Universität Bremen
Fachbereich 2 (Chemie/Biologie)
AG Tomographie – Prof. Dr. D. Leibfritz

Beschränkte Diffusion und Austausch von Wasser in Zellkulturen und im Gehirn: Theoretische Modelle und ^{1}H-NMR-Messungen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Josef Pfeuffer
aus Leipheim an der Donau

im November 1996

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 1994 bis November 1996 im Fachbereich Chemie der Universität Bremen unter der Leitung von Prof. Dr. Dieter Leibfritz angefertigt.

Gutachter der Dissertation:	Prof. Dr. Dieter Leibfritz Prof. Dr. Adalbert Mayer-Heinricy
Tag des öffentlichen Kolloquiums:	19. Dezember 1996
Beisitzer der Prüfung:	Prof. Dr. Detmar Beyersmann Prof. Dr. Wolf-Dieter Stohrer

Der Fall (bababadalgharaghtakamminarronnkonnbronntonner-
ronntuonnthunntrovarrhounawnskawntoohoohoordenenthurnuk !)

James Joyce

„NICHTS IST DRINNE NICHTS IST DRAUSSEN ·
DENN WAS INNEN IST AUCH AUSSEN“

Eberhard Schlotter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **ix**

Symbole und Abkürzungen **x**

1 Einführung und Überblick **1**

2 Theorien und Modelle **5**

2.1 Theoretische Grundlagen 5

2.1.1 Freie und behinderte Diffusion 5

2.1.2 Beschränkte Diffusion – q-Raum 7

2.1.3 Austausch in einem Zweikomponentensystem 10

2.2 Ein Monte-Carlo-Modell für ischämisches Gewebe 12

2.2.1 Random-Walk-Modell für diffundierende Spins 13

2.2.2 Implementierung auf dem Rechner 14

2.2.3 Zweidimensionale Zellmodelle 17

2.2.4 Dreidimensionales Zellmodell 22

2.2.5 Zusammenfassung 25

2.3 Analytisches Modell - Beschränkung und Austausch 26

2.3.1 Zwei Kompartimente ohne Austausch 28

2.3.2 Zwei Kompartimente mit Austausch – Kärgerformel 30

2.3.3 Kärgerformel mit beschränkter intrazellulärer Diffusion . . 32

2.3.4 Extraktion relevanter Parameter 33

2.3.5 Zwei Kompartimente mit Verteilung der Kastenlängen . . 40

2.3.6 Zweikomponentenmodell mit Variation des intrazellulären Volumens und der intrazellulären Austauschzeit 48
2.3.7 Diffusionsmodell für ischämisches Gewebe 50
2.3.8 Zusammenfassung 53

3 Diffusionsgewichtete ^{1}H-NMR-Messungen 55

3.1 Einleitung 55
3.2 Experimentelle Bedingungen 57
3.2.1 Präparation der Zellkulturen 57
3.2.2 Spektroskopische Messungen am AMX 360 58
3.2.3 Bildgebung am BIOSPEC 4.7 T 59
3.3 Diffusionsmessungen an Gliomzellkulturen 60
3.3.1 Kontrollmessungen 60
3.3.2 Kurze Diffusionszeiten – Spinecho mit bipolaren Gradienten 62
3.3.3 Lange Diffusionszeiten – stimulierte Echosequenz 62
3.3.4 Übergang von freier zu beschränkter Diffusion – Spinecho . 69
3.3.5 Diskussion 73
3.4 Verschiedene physiologische Randbedingungen 75
3.4.1 Intrazelluläres Volumen unter osmotischem Stress 75
3.4.2 Astrocytenschwellung mit Immunsuppressiva 79
3.4.3 Zellvolumenabnahme während Apoptose 81
3.4.4 Diskussion 81
3.5 Hg-Reagenzien und Austauschzeit 83
3.5.1 Wirkung von pCMBS auf Gliomzellen 83
3.5.2 Bestimmung der Austauschzeit mit dem *cg*-Experiment . . 86
3.5.3 Kombiniertes *ct*/*cg*-Experiment 86
3.5.4 Diskussion 88
3.6 Diffusionsgewichtete Bildgebung an Ratten 90

Literaturverzeichnis 93

Veröffentlichungen 103

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die beschränkte Diffusion und der Austausch von Wasser in zellulären Systemen mit theoretischen Modellen und ^{1}H-NMR-Messungen untersucht.

Mit einer Monte-Carlo-Simulation wurde das NMR-Experiment zur Messung der Diffusion in biologischem Gewebe auf dem Rechner nachgebildet. In einem dreidimensionalen Zellmodell wurden Zellschwellungen und Permeabilitätsänderungen untersucht, welche als grundlegende, mögliche Faktoren der Änderung des Diffusionskontrastes während Ischämie im Gehirn gelten.

Mit einem analytisches Modell für die Diffusionsabschwächung eines NMR-Experiments in einem Zweikomponentensystem konnte der intrazelluläre Anteil des Signals durch beschränkte Diffusion an permeablen Grenzen erklärt werden. Die Beschreibung erfolgte durch eine Kombination der Formel für beschränkte Diffusion nach Tanner mit der Formel für Austausch in einem Zweikomponentensystem nach Kärger. In der erweiterten Form wurden Verteilungen der Kastenlängen miteinbezogen, wodurch eine größere Übereinstimmung mit den Experimenten erreicht werden kann.

Die Modellrechnungen zeigten, daß durch hohe Diffusionswichtung ausschließlich intrazelluläres Signal erfaßt wird, welches sich sowohl mit dem (intrazellulären) Volumen als auch mit der (intrazellulären) Austauschzeit ändert. Dies begründet eine nichtinvasive Methode zur Messung von Änderungen des intrazellulären Volumens mit Diffusionsgradienten. Mit typischen Parametern für die *in vivo* Situation an der Ratte wurde ischämische Zellschwellung in Gehirngewebe simuliert. Die Änderungen der Diffusionsabschwächung sind in guter Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen und liefern erstmals ein quantitatives Modell für die multiexponentiellen Signalabfälle bei hohen b-Werten.

Im experimentellen Teil wurden Diffusionsmessungen an Gliomzellen bei kurzen, mittleren und langen Diffusionszeiten durchgeführt. Die intrazelluläre Komponente der Diffusionsabschwächung zeigte einerseits den Übergang von freier zu beschränkter Diffusion, andererseits konnte der Austausch von intra- und extrazellulärem Wasser beobachtet und die intrazelluläre Austauschzeit zu 51 ms bestimmt werden. In Übereinstimmung mit der Theorie konnten mit der Wahl der Gradientenstärke Signale aus bestimmten Kompartimenten getrennt werden.

Mit hoher zeitlicher Auflösung konnten Änderungen des intrazellulären Volumens unter osmotischem Stress, unter Behandlung mit Immunsuppressiva und während Apoptose dargestellt werden. Der Einfluß von Hg-Reagenzien auf die Permeabilität der Zellmembran für Wasser wurde mit einer zeitlichen Aufzeichnung sowohl des Zellvolumens als auch der Austauschzeit untersucht.

Mit diffusionsgewichteter Bildgebung an Ratten bei verschiedenen Diffusionszeiten und hohen b-Werten wurde die intrazelluläre Austauschzeit für das Rattenhirn zu 25 ms bestimmt.

Symbole und Abkürzungen

α	extrazellulärer Volumenanteil, $\alpha = p_2$
a	Kastenlänge, $[a] = \mu$m
ADC, D_{app}	scheinbare Diffusionskonstante ('apparent diffusion coefficient')
b	b-Wert, $b = \tilde{q}^2 \cdot t_D$, $[b] = \text{s/mm}^2$
BMG	Basalmembrangel
c_{in}, c_{ex}	Konzentration (intra-, extrazellulär)
cg	Diffusionsmessung bei gleichem Magnetfeldgradient ('constant gradient')
ct	Diffusionsmessung bei gleicher Diffusionszeit ('constant time')
δ, Δ	Gradientendauer, Gradientenabstand, $[\delta, \Delta] = \text{ms}$
D, D_{in}, D_{ex}	Diffusionskonstante (intra-, extrazellulär), $[D] = 10^{-3}\ \text{mm}^2/\text{s}$
DMEM	Perfusionsmedium ('Dulbecco's modified Eagle's medium')
DNA	Träger der genetischen Information ('deoxyribonucleic acid')
$E(q)$	diffusionsgewichtetes NMR-Signal bei beschränkter Diffusion
$\phi_j(t)$	Phase eines Spins j zur Zeit t
FWHM	Halbwertsbreite ('full width at half maximum')
γ	gyromagnetisches Verhältnis des Protons, $\gamma = \gamma_H = 267.52$ MHz/T
g_k	Zufallszahl
G	Gradientenstärke, $[G] = \text{mT/m}$
HF	Hochfrequenz
λ	Tortuositätsfaktor
l	Tortuositätsexponent
m	Steigung eines ct-Experiments
N	Teilchenzahl
NMR	kernmagnetische Resonanz ('nuclear magnetic resonance')
p_1, p_2, p_{in}, p_{ex}	relativer Volumenanteil (intra-, extrazellulär)
pCMBS	Hg-Reagenz: Na^+, p-Chlormercuriobenzosulfonat
P_s	Selbstkorrelationswahrscheinlichkeit
q	q-Wert, $q = \gamma/2\pi \cdot \delta \cdot G$, $[q] = \mu\text{m}^{-1}$
$\tilde{q}^2$	$\tilde{q}^2 = 4\pi^2 q^2$, $[\tilde{q}^2] = 10^3\ \text{mm}^{-2}$
$\rho(r)$	Spindichte
r, $<r>$, r_{app}	Ort, mittlere Verschiebung, scheinbare Verschiebung, $[r] = \mu$m
RVD	Zellschrumpfung durch Volumenregulation ('regulatory volume decrease')
RVI	Zellschwellung durch Volumenregulation ('regulatory volume increase')
σ	Standardabweichung
S	diffusionsgewichtetes NMR-Signal
S/V	Oberflächen-/Volumenverhältnis ('surface/volume')
$\tau_1, \tau_2, \tau_{\text{intra}}$	Austauschzeit (intrazellulär), $[\tau] = \text{ms}$
t, t_R	Zeit, Wiederholzeit, $[t] = \text{ms}$
t_D	Diffusionszeit, $t_D = (\Delta - \delta/3)$, $[t_D] = \text{ms}$
T	Temperatur, $[T] = \text{K}$
T_1, T_2	longitudinale, transversale Relaxationszeit
UFLARE	schnelle Bildgebungssequenz ('Ultra Fast Low Angle RARE')
w^T	Durchtrittswahrscheinlichkeit

Kapitel 1

Einführung und Überblick

Aufbauend auf die grundlegenden Arbeiten von Tanner und Stejskal im Jahre 1965 [1, 2] hat sich die diffusionsgewichtete Kernspinresonanz-Bildgebung zur Standardmethode in der medizinischen Diagnostik von Hirninfarkten entwickelt [3]. Die Ischämie, eine Unterbrechung oder starke Verringerung der Durchblutung, kann bis zur Nekrose der betroffenen Gehirnareale führen. Ischämisches Gewebe hebt sich auf Grund einer veränderten, scheinbaren Diffusionskonstante (ADC ... 'apparent diffusion coefficient') vom gesunden Gewebe ab, wobei mit der Kernspinresonanz zeitliche Änderungen des ADC schon innerhalb weniger Minuten nach Auftreten des Infarktes beobachtet werden können [4].

