhang (A.4) beschrieben. Dabei ist darauf zu achten, dass die Tröpfchengröße der Emulsion klein genug ist, um die Kapillaren nicht zu verstopfen. Als PFC wurde in dieser Arbeit Perfluoro-15-Crown-5-Ether (PF15C5) (ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Dieses Molekül besteht aus einem Ring von zehn Kohlenstoffatomen und fünf Sauerstoffatomen, die von 20 identisch angeordneten Fluoratomen umgeben sind (Abbildung 4.9). Es hat ein Molekulargewicht von 580Da und einen Siedepunkt von 148°C . Diese Substanz hat den Vorteil, dass sie nur eine Resonanzlinie im Spektrum aufweist, wodurch in der Bildgebung keine Artefakte durch chemische Verschiebung auftreten. Ein weiterer Grund für die Wahl dieser Substanz ist, dass PF15C5 das höchste Signal-zu-Rausch-Verhältnis pro mol aller bekannten PFCs besitzt [94].

Bei einer i.v. Injektion der PF15C5-Emulsion in die Schwanzvene der Maus verteilt sich das PFC über den Blutkreislauf auf den ganzen Körper, wird durch phagozytierende Zellen wie z.B. Makrophagen aufgenommen und in der Leber und Milz abgebaut. Die Verweildauer im Organismus hängt von der Tröpfchengröße der Emulsion und

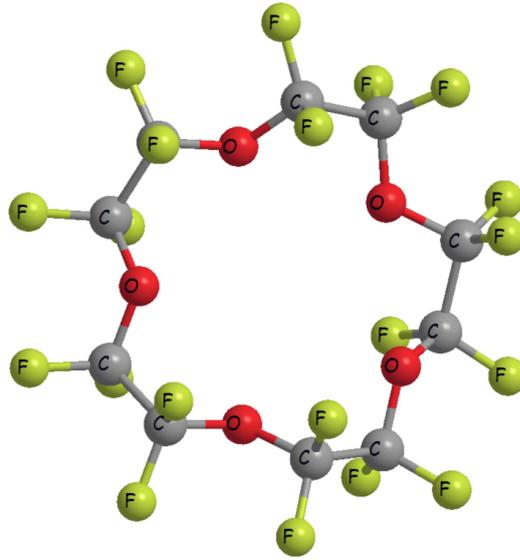


Abbildung 4.9.: Darstellung des PF15C5-Moleküls. (Erstellt mit Chem3D 8, Cambridge-Soft Corporation, Cambridge, USA)

der applizierten Menge ab und beträgt mehrere Tage bevor das PFC über die Lunge abgeatmet wird [94]. Tumoren können Entzündungsherde auslösen, wodurch eine erhöhte Anzahl an PFC-beladenen Makrophagen im Tumor vorzufinden ist. Die Konzentration von PF15C-beladenen Makrophagen kann ausreichen, um den Sauerstoffpartialdruck im Tumor zu bestimmen [94, 95].

4.3.2. Spin-Gitter-Relaxationsrate und pO_2

Die longitudinale Relaxationsrate R_1 des ^{19}F -Signals von Perfluorcarbonen hängt linear mit dem Sauerstoffpartialdruck zusammen. Diese Abhängigkeit wurde 1983 von Parhami et al. [91] für die unterschiedlichen Resonanzlinien von mehreren PFCs gefunden. Ursache dafür ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Elektronenspin der beiden ungepaarten Elektronen des paramagnetischen Sauerstoffmoleküls und dem Kernspin des Fluoratoms. Eine Herleitung dieses linearen Zusammenhangs ist in [92, 93] zu finden.

Die Relaxationsrate R_1 des Fluor-Signals setzt sich aus einem diamagnetischen und einem paramagnetischen Anteil zusammen:

$$R_1 = R_{1,dia} + R_{1,para} \frac{pO_2}{K} \quad (4.12)$$

Der diamagnetische Anteil $R_{1,dia}$ beschreibt die Relaxation bei Abwesenheit von Sauerstoff, während der paramagnetische Anteil $R_{1,para}$ die Relaxation aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit dem Elektronenspin von Sauerstoff beschreibt. K ist die

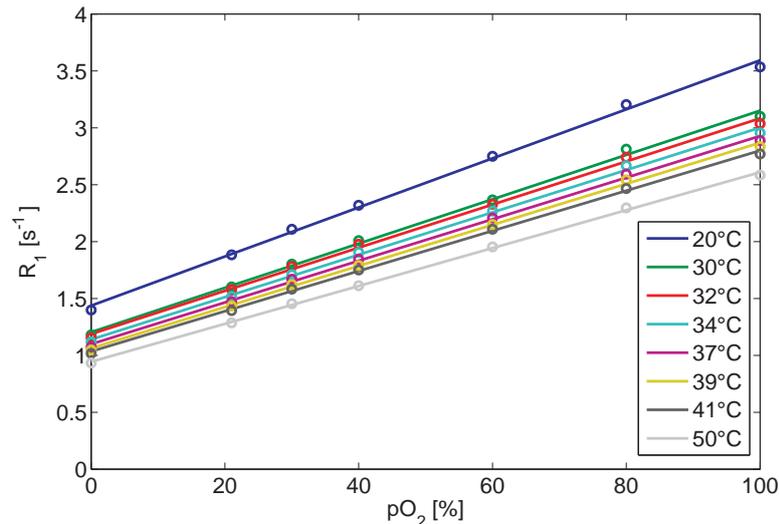


Abbildung 4.10.: Darstellung der linearen Abhängigkeit von $R_1 = 1/T_1$ vom Sauerstoffpartialdruck für verschiedene Temperaturen.

Henrysche Konstante⁷, die von der Temperatur abhängt, und pO_2 ist der Sauerstoffpartialdruck. Die longitudinale Relaxationsrate steigt linear mit dem Sauerstoffpartialdruck. Da $R_{1,dia}$ und K temperaturabhängig sind und $R_{1,dia}$ und $R_{1,para}$ von der Magnetfeldstärke abhängen, gilt dieser lineare Zusammenhang nur für konstante Magnetfelder und Temperaturen. In zahlreichen Arbeiten wurde dieser Effekt genutzt und PFC als regionaler Sauerstoffsensoren eingesetzt [59, 85, 94, 95, 97–100].

4.3.3. ¹⁹F-Kalibrierungskurven

Da der lineare Zusammenhang zwischen pO_2 und R_1 für jede PFC-Substanz verschieden ist und zudem noch von der Temperatur und der Magnetfeldstärke abhängt, ist eine Kalibrierung für die Umrechnung von R_1 zu pO_2 nötig. Dazu wurden Proben der PFC-Reinsubstanz mit sieben verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0% und 100% für ca. 30min begast, in NMR-Röhrchen abgefüllt und luftdicht verschlossen. Die Röhrchen wurden in eine wasserdurchströmte Trommel gesetzt, deren Temperatur über das fließende Wasser reguliert werden konnte. Acht Messwerte für Temperaturen zwischen 20°C und 50°C wurden aufgenommen. Zur Berechnung der Kalibrierungsparameter wurde Gleichung (4.12) umgeformt:

$$R_1 = t + m \cdot pO_2 \quad (4.13)$$

In Tabelle (4.3) und Abbildung (4.10) sind die Ergebnisse der Kalibrierungsmessungen dargestellt. Der lineare Zusammenhang zwischen pO_2 und R_1 wird durch Pearson R-Werte zwischen 0.99 und 1.00 für die untersuchten Temperaturen sehr gut bestätigt. Zur Berechnung der *in vivo* pO_2 -Karten wurde die Kalibrierungsgerade von 39°C verwendet, da durch Entzündungsherde die Temperatur im Tumor leicht erhöht ist.

⁷Aus dem Henryschen Gesetz, das die Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeiten beschreibt.

$pO_2[\%] \setminus T_{emp.}[^\circ C]$	20	30	32	34	37	39	41	50
0	1.3984	1.1802	1.1533	1.1174	1.0753	1.0468	1.0171	0.9326
21	1.8832	1.6010	1.5773	1.5177	1.4708	1.4339	1.3935	1.2860
30	2.1084	1.8021	1.7803	1.7100	1.6692	1.6226	1.5820	1.4537
40	2.3191	2.0084	1.9759	1.9048	1.8457	1.7902	1.7504	1.6129
60	2.7495	2.3669	2.3283	2.2676	2.2070	2.1496	2.1088	1.9527
80	3.2041	2.8121	2.7405	2.6667	2.5920	2.5419	2.4667	2.2957
100	3.5348	3.1008	3.0358	2.9551	2.8877	2.8345	2.7693	2.5846
Steigung (m)	0.02156	0.01946	0.01895	0.01861	0.01828	0.01806	0.01765	0.01665
Y-Achse (t)	1.43741	1.20422	1.18849	1.13977	1.09943	1.06323	1.03504	0.94369
Pearson (R)	0.99881	0.99880	0.99880	0.99903	0.99917	0.99936	0.99947	0.99966

Tabelle 4.3.: Daten der pO_2 -Kalibrierungsmessung. Dargestellt sind die R_1 -Werte der PFC-Reinsubstanz in $1/s$ bei den untersuchten Sauerstoffpartialdrücken und Temperaturen. In der unteren Hälfte der Tabelle sind die berechnete Steigung, der Y-Achsenabschnitt und der Pearson-Korrelations-Wert der Ausgleichsgeraden angegeben.

In der Medizin ist es üblich, den Sauerstoffpartialdruck in mmHg bzw. Torr⁸ anzugeben. Die Umrechnung von % Sauerstoff nach mmHg erfolgt nach:

$$pO_2[mmHg] \hat{=} 759.96 \cdot \frac{pO_2[\%]}{100} \quad (4.14)$$

für einen Luftdruck von 1013.25hPa.

4.3.4. Messprotokoll und Ergebnisse

In den ersten Versuchen wurden 200 μ l PF15C5-Emulsion der Maus i.v. in die Schwanzvene injiziert. Allerdings konnten bei keiner von insgesamt vier Messungen an Tumoren der FaDu-Linie auch nach dreifacher Injektion der PFC-Emulsion verteilt auf drei Tage ein ¹⁹F-Signal im Tumor detektiert werden. Ausreichend Fluor-Signal wurde in Leber, Milz und im Knochenmark detektiert, was bestätigt, dass die Emulsion vom Körper aufgenommen wurde. Nicht in allen Tumoren sind ausreichend viele Makrophagen vorzufinden, was eine Erklärung für das zu geringe Fluorsignal sein könnte [101]. In den weiteren Versuchen wurde deshalb dazu übergegangen, die Emulsion durch drei Einstiche direkt in den Tumor zu injizieren [97, 98, 100].

Die Akquisition der T_1 -Karten erfolgte wie in Kapitel (2.1.8) beschrieben mittels einer IR-Sequenz und exponentiellem Fit der ¹⁹F-Relaxationszeit für jeden einzelnen Voxel. Da aber auch bei der intratumoralen Injektion der Emulsion nicht ausreichend Fluor-Signal für eine Messung mit der IR-Snapshot-FLASH-Sequenz zur Verfügung stand, wurden zehn einzelne Messungen zu verschiedenen Inversionszeiten⁹ (9.5, 50, 100, 300, 600, 1000, 1800, 2500, 4000, 5000ms) durchgeführt. Als Auslesemodul wurde eine Spinecho-Sequenz verwendet (Messparameter siehe Tabelle 4.4), die zwar eine längere Messzeit zur Folge hat, dafür aber mehr Signal liefert, als die mit Anregungswinkeln zwischen sechs und zehn Grad gepulste IR-Snapshot-FLASH-Sequenz. Die ¹⁹F-Spin-

⁸1Torr $\hat{=} 1$ mmHg

⁹Zeitdauer zwischen der Mitte des Inversionspulses und der Mitte des Anregungspulses.

Parameter	Wert
Inversionspuls (Name, Bandbreite, Pulswinkel)	Sech, 5000Hz, 180°
Anregungspuls (Name, Bandbreite, Pulswinkel)	Sinc3, 5000Hz, 90°
Refokussierungspuls (Name, Bandbreite, Pulswinkel)	Sinc3, 5000Hz, 180°
T_R	6s
T_E	6.26ms
T_I	(9.5 - 5000)ms
Bildmatrix	32 × 32
Field of View	16mm × 16mm
Bildaufflösung	500μm × 500μm
Schichtdicke	1.0mm
Anzahl Mittelungen	1
Aufnahmedauer	ca. 3.25min

Tabelle 4.4.: Sequenzparameter zur Messung der ^{19}F - T_1 -Relaxationszeit von PFC.

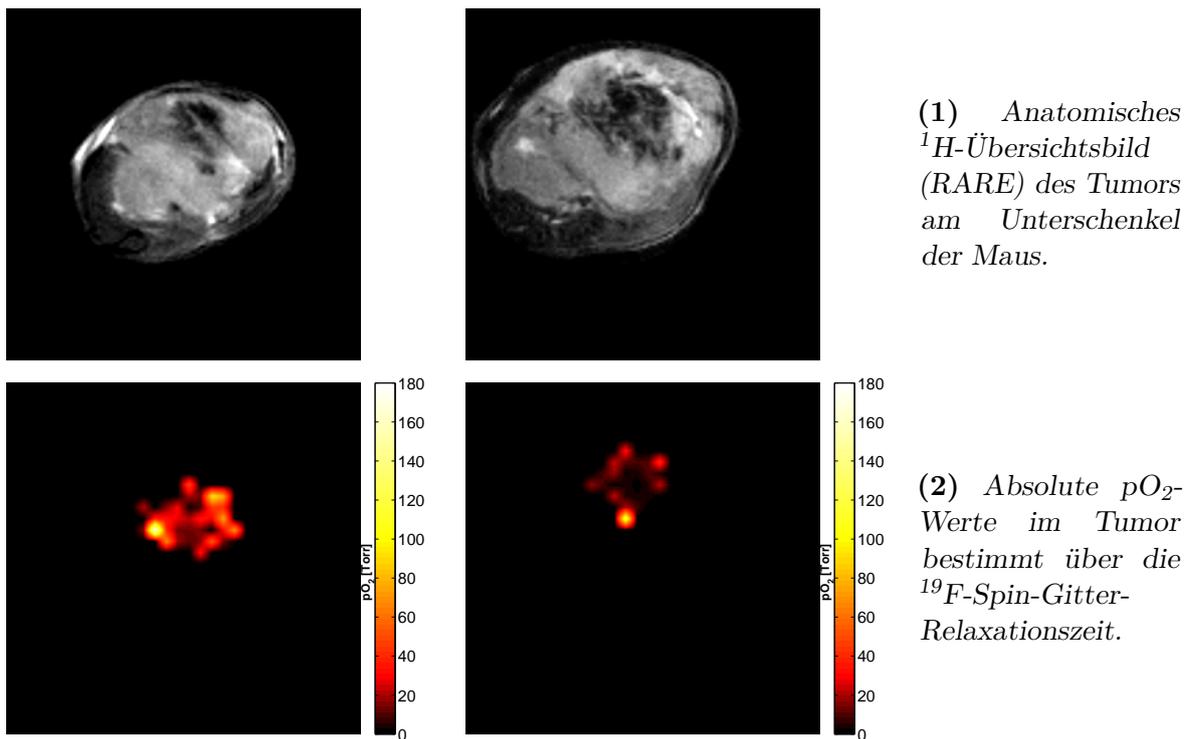


Abbildung 4.11.: (Fortsetzung auf Seite 52)

Gitter-Relaxationszeit wurde bei Beatmung der Maus mit Raumluft bzw. Carbogen gemessen. Mit der Kalibrierungsgeraden für 39°C wurde nach Gleichung (4.13) und (4.14) eine Karte des Sauerstoffpartialdrucks im Tumor berechnet. Aus den Karten für die beiden Atemgase konnte dann eine Differenzkarte des Sauerstoffpartialdrucks bei einem Atemgaswechsel berechnet werden. Um die $p\text{O}_2$ -Differenzkarte mit den Daten aus der BOLD-Messung vergleichen zu können, wurde die Reoxygenierungsmessung aus Kapitel (4.2) am selben Tumor mit der gleichen Auflösung und Schichtdicke durchgeführt.

Die Ergebnisse der $p\text{O}_2$ - und BOLD-Reoxygenierungsmessung sind in Abbildung (4.11) für zwei Tumoren der FaDu-Line dargestellt.

Die erste Bildreihe zeigt den Schnitt eines anatomischen Übersichtsbildes des tumortragenden Beines durch das Zentrum des Tumors. Der dunklere Bereich im Zentrum des Tumors entsteht durch die Wasserverdrängung der verabreichten Emulsion, wodurch ein schwächeres Protonensignal detektiert wurde. Dieser Bereich deckt sich mit dem Areal in dem Fluor-Signal nachgewiesen werden konnte. Darunter ist die absolute Sauerstoffkonzentration im Tumor bei Atmung von Raumluft dargestellt. Die Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks über Relaxationszeitmessungen des Fluors ist nicht von der lokalen Fluorkonzentration abhängig. Es muss lediglich ausreichend Signal vom ^{19}F -Kern messbar sein, um die Relaxationskurve fiten zu können. Da sich die PFC-Emulsion nicht über den kompletten Tumor verteilt, konnte $p\text{O}_2$ nur in der Nähe der Einstichstellen bestimmt werden, in denen ausreichend PFC-Substanz für die Messung vorhanden war. Der durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck im Tumor lag bei 14.97mmHg bzw. 22.02mmHg . Datenpunkte mit dem Wert null gingen nicht in die

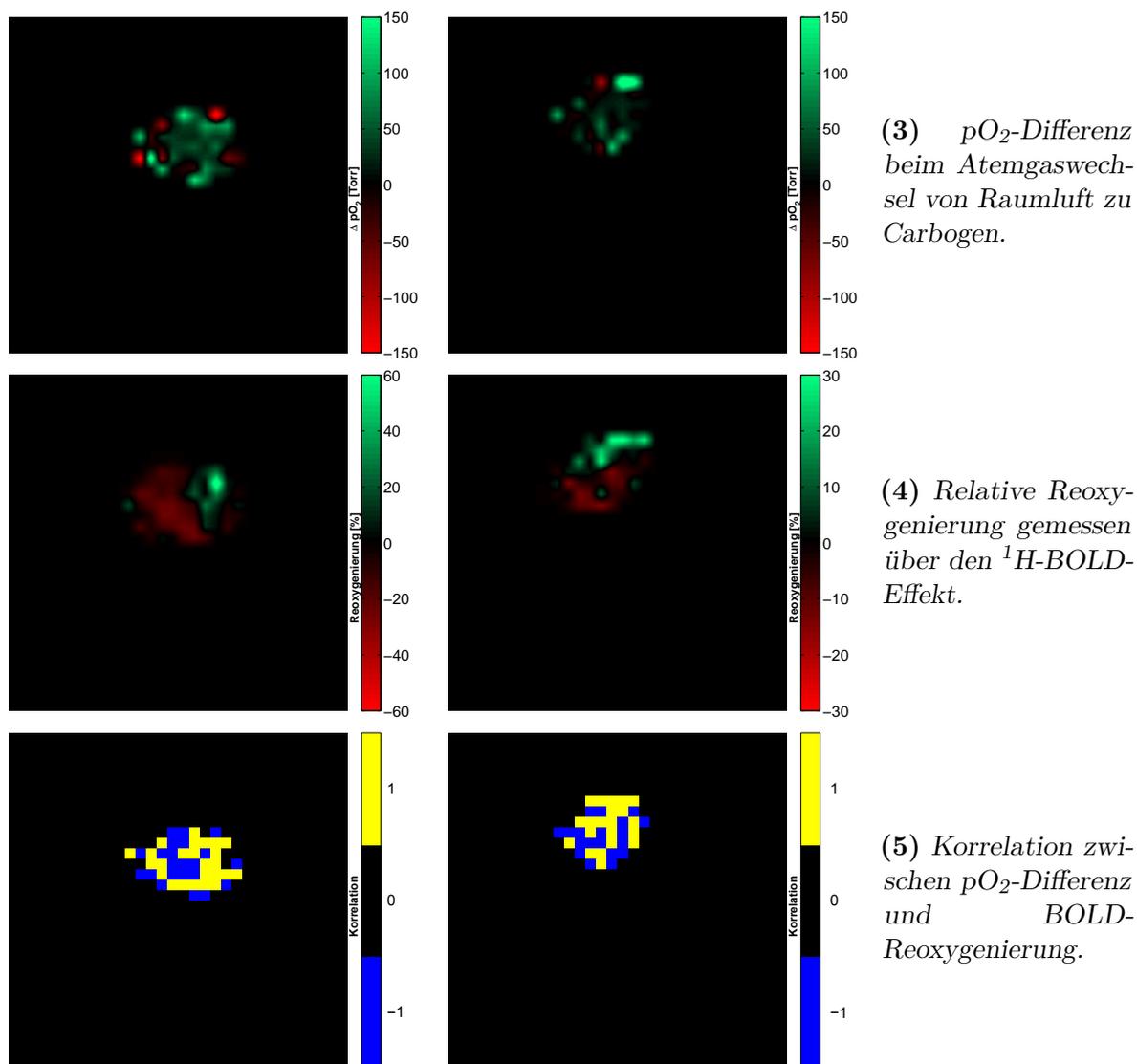


Abbildung 4.11.: Vergleich der pO_2 - und BOLD-Reoxygenierungsmessungen. Die Parameterkarten wurden von der nativen Bildmatrix von 32×32 auf 256×256 Bildpunkte interpoliert. Die Korrelationskarte ist in der nativen Auflösung dargestellt.

Berechnung des Mittelwerts ein. In der dritten und vierten Reihe sind die Differenzen des absoluten Sauerstoffpartialdrucks und die Reoxygenierungswerte des Tumors bei einem Atemgaswechsel von Raumluft nach Carbogen dargestellt. Um die Parameterkarten besser miteinander vergleichen zu können, sind in der BOLD-Reoxygenierungskarte nur Datenpunkte, für die auch in der ^{19}F -Messung Werte vorlagen, dargestellt. Der Sauerstoffpartialdruck stieg im untersuchten Tumorbereich um 5.73mmHg bzw. 26.15mmHg. Die Reoxygenierung in diesem Tumorareal betrug -3.95% bzw. 1.72%. In der letzten Reihe der Abbildung sind die Korrelationen der beiden Messmethoden abgebildet. Die gelben Bereiche stellen eine positive (die Differenzkarten der beiden Messmethoden zeigen einen Trend in die gleiche Richtung) und die blauen Bereiche eine negative (die Trends der beiden Messmethoden sind entgegengesetzt) Korrelation dar.

4.3.5. Diskussion

Das Ziel dieser Messreihe war es, die Daten der absoluten pO_2 -Messung über die ^{19}F -Relaxationszeit mit Daten aus der ^1H -BOLD-Reoxygenierungsmessung, die neben der Sauerstoffkonzentration auch vom regionalen Blutvolumen, der Perfusion, der Temperatur und dem pH-Wert abhängt, zu vergleichen und den Einfluss dieser Parameter auf die Reoxygenierungsmessung zu evaluieren.

Um Absolutwerte des Sauerstoffpartialdrucks angeben zu können, ist eine Kalibrierungsmessung zur Umrechnung von R_1 zu pO_2 bei einer Magnetfeldstärke von 17.6T durchgeführt worden. Dabei konnte der lineare Zusammenhang zwischen R_1 zu pO_2 für die PF15C5-Reinsubstanz bei den gemessenen Temperaturen mit einer Pearson-Korrelation zwischen 0.99 und 1.00 sehr gut bestätigt werden. Für die *in vivo* Messung wurde aus der Reinsubstanz zur besseren Bioverträglichkeit eine Emulsion hergestellt. Dabei ändert sich das Relaxationsverhalten des PFCs nicht und die Kalibrierung bleibt weiterhin gültig [91, 99]. Inwiefern die gemessenen Kalibrationskurven der Reinsubstanz zur pO_2 -Berechnung in die *in vivo* Situation übertragbar sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In den Arbeiten [85, 91, 99, 100] wird die Kalibration unverändert übernommen. Nöth et. al [59, 102] fordern allerdings eine Kalibrierung unter *in vivo* Bedingungen, da die Kalibrierung ihre Gültigkeit verliert, wenn sich die PFC-Moleküle in einem gebundenen Zustand (z.B. durch Phagozytose¹⁰ in den Makrophagen) befinden. Dadurch lassen sich die in der Literatur beschriebenen, biologisch nicht möglichen negativen Sauerstoffpartialdrücke [103–105] erklären. Die Kalibrierungsgerade (4.12) setzt sich aus einem diamagnetischen und paramagnetischen (pO_2 -abhängigen) Relaxationsterm zusammen. Der Einfluss durch den gebundenen Zustand der PFC-Moleküle wirkt lediglich auf den diamagnetischen Term (Ordinatenschnittpunkt) und verschiebt damit die Kalibrierungsgerade. Damit bleibt die Kalibrierung selbst bei dieser Einschränkung für die Berechnung der Differenzen des Sauerstoffpartialdrucks beim Atemgaswechsel gültig.

In den ersten Versuchen wurde die PFC-Emulsion der Maus i.v. in die Schwanzvene injiziert, wobei sich über den Blutkreislauf das PF15C5 im Tumor anreichern sollte

¹⁰Aufnahme größerer Partikel durch spezialisierte Zellen.

[94, 95, 106, 107]. In Vorexperimenten reichte das ^{19}F -Signal aus dem Tumor aber nicht aus, um eine pO_2 -Messung durchzuführen. Ein Grund für das zu schwache Signal im Tumor kann sein, dass es bei der Herstellung der Emulsion nicht möglich war, mittlere Tröpfchengrößen unter $3\mu\text{m}$ zu produzieren, was die Biodistributivität dieser Emulsion stark einschränkt. Da aber auch die Makrophagen, durch die das PFC aufgenommen und transportiert wird, oft nicht in ausreichender Zahl im Tumor vorzufinden sind [59], wurde zu einer intratumoralen Injektion der Emulsion durch drei Einstiche in das Zentrum des Tumors übergegangen, was eine Messung des Sauerstoffpartialdrucks ermöglicht [97, 98, 100]. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass eine Messung des Sauerstoffpartialdrucks nur im unmittelbaren Bereich der Einstichstellen möglich ist, da sich die Emulsion nicht im Tumor verteilt. Zudem presst der hohe interstitielle Druck im Tumor das PFC teilweise wieder aus diesem heraus, so dass lediglich in zwei von sechs untersuchten Tumoren aussagekräftige Messungen möglich waren. Durch die Einstiche ist diese Methode hoch invasiv und es werden durch den Eingriff Teile des Tumors zerstört. Dadurch ist die Durchführung einer Verlaufsstudie zur Wirksamkeit einer Strahlentherapie unter Carbogenatmung mit mehreren aufeinanderfolgenden Messungen schlecht vorstellbar. Ein anderer Ansatz zur Deponierung von PFC im Tumor schlagen Nöth et al. [59] vor. Hierbei wird PF15C5 in Alginatkapseln verpackt und mit den Tumorzellen dem Wirtstier implantiert. Die Kapseln sind sauerstoffdurchlässig und biokompatibel, womit eine lokalisierte, wiederholte Messung des Sauerstoffpartialdrucks möglich ist. Allerdings ist die Verteilung der Kapseln im Tumor zufällig und die Messung auf den unmittelbaren Bereich um diese Vesikel beschränkt.

Die gemessenen mittleren pO_2 -Werte im Tumor von 14.97mmHg bzw. 22.02mmHg liegen in dem in der Literatur beschriebenen Bereich von 1mmHg bis 36mmHg [100]. Da sich die Fluor-Substanz nicht über den kompletten Tumor verteilt, sondern nur an den Einstichstellen vorzufinden war, wurden bei der Berechnung des Mittelwertes über das Tumor-ROI Datenpunkte mit einem Wert von Null nicht berücksichtigt. Der tatsächliche Wert des Sauerstoffpartialdrucks dürfte daher unter dem gemessenen liegen. Zudem wurden negative Werte, die durch die Messwertschwankungen bei niedrigem pO_2 entstehen können, auf Null gesetzt und gingen ebenfalls nicht in den Mittelwert mit ein. Bei der Berechnung der Differenz des Sauerstoffpartialdrucks beim Atemgaswechsel dagegen wurden die negativen Werte aus dem oben genannten Grund berücksichtigt. In den ΔpO_2 -Karten in Abbildung (4.11) ist ein großflächiger Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Tumor zu erkennen (grün). Insgesamt reagieren beide Tumoren mit einem Anstieg des Tumor- pO_2 . Es sind einzelne kleine Bereiche (rot) zu erkennen, in denen der Sauerstoffpartialdruck abfällt. Dies ist auf den Steal-Effekt zurückzuführen (siehe Kapitel 4.2.3), durch den einzelne Gefäße kollabieren können und das umliegende Gewebe mit Sauerstoff unterversorgt wird.

Die Reoxygenierungskarten der beiden Tumoren zeigen neben gut reoxygenierbaren Arealen (grün) auch ausgeprägte Bereiche mit negativer Reoxygenierung (rot). Das vaskuläre System des Tumors reagiert, abhängig vom Entwicklungsstatus der Gefäße, auf sehr heterogene Weise auf Carbogen [108]. Durch eine Erhöhung des RBV aufgrund der vasodilatativen Wirkung des CO_2 kann Wasser aus dem Gewebe in die Blutgefäße gesogen werden. Dadurch verkürzt sich T_2^* in diesem Bereich, was sich in den Reoxyge-

nierungskarten wie eine Sauerstoffminderversorgung darstellt. Die Messung über ^{19}F -Relaxometrie ist von diesem Effekt nicht betroffen und stellt die korrekte pO_2 -Differenz dar. Die BOLD-Messung erfasst hauptsächlich Änderungen der Sauerstoffkonzentration im Blut, das im Normalfall in einem Gleichgewicht mit der Gewebesauerstoffkonzentration steht. Allerdings treten, v.a. beim chaotischen Tumorwachstum, Gradienten in der pO_2 -Konzentration mit wachsendem Abstand zu den Kapillaren auf, die mit der BOLD-Messung nicht erfasst werden können. Die Messung mittels PF15C5 erfasst dagegen direkt den für die Strahlensensitivität relevanten Sauerstoffpartialdruck im Gewebe. Zudem ist die ^{19}F -Relaxometrie wesentlich sensitiver auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration als die BOLD-Messung, da sich bei konstanter Temperatur eine Veränderung von pO_2 des Gewebes direkt auf den T_1 -Wert des ^{19}F überträgt und nicht erst eine Differenzmessung durchgeführt werden muss. Dieses unterschiedliche Ansprechen der Messmethoden auf den Atemgaswechsel erklärt die Heterogenität in der Korrelationskarte, welche auch in anderen Arbeiten beobachtet wurde [59, 85, 100]. Betrachtet man das komplette gemessene Tumervolumen, so wird bestätigt, dass die nichtinvasive BOLD-Messung den Reoxygenierungseffekt bei einem Atemgaswechsel insgesamt korrekt wiedergibt. Ein hohes positives ΔpO_2 ergibt in der BOLD-Messung einen positiven Reoxygenierungswert. Ein leicht positives ΔpO_2 , das kaum Auswirkung auf die Strahlensensitivität hat, ergab in dieser Messung einen negativen Reoxygenierungswert. Eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Messmethoden ist in nekrotischen Arealen zu beobachten. Dort kann durch die kollabierte Gefäßstruktur kein Sauerstoff mehr transportiert werden, wodurch sie in der BOLD-Messung auch nicht erfasst werden. Die ^{19}F -Messung stellt diese Bereiche jedoch als schlecht mit Sauerstoff versorgtes Gewebe dar. Da es sich hierbei um totes Gewebe handelt, das nicht mehr behandelt werden kann, spielt es für die Therapie keine Rolle mehr.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Messung der Reoxygenierung über den BOLD-Effekt valide Aussagen darüber treffen kann, ob sich ein Atemgaswechsel positiv oder negativ auf die Strahlensensitivität des betrachteten Tumors auswirken würde.

5. Perfusion

Ein bedeutender Parameter, der direkten Einfluss auf das Mikromilieu des Tumors hat, ist die mikrovaskuläre Gewebepfusion. Sie wird in $[\text{ml} / (100\text{g} \cdot \text{min})]$ angegeben und beschreibt die Durchblutung des Gewebes auf kapillarer Ebene. Durch die Perfusion werden über das Kapillarnetz Nährstoffe und Sauerstoff zum Gewebe hin- und Abbauprodukte und CO_2 vom Gewebe abtransportiert. Ein schlecht durchbluteter Tumor kann nur schwer therapiert werden, da die Medikamente nicht in die zu behandelnden Bereiche vordringen können [109], und das Gewebe potenziell hypoxisch ist. Deshalb ist es von großem Interesse, die Perfusion von Tumoren idealerweise nichtinvasiv zu messen, um entscheiden zu können ob eine medikamentöse Behandlung den erwünschten therapeutischen Effekt erzielen kann. Damit ist eine individuelle Abstimmung des Therapieplans auf den Patienten möglich. Eine Möglichkeit, die Gewebepfusion nichtinvasiv und ohne Gabe von Kontrastmitteln zu erfassen, stellt die Messung über Spin-Markierung (Spin-Labeling) dar, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

5.1. Grundlagen

Zur Messung von Flussgeschwindigkeiten in großen zu- und ableitenden Arterien und Venen stehen Methoden wie die Messung der flussabhängigen Phasenakkumulation [110] oder, zur Darstellung von durchbluteten Gefäßen, die Time-of-flight Angiographie zur Verfügung. Eine invasive Bestimmung der Gewebepfusion ist über die zeitaufgelöste Messung der Verteilung von intravaskulären Kontrastmitteln nach Injektion möglich [111, 112]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die mikrovaskuläre Perfusion nichtinvasiv zu messen, was mit dem Spin-Labeling-Verfahren möglich ist. Dabei wird das Blut als körpereigenes, endogenes und frei diffusibles Kontrastmittel zur Messung der Perfusion verwendet. Das hat den Vorteil, dass in kurzen Abständen wiederholt Messungen an demselben Organismus durchgeführt werden können, ohne auf das Auswaschen eines Kontrastmittels vor erneuter Messung warten zu müssen.

Das Konzept des Spin-Labeling wurde von Detre et al. [113] zur Perfusionsmessung am Rattenhirn vorgestellt. Dabei werden einfließende Spins in einer Präparationsschicht vor der Messschicht durch kontinuierliches Einstrahlen von Radiowellen gesättigt¹. Die fließenden gesättigten Spins treten in Wechselwirkung mit dem statischen, relaxierten Gewebewasser und erfahren dadurch eine perfusionsabhängige Relaxationszeitverkürzung. Williams et al. entwickelten dieses Konzept weiter und verwendeten anstelle der Sättigung eine adiabatische Inversion der Spins in der Präparationsschicht, wodurch

¹D.h. die longitudinale Magnetisierung ist Null.

die Empfindlichkeit dieser Messmethode um einen Faktor von ca. zwei erhöht werden konnte [114]. Um die longitudinale Signalentwicklung der fließenden Spins zu beschreiben, erweiterten sie die Bloch-Gleichungen um Terme, die den arteriellen Einstrom und venösen Abfluss beschreiben [114]:

$$\frac{dM_b(t)}{dt} = \frac{M_b^0 - M_b(t)}{T_1} + fM_a(t) - \frac{f}{\lambda}M_b(t) \quad (5.1)$$

mit f als Blutfluss (Perfusion) in $ml/(g \cdot s)$, T_1 der Spin-Gitter-Relaxationszeit von Gewebewasser in der Abwesenheit von Fluss oder Austausch zwischen Blut und Gewebe, M_b der longitudinalen Magnetisierung pro Gramm Gewebe, M_b^0 der Wert von M_b unter vollständig relaxierten Bedingungen, M_a der longitudinalen Magnetisierung pro ml arteriellen Blutes und λ als Gewebe-Blut-Verteilungskoeffizient von Wasser, der definiert ist als:

$$\lambda = \frac{\text{Wassermenge/g Gewebe}}{\text{Wassermenge/ml Blut}} \quad (5.2)$$

Williams et al. haben einen Formalismus entwickelt, mit dem es möglich ist, aus der Messung der apparenten Spin-Gitter Relaxationszeit $T_{1,app}$ bei kontinuierlicher Inversion M_b^{inv} und Messung ohne Inversion M_b^{cont} die Perfusion im Gewebe zu berechnen:

$$f = \frac{\lambda}{T_{1,app}} \frac{M_b^{cont} - M_b^{inv}}{2M_b^{cont}} \quad (5.3)$$

Dabei sind sie von folgenden Annahmen ausgegangen:

- Wasser ist ein frei diffusibler Signalträger. (Allerdings spielt bei den hier vorherrschenden Gleichgewichtsbedingungen durch die kontinuierliche Inversion eine evtl. limitierte Diffusion kaum eine Rolle.)
- Der Gewebe-Blut-Verteilungskoeffizient λ wurde als konstant (0.9g/ml) über das komplette Gewebe angenommen. (Im untersuchten Gewebe (Rattenhirn) liegen nur geringe Variationen in λ vor [115], was im Tumor nicht der Fall ist.)
- Die Inversion durch den adiabatischen Inversionspuls erfolgt, bedingt durch den Fluss, nicht vollständig, sondern nur zu 90%.
- Die invertierten Spins bleiben bis zur Wechselwirkung mit dem Gewebewasser an den Kapillaren vollständig invertiert. D.h. die Transit-Zeit ist vernachlässigbar klein im Vergleich zur Spin-Gitter-Relaxationszeit.
- Die invertierten Spins in den zuleitenden Arterien tragen nicht zum Signal bei. (Im Gehirn macht das Volumen der Arterien nur ca. 0.6% des Gesamtvolumens aus und ist damit vernachlässigbar.)

Edelman et al. adaptierten diese Spin-Labeling-Messmethode und strahlten zur Inversion der Spins einen Puls anstatt eines kontinuierlichen HF-Feldes in die Präparationsschicht ein (EPISTAR) [116].

Die vorgestellten Sequenzen haben den Nachteil, dass die Präparationsschicht und die

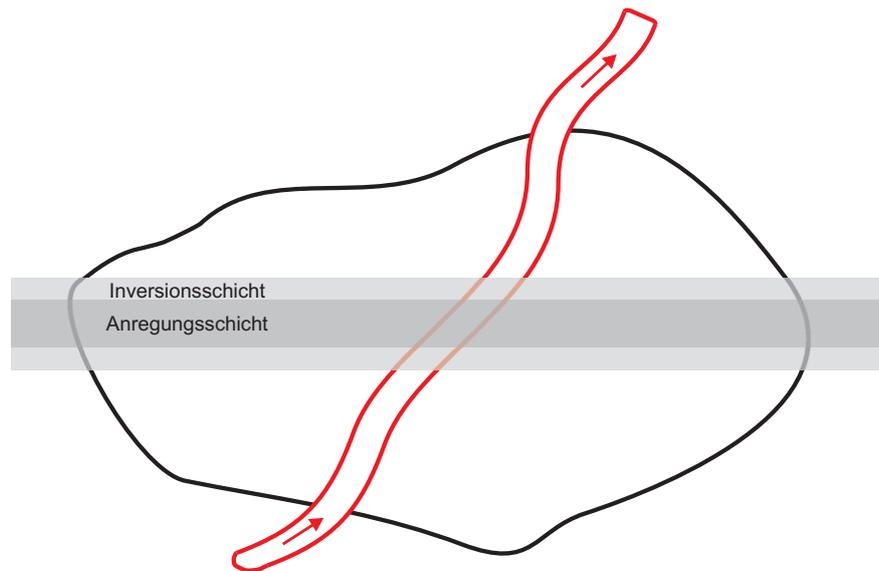


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung des Spin-Labelings nach Kwong et al. [117]

Messschicht räumlich voneinander getrennt sind. Damit relaxieren die Spins während der Zeit, die sie von der Inversionsschicht zu den Kapillaren benötigen, abhängig von der Transitstrecke, welche unbekannt ist. Darüber hinaus entstehen durch die Offresonante HF-Einstrahlung zur Inversion der Spins außerhalb der Messschicht Artefakte durch den Magnetisierungstransfer-Effekt, die in ihrer Signalstärke das Perfusionssignal um ein vielfaches übertreffen und die Messwerte verfälschen können. Eine Lösung dieser Probleme stellten Kwong et al. [117] vor. Zur Messung der Perfusion führten sie zwei T_1 -Messungen durch: Eine Messung bei globaler Inversion, bei der die Spins des kompletten Probenvolumens invertiert werden, und eine Messung bei schichtselektiver Inversion, bei der die Spins in einer Schicht definierter Breite invertiert werden (Abbildung 5.1). Die Messschichten (im Folgenden auch Ausleseschichten oder Anregungsschichten genannt) sind bei globaler und schichtselektiver Inversion identisch. Zusätzlich sind in der schichtselektiven Messung die Inversionsschicht und die Messschicht identisch, wodurch die oben beschriebenen Probleme eliminiert werden, da die Schichten räumlich übereinander liegen und keine offresonanten HF-Pulse eingestrahlt werden. In die invertierte Schicht fließen nicht invertierte Spins von außerhalb der Schicht ein und führen zu einer perfusionsabhängigen beschleunigten T_1 -Relaxation. Die Spins in der global invertierten Messung erfahren keine beschleunigte Relaxation, da die einfließenden Spins ebenfalls invertiert wurden. Über die Differenz der Relaxationszeiten ist eine Berechnung von perfusionsgewichteten Bildern möglich. Aufgrund des geringen Unterschiedes zwischen den Spin-Gitter Relaxationszeiten der beiden Messungen ist ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis und ein stabiler Fitalgorithmus nötig, um genaue Perfusionsdaten zu erhalten. In dem Modell von Kwong wird außerdem berücksichtigt, dass T_1 von Gewebe und Blut unterschiedlich sind, was bei Detre und Williams vernachlässigt wurde. Dies kann bei stark unterschiedlichen T_1 -Werten (z.B. weiße Gehirnmasse und Blut) zu einer Überschätzung der Perfusionswerte führen.

Das Modell von Kwong erlaubt zwar die Aufnahme von perfusionsgewichteten Bildern,

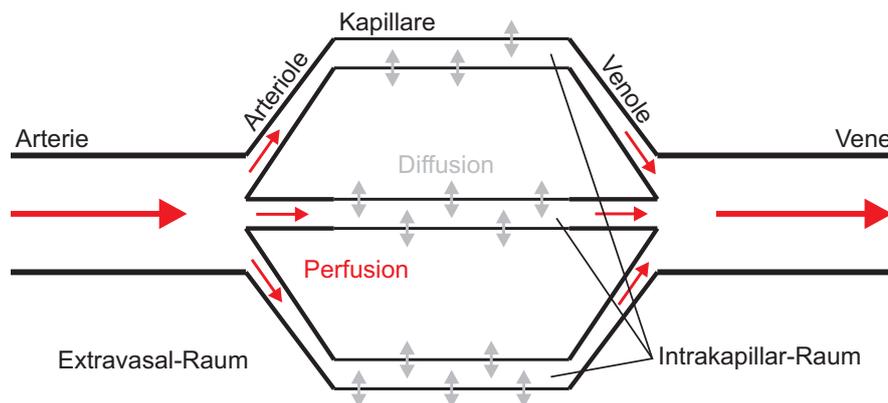


Abbildung 5.2.: Schematische Darstellung des Perfuptionsmodell nach Bauer et al. [119]

es liefert aber keine Absolutwerte für die Perfusion. Belle et al. [118] haben das Zwei-Kompartimente-Modell von Bauer et al. [119] zur Beschreibung von Gewebepfusion erweitert, was eine Messung von absoluten Perfuptionswerten ermöglicht. Im Modell von Bauer wird das Gewebe in zwei Kompartimente, die miteinander in Wechselwirkung stehen eingeteilt: Das intravaskuläre Kapillarblut und das extravaskuläre Gewebe (Abbildung 5.2). Dabei werden folgende Annahmen getroffen:

- Die Magnetisierung in jedem der beiden Kompartimente ist homogen.
- Aufgrund ihres geringen Volumenanteils kann der Beitrag von Arterien und Venen zur Gesamtmagnetisierung im Gewebe vernachlässigt werden.