ADC-Änderungen während einer Ischämie sind in großem Umfange bei Mensch und Tieren untersucht worden, obwohl deren Ursachen im Detail noch Gegenstand aktueller Forschungsarbeit sind. Bislang fehlt eine quantitative Erklärung für den Absolutwert des ADC sowie dessen Änderung während einer Ischämie. Schon die Verwendung des Begriffes „scheinbare Diffusionskonstante“ drückt aus, daß dieser phänomenologische Parameter aus einem komplizierten Zusammenwirken physiologisch teilweise nur unzureichend bekannter Größen abgeleitet ist.

Ausgangspunkt dieser Arbeit sind insbesondere zwei Experimente, deren Erklärung auf ein besseres Verständnis der Diffusion von Wasser im Gehirngewebe hoffen läßt:

- Als einfaches, experimentelles Modell für das Gehirn können *perfundierte Gliomzellkulturen* verwendet werden, die sich über Stunden *in vitro* unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersuchen lassen. Insbesondere können die intrazelluläre Diffusion und der Wasseraustausch über die Zellmembran mit dem umgebenden Wasser ohne die zusätzliche Komplikation der Diffusion im Extrazellulärraum studiert werden. In Gewebe muß zusätzlich die Behinderung (Tortuosität) und Anisotropie der extrazellulären Diffusion berücksichtigt werden.

In Abb. 1.1 (oben) ist eine typische Messung an Gliomzellkulturen dargestellt. Mit steigendem Diffusionsgradienten (b-Wert, siehe Glg. 2.4) wird das NMR-Signal S zunehmend abgeschwächt. Die Diffusionskonstante ergibt sich bei freier Diffusion als negative Steigung in der Auftragung des logarithmierten Signalabfalls über den b-Wert. Beschreibt man das System mit zwei Kompartimenten bestehend aus extra- und intrazellulärem Wasser, könnte man vermuten, daß der Signalabfall biexponentiell auf Grund unterschiedlicher Diffusionskonstanten sei. Andererseits tauscht das Wasser der beiden Kompartimente aus, was bedeutet, daß bei Diffusionszeiten, die größer als diese Austauschzeit sind, sich eine mittlere Diffusionskonstante und eine monoexponentielle Signalabschwächung einstellen müßte. Der Signalabfall läßt sich aber weder an ein biexponentielles Modell anpassen, noch stellt sich bei langen Diffusionszeiten ein monoexponentieller Abfall ein (siehe Abschnitt 3.3.3).

Van Zijl *et al.* [5] haben auf Grund experimenteller Ergebnisse geschlossen, daß das Signal bei hohen b-Werten allein aus dem intrazellulären Kompartiment stammt. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, durch geeignete Experimente und theoretische Modelle dieses Phänomen besser zu verstehen.

- Mißt man am Menschen den ADC *im Gehirn*, wird meist von einem monoexponentiellen Abfall des diffusionsgewichteten Signals *vs.* b-Wert ausgegangen und dieser aus einer linearen Regression von $\ln S$ *vs.* b ermittelt [3]. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe bei sehr hohen b-Werten im Vergleich zu den in der klinischen Diagnostik üblichen haben gezeigt [6], daß in Gehirngewebe von Ratten Diffusionsabschwächungen gemessen werden, die sich durch biexponentielle Kurven charakterisieren lassen.

  In Abb. 1.1 (unten) sind Signalabfälle von neugeborenen und ausgewachsenen Ratten unter Normal- und ischämischen Bedingungen gezeigt. Betrachtet man den in der klinischen Diagnostik üblichen b-Wertebereich bis ca. 1500 s/mm^2, ist $\ln S$ *vs.* b linear. In Analogie zu den Zellexperimenten kann die Signalkomponente bei hohen b-Werten als intrazelluläres Signal gedeutet werden. Das Verständnis der Signalseparation bei hohen b-Werten und deren Rückwirkung auf den ADC bei kleinen b-Werten ist eine wichtige Fragestellung der Forschung an den Grundlagen des Diffusionskontrastes während einer cerebralen Ischämie.

In der vorliegenden Arbeit wird die beschränkte Diffusion und der Austausch von Wasser in zellulären Systemen untersucht. Die Arbeit gliedert sich in zwei Schwerpunkte:

- Theorien und Modelle der Wasserdiffusion in Zellsystemen (Kapitel 2)
- ^{1}H-NMR-Messungen an Gliomzellkulturen und Ratten (Kapitel 3)

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die behandelten Aspekte der Diffusion in Zellsystemen gegeben.

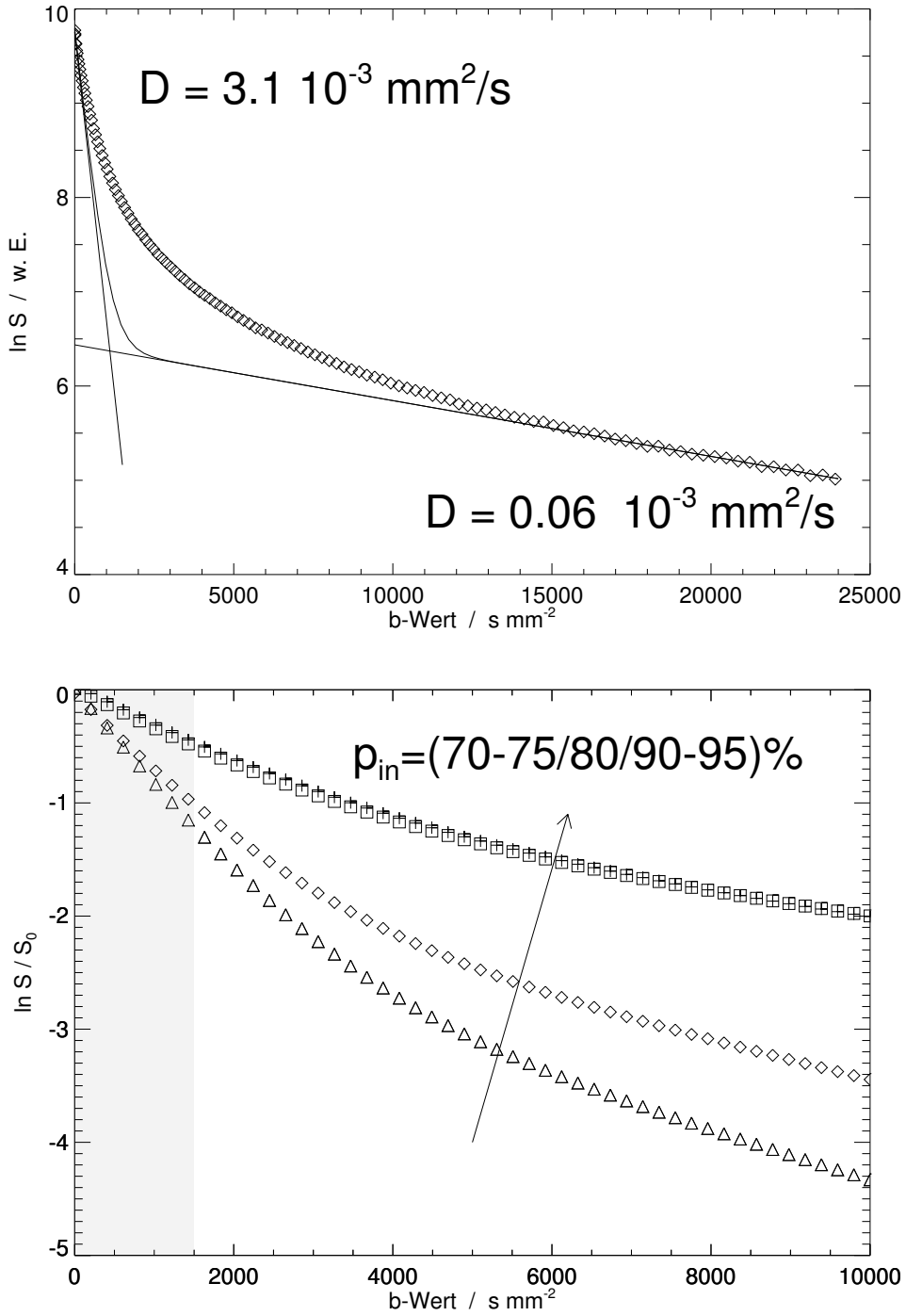


Abbildung 1.1: (oben) Signalabfall *vs.* b-Wert bei Gliomzellkulturen (F98). Lineare Regression liefert bei kleinen b-Werten eine Selbstdiffusionskonstante von $D = (3.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s und bei hohen b-Werten $D = (0.060 \pm 0.002) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s (intrazelluläres Wasser). Meßparameter: $\delta = 15$ ms, $t_D = 15$ ms. **(unten)** Biexponentieller Signalabfall bei neugeborenen ($\triangle$,+) und ausgewachsenen ($\diamond, \square$) Ratten *in vivo* und *post mortem*, simuliert nach [6]. Den verschiedenen Kurven entspricht eine Änderung im intrazellulären Volumen von ca. (70-75) bzw. 80 auf (90-95) % . Parameter: $\delta = 16.2$ ms, $t_D = 18.01$ ms.

Im Theorieteil beschreibt **Kapitel 2.1** die theoretischen Grundlagen der freien, behinderten und beschränkten Diffusion sowie den Austausch in einem Zweikomponentensystem.

Kapitel 2.2 stellt das im Rahmen der Arbeit implementierte Computerprogramm für diffundierende Teilchen mit Spin in einem Zweikomponentensystem vor, mit dem die Ischämie im Gehirn in einem dreidimensionalen Zellmodell simuliert wird.

In **Kapitel 2.3** wird ein analytisches Modell für Diffusion von Wasser in einem Zellsystem mit Austausch entwickelt. Die Formeln für beschränkte und behinderte Diffusion werden mit denen für Austausch in einem Zweikomponentensystem kombiniert. Damit können die Auswirkungen von Änderungen des intrazellulären Volumens und der intrazellulären Austauschzeit auf die Diffusionsabschwächung modelliert werden. Schließlich wird ein quantitatives Modell für Diffusionsmessungen in Gehirngewebe vorgestellt, das versucht, die grundlegenden physiologischen Vorgänge während der Ischämie im Gehirn zu berücksichtigen.

Im experimentellen Teil werden nach der Einleitung und dem methodischen Abschnitt in **Kapitel 3.3** Diffusionsmessungen an Gliomzellen bei kurzen, mittleren und langen Diffusionszeiten gezeigt. Dabei kann für die intrazelluläre Komponente der Diffusionsabschwächung einerseits der Übergang von freier zu beschränkter Diffusion, andererseits der Austausch von intra- und extrazellulärem Wasser beobachtet werden.

Kapitel 3.4 zeigt beispielhaft, wie mit Diffusionsgradienten an Zellkulturen ausschließlich intrazelluläres Signal detektiert werden kann. Änderungen des intrazellulären Volumens werden unter osmotischem Stress, unter Behandlung mit Immunsuppressiva und während der Apoptose (programmierter Zelltod) dargestellt.

In **Kapitel 3.5** wird der Einfluß von Hg-Reagenzien auf die intrazelluläre Austauschzeit von Gliazellen untersucht. Mit einem kombinierten ct/cg-Experiment kann alternierend intrazelluläres Volumen und intrazelluläre Austauschzeit aufgezeichnet werden.

In Analogie zu den Zellexperimenten wird in **Kapitel 3.6** diffusionsgewichtete Bildgebung an Ratten bei verschiedenen Diffusionszeiten durchgeführt und eine mittlere, intrazelluläre Austauschzeit für das Rattenhirn bestimmt.

Kapitel 2

Theorien und Modelle zur beschränkten Diffusion mit Austausch

2.1 Theoretische Grundlagen

2.1.1 Freie und behinderte Diffusion – Spinecho mit gepulsten Gradienten

Diffusion ist eine zufällige Translationsbewegung von Molekülen auf Grund thermischer Energie (Brownsche Molekularbewegung). Mit Kernspinresonanz kann man die Nettoverschiebung der Moleküle messen, welche durch die Beziehung von Einstein und v. Smoluchowski zwischen dem mittleren Verschiebungsquadrat $\overline{(r'-r)^2}$ eines Ensembles von Molekülen (eindimensional) und der Diffusionszeit t_D gegeben ist:

$$\overline{(r'-r)^2} = 2D\,t_D \quad . \tag{2.1}$$

D ist die Selbstdiffusionskonstante, welche stark von der Temperatur abhängt und z.B. für freies Wasser $D = 2.30 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s bei $T = 298.2$ K und $D = 3.01 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s bei $T = 310$ K beträgt [7].

Diffusion kann durch eine Selbstkorrelationswahrscheinlichkeit $P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', t)$ beschrieben werden, welche die Wahrscheinlichkeit angibt, daß sich ein Molekül in der Zeit t von $\mathbf{r}$ nach $\mathbf{r}'$ bewegt [8].

Bei *freier* Selbstdiffusion ist $P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', t)$ eine Gaußfunktion

$$P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', t_D) = (4\pi D t_D)^{-3/2} \exp\{-(\mathbf{r}' - \mathbf{r})^2/4Dt_D\} \quad , \tag{2.2}$$

deren Breite mit der Diffusionszeit t_D zunimmt. In Abb. 2.1 ist die Stejskal-Tanner-Pulssequenz mit gepulsten Magnetfeldgradienten zur Messung der Selbstdiffusion von Molekülen mit Kernspinresonanz dargestellt.

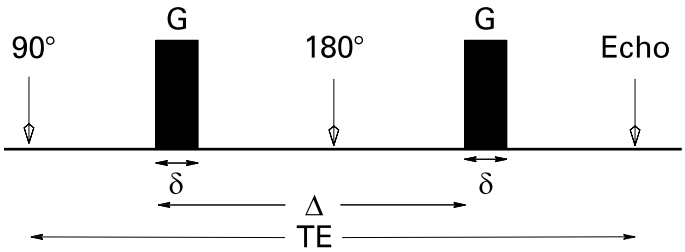


Abbildung 2.1: Stejskal-Tanner Pulssequenz zur Diffusionsmessung mit gepulsten Magnetfeldgradienten [1].

Mit der Spinechosequenz erhält man nach der Echozeit TE durch Refokussierung der transversalen Magnetisierung ein Spinecho der Intensität S_0. Durch zusätzliche Magnetfeldgradienten der Dauer δ und Stärke G vor und hinter dem 180°-HF-Inversionspuls wird die transversale Magnetisierung dephasiert und wieder refokussiert. Findet eine Translationsbewegung zwischen den Gradientenpulsen statt, ist die Refokussierung unvollständig und das Echosignal S wird erniedrigt.

Stejskal und Tanner haben 1965 die Formel für die Abschwächung des Signals

$$\ln\left(\frac{S(t = \mathrm{TE})}{S_0}\right) = -\gamma^2 D \int_0^{\mathrm{TE}} \left(\int_0^{t'} \mathbf{G}_{\mathrm{eff}}(t'')\, dt''\right)^2 dt' \tag{2.3}$$

hergeleitet [1]. Die Phaseninversion durch den 180°-HF-Puls muß im effektiven Gradienten $\mathbf{G}_{\mathrm{eff}}(t)$ durch Vorzeichenumkehr berücksichtigt werden.

Mit zwei gepulsten Gradienten der Dauer δ und dem Abstand Δ gilt:

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\underbrace{\gamma^2\delta^2 G^2(\Delta - \frac{\delta}{3})}_{b\text{-Wert}} \cdot D \tag{2.4}$$

In der Auftragung der Diffusionsabschwächung $\ln(S/S_0)$ über den b-Wert erhält man aus der negativen Steigung die freie Selbstdiffusionskonstante D.

Die Diffusionszeit

$$t_D := \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \tag{2.5}$$

geht mit abnehmender Dauer der Gradientenpulse $\delta \to 0$ gegen Δ.

Im Falle *behinderter Diffusion* wird die freie Selbstdiffusionskonstante D durch D/λ^2 ersetzt (λ ... Tortuositätsfaktor, $\lambda \geq 1$) [9]. Wenn für diffundierendes Wasser in Zellgewebe Hindernisse wie zum Beispiel Nervenfasern, Makromoleküle oder Zellorganellen vorliegen, müssen die Moleküle längere Diffusionswege zurücklegen, um einen bestimmten Abstand zum Ausgangspunkt zu erreichen. Dabei bleibt $P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', t)$ gaußförmig, nur die mittlere quadratische Verschiebung der Moleküle ist um den Faktor λ^{-2} erniedrigt[1].

2.1.2 Beschränkte Diffusion – q-Raum

Während sich die Teilchen bei freier und behinderter Diffusion beliebig weit von ihrem Ausgangspunkt entfernen können ($\overline{(r'-r)^2} \to \infty$ für $t \to \infty$), ist dies bei beschränkter Diffusion nicht der Fall. Betrachtet man einen Kasten der Länge a, ergeben sich anschaulich zwei Grenzfälle: Ist die Diffusionszeit sehr kurz, erfahren die meisten Teilchen keine Beschränkung und diffundieren frei – nur die wenigen am Rand des Kastens werden an der Wand reflektiert (woraus sich eine Methode zur Bestimmung des Oberflächen- zu Volumenverhältnisses ergibt [10,11]). Ist die Diffusionszeit so lang, daß die Teilchen die Länge a durchlaufen können, wird sich ein Zustand einstellen, der unabhängig von der Diffusionszeit die Morphologie des Systems charakterisiert. Definiert man den q-Wert zu

$$\mathbf{q} := \frac{\gamma}{2\pi}\,\delta\,\mathbf{G} \quad , \tag{2.6}$$

kann man das Echosignal $E_\Delta(\mathbf{q})$ bei der Diffusionszeit Δ als Überlagerung von transversalen Magnetisierungen im Ensemblemittel darstellen:

$$E_\Delta(\mathbf{q}) = \int \rho(\mathbf{r}) \int P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', \Delta)\ \exp[\, i2\pi\mathbf{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{r})\,]\ d\mathbf{r}' d\mathbf{r} \tag{2.7}$$

Jeder Phasenterm $\exp[\, i2\pi\mathbf{q}(\mathbf{r}'-\mathbf{r})\,]$ ist mit der Wahrscheinlichkeit $\rho(\mathbf{r})P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', \Delta)$ für einen Spin, sich von $\mathbf{r}$ nach $\mathbf{r}'$ zu bewegen, gewichtet, wobei $\rho(\mathbf{r})$ die Spindichte beschreibt. Unter der Bedingung, daß die Gradientenpulsdauer δ klein gegenüber der Diffusionszeit Δ ist, haben Tanner und Stejskal gezeigt [12],

[1] Bei *behinderter* Diffusion ist die mittlere Verschiebung im Vergleich zur freien Selbstdiffusion verringert, da die Teilchen lokal um Hindernisse diffundieren müssen, sie können sich jedoch beliebig weit von ihrem Ausgangspunkt entfernen. Bei *beschränkter* Diffusion ist die freie Diffusion durch Barrieren begrenzt, die Teilchen können sich nicht mehr beliebig weit von ihrem Ausgangspunkt entfernen und stoßen immer wieder an die Beschränkung.

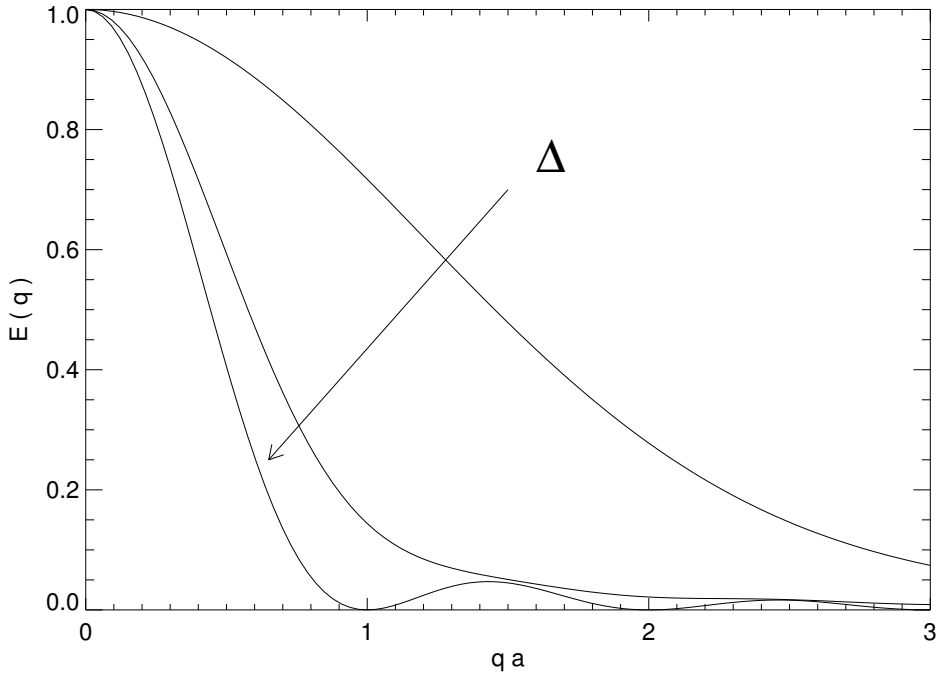


Abbildung 2.2: Signalabschwächung für beschränkte Diffusion in einem Kasten der Länge $a = 5\ \mu$m mit der Diffusionskonstante $D = 1.0 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s bei Diffusionszeiten von $\Delta = [0.25, 2.5, 25]$ ms. Mit zunehmender Diffusionszeit Δ nähern sich die Kurven der Funktion $\mathrm{sinc}^2(\pi q a)$.

daß für einen Kasten der Länge a die Diffusionsabschwächung

$$\begin{aligned} E_\Delta(q) &= \frac{2\{1-\cos(2\pi q a)\}}{(2\pi q a)^2} + 4(2\pi q a)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-n^2\pi^2 \frac{D\Delta}{a^2}\right) \\ &\quad \times \frac{1-(-1)^n \cos(2\pi q a)}{\{(2\pi q a)^2 - (n\pi)^2\}^2} \end{aligned} \tag{2.8}$$

ist. Bei kurzen Diffusionszeiten $\Delta \ll a^2/2D$ gilt [8]

$$E_\Delta(q) = \exp(-4\pi^2 q^2 D\Delta) \quad , \tag{2.9}$$

bzw. bei langen Diffusionszeiten $\Delta \gg a^2/2D$

$$E(q) = \frac{2\{1-\cos(2\pi q a)\}}{(2\pi q a)^2} = \mathrm{sinc}^2(\pi q a) \quad . \tag{2.10}$$

$E(q)$ ist unabhängig von Δ und nur durch die geometrische Größe a beeinflußt.