Das Modell berücksichtigt die Effekte von zwei Transportprozessen, die zu einer beschleunigten Relaxation führen: Die Diffusion von Spins zwischen Kapillaren und Gewebe durch die Kapillarwand, und die Perfusion, durch die ständig frisches Blut in die Kapillaren strömt. Das Modell beschreibt den zeitlichen Verlauf der Magnetisierung in den beiden Kompartimenten, abhängig von: Den Diffusionskonstanten zwischen Gewebe und Kapillaren, den Relaxationszeiten der einzelnen Kompartimente, des regionalen Blutvolumens und der Perfusion. Durch Anpassung dieses Modells an die Perfuptionsmessung nach Kwong et al. gelang es Belle, einen Formalismus zur Messung von absoluten Perfuptionswerten zu entwickeln. Dabei wurden folgende Annahmen getroffen:

- Die biexponentielle Relaxation der longitudinalen Magnetisierung² kann durch einen monoexponentiellen Verlauf angenähert werden.
- Im Vergleich zur T_1 -Relaxationszeit kann von einem schnellen Austausch zwischen intrakapillarem und extravaskulärem Wasser ausgegangen werden.
- Der Gewebe-Blut-Verteilungskoeffizient von Wasser über das gemessene Gewebe ist homogen.

²Die Relaxationszeiten der beiden Kompartimente addieren sich zu einer biexponentiellen Relaxation.

Damit ergibt sich zur Berechnung der Perfusion (P) [118]:

$$P = \frac{\lambda}{T_{1,cap}} \left(\frac{T_{1,glob}}{T_{1,sel}} - 1 \right) \quad (5.4)$$

mit λ als Gewebe-Blut-Verteilungskoeffizient, $T_{1,cap}$ als T_1 von Kapillarblut, $T_{1,glob}$ als T_1 der Probe bei globaler Inversion und $T_{1,sel}$ als T_1 der Probe bei schichtselektiver Inversion.

Die beschriebenen Modelle gehen von einem homogenen Gewebe-Blut-Verteilungskoeffizienten und einer homogenen Magnetisierung in den Kompartimenten aus. Dies ist in dem teilweise sehr heterogenen Tumorgewebe nicht gegeben, was die Genauigkeit der Messwerte von absoluter Perfusion in diesem Gewebe herabsetzt. Selbst in der weißen und grauen Gehirnmasse sind Unterschiede in λ gemessen worden [115]. Deshalb wurden zur korrekten Berechnung von absoluten Perfusionswerten eine Berücksichtigung des ortsabhängigen Gewebe-Blut-Verteilungskoeffizienten sogar innerhalb des gleichen Gehirngewebes gefordert [120]. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die Perfusion nicht als Absolutwert bestimmt, sondern als Relativwert zur Muskelperfusion angegeben, was stabilere Aussagen über die Tumorperfusion liefert.

Das verwendete Narkosemittel Isofluran hat einen nur geringen Einfluss auf die Physiologie des Tieres [42], es treten aber abhängig von der Tiefe der Narkose, die für jedes Tier individuell eingestellt und reguliert wird, Schwankungen in Herzfrequenz und Blutdruck auf, die sich unmittelbar auf die Perfusion übertragen. Stress (z.B. durch den Transport des Tieres) ist ein weiterer Faktor, der die Perfusion bei jedem Tier individuell beeinflusst. Somit sind die absoluten Perfusionswerte stark abhängig von dem aktuellen Zustand des jeweiligen Tieres und kein spezifischer Parameter des Tumors. Da sich die Parameter des Herz-Kreislauf-Systems auf den kompletten Organismus auswirken, können solche Schwankungen herausgerechnet werden. Dazu wird die gemessene Perfusion des Muskelgewebes als Referenzwert genommen und die Tumorperfusion bezüglich dieses Wertes in Prozent angegeben. Der Muskel, welcher intaktes, funktionierendes Gewebe darstellt, hat in jedem gesunden Tier den gleichen Perfusionswert, welcher lediglich vom Zustand des Organismus (Stress oder Narkose) abhängt. Mit der Berechnung von relativen Perfusionswerten ist somit eine verlässlichere, aussagekräftigere Angabe der tumorspezifischen Perfusion unabhängig vom aktuellen Befinden des Wirtstieres möglich.

5.2. Messmethoden und Datenauswertung

Die Perfusion wird, wie oben beschrieben, aus den Spin-Gitter-Relaxationszeiten bei globaler bzw. schichtselektiver Inversion berechnet. Da für die Inversion und Anregung unterschiedliche Pulsformen verwendet werden, war eine Untersuchung der Pulsprofile und deren Einfluss auf die Perfusionsmessung nötig.

Idealerweise regen der schichtselektive Inversionspuls und der Anregungspuls genau

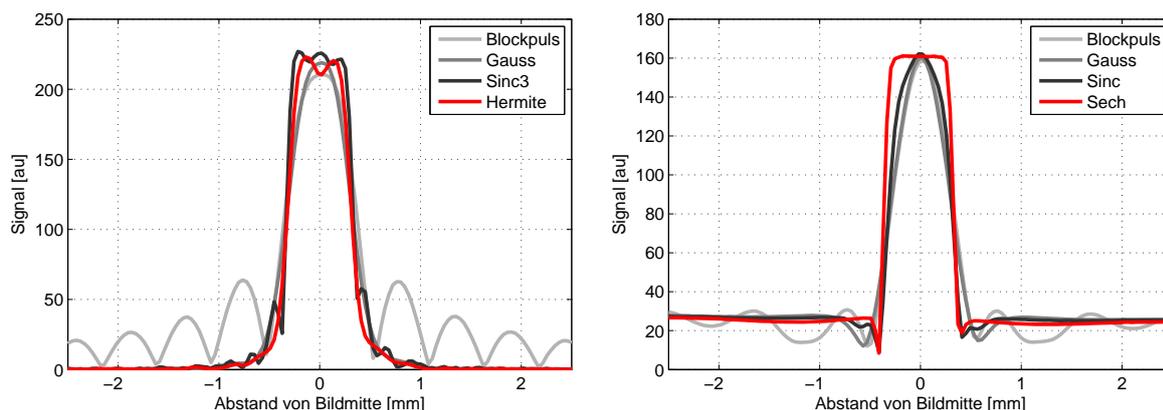


Abbildung 5.3.: Pulsprofile der untersuchten Inversions- und Anregungspulse. Die Profile der für die Messung verwendeten Pulse (der adiabatische Inversionspuls Sech und der Anregungspuls Hermite) sind rot eingefärbt.

die gleiche Schicht in der Probe an. Dies ist im realen Experiment aber nicht gegeben, da Nebenkeulen³ der Pulse Spins außerhalb der Schicht anregen können, was die Relaxationszeitmessung und damit auch die Perfusionmesswerte verfälschen kann. Es muss also die Schichtdicke des selektiven Inversionspulses auf die Schichtdicke des Anregungspulses angepasst werden. Dazu wurden T_1 -Messungen an einem Agar-Phantom bei einer konstanten Anregungsschichtdicke durchgeführt. Die Schichtdicke des Inversionspulses wurde, beginnend bei einer unendlich dicken Schicht (globale Inversion), so weit reduziert, bis durch den Anregungspuls eine breitere Schicht ausgelesen wird als durch den Präparationspuls invertiert wurde. Dies ist in dem Plot der T_1 -Relaxationszeit gegen die Inversionsschichtdicke an dem Abknicken der Spin-Gitter-Relaxationszeitkurve zu erkennen (Abbildung 5.4). Als Inversionsschichtdicke wurde dann der Wert kurz vor dem Abfallen der T_1 -Zeit gewählt. Somit ist gewährleistet, dass ein Unterschied in T_1 zwischen der Messung bei globaler und selektiver Inversion ausschließlich der Perfusion zuzuschreiben ist. Alle am Messsystem zur Verfügung stehenden Inversions- und Anregungspulse wurden hinsichtlich ihres Schichtprofils untersucht. Die besten Ergebnisse mit den steilsten Flanken und den am wenigsten ausgeprägten Nebenkeulen erzielten dabei der adiabatische Inversionspuls Sech und der Anregungspuls Hermite (Abbildung 5.3). Für diese zwei Pulse wurde die optimale Inversionsschichtdicke für eine Anregungsschicht von 1.2mm zu 2.0mm bestimmt (Abbildung 5.4).

Mit den so bestimmten Pulsparametern wurde die Perfusion in einer 1.2mm dicken Schicht durch das Zentrum des Tumors, orthogonal zum Schienbein der Maus gemessen. Die Messmethode erfasst die Perfusion senkrecht durch diese Schicht; die Perfusion innerhalb der Schicht kann mit diesem Verfahren nicht gemessen werden. Die Sequenzparameter der segmentierten T_1 -Messung sind in Tabelle (5.1) aufgeführt. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit wurde für jeden Bildpunkt der globalen und schichtselektiven Messungen nach dem in Kapitel (2.1.8) beschriebenen Verfahren berechnet. T_1 -Werte mit einer schlechten Güte des Fits wurden verworfen. Aus den gewonnenen

³engl.: side lobes

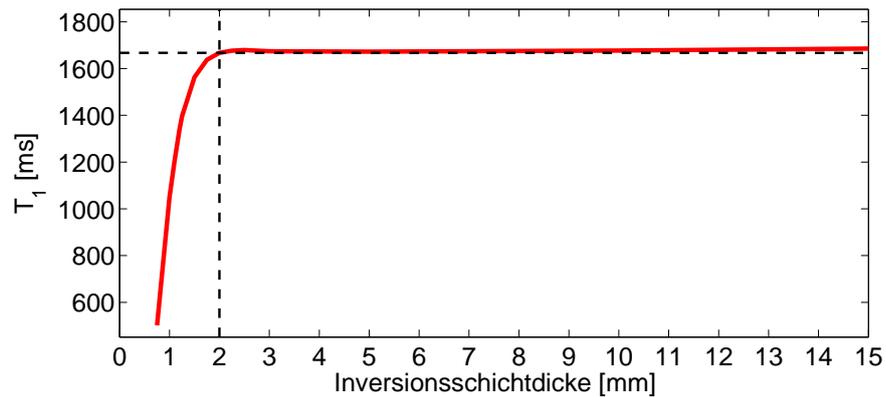


Abbildung 5.4.: Bestimmung der optimalen Inversionsschichtdicke eines Sech Pulses bei einer 1.2mm dicken Anregungsschicht eines Hermite Pulses.

Parameter	Wert
Inversionspuls (Name, Bandbreite, Pulswinkel, Schichtdicke)	Sech, 3500Hz, 180°, 1.2mm
Anregungspuls (Name, Bandbreite, Pulswinkel, Schichtdicke)	Hermite, 3500Hz, 10°, 2.0mm
T_{R1} (1.Anregung - 1.Anregung in aufeinanderfolgenden Bildern)	120ms
T_{R2} (Inversion - Inversion)	6s
T_{R3} (Anregung - Anregung in einem Segment)	5.43ms
T_E	2.75ms
Segmente	5
Bildmatrix	80 × 80
Field of View	16mm × 16mm
Bildaufösung	200µm × 200µm
Schichtdicke	1.2mm
Anzahl Bilder	40
Anzahl Mittelungen	8
Aufnahmedauer	ca. 8min

Tabelle 5.1.: Sequenzparameter der Perfusionsmessung (die Parameter sind in Kapitel (A.3) beschrieben).

T_1 -Karten wurde eine perfusionsgewichtete Karte der gemessenen Probe nach

$$P[a.u.] = \frac{T_{1,glob} - T_{1,sel}}{T_{1,sel}} \quad (5.5)$$

erstellt. Dabei ist $T_{1,sel}$ die Relaxationszeit bei selektiver und $T_{1,glob}$ bei globaler Inversion. Bildpunkte, die in einer der beiden T_1 -Karten verworfen wurden, wurden in der Perfusionskarte auf den Wert null gesetzt. Ebenso wurden negative Perfusionswerte, die durch Messwertschwankungen bei geringer oder keiner Perfusion auftreten können, auf null gesetzt.

Die relative Perfusion, bezogen auf den mittleren Perfusionswert des Muskelgewebes, wurde für die ausgewählten Tumor-ROIs⁴ folgendermaßen berechnet:

$$P_{rel} = \frac{P_{ROI}}{P_{Muskel}} \cdot 100\% \quad (5.6)$$

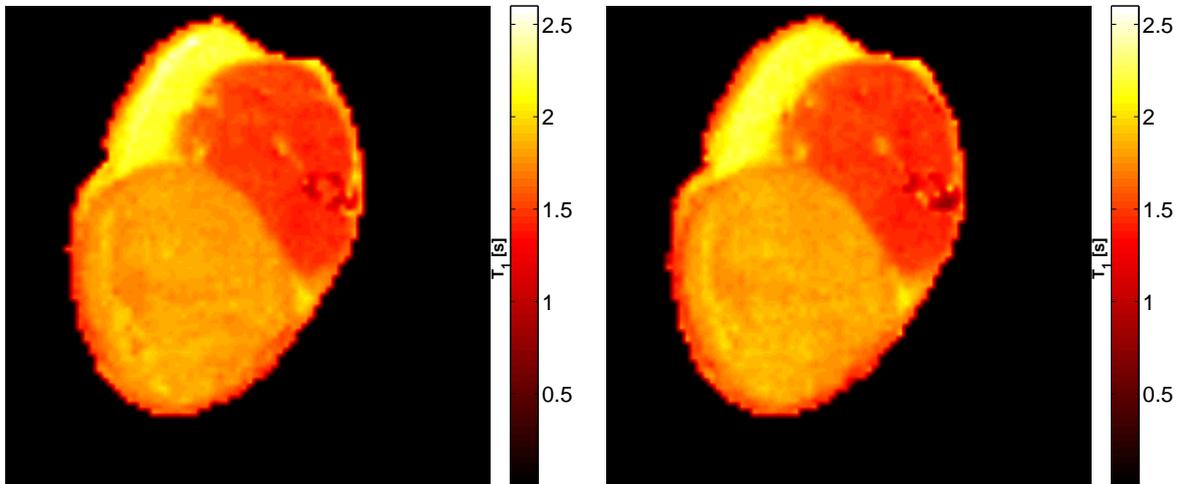
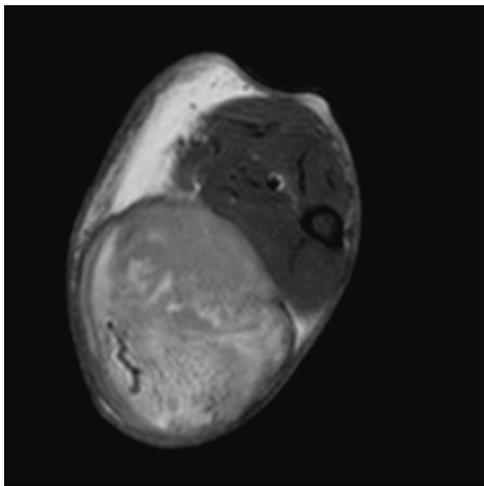
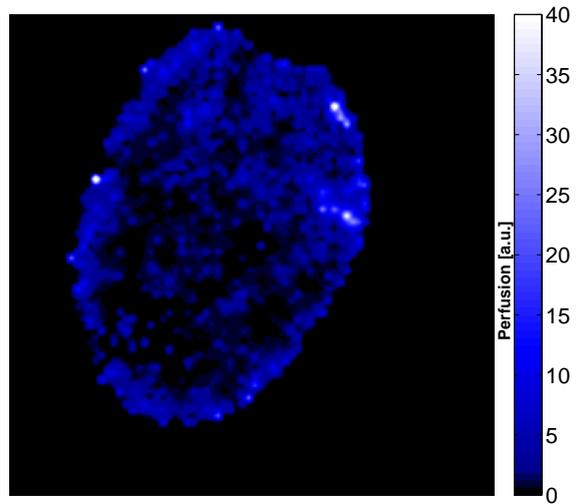
P_{Muskel} entspricht dem Mittelwert der Perfusion in der Muskel-ROI und P_{ROI} der mittleren Perfusion im kompletten Tumor, der Tumorschale bzw. dem Tumorkern. Große blutführende Gefäße mit sehr hohen Perfusionswerten wurden nicht in die ROIs aufgenommen.

5.3. Ergebnisse

Die gemessenen T_1 -Karten bei globaler bzw. schichtselektiver Inversion und die daraus berechnete Perfusionskarte sind für einen Tumor der FaDu-Linie in Abbildung (5.5) dargestellt. Hierbei handelt es sich um den selben Tumor, für den die Ergebnisse der Reoxygenierung in Darstellung (4.7) abgebildet wurden. Die Parameterkarte in Abbildung (5.5d) stellt nicht die Perfusion in [ml/100g/min] dar, sondern einen Wert, der proportional zur Perfusion ist. Größere Blutgefäße sind deutlich an den sehr hohen Perfusionswerten, die hier in den weißen Bereich der Skala übergehen, zu erkennen. Diese Gefäße wurden bei der Berechnung der Mittelwerte über die einzelnen ROIs aussegmentiert. Insgesamt ist der Tumor weniger gut perfundiert als das umliegende Muskelgewebe. Auffallend ist auch, dass im Tumor nur sehr vereinzelt größere Gefäße zu erkennen sind. Diese befinden sich vermehrt in den peripheren Bereichen des Tumors. Dies deutet darauf hin, dass der Tumorkern schlecht mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, was die Ursache von Nekrosenbildung darstellt. Solche Nekrosen treten in großen Tumoren ab ca. 1cm verstärkt im Tumorkern auf.

Im Histogramm (5.6) ist die Häufigkeitsverteilung der nach Gleichung (5.5) berechneten Perfusionswerte, gemittelt über das Muskelgewebe, für alle untersuchten Tiere dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Gewebepfusion erheblichen Schwankungen aufgrund von äußeren Einflüssen unterliegt, welche sich auch auf die Perfusion im Tumor auswirken. Dies bestätigt die Notwendigkeit der hier beschriebenen Normierung

⁴Es wurden dieselben ROIs wie in der BOLD-Messung (Kapitel 4.2.1) verwendet.

(a) T_1 -Karte bei globaler Inversion.(b) T_1 -Karte bei schichtselektiver Inversion.(c) T_2 -gewichtetes, anatomisches Übersichtsbild (RARE).

(d) Perfusionskarte in a.u.

Abbildung 5.5.: Abgebildet sind die T_1 -Karten bei Präparation mit einem globalen (a) bzw. schichtselektiven (b) Inversionspuls. Daraus wurde eine Perfusionskarte (d) nach Gleichung (5.5) berechnet. In Abbildung (d) ist zu erkennen, dass der Tumorkern insgesamt schlechter als das umliegende Gewebe perfundiert ist. Die hellen, weisen Punkte kennzeichnen größere, Blut transportierende Gefäße.

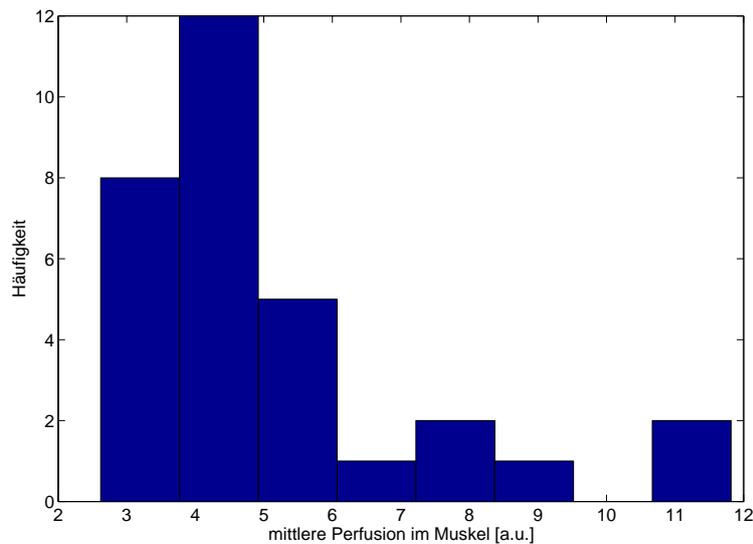


Abbildung 5.6.: Häufigkeitsverteilung der gemessenen Perfusionswerte in den untersuchten Tieren, gemittelt über das Muskelgewebe des jeweiligen Tieres.

der Tumorperfusion auf die Perfusion im Muskel des jeweiligen Tieres nach Gleichung (5.6).

Die mittleren normierten Perfusionswerte und Standardabweichungen der untersuchten Tumorlinien sind in Abbildung (5.7) und Tabelle (5.2) für die betrachteten Tumor-ROIs dargestellt. Die Tumorperfusion aller untersuchten Linien liegt unter dem Wert der mittleren Muskelperfusion, was auch schon in der Literatur beschrieben wurde [32, 121, 122]. Wie die Reoxygenierungsmessung zeigt auch die Perfusion signifikante Unterschiede in den einzelnen Tumorlinien: Der UT-SCC-5 Tumor ist mit einer Perfusion von nur 42% der Muskelperfusion am schlechtesten durchblutet, gefolgt von Tumoren der XF354-Linie mit einem Wert von knapp 60%. Die Linien FaDu, UT-SCC-8 und HSC4 weisen eine mittlere Perfusion im Bereich zwischen 68% und 75% auf. Am besten sind Tumoren der Linie UT-SCC-15 durchblutet. Sie erreichen einen Wert von ca. 93% der Muskelperfusion.

5.4. Diskussion

Eine Messung von Absolutwerten der Perfusion ist wegen der Heterogenität des Gewebe-Blut-Verteilungs-Koeffizienten von Wasser im Tumor nicht exakt möglich. Auch die Schwankungen in der Herz-Kreislauf-Aktivität aufgrund von Stress und der Tiefe der Narkose setzen die Aussagekraft von solchen Absolutwerten beim intertumoralen Vergleich stark herab. Diagramm (5.6) zeigt deutlich, dass die Perfusionswerte im Muskelgewebe, welches bei gleichen Bedingungen bei jedem Tier auch den gleichen mittleren Perfusionswert aufweisen sollte, signifikanten Schwankungen unterliegen, welche sich unmittelbar auf die Tumorperfusion übertragen. Aus diesen Gründen wurden die Perfu-

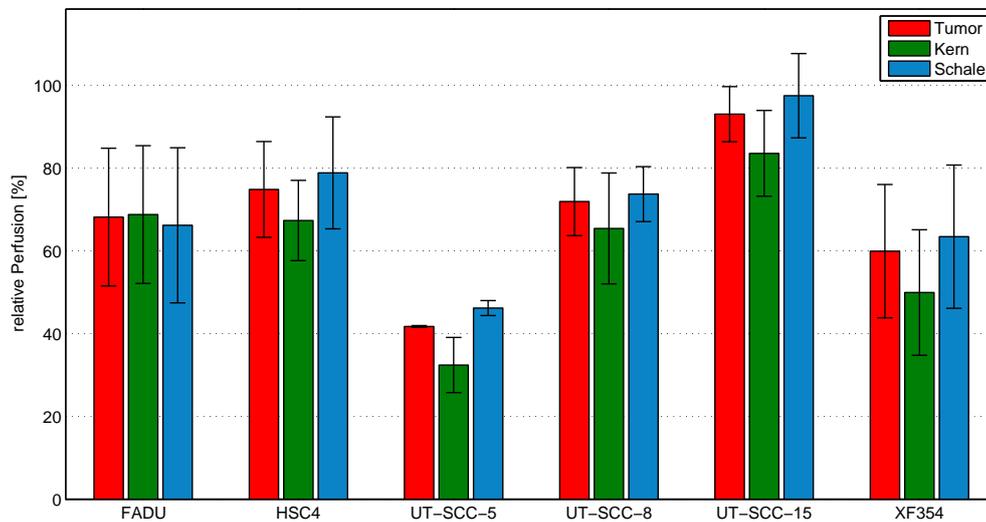


Abbildung 5.7.: Mittlere normierte Perfusion und Standardabweichung der untersuchten Tumorlinien in den einzelnen Tumorregionen.

Tumorlinie	gemessene Tumoren	Tumor komplett	Tumor Kern	Tumor Schale
FaDu	7	68.14 ± 16.64	68.76 ± 16.63	66.16 ± 18.73
HSC4	7	74.82 ± 11.58	67.32 ± 9.70	78.83 ± 13.52
UT-SCC-5	4	41.73 ± 0.21	32.40 ± 6.66	46.17 ± 1.82
UT-SCC-8	5	71.89 ± 8.22	65.40 ± 13.40	73.70 ± 6.64
UT-SCC-15	4	93.01 ± 6.66	83.54 ± 10.37	97.46 ± 10.18
XF354	4	59.91 ± 16.12	49.93 ± 15.16	63.42 ± 17.30

Tabelle 5.2.: Perfusions-Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten Tumorlinien in [%] bezogen auf die Muskelperfusion.

sionswerte der Tumoren in dieser Arbeit als Relativwerte bezüglich des Mittelwertes der Muskelperfusion angegeben. Diese Normierung stellt prinzipiell eine Division von Tumor- und Muskelperfusionswerten, bestimmt nach Belle et. al [118] (Gleichung 5.4) dar. Der T_1 -Wert von Kapillarblut fällt bei dieser Normierung heraus und muss nicht berechnet werden. Dagegen würde der Gewebe-Blut-Verteilungs-Koeffizient (λ) nur herausfallen, wenn er für Muskel- und Tumorgewebe identisch wäre, was nicht der Fall ist. Durch das chaotische Tumorwachstum ist es nicht möglich, einen allgemeingültigen mittleren Wert für λ im Tumor anzugeben. Die größten Abweichungen in λ sind zwischen Muskelgewebe und nekrotischen Tumorgewebe zu erwarten. Allerdings findet in den toten nekrotischen Arealen ohnehin keine Perfusion mehr statt, so dass diese Bereiche nicht von Interesse sind. Das vitale Tumorgewebe weist einen Gewebe-Blut-Verteilungs-Koeffizient ähnlich dem des umliegenden Muskelgewebes auf, aus dem es erwächst. Als Näherung wurde der Quotient $\lambda_{Tumor}/\lambda_{Muskel}$ auf den Wert eins gesetzt. In den dargestellten Ergebnissen kann es somit sein, dass die Perfusionswerte, je nach dem im Tumor vorherrschenden λ , über- bzw. unterschätzt werden. Aus den Standardabweichungen in Abbildung (5.7) ist jedoch ersichtlich, dass die Perfusionswerte einer Linie wenig streuen, was nahe legt, dass die Gewebe-Blut-Verteilungs-Koeffizienten innerhalb einer Linie auch nur wenig streuen. Ein Vergleich der relativen Tumorperfusionswerte mit den Durchblutungswerten aus der Histologie in Kapitel (6) zeigt zudem, dass diese Werte gut miteinander korrelieren, was bedeutet, dass sich die λ -Werte auch intertumoral nicht zu sehr voneinander unterscheiden. Ein globaler Unterschied des Gewebe-Blut-Verteilungs-Koeffizienten zwischen Tumor- und Muskelgewebe ist nicht von Bedeutung, da die relativen Perfusionswerte der einzelnen Tumoren dieselbe konstante Abweichung erhalten würden, die beim Vergleich der Perfusion der einzelnen Tumorlinien herausfällt. Damit konnte bestätigt werden, dass ein Wert von eins für den Quotienten $\lambda_{Tumor}/\lambda_{Muskel}$ aussagekräftige Ergebnisse für die relative Perfusion im Tumor liefert.

Mit der Normierung der Tumorperfusion auf den mittleren Perfusionswert im Muskelgewebe ist es möglich, die Tumorperfusion unabhängig vom aktuellen Zustand des Wirtstieres zu messen. Damit sind verlässlichere und stabilere Aussagen über die Perfusionsunterschiede in Tumoren möglich. Anatomisch weisen Tumoren eine ganze Bandbreite von anormalem Gefäßwachstum wie z.B. verengte Gefäße, Ausstülpungen, in sich verdrehte Gefäße, arterio-venöse Abzweigungen und Plasmakanäle auf. Diese Abnormalitäten sind Gründe für die verminderte Perfusion in Tumoren. Eine im Vergleich zu Muskelgewebe herabgesetzte Perfusion im Tumor, wie sie in allen untersuchten Tumorlinien gemessen wurde, wird in der Literatur durch verschiedene Messverfahren bestätigt [32, 121, 122]. Zudem konnten signifikante Unterschiede in der Perfusion zwischen den einzelnen Tumorlinien detektiert werden, die von 41.7% bis 93.0% der Muskelperfusion reichen. Diese mit der NMR nichtinvasiv erfassten Perfusionswerte werden in Kapitel (6) mit den Daten aus der Histologie verglichen.

6. Vergleich der NMR-Messdaten mit der histologischen Auswertung

Das Ziel des gemeinsamen Tumorprojektes mit der Technischen Universität Dresden, der Universität Mainz und der Technischen Universität München [3] war es, die Parameter des Tumormikromilieus verschiedener standardisierter Xenograft-Tumorlinien zu erfassen und untereinander zu vergleichen. Damit sollte der Zusammenhang der einzelnen Parameter untereinander und insgesamt das Mikromilieu des Tumors besser verstanden werden. Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Parameter des Mikromilieus auf die Strahlenempfindlichkeit des Tumors.

Ein konkretes Ziel dieser Arbeit war es, Parameter des Mikromilieus solider Tumoren nichtinvasiv mit Methoden der NMR zu erfassen, und mit den Daten aus der Histologie, die an den gleichen Tumorlinien erhoben wurden, zu vergleichen. Als interessante und vor allem auch direkt beeinflussbare Parameter des Mikromilieus eines Tumors wurden die Perfusion und Reoxygenierung mit Methoden der Magnetresonanztomographie untersucht. An den gleichen Tumoren wurde zudem die Laktatverteilung im Tumor über die spektroskopische Bildgebung mit der NMR bestimmt [46]. Diese Parameter wurden mit der Hypoxie (pHF), der perfundierten relativen Gefäßfläche (PVA) und der Tumor-Kontroll-Dosis (TCD₅₀) verglichen, die an der TU-Dresden histologisch und über Dosis-Wirkungs-Messungen bestimmt wurden.

6.1. Pimonidazol als histologischer Hypoxiemarker

Histologisch wurde die Hypoxie über den Marker Pimonidazol bestimmt. Dieser Marker bindet bei Sauerstoffpartialdrücken unter 10mmHg irreversibel an Membranproteine der Zellen ohne diese dabei zu zerstören [43]. Das Messprotokoll zur histologischen Bestimmung der Hypoxie ist in [44, 123] genauer beschrieben und soll hier nur kurz zusammengefasst werden: Der Marker wurde der Maus i.p.¹ (0.1mg/g Körpergewicht der Maus, verdünnt in 10mg/ml isotonischer Kochsalzlösung) verabreicht. Daraufhin wurden, nach Tötung, Gefrierschnitte durch das Zentrum des Tumors mit einer Dicke von 10µm angefertigt. Die Schnitte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, in kaltem Aceton für 10min fixiert und dann in PBS² rehydriert. Bei 4°C wurden die fixierten

¹lat.: intraperitoneal = in die Bauchhöhle.

²engl.: phosphate buffered saline = isotonische Pufferlösung.

Tumorlinie	pHF [%]	RVA [%]	PF [%]	TCD ₅₀ [Gy]
CAL33	29.30	1.90	85.90	105.20
FaDu	11.70	3.40	76.50	85.20
HSC4	20.20	1.70	84.50	82.90
UT-SCC-5	35.20	1.60	64.20	117.20
UT-SCC-8	14.20	3.60	68.40	52.10
UT-SCC-15	23.60	2.60	88.20	78.10
UT-SCC-45	18.10	1.70	75.10	45.40
XF354	19.40	2.90	52.00	47.40

Tabelle 6.1.: Histologisch bestimmte Parameter der untersuchten Tumorlinien [44, 45]. pHF = Pimonidazol hypoxische Fraktion pro vitale Tumorfläche, RVA = relative Gefäßfläche pro vitale Tumorfläche, PF = relative perfundierte Gefäßfläche pro Gefäßfläche, TCD₅₀ = Tumor-Kontroll-Dosis von 50% der Tumoren.

Schnitte über Nacht in einem polyklonalen Antikörper gegen Pimonidazol inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte im zweiten Antikörper (FITC-conjugated AffiniPure goatanti-rabbit-IgG absorbed against mouse serum proteins, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 1:150 verdünnt in 10% BSA³ für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden erneut gewaschen und anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop abfotografiert. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC leuchtet dabei in hypoxischen Arealen grün auf. Nach der Aufnahme wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung) um vitales von nekrotischem Gewebe unterscheiden zu können.

Ein Zahlenwert, der den Grad der Hypoxie eines Tumors angibt, ist die Pimonidazol hypoxische Fraktion (pHF). Die pHF ist die Größe der grün eingefärbten Fläche pro Gesamtfläche von vitalem Tumorgewebe; nekrotische Areale werden nicht mit einbezogen. Für die untersuchten Tumorlinien sind die Mittelwerte der gemessenen pHF in Tabelle (6.1) zusammengefasst.

6.2. Histologische Perfusionsmessung

Die Perfusion lässt sich histologisch mit Hilfe des Markers Hoechst 33342, einem DNA-Marker, erfassen. Dazu wird dem Wirtstier ca. eine Minute vor zervikaler Dislokation die Substanz i.v. injiziert. Durch das Blutgefäßsystem verteilt sich der Marker im Körper und diffundiert durch die Gefäßwände in die Zellen des angrenzenden Gewebes. Der Diffusionsradius ist damit abhängig von der Inkubationszeit des Markers (von Injektion bis Tod). Durch eine immunhistologische Färbung von Hoechst 33342 lassen

³engl.: bovine serum albumin = Rinderserumalbumin.

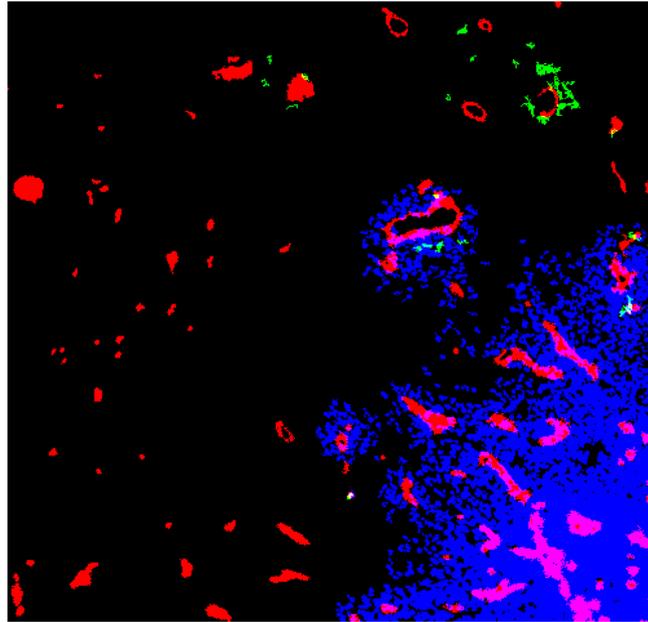


Abbildung 6.1.: Vergrößerter Ausschnitt der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines mit Pimonidazol (grün), Hoechst 33342 (blau) und CD31 (rot) markierten FaDu-Tumors. Blutgefäße in der linken und oberen Hälfte sind nicht perfundiert (keine blaue Einfärbung um die Gefäße).

sich bluttransportierende von verschlossenen Gefäßen unterscheiden. Die Blutgefäße selbst, ob aktiv oder nicht, werden durch Inkubation des Gefrierschnittes mit dem Marker CD31 rot eingefärbt. Dieser Marker bindet an die vaskulären Endothelzellen⁴ der Blutgefäße. Eine genauere Beschreibung des Messprotokolls ist in [123] zu finden.

Abbildung (6.1) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der binären fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines mit Pimonidazol (grün), Hoechst 33342 (blau) und CD31 (rot) markierten FaDu-Tumors. Bei der binären Darstellung werden Pixel angezeigt, deren Intensität einen bestimmten Schwellwert im fluoreszenzmikroskopischen Bild überschreiten. Werte unter dieser individuell festgelegten Schwelle werden nicht dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind Blutgefäße (rot) in der linken und oberen Hälfte der Abbildung nicht perfundiert (keine blaue Einfärbung um die Gefäße). Als Zahlenwert für die Perfusion wird nicht wie beim Hypoxiemarker Pimonidazol die gefärbte Fläche pro vitalem Tumorgesamtfläche angegeben. Denn aufgrund der sehr schwer konstant zu haltenden Inkubationszeit ist dieser Parameter zu ungenau. Als Messwert wird der relative Flächenanteil von Gefäßen pro Gesamtfläche an vitalem Tumorgewebe (RVA⁵) und der Quotient von perfundierter Gefäßfläche zur Gesamtfläche der Gefäße (PF⁶) in Prozent angegeben. Das Produkt aus RVA und PF ergibt einen Messwert, der proportional zur Perfusion ist (PVA⁷). Die Mittelwerte dieser Parameter sind in Tabelle (6.1) für die untersuchten Tumorklinien zusammengestellt.

⁴Zellen an der Innenseite von Blutgefäßen.

⁵engl.: relative vessel area

⁶engl.: perfused fraction

⁷engl.: perfused vessel area

6.3. Bestimmung der Tumor-Kontroll-Dosis TCD₅₀

Wächst ein Tumor innerhalb eines Beobachtungszeitraums (meist 120 oder 180 Tage) nach erfolgter Strahlentherapie nicht weiter, so gilt er als lokal kontrolliert. Die Strahlendosis, die notwendig ist, um 50% der Tumoren einer Line lokal zu kontrollieren, wird TCD₅₀ genannt und in Gray angegeben. Die TCD₅₀-Bestrahlungsdosis hängt dabei stark von der Bestrahlungsform (z.B. fraktionierte oder einmalige Bestrahlung) ab [44, 45]; daher wird diese bei TCD₅₀-Werten immer mit angegeben.

Das Messprotokoll zur Bestimmung der Tumor-Kontroll-Dosis ist in [44] genauer beschrieben und wird hier wieder nur kurz zusammengefasst: Das tumortragende Bein wurde lokal mit 200kV Röntgenstrahlung (0.5mm Cu, 1Gy/min) bestrahlt. Die fraktionierte Bestrahlung erfolgte in jeweils 30 Sitzungen über einen Zeitraum von sechs Wochen. Dabei wurden insgesamt 6-8 (je nach Resistenz der Tumorlinie) Gesamtdosen von 30, 40, 50, 60, 72.5, 85, 100, 130 und 160Gy während der sechs Wochen verabreicht. Es wurden zwölf Tiere pro Dosisgruppe und Tumorlinie untersucht. Die Tumorgröße wurde nach der sechswöchigen Bestrahlung 120 Tage lang beobachtet. Direkt nach der Strahlentherapie nimmt das Tumolvolumen ab. Wenn während des Beobachtungszeitraums die Tumolvolumenkurve nach dieser Senke an drei aufeinanderfolgenden Messtagen anstieg, galt der Tumor als nicht kontrolliert. Die Anzahl kontrollierter Tumoren (in %) gegen die Gesamtdosis wurde für jede Tumorlinie an ein Dosis-Wirkungs-Modell angefitet und daraus die TCD₅₀ berechnet [45]. Die Ergebnisse sind in Tabelle (6.1) dargestellt.

6.4. Vergleich der NMR-Messung mit histologischen Daten

Die mit der NMR und Histologie erfassten Daten wurden auf zwei Arten miteinander verglichen. Zum Einen wurden die Intensitätsverteilungen der Messwerte in den Parameterkarten räumlich miteinander korreliert. Zum Anderen wurden die Mittelwerte zweier Parameter für die untersuchten Tumorlinien in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen und deren Korrelation berechnet.

Einige Tumoren wurden mit den Methoden der NMR und der Histologie untersucht. Damit ist es möglich, die Parameterkarten der Reoxygenierung, Perfusion und Laktatverteilung untereinander und mit den histologischen Daten pHF, Perfusion und Gefäßdichte räumlich zu korrelieren. Dazu wurden die Karten über ein morphologisches Übersichtsbild (RARE-Aufnahme) des tumortragenden Mäusebeines gelegt. Da die NMR-Karten eine geringere Auflösung als die histologischen Parameterkarten haben, wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) die Karten auf die Größe des Tumors skaliert. Bei der Anfertigung der histologischen Schnitte wurde darauf geachtet, dass die Schicht aus der gleichen Ebene wie die NMR-Messschicht stammt (senkrecht zum Schienbein durch das Zentrum des Tumors). Die räumliche Korrelation der Parameter diente zur Validierung der *in vivo* NMR-Messmethoden. Damit konnte überprüft werden, ob die

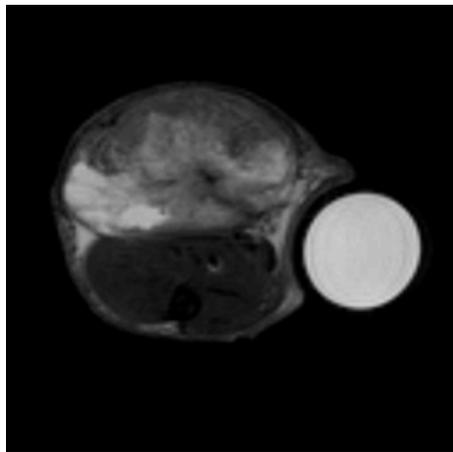
NMR-Messung die gleichen Aussagen in denselben Tumorregionen treffen kann, wie die Histologie und ob sie in direkten Zusammenhang miteinander stehen. Diese Korrelation ist für den Parameter TCD_{50} , der keine räumlichen Informationen enthält, sondern einen globalen Parameter des kompletten Tumors darstellt, nicht möglich.

Eine räumliche Korrelation der Parameterkarten kann zwar validieren, dass die nichtinvasiven NMR-Messmethoden die gleichen Aussagen wie die Histologie treffen kann, allerdings kann damit kein Wert angegeben werden, der beschreibt, wie gut die Parameter miteinander korrelieren und ob diese Korrelation evtl. nur zufällig ist. Auch sind charakteristische Unterschiede eines Parameters zwischen den untersuchten Tumorlinien alleine aufgrund der Parameterkarten nur schwer erkennbar. Deshalb wurden die Mittelwerte der Parameter für jede Tumorlinie berechnet. Betrachtet wurde dabei immer der komplette Tumor. Diese Mittelwerte wurden für zwei Parameter, deren Korrelation untersucht werden sollte, für die einzelnen Tumorlinien in einem Streudiagramm aufgetragen und der Korrelationskoeffizient (R , Pearson Korrelation) und die Signifikanz (p , zweiseitiger Signifikanztest) berechnet.