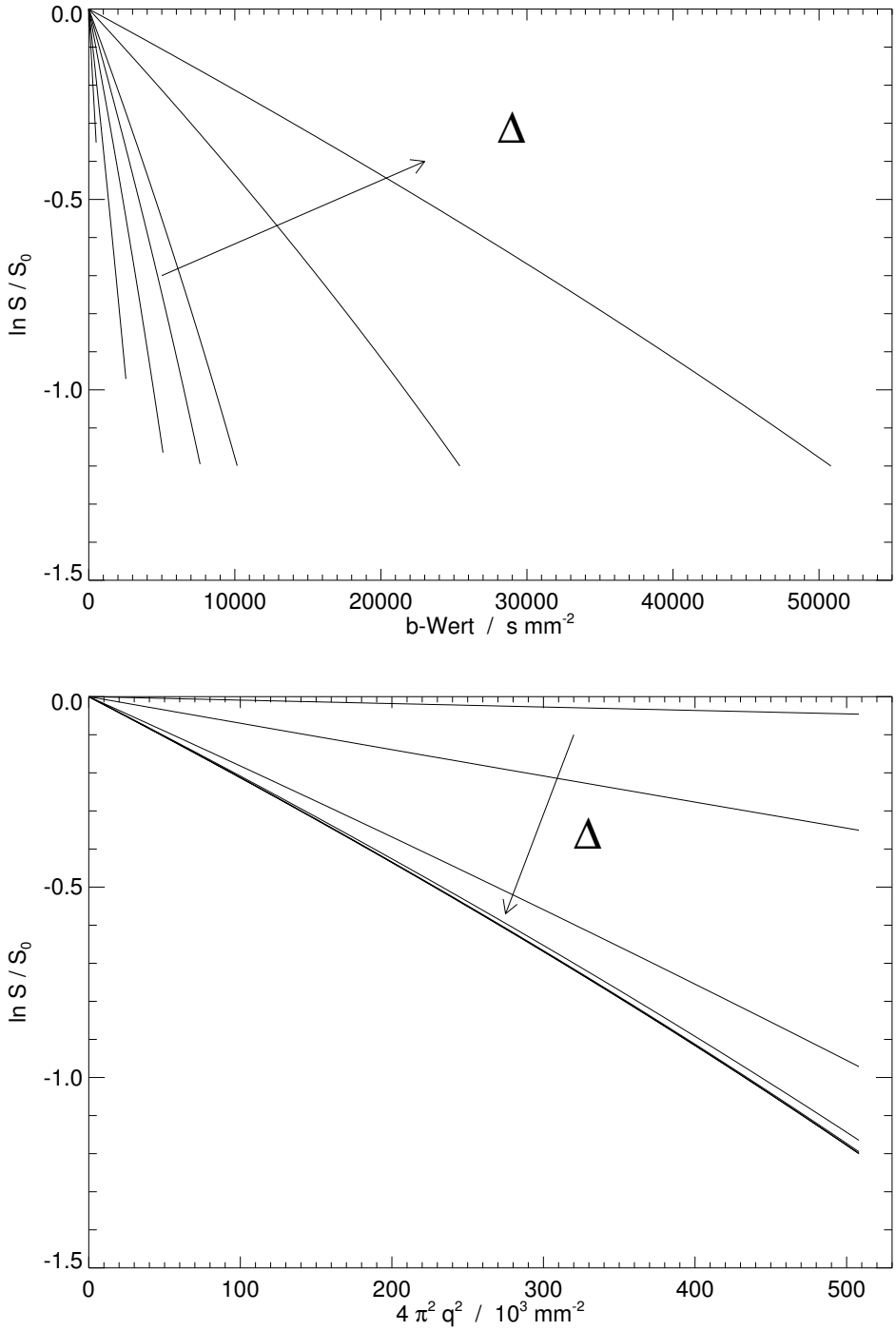


Abbildung 2.3: Beschränkte Diffusion in einem Kasten der Länge $a = 5\,\mu$m bei den Diffusionszeiten $\Delta = [0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 50, 100]$ ms (Diffusionskonstante $D = 1.0 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s, $q_{\max} = (8.8\mu\text{m})^{-1}$).

In diesem Grenzfall langer Diffusionszeiten ($\Delta \to \infty$) verliert das Teilchen die Erinnerung an seine Startposition $\mathbf{r}$ und kann sich irgendwo innerhalb der Beschränkung aufhalten, d.h. $P_s(\mathbf{r}|\mathbf{r}', \infty)$ ist gleich der Spindichte $\rho(\mathbf{r}')$. Die Spinechoamplitude eines Experiments mit gepulsten Gradienten ist damit die Fouriertransformierte der Autokorrelationsfunktion der Spindichte $A(\mathbf{q})$ [13]

$$\begin{aligned} E_\infty(\mathbf{q}) &= \int\int \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}') \exp[\, i2\pi\mathbf{q}(\mathbf{r}' - \mathbf{r})\,]\, d\mathbf{r}' d\mathbf{r} \\ &= A^*(\mathbf{q})A(\mathbf{q}) = |A(\mathbf{q})|^2 \quad . \end{aligned} \tag{2.11}$$

In Abb. 2.2 ist $E(q)$ mit der Diffusionskonstante $D = 1.0 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s und der Kastenlänge $a = 5$ μm dargestellt. Mit Diffusionszeiten von $\Delta = [0.25, 2.5, 25]$ ms ergibt sich $D\Delta/a^2 = [0.01, 0.1, 1]$.

Bei einer maximalen Gradientenstärke von $G = 333$ mT/m und einer Gradientendauer $\delta = 8$ ms, wie sie typischerweise auf dem AMX 360 verfügbar waren, errechnet sich der maximale q-Wert zu $q_{\max} = (8.8\mu\text{m})^{-1}$. Mit diesen Parametern ist in Abb. 2.3 der logarithmierte Signalabfall für die beschränkte Diffusion in einem Kasten gegen den b-Wert und $4\pi q^2$ für Diffusionszeiten von $(0.1 \ldots 100)$ ms aufgetragen. Kennzeichen der beschränkten Diffusion ist das Erreichen einer zeitunabhängigen Kurve in der Auftragung *vs.* q und q^2. Liest man die Diffusionskonstante als (negative) Steigung in der Auftragung von $\ln(S(b)/S_0)$ *vs.* b-Wert ab, erhält man nur eine *scheinbare* Diffusionskonstante, die mit zunehmender Diffusionszeit gegen Null strebt. Bei langen Diffusionszeiten gilt für $q \to 0$ im Kastenmodell:

$$D_{\text{app}} \xrightarrow[q\to 0]{} \frac{a^2}{12} \cdot \frac{1}{\Delta} \tag{2.12}$$

Stejskal und Tanner haben ebenfalls die analytischen Formeln für die beschränkte Diffusion in einer Kugel hergeleitet [12], die zwar komplizierter sind (Besselfunktionen), qualitativ jedoch die gleichen Aussagen liefern.

2.1.3 Austausch in einem Zweikomponentensystem

Wenn man die Diffusion von Spins in einem System mit mehreren Kompartimenten beschreiben will, wird sich das Gesamtsignal als Superposition der Signale aus den einzelnen Kompartimenten darstellen. Im einfachsten Modell für Diffusion in Gewebe nimmt man die eine Komponente als den Intrazellulärraum, die andere als den Extrazellulärraum an. Die Grenzfläche der beiden Kompartimente ist die endlich dünne Zellmembran, über welche die Spins die Räume wechseln oder austauschen können.

Auf Grund der schwierigen analytischen Behandlung bieten sich entweder numerische Methoden (z.B. eine Rechnersimulation der Brownschen Molekularbewegung) oder die Annäherung durch ein geeignetes Diffusionsmodell an. Letzteres haben Kärger *et al.* durch Kombination des 2. Fickschen Gesetzes mit den Chapman-Kolmogoroff Gleichungen [14–16] formuliert. Innerhalb einer Region wird die molekulare Bewegung durch die gewöhnlichen Diffusionsgleichungen beschrieben. Zusätzlich wird eine Austauschgeschwindigkeit oder -rate für Spins zwischen den Regionen eingeführt.

Für ein System aus zwei Komponenten mit den Diffusionskonstanten $D_{1,2}$, den Austauschzeiten $\tau_{1,2}$, den relativen Volumenanteilen $p_{1,2}$ und mit $\tilde{q} = \gamma\delta G$ gilt:

$$p_1 + p_2 = 1 \qquad\qquad p_i = \frac{\tau_i}{\tau_1 + \tau_2}, \quad i = 1, 2 \tag{2.13}$$

p_1, p_2, τ_1 und τ_2 sind also abhängig und auf zwei Parameter reduzierbar. Mit $n := p_2/p_1 = p_2/(1 - p_2)$ beträgt die Signalabschwächung $S = S(\tilde{q}^2, \Delta, D_1, D_2, p_2, \tau_2)$

$$\boxed{S(\tilde{q}^2, \Delta) = (1 - p_2') \exp(-\tilde{q}^2 D_1' \Delta) + p_2' \exp(-\tilde{q}^2 D_2' \Delta)}$$

$$\begin{aligned} D_{1,2}' &:= \frac{1}{2}\Bigg(D_2 + D_1 + \frac{1}{\tilde{q}^2\tau_2}(1+n) \\ &\quad \mp \sqrt{\left(D_2 - D_1 + \frac{1}{\tilde{q}^2\tau_2}(1-n)\right)^2 + \frac{4n}{\tilde{q}^4\tau_2^2}} \Bigg) \\ p_2' &:= \frac{1}{D_2' - D_1'}[(1-p_2)D_1 + p_2 D_2 - D_1'] \end{aligned} \tag{2.14}$$

dabei ist D_1' immer kleiner als D_2'. Ordnet man die sechs unabhängigen Parameter nach ihrer Bedeutung, werden $\tilde{q}^2$ und Δ durch die Experimentführung, D_1, D_2, p_2, τ_2 durch physiologische Gegebenheiten bestimmt.

Unter der Bedingung eines schnellen Austauschs ($\tilde{q}^2\tau_i D_i \ll 1$, d.h. hinreichend lange Diffusionswege) wird die Signalabschwächung monoexponentiell mit der mittleren Diffusionskonstante $\bar{D}$

$$\bar{D} = p_1 D_1 + p_2 D_2 \quad . \tag{2.15}$$

2.2 Ein Monte-Carlo-Modell für Diffusion in ischämischem Gewebe

Die Diffusion von Teilchen in Gehirngewebe ist auf Grund der komplizierten Randbedingungen analytisch schwierig zu erfassen und nur mit Vereinfachungen theoretisch modellierbar. Einerseits muß behinderte und beschränkte Diffusion in Kompartimenten mit Austausch beschrieben werden, andererseits die anisotrope Morphologie berücksichtigt werden, die sich bei einer Ischämie durch Zellschwellung ändern kann.

Einen Weg der Untersuchung bietet dazu eine Rechnersimulation von diffundierenden Teilchen mit Spin in einem zwei- oder dreidimensionalen Gebiet vorgegebener Morphologie. Dabei wird die Diffusion der Teilchen durch eine zufällige Bewegung in einer Monte-Carlo-Simulation verwirklicht.

Haus *et al.* [17] haben einen allgemeinen Überblick über Random-Walk-Modelle gegeben. Hunter *et al.* [18] haben ein Modell mit räumlich veränderlicher Diffusität vorgestellt.

Auch in der Literatur wurde vielfach der Einfluß von Diffusionseffekten auf die NMR-Bildgebung (NMR-Mikroskopie) simuliert [19–21].

Zawodzinski *et al.* [22] haben beispielsweise das Verhalten der Magnetisierung an impermeablen Grenzen (z.B. Glaswände), an vollständig permeablen Grenzen (Polymer in Kontakt mit einer Lösung) und an semipermeablen, biologischen Membranen berechnet.

Pütz [23] stellte ein Simulationsprogramm zur Untersuchung von Diffusions- und Relaxationsprozessen in beliebig wählbaren Diffusionsräumen vor und betrachtete u. a. die Wasserdiffusivität in liposomalen Kontrastmitteln sowie an Zellmembranen.

Lipinski [24] hat die extrazelluläre Diffusion an digitalisierten Gewebeschnitten durchgeführt und eine Korrelation zwischen dem Volumenanteil und dem Grad der Behinderung (Tortuositätsfaktor) gefunden.

Die neueste und ausführlichste Modellierung von Wasserdiffusion in Gewebe sowohl mit Monte-Carlo-Simulationen als auch mit analytischen Ansätzen veröffentlichte Szafer *et al.* [25] 1995.

Im Folgenden wird die im Rahmen der Arbeit implementierte Computersimulation vorgestellt, die insbesondere Diffusionsabschwächungen bei hohen b-Werten untersucht. In einem dreidimensionalen Zellmodell werden Änderungen der Diffusionskurven infolge von Änderungen des Volumenverhältnisses und der Membranpermeabilität, wie sie möglicherweise bei einer Ischämie im Gehirn auftreten, gezeigt.

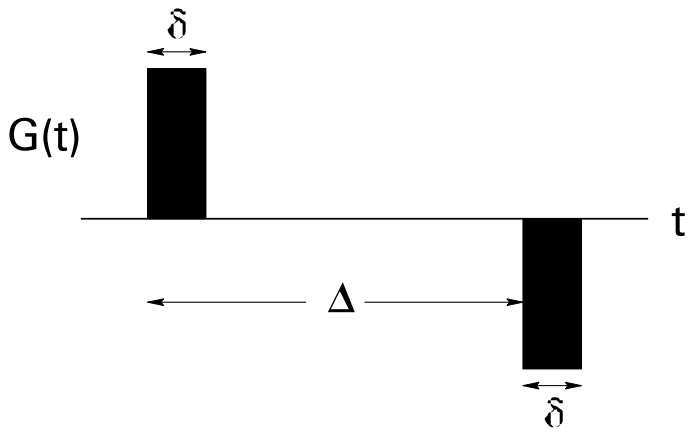
2.2.1 Random-Walk-Modell für diffundierende Spins

Für die Behandlung mit dem Rechner muß das NMR-Experiment an diffundierenden Teilchen in Gewebe in verschiedene Teilaspekte getrennt werden: die zufällige Diffusionsbewegung der Teilchen (Ortsinformation und Spin bzw. Phase), das Spinechoexperiment (Gradientenstärke und -abstand), physiologische Parameter und die morphologische Struktur des Gewebes.

Die Brownsche Molekularbewegung wird durch eine zufällige Ortsverschiebung

$$r_k(t + \delta t) = r_k(t) + \sqrt{2\ D\ \delta t} \cdot g_k \tag{2.16}$$

simuliert (random walk), wobei sich jeder Spin während eines Zeitschritts δt in den räumlichen Koordinaten $k{=}x, y, z$ bewegt. Die Richtung bzw. Streuung wird durch die Zufallszahl g_k, die Weite durch die Diffusionskonstante D bestimmt.



Die Diffusionsabschwächung beim Spinechoexperiment mit gepulsten Gradienten wird durch zwei alternierende, zeitabhängige Gradienten $G(t)$ mit Gradientendauer δ und Gradientenabstand Δ beschrieben.

Jeder Spin besitzt eine Phase ϕ_j, welche bei jedem Zeitschritt δt gemäß

$$\phi_j(t + \delta t) = \phi_j(t) + \gamma\ \mathbf{G}\ \mathbf{r}\ \delta t \tag{2.17}$$

akkumuliert wird. Das Gesamtsignal berechnet sich als Summe der Phasenterme über alle N Teilchen

$$S = S_0 \cdot \frac{1}{N} \cdot \sum_j^N \exp(i\phi_j) \quad . \tag{2.18}$$

Physiologische Parameter

Das Monte-Carlo-Modell eines Zellgewebes mit zwei Kompartimenten (intra- und extrazellulär) muß folgende physiologische Parameter abbilden:

- p_{in} / p_{ex} ... relativer Volumenanteil der Kompartimente
- c_{in} / c_{ex} ... Konzentration (proportional der Teilchenzahl)
- D_{in} / D_{ex} ... Diffusionskonstanten in den Kompartimenten
- κ ... Permeabilität der Zellmembran (Austausch)

Die morphologische Nachbildung der Gewebestruktur muß die wesentlichen Elemente und deren Funktion abstrahieren. Für anisotrope Diffusion in Nervenfasern wird zum Beispiel ein Röhrenmodell, für isotrope Diffusion ein Kasten-/Kugelmodell verwendet.

2.2.2 Implementierung auf dem Rechner

Die Simulation ist in C++ auf einem SUN SPARC20 Rechner (60 MHz) mit dem GNU Compiler g++ V 2.7.2 implementiert. Die Steuerung des Ablaufs erfolgt über das Einlesen und Auswerten eines ASCII-Parameter-Files, das Ergebnis der Simulation wird als binärer Datensatz gespeichert.

Umsetzung der physiologischen Parameter

Die morphologische Struktur, in welcher die Diffusion der Teilchen simuliert wird, kann als zwei- oder dreidimensionaler Datensatz eingelesen werden. Jedes Pixel bzw. Voxel kodiert dabei den Intra- oder Extrazellulärraum. Die Struktur wird vorher gesondert erzeugt und kann beliebige Morphologie besitzen, z.B. könnte auch ein digitalisiertes Bild eines Gewebeschnittes verwendet werden. Durch diese Struktur sind die Grenzen der räumlichen Koordinaten festgelegt, über die sich die Teilchen nicht hinausbewegen können.

Aus dem Verhältnis der intra- zu extrazellulären Pixel bzw. Voxel ergibt sich der relative Volumenanteil der Kompartimente $p_{\text{in}}/p_{\text{ex}}$, aus der Verteilung der Teilchen auf die Kompartimente dann die Konzentrationen c_{in} bzw. c_{ex} . Für jedes Kompartiment wird eine Diffusionskonstante D_{in} bzw. D_{ex} gewählt.

Jedes der N Teilchen hat seine Ortskoordinaten x, y, z, seine Phase ϕ und die Information, in welchem Kompartiment es sich befindet, intra- oder extrazellulär.

Die Permeabilität der Zellmembran ist durch eine Durchtrittswahrscheinlichkeit $\mathrm{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}}$ bzw. $\mathrm{w}^T_{\text{ex}\to\text{in}}$ erfaßt. Wenn die Diffusionskonstanten in den Kompartimenten

verschieden sind, muß $\mathrm{w}^T_{\mathrm{in}\to\mathrm{ex}}$ auch verschieden von $\mathrm{w}^T_{\mathrm{ex}\to\mathrm{in}}$ sein, da sich sonst Teilchen in dem Kompartiment kleinerer Diffusionskonstante ansammeln würden. Im Gleichgewicht, wenn die Anzahl der einfließenden gleich der ausfließenden Teilchen ist, gilt

$$\frac{\mathrm{w}^T_{\mathrm{in}\to\mathrm{ex}}}{\mathrm{w}^T_{\mathrm{ex}\to\mathrm{in}}} = \sqrt{\frac{D_{\mathrm{ex}}}{D_{\mathrm{in}}}} \tag{2.19}$$

Wenn zum Beispiel $D_{\mathrm{ex}}/D_{\mathrm{in}} = 3.0/0.25$ und $\mathrm{w}^T_{\mathrm{in}\to\mathrm{ex}} = 1.0$ sein soll, d.h. intrazelluläre Spins ungehindert in den Extrazellulärrraum diffundieren können, dann ist $\mathrm{w}^T_{\mathrm{ex}\to\mathrm{in}} = 0.29$. Extrazelluläre Teilchen erfahren also wegen der Gleichgewichtsbedingung eine Beschränkung und können nur mit einer Durchtrittswahrscheinlichkeit von 29 % in den Intrazellulärraum diffundieren.

Ablauf der Simulation

Um einen Wert für die Signalabschwächung $S(G, \delta, \Delta)$ zu erhalten, wird die Simulation für jedes der N Teilchen nach folgendem Schema durchgeführt:

Teilchen j

Koordinaten x_j, y_j, z_j		neue Koordinaten würfeln $\tilde{x}_j, \tilde{y}_j, \tilde{z}_j$		Koordinaten x'_j, y'_j, z'_j
Kompartiment intra/extra	$\longrightarrow$	falls Kompartimentswechsel: ? erlaubt mit w^T? ja – neue Koord. $\tilde{x}_j, \tilde{y}_j, \tilde{z}_j$ nein – alte Koord. x_j, y_j, z_j	$\longrightarrow$	Kompartiment intra/extra
Phase ϕ_j		falls Gradient $G \neq 0$: neue Phase $\phi_j(\mathbf{r})$ addieren		Phase ϕ'_j

Bei jedem Zeitschritt der Dauer δt wird ein neuer Koordinatensatz $\tilde{x}_j, \tilde{y}_j, \tilde{z}_j$ berechnet und geprüft, ob ein Wechsel des Kompartiments vorliegt und ein Gradient anliegt.

Falls ein Wechsel des Kompartiments vorliegt, wird mit der entsprechenden Durchtrittswahrscheinlichkeit $\mathrm{w}^T_{\mathrm{in}\to\mathrm{ex}}$ oder $\mathrm{w}^T_{\mathrm{ex}\to\mathrm{in}}$ gewürfelt, ob das Teilchen in das andere Kompartiment darf oder nicht. Im letzteren Falle behält es seine alten Koordinaten x_j, y_j, z_j, wird also *de facto* an der Zellmembran reflektiert[2].

Falls ein Gradient anliegt, wird zu der Phase des Spins entsprechend der Ortskoordinaten die Phase $\phi_j(\mathbf{r}) = \gamma\, \mathbf{G}\, \mathbf{r}\, \delta t$ addiert.

[2] Für eine genauere Simulation müßte man (auf Kosten der Rechenzeit) einerseits die Reflexion gespiegelt durchführen, andererseits bei Durchtritt die verschiedenen Diffusionskonstanten durch verschieden lange Wegstrecken in den Kompartimenten berücksichtigen.

Dies wird jeweils für alle N Teilchen bei jedem Zeitschritt δt durchgeführt, bis die ganze Spinechosequenz durchlaufen ist. Am Schluß wird dann das Gesamtsignal $S(G, \Delta)$ nach Glg. 2.18 berechnet.

Für eine ct-Kurve ('constant diffusion time') wird bei gleichem Gradientenabstand Δ die Simulation für eine Reihe von Gradientenstärken G durchgeführt.

Kritische Einstellungen

Wie bei jeder numerischen Ausführung auf einem Rechner, sollte auch dieses Monte-Carlo-Modell durch analytisch bekannte Ergebnisse verifiziert werden. Die Teilchenzahl N und der Zeitschritt δt müssen festgelegt und die Laufzeit nach Möglichkeit optimiert werden[3].

Das Monte-Carlo-Modell wurde mit Simulationen von freier Diffusion sowie beschränkter Diffusion in einem Kasten und in einer Kugel getestet. Bei freier Diffusion ergab sich eine monoexponentielle Signalabschwächung, deren Steigung der eingesetzten Diffusionskonstante entsprach. Die Ergebnisse der total beschränkten Diffusion stimmte mit den analytischen Formeln überein, die Fouriertransformation des q-Raum-Experiments (s. Glg. 2.11) lieferte den Durchmesser der Beschränkung (Daten nicht gezeigt).