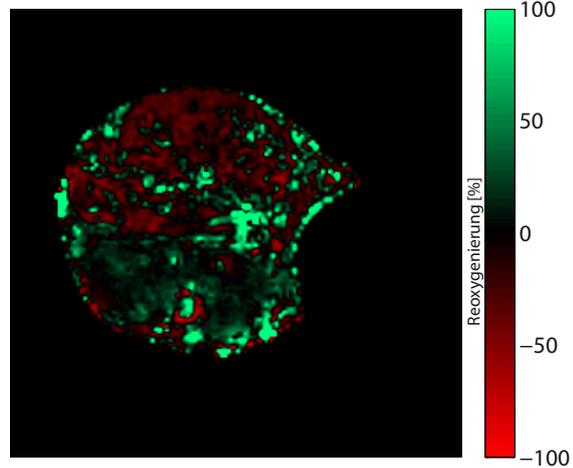
6.5. Ergebnisse

In den Abbildungen (6.2) und (6.3) sind die gemessenen Parameterkarten für einen Tumor der Linie UT-SCC-15 bzw. XF354 dargestellt. Zur Erleichterung der Orientierung sind die Histologie-Karten einer hoch aufgelösten morphologischen NMR-Übersichtsaufnahme überlagert. Der hellere Tumor in der oberen Hälfte des Übersichtsbildes hebt sich deutlich von dem etwas dunkleren Muskelgewebe ab. Die sehr hellen Strukturen innerhalb des Tumors weisen auf einen erhöhten Wassergehalt hin, was auf nekrotisches oder zystisches Gewebe in diesen Arealen zurückzuführen ist. Der Vergleich der histologischen und NMR-Parameterkarten zeigt eine gute räumliche Korrelation. Hohe Perfusionswerte wurden sowohl mit dem histologischen Messverfahren (blau in Abbildung 6.2c und 6.3c) als auch mit der NMR (Abbildung 6.2d und 6.3d) fast ausschließlich in den Randbereichen des Tumors gemessen. Hypoxische Areale, die im Histologiebild grün eingefärbt sind (Abbildung 6.2c und 6.3c), korrespondieren mit den Tumorbereichen, die von einem Atemgaswechsel zu Carbogen profitierten (grün in den Reoxygenierungsbildern, Abbildung 6.2b und 6.3b) und dadurch besser mit Sauerstoff versorgt werden. Auf dem histologischen Bild ist zu erkennen, dass in dem Bereich, in dem die hellen Areale im Tumor auf dem RARE-Übersichtsbild auftreten, keine Marker detektiert wurden. Dies bestätigt, dass es sich hierbei um nekrotisches bzw. zystisches Tumorgewebe handelt, das keine perfundierten Gefäße mehr besitzt.

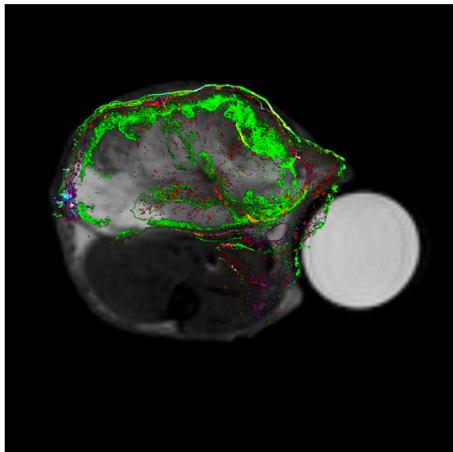
Abbildung (6.4) zeigt die Streudiagramme jeweils zweier miteinander korrelierter Parameter. Die Namen der Tumorlinien sind in blauer Schrift neben den Datenpunkten angegeben. Die Regressionsgerade ist als rote Linie eingezeichnet. Oben links in den Diagrammen sind der Wert der Pearson-Korrelation und die Signifikanz angegeben. Die dargestellten Daten aus den NMR-Messungen und der Histologie stammen von unterschiedlichen Tumoren, aber aus jeweils der gleichen Tumorlinie. D.h. die Daten wurden nicht immer an denselben Tieren erhoben.



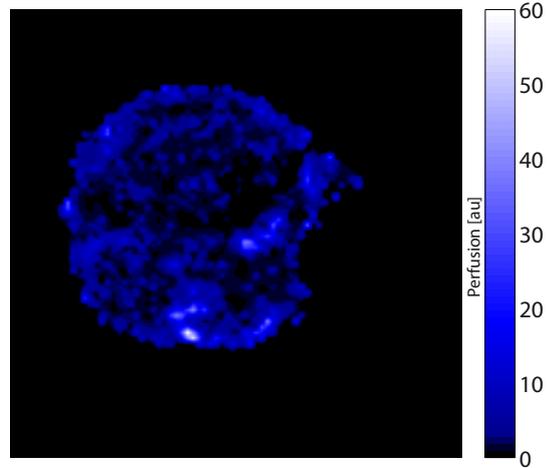
(a) RARE-Übersichtsbild der Tumormorphologie.



(b) Reoxygenierungskarte des Tumors und Muskelgewebes.

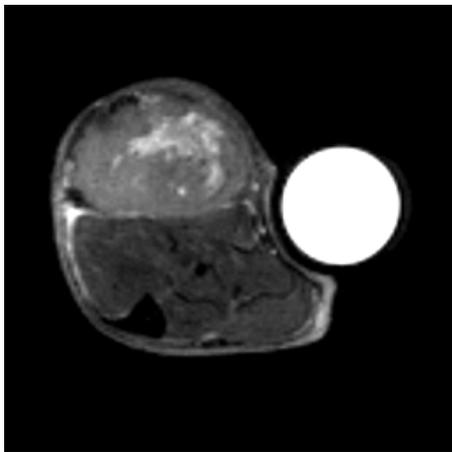


(c) Der RARE-Aufnahme überlagertes Binärbild der Histologiemarker-Verteilung.

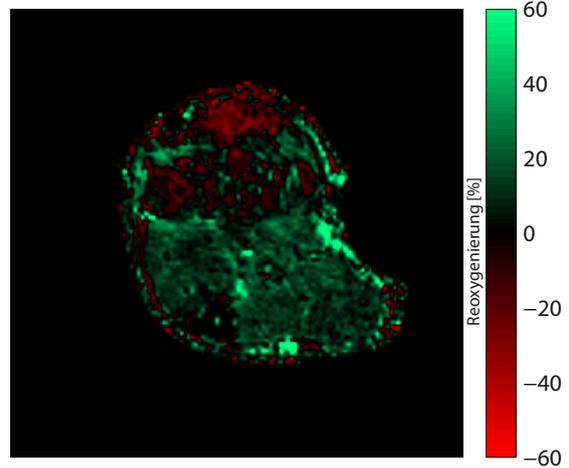


(d) Perfusionskarte des Tumors und Muskelgewebes.

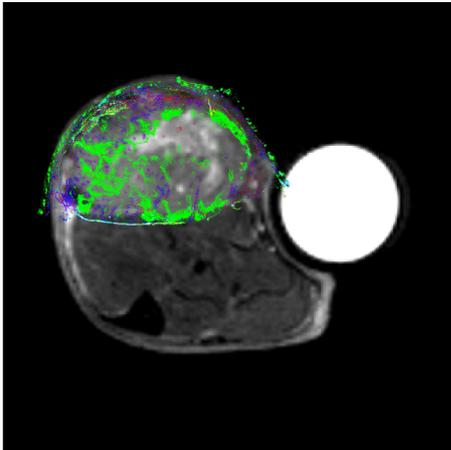
Abbildung 6.2.: Parameterkarten eines Tumors der Linie UT-SCC-15. (a) RARE-Übersichtsbild des Tumors und Unterschenkels der Maus. (b) Mit NMR gemessene Reoxygenierung und darunter die Perfusion (d). (c) Ergebnisse der histologischen Untersuchung (grün = Hypoxie, rot = Gefäße, blau = Perfusion).



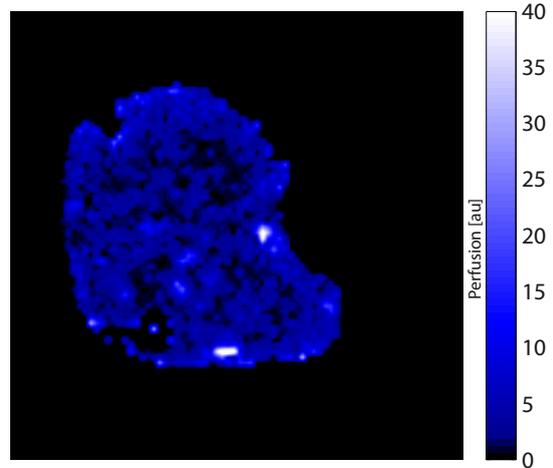
(a) RARE-Übersichtsbild der Tumormorphologie.



(b) Reoxygenierungskarte des Tumors und Muskelgewebes.



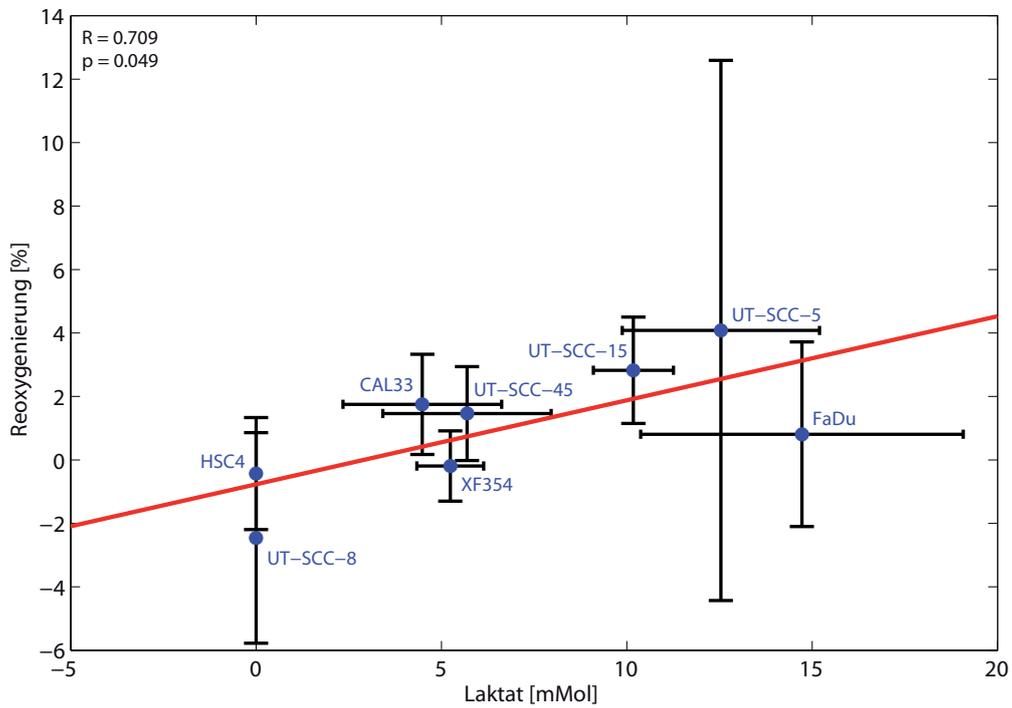
(c) Der RARE-Aufnahme überlagertes Binärbild der Histologiemarker-Verteilung.



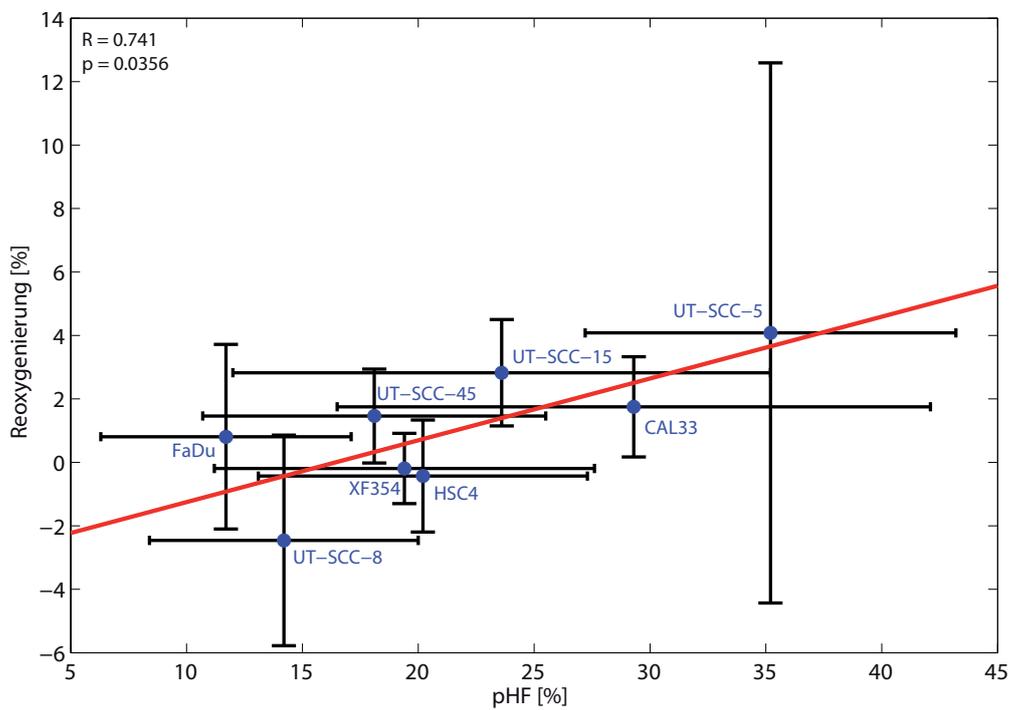
(d) Perfusionskarte des Tumors und Muskelgewebes.

Abbildung 6.3.: Parameterkarten eines Tumors der Linie XF354. (a) RARE-Übersichtsbild des Tumors und Unterschenkels der Maus. (b) Mit NMR gemessene Reoxygenierung und darunter die Perfusion (d). (c) Ergebnisse der histologischen Untersuchung (grün = Hypoxie, rot = Gefäße, blau = Perfusion).

6. Vergleich der NMR-Messdaten mit der histologischen Auswertung

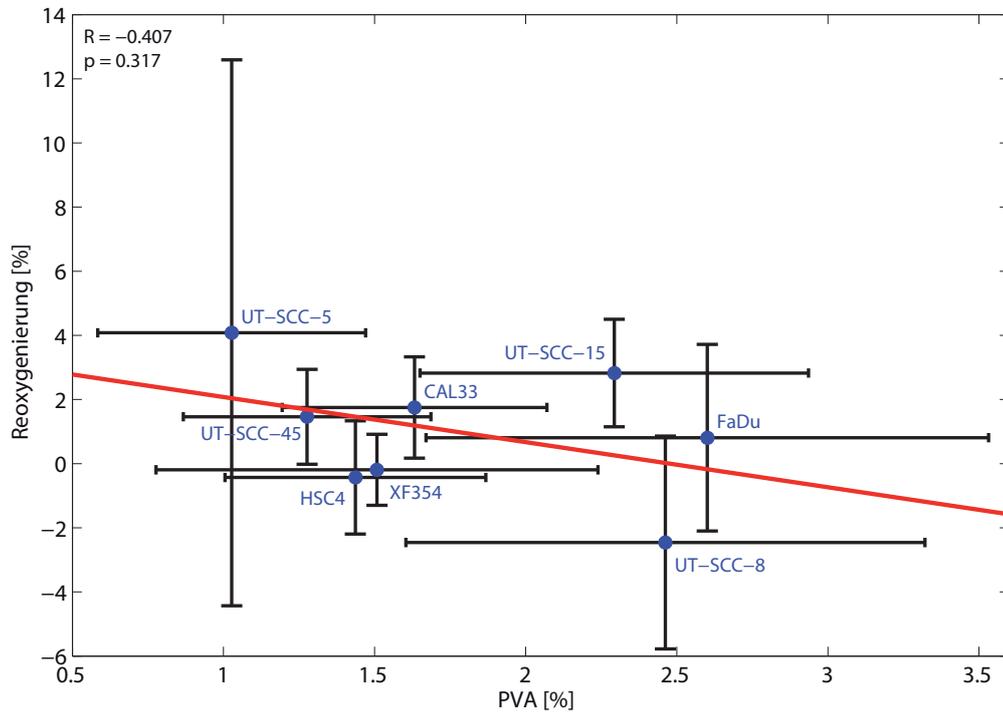


(a) Laktatkonzentration - Reoxygenierung

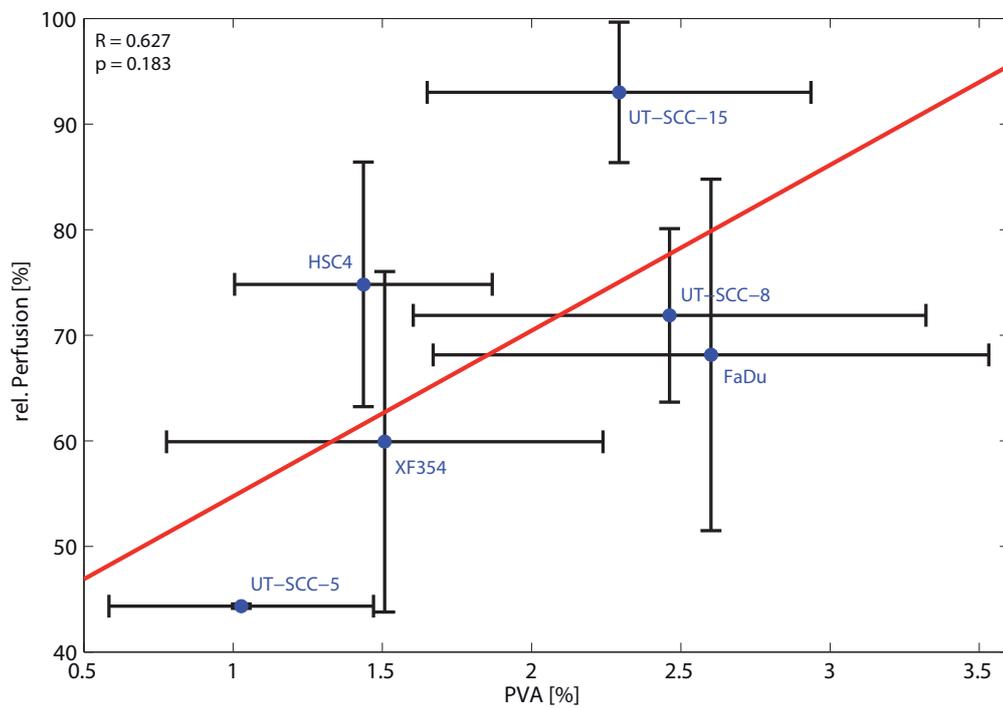


(b) Pimonidazol hypoxische Fraktion - Reoxygenierung

Abbildung 6.4.

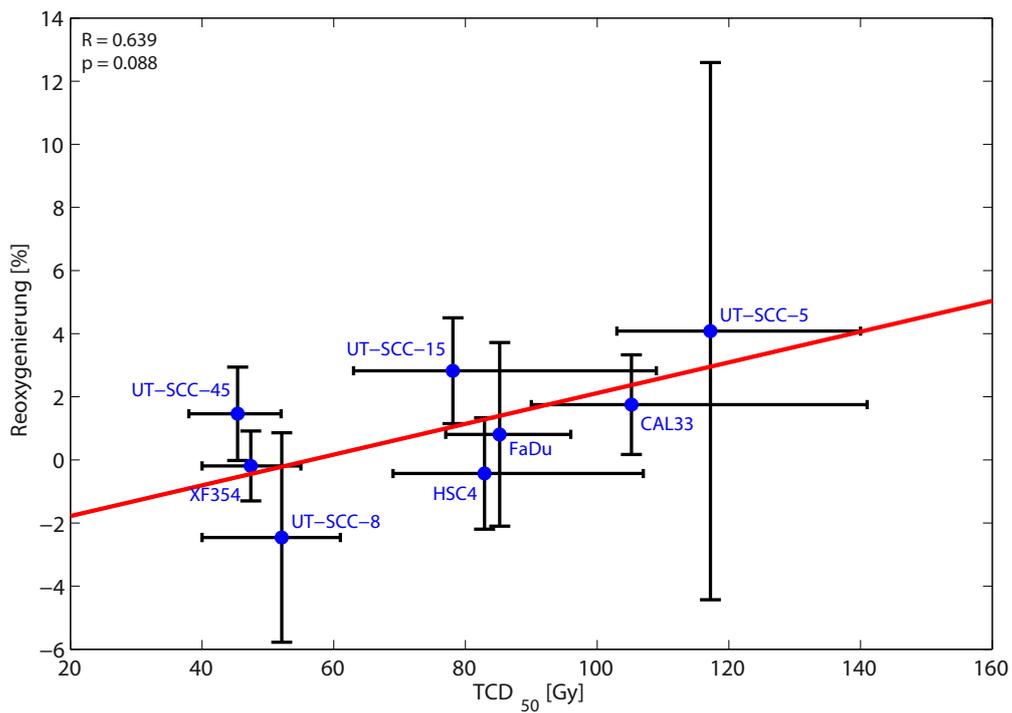


(c) PVA - Reoxygenierung



(d) PVA - relative Perfusion

Abbildung 6.4.



(e) TCD₅₀ - Reoxygenierung

Abbildung 6.4.: Korrelationen der untersuchten Parameter. Die Pearson Korrelation (R) und die Signifikanz (p) sind oben links in den Diagrammen angegeben. Die Regressionsgerade ist als rote Linie dargestellt. Die Namen der Tumorlinien sind in blauer Schrift neben den Datenpunkten angegeben.

Aus Diagramm 6.4a ist zu erkennen, dass die Tumorlinien eine starke Korrelation ($R=0.71$, $p=0.049$) zwischen der Laktatkonzentration und dem Reoxygenierungsvermögen aufweisen. Laktat entsteht bei der anaeroben Glycolyse, wie sie in hypoxischem Gewebe auftritt, aber auch unabhängig von der Sauerstoffkonzentration durch den gestörten Metabolismus in Tumorzellen (Warburg Effekt [35]). Diagramm 6.4b zeigt eine hohe Korrelation mit deutlicher Signifikanz zwischen der Reoxygenierung und der histologisch bestimmten Pimonidazol hypoxischen Fraktion ($R=0.74$, $p=0.036$). Eine relativ gute Übereinstimmung besteht zwischen der mit NMR bestimmten Perfusion und der mit der Histologie ermittelten perfundierten Gefäßfläche ($R=0.63$, $p=0.183$, Abbildung 6.4d). Aufgrund der niedrigen Anzahl der Datenpunkte ist die Signifikanz nicht ganz so hoch wie bei den anderen Korrelationen. Interessanterweise konnte keine Korrelation zwischen Perfusion und Reoxygenierung festgestellt werden ($R=-0.41$, $p=0.317$, Abbildung 6.4c). Die Pearson Korrelation zwischen der Reoxygenierung und der TC_{50} liegt bei 0.64 ($p=0.088$, Abbildung 6.4e).

6.6. Diskussion

Es ist weitestgehend anerkannt, dass der zum Teil nur mäßige Erfolg von Maßnahmen gegen die Tumorhypoxie auf die Heterogenität in der Patientenauswahl und das Fehlen von effizienten Prädiktoren für die Patientenauswahl zurückzuführen ist. Daher besteht ein großes Interesse daran, radiobiologisch relevante Parameter nichtinvasiv messen zu können. In dieser Arbeit wurden die Reoxygenierung und Perfusion mit Methoden der NMR nichtinvasiv erfasst und mit den Daten aus der Histologie von Tumoren der gleichen Linien verglichen.

Die räumliche Überlagerung der Parameterkarten konnte bestätigen, dass die nichtinvasiven Messmethoden der NMR die gleichen Aussagen treffen können wie die Histologie. Trotz der unterschiedlichen Auflösung und Messschichtdicken (Histologie: $10\mu\text{m}$; NMR: $0.6 - 1.2\text{mm}$) der Messverfahren ist eine gute Übereinstimmung der Parameterkarten zu erkennen.

Erhöhte Perfusionswerte traten hauptsächlich in den Randbereichen der Tumoren auf. Dort waren durch den Marker Hoechst auch die meisten perfundierten Gefäße in der Histologie vorzufinden. In dem Randbereich profitiert der Tumor von der geordneten Vaskularisation des gesunden umliegenden Muskelgewebes, welches den Tumor mit versorgt. Durch die erhöhte Angiogenese im Tumor [124] können von dem intakten vaskulären Netzwerk Gefäße in den Tumor abgezweigt werden. Nekrotische Areale traten hauptsächlich im Zentrum des Tumors und in der dem Muskelgewebe abgewandten Tumorseite auf. Dort ist der Tumor durch die chaotische Vaskularisation unzureichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, und das Gewebe stirbt ab. Die gute Korrelation der NMR-Perfusionsmessung mit der histologisch bestimmten perfundierten Gefäßfläche (Abbildung 6.4d) bestätigt, dass sich die hier vorgestellte Methode der Normierung auf die Muskelperfusion als Parameter zur Messung der Tumorperfusion sehr gut eignet. Durch die Normierung wird der Parameter unabhängig von äußeren Einflüssen die die Physiologie verändern können und liefert Messwerte, die ausschließlich auf die

Eigenschaften des untersuchten Tumors zurückzuführen sind. Wie in der Literatur beschrieben [32, 121, 122], liegen die gemessenen Perfusionswerte aller Tumoren unter dem von Muskelgewebe. Aus den histologischen Untersuchungen liegen keine Daten über die Muskelperfusion vor, die mit den NMR-Werten verglichen werden können. Interessanterweise lässt sich keine Korrelation zwischen der histologisch oder mit der NMR bestimmten Perfusion und der Reoxygenierung feststellen. Auch die TCD_{50} korreliert nicht mit der Perfusion. Es wäre zu erwarten, dass Tumoren, die gut perfundiert sind auch besser reoxygeniert werden können, da der Sauerstoff leichter in die hypoxischen Bereiche transportiert werden kann. Andererseits sind Tumoren, die gut durchblutet sind, kaum hypoxisch und reagieren somit bei gleicher Metabolisierungsrate auch nur wenig auf den Atemgaswechsel.

Pimonidazol bindet vornehmlich an Zellen mit chronischer Hypoxie und nur in Randbereichen von chronischer Hypoxie auch an Zellen mit akuter Hypoxie [125]. Der BOLD-Effekt misst die Reoxygenierung jedoch unabhängig von der Art der Hypoxie. Dennoch ist eine gute räumliche Korrelation zwischen den mit Pimonidazol hypoxisch markierten Tumorbereichen und der Reoxygenierungskarte zu erkennen (Abbildung 6.2 und 6.3). Hohe Reoxygenierungswerte wurden hauptsächlich in Pimonidazol positiven Bereichen gemessen. D.h. ein Atemgaswechsel auf Carbogen kann den Sauerstoffpartialdruck in hypoxischem Gewebe erhöhen und damit die Strahlenresistenz des Tumors senken. Dies ist auch in der Korrelation zwischen der pHF und der Reoxygenierung (Abbildung 6.4b) ersichtlich: Tumoren mit einem hohen hypoxischen Gewebeanteil können besser durch Beatmung mit Carbogen reoxygeniert werden, als Tumoren, die relativ gut mit Sauerstoff versorgt werden (siehe Kapitel 4.2.3). Insgesamt ist die Reoxygenierungsantwort über den Tumor sehr heterogen verteilt, was auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden konnte [43, 87, 88]. In den Reoxygenierungskarten sind ausgeprägte Tumorbereiche zu erkennen, die einen negativen Reoxygenierungswert aufweisen. Es kann vorkommen, dass einzelne Tumoreale von einem Atemgaswechsel profitieren, benachbarte Bereiche aber gleichzeitig schlechter mit Sauerstoff versorgt werden. So ist z.B. in Abbildung (6.3) zu erkennen, dass der hypoxisch markierte Bereich unten links im Tumor (Abbildung 6.3c) durch den Gaswechsel zu Carbogen noch schlechter mit O_2 versorgt wird (Abbildung 6.3b). Damit stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der Strahlensensitivität in den Bereichen mit positiver Reoxygenierung die Erhöhung der Strahlenresistenz in Bereichen mit negativer Reoxygenierung aufhebt. Zu beachten ist, dass der Parameter Reoxygenierung nur Differenzen des Sauerstoffpartialdrucks anzeigt. Es ist also möglich, dass Tumorgewebe, das positiv auf die Erhöhung des Sauerstoffgehaltes in der Atemluft reagiert, immer noch unterhalb des strahlenbiologisch kritischen Schwellenwertes von 10mmHg liegt. Die Korrelation der Reoxygenierung mit der TCD_{50} (Abbildung 6.4e) bestätigt jedoch, dass Tumoren, die eine erhöhte Strahlenresistenz aufweisen, auch gut reoxygeniert werden können. Dies legt den Schluss nahe, dass die radiobiologische Sensitivität strahlenresistenter Tumoren durch einen Atemgaswechsel erhöht wird. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass Tumoren, die insgesamt eine deutlich positive Reoxygenierung zeigen, auch eine erhöhte Strahlensensitivität aufweisen. Denn der Sauerstoffgehalt im Tumor, welcher eine wichtige Rolle in der biologischen Wirkung der ionisierenden Strahlung spielt (siehe Kapitel 2.2.2), wird angehoben.

Eine gute Korrelation ließ sich zwischen den Parametern Laktatkonzentration und Reoxygenierung, die an denselben Tieren gemessen wurden, feststellen (Abbildung 6.4a). Laktat entsteht u.a. bei der anaeroben Glycolyse, die in hypoxischen Tumoren auftritt. Die verwendete Messmethode zur Bestimmung der Laktatkonzentration misst nur das freie Laktat. Über den Anteil an gebundenem Laktat kann sie keine Aussagen treffen [46]. Der hier gefundene Zusammenhang bestätigt, dass das freie Laktat mit der Reoxygenierbarkeit der Tumoren skaliert. D.h. ein hypoxischer Tumor, der mehr freies Laktat produziert, wird durch Beatmung mit Carbogen besser mit Sauerstoff versorgt.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes festhalten: Die Perfusionsmessung mit der hier vorgestellten Normierung stellt einen robusten Parameter zur Erfassung der Tumorphusion unabhängig von äußeren, die Physiologie beeinflussenden Störfaktoren dar. Damit sind die Perfusionswerte nur noch abhängig von der Morphologie und Physiologie des untersuchten Tumors. Die Reoxygenierung stellt einen prädikativen Parameter zur nichtinvasiven *in vivo* Abschätzung der Strahlensensitivität von Tumoren dar. Weiterhin kann individuell untersucht werden, ob der zu behandelnde Tumor durch Beatmung des Patienten mit Carbogen-Gas besser oxygeniert wird und somit weniger strahlenresistent ist. Dies muss in weiteren Studien bei Bestrahlung unter Carbogenatmung untersucht werden. Zudem müssen die hier vorgestellten Messverfahren auf klinische Tomographen übertragen werden, was durch die höheren Sicherheitsrichtlinien und den damit verbundenen Einschränkungen in der applizierbaren HF-Sendeleistung pro Zeiteinheit (SAR-Limitierung⁸) eine Herausforderung an die Portierung stellt. Die Methoden müssen für diese Geräte optimiert werden, um die durch die niedrigere Feldstärke der klinischen Geräte (meist 1.5 oder 3T) bedingte höhere Messzeit und geringere Auflösung auf einem dem Patienten zumutbaren und dennoch brauchbaren Niveau zu halten. Insgesamt stellen diese Parameter eine vielversprechende Möglichkeit zur nichtinvasiven Untersuchung des Tumormikromilieus und damit verbunden einer individuellen Abstimmung der Strahlentherapie auf den Patienten vor der Behandlung dar.

⁸SAR (spezifische Absorptionsrate): Ein Maß für die Absorption von elektromagnetischen Feldern in biologischem Gewebe.

7. Berechnung von Relaxationszeiten über Pulsprogrammsimulationen

Die quantitative Bildgebung in der NMR bietet eine Reihe von Möglichkeiten, biologische Phänomene und Vorgänge zu untersuchen. Deshalb wurden in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen, möglichst effiziente Methoden zur quantitativen Erfassung der verschiedenen Relaxationsparameter zu entwickeln. Die meisten dieser Messmethoden setzen voraus, dass das Signal vor einer erneuten Anregung vollständig zum thermodynamischen Gleichgewicht zurück relaxiert ist, und dass die Messpunkte zeitlich äquidistant akquiriert wurden, um die Relaxationskurve analytisch anfitzen zu können.

Im Folgenden wird eine Fitmethode beschrieben, die es ermöglicht, Relaxationszeiten aus Messdaten zu berechnen, die mit einer zeitlich nicht äquidistant geschalteten Pulsfolge akquiriert wurden. Damit ist auch die Limitierung, dass das Signal gegen einen stationären Gleichgewichtswert relaxieren muss, bevor eine erneute Anregung erfolgen darf, aufgehoben. Der implementierte Fitalgorithmus wurde zur Relaxationszeitberechnung einer neuen NMR-Sequenz verwendet. Diese Sequenz erlaubt es, die Relaxationszeiten T_1 und T_2^* in einer Akquisition simultan zu erfassen. Die dazu benötigte Messzeit ist die gleiche, wie die einer herkömmlichen Inversion-Recovery-Methode zur Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit. In der Literatur sind zwar Methoden zur gleichzeitigen Bestimmung von T_1 und T_2^* beschrieben [126, 127], aber entweder müssen dabei zusätzlich Anregungswinkel-Karten (Flipwinkel-Karten) gemessen oder aus anderen, zusätzlich zu akquirierenden Messparametern berechnet werden, was die Messzeit erhöht. Die hier vorgestellte Methode benötigt keine Flipwinkel-Karten, um die korrekten Relaxationszeiten berechnen zu können.

Im ersten Teil dieses Kapitels wird der Fitalgorithmus zur Berechnung der T_1 -Zeit beschrieben. Dabei wird der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Stabilität des Algorithmus untersucht und mit einer Standardmethode zur T_1 -Zeit-Bestimmung, der Deichmann-Methode, verglichen. Im zweiten Teil wird die Fit- und Messmethode erweitert um die gleichzeitige Messung der Relaxationszeiten T_1 und T_2^* zu ermöglichen. Die Stabilität und Genauigkeit dieser kombinierten Messmethode wird in Simulationen, Phantom- und *in vivo*-Messungen untersucht.

7.1. Grundlagen

Um ein NMR-Signal aus einer Probe in einem statischen Magnetfeld zu erhalten, müssen die Spins aus ihrer Gleichgewichtsposition ausgelenkt werden. Dies passiert durch resonante Einstrahlung von Hochfrequenz-Pulsen senkrecht zum B_0 -Feld über eine Sendespule, welche zugleich auch als Empfangsspule dient. Dazu wird durch die Spule ein charakteristisches B_1 -Feld im Probenvolumen induziert, welches, bedingt durch den Aufbau des Resonators und den Eigenschaften der Probe, räumlichen Variationen unterworfen ist. Wenn also die Spins in einer Probe durch Einstrahlen eines definierten HF-Pulses um einen Winkel ausgelenkt werden, so variiert dieser Winkel über das Probenvolumen abhängig von der B_1 -Feldverteilung der Spule (der Anregungswinkel ist proportional zur eingestrahlten B_1 -Feldstärke: $\alpha = \int \gamma B_1 \delta t$). Diese Flipwinkel-Variationen können zu Bildartefakten und Fehleinschätzungen bei der Berechnung von Relaxationszeiten führen. Ein Birdcage-Resonator am 17.6T Tomographen hat typischerweise eine maximale Flipwinkel-Variation von ca. $\pm 25\%$ über das Probenvolumen¹.

Bei der Beschreibung der grundlegenden Methoden zur Erfassung von T_1 - bzw. T_2^* -Relaxationszeiten in den Kapiteln (2.1.8) und (2.1.9) wurde auf den Einfluss der Flipwinkelverteilung auf die Fitwerte nicht näher eingegangen. Zur Akquisition der T_1 -Zeit wurde eine Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH Sequenz nach Deichmann et al. [27] verwendet. Diese Methode nutzt fast den kompletten dynamischen Bereich der Magnetisierung von $-M_0$ bis $+M_0$ aus, was eine hohe Stabilität des Fits gewährleistet. Das Signal kann dabei aber nicht ungestört nach $+M_0$ relaxieren, da durch die sukzessive HF-Einstrahlung in den FLASH-Auslesemodulen immer wieder Magnetisierung aus der longitudinalen in die transversale Ebene transferiert wird. Abhängig von der T_1 -Relaxationszeit, dem Anregungswinkel und der Repetitionszeit der FLASH-Module relaxiert das Signal gegen einen niedrigeren Gleichgewichtswert² $+M_0^*$. Damit ist die Berechnung der T_1 -Zeit abhängig von der Flipwinkelverteilung und dem B_1 -Feld der Spule. Deichmann hat jedoch gezeigt, dass für Anregungswinkel kleiner als ca. 8° die T_1 -Relaxationszeiten näherungsweise unabhängig vom Anregungswinkel in der Probe berechnet werden können (siehe Gleichung 2.30). Der am Tomographen eingestellte Flipwinkel muss jedoch noch kleiner gewählt werden, um trotz der B_1 -Feld-Inhomogenität der Sendespule im kompletten Probenvolumen unter der 8° -Flipwinkelgrenze zu bleiben. Der Nachteil solch kleiner Flipwinkel ist, dass nur wenig Signal zur Abtastung der Relaxationskurve angeregt werden kann, was ein niedriges SNR und eine erhöhte Ungenauigkeit im Fit zur Folge hat. Werden jedoch größere Flipwinkel gewählt, so ist die Näherung nach Deichmann nicht mehr gültig und die berechneten T_1 -Werte werden schnell unterschätzt. Abbildung (7.1) zeigt die nach Deichmann berechneten T_1 -Werte, für simulierte Relaxationsdatensätze, deren Anregungswinkel in den FLASH-Modulen zwischen 1° und 89° liegen.

Diese Limitierung auf kleine Flipwinkel und zeitlich äquidistante Pulsfolgen lässt sich

¹Der 38mm-Birdcage-Resonator, der für die in vivo Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet wurde, hatte eine Flipwinkel-Variation von weniger als $\pm 5\%$ über den Tumor-Messbereich.

²Das Signal relaxiert nur gegen einen Gleichgewichtswert $+M_0^*$, wenn die Anregungspulse der FLASH-Module zeitlich äquidistant geschaltet werden.

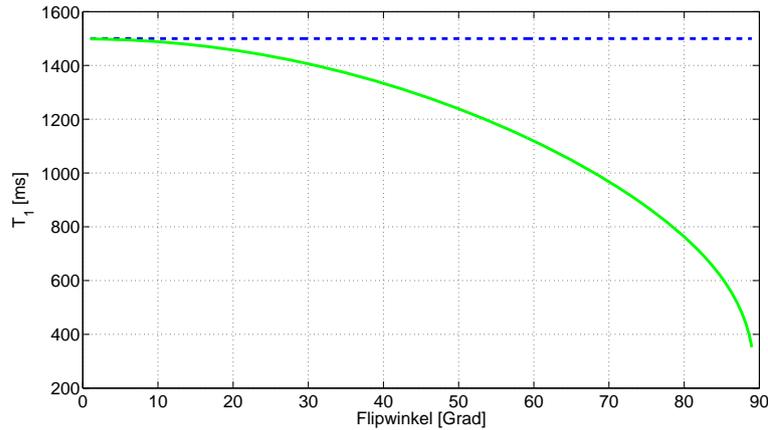


Abbildung 7.1.: T_1 -Werte berechnet nach Deichmann (grüne Linie). Es wurden T_1 -Relaxationskurven mit Anregungswinkeln der FLASH-Module zwischen 1° und 89° simuliert und nach der Deichmann-Methode gefittet. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms und ist durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt. Ab einem Anregungswinkel von ca. 10° werden die T_1 -Werte stark unterschätzt (Die Abweichung bei 11.5° beträgt über 1%).

durch die im Folgenden vorgestellte Fitmethode umgehen. Dabei wird das Pulsprogramm simuliert und die Parameter T_1 und M_0 angepasst, so dass der simulierte Verlauf den gemessen möglichst genau wiedergibt.

7.2. Simulation der T_1 -Messung

Zur Aufnahme des Messsignals wird die in Kapitel (2.1.8) beschriebene Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH Sequenz (IR-FLASH) verwendet. Die Zeitpunkte, zu denen der Inversionspuls und die Anregungspulse der FLASH-Module geschaltet werden, und deren Flipwinkel, sind im Pulsprogramm angegeben und bekannt. Damit kann der Signalverlauf der Magnetisierung während der Abarbeitung des Pulsprogramms nachgebildet werden. Die Simulation besteht im Wesentlichen aus drei Einheiten, die zusammengesetzt das Pulsprogramm wiedergeben:

Signal-Einheit: Diese Einheit dient zur Berechnung des T_2^* -Zerfalls. Sie beschreibt das gemessene Signal in der transversalen Ebene (S_{xy}) nach einem Anregungspuls.

$$M_{xy} = M_z \sin(\alpha)$$

$$S_{xy} = M_{xy} \exp\left(-\frac{T_E}{T_2^*}\right) \quad (7.1)$$

Mit M_z der longitudinalen Magnetisierung vor dem Anregungspuls eines FLASH-Moduls, α dem Flipwinkel, M_{xy} der Transversalmagnetisierung, T_E der Echozeit und der T_2^* -Relaxationszeit. Abbildung (7.2) stellt diese Einheit schematisch dar.

Relaxations-Einheit: Während der Zeitdauer dieser Einheit relaxiert die longitudinale

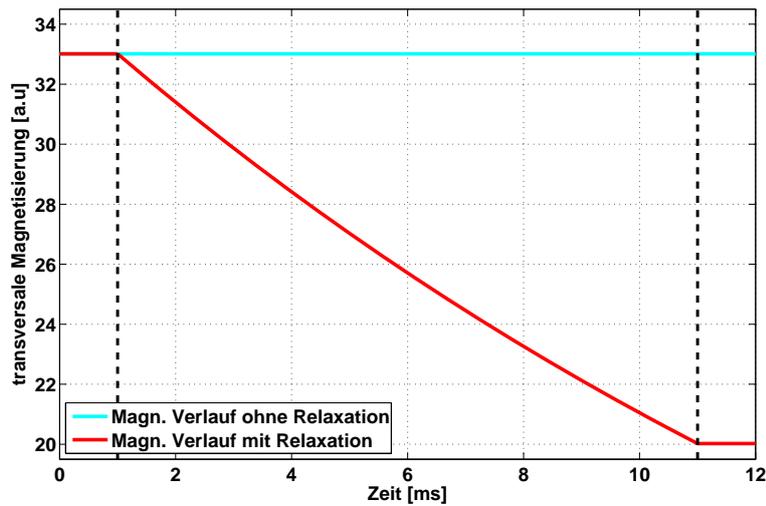


Abbildung 7.2.: Schematische Darstellung der Signal-Einheit. Die Einheit erstreckt sich über den Bereich zwischen den zwei senkrechten gestrichelten Linien. M_{xy} entspricht dem Wert auf der roten Kurve zum Zeitpunkt der ersten gestrichelten Linie, S_{xy} dem Wert auf der roten Kurve zum Zeitpunkt der zweiten gestrichelten Linie.

Komponente des Signals ungestört in Richtung des thermodynamischen Gleichgewichts M_0 .

$$M'_z = M_0 + (M_z - M_0) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \quad (7.2)$$

Mit M'_z der Magnetisierung nach und M_z der Magnetisierung zu Beginn dieser Einheit, t der Zeitdauer dieser Einheit und der T_1 -Relaxationszeit. In Abbildung (7.3) ist die Relaxations-Einheit schematisch dargestellt.

Puls-Einheit: In dieser Einheit wird der Einfluss eines Pulses auf die Magnetisierung simuliert. Als Näherung erster Ordnung wurde davon ausgegangen, dass sich die Magnetisierung linear während der Pulsdauer verändert³. Die longitudinale Relaxation der Spins während des Anliegens eines Pulses wird in diesem Modell mit berücksichtigt.

$$M_{zp} = M_z \cos(\alpha)$$

$$M_{zr} = M_0 + \left(\frac{(M_z + M_{zp})}{2} - M_0\right) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \quad (7.3)$$

$$\Delta M_z = M_{zr} - \frac{(M_z + M_{zp})}{2}$$

$$M'_z = M_{zp} + \Delta M_z$$

Mit M_{zp} der Magnetisierung nach dem Anregungspuls mit Flipwinkel α und der Magnetisierung M_z vor dem Puls. M_{zr} beschreibt die absolute Spin-Gitter-Relaxation

³Der tatsächliche Verlauf hängt von der Art des Pulses (Frequenz- und Phasenverlauf) ab.