Da die Rechenzeit direkt proportional zur Teilchenzahl N ist, muß man versuchen, N so klein wie möglich zu wählen: In unseren Modellen scheint $N = 50000 - 100000$ auszureichen. Bei zu kleiner Teilchenzahl wird dagegen die Streuung des Signals S, insbesondere bei großen Abschwächungen, zu stark.

Die Größe der einzulesenden, morphologischen Struktur muß so gewählt werden, daß die Auswirkungen der Reflexion an den Gebietsgrenzen auf das Signal vernachlässigbar ist (Test durch freie Diffusion). Dabei ist die maximal zu verwendende Diffusionszeit zu berücksichtigen.

Der Zeitschritt δt muß so klein sein, daß Diffusionsbewegung auch an den engsten Stellen der morphologischen Struktur möglich ist.

Nach einem Beitrag von Hunter *et al.* [18] muß der Zufallsgenerator so ausgewählt werden, daß er einerseits effizient arbeitet, andererseits dürfen die erhaltenen Zahlen nur so wenig Korrelationen aufweisen, daß sie den Diffusionsvorgang genau genug wiedergeben.

Da in die Diffusionsabschwächung meist das Produkt $(\delta \cdot G)$, die Fläche unter dem Gradienten, eingeht, kann die Laufzeit der Simulation durch Verkleinerung der Gradientendauer δ verbessert werden, da weniger Phasenschritte akkumuliert werden müssen. Vorsicht ist geboten, wenn innerhalb δ Längen in der Größenordnung der Zelldimensionen durchschritten werden. Wie Joy *et al.* [26] zeigten, ergeben sich dann unterschiedliche Diffusionsabschwächungen.

[3] Simulation einer ct-Kurve im dreidimensionalen Zellmodell dauerte Tage.

2.2.3 Zweidimensionale Zellmodelle

Nach der Bestätigung der Richtigkeit der Simulation mit freier und beschränkter Diffusion in einem Kompartiment (s.o.), werden im Folgenden zweidimensionale Zellmodelle, in denen Austausch zwischen den Kompartimenten stattfinden kann, behandelt.

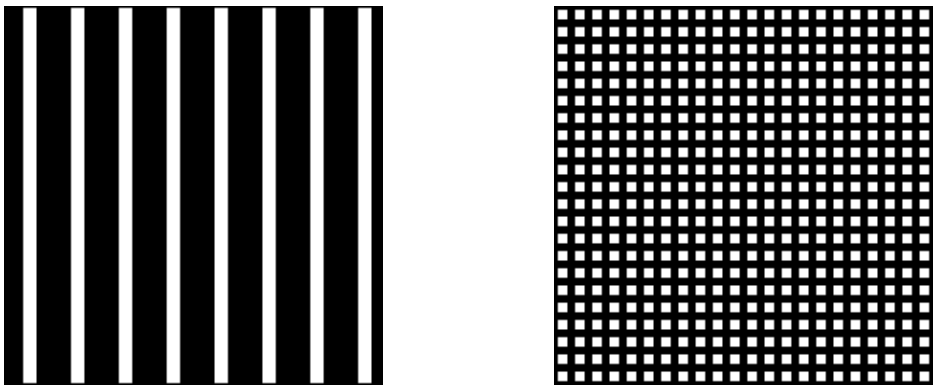


Abbildung 2.4: Streifen- und Kastenmodell der zweidimensionalen Monte-Carlo-Simulation. Intrazellulärraum ist weiß, $D_{\text{in}}/D_{\text{ex}} = 0.25/3.0$, $p_{\text{in}}/p_{\text{ex}} = 0.30$, Streifenbreite/-abstand: 4/12 μm, Kastenbreite/-abstand: 4/4 μm.

Das Streifenmodell

Der einfachste Fall anisotroper Diffusion ist im Streifenmodell realisierbar, längs der Streifen ist die Diffusion frei, senkrecht dazu beschränkt.

In Abb. 2.5 ist die Diffusion im Intrazellulärraum (Breite 4 μm) mit Gradienten längs bzw. quer zur Streifenrichtung dargestellt. Ein Übertritt in den Extrazellulärraum ist nicht möglich. Für die freie Diffusion zeigt sich eine Erniedrigung der Selbstdiffusionskonstante von $D_{\text{in}} = 0.25$ auf $D_{\text{app},\parallel}$:

Δ / ms	2	72	288
$D_{\text{app},\parallel}$	0.237	0.229	0.218

Diese Abnahme von $D_{\text{app},\parallel}$ ist theoretisch nicht zu erwarten und dadurch begründet, daß die Reflexion an der Wand nicht gespiegelt erfolgt (s. S. 15). Dadurch ist die mittlere, quadratische Verschiebung nach einem Wandstoß zu klein und die Diffusionskonstante scheinbar erniedrigt. Im Rahmen des Modells ist dies um der verminderten Rechenzeit willen jedoch vertretbar.

Die beschränkte Diffusion senkrecht zu den Streifen zeigt den erwarteten schnellen Abfall der scheinbaren Diffusionskonstanten mit der Diffusionszeit (s. Glg. 2.12)

Δ / ms	2	8	32	288
$D_{\text{app},\perp}$	0.172	0.135	0.064	0.007

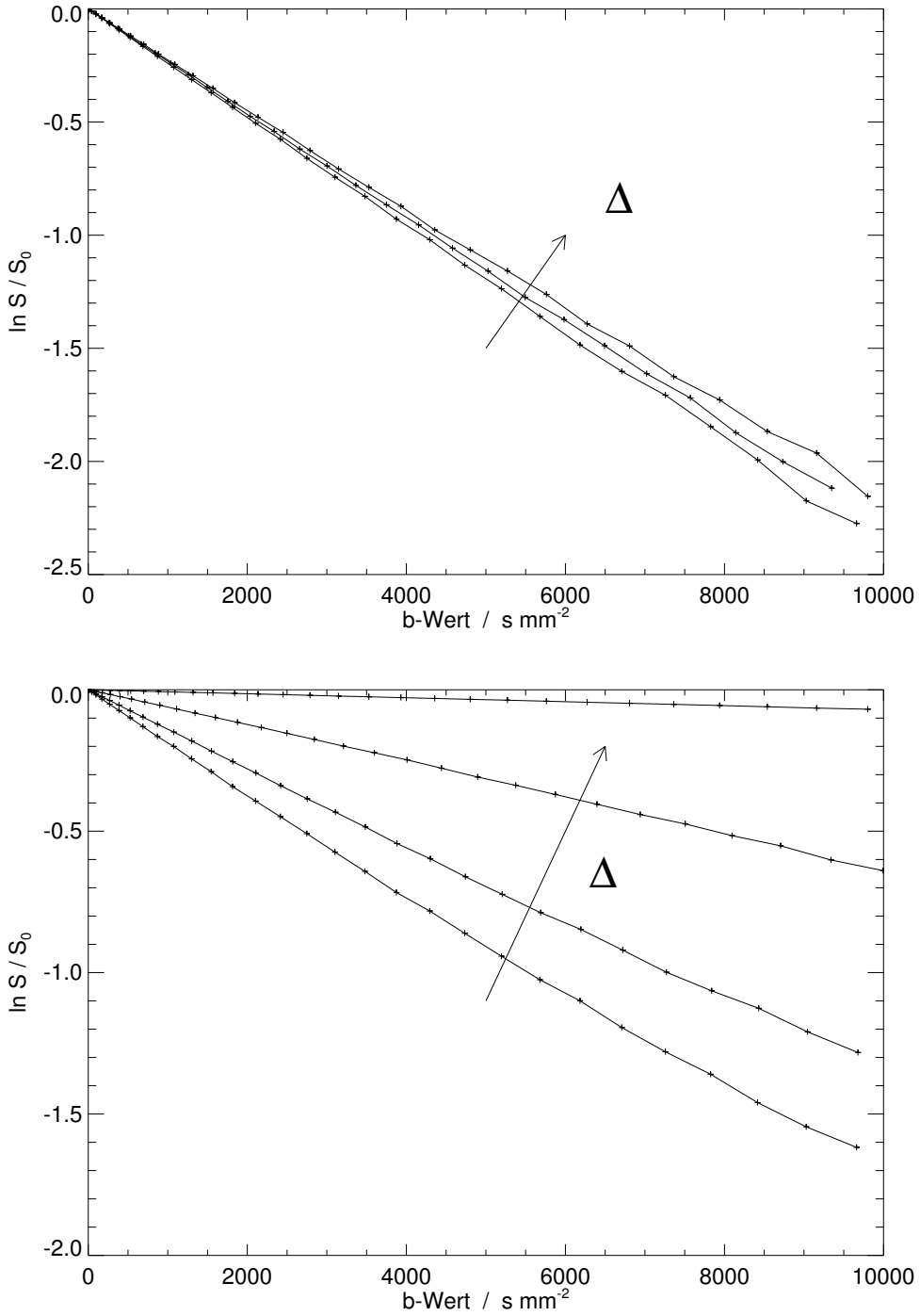


Abbildung 2.5: Diffusion im Streifenmodell: **(oben)** *freie* Diffusion im Intrazellulärraum längs des Streifens bei Diffusionszeiten $\Delta = (2, 72, 288)$ ms und **(unten)** *beschränkte* Diffusion senkrecht dazu $\Delta = (2, 8, 32, 288)$ ms . $D_{\text{in}}/D_{\text{ex}} = 0.25/3.0$, $\text{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}} = 0$, $N = 100000$, $\delta = 1$ ms, $\delta t = 0.1$ ms.

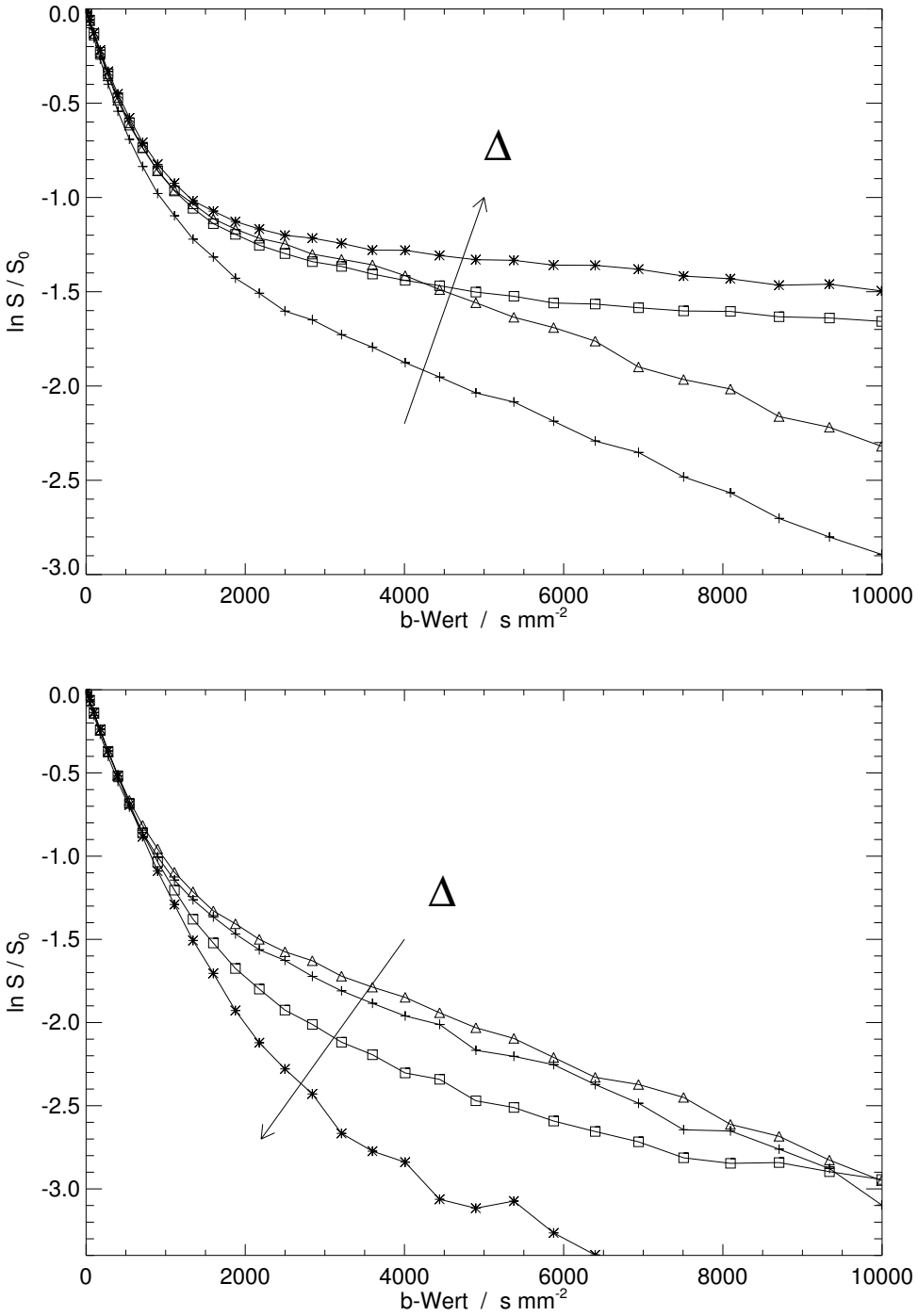


Abbildung 2.6: Diffusion von zwei Komponenten im Kastenmodell mit $\mathrm{w}^T_{\mathrm{in}\to\mathrm{ex}}/\mathrm{w}^T_{\mathrm{ex}\to\mathrm{in}}$ =(0/0) **(oben)** und (0.05/0.015) **(unten)** bei Diffusionszeiten $\Delta = [1(+), 9(\triangle), 25(\square), 64(*)]$ ms. $D_{\mathrm{in}}/D_{\mathrm{ex}} = 0.25/3.0$, $N = 100000$, $\delta = 0.5$ ms, $\delta t = 0.05$ ms.

Das Kastenmodell

Mit dem Kastenmodell steht ein isotropes, zweidimensionales Modell zur Verfügung, mit dem der Austausch diffundierender Teilchen zwischen Intra- und Extrazellulärraum und die behinderte Diffusion im Extrazellulärraum untersucht werden soll.

Ein Austausch zwischen dem intra- und extrazellulären Kompartiment im Kastenmodell ist in Abb. 2.6 bei Diffusionszeiten von $\Delta = 1 \ldots 64$ ms simuliert. Findet kein Austausch statt (oben), ist die Diffusion extrazellulär behindert und intrazellulär beschränkt. Bei langen Δ geht die scheinbare Diffusionskonstante der zweiten Komponente gegen Null. Mit Austausch (unten) stellt sich bei langen Diffusionszeiten eine mittlere, aus beiden Kompartimenten gewichtete Diffusionskonstante ein.

Die Zeitentwicklung der behinderten Diffusion im Extrazellulärraum ist in Abb. 2.7 dargestellt. Die scheinbare Diffusionskonstante bei kleinen b-Werten wird dabei mit zunehmender Diffusionszeit von $D_{\text{ex}}= 3.0$ auf D_{app} erniedrigt

Δ / ms	0.5	1.5	4	8	12	16	40
D_{app}	2.41	2.17	2.05	2.01	2.00	1.93	1.96

Der Übergang von der freien zur behinderten Diffusion zeigt ein interessantes Verhalten besonders bei den hohen b-Werten.

Bis $\Delta = 8$ ms erniedrigt sich die Diffusionskonstante bei kleinen b-Werten deutlich, während bei hohen b-Werten das Signal zunimmt (Abb. 2.7 oben). Dies bedeutet anschaulich, daß die Teilchen erst frei diffundieren und mit wachsender Diffusionszeit die Beschränkung erfahren.

Bei größeren Diffusionszeiten bis $\Delta = 40$ ms bleibt die Diffusionskonstante bei kleinen b-Werten annähernd konstant, die Signalabschwächung bei hohen b-Werten zeigt starke Abweichungen von der Monoexponentialität, die bei $\Delta = 40$ ms wieder verschwinden. Im Sinne des q-Raum-Experiments nach Callaghan *et al.* [8] wird die Diffusionsabschwächung in Abhängigkeit der Diffusionslänge vom Strukturfaktor bzw. dem Gitterabstand des Extrazellulärraums beeinflusst.

Mit der erniedrigten (scheinbaren) Diffusionskonstante

$$D_{\text{frei}} = 3.0 \quad \longrightarrow \quad D_{\text{app}} = \frac{D_{\text{frei}}}{\lambda^2} = 1.96$$

ist der Tortuositätsfaktor λ im zweidimensionalen Kastenmodell $\lambda = 1.24$.

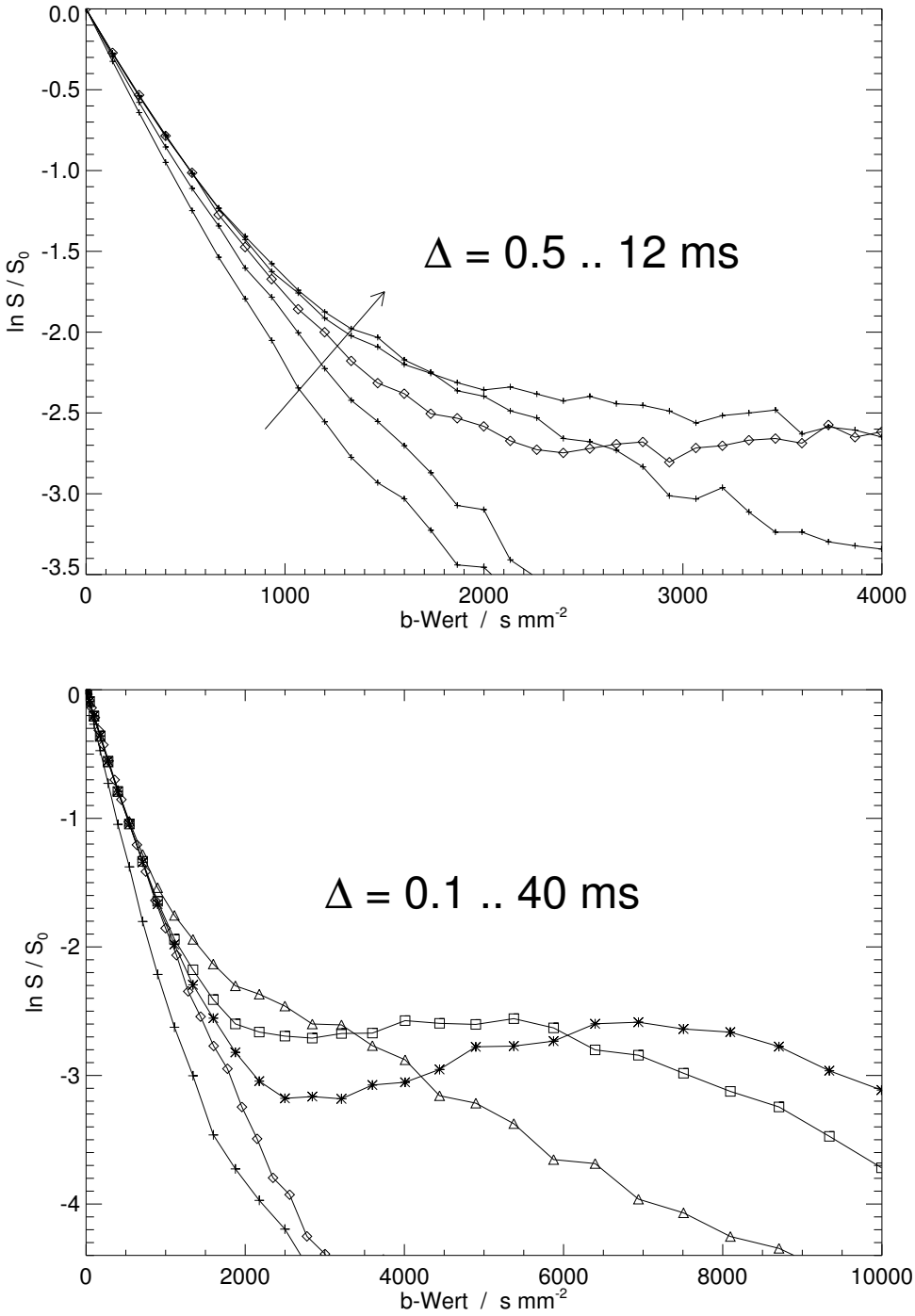


Abbildung 2.7: Diffusion im Kastenmodell: behinderte Diffusion im Extrazellulärraum bei Diffusionszeiten Δ=$[0.5, 1.5, 4, 8(+), 12(\diamond)]$ ms **(oben)** und Δ=$[0.1(+), 6(\Delta), 12(\square), 16(*), 40(\diamond)]$ ms **(unten)**. $D_{\text{ex}} = 3.0$, $\text{w}^T_{\text{ex}\to\text{in}} = 0$, $N = 100000$, $\delta = 1$ ms, $\delta t = 0.1$ ms.

2.2.4 Dreidimensionales Zellmodell

Zur Simulation der Zellschwellung in Gehirngewebe während der Ischämie wird das dreidimensionale Kasten-/Kugelmodell aus Abb. 2.8 verwendet. Es besteht aus Würfeln der Kantenlänge 5 μm, welche je nach gewünschtem relativem Volumenverhältnis mehr oder weniger an den Ecken abgerundet werden. Die Verwendung eines dreidimensionalen Modells garantiert, daß alle extrazellulären Diffusionswege, auch um die Zelle herum, möglich sind.