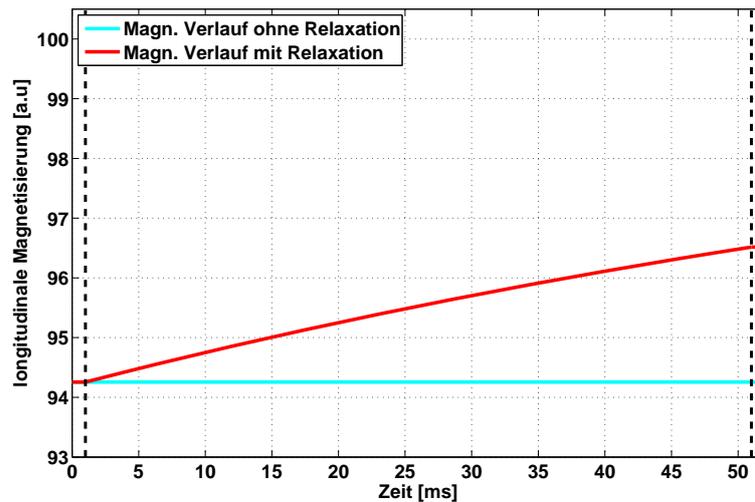


Abbildung 7.3.: Schematische Darstellung der Relaxations-Einheit. Die Einheit erstreckt sich über den Bereich zwischen den zwei senkrechten gestrichelten Linien. M_z entspricht dem Wert auf der roten Kurve zum Zeitpunkt der ersten gestrichelten Linie, M'_z dem Wert auf der roten Kurve zum Zeitpunkt der zweiten gestrichelten Linie. Als M_0 wurde in dieser Darstellung 100 gewählt.

der Magnetisierung während der Pulsschaltdauer (lineare Näherung). ΔM_z beschreibt die insgesamt Änderung der Magnetisierung hervorgerufen durch die Spin-Gitter-Relaxation während des Anregungspulses. M'_z gibt die Magnetisierung nach dem Puls inklusive Relaxation während des Anliegens des Pulses an. Die schematische Darstellung zu dieser Einheit ist in Abbildung (7.4) zu finden. Darin entspricht die cyan gefärbte Linie der linearen Näherung für die Änderung der Magnetisierung während der Pulsdauer. Daraus resultiert eine mittlere Magnetisierung während der Dauer des Pulses, die als grüne Linie dargestellt ist, und als Referenzmagnetisierung zur Berechnung der Relaxation während der Pulsdauer dient $(M_z + M_{zp})/2$. Die Magnetisierung am Ende des Pulses wird schließlich um die T_1 -Relaxation während des Pulses (orangene Linie) korrigiert (ΔM_z).

Diese drei Einheiten mit den aus der Messsequenz bekannten Parametern α , t und T_E werden so kombiniert, dass sie das IR-FLASH Pulsprogramm nachbilden (Abbildung 7.5) und das aufgenommene Signal simulieren können. Die gesuchte Relaxationszeit T_1 sowie M_0 werden durch Minimierung der Summe der kleinsten Fehlerquadrate zwischen dem Betrag der komplexen Messdaten und dem simulierten Signalverlauf bestimmt⁴. Diese Optimierung wird im Folgenden als Simulations-Fit bezeichnet. Im Anhang (A.7) ist der Ablauf der Simulation und des Fits in einem Struktogramm schematisch dargestellt.

⁴Als Minimierungsalgorithmus wurde das Downhill-Simplex-Verfahren [29] verwendet.

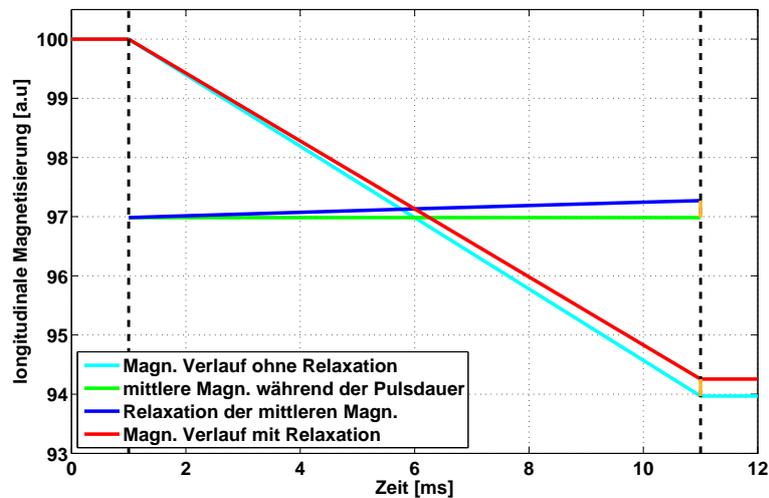


Abbildung 7.4.: Schematische Darstellung der Puls-Einheit. Die Einheit erstreckt sich über den Bereich zwischen den zwei senkrechten gestrichelten Linien. M_z entspricht dem Wert auf der cyan gefärbten Kurve zum Zeitpunkt der ersten gestrichelten Linie, M_{zp} dem Wert auf der cyan gefärbten Kurve zum Zeitpunkt der zweiten gestrichelten Linie. $(M_z + M_{zp})/2$ entspricht der grünen Linie. M_{zr} dem Wert auf der blauen Kurve zum Zeitpunkt der zweiten gestrichelten Linie. ΔM_z ist zwei mal als kurze senkrechte orangene Linie eingezeichnet. M'_z entspricht dem Wert auf der roten Kurve zum Zeitpunkt der zweiten gestrichelten Linie. Als M_0 wurde in dieser Darstellung 100 gewählt.

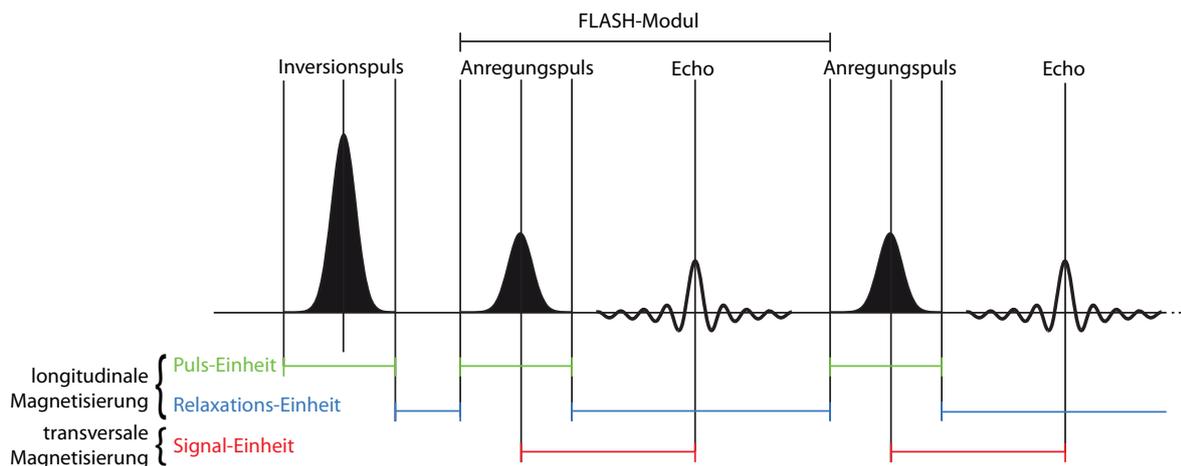


Abbildung 7.5.: Schematische Darstellung eines IR-Pulsprogramms mit den einzelnen Einheiten der Simulation. Die Puls- und Relaxationseinheiten dienen zur Beschreibung der longitudinalen Magnetisierung. Mit der Signaleinheit wird die in die transversale Ebene transferierte Magnetisierung ausgelesen.

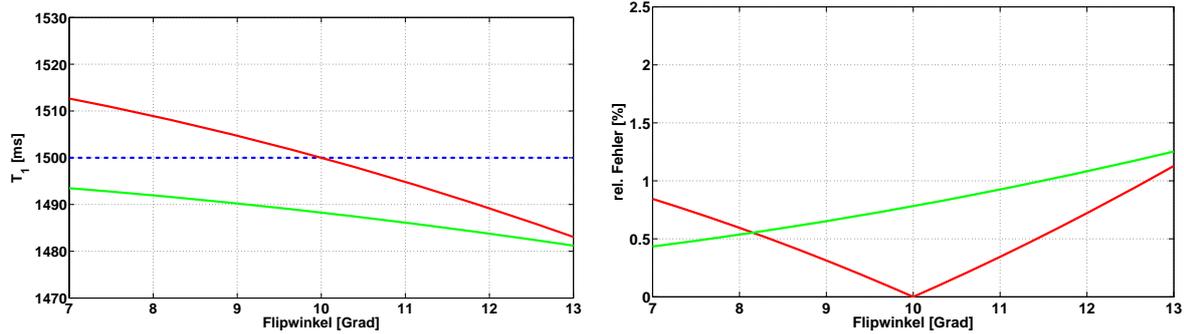
Parameter	Wert
Zeit zwischen Mitte Inversionspuls und Mitte erstem Anregungspuls	12.5ms
Zeit zwischen Mitte Inversionspuls und Mitte letztem Anregungspuls	7500ms
Echozeit	2.75ms
T_1 -Relaxationszeit	1500ms
T_2^* -Relaxationszeit	30ms
M_0	1000
Inversionswinkel	180°
Inversionspulsdauer	5ms
Anregungswinkel	10°
Anregungspulsdauer	1.5ms
Anzahl an Messpunkten	16

Tabelle 7.1.: Sequenzparameter der künstlich generierten Datensätze, soweit sie nicht in den jeweiligen Untersuchungen variiert werden.

7.2.1. Flipwinkelvariationen

Um die Stabilität des Fitalgorithmus bezüglich der Flipwinkelvariationen zu untersuchen, wurden künstliche T_1 -Relaxationsdatensätze mit bekanntem T_1 erstellt und mit dem Algorithmus gefittet. Die Ergebnisse wurden mit den Soll-Werten und den Resultaten des Fits nach dem Deichmann-Verfahren an die gleichen Datensätze verglichen. Als Soll- T_1 -Wert wurde 1500ms gewählt, was ungefähr dem Wert von Tumorgewebe bei 17.6T entspricht. Das im Folgenden untersuchte Verhalten der Fit-Algorithmen ist unabhängig vom hier beispielhaft gewählten Soll- T_1 -Wert; die Kurven und Zeitachsen wären lediglich anders skaliert, die Aussagen bleiben dabei aber dieselben. Die Sequenzparameter der künstlich generierten Datensätze sind in Tabelle (7.1) angegeben.

Abbildung (7.6) zeigt den Einfluss einer Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$ bei einem eingestellten Flipwinkel von 10° auf die berechneten T_1 -Werte des Fitalgorithmus. Dazu wurden künstliche Datensätze mit Flipwinkeln zwischen 7° und 13° erzeugt und jeder dieser Datensätze mit dem fest vorgegebenen Flipwinkel von 10° gefittet. Die berechneten T_1 -Werte nach dem Simulations-Algorithmus sind als rote Linie in Abbildung (7.6a) dargestellt. Die grüne Linie gibt die Ergebnisse der Deichmann-Methode wieder. In Abbildung (7.6b) sind die Beträge der relativen Fehler bezüglich des Soll- T_1 -wertes in Abhängigkeit von der Flipwinkelvariation dargestellt. Die neue Fitmethode liefert bei dem Flipwinkel von 10° , was dem vorgegebenen Winkel entspricht, den korrekten T_1 -Wert. Die Methode nach Deichmann unterschätzt jedoch den T_1 -Wert auch bei kleinen



(a) T_1 -Werte der Fitalgorithmen bei verschiedenen Flipwinkeln.

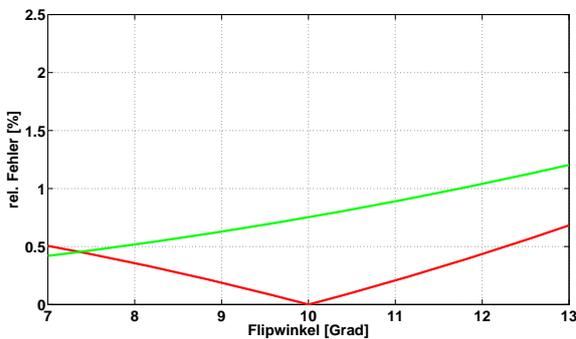
(b) Relativer Fehler der T_1 -Werte zum Soll-Wert in %.

Abbildung 7.6.: (a) Einfluss einer Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$ auf die berechneten T_1 -Werte der Fitalgorithmen. Die rote Linie stellt die T_1 -Fitergebnisse des Simulations-Fits bei festem Anregungswinkel von 10° dar, die grüne Linie die der Deichmann-Methode. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms und ist durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt. (b) Betrag des relativen Fehlers der gefitteten T_1 -Werte bezüglich des Soll-Wertes.

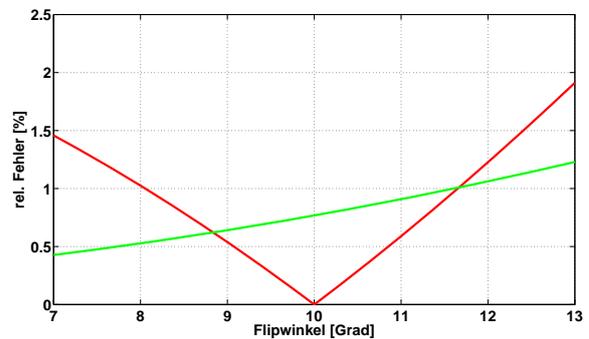
Winkeln, erzeugt aber im Winkelbereich bis knapp über 8° Resultate mit einem kleineren relativen Fehler. Bei Winkelwerten darüber ist die Simulations-Fitmethode genauer. Dieses Verhalten gilt nur für die Simulation mit 16 Messpunkten (FLASH-Modulen und damit Anregungspulsen) entlang der Relaxationskurve und einem Flipwinkel von 10° . Wird die Kurve mit weniger Messpunkten abgetastet, ist der Simulations-Fit auch für kleinere Winkel besser; bei mehr Punkten wandert der Schnittpunkt der Fehlerkurven in Abbildung (7.6b) weiter nach rechts. Dies liegt an dem additiven Effekt des Fehlers in den Pulswinkeln der FLASH-Module: Je mehr Pulse mit falschem Pulswinkel geschaltet werden, desto größer ist der Gesamtfehler. In Abbildung (7.7) ist dieses Verhalten für 8 bzw. 32 Messpunkte dargestellt. Im Folgenden werden die Untersuchungen mit 16 Messpunkten auf der Signalkurve durchgeführt, womit der Signalverlauf ausreichend gut abgetastet werden kann.

Bei größeren Vorgabe-Flipwinkeln⁵ wird der relative Fehler des Simulations-Fits im Vergleich mit der Deichmann-Methode immer kleiner. Dies ist in Abbildung (7.8a) deutlich zu erkennen. Hier ist der Soll-Flipwinkel der künstlich generierten Daten von 1° bis 70° durchgefahren, und die T_1 -Werte durch den Fit sind mit einer festen Flipwinkel-Abweichung von -10% bezüglich des entsprechenden Soll-Flipwinkels berechnet worden. D.h. für einen Vorgabe-Flipwinkel von z.B. 50° wurde der Fit mit einem Flipwinkel von 45° durchgeführt. Die T_1 -Werte des Fits sind als rote Linie dargestellt. Zum Vergleich sind die Werte der Deichmann-Methode wieder als grüne Linie angegeben. Im Diagramm (7.8b) ist der Betrag der relativen Fehler der gefitteten T_1 -Werte abgebildet. Die berechneten T_1 -Werte für Soll-Flipwinkel von 1° bis 68° und einer Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$ sind in der dreidimensionalen Darstellung (7.9) abgebildet. Der Soll- T_1 -Wert ist als schwarzes Gitternetz dargestellt. Die rote Fläche gibt die mit der Simulationsmethode gefitteten T_1 -Werte an, die grüne die Werte der Deichmann-Fitmethode. Aus dieser

⁵Im Folgenden auch Soll-Flipwinkel genannt.

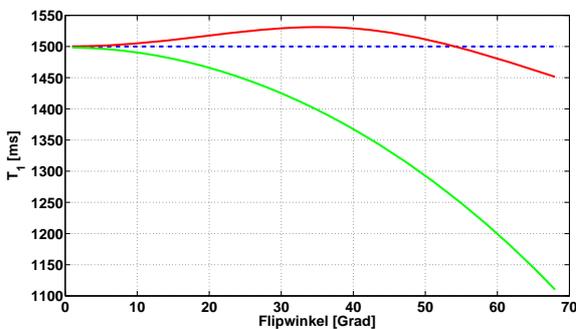


(a) Relativer Fehler der T_1 -Werte bei acht Messpunkten.

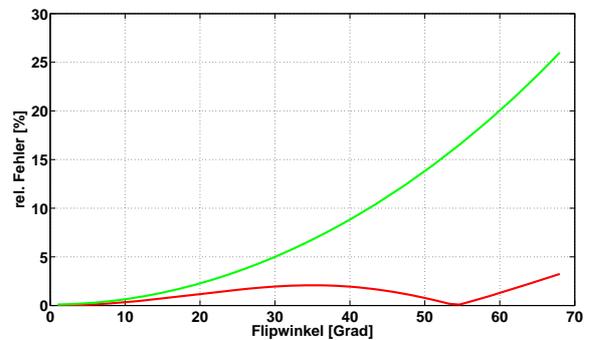


(b) Relativer Fehler der T_1 -Werte bei 32 Messpunkten.

Abbildung 7.7.: Einfluss der Anzahl an Messpunkten (FLASH-Modulen) auf die berechneten T_1 -Werte der Fitalgorithmen. Dargestellt sind nur die relativen Fehler bezüglich des Soll- T_1 -wertes. In (a) wurde die Signalkurve mit acht Messpunkten abgetastet, in (b) mit 32. Die übrigen Parameter sind die gleichen wie in Abbildung (7.6).



(a) T_1 -Werte der Fitalgorithmen bei verschiedenen Soll-Flipwinkeln.



(b) Relativer Fehler der T_1 -Werte zum Soll-Wert in %.

Abbildung 7.8.: (a) Einfluss des Soll-Flipwinkels auf die berechneten T_1 -Werte der Fitalgorithmen. Die rote Linie stellt die T_1 -Fitergebnisse des Simulations-Fits bei einer Abweichung des Anregungswinkel von -10% vom Soll-Winkel dar, die grüne Linie die der Deichmann-Methode. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms und ist durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt. (b) Betrag des relativen Fehlers der gefitteten T_1 -Werte bezüglich des Soll-Wertes.

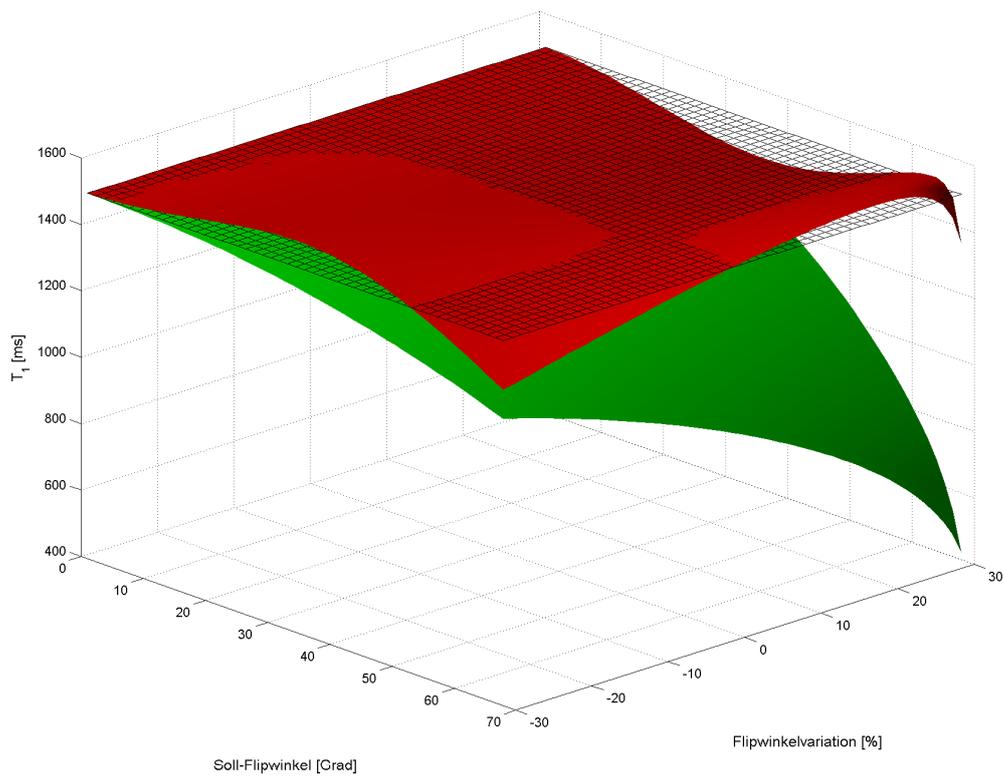


Abbildung 7.9.: Darstellung der gefitteten T_1 -Werte für Soll-Flipwinkel von 1° bis 68° und einer Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$. Der Soll- T_1 -Wert ist als schwarzes Gitternetz dargestellt. Die rote Fläche gibt die mit der Simulationsmethode gefitteten T_1 -Werte an, die grüne die Werte der Deichmann-Fitmethode.

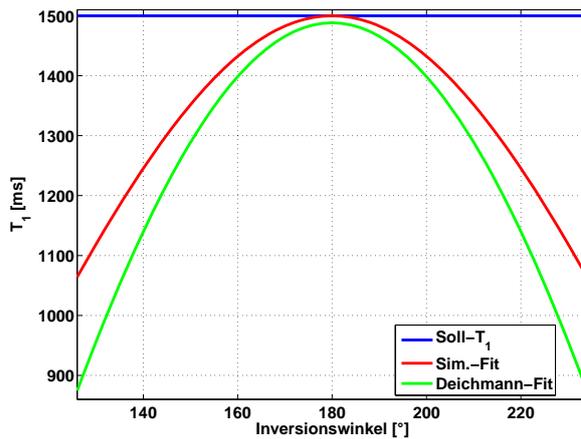


Abbildung 7.10: Darstellung der gefitteten T_1 -Werte in Abhängigkeit von Inversionswinkel-Variationen (ohne Variationen im Flipwinkel).

Darstellung ist klar ersichtlich, dass die Simulationemethode in diesem Parameterraum genauere Fitergebnisse liefert als die Deichmann-Methode.

7.2.2. Variationen im Inversionspulswinkel

Wie der Anregungspuls ist auch der Inversionspuls von den Variationen in der B_1 -Feldverteilung der Sendespule abhängig, so lange, wie am Ende dieses Kapitels beschrieben, kein adiabatischer Puls verwendet wird. Ein Inversionspuls mit einem Winkel von nicht genau 180° hat zur Folge, dass ein zusätzlicher Fitparameter in die Modellfunktion eingefügt werden muss, um korrekte Werte zu erhalten. Denn der Startwert der Relaxationskurve ist nicht mehr $-M_0$ sondern ein vom Inversionswinkel abhängiger Parameter, der zusätzlich angefitet werden muss.

Für Inversionswinkel von $180^\circ \pm 30\%$ wurden künstliche T_1 -Relaxationsdatensätze berechnet und mit einem festen 180° Inversionspuls (ohne zusätzlichen Parameter) gefittet. Abbildung (7.10) zeigt die berechneten T_1 -Werte des betrachteten Inversionswinkelbereiches für die Deichmann-Methode (grüne Kurve) und den Simulations-Fit (rote Kurve). Je weiter der Inversionswinkel von 180° abweicht, desto stärker wird der T_1 -Wert unterschätzt. Dieses Verhalten ist für die Methode nach Deichmann stärker ausgeprägt als für den Simulations-Fit. Abbildung (7.11) stellt die relativen Fehler der gefitteten T_1 -Werte für Variationen im Anregungs- und Inversionswinkel dar. Zur deutlicheren Darstellung wurde der Bereich des Inversionswinkels auf Werte zwischen 170° und 190° beschränkt.

Abweichungen im Inversionspulswinkel lassen sich durch Verwendung von adiabatischen Pulsen eliminieren [6]. Zusätzlich zur Amplitudenmodulation von konventionellen Pulsen sind die adiabatischen Pulse frequenz- bzw. phasenmoduliert. Diese Pulse erzeugen einen definierten Anregungswinkel, unabhängig von der B_1 -Feldstärke der Sendespule, vorausgesetzt die Sendeleistung liegt über einem von der Spule und dem Puls abhängigen Grenzwert. Damit ist es möglich, eine exakte Inversion ohne Inversionswinkelvariationen in der Probe zu erzeugen, womit die Berechnung der T_1 -Relaxationszeit dieser Fehlerquelle nicht mehr unterliegt.

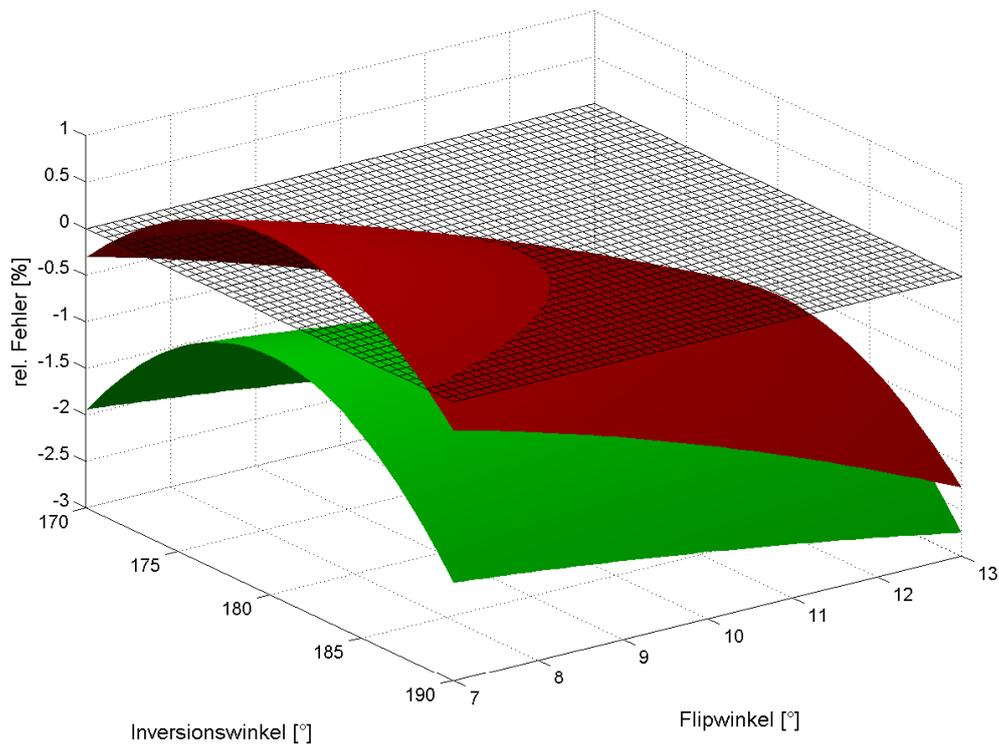


Abbildung 7.11.: Darstellung des relativen Fehlers in der Berechnung der T_1 -Werte aufgrund von Inversionswinkel-Variationen. Zusätzlich zu den Inversionswinkelvariationen wurde auch die Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$ bei einem Soll-Flipwinkel von 10° simuliert. Zur besseren Darstellung wurde der Bereich des Inversionswinkels auf Werte zwischen 170° und 190° beschränkt. Die rote Fläche stellt den Fit durch Simulation des Pulsprogramms dar, die grüne Fläche die Ergebnisse nach der Methode von Deichmann.

7.2.3. Anregungs-Schichtprofile

Zur Anregung einer Messschicht werden in der MR-Tomographie, je nach Aufgabenstellung, Pulse mit unterschiedlichen Frequenzprofilen verwendet [6]. Durch den Schichtselektionsgradienten wird die Amplitudenverteilung des Pulses im Frequenzraum auf eine Anregungswinkelverteilung entlang der z -Richtung (senkrecht zur Messschicht) übertragen (siehe Kapitel 2.1.5). Häufig verwendete Pulsformen sind der Block-Puls, der ein Sinc-Profil anregt, der Sinc-Puls, der näherungsweise ein Rechteckprofil als Messschicht anregt und der Gauß-Puls, der wieder ein Gauß-Profil anregt. Mit dem Pulsprofil variieren damit auch die Anregungswinkel über die Messschichtdicke. Das Signal aus der Anregungsschicht ist also proportional zum Integral über die Amplitudenverteilung des Pulses im Frequenzraum. Inwieweit diese Flipwinkelverteilung einen Einfluss auf die Bestimmung der T_1 -Zeit über die Fitalgorithmen hat, wird im Folgenden genauer untersucht.

Die betrachteten Pulsprofile besitzen in ihrer Frequenzmitte den Maximalwert in der Amplitudenverteilung, der zu höheren bzw. niedrigeren Frequenzen hin abfällt. Entsprechend werden auch die Spins im Zentrum der Messschicht am stärksten ausgelenkt. Damit ist die Angabe eines Anregungswinkels, der für die komplette Messschicht gilt, nicht ohne weiteres möglich, da es sich im Allgemeinen (vom Idealfall eines Rechteckprofils abgesehen) um eine Anregungswinkelverteilung in der Messschicht handelt. Diese ist im Mittel kleiner als der Maximalwinkel im Messschichtzentrum. Eine Möglichkeit, definierte Signalamplituden bei vorgegebenen Flipwinkeln aus einer Messschicht für unterschiedliche Pulsprofile zu erhalten, ergibt sich durch eine Normierung der Anregungswinkelverteilung. Dazu wird das Pulsprofil so skaliert, dass der Mittelwert der Amplitudenverteilung über den FWHM-Frequenzbereich eins ergibt. Anschließend wird das normierte Profil mit dem Pulswinkel multipliziert. Damit ist die Angabe eines definierten Pulswinkels für die unterschiedlichen Pulsprofile möglich. In Abbildung (7.12) ist die Normierung des Amplitudenmaximalwertes auf eins (7.12a) bzw. die Normierung des Flipwinkelmittelwertes über den FWHM-Frequenzbereich auf eins (7.12b) für einen Gauß-Puls dargestellt.

Zur Simulation wurden die Pulsprofile (Amplitudenverteilung) im Frequenzraum mit 128 Messpunkten abgetastet, der Betrag gebildet und wie oben beschrieben eine Normierung des Flipwinkelmittelwertes über den FWHM-Frequenzbereich durchgeführt. Die so berechneten Flipwinkelverteilungen für einen 10° Block-, Gauß bzw. Sinc-Puls sind in Abbildung (7.13) dargestellt. Die Anregung der Messschicht mit einem Anregungswinkelprofil wurde mit 128 künstlichen T_1 -Relaxationsdatensätzen und den entsprechenden Pulswinkeln des Profils simuliert. Die generierten T_1 -Kurven wurden zu einer Signalkurve aufsummiert und mit dem Soll-Flipwinkel über den Simulations-Fit bzw. mit der Deichmann-Methode gefittet. Nach diesem Verfahren wurden Soll-Flipwinkel in einem Winkelbereich von 1 bis 80° untersucht und die gefitteten T_1 -Werte mit dem Soll-Wert von 1500ms verglichen. Die Ergebnisse und relativen Fehler der Fitalgorithmen sind für die Pulsprofile in den Abbildungen (7.14) dargestellt. Aus diesen Abbildungen geht hervor, dass die Simulations-Methode beim Block-Puls bis zu einem Anregungswinkel von knapp unter 60° und beim Gauß-Puls bis knapp über 65° vergleichbare, oder sogar

7. Berechnung von Relaxationszeiten über Pulsprogrammsimulationen

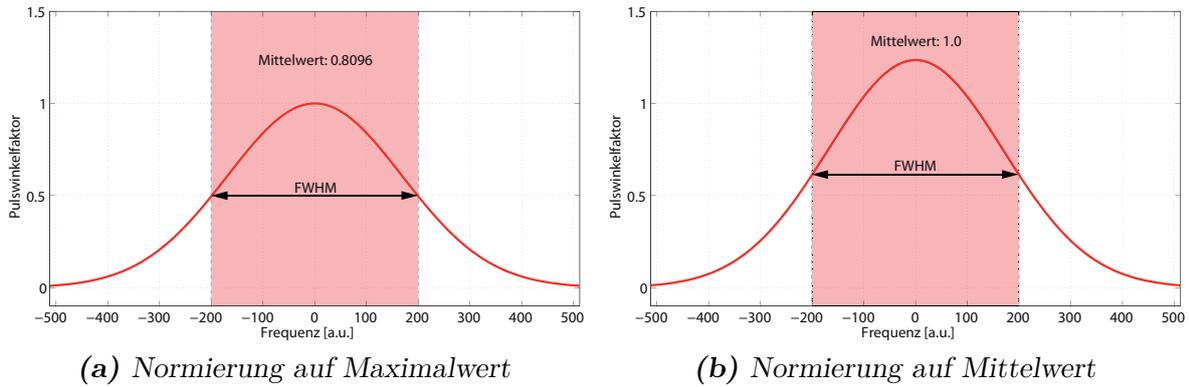


Abbildung 7.12.: Darstellung der Normierung des Amplitudenmaximalwertes auf eins (7.12a) bzw. die Normierung des Flipwinkelmittelwertes im FWHM-Frequenzbereich auf eins (7.12b) für einen Gauß-Puls.

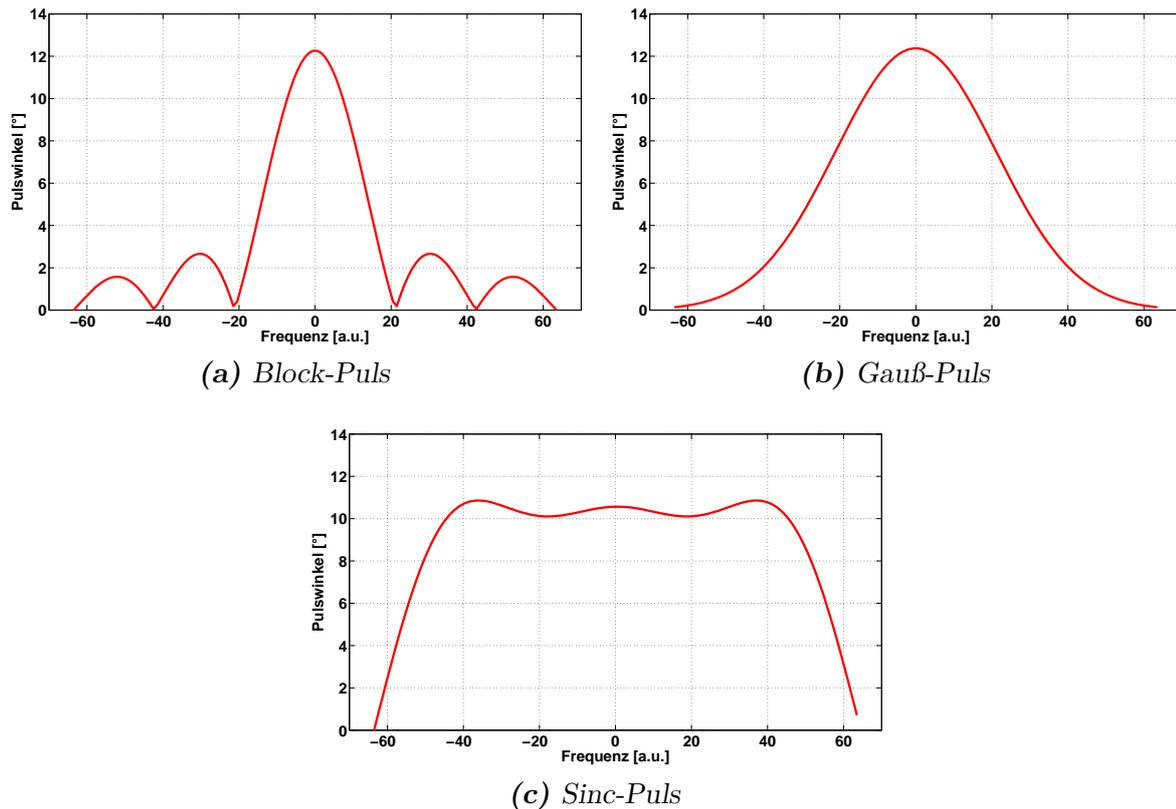


Abbildung 7.13.: Darstellung der Anregungswinkelverteilung im Frequenzraum für einen 10° Block-Puls (a), einen 10° Gauß-Puls bzw. einen 10° Sinc-Puls (c) nach Normierung des Flipwinkelmittelwertes im FWHM-Frequenzbereich.

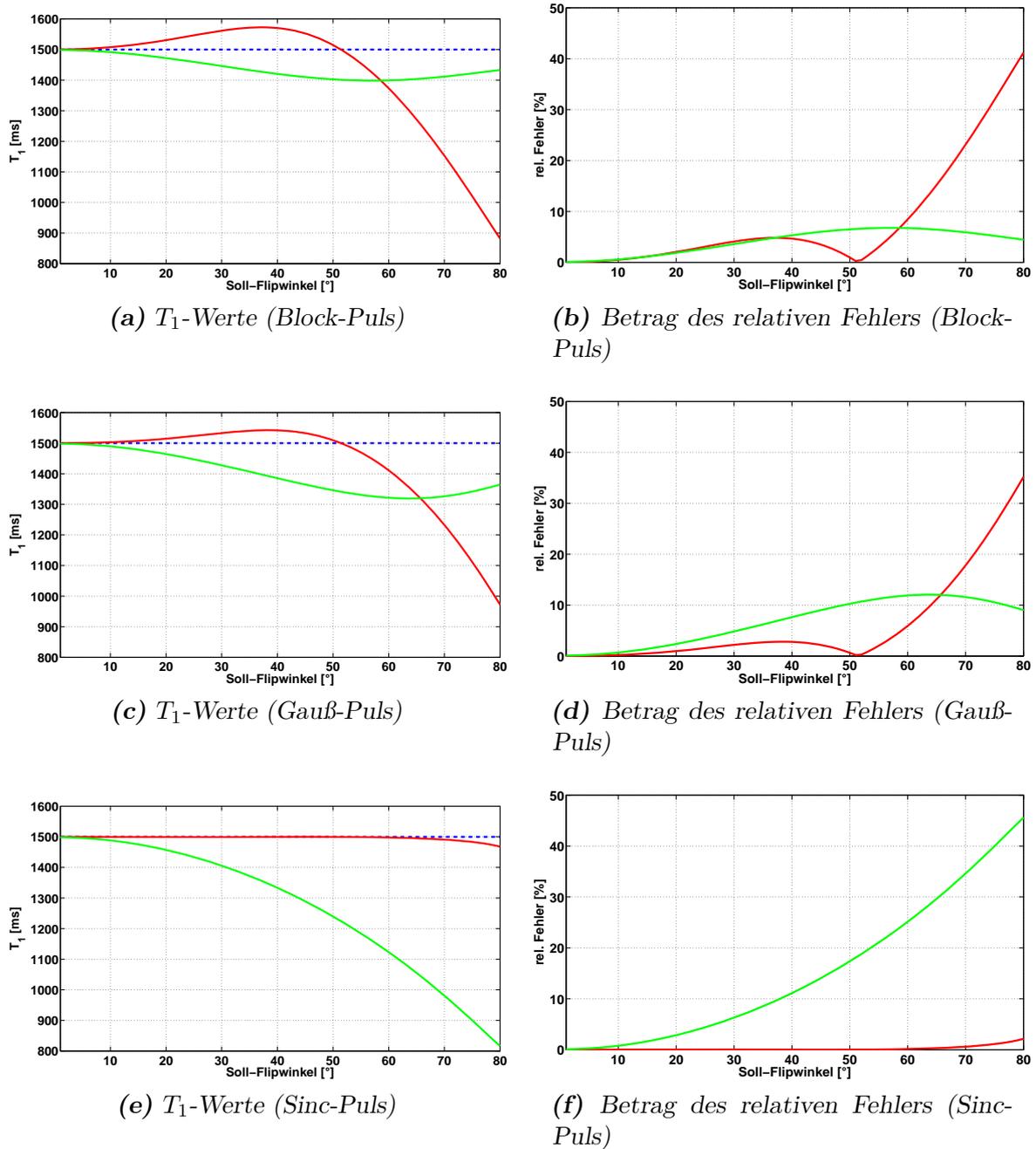


Abbildung 7.14.: Darstellung der gefitteten T_1 -Werte und des Betrags des relativen Fehlers der Fitalgorithmen für den Block-Puls ((a) + (b)), den Gauß-Puls ((c) + (d)) und den Sinc-Puls ((e) + (f)) über ein Soll-Flipwinkelbereich von 1 bis 80° . Die rote Linie stellt die Ergebnisse des Simulations-Fits dar, die grüne Linie die der Deichmann-Methode. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms und ist durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt.

bessere T_1 -Werte liefert als die Methode nach Deichmann. Wird der Anregungswinkel jedoch größer als die angegebenen Werte gewählt, produziert die Deichmann-Methode genauere T_1 -Werte. Dies liegt daran, dass mit wachsendem Anregungswinkel auch der Signalanteil aus den Seitenbanden des Pulsprofils ansteigt, deren Pulswinkel stark vom angegebenen Soll-Flipwinkel abweicht. Der Anregungswinkel in den Nebenkeulen ist deutlich kleiner als im Zentrum des Pulsprofils; solche kleinen Winkel kann die Methode nach Deichmann, da sie unabhängig vom Flipwinkel ist, besser anfassen. Dieser Effekt ist beim Block-Puls durch die ausgeprägten Nebenkeulen des Sinc-Profiles ausgeprägter als beim glatt abfallenden Profil des Gauß-Pulses. Dieses Verhalten wird in Abbildung (7.15) veranschaulicht. Hier sind die gefitteten T_1 -Werte und der Betrag des relativen Fehlers für den Fit über die Flipwinkelverteilung der Pulsprofile mit einem Soll-Flipwinkel von 10° abgebildet. Es ist zu erkennen, dass sich der relative Fehler von ca. 1.6% beim Block-Puls über einen deutlich größeren Frequenzbereich als beim Gauß-Puls erstreckt. Allerdings wird in einer realen T_1 -Messung der Anregungswinkel nicht in solchen Größenordnungen (über 60°) gewählt werden, da die Gleichgewichtsmagnetisierung M_0^* sonst unnötig klein wird, was den Messbereich und damit auch die Genauigkeit des Fits herabsetzt. Idealerweise wird als Anregungspuls ein Sinc-Puls gewählt, der näherungsweise ein Rechteckprofil und somit einen sehr konstanten Anregungswinkel über die Messschicht aufweist, und von diesen Effekten weitestgehend unberührt bleibt (Abbildung 7.14f und 7.15f).

7.2.4. Signal-Rausch-Verhältnis

Die bisherigen Simulationen wurden ohne Rauschen, welches in realen Messungen immer vorhanden ist, durchgeführt. Im Folgenden wird zu den künstlich generierten Daten normalverteiltes, komplexes Rauschen unterschiedlicher Stärke addiert um die Robustheit des Fitalgorithmus zu untersuchen. Als Maß für das Rauschen wird der SNR-Wert angegeben, wobei als Signalwert der betragsmäßig größte Wert in den künstlich generierten Relaxationskurven verwendet wurde. D.h. es wurden alle unverrauschten Datensätze über den kompletten betrachteten Flipwinkelbereich erzeugt und der größte Wert in diesem Datensatz als Signalwert zur Angabe des SNR herangezogen. Mit dem so berechneten SNR wurden die Datensätze verrauscht und anschließend gefittet.

Abbildung (7.16) zeigt das Verhalten der Fitalgorithmen bei einem SNR-Wert von 100 bzw. 50 für einen Soll-Flipwinkel von 10° und einem SNR-Wert von 100 für einen Soll-Flipwinkel von 20° . Simuliert und gefittet wurden jeweils 1000 verrauschte Datensätze aus denen die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet wurden. Links ist der Mittelwert als durchgezogene Linie, die Standardabweichung als gestrichelte Linien dargestellt. In der rechten Spalte ist die Standardabweichung noch einmal in Prozent bezüglich des Soll- T_1 -Wertes abgebildet. Wie zuvor, sind die Ergebnisse des Simulations-Fits rot, die der Deichmann-Methode grün eingefärbt.

Die gefitteten T_1 -Werte in der linken Spalte zeigen, abgesehen von kleinen Schwankungen aufgrund des Verrauschens der Datensätze, den gleichen Kurvenverlauf wie die unverrauschten Daten (vgl. Abbildung 7.6). An dem Verlauf der Standardabweichung

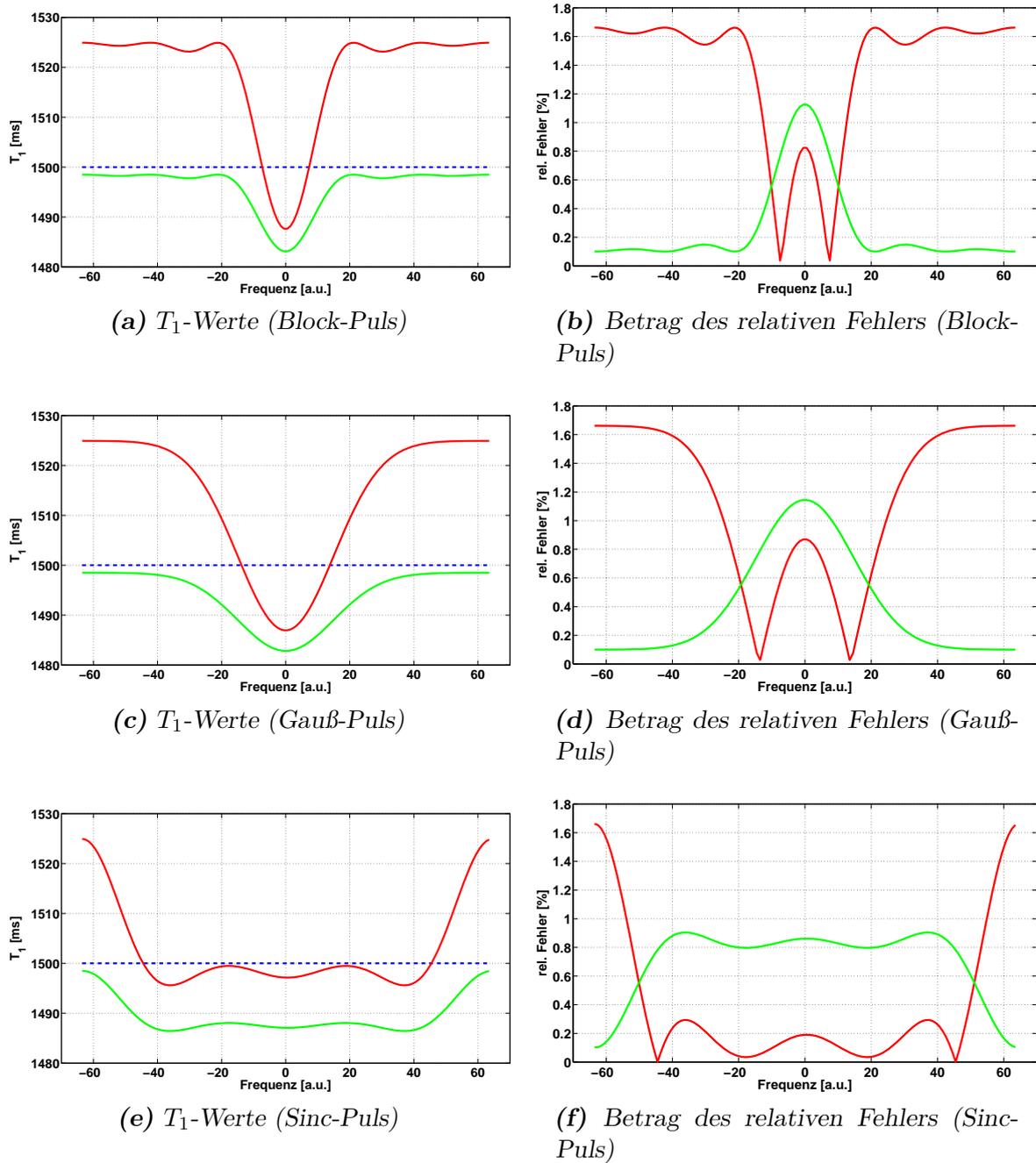
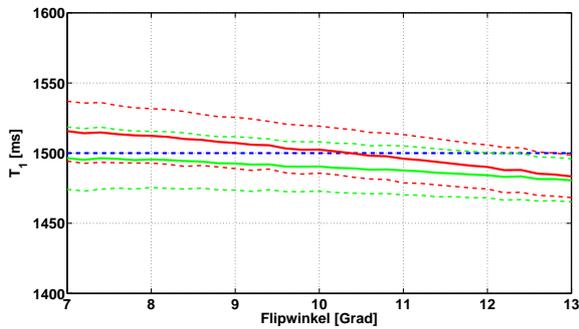
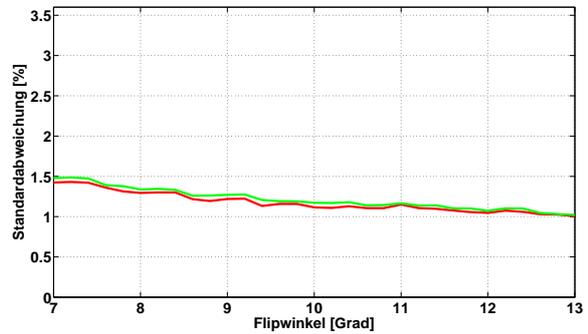


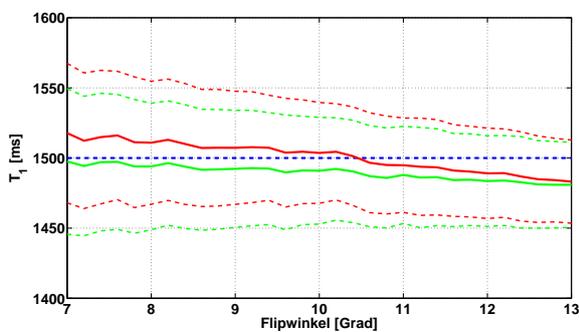
Abbildung 7.15.: Darstellung der gefitteten T_1 -Werte und des Betrags des relativen Fehlers der Fitalgorithmen für den Block-Puls ((a) + (b)), den Gauß-Puls ((c) + (d)) und den Sinc-Puls ((e) + (f)) über die Flipwinkelverteilung der Pulse für einen Soll-Flipwinkel von 10° . Die rote Linie stellt die Ergebnisse des Simulations-Fits dar, die grüne Linie die der Deichmann-Methode. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms und ist durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt.



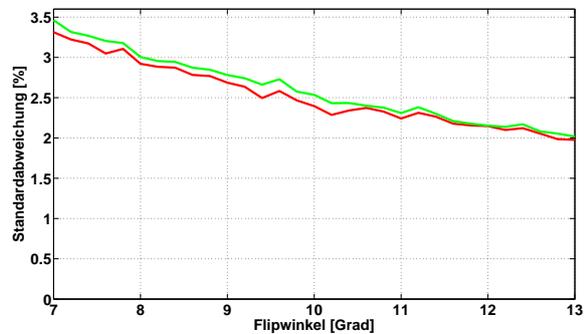
(a) Gefittete T_1 -Werte bei einem SNR von 100 und einem Soll-Flipwinkel von 10° .



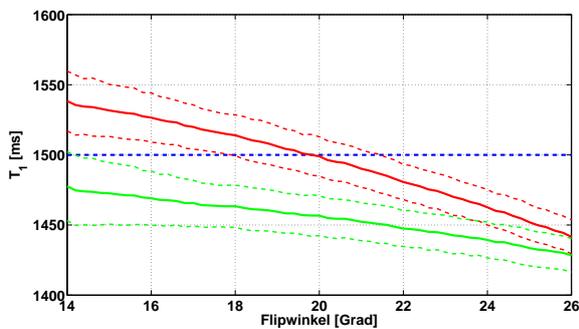
(b) Standardabweichung in % bezüglich des Soll- T_1 -Wertes.



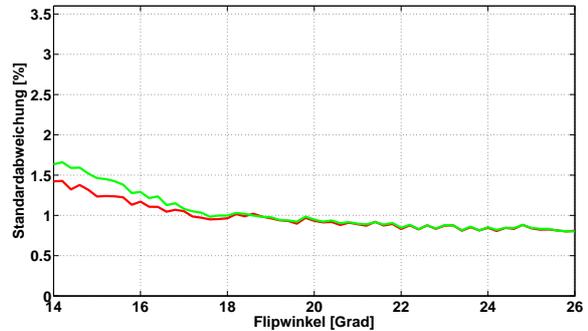
(c) Gefittete T_1 -Werte bei einem SNR von 50 und einem Soll-Flipwinkel von 10° .



(d) Standardabweichung in % bezüglich des Soll- T_1 -Wertes.



(e) Gefittete T_1 -Werte bei einem SNR von 100 und einem Soll-Flipwinkel von 20° .



(f) Standardabweichung in % bezüglich des Soll- T_1 -Wertes.

Abbildung 7.16.: Darstellung des Mittelwertes (durchgezogene Linie) und der Standardabweichung (links: unterbrochene Linien, rechts: durchgezogene Linie) des T_1 -Verlaufes, berechnet aus jeweils 1000 verrauschten, künstlichen Datensätzen. Die rote Linie stellt die T_1 -Fitergebnisse des Simulations-Fits dar, die grüne Linie die der Deichmann-Methode. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms und ist durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt.

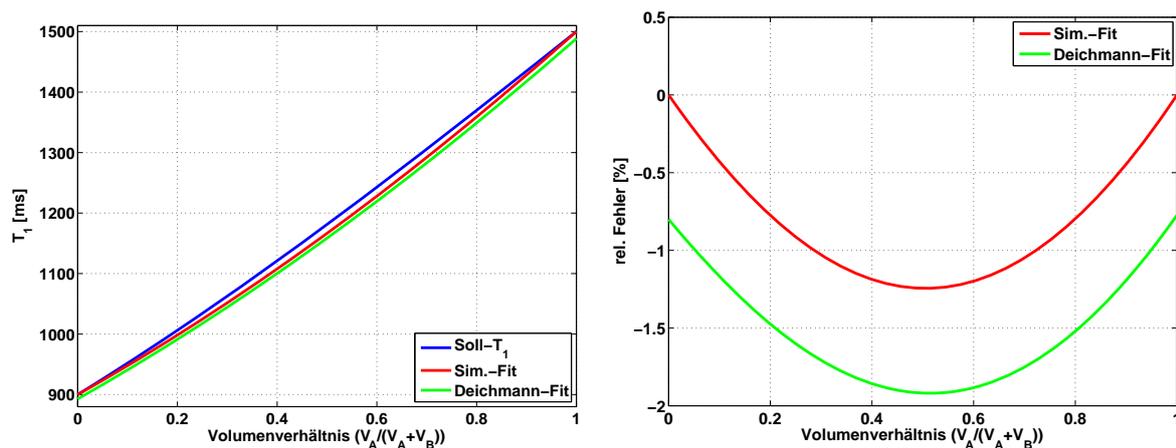
ist zu erkennen, dass die beiden Algorithmen ähnlich robust sind, wobei der Simulations-Fit durchweg etwas stabilere Werte mit einer geringeren Standardabweichung liefert. Zu erkennen ist auch, dass die Standardabweichungen bei beiden Verfahren zu größeren Flipwinkeln hin abnimmt. Dies liegt daran, dass das gemessene Signal bei kleinen Flipwinkeln niedriger ist als bei größeren; als Signalwert beim Generieren des Rauschens mit einem vorgegebenen SNR wurde jedoch der größte Wert im kompletten Datensatz (Winkelbereich) verwendet. Dadurch ist bei dieser Simulation das SNR bei kleineren Flipwinkeln niedriger als bei größeren, was auch an einer realen Messung so beobachtet werden kann. Dieses vergleichsweise niedrige SNR führt somit zu einer höheren Standardabweichung bei kleineren Flipwinkeln. Eine Halbierung des SNR von 100 auf 50 hat bei beiden Fitmethoden näherungsweise eine Verdoppelung der Standardabweichung zur Folge (Abbildung 7.16b und 7.16d). Mit diesen Ergebnissen konnte die Stabilität der neuen Fitmethode auch bei verrauschten Daten bestätigt werden, wobei der Simulations-Fit sogar verlässlichere Daten als die Deichmann-Methode liefert.

7.2.5. Partialvolumen-Effekte

Die Strukturen in biologischem Gewebe sind im Allgemeinen kleiner als die Voxelgröße in einem NMR-Experiment. Somit enthält ein Voxel in der Regel mehrere Gewebearten (z.B. Muskelgewebe, Fett, Kapillaren, Lymphgefäße, usw.) mit unterschiedlichen Relaxationszeiten. Diese Relaxationszeiten addieren sich zu einer multiexponentiellen Gesamtreaxation des Voxels, die in der NMR üblicherweise als monoexponentielle Funktion gefittet wird. Die so berechneten Werte entsprechen also nicht den wirklichen Relaxationszeiten des Gewebes. Enthält ein Voxel z.B. 50% Fett und 50% Muskelgewebe, so ist die resultierende T_1 -Zeit nicht das arithmetische Mittel der jeweiligen Relaxationszeiten. Diese Eigenschaft wird in der NMR als Partialvolumen-Effekt bezeichnet.

Um den Einfluss des Partialvolumen-Effektes auf den Algorithmus untersuchen zu können, wurde ein künstlicher biexponentieller Relaxationsdatensatz aus einem Voxel mit zwei verschiedenen Substanzen erzeugt. Die Substanz A hat eine Relaxationszeit von $T_{1a}=1500\text{ms}$ und einen Volumenanteil von V_a im Voxel, für Substanz B wurde eine Relaxationszeit von $T_{1b}=900\text{ms}$ und ein Volumenanteil von $V_b = 1 - V_a$ gewählt. Die Relaxationsdatensätze wurden für die zwei Substanzen separat generiert und gewichtet mit ihrem Volumenanteil zu einem biexponentiellen Datensatz addiert: $S = S_a \cdot V_a + S_b \cdot V_b$. Um das Ergebnis des Fits mit einem Soll- T_1 -Wert vergleichen zu können, muss dieser zuvor bestimmt werden, da der T_1 -Wert die monoexponentielle Lösung eines biexponentiellen Problems darstellt. Dazu wurde die Fehlerfunktion F

$$F = \int_0^\infty \left(V_a \left(1 - 2 \exp \left(-\frac{t}{T_{1a}} \right) \right) + V_b \left(1 - 2 \exp \left(-\frac{t}{T_{1b}} \right) \right) - \left(1 - 2 \exp \left(-\frac{t}{T_1} \right) \right) \right)^2 \delta t \quad (7.4)$$



(a) Berechnete T_1 -Werte in Abhängigkeit vom Volumenanteil der untersuchten Substanzen.

(b) Relativer Fehler der gefitteten T_1 -Werte bezüglich des Soll- T_1 -Wertes.

Abbildung 7.17.: (a) Darstellung der berechneten T_1 -Werte und (b) des relativen Fehlers in der Berechnung der T_1 -Werte aufgrund von Partialvolumeneffekten bezüglich des Soll- T_1 -Wertes. Simuliert wurden Datensätze mit verschiedenen Volumenanteilen von zwei Substanzen mit $T_{1a} = 1500\text{ms}$ bzw. $T_{1b} = 900\text{ms}$. Bei einem Volumenanteil von eins ist der komplette Voxel mit Substanz A gefüllt, bei null komplett mit Substanz B. Die blaue Linie gibt den Soll- T_1 -Wert an, die rote Linie stellt den Fit durch Simulation des Pulsprogramms dar, die grüne Kurve die Ergebnisse nach der Methode von Deichmann. Der Versatz zwischen dem Simulations-Fit und dem Deichmann-Fit ist auf die Unterschätzung der T_1 -Zeit bei der Fitmethode nach Deichmann zurückzuführen (siehe Kapitel 7.2.1).

der monoexponentiellen Lösung bezüglich der tatsächlichen, biexponentiellen Lösung nach T_1 abgeleitet und die Nullstellen bestimmt. Von den vier Lösungen existiert nur eine physikalisch sinnvolle, welche zur Berechnung des Soll- T_1 -Wertes verwendet wurde (siehe Anhang A.5).

Abbildung (7.17) stellt die gefitteten T_1 -Werte und den relativen Fehler der monoexponentiellen Berechnung bezüglich des Soll- T_1 -Wertes aufgrund von Partialvolumeneffekten dar. Hierbei wurden wieder künstliche Datensätze für die zwei oben genannten Substanzen mit unterschiedlichen Volumenanteilen im Voxel erzeugt. Bei einem Volumenanteil von eins ist der komplette Voxel mit Substanz A gefüllt, bei Null ist er komplett mit Substanz B gefüllt. Zusätzlich zum Partialvolumeneffekt wurde in Abbildung (7.18) auch die Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$ simuliert. Der Fit wurde wieder mit einem festen Flipwinkel von 10° berechnet. Die rote Kurve stellt den Fit durch Simulation des Pulsprogramms dar, die grüne Kurve die Ergebnisse nach der Methode von Deichmann.

Wie aus den Darstellungen zu erkennen ist, erzeugt der Partialvolumeneffekt einen zusätzlichen Fehler in den gefitteten T_1 -Werten, der bei gleichem Volumenanteil der beiden Substanzen im Voxel am größten ist. Der größte relative Fehler zum berechneten Soll- T_1 -Wert beträgt für den Deichmann-Fit ca. 1.9% und für den Fit über Simulation des

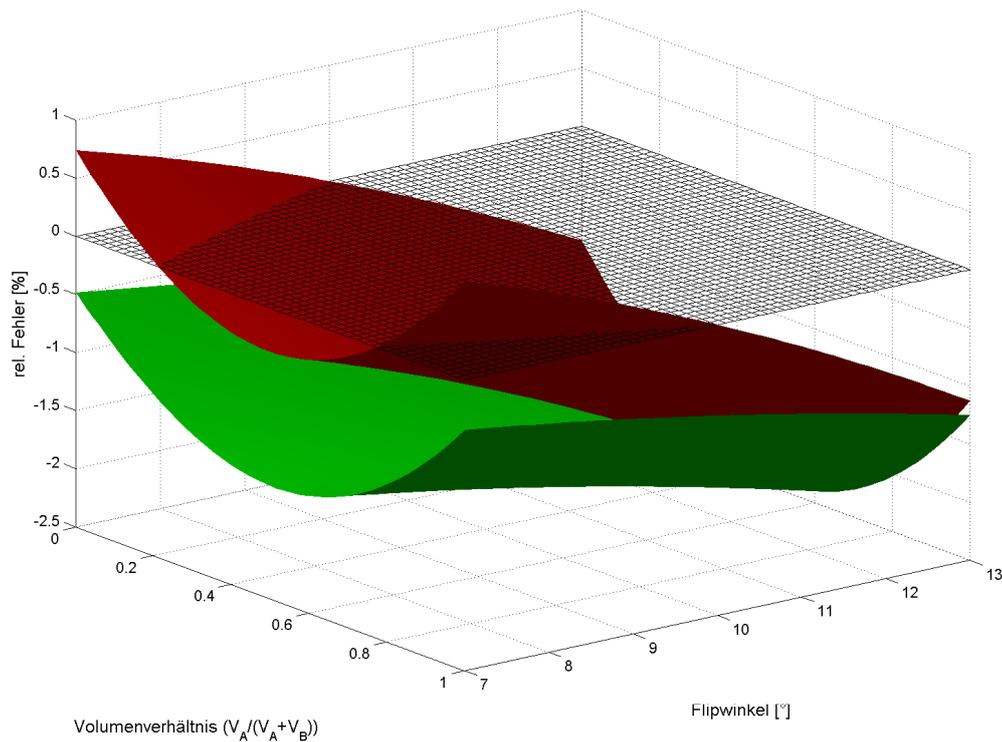


Abbildung 7.18.: Darstellung des relativen Fehlers in der Berechnung der T_1 -Werte aufgrund von Partialvolumeneffekten bezüglich des Soll- T_1 -Wertes. Simuliert wurden Datensätze mit verschiedenen Volumenanteilen von zwei Substanzen mit T_1 -Werten von $T_{1a} = 1500\text{ms}$ bzw. $T_{1b} = 900\text{ms}$. Bei einem Volumenanteil von eins ist der komplette Voxel mit Substanz A gefüllt, bei null komplett mit Substanz B. Zusätzlich zum Partialvolumeneffekt wurde auch die Flipwinkelvariation von $\pm 30\%$ bei einem Soll-Flipwinkel von 10° simuliert. Die rote Fläche stellt den Fit durch Simulation des Pulsprogramms dar, die grüne Kurve die Ergebnisse nach der Methode von Deichmann.

Pulsprogramms ca. 1.2%. Somit liefert der Simulations-Fit verlässlichere T_1 -Messwerte als die Deichmann-Methode. Ist das gesamte Voxel mit nur einer Substanz gefüllt, liefert der Simulations-Fit die exakten Relaxationswerte. Die Soll- T_1 -Werte für die Untersuchung der Partialvolumen-Effekte sind frei gewählt worden. Für andere Soll-Werte sind die Ergebniskurven jedoch lediglich anders skaliert – die Aussagen bleiben dieselben.

Ein weiterer Effekt, der auftritt, wenn sich mehr als eine Substanz in einem Voxel befindet, ist die Signalmodulation aufgrund der chemischen Verschiebung. Dabei wird die Signalamplitude wie bei der akustischen Schwebung durch die unterschiedlichen Larmorfrequenzen der Substanzen moduliert. Zu Echozeiten im Schwebungsknoten kommt es dadurch zur Signalabschwächung. Eine genauere Beschreibung sowie Messungen zu diesem Effekt sind in Anhang (A.6) zu finden. Da die Signalamplitude bei den konstanten Echozeiten des IR-Experimentes immer dieselbe ist, spielt dieser Effekt in den hier durchgeführten Messungen mit festen Echozeiten keine Rolle.

7.2.6. Gleichzeitige Messung von unterschiedlichen T_1 -Relaxationszeiten

Sollen die T_1 -Zeiten einer Probe mit sehr unterschiedlichen Relaxationszeiten gemessen werden, so müssen mehrere Einzelmessungen für verschiedene T_1 -Bereiche durchgeführt werden, um die Signalkurve in ausreichender zeitlicher Auflösung komplett erfassen zu können. Alternativ könnte der Signalverlauf mit sehr kurzen Repetitionszeiten der FLASH-Module abgetastet werden, was aber wiederum den dynamischen Bereich der Messung verkleinert, da das Signal gegen einen niedrigen Gleichgewichtswert relaxiert.

Abbildung (7.19) zeigt die gemessenen Relaxationskurven gemittelt über die ROIs von drei mit verschiedenen Konzentrationen an Magnevist (Schering Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) versetzten Wasserphantomen. Die Proben haben eine T_1 -Relaxationszeit von 145ms, 330ms bzw. 2912ms. Die Relaxationskurven wurden jeweils mit 16 Messpunkten abgetastet, wobei der zeitliche Abstand der Messpunkte an die entsprechende Relaxationszeit der Probe angepasst wurde um den gesamten Messbereich zu erfassen. Die Messparameter sind in Tabelle (7.2) zusammengefasst. Wie aus Abbildung (7.19) zu erkennen ist unterscheiden sich die Abstände der Messpunkte bei den drei Einzelmessungen deutlich (30ms, 80ms, 400ms), so dass der letzte Messwert 450ms, 1200ms bzw. 6000ms nach dem Inversionspuls akquiriert wurde.

Die hier vorgestellte Fitmethode ermöglicht die Erfassung der verschiedenen T_1 -Zeiten in nur einer Messung. Dabei wird das relaxierende Signal zu Beginn, kurz nach der Inversion, zeitlich dicht abgetastet und gegen Ende in deutlich größeren Zeitabständen. Dadurch können sowohl kurze als auch sehr lange Relaxationszeiten mit nur wenigen Messpunkten über den kompletten dynamischen Messbereich aufgezeichnet werden. Für die gleichzeitige Messung der drei Magnevist-Phantome wurde die Zeit zwischen den Anregungspulsen in den FLASH-Modulen exponentiell von 1.8ms bis 7500.0ms mit wachsendem Abstand vom Inversionspuls erhöht. Die Ergebnisse der Messung sind in

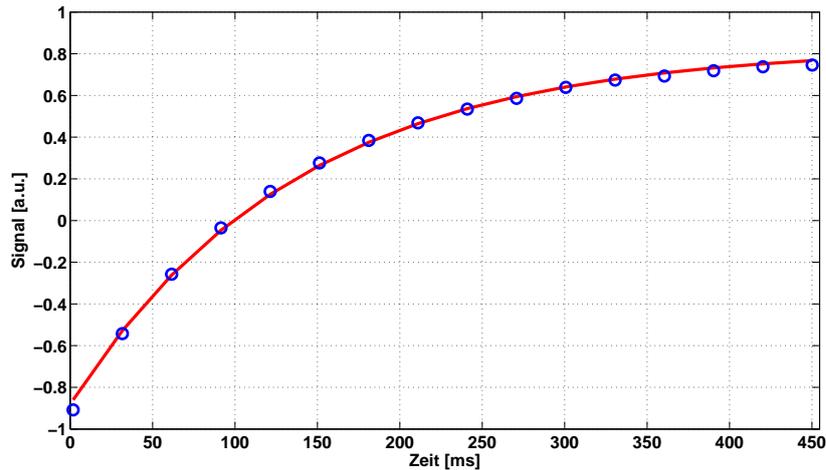
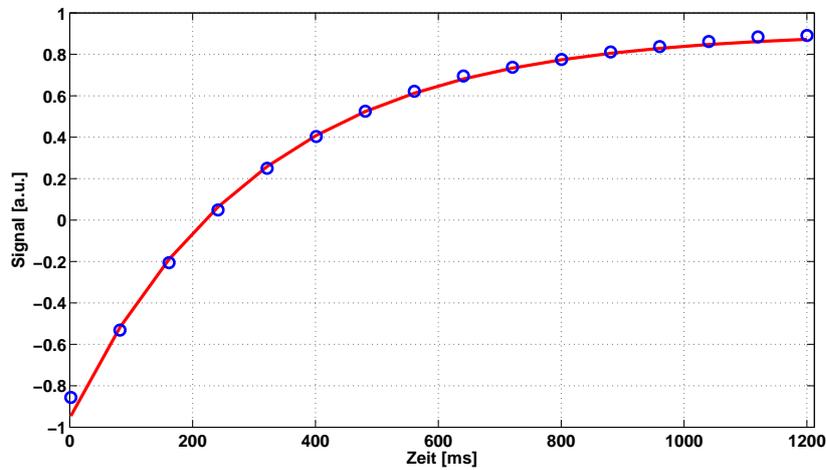
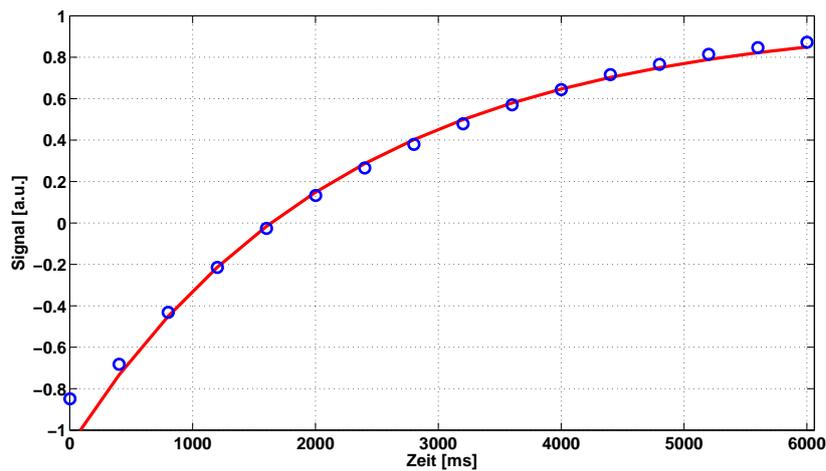
(a) Probe 1: T_1 -Relaxationszeit = 145ms.(b) Probe 2: T_1 -Relaxationszeit = 330ms.(c) Probe 3: T_1 -Relaxationszeit = 2912ms.

Abbildung 7.19.: Darstellung der T_1 -Relaxationszeitkurven und berechnete Relaxationszeit über die ROIs von drei mit verschiedenen Konzentrationen an Magnevist versetzten Wasserphantomen. Die Daten wurden in drei Einzelmessungen aufgenommen, wobei der zeitliche Abstand der Messpunkte an die entsprechende Relaxationszeit der Probe angepasst wurde. Die Messdaten sind als blaue Kreise dargestellt, der dazugehörige Fit als rote Linie.

Parameter	Wert
Field of View	16mm × 16mm
Bildauflösung	200µm × 200µm
Bildmatrix	80 × 80
Inversionspuls	Gauß, 4000Hz, 180°, global
Anregungspuls	Gauß, 3500Hz, 10°, 1.0mm
T_R -FLASH-Modul	30ms
	80ms
	400ms
	(1.8 → 7500)ms
T_R	1500ms
	2500ms
	7500ms
	14000ms
T_E	2.8ms
Segmente	80
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	2

Tabelle 7.2.: Sequenzparameter der T_1 -Messung an den Magnevist-Phantomen. Die Parameter T_R -FLASH-Modul und T_R für die zeitlich nicht äquidistant gepulste Messsequenz sind in fester Schrift angegeben.

Probe	T_1 [ms]	T_1 [ms]	rel. Fehler [%]
	Einzelmessung	Komplettmessung	
Probe 1	145.32	143.17	1.48
Probe 2	330.02	335.73	1.73
Probe 3	2912.30	2861.90	1.73

Tabelle 7.3.: Vergleich der Ergebnisse der T_1 -Einzelmessungen mit der gleichzeitigen Messung aller T_1 -Werte. Der Betrag des relativen Fehlers zwischen den Messungen ist in Prozent angegeben.

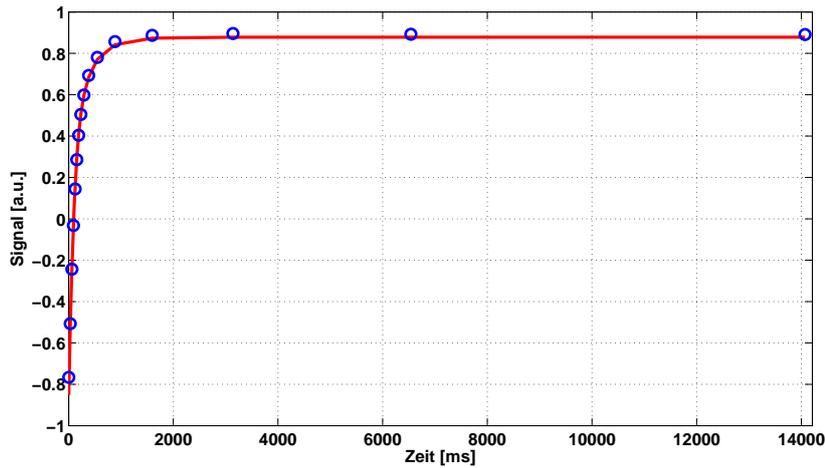
Abbildung (7.20) dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Abtastung der Relaxationskurve zu Beginn sehr dicht ist und zum Ende der Messung hin abnimmt. Der letzte Datenpunkt wird 14s nach dem Inversionspuls akquiriert, womit auch sehr lange T_1 -Repetitionszeiten erfasst werden können. In Tabelle (7.3) werden die Ergebnisse der Einzelmessungen mit der gleichzeitigen Messung aller T_1 -Relaxationswerte verglichen und der relative Fehler im Vergleich zu den Einzelmessungen angegeben. Der relative Fehler lag dabei deutlich unter 2%. Die relativen Fehler von zwei aufeinander folgenden T_1 -Zeit-Einzelmessungen mit denselben Messparametereinstellungen lagen bei ca. 1.5% bis teilweise über 2%. Damit liegen die Fehler der Komplettmessung im Bereich der Messungenauigkeit. Mit dieser Messmethode in Kombination mit dem vorgestellten Fitalgorithmus kann somit eine große Bandbreite von unterschiedlichen Relaxationszeiten in nur einer Messung sehr genau bestimmt werden.

7.2.7. Zusammenfassung der Simulationsergebnisse

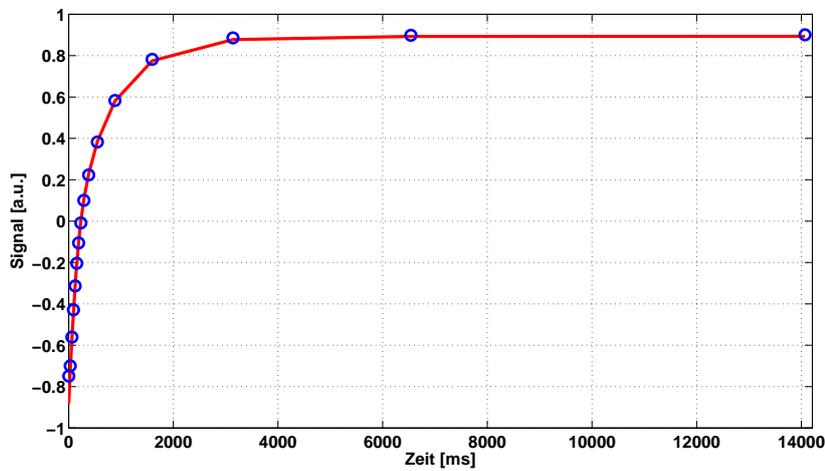
Insgesamt verdeutlichen die Untersuchungen an künstlich generierten Datensätzen mit definierten Soll-Werten, dass der Fit durch Simulation des Pulsprogramms robuster als die Deichmann-Fitmethode ist und genauere Resultate liefert. Die zwei großen Vorteile dieser Methode sind zum Einen die Aufhebung der Limitierung auf kleine Anregungswinkel, wodurch das SNR und damit die Stabilität des Fits erhöht werden konnte. Zum Anderen müssen die Anregungspulse nicht zeitlich äquidistant geschaltet werden und das System nicht in einen Gleichgewichtszustand laufen, wodurch viel größere Freiheit bei der Entwicklung neuer Pulssequenzen gegeben ist. Diese Vorteile konnten in einem Beispiexperiment an Magnevist-Proben ausgenutzt werden um einen großen Bereich von T_1 -Relaxationszeiten in nur einer Messung zu erfassen und die jeweiligen T_1 -Werte zu bestimmen.

Für äquidistante Pulsschaltzeitpunkte lässt sich das dargestellte Verhalten des Simulations-Fits auch durch eine analytische Funktion beschreiben. Dabei werden die Näherungen, die Deichmann für kleine Anregungspulswinkel eingeführt hat, um unabhängig vom Flipwinkel zu sein [27], nicht angewendet. Damit ergibt sich als Modellfunktion für

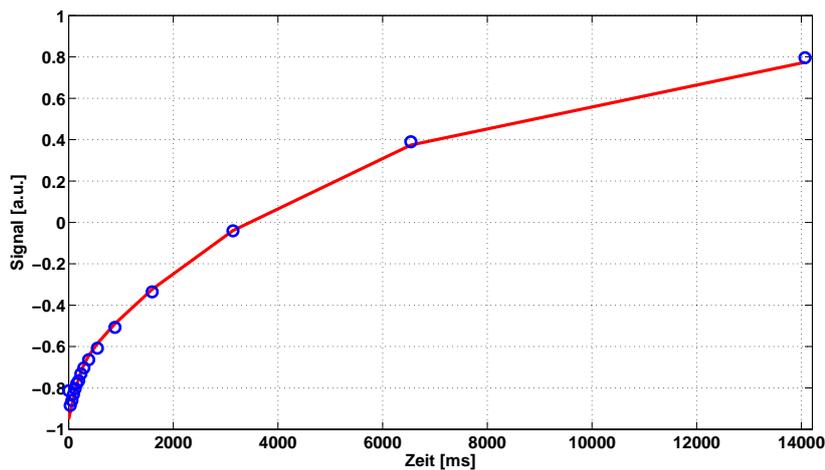
7. Berechnung von Relaxationszeiten über Pulsprogrammsimulationen



(a) Probe 1: T_1 -Relaxationszeit = 145ms.



(b) Probe 2: T_1 -Relaxationszeit = 330ms.



(c) Probe 3: T_1 -Relaxationszeit = 2912ms.

Abbildung 7.20.: Darstellung der T_1 -Relaxationszeitkurven über die ROIs von drei mit verschiedenen Konzentrationen an Magnevist versetzten Wasserphantomen. Die Daten wurden in einer Messungen aufgenommen, wobei der zeitliche Abstand der Messpunkte exponentiell verlängert wurde. Die Messdaten sind als blaue Kreise dargestellt, der dazugehörige Fit als rote Linie.

den T_1 -Signalverlauf $M_0(t)$ nach einer Inversion [26]:

$$M(t) = M_0 \left(M_\infty - (1 + M_\infty) \cdot \exp\left(-t/T_1^*\right) \right) \quad (7.5)$$

mit

$$T_1^* = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_R} \log(\cos(\alpha)) \right)^{-1}$$

$$M_\infty = \frac{1 - \exp\left(-T_R/T_1\right)}{1 - \exp\left(-T_R/T_1^*\right)}$$

und α als Anregungspulswinkel in den FLASH-Modulen, T_R der Repetitionszeit der FLASH-Module und den Fitparametern M_0 als Gleichgewichtsmagnetisierung und der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Die Repetitionszeit der FLASH-Module geht hier als Konstante ein, was der Grund dafür ist, dass diese analytische Lösung und auch das Fitverfahren nach Deichmann nur für zeitlich äquidistant geschaltete Pulssequenzen valide Ergebnisse für die T_1 -Repetitionszeit liefern. Der Fit an das IR-Signal ist umso stabiler je größer der dynamische Bereich ist, der mit der Messung erfasst werden kann. Dadurch entsteht folgendes Optimierungsproblem bei der analytischen Fitmethode: Der erste Datenpunkt sollte so früh wie möglich nach dem Inversionspuls erfasst werden um einen Messpunkt nahe $-M_0$, dem kleinsten Wert der Kurve, zu akquirieren. Diese Zeitspanne von Inversionspuls zu erstem Anregungspuls legt die Repetitionszeit für alle nachfolgenden FLASH-Module fest. Durch die kurze Repetitionszeit sind viele FLASH-Module nötig um die komplette Relaxationskurve bis zur Gleichgewichtsmagnetisierung erfassen zu können. Dies führt wiederum dazu, dass das Signal gegen einen kleinen M_0^* -Wert relaxiert, was zur Folge hat, dass der Messbereich gestaucht wird. Wird jedoch eine lange Repetitionszeit gewählt, um die Kurve mit weniger FLASH-Modulen abzutasten, schränkt der späte Akquisitionszeitpunkt des ersten Messpunktes den Messbereich ein. Es muss also, um die analytische Fitmethode anwenden zu können, bei der Wahl der Repetitionszeit ein Kompromiss zwischen maximal möglichem negativen und positiven Akquisitionszeitpunkt im dynamischen Messbereich eingegangen werden. Bei dem hier vorgestellten Simulations-Fit dagegen können die Parameter frei und damit optimal gewählt werden, was bei der gleichzeitigen Messung von kurzen und langen T_1 -Zeiten gezeigt werden konnte.

7.3. Kombinierte T_1/T_2^* Messung

Die Aufhebung der Limitierung auf zeitlich äquidistanten Schalten der Anregungspulse des Simulations-Fitalgorithmus wurde ausgenutzt, um eine neue NMR-Sequenz zur simultanen Messung der T_1 - und T_2^* -Relaxationszeit zu realisieren. Ausgangspunkt ist die von Look und Locker [25] entwickelte Inversion-Recovery-Sequenz zur schnellen Messung von T_1 -Relaxationszeiten. Bei der neuen kombinierten Messmethode wird die Echozeit mit steigendem zeitlichen Abstand vom Inversionspuls verlängert, wodurch es möglich ist, zusätzlich zur T_1 - auch die T_2^* -Relaxationszeit zu bestimmen. Die Messdauer bleibt dabei dieselbe wie bei der herkömmlichen T_1 -Messung. Durch diesen Eingriff sind die Schaltzeitpunkte der Anregungspulse, aufgrund der Erhöhung der Echozeit, nicht mehr äquidistant und die Fitroutine von Deichmann kann nicht angewendet werden. Mit dem hier vorgestellten Simulations-Fit ist die Berechnung aber problemlos möglich.

Um einen möglichst großen dynamischen Bereich auszunutzen, wird die Echozeit direkt nach dem Inversionspuls kurz gehalten und erst in der zweiten Hälfte der Spin-Gitter-Relaxations-Kurve deutlich erhöht⁶. Dieses Verhalten ist durch einen exponentiellen Anstieg der Echozeit mit wachsendem zeitlichen Abstand zum Inversionspuls realisiert worden:

$$T_E = T_{E,min} + (T_{E,max} - T_{E,min}) \frac{\exp\left(\rho \frac{t_i}{N_I}\right) - 1}{\exp(\rho) - 1} \quad (7.6)$$

mit $T_{E,min}$ als minimale Echozeit, $T_{E,max}$ als maximale Echozeit, die mit dem letzten FLASH-Modul der Messserie ausgelesen werden soll, N_I der Anzahl an Messpunkten auf der Relaxationskurve, t_i dem Messpunkt als Laufparameter zwischen 1 und N_I und ρ dem Parameter, der den exponentiellen Anstieg beschreibt. In Abbildung (7.21) sind die Pulssequenzen der konventionellen IR-FLASH Sequenz und die der neuen Methode zur simultanen Messung der T_1 - und T_2^* -Relaxationszeit schematisch dargestellt. Aus Diagramm (7.21b) ist zu erkennen, dass weder die Echozeiten (T_E) noch die Repetitionszeiten (T_R) der einzelnen FLASH-Module konstant sind.

Eine Simulation der Signalverläufe der longitudinalen und transversalen Magnetisierung ist in Abbildung (7.22) dargestellt. Die grüne Linie gibt den Verlauf der normalen IR-Sequenz wieder, die rote den der kombinierten Messesequenz. In Diagramm (7.22a) ist zu erkennen, dass die longitudinale Magnetisierung der herkömmlichen IR-Sequenz (grüne Kurve) gegen den festen Grenzwert M_0^* relaxiert, die der kombinierten Messesequenz (rote Kurve) aber, aufgrund der mit der Inversionszeit ansteigenden Repetitionszeit der FLASH-Module, gegen M_0^7 . Abbildung (7.22b) zeigt den Signalverlauf der Sequenzen in der Transversalebene. Durch die exponentiell verlängerte Echozeit relaxiert das Signal der kombinierten Messesequenz am Ende der Messung gegen Null. Dennoch wird ein großer Teil des dynamischen Messbereiches in der ersten Hälfte der Sequenz genutzt, was eine hohe Stabilität des Fits gewährleistet.

Abbildung (7.23) zeigt das Verhalten des Fitalgorithmus auf Flipwinkelvariationen in

⁶95% des dynamischen Bereiches von $-M_0$ bis $+M_0$ sind bereits nach $3 \times T_1$ durchlaufen.

⁷Hier wurde für M_0 der Wert eins gewählt.

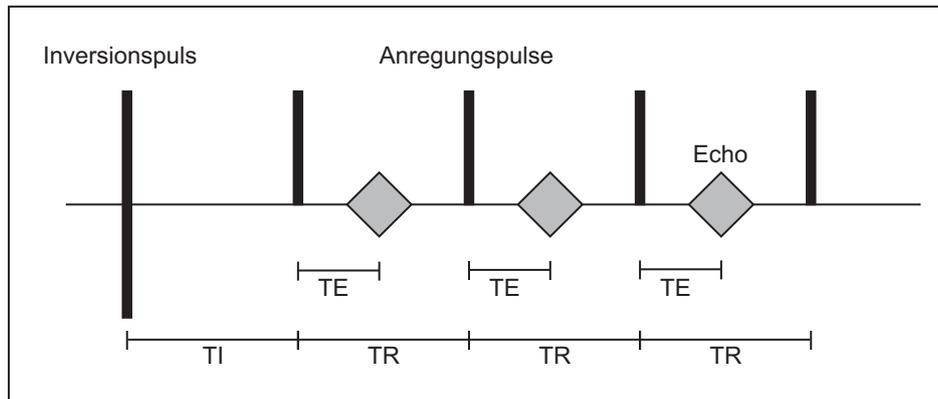
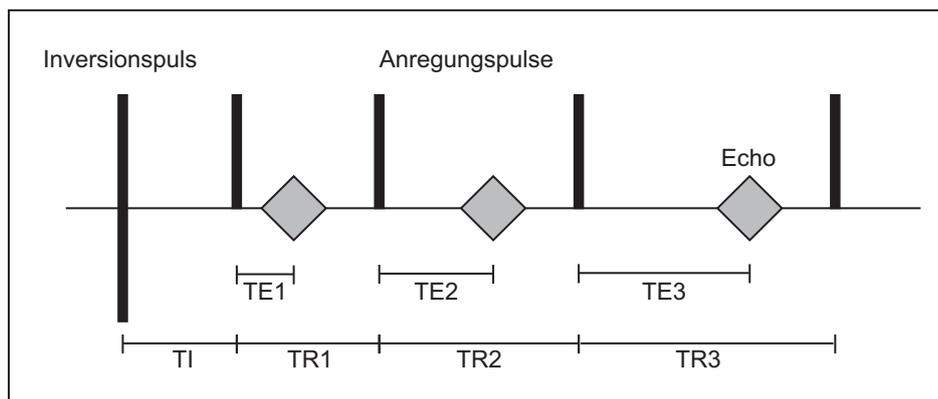
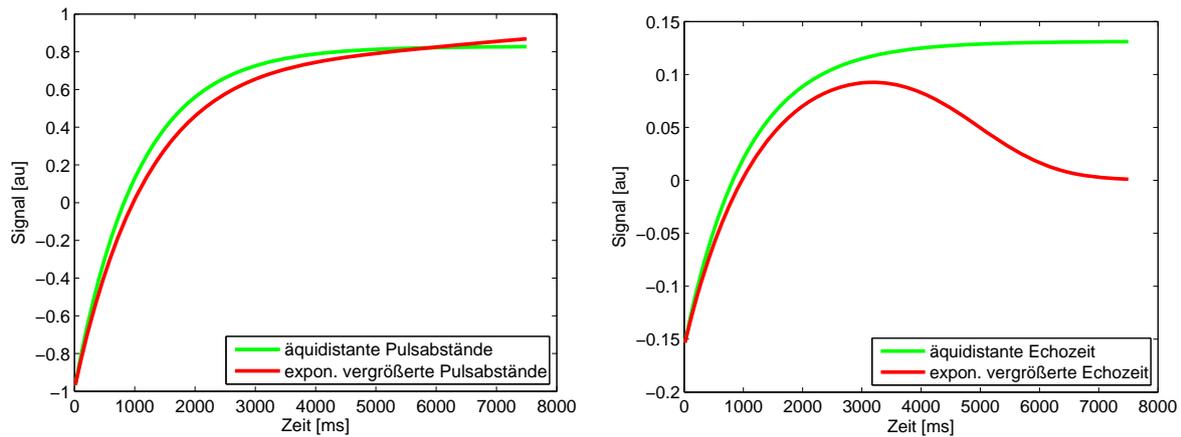
(a) Pulssequenz zur Messung der T_1 -Relaxationszeit.(b) Pulssequenz zur simultanen Messung der T_1 - und T_2^* -Relaxationszeit.

Abbildung 7.21.: Schematische Darstellung der Pulsprogramme (a) einer konventionellen Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH Pulssequenz zur Messung von T_1 und (b) der neuen Pulssequenz zur simultanen Messung der T_1 - und T_2^* -Relaxationszeit. Der lange schwarze Balken stellt den Inversionspuls dar, die kürzeren Balken repräsentieren die Anregungspulse der FLASH-Module. Das um 90° gedrehte Rechteck symbolisiert das Echo. T_I ist die Zeit zwischen Inversionspuls und erstem Anregungspuls, T_R die Zeitdauer zwischen zwei Anregungspulsen und T_E die Echozeit.



(a) Verhalten der longitudinalen Magnetisierung.

(b) Verhalten der transversalen Magnetisierung.

Abbildung 7.22.: Simulation der Signalverläufe der longitudinalen und transversalen Magnetisierung. Die grüne Linie gibt den Verlauf der normalen IR-Sequenz wieder die rote den der kombinierten Messsequenz. (a) Die longitudinale Magnetisierung der grünen Kurve relaxiert gegen den festen Grenzwert (M_0^*), die der roten Kurve aufgrund der mit der Inversionszeit ansteigenden Repetitionszeit der FLASH-Module gegen M_0 . (b) Durch die exponentiell verlängerte Echozeit relaxiert das Signal der kombinierten Messsequenz (rote Linie) am Ende der Messung gegen null.

künstlich generierten Daten. Die rote Linie stellt das Verhalten der gefitteten T_1 -Relaxationszeit, die grüne Linie das Verhalten der T_2^* -Relaxationszeit dar. Als Eingangswert wurde wieder eine T_1 -Zeit von 1500ms und als T_2^* -Zeit ein Wert von 30ms gewählt. Diagramm (7.23a) stellt die Fitwerte für unverrauschte Daten mit einem Soll-Flipwinkel von 10° , Diagramm (7.23b) von 15° dar. In Abbildung (7.23c) wurde ein SNR von 100 und ein Soll-Flipwinkel von 10° eingestellt, wobei der Signalwert und die Standardabweichung analog zu dem in Kapitel (7.2.4) beschriebenen Verfahren berechnet wurden. Die durchgängigen schwarzen Linien in den Diagrammen kennzeichnen einen relativen Fehler von $\pm 5\%$ vom Soll-Wert in T_1 bzw. T_2^* . Wie zu erkennen ist, ist der Algorithmus robust genug, um bei einem SNR von 100 und Flipwinkelvariationen von $\pm 30^\circ$ noch verlässliche Relaxationswerte mit einer Standardabweichung von weniger als $\pm 5\%$ zu liefern.

Auch der Einfluss des Partialvolumen-Effektes auf die kombinierte Messung wurde untersucht. Betrachtet wurden dabei zwei Fälle: Einmal sind T_1 und T_2^* von Substanz A größer als von Substanz B. Im zweiten Fall ist T_1 von Substanz A größer und T_2^* kleiner als von Substanz B. Die Berechnung des Soll- T_2^* -Wertes geschieht analog zu dem in Kapitel (7.2.5) beschriebenen Verfahren. Die resultierende Gleichung für die Nullstellen der T_2^* -Fehlerfunktion ist dabei dieselbe wie für die T_1 -Fehlerfunktion (siehe Anhang A.5). Abbildungen (7.24a) und (7.24b) zeigen die relativen Fehler in den Relaxationszeitberechnungen für den ersten Fall mit $T_{1a}=1500\text{ms}$, $T_{2a}^*=60\text{ms}$, $T_{1b}=900\text{ms}$ und $T_{2b}^*=30\text{ms}$. In Abbildungen (7.24c) und (7.24d) ist der zweite Fall mit $T_{1a}=1500\text{ms}$, $T_{2a}^*=30\text{ms}$, $T_{1b}=900\text{ms}$ und $T_{2b}^*=60\text{ms}$ dargestellt. Wie zu erkennen ist

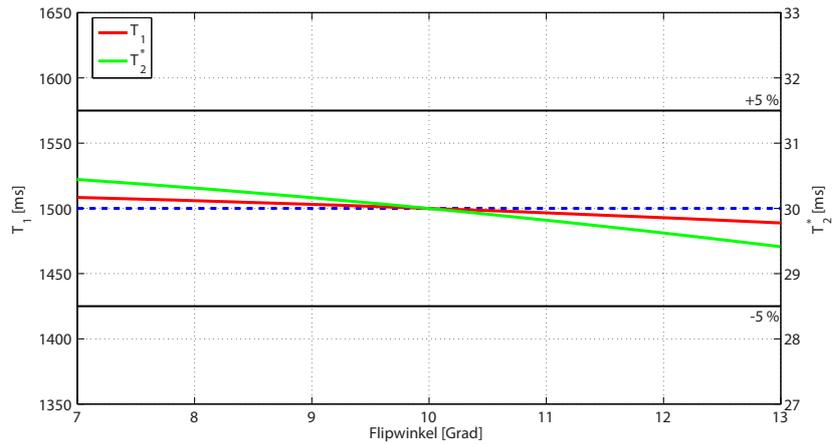
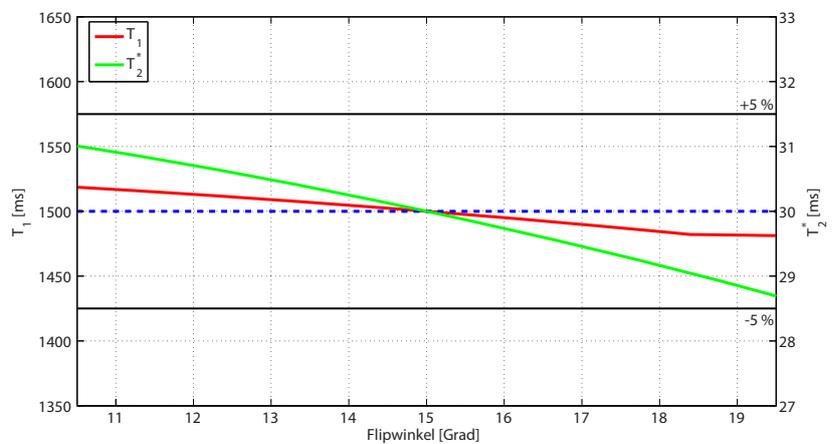
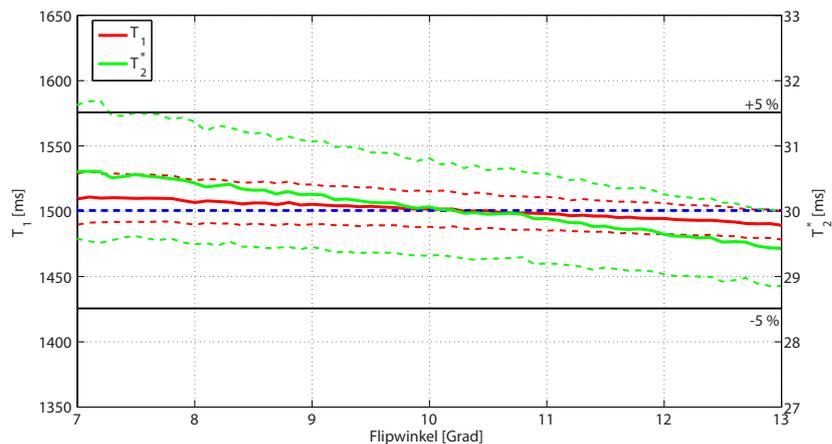
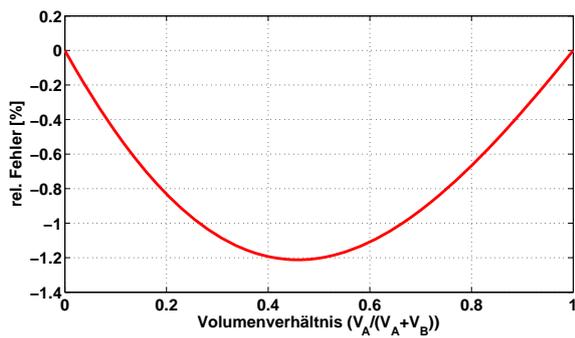
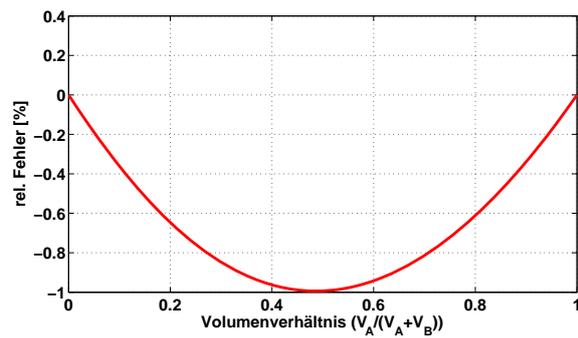
(a) Unverrauschte Daten, Soll-Flipwinkel 10° .(b) Unverrauschte Daten, Soll-Flipwinkel 15° .(c) Mittelwert (durchgezogene Linie) und Standardabweichung (unterbrochene Linien) des T_1 - und T_2^* -Verlaufes, berechnet aus jeweils 1000 verrauschten, künstlichen Datensätzen mit einem SNR von 100 und einem Soll-Flipwinkel von 10° .

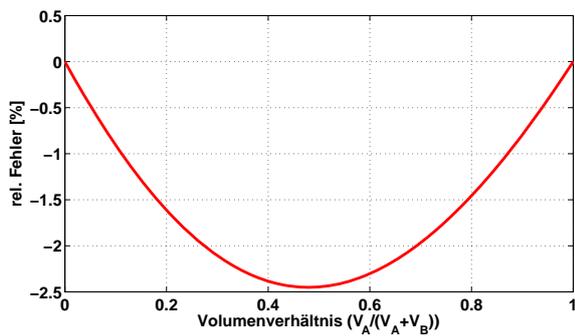
Abbildung 7.23.: Darstellung des Verhaltens der kombinierten Fitmethode auf Flipwinkelvariationen ((a) und (b)) und Rauschen (c) bei künstlich generierten Daten. Die rote Linie stellt die T_1 -Fitergebnisse, die grüne Linie die T_2^* -Fitergebnisse dar. Der Soll- T_1 -Wert liegt bei 1500ms, der Soll- T_2^* -Wert bei 30ms und ist jeweils durch die unterbrochene blaue Linie dargestellt.



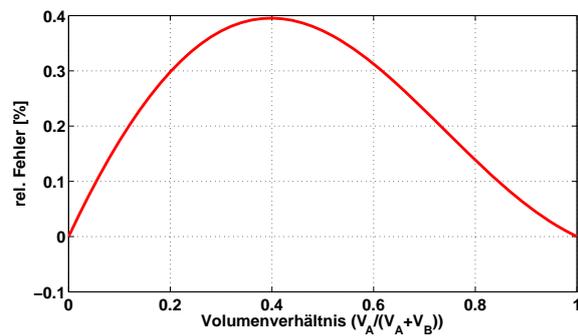
(a) Relativer Fehler in T_1 .



(b) Relativer Fehler in T_2^* .



(c) Relativer Fehler in T_1 .



(d) Relativer Fehler in T_2^* .

Abbildung 7.24.: Darstellung der relativen Fehler in T_1 und T_2^* aufgrund von Partialvolumen-Effekten. (a) und (b) zeigen die relativen Fehler für $T_{1a}=1500\text{ms}$, $T_{2a}^*=60\text{ms}$, $T_{1b}=900\text{ms}$ und $T_{2b}^*=30\text{ms}$. (c) und (d) zeigen die relativen Fehler für $T_{1a}=1500\text{ms}$, $T_{2a}^*=30\text{ms}$, $T_{1b}=900\text{ms}$ und $T_{2b}^*=60\text{ms}$.

liegen bei allen Simulationen die relativen Fehler unter 2.5%. Der Verlauf des relativen Fehlers von T_2^* ist dabei abhängig von der gewählten maximalen Echozeit bis zu der das Signal noch akquiriert werden soll.

Die längste T_2^* -Zeit einer Probe, die noch bestimmt werden soll, gibt die maximale Echozeit der letzten Akquisition am Ende der Relaxationskurve vor. Die exponentielle Verlängerung der Echozeit hat, im Gegensatz zu einem linearen Anstieg den Vorteil, dass auch kurze T_2^* -Relaxationszeiten erfasst werden, da die T_2^* -Relaxationskurve zu Beginn in sehr kurzen Zeitabständen abgetastet wird. Dieses Abtastschema lässt sich durch die Wahl des Parameters ρ in der Exponentialfunktion (7.6), die das Anwachsen der Echozeiten in den FLASH-Modulen beschreibt, auf die jeweilige Messsituation (den gewünschten T_2^* -Messbereich) einstellen. Bei den Messungen in dieser Arbeit hat sich dabei ein Wert von sieben für den Parameter ρ als optimal erwiesen, bei dem die Relaxationskurve einen großen dynamischen Messbereich durchläuft und genügend Datenpunkte in der letzten Hälfte des Kurvenverlaufes akquiriert, um den T_2^* -Abfall stabil fitzen zu können. Die Schwebungs-Effekte der chemischen Verschiebung können hier, wie in Kapitel (A.6) beschrieben, vernachlässigt werden.

7.4. Phantom und *in vivo* Messungen

Um die Simulationen an realen Messungen zu validieren, wurde die kombinierte T_1/T_2^* -Messung an Phantomen und *in vivo* an einem Tumor der Linie FaDu und einem Mäusehirn durchgeführt. Als Phantom wurden Probenröhrchen, gefüllt mit destilliertem Wasser und verschiedenen Konzentrationen an Magnevist, verwendet. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit wurde nach Deichmann mit der in Kapitel (2.1.8) beschriebenen Messsequenz bestimmt. Die T_2^* -Relaxationszeit wurde mit der Multi-Gradientenecho-Sequenz aus Kapitel (2.1.9) quantifiziert. Diese Relaxationswerte dienten als Referenzwerte für die kombinierte Messung. Alle Messungen wurden am 17.6T Spektrometer durchgeführt. Die Sequenzparameter der Phantom-, Tumor- und Mäusehirnmessungen sind in den Tabellen (7.4), (7.5) und (7.6) angegeben.

7.5. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Phantom- und *in vivo* Messungen sind in Tabelle (7.7) zusammengefasst. Betrachtet wurde jeweils ein ROI über das komplette Probenvolumen bzw. des kompletten Tumors oder Mäusehirns. Die Messwerte der kombinierten Messsequenz wurden mit den Werten der Einzelmessungen verglichen und der Betrag des relativen Fehlers in Prozent berechnet. Dieser lag bei allen Messungen unter 5.5%. Der vergleichsweise hohe relative Fehler von 5.5% in der T_2^* -Messung des Mäusehirns lässt sich durch die niedrigen T_2^* -Werte von ca. 10ms erklären. Denn damit bewirken kleine Schwankungen in der Relaxationszeit von nur 0.55ms einen relativen Fehler von 5.5%. Ein Vergleich von zwei aufeinander folgenden T_2^* -Messungen, akquiriert mit

Parameter	Wert
Gemeinsame Parameter	
Field of View	16mm × 16mm
Bildauflösung	500µm × 500µm
Bildmatrix	32 × 32
Parameter der T_1-Messung	
Inversionspuls	Sech, 3500Hz, 180°, global
Anregungspuls	Gauß, 3500Hz, 10°, 1.0mm
T_R	3s
T_E	2.5ms
Segmente	32
Anzahl Bilder	45
Anzahl Mittelungen	4
Parameter der T_2^*-Messung	
Anregungspuls	Sinc, 3500Hz, 60°, 1.0mm
T_R	300ms
T_E	4ms
Anzahl Bilder	50
Anzahl Mittelungen	16
Parameter der T_1/T_2^*-Messung	
Inversionspuls	Sech, 3500Hz, 180°, global
Anregungspuls	Gauß, 3500Hz, 10°, 1.0mm
T_R	3s
erstes Echo nach Inversion	2.5ms
letztes Echo nach Inversion	884.1ms
Segmente	32
Anzahl Bilder	45
Anzahl Mittelungen	4

Tabelle 7.4.: Sequenzparameter der T_1/T_2^* -Messung am Phantom.

Parameter	Wert
Gemeinsame Parameter	
Field of View	16mm × 16mm
Bildaufösung	200µm × 200µm
Bildmatrix	80 × 80
Parameter der T_1-Messung	
Inversionspuls	Sech, 3500Hz, 180°, global
Anregungspuls	Hermite, 3500Hz, 10°, 1.2mm
T_R	9s
T_E	2.5ms
Segmente	80
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	16
Parameter der T_2^*-Messung	
Anregungspuls	Sinc, 3500Hz, 60°, 1.0mm
T_R	300ms
T_E	4ms
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	8
Parameter der T_1/T_2^*-Messung	
Inversionspuls	Sech, 3500Hz, 180°, global
Anregungspuls	Gauß, 3500Hz, 10°, 1.2mm
T_R	9s
erstes Echo nach Inversion	2.9ms
letztes Echo nach Inversion	8750.0ms
Segmente	80
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	16

Tabelle 7.5.: Sequenzparameter der *in vivo* T_1/T_2^* -Messung am FaDu-Tumor.

Parameter	Wert
Gemeinsame Parameter	
Field of View	17mm × 17mm
Bildauflösung	133µm × 133µm
Bildmatrix	128 × 128
Parameter der T_1-Messung	
Inversionspuls	Sech, 4000Hz, 180°, 5.0mm
Anregungspuls	Hermite, 3500Hz, 10°, 1.0mm
T_R	8.5s
T_E	3.1ms
Segmente	128
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	2
Parameter der T_2^*-Messung	
Anregungspuls	Sinc, 3500Hz, 30°, 1.0mm
T_R	280ms
T_E	3.8ms
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	8
Parameter der T_1/T_2^*-Messung	
Inversionspuls	Sech, 4000Hz, 180°, 5.0mm
Anregungspuls	Gauß, 3500Hz, 10°, 1.0mm
T_R	8.5s
erstes Echo nach Inversion	7.2ms
letztes Echo nach Inversion	7657.5ms
Segmente	128
Anzahl Bilder	16
Anzahl Mittelungen	2

Tabelle 7.6.: Sequenzparameter der *in vivo* T_1/T_2^* -Messung am Mäusehirn.

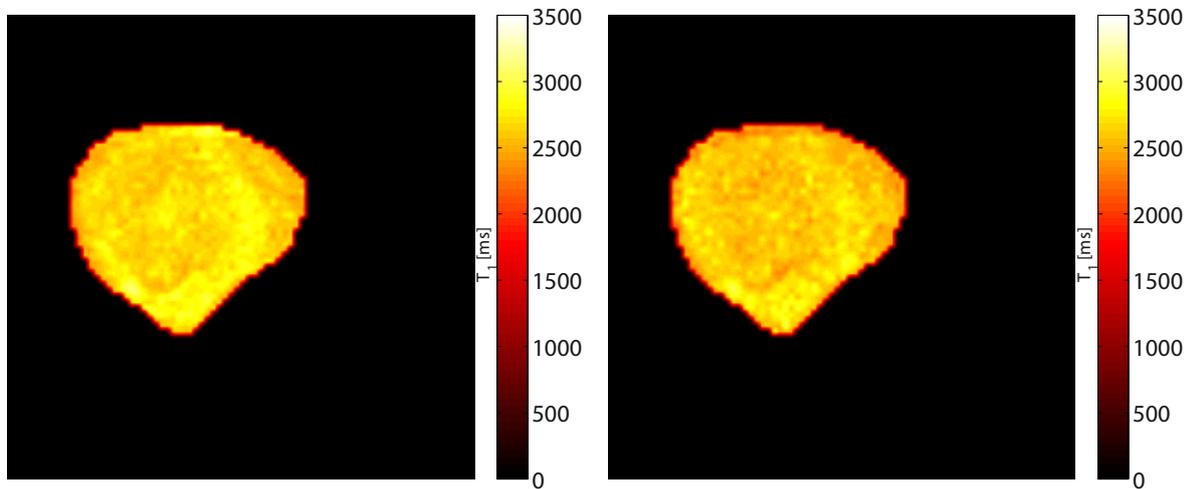
Probe	T_1 -Referenz [ms]	T_1 [ms]	rel. Fehler [%]
Phantom 1	90.18	90.98	0.88
Phantom 2	91.70	91.50	0.22
Phantom 3	402.94	407.33	1.09
Tumor	2668.01	2610.58	2.15
Mäusehirn	1849.5	1850.3	0.04

Probe	T_2^* -Referenz [ms]	T_2^* [ms]	rel. Fehler [%]
Phantom 1	48.90	50.33	2.92
Phantom 2	49.00	49.50	1.02
Phantom 3	168.39	169.02	0.37
Tumor	19.99	19.91	0.38
Mäusehirn	10.02	10.57	5.44

Tabelle 7.7.: Vergleich der Ergebnisse der kombinierten Messung mit den Referenzwerten. Die Messwerte der kombinierten Messsequenz wurden mit den Referenzwerten verglichen und der Betrag des relativen Fehlers in Prozent berechnet. Die T_1 -Referenzwerte wurden mit der IR-Sequenz, die T_2^* -Referenzwerte mit der MGE-Sequenz bestimmt. (Der relative Fehler wurde mit den exakten, nicht mit den hier angegebenen gerundeten, Messwerten berechnet)

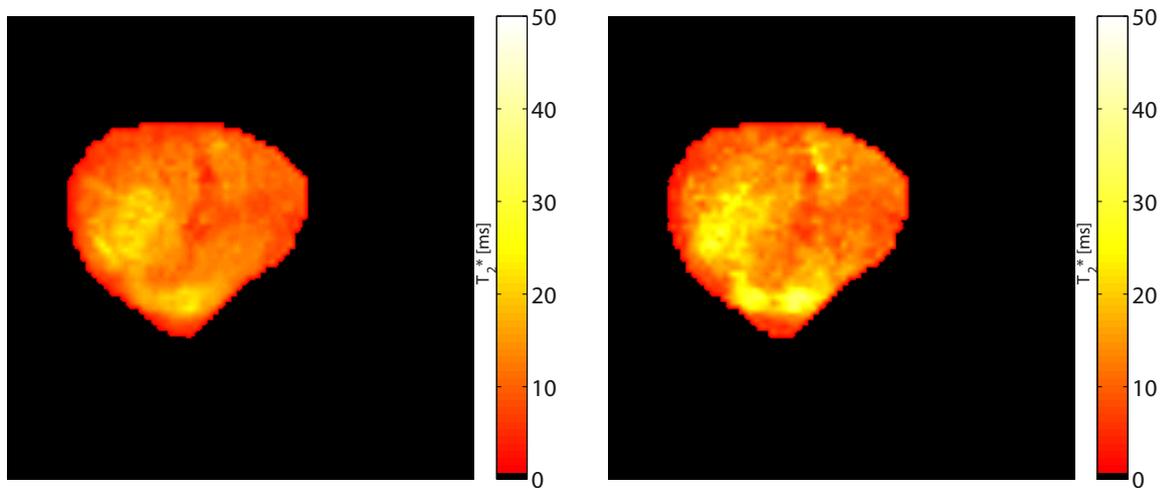
der MSE-Sequenz und den selben Messparametern, ergab einen relativen Fehler von 6.63% (Messung 1: $T_2^*=10.02\text{ms}$, Messung 2: $T_2^*=9.36\text{ms}$). Damit liegt der Messfehler innerhalb der Messtoleranz. Die relativen Fehler der übrigen Messungen, mit größeren absoluten Messwerten, liegen alle unter 3%. Die T_1 - und T_2^* -Parameterkarten der *in vivo* Messungen sind in Abbildung (7.25) und (7.26) dargestellt. Die Strukturen innerhalb des Tumors bzw. des Gehirns in den Einzelmessungen sind in den kombinierten Messungen klar wieder zu erkennen. Auch die Relaxationswerte werden in der kombinierten Messung korrekt wiedergegeben. Die kombinierte Messung am Mäusehirn wurde nur zweimal gemittelt, was das etwas höhere Rauschen in der T_2^* -Parameterkarte im Vergleich zur MSE-Messung (acht Mittelungen) erklärt. Der Bereich mit erhöhter T_2^* -Zeit in der linken Hälfte des Mäusehirns (grauer Pfeil in der Parameterkarte (7.26c)) ist auf einen Shim-effekt zurückzuführen. Die automatische Shimroutine FASTMAP hat in diesem Areal das Magnetfeld homogener einstellen können als in den übrigen Bereichen des Gehirns, was zu den langen T_2^* -Zeiten führt.

In Abbildung (7.27) ist der Signalverlauf eines typischen Voxels aus dem FaDu-Tumor mit der dazu berechneten Fitkurve dargestellt. Wie zu erkennen ist, gibt der Fit den tatsächlichen Signalverlauf sehr gut wieder. Mit diesen Ergebnissen konnte bestätigt werden, dass sich das Modell sehr gut zur Beschreibung des Signalverlaufs und zum Fit



(a) T_1 -Parameterkarte, Einzelmessung.

(b) T_1 -Parameterkarte, kombinierte Messung.



(c) T_2^* -Parameterkarte, Einzelmessung.

(d) T_2^* -Parameterkarte, kombinierte Messung.

Abbildung 7.25.: Vergleich der T_1 - und T_2^* -Parameterkarten akquiriert als Einzelmessung (linke Spalte) und als kombinierte Messung (rechte Spalte). Dargestellt ist ein Schnitt durch den kompletten Tumor der FaDu-Linie.

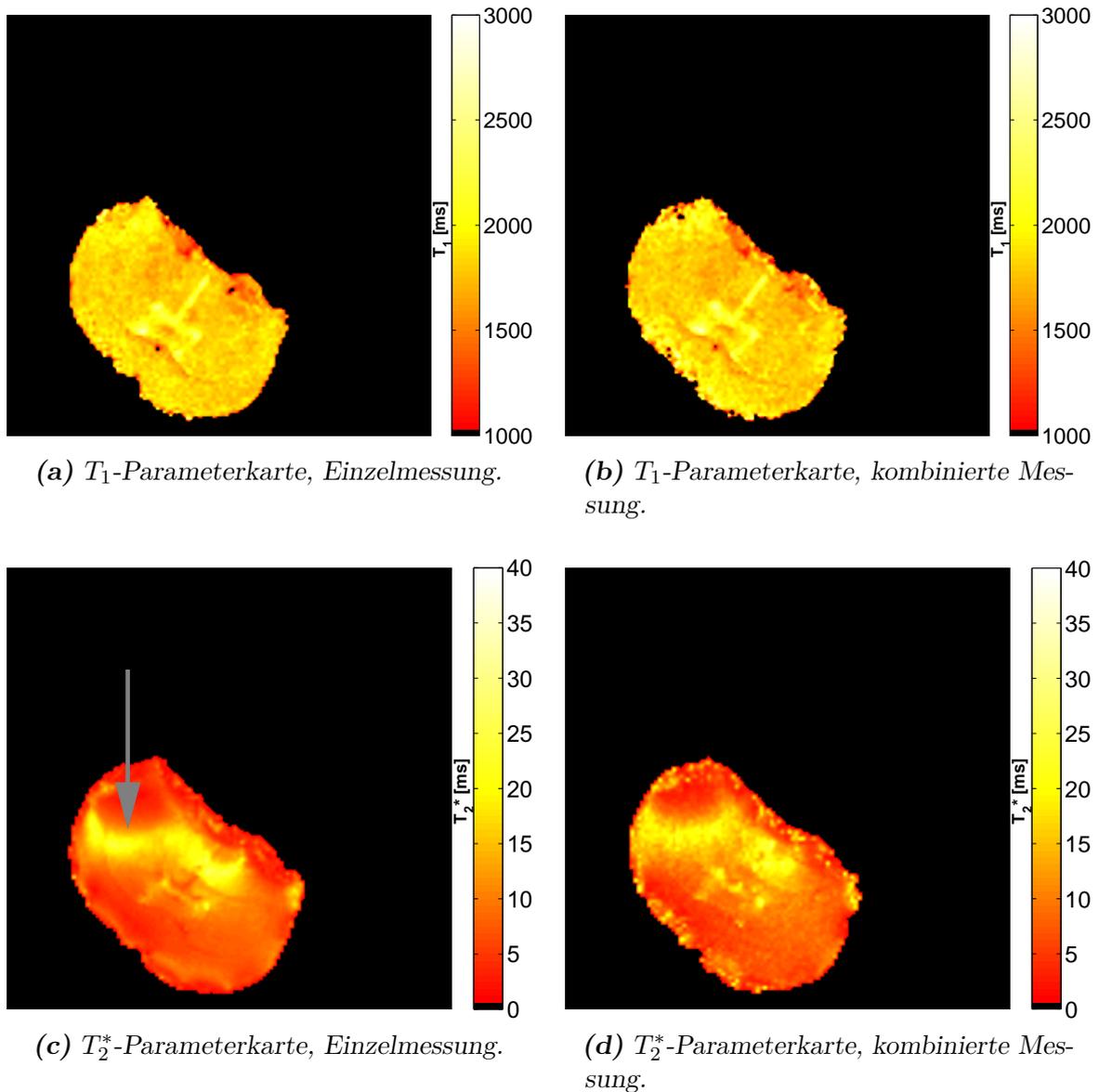


Abbildung 7.26.: Vergleich der T_1 - und T_2^* -Parameterkarten akquiriert als Einzelmessung (linke Spalte) und als kombinierte Messung (rechte Spalte). Dargestellt ist ein Schnitt durch das Gehirn einer Maus. Der graue Pfeil in Abbildung (c) kennzeichnet einen Bereich im Mäusegehirn mit erhöhten T_2^* -Zeiten, die auf einen im Vergleich zum übrigen Gewebe besseren Shim zurückzuführen sind. Die Aufnahmen zur Berechnung der T_2^* -Karte (c) sind acht mal gemittelt worden, die der T_2^* -Karte (d) zwei mal. Dies erklärt das etwas bessere SNR in der Abbildung (c).

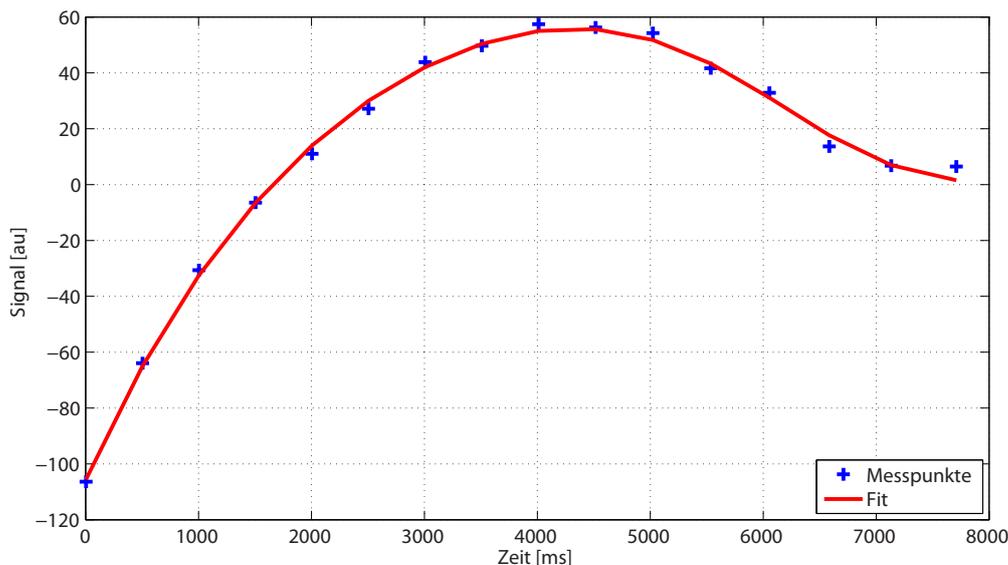


Abbildung 7.27.: Darstellung der Relaxationsmesswerte eines typischen Voxels der kombinierten Messsequenz im Tumor (blaue Kreuze) und der dazu berechneten Fitkurve (rote Linie).

der gesuchten Relaxationswerte eignet.

7.6. Diskussion

Herkömmliche analytische Fitmethoden zur Berechnung von Relaxationszeiten sind darauf angewiesen, dass sich das Messsignal vor jeder Anregung im thermodynamischen Gleichgewicht befindet und die Einstrahlung der zur Messung nötigen Anregungspulse in gleichen zeitlichen Abständen erfolgt. Diese Vorgaben schränken die Freiheit im Entwurf neuer Sequenzen stark ein. Zur Aufhebung dieser Beschränkungen wurde eine Modellfunktion entwickelt, die das Messsignal während des Durchlaufens einer NMR-Pulssequenz nachbildet und es damit erlaubt, durch eine Anpassung der kleinsten Fehlerquadrate zwischen gemessenem Signal und simuliertem Signal die gesuchten Relaxationsparameter zu bestimmen. Diese Fitmethode wurde am Beispiel der IR-FLASH-Sequenz auf ihre Stabilität hinsichtlich Flipwinkelschwankungen, Anregungspulsprofile, Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Partialvolumeneffekten mit der herkömmlichen Fitmethode nach Deichmann verglichen. Dabei erwies sich die Simulations-Methode als robuster als die Standardfitmethode. Lediglich bei sehr kleinen Anregungswinkeln und einer dichten Abtastung der Relaxationskurve mit mehr als 16 Messpunkten wird die Methode nach Deichmann über einen größeren Flipwinkel-Variationsbereich genauer als die Simulations-Methode. Bei einer großen Anzahl an Messpunkten und damit sehr kurzen Repetitionszeiten der FLASH-Module verschmälert sich jedoch der dynamische Messbereich der Deichmann-Methode, was die Stabilität des Fits wiederum herabsetzt. In der Praxis sind zudem 16 Stützstellen völlig ausreichend, um den Relaxationsverlauf stabil fitten zu können. Ein Nachteil des Simulations-Fits ist der im Vergleich zu einer

analytischen Fitmethode höhere Rechenaufwand zur Bestimmung der Fitparameter. Bei den heutigen Rechenleistungen spielt das aber eine eher untergeordnete Rolle. So benötigt z.B. ein analytischer Fit von T_1 -Relaxationszeiten eines Datensatzes mit 362 Bildpunkten und 24 Messpunkten auf der Relaxationskurve 7.68s und der Simulations-Fit desselben Datensatzes 10.79s⁸.

Durch die mit der Simulations-Fitmethode gewonnenen größeren Freiheiten in der Entwicklung von Pulssequenzen war es z.B. möglich, T_1 -Zeiten von Proben mit einer großen Bandbreite an Relaxationszeiten in nur einer Messung zu bestimmen. Dazu wurde der Relaxationskurvenverlauf zu Beginn dicht und am Ende der Messung in größerem zeitlichen Abstand abgetastet, so dass sowohl kurze als auch sehr lange Relaxationszeiten erfasst werden konnten. Mit der Simulations-Fitmethode war es dann möglich, die exakten Werte eines großen Spektrums an T_1 -Zeiten zu berechnen, was durch Messungen an verschiedenen Magnevist-Phantomen bestätigt werden konnte. Eine weitere Anwendung der Simulations-Fitmethode war die Implementierung einer neuen Sequenz zur simultanen Messung von T_1 - und T_2^* -Relaxationszeiten. Dabei bleibt die Messzeit dieselbe wie die der herkömmlichen T_1 -Messung nach Deichmann. Anders als die bisher in der Literatur beschriebenen Sequenzen zur simultanen Messung von T_1 und T_2^* [126, 127] kommt diese Methode ohne Korrekturen durch Flipwinkelkarten aus, die sonst in einer zusätzlichen Messung aufgenommen werden müssten. Dies wurde an Simulationen gezeigt, wobei der relative Fehler der kombinierten Messsequenz im Bereich der Standardabweichung auch bei verrauschten Datensätzen unter 5% lag. Oft sollen die akquirierten Relaxationskarten miteinander verglichen oder korreliert werden. Bei zwei getrennten, aufeinanderfolgenden Messungen ist die Wahrscheinlichkeit von Bewegungen (z.B. bei der Messung einer narkotisierten Maus) während dieser Zeitspanne deutlich größer, was eine exakte Überlagerung der Karten erschwert. Die kombinierte Messung ist hier weniger anfällig, da die Daten simultan akquiriert werden. Die Parameterkarten können direkt ohne eine Bildregistrierung miteinander verglichen und verrechnet werden, da sie exakt übereinander liegen. Ein Einsatzgebiet dieser Messsequenz bietet sich damit z.B. zur gleichzeitigen Messung des BOLD-Effekts und der relativen Perfusion über Spin-Markierung.

Um die in den Simulationen bestätigte Stabilität der Fitmethode an realen Daten zu verifizieren, wurden Messungen an Phantomen und *in vivo* an einem Tumor und einem Mäusehirn durchgeführt. Die relativen Fehler lagen bei allen Messungen unter 5.5% im Vergleich zu den Referenzwerten, was die Ergebnisse aus den Untersuchungen an künstlichen Datensätzen bestätigt. Wird der Fehler in der T_2^* -Messung am Gehirn der Maus ausgeklammert, der sich durch die niedrigen T_2^* -Werte erklären lässt und kleiner als die Schwankungen zwischen zwei aufeinanderfolgenden, identischen Messungen ist, so liegt der relative Fehler sogar unter 3%. Damit konnte bestätigt werden, dass sich diese Messmethode sehr gut zur simultanen Erfassung der T_1 - und T_2^* -Relaxationszeit auch *in vivo* eignet.

Mit der hier vorgestellten Simulations-Fitmethode konnte die Limitierung auf zeitlich

⁸Die Fitalgorithmen wurden in Matlab2009b implementiert. Die CPU des Auswerterechners war ein Intel Pentium 4 Prozessor mit 2.6GHz.

äquidistanten Pulsen zur Berechnung von Relaxationskarten in der NMR-Methodenentwicklung aufgehoben und damit der Weg für die Realisierung neuer, innovativer Pulsprogramme geebnet werden. Die Fitmethode kann problemlos an neue Pulssequenzen angepasst werden und prinzipiell jedes Pulsprogramm nachbilden. So lässt sich z.B. recht einfach eine Spin-Echo-Einheit modellieren um die T_2 -Relaxationskurven zu simulieren und die T_2 -Zeiten zu berechnen. Denkbar ist auch eine Simulation des IR-TrueFISP-Experiments zur T_1 -Zeit Berechnung [128] oder der gleichzeitigen Bestimmung von T_1 und T_2 nach der Methode von Schmitt et al. [129]. Es ist nicht nur die Berechnung von Relaxationszeiten möglich; die Pulsprogramm-Simulation ermöglicht es auch die verschiedenen Kontraste in NMR-Aufnahmen zu fitten und damit MR-Parameter zu berechnen. Die mit der Methode verbundene höhere Rechenzeit des Algorithmus im Vergleich zur analytischen Berechnung spielt sich bei den heutigen Rechenleistungen eines typischen Arbeitsplatzrechners im Sekundenbereich ab und ist damit vernachlässigbar.

8. Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung im ersten Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Etablierung von Methoden zur nichtinvasiven Erfassung von radiobiologisch relevanten Parametern des Tumormikromilieus mit der Magnet-Resonanz-Tomographie. Dabei wurden die Tumorperfusion und die Reoxygenierung des Tumors bei Beatmung mit Carbogengas als strahlentherapeutisch prognostisch relevante und vor allem auch beeinflussbare Parameter des Tumors untersucht. Die Untersuchungen fanden an einem Xenograft Modell von neun verschiedenen standardisierten humanen Tumorlinien statt, die auf Oberschenkel von Mäusen transplantiert wurden.

Als Teil eines multiinstitutionellen Verbundprojekts wurden parallel zu den NMR-Untersuchungen dieselben Tumorlinien mit verschiedenen Methoden der Histologie und Immunhistologie untersucht. Die Erhebung und Sammlung von einer solch großen Anzahl an Tumordaten, die mit den verschiedensten Untersuchungsmethoden an den selben Tumorlinien erfasst wurden bot eine einmalige Möglichkeit, die einzelnen Tumorparameter miteinander zu korrelieren. In der Literatur sind einige Arbeiten zu finden, in denen einzelne NMR-Parameter mit der Histologie verglichen wurden; dabei wurden aber oft nur eine bis drei Tumorlinien und ein bis zwei Tumorparameter untersucht. Durch die Vielzahl an hier untersuchten Tumorlinien waren aussagekräftige Korrelationen der erfassten Parameter (Perfusion, Reoxygenierung, Laktatverteilung, TCD₅₀, Hypoxie, Blutgefäßdichte) möglich. Damit konnten die Zusammenhänge der einzelnen Parameter des Tumormikromilieus genauer untersucht werden, wodurch das Verständnis über die Vorgänge im Tumor weiter verbessert werden konnte.

Mittels quantitativer Messung des oxygenierungssensitiven NMR-Parameters T_2^* wurde die individuelle Reaktion der Tumoren auf die Atmung von Carbogengas orts aufgelöst erfasst. Dabei konnte eine ausgeprägte Heterogenität in der Carbogen-Antwort zwischen den einzelnen Tumorlinien beobachtet werden. Auch innerhalb der einzelnen Linien waren die Reaktionen sehr unterschiedlich. Dieses Verhalten wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [43, 86–88]. Diese große inter- und intratumorale Heterogenität disqualifiziert diesen Parameter zur eindeutigen Identifikation einer Tumorlinie. Allerdings stellte sich die Reoxygenierung als sehr guter prognostischer Faktor für die Strahlentherapie heraus. Denn die Reoxygenierungsmittelwerte der Tumorlinien korrelieren sehr gut mit der Tumor-Kontrolldosis und der Pimonidazol hypoxischen Fraktion. Dies bestätigt die Annahme, dass Tumoren, die einen hohen hypoxischen Gewebeanteil aufweisen und damit strahlenresistenter als normoxisches Gewebe sind durch den Atemgaswechsel besser mit Sauerstoff versorgt werden können; dies wirkte sich somit positiv auf die Strahlensensitivität des Tumors aus. Durch die Reoxygenierungsmessung kann also ein Tumor nicht eindeutig einer Tumorlinie zugeordnet werden,

es kann aber festgestellt werden, ob ein Patient von einer Beatmung mit Carbogengas während der Strahlentherapie profitiert.

Zur nichtinvasiven Erfassung der nativen Mikrozirkulation der Tumoren wurden Spin-Labeling-Techniken eingesetzt, die orts aufgelöste Perfusionskarten über den NMR-Relaxationsparameter T_1 liefern. Die Tumorperfusion wurde dabei nicht als Absolutwert berechnet, sondern als Relativwert bezüglich der Muskelperfusion angegeben. Mit der Einführung dieser Normierung ist die berechnete relative Perfusion unabhängig von dem aktuellen Zustand des Herz-Kreislauf-System des Wirtstieres, welches äußeren Einflüssen unterlegen ist, und liefert stabile, vergleichbare Daten, die nur noch von den Eigenschaften des Tumorgewebes abhängen. Zwischen den einzelnen Tumorlinien konnten mit dieser Methode signifikante Unterschiede in der Tumormikrozirkulation festgestellt werden, die von 42% bis 93% des Muskelperfusionswertes reichen. Damit liegt die Tumorperfusion bei allen untersuchten Linien unter dem Wert der Muskelperfusion, was durch Untersuchungen mit unterschiedlichen Messmethoden in der Literatur bestätigt wird [32, 121, 122]. Die gute Korrelation des mittels NMR erfassten Perfusionswertes mit den Durchblutungsdaten aus der Histologie bestätigt die Validität dieses Messverfahrens. Somit kann die Perfusion von Tumoren nichtinvasiv gemessen werden, um z.B. zu überprüfen, ob bei Gabe eines Medikamentes dieses überhaupt durch das bluttransportierende System in die zu behandelnden Tumorregionen vordringen kann. Auch eine Überwachung der Vitalität von Tumorgewebe ist mit diesem Messverfahren denkbar, was zur Kontrolle des Erfolges von Therapiemaßnahmen Verwendung finden könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Fitalgorithmus entworfen und implementiert, der es ermöglicht, völlig neue Messsequenzen zu entwickeln, die nicht an die Restriktionen der analytischen Fitmethoden gebunden sind. So können z.B. die Schaltzeitpunkte der Pulse zur Abtastung einer Relaxationskurve frei gewählt werden. Auch muss das Spinsystem nicht gegen einen Gleichgewichtswert laufen um die Relaxationszeiten bestimmen zu können. Dieser Algorithmus wurde in Simulationen mit dem Standardverfahren zur T_1 -Akquisition verglichen. Dabei erwies sich diese Fitmethode als stabiler als das Standardmessverfahren. Auch an realen Messungen an Phantomen und *in vivo* liefert der Algorithmus zuverlässig korrekte Werte. An einer Beispielmessung von Phantomen, welche eine große Bandbreite an Relaxationszeiten aufweisen, konnten die Vorteile des neuen Algorithmus durch ein exponentielles Anwachsen der Repetitionszeit in den FLASH-Module eingesetzt werden. Damit war es möglich sehr kurze wie auch sehr lange T_1 -Zeiten in nur einer Akquisition exakt zu erfassen, was mit den herkömmlichen Methoden nur in mehreren Einzelmessungen möglich ist.

Die im ersten Teil dieser Arbeit entwickelten Verfahren zur nichtinvasiven Erfassung strahlentherapeutisch relevanter Parameter sollen letztlich in die klinische Situation auf den Menschen übertragen werden. Durch die geringere magnetische Feldstärke und das damit verbundene niedrigere SNR der klinischen Magnettomographen muss jedoch die Anzahl der Mittelungen erhöht werden, um die gleiche Qualität der Messdaten zu erhalten. Dies führt aber schnell zu sehr langen Messzeiten, die einem Patienten nicht zugemutet werden können. Um die Messzeit zu verkürzen wurde eine Messsequenz, aufbauend auf den erarbeiteten Fitalgorithmus entwickelt, die es ermöglicht, die T_1 -

und T_2^* -Relaxationszeit simultan und in der Dauer einer herkömmlichen T_1 -Messequenz zu akquirieren. Neben der Messzeitverkürzung ist dieses Messverfahren weniger anfällig gegen Bewegungsartefakte, die bei der räumlichen Korrelation von einzeln nacheinander aufgenommenen T_1 - und T_2^* -Relaxationszeitkarten auftreten, da diese in einem Datensatz akquiriert wurden und somit exakt übereinander zu liegen kommen.

Mit dieser Arbeit ist ein Messprotokoll zur nichtinvasiven Erfassung von radiobiologisch relevanten und beeinflussbaren Parametern des Tumormikromilieus mit der Magnet-Resonanz-Tomographie etabliert worden. Die erfassten Parameter konnten positiv mit dem "Goldstandard" zur Untersuchung von Tumorgewebe, der Histologie, korreliert werden und können somit nichtinvasiv die gleichen Aussagen, wenn auch in geringerer Auflösung, treffen. Zur Verkürzung der Messzeit am klinischen Tomographen wurden eine neue Messequenz und ein Algorithmus entwickelt, die es erlauben zwei Relaxationsparameter in nur einer Akquisition aufzuzeichnen. Als nächster Schritt bleibt die Portierung dieser Methoden auf die klinischen Tomographen um sie am Patienten nutzen zu können. Dies soll in der dritten Förderperiode des multiinstitutionellen Tumorprojektes erfolgen.

9. Summary

The goal of the first part of this thesis was the development and implementation of methods for the non-invasive acquisition of radiobiologically relevant parameters of the tumor microenvironment via the nuclear magnetic resonance. Therefore the tumor perfusion and re-oxygenation by application of high oxygen content gases were investigated as radiobiologically relevant and manipulable parameters. The studies were performed on a xenograft model of nine different standardized human tumor lines transplanted to the flank of a mouse.

As part of a multi-institutional research project the same tumor lines were examined using histological and immunohistological methods in parallel to the NMR-examination. The collection of such a huge number of tumor parameters acquired on the same tumor lines using different examination methods offered a unique opportunity for a mutual correlation of these parameters. In literature some papers can be found where NMR parameters are correlated with histological data, but often only one or two parameters of one to three tumor lines were under investigation. With the multitude of examined tumor lines in this work significant correlations between the parameters (perfusion, re-oxygenation, lactate distribution, TCD₅₀, hypoxia, blood vessel density) could be found. By means of these results the mutual relation of the different parameters of the tumor microenvironment could be further examined increasing the understanding of the tumor's internal processes.

With the quantitative measurement of the oxygenation sensitive NMR parameter T_2^* the individual response of the tumor to an application of carbogen gas was spatially acquired. A significant heterogeneity in the response to the carbogen challenge could be detected among the different tumor lines. Even within the same tumor line a great heterogeneity in the response could be found. These findings were previously reported by other groups [43, 86–88]. These inter- and intratumoral heterogeneities disqualify this parameter for a definite identification of a tumor to the corresponding tumor line. However the parameter re-oxygenation was found to be a very good prognostic marker for radiotherapy. The mean re-oxygenation values correlate very well with the tumor control dose and the pimonidazole hypoxic fraction. This confirms the assumption that tumors which exhibit a high hypoxic tissue fraction and therefore are more radio resistant than healthy tissue can be well re-oxygenated by switching the breathing gas to carbogen, which results in a positive effect concerning radio sensitivity. In conclusion, the parameter T_2^* and the calculated re-oxygenation maps cannot identify the corresponding line of a tumor, but with these parameters it can be determined whether a patient could benefit from breathing carbogen gas during radiotherapy.

Using spin-labeling techniques the spatially resolved native microcirculation of the tumor

was acquired non-invasively via the relaxation parameter T_1 . The tumor perfusion was not calculated as an absolute value, but as a relative value in percent normalized to the muscle perfusion. With this normalization the perfusion value is independent of outer factors modulating the heart rate of the host animal and therefore delivers stable and reliable data which only depend on the characteristics of the tumor tissue. Significant differences in tumor perfusion among the different tumor lines could be found using this normalization method, ranging from 42% to 93% of muscle perfusion. Hence the tissue perfusion of all tumor lines is lower than the muscle perfusion, which is in accordance with values found in the literature [32, 121, 122]. Moreover the good correlation between the perfusion acquired with NMR methods and the histological data further validates this acquisition and normalization procedure introduced in this work. Utilizing the introduced techniques it is possible to non-invasively acquire the tumor perfusion for example in order to determine whether a medication can advance via the blood system to the tumor which is to be therapied. Furthermore the viability of the tumor tissue can be monitored in order to trace the outcome of anti-cancer therapies.

In the second part of this work a fitting algorithm has been developed and implemented which allows for the development of completely new measuring sequences without the restrictions of analytical fitting algorithms. E.g. for example the trigger time for the excitation pulses which sample a relaxation curve may be chosen freely. Furthermore the spin system does not need to relax towards a steady-state in order to determine the relaxation times. This new algorithm has been compared in simulations with the standard procedure to acquire the T_1 relaxation time. It could be shown that the new fitting method is more stable than the standard method. These results could be verified in real measurements on phantoms and *in vivo* where the algorithm produces reliable and correct results. The improvements of the new algorithm could be applied on a measurement of phantoms which hold a wide spectrum of T_1 relaxation times. By exponentially increasing the repetition times of the FLASH modules in the inversion recovery experiment (IR-experiment) it was possible to record very short and very long relaxation times in one scan, which would only be possible with multiple acquisitions in a conventional IR-experiment.

The methods for the non-invasive acquisition of radiobiologically relevant parameters developed in the first part of this thesis are to be ported into the clinical situation and applied to the patient. Due to the lower magnetic field and the associated lower SNR of the clinical scanner the number of averages has to be increased in order to achieve the same quality in the acquired datasets. This results in long measurement times, which is very uncomfortable for the patient. In order to reduce the measurement time a sequence based on the introduced fitting algorithm has been developed which allows for the simultaneous acquisition of the T_1 and T_2^* relaxation times in one scan. This combined measurement takes the same time like a conventional IR-experiment for the measurement of the T_1 relaxation time. Beside the reduction of the scan time this procedure is less prone to motion artifacts which accrue when correlating T_1 and T_2^* parameter maps which were recorded consecutively. Since the relaxation maps are acquired in one scan the parameter maps can be exactly superposed.

In conclusion, in this thesis a measurement protocol for the non-invasive acquisition of radiobiologically relevant and manipulable parameters of the tumor microenvironment utilizing the magnetic resonance tomography has been established. The acquired parameters were positively correlated with histological data, the gold standard of tumor analysis. Hence it is possible to draw the same conclusions non-invasively although in a lower spatial resolution. In order to reduce the scan time on a clinical scanner a measurement sequence and a fitting algorithm were developed which allow for the simultaneous acquisition of two relaxation parameters in a single scan. The next step is the porting of the established measurement protocol to the clinical scanner in order to apply it to the patient. This is part of the third funding period of the multi-institutional project.

A. Anhang

A.1. Gradientenberechnung und k-Raum

Wie in Kapitel 2.1.5 erklärt, wird zum Anregen einer Schicht der Schichtselektionsgradient angelegt und gleichzeitig ein HF-Puls einer bestimmten Bandbreite eingestrahlt. Eine Schicht im Abstand z von der Mitte des Gradienten hat dann die Resonanzfrequenz $\nu(z) = \nu_0 + z\gamma/(2\pi)G_s$. Strahlt man einen HF-Puls der Frequenz ν ein, so werden alle Spins einer Schicht ausgelenkt, für die gilt:

$$z = 2\pi \frac{\nu - \nu_0}{\gamma G_s} \quad (\text{A.1})$$

Wird ein Puls mit einer Frequenzbreite $\Delta\nu$ um die Grundfrequenz ν_0 eingestrahlt, so werden Spins in der Umgebung der zentralen Schicht ($z = 0$) angeregt, wobei die Schichtdicke

$$\Delta z = 2\pi \frac{\Delta\nu}{\gamma G_s} \quad (\text{A.2})$$

beträgt.

Die Akquisition des komplexen Signals erfolgt in der Zeit τ_{aq} in Leserichtung. Aus Gleichung (2.20) und bei zeitlich konstanten Gradienten folgt: $k_{x,max} = \gamma G_r \tau_{aq}$. Für die Spindichte $\rho(x, y)$ in x -Richtung folgt aus den Gesetzen der diskreten Fouriertransformation das Auflösungsvermögen

$$\Delta x = \frac{2\pi}{k_{x,max}} = \frac{2\pi}{\gamma G_r \tau_{aq}}. \quad (\text{A.3})$$

Bei sequentieller Akquisition werden Real- und Imaginärteil der komplexen Datenpunkte wechselweise im Abstand $\Delta t/2$ aufgenommen. Diese Größe wird als **Dwell-Time** (DW) bezeichnet. Der zeitliche Abstand zweier akquirierter komplexer Datenpunkte $\Delta t = 2 \times DW$ wird als reziproke **Sweepweite**¹ (SW) definiert: $\Delta t = 1/SW$. Die Akquisitionszeit beträgt damit, bei der Aufnahme von N_r Datenpunkten: $\tau_{aq} = N_r \Delta t = N_r/SW$.

Es gilt also:

$$\Delta x = 2\pi \frac{SW}{N_r \gamma G_r} \quad (\text{A.4})$$

$\rho(x, y)$ ist damit nur für N_r diskrete x -Werte im Abstand Δx bekannt, d.h. der im

¹Oder auch Bandbreite.

Ortsraum abgebildete Bereich in x -Richtung (FOV_x) erstreckt sich über $N_r \Delta x$:

$$\text{FOV}_x = 2\pi \frac{SW}{\gamma G_r} \quad (\text{A.5})$$

Die Gradientenberechnung in Phasenkodierrichtung verläuft analog. Für die Ortskodierung in y -Richtung liegt k_y zwischen $-\gamma G_{p,max} \tau_p$ und $+\gamma G_{p,max} \tau_p$. Damit folgt für das Auflösungsvermögen in y -Richtung:

$$\Delta y = \frac{2\pi}{2\gamma G_p \tau_p} \quad (\text{A.6})$$

Analog zu Gleichung (A.5) ergibt sich für das FOV_y in y -Richtung:

$$\text{FOV}_y = 2\pi \frac{N_p}{2\gamma G_p \tau_p} \quad (\text{A.7})$$

Mit diesem Formelapparat lassen sich die nötigen Gradientenstärken bei gewünschtem FOV berechnen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das FOV immer größer als der signalliefernde Anteil der Probe ist, da das Bild sonst durch Einfaltungen gestört wird (**Nyquist-Theorem** [130]). Dies ist eine direkte Folge der diskreten Datenakquisition. Das Nyquist-Theorem besagt, dass

$$\frac{1}{\Delta k_{(x,y)}} > \text{Probe} \quad (\text{A.8})$$

gelten muss, um Einfaltungen zu vermeiden.

A.2. Wirbelstrom Artefakte

Durch das schnelle Schalten von Gradienten ändert sich der Magnetfluss durch die HF-Spule, die HF-Abschirmungen und den Magneten. Nach der Lenz'schen Regel wird durch ein sich änderndes Magnetfeld Strom in Leitern induziert (Wirbelstrom), der der Magnetfeldänderung entgegenwirkt. Der Gradient wird somit durch Wirbelströme während seines Schaltens abgeschwächt. Diese Veränderungen in der Gradientenstärke führen zu Phasenfehlern und Verzerrungen. Durch die Verwendung von aktiv geschirmten Gradientensystemen können die Wirbelströme stark verringert werden.

A.3. Segmentierte T_1 -Messung

Um die Messung von T_1 -Werten nach Kapitel (2.1.8) weiter zu beschleunigen können mehrere k -Raum Zeilen des entsprechenden Bildes durch kurz hintereinander geschaltete FLASH-Module mit unterschiedlicher Phasenkodierung aufgenommen werden. Die Messdauer wird damit um den Faktor der k -Raumzeilen pro Segment (hier vier) reduziert. Als

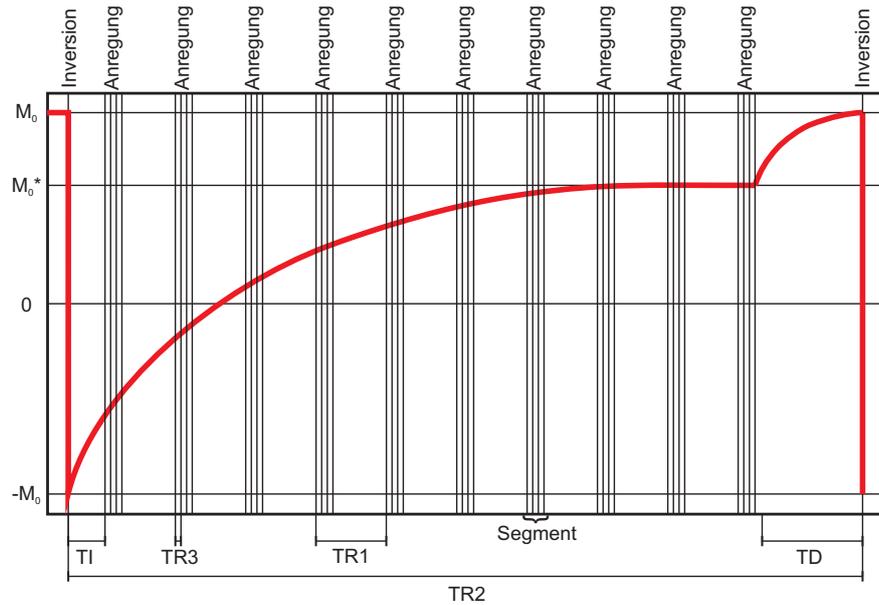


Abbildung A.1.: Abtastschema des T_1 -Signalverlaufs. Nach dem Inversionspuls werden kontinuierlich im Abstand der Repetitionszeit T_{R1} eines FLASH-Moduls die T_1 -Relaxationskurve abgetastet. Nach der Repetitionszeit T_{R2} folgt der nächste Inversionspuls nachdem das System in der Zeit T_D in das Gleichgewicht zurückgekehrt ist. Zur Beschleunigung der Messung werden mehrere k -Raum Zeilen des entsprechenden Bildes durch kurz hintereinander geschaltete FLASH-Module mit unterschiedlicher Phasenkodierung aufgenommen. Die Repetitionszeit in einem Segment (T_{R3}) wird dabei so kurz wie möglich gewählt.

Zeitpunkt (T_I), zu dem das Bild aufgenommen wurde wird die Echozeit der k -Raumzeile im Segment gewählt, die durch das k -Raum Zentrum läuft. Diese k -Raumzeile enthält die größten Signalwerte und trägt somit auch die meisten Bildinformationen. Genau genommen stellt das so akquirierte Bild keinen Messpunkt sondern einen Messbereich auf der Relaxationskurve dar. Die Repetitionszeit der FLASH-Module in einem Segment (T_{R3}) wird deshalb so kurz wie möglich gewählt, um die Zeitdauer zur Akquisition eines Bildes kurz zu halten.

A.4. Herstellung der PFC-Emulsion

Zur Herstellung einer Emulsion wird die PFC-Substanz mit Kochsalzlösung auf ca. 40% verdünnt, Lipide beigemischt und mit Ultraschall beschallt. Dabei entstehen kleine, von einer Lipidmembran umgebene Tröpfchen, die mit PFC und Wasser gefüllt sind. Der Radius dieser Vesikel lässt sich über die Beschallungszeit und Intensität regulieren. Sehr kleine Vesikel sind allerdings instabil und schließen sich zu größeren Tröpfchen zusammen. Der minimale Radius hängt von der Güte der Lipide und dem Mischungsverhältnis der einzelnen Bestandteile der Emulsion ab. 2ml der PFC-Emulsion bestehen aus folgenden Bestandteilen:

- 1.2ml einer 0.9% Kochsalzlösung (0.9g NaCl auf 100ml H₂O)
- 0.8ml des Perfluoro-15-Crown-5-Ether Reinstoffes (98% Reinheit, ABCR, Karlsruhe, Deutschland)
- 0.060g DEPC (1,2-Dielaidoyl-sn-glycero-3-Phosphocholine, Avanti Polar-Lipids Inc., Alabaster, AL, USA)
- 0.020g Cholesterol (99% Reinheit, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

Die Inhaltsstoffe werden in ein Plastikröhrchen mit 6ml Fassungsvermögen gegeben. Mit einem Rüsselbeschaller (Sonifier S-250A, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT, USA), der in die Lösung getaucht wird, wird die Mischung bei einem Duty-Cycle von 50% und maximaler Stärke viermal für 5min mit Ultraschall beschallt. Zwischen den Beschallungen liegen Pausen von ca. 3min damit sich die Lösung nicht zu stark aufheizt, was die Lipide zerstören würde. Zur zusätzlichen Temperatursenkung wird das Plastikröhrchen während der kompletten Prozedur in Eiswasser gekühlt. Die mittlere Tröpfchengröße wurde mit einem Lasergranulometer (Coulter LS230, Beckmann Coulter Inc., Fullerton, Kalifornien, USA) zu ca. 3.5µm bestimmt.

A.5. Berechnung des T_1 -Wertes bei biexponentieller Relaxation

Die Lösung der Minimabestimmung von Gleichung (7.4) wurde mit Mathematica 7 (Wolfram Research Inc., Champaign, IL, USA) berechnet². In Abbildung (A.2) ist der Verlauf des berechneten Soll- T_1 -Wertes für verschiedene Volumenverhältnisse von Substanz A und B dargestellt (rote Linie). Die blaue Linie gibt den volumenbezogenen Mittelwert ($T_{1a} \cdot V_a + T_{1b} \cdot V_b$) wieder. Wie zu erkennen ist liegt der durch eine monoexponentielle Funktion berechnete T_1 -Wert der biexponentiellen Relaxationsfunktion nicht auf der blauen Geraden.

A.6. Signalmodulation durch chemische Verschiebung

Die Spins eines Voxel in dem mehr als eine Substanz vorhanden ist rotieren aufgrund der chemischen Verschiebung (Kapitel 2.1.7) mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen. Das NMR-Signal dieses Voxels setzt sich also aus der Summe der FID's der im Voxel enthaltenen Substanzen zusammen. Dabei kann es zu einer Schwebung und damit verbunden zur Signalauslöschung zu bestimmten Echozeitpunkten kommen.

Dieser Effekt wurde für die in biologischem Gewebe häufig vorkommenden Substanzen Wasser und Öl an einem Phantom untersucht. Dazu wurde handelsübliches Sonnenblu-

²Die Berechnung des T_2^* -Wertes bei biexponentieller Relaxation liefert das gleiche Ergebnis.

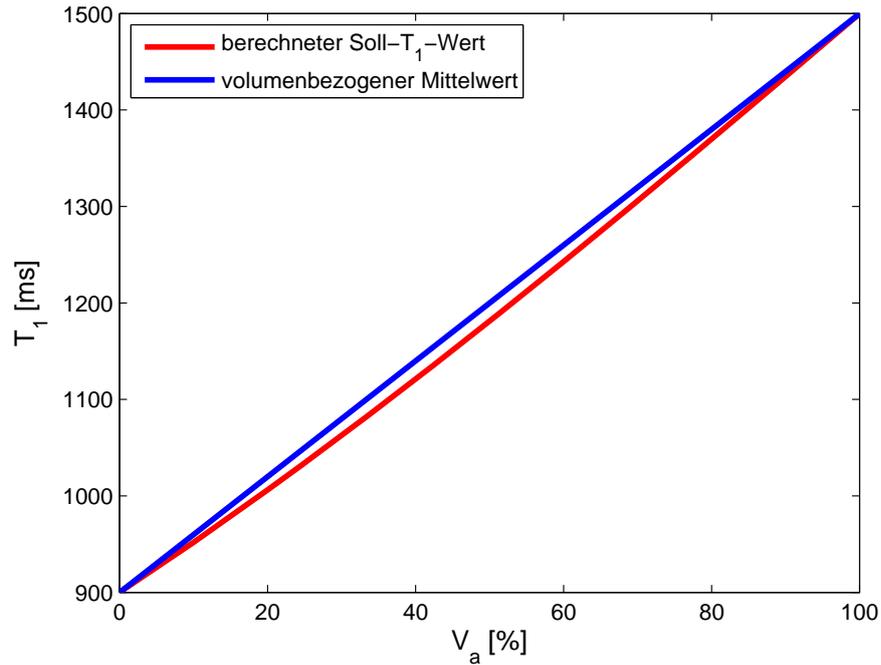


Abbildung A.2.: Die rote Line stellt den berechneten Soll- T_1 -Werte für verschiedene Volumenverhältnisse von Substanz A mit $T_{1a}=1500\text{ms}$ und B mit $T_{1b}=900\text{ms}$ dar. Die blaue Linie gibt den volumenbezogenen Mittelwert ($T_{1a} \cdot V_a + T_{1b} \cdot V_b$) wieder.

menspeiseöl und destilliertes Wasser in ein 5mm Probenröhrchen gegeben. Die Messung wurde in einer Schicht durch den Wasser-Öl-Meniskus mit einer FLASH-Sequenz durchgeführt. In 100 Einzelmessungen wurde die Echozeit dabei in Schritten von $10\mu\text{s}$ erhöht. Abbildung (A.3) zeigt den gegen die Echozeit aufgetragenen Signalverlauf eines Voxels in dem sich Wasser und Öl befindet. Die Signalkurve weist dabei deutliche Schwebungsbäuche und -täler auf. Die Schwebungsfrequenz (ω_S) des Signals wurde durch einen Fit der Messdaten an die Funktion

$$S = a \left| \sin(\omega_S T_E - b) \right| + c \quad (\text{A.9})$$

berechnet. Mit a als Amplitude der Schwebung, b dem Phasenoffset, c dem Amplitudenoffset und T_E der Echozeit. Dabei ergab sich ein ω_S von 8724.3Hz . Die Schwebungsfrequenz setzt sich aus den Larmorfrequenzen von Wasser und Öl zusammen,

$$\begin{aligned} \omega_S &= \frac{\omega_{\text{Wasser}} - \omega_{\text{Öl}}}{2} \\ &= 2\pi \frac{f_{\text{Wasser}} - f_{\text{Öl}}}{2} \\ &= 2\pi \frac{\Delta f_{\text{WO}}}{2} \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

mit Δf_{WO} als Frequenzunterschied zwischen Wasser und Öl. Der Literaturwert für

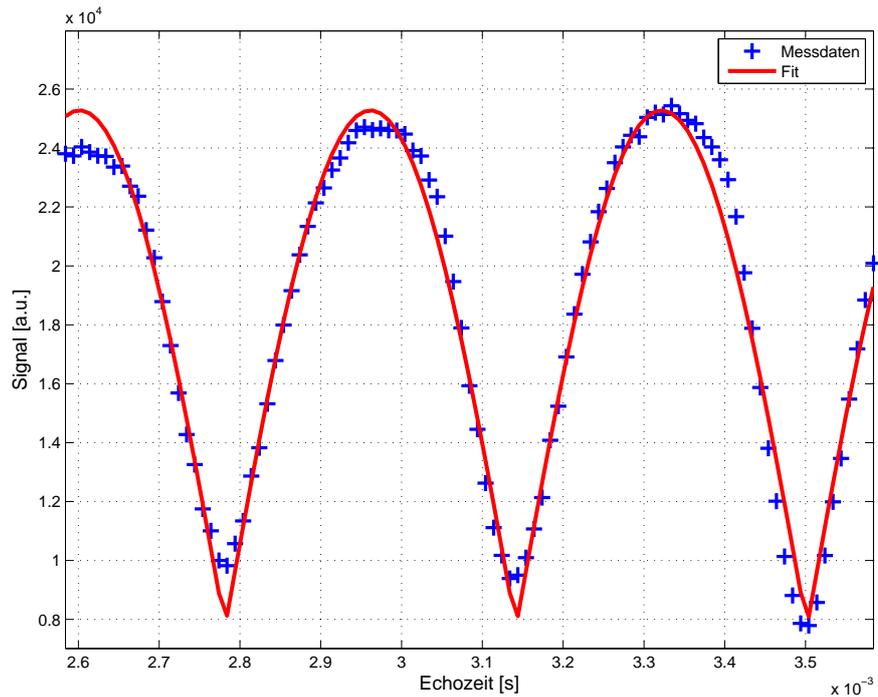


Abbildung A.3.: Signal eines mit Wasser und Öl gefüllten Voxels zu den unterschiedlichen Echozeitpunkten. Die Messdaten sind als blaue Kreuze, der Fit nach Gleichung (A.9) als rote Linie dargestellt.

Δf_{WO} beträgt ca. 3.5ppm^3 , was ein Δf_{WO} von 2625.0Hz bzw. ein ω_S von 8246.7Hz bei 17.6T ergibt. Obwohl der Literaturwert für reines Öl und nicht für Sonnenblumenöl angegeben ist, liegt der berechnete Wert für ω_S nahe an diesem Literaturwert.

In Abbildung (A.4a) ist die aufgenommene Messschicht zum Zeitpunkt eines Schwebungsbauchs und in Abbildung (A.4b) zum Zeitpunkt eines Schwebungstals dargestellt. In Abbildung (A.4b) ist deutlich ein Ring mit Signalauslöschung an der Wasser-Öl-Grenzfläche zu erkennen.

Diese Untersuchung zeigt, dass die Wahl der Echozeit, unabhängig von den beschriebenen Relaxationsmechanismen, Einfluss auf das akquirierte Signal haben kann. Solange die Echozeit bei den Akquisitionen konstant gehalten wird, wie z.B. bei dem IR-Experiment, spielt dieser Effekt keine Rolle bei der Relaxationszeitmessung. Es ist lediglich möglich, dass das Messsignal nicht mit dem maximalen Wert erfasst wird (z.B. im Schwebungsbauch), was sich negativ auf das SNR auswirkt. Wird allerdings die Echozeit während der Messung variiert, wie bei der T_2^* -Messung oder der kombinierten T_1/T_2^* -Messung, dann ist es möglich, dass unter Umständen ein falscher Relaxationswert bestimmt wird. In Abbildung (A.5) ist eine T_2^* -Relaxationskurve für verschiedene Fälle dargestellt. Die grüne Kurve zeigt den Verlauf bei nur einer Substanz im Voxel mit einer Relaxationszeit von 20.0ms . Rot stellt eine Relaxationskurve eines Voxels mit zwei Substanzen (A, B) dar, wobei die Larmorfrequenz von Substanz B 0.4 mal der Frequenz von Substanz A entspricht. Als Relaxationszeit der beiden Substanzen wurde 20.0ms

³ppm = parts per million

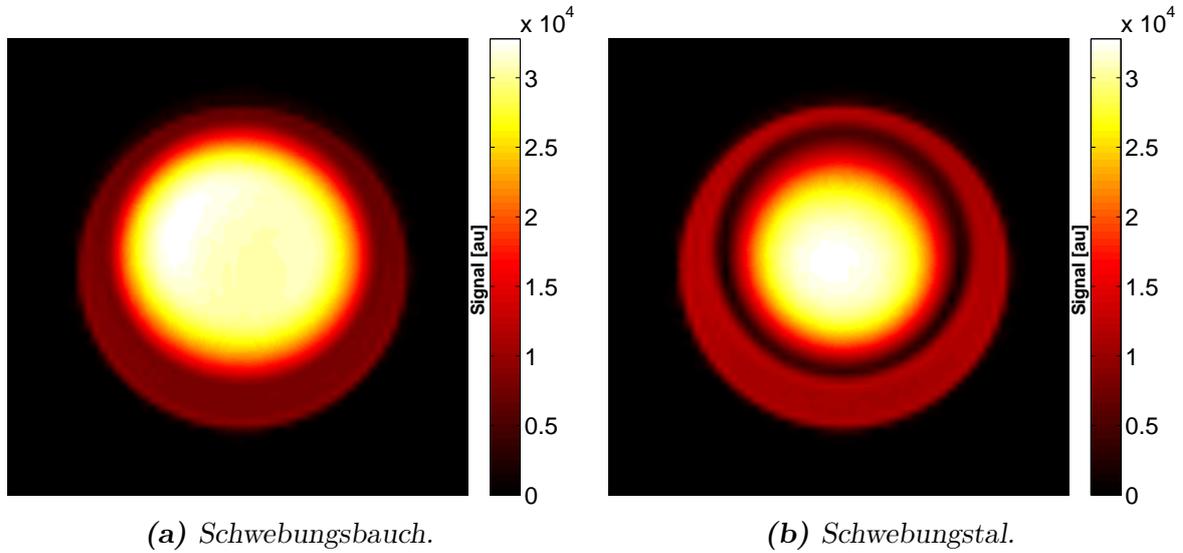


Abbildung A.4.: Darstellung der Messschicht zum Zeitpunkt eines Schwabungsbauches (a) und zum Zeitpunkt eines Schwabungstals (b). In Abbildung (b) ist deutlich ein Ring mit Signalauslöschung an der Wasser-Öl-Grenzfläche zu erkennen.

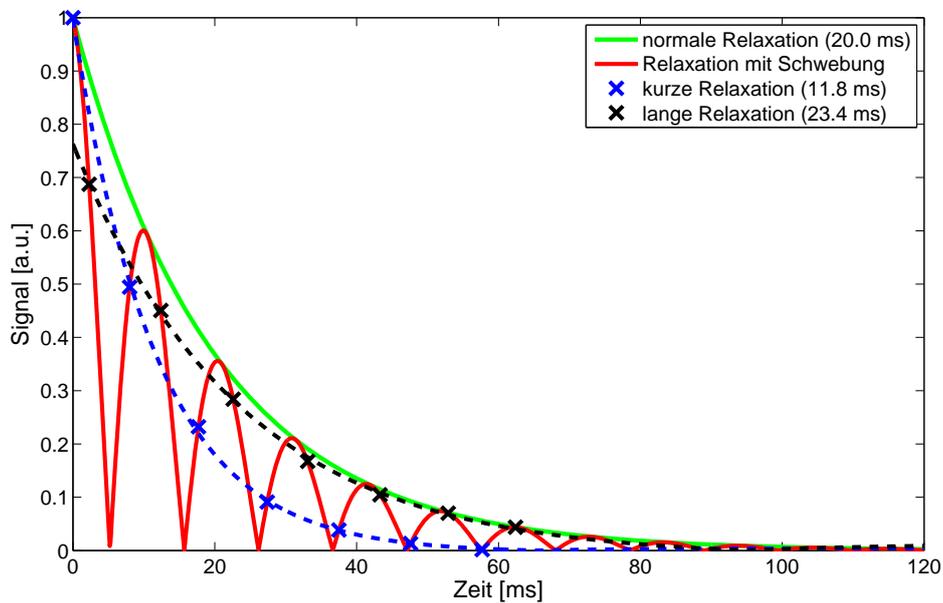


Abbildung A.5.: Darstellung von T_2^* -Relaxationskurven für den Fall mit nur einer Substanz im Voxel (grün) und für den Fall mit zwei Substanzen im Voxel mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen aber gleichen Relaxationszeiten (rot). Je nach Wahl der Messpunkte auf der roten Kurve ergeben sich unterschiedliche T_2^* -Zeit (blau und schwarz).

gewählt. Damit kommt es zu einer Schwebung mit überlagerter T_2^* -Relaxation. Bei einer Multi-Gradientenecho-Messung zur Bestimmung der T_2^* -Zeit wird die rote Kurve zu bestimmten Zeitpunkten abgetastet und mit diesen Messwerten die Relaxationszeit berechnet. Abhängig von der Wahl der Messpunkte ergeben sich unterschiedliche T_2^* -Zeiten, was als blaue bzw. schwarze Kurve in Abbildung (A.5) dargestellt ist. Werden die schwarzen Messpunkte gewählt, so ergibt sich eine Relaxationszeit von 23.4ms, bei den blauen Messpunkten eine T_2^* -Zeit von 11.8ms.

Wie in Abbildung (A.3) zu erkennen ist, liegt der zeitliche Abstand von Schwebungsbauch und -tal der Substanzen Öl und Wasser bei 17.6T bei ca. 0.2ms. Der Abstand der Echoakquisitionen eines Multi-Gradientenecho-Experimentes liegt im Bereich von einigen Millisekunden, so dass es sehr unwahrscheinlich ist, einen Echozug wie er in Abbildung (A.5) als schwarze oder blaue Linie dargestellt zu erhalten. In realen Messungen wird sich der Schwebungseffekt über den Fit der Messpunkte, die zufällig schwanken, ausmitteln. Zudem sind in einem Voxel mit biologischem Gewebe mehr als nur zwei Substanzen, und diese in unterschiedlichen Stoffmengen vorhanden, so dass sich im Allgemeinen keine ausgeprägten Täler und Bäuche ausbilden. Somit kann der Effekt der Schwebung durch chemische Verschiebung in den Messungen an biologischem Gewebe vernachlässigt werden – er tritt nur unter idealisierten Bedingungen auf.

A.7. Schematischer Ablauf der Pulsprogramm-Simulation

In Diagramm (A.6) ist der Ablauf des Matlab-Programms zur Simulation des IR-Pulsprogramms und der dazugehörige Fit des modellierten Signalverlaufes an die Messdaten schematisch dargestellt. Die einzelnen Einheiten zur Modellierung des Signalverlaufes (Relaxations-, Puls- und Signal-Einheit) mit den benötigten Eingabeparametern und den erzeugten Ausgabeparametern sind in Kapitel (7.2) beschrieben.

Im ersten Teil des Programms werden die Messparameter und die Messdaten eingelesen. Danach werden die Startparameter für die Fitroutine berechnet bzw. festgelegt. Im dritten Teil wird das Pulsprogramm durch die Relaxations-, Puls- und Signal-Einheit nachgebildet und der Signalverlauf mit den eingestellten Fitparametern berechnet. Die Parameter werden so lange variiert, bis der quadratische Fehler zwischen dem modellierten Signalverlauf und den gemessenen Daten der einzelnen Bildpunkte minimal ist. Die so gefitteten Parameter werden in Parameterkarten abgespeichert und ausgegeben.

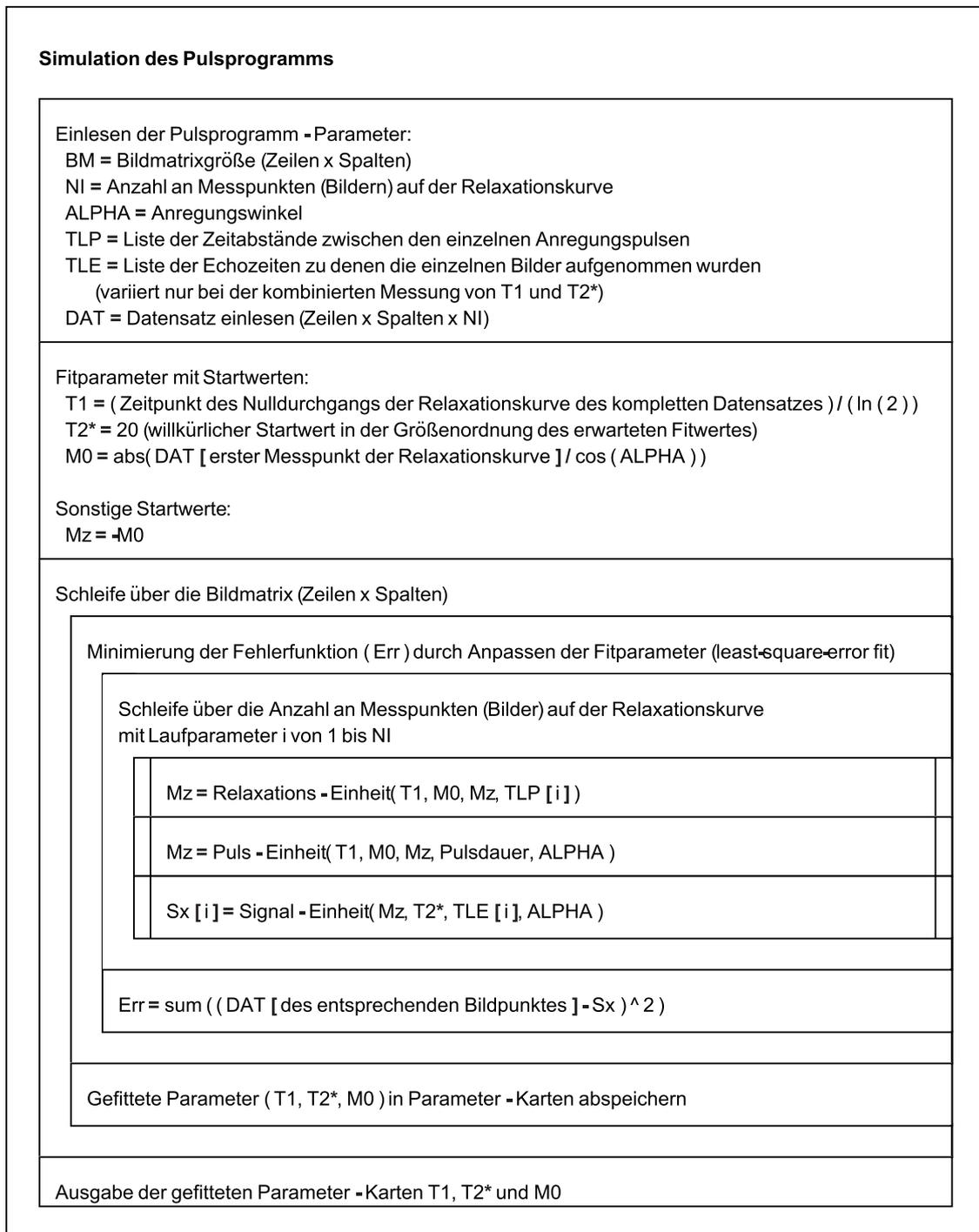


Abbildung A.6.: Schematische Darstellung des Ablaufs der Pulsprogramm-Simulation und des Fits in einem Nassi-Shneiderman-Diagramm.

Literaturverzeichnis

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION: World Health Statistics 2008. In: *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* (2008)
- [2] STATISTISCHES BUNDESAMT WIESBADEN: Gesundheitswesen, Todesursachen in Deutschland, Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen. In: *Destatis Fachserie 12 Reihe 4* (2007)
- [3] ZIPS, D.; ADAM, M.; FLENTJE, M.; HAASE, A.; MOLLS, M.; MUELLER-KLIESER, W.; PETERSEN, C.; PHILBROOK, C.; SCHMITT, P.; THEWS, O.; WALENTA, S.; BAUMANN, M.: Impact of hypoxia and the metabolic microenvironment on radiotherapy of solid tumors. Introduction of a multi-institutional research project. In: *Strahlenther Onkol* 180 (2004), Oct, Nr. 10, S. 609–615
- [4] CALLAGHAN, P. T.: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*. illustrated edition. Clarendon Press, 1991
- [5] COWAN, B.: *Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation*. Cambridge University Press, 1997
- [6] GRAAF, R. A.: *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. 1. Wiley & Sons, 1998
- [7] HAACKE, E. M.; BROWN, R. W.; THOMPSON, M. R.; VENKATESAN, R.: *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*. John Wiley and Sons, Inc., 1999
- [8] COHEN-TANNOUJJI, C.; DIU, B.; LALOË, F.: *Quantenmechanik (Teil 1)*. 2. Heidelberg, Berlin, Oxford : Walter de Gruyter, 1999
- [9] REIF, F.: *Statistische Physik und Theorie der Wärme*. New York : Walter de Gruyter, 1987
- [10] BLOCH, F.: Nuclear Induction. In: *Physical Review* 70 (1946), Oct, Nr. 7-8, S. 460–474
- [11] FUKUSHIMA, E.; ROEDER, S. B. W.: *Experimental Pulse NMR: A Nuts and Bolts Approach*. Addison-Wesley, 1981. – ISBN 0201627264
- [12] ANET, F. A. L.; O’LEARY, D. J.: The shielding tensor part II: Understanding its strange effects on relaxation. In: *Concepts in Magnetic Resonance* 4 (1992), Nr. 1, S. 35–52

- [13] TRAFICANTE, D. D.: Relaxation. Can T2, be longer than T1? In: *Concepts in Magnetic Resonance* 3 (1991), Nr. 3, S. 171–177
- [14] BLOEMBERGEN, N.; PURCELL, E. M.; POUND, R. V.: Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. In: *Phys. Rev.* 73 (1948), Apr, Nr. 7, S. 679–712
- [15] LAUTERBUR, P. C.: Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. In: *Nature* 242 (1973), mar, S. 190–191
- [16] KUMAR, A.; WELTI, D.; ERNST, R. R.: Imaging of macroscopic objects by NMR Fourier zeugmatography. In: *Naturwissenschaften* 62 (1975), Nr. 1, S. 34
- [17] HENNIG, J.; NAUERTH, A.; FRIEDBURG, H.: RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. In: *Magn Reson Med* 3 (1986), Dec, Nr. 6, S. 823–833
- [18] HAASE, A.; FRAHM, J.; MATHAEI, D.; HÄNICKE, W.; MERBOLDT, D.: FLASH Imaging: Rapid NMR Imaging Using Low Flip-Angle Pulses. In: *J. Magn. Reson.* 67 (1986), S. 258–266
- [19] KENNAN, R. P.; ZHONG, J.; GORE, J. C.: Intravascular susceptibility contrast mechanisms in tissues. In: *Magn Reson Med* 31 (1994), Jan, Nr. 1, S. 9–21
- [20] GILLIS, P.; KOENIG, S. H.: Transverse relaxation of solvent protons induced by magnetized spheres: application to ferritin, erythrocytes, and magnetite. In: *Magn Reson Med* 5 (1987), Oct, Nr. 4, S. 323–345
- [21] FISEL, C. R.; ACKERMAN, J. L.; BUXTON, R. B.; GARRIDO, L.; BELLIVEAU, J. W.; ROSEN, B. R.; BRADY, T. J.: MR contrast due to microscopically heterogeneous magnetic susceptibility: numerical simulations and applications to cerebral physiology. In: *Magn Reson Med* 17 (1991), Feb, Nr. 2, S. 336–347
- [22] BOXERMAN, J. L.; BANDETTINI, P. A.; KWONG, K. K.; BAKER, J. R.; DAVIS, T. L.; ROSEN, B. R.; WEISSKOFF, R. M.: The intravascular contribution to fMRI signal change: Monte Carlo modeling and diffusion-weighted studies in vivo. In: *Magn Reson Med* 34 (1995), Jul, Nr. 1, S. 4–10
- [23] PROCTOR, W. G.; YU, F. C.: The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound. In: *Physical Review* 717 (1950), März, Nr. 5
- [24] VOLD, R.; WAUGH, J. S.; KLEIN, M. P.; PHELPS, D. E.: Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems. In: *J. Chem. Phys.* 48 (1968), April, S. 3831
- [25] LOOK, D. C.; LOCKER, D. R.: Time Saving in Measurement of NMR and EPR Relaxation Times. In: *Review of Scientific Instruments* 41 (1970), Februar, Nr. 2, S. 250–251

- [26] KAPTEIN, R.; DIJKSTRA, K.; TARR, C. E.: A Single-Scan Fourier Transform Method for Measuring Spin-Lattice Relaxation Times. In: *J Magn Reson* 24 (1976), S. 295–300
- [27] DEICHMANN, R.; HAASE, A.: Quantification of T1 values by SNAPSHOT-FLASH NMR imaging. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 96 (1992), Februar, Nr. 3, S. 608–612
- [28] FERNÁNDEZ-SEARA, M. A.; WEHRLI, F. W.: Postprocessing technique to correct for background gradients in image-based R*(2) measurements. In: *Magn Reson Med* 44 (2000), Sep, Nr. 3, S. 358–366
- [29] LAGARIAS, J. C.; REEDS, J. A.; WRIGHT, M. H.; WRIGHT, P. E.: Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions. In: *SIAM Journal of Optimization* 9 (1998), S. 112–147
- [30] WILMANN, W.; HUHN, D.; WILMS, K.: *Internistische Onkologie*. 2., Überarb. u. erw. A. Thieme, Stuttgart, 2000. – ISBN 3131277025
- [31] BROWN, J. M.; GIACCIA, A. J.: The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. In: *Cancer Res* 58 (1998), Apr, Nr. 7, S. 1408–1416
- [32] FELDMANN, H. J.; MOLLS, M.; VAUPEL, P.: Blood flow and oxygenation status of human tumors. Clinical investigations. In: *Strahlenther Onkol* 175 (1999), Jan, Nr. 1, S. 1–9
- [33] KROHN, K. A.; LINK, J. M.; MASON, R. P.: Molecular imaging of hypoxia. In: *J Nucl Med* 49 Suppl 2 (2008), Jun, S. 129S–148S
- [34] HARRIS, A. L.: Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. In: *Nat Rev Cancer* 2 (2002), Jan, Nr. 1, S. 38–47
- [35] WARBURG, O.; POSENER, K.; NEGELEIN, E.: Über den Stoffwechsel der Carzinomzelle. In: *Biochem Zeitschr* 152 (1924), S. 309–344
- [36] HOCKEL, M.; SCHLENGER, K.; ARAL, B.; MITZE, M.; SCHAFFER, U.; VAUPEL, P.: Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. In: *Cancer Res* 56 (1996), Oct, Nr. 19, S. 4509–4515
- [37] BRIZEL, D. M.; DODGE, R. K.; CLOUGH, R. W.; DEWHIRST, M. W.: Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. In: *Radiother Oncol* 53 (1999), Nov, Nr. 2, S. 113–117
- [38] KAANDERS, J. H. A. M.; WIJFFELS, K. I. E. M.; MARRES, H. A. M.; LJUNGKVIST, A. S. E.; POP, L. A. M.; HOOGEN, F. J. A. d.; WILDE, P. C. M.; BUSSINK, J.; RALEIGH, J. A.; KOGEL, A. J. d.: Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. In: *Cancer Res* 62 (2002), Dec, Nr. 23, S. 7066–7074

- [39] QUENNET, V.; YAROMINA, A.; ZIPS, D.; ROSNER, A.; WALENTA, S.; BAUMANN, M.; MUELLER-KLIESER, W.: Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. In: *Radiother Oncol* 81 (2006), Nov, Nr. 2, S. 130–135
- [40] BROWN, J. M.: The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy—eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. In: *Cancer Res* 59 (1999), Dec, Nr. 23, S. 5863–5870
- [41] GULLEDGE, C. J.; DEWHIRST, M. W.: Tumor oxygenation: a matter of supply and demand. In: *Anticancer Res* 16 (1996), Nr. 2, S. 741–749
- [42] BAUDELET, C.; GALLEZ, B.: Effect of anesthesia on the signal intensity in tumors using BOLD-MRI: comparison with flow measurements by Laser Doppler flowmetry and oxygen measurements by luminescence-based probes. In: *Magn Reson Imaging* 22 (2004), Sep, Nr. 7, S. 905–912
- [43] VARIA, M. A.; CALKINS-ADAMS, D. P.; RINKER, L. H.; KENNEDY, A. S.; NOVOTNY, D. B.; FOWLER, W. C.; RALEIGH, J. A.: Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. In: *Gynecol Oncol* 71 (1998), Nov, Nr. 2, S. 270–277
- [44] YAROMINA, A.; ZIPS, D.; THAMES, H. D.; EICHELER, W.; KRAUSE, M.; ROSNER, A.; HAASE, M.; PETERSEN, C.; RALEIGH, J. A.; QUENNET, V.; WALENTA, S.; MUELLER-KLIESER, W.; BAUMANN, M.: Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. In: *Radiother Oncol* 81 (2006), Nov, Nr. 2, S. 122–129
- [45] YAROMINA, A.; KRAUSE, M.; THAMES, H.; ROSNER, A.; KRAUSE, M.; HESSEL, F.; GRENMAN, R.; ZIPS, D.; BAUMANN, M.: Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. In: *Radiother Oncol* 83 (2007), Jun, Nr. 3, S. 304–310
- [46] MELKUS, G.: Entwicklung und Anwendung spektroskopischer ^1H -NMR-Methoden zur in vivo Charakterisierung von Xenograft-Tumormodellen bei 17,6 T, *Physikalisches Institut der Universität Würzburg*, Diplomarbeit, 2010
- [47] GRUETTER, R.: Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. In: *Magn Reson Med* 29 (1993), Jun, Nr. 6, S. 804–811
- [48] BOTTOMLEY, P. A.: Selective volume method for performing localized NMR spectroscopy, Patent Nr. 4480228, United States
- [49] LANDUYT, W.; HERMANS, R.; BOSMANS, H.; SUNAERT, S.; BÉATSE, E.; FARINA, D.; MEIJERINK, M.; ZHANG, H.; BOGAERT, W. V. D.; LAMBIN, P.; MARCHAL, G.: BOLD contrast fMRI of whole rodent tumour during air or carbogen breathing using echo-planar imaging at 1.5 T. In: *Eur Radiol* 11 (2001), Nr. 11, S. 2332–2340

- [50] LANDUYT, W.; SUNAERT, S.; FARINA, D.; MEIJERINK, M.; BÉATSE, E.; HECKE, P. V.; HERMANS, R.; MARCHAL, G.; LAMBIN, P.; BOSMANS, H.: In vivo animal functional MRI: improved image quality with a body-adapted mold. In: *J Magn Reson Imaging* 16 (2002), Aug, Nr. 2, S. 224–227
- [51] ROJAS, A.; CARL, U.; REGHEBI, K.: Effect of normobaric oxygen on tumor radiosensitivity: fractionated studies. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18 (1990), Mar, Nr. 3, S. 547–553
- [52] ROJAS, A.: Radiosensitization with normobaric oxygen and carbogen. In: *Radiother Oncol* 20 Suppl 1 (1991), S. 65–70
- [53] KJELLEN, E.; JOINER, M. C.; COLLIER, J. M.; JOHNS, H.; ROJAS, A.: A therapeutic benefit from combining normobaric carbogen or oxygen with nicotinamide in fractionated X-ray treatments. In: *Radiother Oncol* 22 (1991), Oct, Nr. 2, S. 81–91
- [54] CHAPLIN, D. J.; HORSMAN, M. R.; AOKI, D. S.: Nicotinamide, Fluosol DA and Carbogen: a strategy to reoxygenate acutely and chronically hypoxic cells in vivo. In: *Br J Cancer* 63 (1991), Jan, Nr. 1, S. 109–113
- [55] GRAU, C.; HORSMAN, M. R.; OVERGAARD, J.: Improving the radiation response in a C3H mouse mammary carcinoma by normobaric oxygen or carbogen breathing. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22 (1992), Nr. 3, S. 415–419
- [56] CHAPLIN, D. J.; HORSMAN, M. R.; SIEMANN, D. W.: Further evaluation of nicotinamide and carbogen as a strategy to reoxygenate hypoxic cells in vivo: importance of nicotinamide dose and pre-irradiation breathing time. In: *Br J Cancer* 68 (1993), Aug, Nr. 2, S. 269–273
- [57] HUNJAN, S.; ZHAO, D.; CONSTANTINESCU, A.; HAHN, E. W.; ANTICH, P. P.; MASON, R. P.: Tumor oximetry: demonstration of an enhanced dynamic mapping procedure using fluorine-19 echo planar magnetic resonance imaging in the Dunning prostate R3327-AT1 rat tumor. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49 (2001), Mar, Nr. 4, S. 1097–1108
- [58] ZHAO, D.; CONSTANTINESCU, A.; JIANG, L.; HAHN, E. W.; MASON, R. P.: Prognostic radiology: quantitative assessment of tumor oxygen dynamics by MRI. In: *Am J Clin Oncol* 24 (2001), Oct, Nr. 5, S. 462–466
- [59] NÖTH, U.; RODRIGUES, L. M.; ROBINSON, S. P.; JORK, A.; ZIMMERMANN, U.; NEWELL, B.; GRIFFITHS, J. R.: In vivo determination of tumor oxygenation during growth and in response to carbogen breathing using $^{15}\text{C}5$ -loaded alginate capsules as fluorine-19 magnetic resonance imaging oxygen sensors. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60 (2004), Nov, Nr. 3, S. 909–919
- [60] GILLIES, R. J.; BHUJWALLA, Z. M.; EVELHOCH, J.; GARWOOD, M.; NEEMAN, M.; ROBINSON, S. P.; SOTAK, C. H.; SANDEN, B. V. D.: Applications of magnetic

- resonance in model systems: tumor biology and physiology. In: *Neoplasia* 2 (2000), Nr. 1-2, S. 139–151
- [61] TAYLOR, N. J.; BADDELEY, H.; GOODCHILD, K. A.; POWELL, M. E.; THOUMINE, M.; CULVER, L. A.; STIRLING, J. J.; SAUNDERS, M. I.; HOSKIN, P. J.; PHILLIPS, H.; PADHANI, A. R.; GRIFFITHS, J. R.: BOLD MRI of human tumor oxygenation during carbogen breathing. In: *J Magn Reson Imaging* 14 (2001), Aug, Nr. 2, S. 156–163
- [62] ROBINSON, S. P.; HOWE, F. A.; RODRIGUES, L. M.; STUBBS, M.; GRIFFITHS, J. R.: Magnetic resonance imaging techniques for monitoring changes in tumor oxygenation and blood flow. In: *Semin Radiat Oncol* 8 (1998), Jul, Nr. 3, S. 197–207
- [63] PELLER, M.; WEISSFLOCH, L.; STEHLING, M. K.; WEBER, J.; BRUENING, R.; SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R.; MOLLS, M.; REISER, M.: Oxygen-induced MR signal changes in murine tumors. In: *Magn Reson Imaging* 16 (1998), Sep, Nr. 7, S. 799–809
- [64] HOWE, F. A.; ROBINSON, S. P.; RODRIGUES, L. M.; GRIFFITHS, J. R.: Flow and oxygenation dependent (FLOOD) contrast MR imaging to monitor the response of rat tumors to carbogen breathing. In: *Magn Reson Imaging* 17 (1999), Nov, Nr. 9, S. 1307–1318
- [65] LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2003
- [66] HORN, F.; MOC, I.; SCHNEIDER, N.; GRILLHÖSL, C.; BERNHOLD, S.; LINDENMEIER, G.: *Biochemie des Menschen*. Bd. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
- [67] <http://www.3dchem.com/moremolecules.asp?ID=213&othername=Haemoglobin>
- [68] SCHMIDT, R. F.; LANG, F.; THEWS, G.: *Physiologie des Menschen*. Bd. 29. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, 2007
- [69] SEVERINGHAUS, J. W.: Simple, accurate equations for human blood O₂ dissociation computations. In: *J Appl Physiol* 46 (1979), Mar, Nr. 3, S. 599–602
- [70] KLINKE, R.; PAPE, H.-C.; SILBERNAGL, S.: *Physiologie*. Bd. 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
- [71] PAULING, L.; CORYELL, C. D.: The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 22 (1936), Apr, Nr. 4, S. 210–216
- [72] THULBORN, K. R.; WATERTON, J. C.; MATTHEWS, P. M.; RADDA, G. K.: Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in

- whole blood at high field. In: *Biochim Biophys Acta* 714 (1982), Feb, Nr. 2, S. 265–270
- [73] OGAWA, S.; LEE, T. M.; KAY, A. R.; TANK, D. W.: Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), Dec, Nr. 24, S. 9868–9872
- [74] OGAWA, S.; LEE, T. M.; NAYAK, A. S.; GLYNN, P.: Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. In: *Magn Reson Med* 14 (1990), Apr, Nr. 1, S. 68–78
- [75] OGAWA, S.; LEE, T. M.: Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: in vivo and in vitro measurements and image simulation. In: *Magn Reson Med* 16 (1990), Oct, Nr. 1, S. 9–18
- [76] OGAWA, S.; MENON, R. S.; TANK, D. W.; KIM, S. G.; MERKLE, H.; ELLERMANN, J. M.; UGURBIL, K.: Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model. In: *Biophys J* 64 (1993), Mar, Nr. 3, S. 803–812
- [77] YABLONSKIY, D. A.; HAACKE, E. M.: Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. In: *Magn Reson Med* 32 (1994), Dec, Nr. 6, S. 749–763
- [78] DUYN, J. H.; MOONEN, C. T.; YPEREN, G. H.; BOER, R. W.; LUYTEN, P. R.: Inflow versus deoxyhemoglobin effects in BOLD functional MRI using gradient echoes at 1.5 T. In: *NMR Biomed* 7 (1994), Mar, Nr. 1-2, S. 83–88
- [79] BOXERMAN, J. L.; HAMBERG, L. M.; ROSEN, B. R.; WEISSKOFF, R. M.: MR contrast due to intravascular magnetic susceptibility perturbations. In: *Magn Reson Med* 34 (1995), Oct, Nr. 4, S. 555–566
- [80] KUPERMAN, V. Y. U.; RIVER, J. N.; LEWIS, M. Z.; LUBICH, L. M.; KARCZMAR, G. S.: Changes in T2*-weighted images during hyperoxia differentiate tumors from normal tissue. In: *Magn Reson Med* 33 (1995), Mar, Nr. 3, S. 318–325
- [81] GRIFFITHS, J. R.; TAYLOR, N. J.; HOWE, F. A.; SAUNDERS, M. I.; ROBINSON, S. P.; HOSKIN, P. J.; POWELL, M. E.; THOUMINE, M.; CAINE, L. A.; BADDELEY, H.: The response of human tumors to carbogen breathing, monitored by Gradient-Recalled Echo Magnetic Resonance Imaging. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39 (1997), Oct, Nr. 3, S. 697–701
- [82] AL-HALLAQ, H. A.; RIVER, J. N.; ZAMORA, M.; OIKAWA, H.; KARCZMAR, G. S.: Correlation of magnetic resonance and oxygen microelectrode measurements of carbogen-induced changes in tumor oxygenation. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41 (1998), Apr, Nr. 1, S. 151–159

- [83] ZHONG, J.; KENNAN, R. P.; FULBRIGHT, R. K.; GORE, J. C.: Quantification of intravascular and extravascular contributions to BOLD effects induced by alteration in oxygenation or intravascular contrast agents. In: *Magn Reson Med* 40 (1998), Oct, Nr. 4, S. 526–536
- [84] BAUDELET, C.; GALLEZ, B.: How does blood oxygen level-dependent (BOLD) contrast correlate with oxygen partial pressure (pO₂) inside tumors? In: *Magn Reson Med* 48 (2002), Dec, Nr. 6, S. 980–986
- [85] FAN, X.; RIVER, J. N.; ZAMORA, M.; AL-HALLAQ, H. A.; KARZMAR, G. S.: Effect of carbogen on tumor oxygenation: combined fluorine-19 and proton MRI measurements. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54 (2002), Nov, Nr. 4, S. 1202–1209
- [86] ZHAO, D.; RAN, S.; CONSTANTINESCU, A.; HAHN, E. W.; MASON, R. P.: Tumor oxygen dynamics: correlation of in vivo MRI with histological findings. In: *Neoplasia* 5 (2003), Nr. 4, S. 308–318
- [87] JAEGER, K. D.; MERLO, F. M.; KAVANAGH, M. C.; FYLES, A. W.; HEDLEY, D.; HILL, R. P.: Heterogeneity of tumor oxygenation: relationship to tumor necrosis, tumor size, and metastasis. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (1998), Nov, Nr. 4, S. 717–721
- [88] HÖCKEL, M.; VAUPEL, P.: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. In: *J Natl Cancer Inst* 93 (2001), Feb, Nr. 4, S. 266–276
- [89] ZLOTECKI, R. A.; BAXTER, L. T.; BOUCHER, Y.; JAIN, R. K.: Pharmacologic modification of tumor blood flow and interstitial fluid pressure in a human tumor xenograft: network analysis and mechanistic interpretation. In: *Microvasc Res* 50 (1995), Nov, Nr. 3, S. 429–443
- [90] BERNSEN, H. J.; RIJKEN, P. F.; OOSTENDORP, T.; KOGEL, A. J. d.: Vascularity and perfusion of human gliomas xenografted in the athymic nude mouse. In: *Br J Cancer* 71 (1995), Apr, Nr. 4, S. 721–726
- [91] PARHAMI, P.; FUNG, B. M.: Fluorine-19 relaxation study of perfluoro chemicals as oxygen carriers. In: *J Physiol Chem* 87 (1983), S. 1928–1931
- [92] SOLOMON, I.: Relaxation Processes in a System of Two Spins. In: *Physical Review* 99 (1955), July, Nr. 2, S. 559
- [93] NÖTH, U.: Quantitative Bestimmung der ¹⁹F-NMR-Relaxationsrate von fluorierten Substanzen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration., *Physikalisches Institut der Universität Würzburg*, Diplomarbeit, 1991
- [94] DARDZINSKI, B. J.; SOTAK, C. H.: Rapid tissue oxygen tension mapping using ¹⁹F inversion-recovery echo-planar imaging of perfluoro-15-crown-5-ether. In: *Magn Reson Med* 32 (1994), Jul, Nr. 1, S. 88–97

- [95] MASON, R. P.; RODBUMRUNG, W.; ANTICH, P. P.: Hexafluorobenzene: a sensitive ^{19}F NMR indicator of tumor oxygenation. In: *NMR Biomed* 9 (1996), May, Nr. 3, S. 125–134
- [96] YOKOYAMA, K.; YAMANOUCHI, K.; OHYANAGI, H.; MITSUNO, T.: Fate of perfluorochemicals in animals after intravenous injection or hemodilution with their emulsions. In: *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 26 (1978), Mar, Nr. 3, S. 956–966
- [97] LE, D.; MASON, R. P.; HUNJAN, S.; CONSTANTINESCU, A.; BARKER, B. R.; ANTICH, P. P.: Regional tumor oxygen dynamics: ^{19}F PBSR EPI of hexafluorobenzene. In: *Magn Reson Imaging* 15 (1997), Nr. 8, S. 971–981
- [98] SANDEN, B. P. d.; HEERSCHAP, A.; SIMONETTI, A. W.; RIJKEN, P. F.; PETERS, H. P.; STÜBEN, G.; KOGEL, A. J. d.: Characterization and validation of noninvasive oxygen tension measurements in human glioma xenografts by ^{19}F -MR relaxometry. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44 (1999), Jun, Nr. 3, S. 649–658
- [99] YU, J. xin; KODIBAGKAR, V. D.; CUI, W.; MASON, R. P.: ^{19}F : a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance. In: *Curr Med Chem* 12 (2005), Nr. 7, S. 819–848
- [100] ZHAO, D.; JIANG, L.; HAHN, E. W.; MASON, R. P.: Comparison of ^1H blood oxygen level-dependent (BOLD) and ^{19}F MRI to investigate tumor oxygenation. In: *Magn Reson Med* 62 (2009), Aug, Nr. 2, S. 357–364
- [101] MILAS, L.; WIKE, J.; HUNTER, N.; VOLPE, J.; BASIC, I.: Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: associations with tumor growth parameters and tumor radiocurability. In: *Cancer Res* 47 (1987), Feb, Nr. 4, S. 1069–1075
- [102] NÖTH, U.; MORRISSEY, S. P.; DEICHMANN, R.; ADOLF, H.; SCHWARZBAUER, C.; LUTZ, J.; HAASE, A.: In vivo measurement of partial oxygen pressure in large vessels and in the reticuloendothelial system using fast ^{19}F -MRI. In: *Magn Reson Med* 34 (1995), Nov, Nr. 5, S. 738–745
- [103] MASON, R. P.; NUNNALLY, R. L.; ANTICH, P. P.: Tissue oxygenation: a novel determination using ^{19}F surface coil NMR spectroscopy of sequestered perfluorocarbon emulsion. In: *Magn Reson Med* 18 (1991), Mar, Nr. 1, S. 71–79
- [104] MASON, R. P.; JEFFREY, F. M.; MALLOY, C. R.; BABCOCK, E. E.; ANTICH, P. P.: A noninvasive assessment of myocardial oxygen tension: ^{19}F NMR spectroscopy of sequestered perfluorocarbon emulsion. In: *Magn Reson Med* 27 (1992), Oct, Nr. 2, S. 310–317
- [105] HEES, P. S.; SOTAK, C. H.: Assessment of changes in murine tumor oxygenation in response to nicotinamide using ^{19}F NMR relaxometry of a perfluorocarbon emulsion. In: *Magn Reson Med* 29 (1993), Mar, Nr. 3, S. 303–310
- [106] MASON, R. P.; ANTICH, P. P.; BABCOCK, E. E.; CONSTANTINESCU, A.; PESCHKE, P.; HAHN, E. W.: Non-invasive determination of tumor oxygen tension and local

- variation with growth. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29 (1994), Apr, Nr. 1, S. 95–103
- [107] McINTYRE, D. J.; MCCOY, C. L.; GRIFFITHS, J. R.: Tumour oxygenation measurements by ^{19}F magnetic resonance imaging of perfluorocarbons. In: *Current science* 76 (1999), S. 753–762
- [108] NEEMAN, M.; DAFNI, H.; BUKHARI, O.; BRAUN, R. D.; DEWHIRST, M. W.: In vivo BOLD contrast MRI mapping of subcutaneous vascular function and maturation: validation by intravital microscopy. In: *Magn Reson Med* 45 (2001), May, Nr. 5, S. 887–898
- [109] FUKUMURA, D.; JAIN, R. K.: Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. In: *J Cell Biochem* 101 (2007), Jul, Nr. 4, S. 937–949
- [110] LOTZ, J.; MEIER, C.; LEPPERT, A.; GALANSKI, M.: Cardiovascular flow measurement with phase-contrast MR imaging: basic facts and implementation. In: *Radiographics* 22 (2002), Nr. 3, S. 651–671
- [111] ATKINSON, D. J.; BURSTEIN, D.; EDELMAN, R. R.: First-pass cardiac perfusion: evaluation with ultrafast MR imaging. In: *Radiology* 174 (1990), Mar, Nr. 3 Pt 1, S. 757–762
- [112] EDELMAN, R. R.; MATTLE, H. P.; ATKINSON, D. J.; HILL, T.; FINN, J. P.; MAYMAN, C.; RONTAL, M.; HOOGEWOU, H. M.; KLEEFIELD, J.: Cerebral blood flow: assessment with dynamic contrast-enhanced $\text{T}2^*$ -weighted MR imaging at 1.5 T. In: *Radiology* 176 (1990), Jul, Nr. 1, S. 211–220
- [113] DETRE, J. A.; LEIGH, J. S.; WILLIAMS, D. S.; KORETSKY, A. P.: Perfusion imaging. In: *Magn Reson Med* 23 (1992), Jan, Nr. 1, S. 37–45
- [114] WILLIAMS, D. S.; DETRE, J. A.; LEIGH, J. S.; KORETSKY, A. P.: Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Jan, Nr. 1, S. 212–216
- [115] HERSCOVITCH, P.; RAICHLE, M. E.: What is the correct value for the brain–blood partition coefficient for water? In: *J Cereb Blood Flow Metab* 5 (1985), Mar, Nr. 1, S. 65–69
- [116] EDELMAN, R. R.; SIEWERT, B.; DARBY, D. G.; THANGARAJ, V.; NOBRE, A. C.; MESULAM, M. M.; WARACH, S.: Qualitative mapping of cerebral blood flow and functional localization with echo-planar MR imaging and signal targeting with alternating radio frequency. In: *Radiology* 192 (1994), Aug, Nr. 2, S. 513–520
- [117] KWONG, K. K.; CHESLER, D. A.; WEISSKOFF, R. M.; DONAHUE, K. M.; DAVIS, T. L.; OSTERGAARD, L.; CAMPBELL, T. A.; ROSEN, B. R.: MR perfusion studies with $\text{T}1$ -weighted echo planar imaging. In: *Magn Reson Med* 34 (1995), Dec, Nr. 6, S. 878–887

- [118] BELLE, V.; KAHLER, E.; WALLER, C.; ROMMEL, E.; VOLL, S.; HILLER, K. H.; BAUER, W. R.; HAASE, A.: In vivo quantitative mapping of cardiac perfusion in rats using a noninvasive MR spin-labeling method. In: *J Magn Reson Imaging* 8 (1998), Nr. 6, S. 1240–1245
- [119] BAUER, W. R.; HILLER, K. H.; RODER, F.; ROMMEL, E.; ERTL, G.; HAASE, A.: Magnetization exchange in capillaries by microcirculation affects diffusion-controlled spin-relaxation: a model which describes the effect of perfusion on relaxation enhancement by intravascular contrast agents. In: *Magn Reson Med* 35 (1996), Jan, Nr. 1, S. 43–55
- [120] ROBERTS, D. A.; RIZI, R.; LENKINSKI, R. E.; LEIGH, J. S.: Magnetic resonance imaging of the brain: blood partition coefficient for water: application to spin-tagging measurement of perfusion. In: *J Magn Reson Imaging* 6 (1996), Nr. 2, S. 363–366
- [121] YUAN, F.; SALEHI, H. A.; BOUCHER, Y.; VASTHARE, U. S.; TUMA, R. F.; JAIN, R. K.: Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. In: *Cancer Res* 54 (1994), Sep, Nr. 17, S. 4564–4568
- [122] SILVA, A. C.; KIM, S. G.; GARWOOD, M.: Imaging blood flow in brain tumors using arterial spin labeling. In: *Magn Reson Med* 44 (2000), Aug, Nr. 2, S. 169–173
- [123] ZIPS, D.; LE, K.; YAROMINA, A.; DÖRFLER, A.; EICHELER, W.; ZHOU, X.; GEYER, P.; HILBERG, F.; BAUMANN, M.: Triple angiokinase inhibition, tumour hypoxia and radiation response of FaDu human squamous cell carcinomas. In: *Radiother Oncol* 92 (2009), Sep, Nr. 3, S. 405–410
- [124] HANAHAN, D.; FOLKMAN, J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. In: *Cell* 86 (1996), Aug, Nr. 3, S. 353–364
- [125] KLEITER, M. M.; THRALL, D. E.; MALARKEY, D. E.; JI, X.; LEE, D. Y. W.; CHOU, S.-C.; RALEIGH, J. A.: A comparison of oral and intravenous pimonidazole in canine tumors using intravenous CCI-103F as a control hypoxia marker. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (2006), Feb, Nr. 2, S. 592–602
- [126] ISHIMORI, Y.; KIMURA, H.; UEMATSU, H.; MATSUDA, T.; ITOH, H.: Dynamic T1 estimation of brain tumors using double-echo dynamic MR imaging. In: *J Magn Reson Imaging* 18 (2003), Jul, Nr. 1, S. 113–120
- [127] WARNTJES, J. B. M.; DAHLQVIST, O.; LUNDBERG, P.: Novel method for rapid, simultaneous T1, T*2, and proton density quantification. In: *Magn Reson Med* 57 (2007), Mar, Nr. 3, S. 528–537
- [128] SCHEFFLER, K.; HENNIG, J.: T(1) quantification with inversion recovery TrueFISP. In: *Magn Reson Med* 45 (2001), Apr, Nr. 4, S. 720–723

- [129] SCHMITT, P.; GRISWOLD, M. A.; JAKOB, P. M.; KOTAS, M.; GULANI, V.; FLENTJE, M.; HAASE, A.: Inversion recovery TrueFISP: quantification of T(1), T(2), and spin density. In: *Magn Reson Med* 51 (2004), Apr, Nr. 4, S. 661–667
- [130] BLACK, H. S.: *Modulation theory*. Princeton : Van Nostrand, 1953

Publikationen

Zeitschriften:

- **Philipp Mörchel**, Gerd Melkus, Peter M. Jakob, Michael Flentje, “Fitting Relaxation Measurements via Pulse Sequence Simulations”, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, In Review, 2010
- **Philipp Mörchel**, Gerd Melkus, Ala Yaromina, Daniel Zips, Michael Baumann, Peter M. Jakob, Michael Flentje “Correlating quantitative MR measurements of standardized tumor lines with histological parameters and tumor control dose”, *Radiotherapy and Oncology* 96:123-130, 2010
- Herold, V., Parczyk, M., **Mörchel, P.**, Ziener, C., Klug, G., Bauer, W.R., Rommel, E., Jakob, P.M. “In vivo measurement of local aortic pulse-wave velocity in mice with MR microscopy at 17.6 tesla”, *Magnetic Resonance in Medicine* 61 (6): 1293-1299, 2009
- Gerd Melkus, **Philipp Mörchel**, Volker C. Behr, Markus Kotas, Michael Flentje, Peter M. Jakob, “Short-echo spectroscopic imaging combined with lactate editing in a single scan”, *NMR in Biomedicine* 21:1076-1086, 2008
- Johannes F.T. Arnold, **Philipp Mörchel**, Eckard Glaser, Eberhard D. Pracht, Peter M. Jakob, “Lung MRI using an MR-compatible active breathing control (MR-ABC)”, *Magnetic Resonance in Medicine* 58:1092-1098, 2007
- Volker Herold, **Philipp Mörchel**, Cornelius Faber, Eberhard Rommel, Axel Haase, Peter M. Jakob, “In Vivo Quantitative Three-Dimensional Motion Mapping of the Murine Myocardium with PC-MRI at 17.6 T”, *Magnetic Resonance in Medicine* 55:1058-1064, 2006

Vorträge:

- G. Melkus, **P. Mörchel**, V. C. Behr, M. Kotas, M. Flentje, P. Jakob, “Sensitive J-Coupled Metabolite Mapping Using Sel-MQC with Selective Multi Spin Echo Readout”, *Proc. ISMRM*, #51, Berlin, Germany, 2007
- G. Melkus, **P. Mörchel**, V. C. Behr, M. Kotas, P. Jakob, M. Flentje, “Chemical shift imaging and lactate editing in one scan”, *Proc. ESMRMB*, #211, Warsaw, Poland, 2006 (*MAGMA* 19(s), 2006)
- G. Melkus, **P. Mörchel**, V. C. Behr, M. Kotas, P. Jakob, M. Flentje, “Magnetresonanztomographie und -spektroskopie standardisierter Xenograft-Plattenepithelkarzinome: Laktatverteilung, Perfusion und Oxygenierung”, 12. Jahrestagung

der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) #59, Dresden, Germany, 2006

- **P. Moerchel**, G. Melkus, V. C. Behr, M. Kotas, P. Jakob, M. Flentje, “Multi Parameter High-Resolution Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of Tumors”, Proc. ISMRM, #472, Seattle, Washington, USA, 2006
- V. Herold, **P. Moerchel**, C. Faber, E. Rommel, A. Haase, P. M. Jakob, “In Vivo cardiac and vascular imaging in mice at 17.6T”, Proc. Highfield Symposium, O4, Würzburg, Germany, 2006
- **P. Moerchel**, G. Melkus, M. Kotas, P. Jakob, M. Flentje, “High-Resolution MRI and MRS of the Tumor Microenvironment”, Proc. Highfield Symposium, O4, Würzburg, Germany, 2006
- G. Melkus, **P. Mörchel**, M. Kotas, P. M. Jakob, M. Flentje, “Hochaufgelöste Magnetresonanztomographische Untersuchung standardisierter Xenograft-Plattenepithelkarzinome: Laktatverteilung, Perfusion, und Oxygenierung”, Deutsche Sektion - International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM), Münster, Deutschland, 2005
- P. Schmitt, F. Breuer, M. Kotas, G. Melkus, **P. Mörchel**, J. Müller, P. M. Jakob, A. Haase, M. Flentje, “Hochaufgelöste Magnetresonanztomographische Untersuchung standardisierter Xenograft-Plattenepithelkarzinome: Azidose-Metabolismus, Perfusion, und Oxygenierung”, Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie, Dresden, Deutschland, 2004
- **Philipp Mörchel**, Volker Herold, Cornelius Faber, Eberhard Rommel, Axel Haase, “High field In-Vivo Quantitative 3D Motion Mapping of Murine Myocardium with Phase Contrast MRI”, Proc. ICMRM, C-38, Snowbird, Utah, USA, 2003
- **Philipp Mörchel**, Volker Herold, Cornelius Faber, Eberhard Rommel, Axel Haase, “Quantitative 3D in vivo motion mapping of murine myocardium with phase contrast MRI at 17.6 Tesla”, Proc. ESMRMB, #336, Rotterdam, Netherlands, 2003

Posterpräsentationen:

- M. F. Hildenbrand, S. Nauroth, X. Helluy, **P. Moerchel**, A. Schmitt, and K. P. Lesch, “Development of a 17.6T ultra-high field BOLD-fMRI method for amygdala related psychiatric disorders”, Proc. ISMRM #7212, Stockholm, Sweden, 2010
- **P. Mörchel**, G. Melkus, M. Flentje, P. M. Jakob, “Single Scan T1 and T2* Mapping without Flip Angle Correction”, Proc. ISMRM #2633, Hawaii, USA, 2009
- G. Melkus, **P. Mörchel**, M. Flentje, P. M. Jakob, “Diffusion measurement of Mobile Lipids using co-resonant coupled metabolite dephasing”, Proc. ISMRM #2362, Hawaii, USA, 2009
- J. F. Arnold, **P. Mörchel**, E. Glaser, and P. M. Jakob, “An MR-compatible

- active breathing control (MR-ABC)”, Proc. ISMRM #3790, Toronto, Canada, 2008
- **P. Mörchel**, G. Melkus, V. C. Behr, M. Kotas, P. M. Jakob, M. Flentje, “Simultaneous T1 and T2* mapping without B1 correction”, Proc. ISMRM #2186, Toronto, Canada, 2008
 - G. Melkus, **P. Mörchel**, V. C. Behr, M. Kotas, P. M. Jakob, M. Flentje, “Sensitivity of single shot multiple J-coupled metabolite detection using Dual Sel-MQC (D-Sel-MQC) editing”, Proc. ISMRM #1566, Toronto, Canada, 2008
 - G. Melkus, **P. Mörchel**, V.C. Behr, M. Kotas, P. Jakob, M. Flentje, “Combined lactate editing and T2 measurement for quantification in lipid rich tissues”, Proc. ESMRMB, #839, Warsaw, Poland, 2006 (MAGMA 19(s), 2006)
 - **P. Moerchel**, G. Melkus, V. C. Behr, M. Kotas, P. Jakob, M. Flentje, “High-resolution MRI and MRS of the tumor microenvironment”, Proc. ESMRMB, #379, Warsaw, Poland, 2006 (MAGMA 19(s), 2006)
 - G. Melkus, **P. Mörchel**, V. C. Behr, M. Kotas, P. M. Jakob, M. Flentje, “Short Echo Spectroscopic Imaging combined with Lactate Editing in a single scan”, Proc. ISMRM, #3053, Seattle, Washington, USA, 2006

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung des Lehrstuhls für Experimentelle Physik 5 der Universität Würzburg, der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Projekt FI 429 225/2-1) ermöglicht. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt diesbezüglich:

Prof. Dr. Peter M. Jakob, meinem Doktorvater, der mir die Möglichkeit zur Promotion am Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 eröffnet hat. Durch seine fachlichen Denkanstöße und den sehr angenehmen Umgang werde ich ihn immer als vorbildlichen “Chef” in Erinnerung behalten.

Prof. Dr. Michael Flentje, meinem “Arbeitgeber” und Mentor in tumorbezogenen und strahlentherapeutischen Belangen, der immer ein offenes Ohr für Probleme und fachliche Diskussionen hatte.

Gerd Melkus mit dem ich in unserem Projekt gemeinsam etliche Tage vor dem 750er verbracht und unzählige Proben untersucht habe. Mit seiner Hilfe konnten so einige Unwegsamkeiten auf dem Weg zum Abschluss dieser Arbeit beiseite geräumt werden.

Dr. Markus Kotas, für die fachlichen Diskussionen über die Tumormedizin und für die Bearbeitung des “Papierkrams” rund um die Tierversuchsanträge.

Meinen Projektpartnern aus Dresden, Mainz und München: Prof. Dr. Michael Baumann, Prof. Dr. Wolfgang Mueller-Klieser, Prof. Dr. Michael Molls, Dr. Daniel Zips, Ala Yaromina und Verena Quennet für die fachlichen Diskussionen auf unseren Projekttreffen und die angenehme Zusammenarbeit in unserem Projekt.

Carmen Bundschuh, Elisabeth Höfer und Sabine Voll die sich um das Wohlbefinden meiner Probanden innerhalb sowie außerhalb des Tomographen gekümmert haben.

Andrea Rosner und Katja Schumann, für den nicht abreisenden Nachschub an Messproben aus Dresden.

Dr. Felix Breuer, Johannes Fuchs, Volker Herold, Thomas Kampf, Gerd Melkus, Sabine Voll und Dr. Christian Ziener für das Korrekturlesen der Arbeit und die hilfreichen Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge.

Katrin Durschang, Dr. Nicole Seiberlich die meinen englischsprachigen Ausführungen den letzten Schliff verpasst haben.

Dr. Johannes Arnold, Constanze Braasch, Johannes Fuchs, Daniel Gareis, Gerd Melkus,

Danksagung

Dr. Armin Porea und Stefanie Sparka für die mehr als angenehme Arbeitsatmosphäre in F069 und die unvergesslichen “Veranstaltungen” auch außerhalb des Büroalltags.

Ganz EP5, der besten Arbeitsgruppe, die man sich nur wünschen kann.

Christine Lehnert, für die Ausdauer und Geduld mit der sie mir zur Seite gestanden, den Rücken frei gehalten und mich bestärkt hat.

Meiner Mutter, die mich stets unterstützt hat und immer für mich da war.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Promotionsarbeit nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie wurde weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Würzburg, August 2010

.....

(Philipp Mörchel)