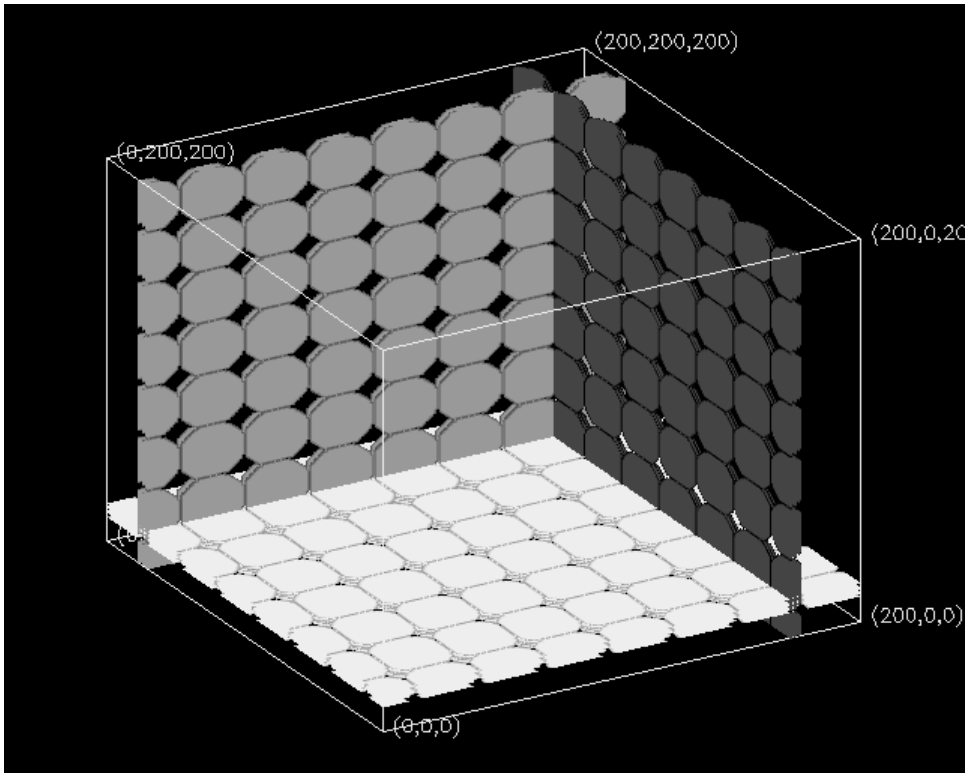


Abbildung 2.8: Dreidimensionales Kasten-/Kugelmodell (200×200×200) für die Simulation einer ischämischen Zellschwellung. Eine Kastenlänge beträgt 5 μm mit einer Pixellänge von 0.2 μm, das Volumenverhältnis wird durch Abrundung der Würfel an den Ecken angepaßt, $D_{\text{in}}/D_{\text{ex}} = 0.25/3.0$.

Ziel der Simulation ist es, die Diffusionsmessungen am Rattenhirn (s. Abb. 1.1) auf dem Rechner nachbilden zu können, um dann durch gezielte Variation der Eingabeparameter das Zustandekommen und die Änderung des ADC in Gewebe besser zu verstehen.

Das intrazelluläre Volumen wird im Folgenden bei $p_{\text{in}} = (0.75, 0.80, 0.90)$ betrachtet. Dies entspricht den experimentellen Gegebenheiten bei neugeborenen und ausgewachsen Ratten in gesundem bzw. totem Zustand (globale Ischämie).

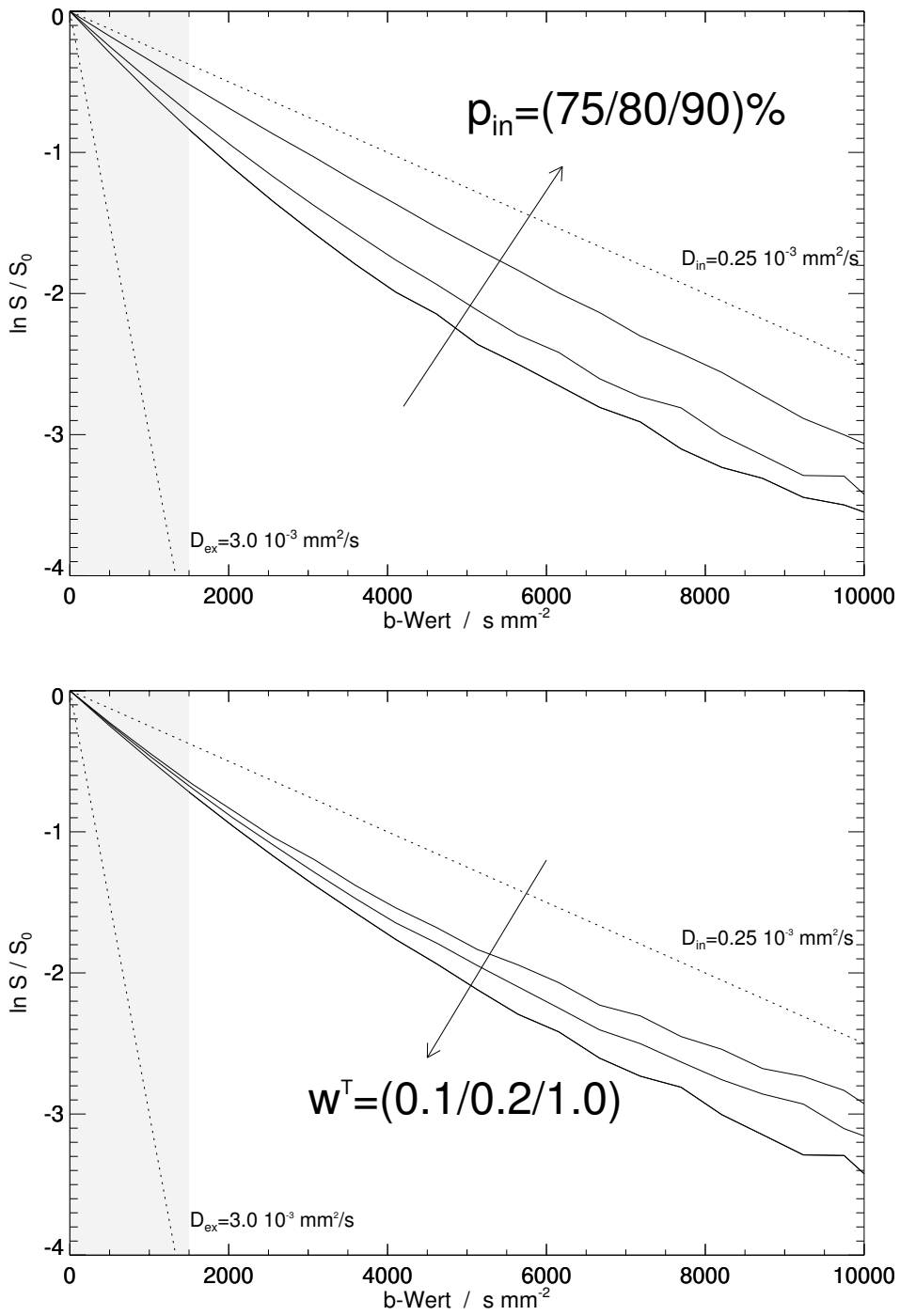


Abbildung 2.9: Monte-Carlo-Simulation eines Diffusionsexperiments im dreidimensionalen Zellmodell bei variiertem intrazellulärem Volumen $p_{\text{in}} = (0.75, 0.80, 0.90)$, $\mathrm{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}} = 1.0$ **(oben)** und variierter Permeabilität $\mathrm{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}}/\mathrm{w}^T_{\text{ex}\to\text{in}} = (1.0/0.13 - 0.2/0.045 - 0.1/0.025)$, $p_{\text{in}} = 0.80$ **(unten)**. $\delta = 1$ ms, $\Delta = 20$ ms, $D_{\text{in}}/D_{\text{ex}} = 0.25/3.0$, $\delta t = 0.01$ ms, $N = 200000$.

Die Diffusionskonstanten in den Kompartimenten sind $D_{\text{ex}}/D_{\text{in}} = (3.0/0.25)$, die Durchtrittswahrscheinlichkeiten $\text{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}} = (1.0,\ 0.2,\ 0.1)$.

Die Ergebnisse der Simulation sind in Abb. 2.9 gezeigt: (oben) wird das intrazelluläre Volumen, (unten) die Permeabilität der Zellmembran variiert. Das intrazelluläre Volumen beträgt bei neugeborenen Ratten ca. $p_{\text{in}} = (70 \ldots 75)\%$, bei erwachsenen ca. $p_{\text{in}} = 80\%$. Nach globaler Ischämie schwillt das intrazelluläre Volumen bei beiden auf ca. $p_{\text{in}} = (90 \ldots 95)\%$ [27,28], Änderungen der Permeabilität während Ischämie werden vermutet [29].

Bei dieser Volumenzunahme ist in Abb. 2.9 (oben) eine Änderung der biexponentiellen Diffusionskurven zu beobachten. Der ADC bei kleinen b-Werten sinkt von 0.56 auf $0.34 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s, der Achsenabschnitt der zweiten Komponente p_2 steigt. In Abb. 2.9 (unten) ist der Einfluß der Durchtrittswahrscheinlichkeit und damit der Permeabilität für eine gesunde, ausgewachsene Ratte ($p_{\text{in}} = 80\%$) gezeigt. Mit abnehmender Permeabilität sinkt der ADC bei kleinen b-Werten von 0.48 auf $0.43 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s, der Achsenabschnitt der zweiten Komponente p_2 steigt.

Zusammenfassend sind in Tab. 2.1 die numerischen Ergebnisse für Simulationen mit verschiedenen Werten für das intrazelluläre Volumen p_{in} und die Durchtrittswahrscheinlichkeit $\text{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}}$ dargestellt. Der ADC ist das Ergebnis einer linearen Regression im Bereich kleiner b-Werte, p_2, D_1, D_2 das Ergebnis einer Anpassung an biexponentielle Kurven. Diese unterschiedliche Auswertung wird durchgeführt, da auf Ganzkörpergeräten am Menschen nur Diffusionsabschwächungen bis ca. $b = 1500$ (schattierter Bereich) gemessen werden können. Daten bei hohen b-Werten erhält man nur im Tierexperiment oder in einer Simulation.

	$\text{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}} = 1.0$				$\text{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}} = 0.2$				$\text{w}^T_{\text{in}\to\text{ex}} = 0.1$			
p_{in}	ADC	p_2	D_1	D_2	ADC	p_2	D_1	D_2	ADC	p_2	D_1	D_2
75 %	0.56	0.24	0.71	0.22	0.51	0.31	0.71	0.22	0.48	0.36	0.71	0.21
80 %	0.48	0.30	0.62	0.23	0.45	0.32	0.60	0.20	0.43	0.38	0.62	0.20
90 %	0.34	0.33	0.42	0.22	0.32	0.28	0.37	0.18	0.30	0.52	0.42	0.21

Tabelle 2.1: Auswertung der Monte-Carlo-Simulation im dreidimensionalen Zellmodell: lineare Regression von $b = [0 \ldots 1500]$ smm^{-2} (ADC) bzw. biexponentieller Fit an $(S/S_0) = (1 - p_2)\exp(-bD_1) + p_2 \exp(-bD_2)$

Aus dem Vergleich der Werte für ADC bzw. p_2, D_1, D_2 kann man erkennen, daß die ADC-Abnahme bei Zellschwellung mit einer Abnahme von D_1 sowie einem Anwachsen von p_2 (intrazellulärer Volumenanteil) korreliert und D_2, die intrazelluläre Diffusionskonstante nahezu gleich bleibt.

Eine vergleichbar geringe ADC-Erniedrigung zeigt sich auch mit abnehmender Permeabilität, welche v. a. auf den steigenden, intrazellulären Volumenanteil p_2 zurückzuführen ist.

	Simulation			Experiment		
p_{in}	p_2	D_1	D_2	p_2	D_1	D_2
75 %	0.24	0.71	0.22	0.10	0.94	0.21
80 %	0.30	0.62	0.23	0.17	0.82	0.17
90 %	0.33	0.42	0.21	0.33	0.52	0.09

Tabelle 2.2: Biexponentieller Fit der Daten aus Abb. 2.9 (oben) im Vergleich mit den experimentellen Rattendaten aus Abb. 1.1 (unten).

Um die Gültigkeit des Rechnermodells im Vergleich zum Experiment zu prüfen, sind in Tab. 2.2 die numerischen Werte der Monte-Carlo-Simulation (s. Abb. 2.9 oben) den Meßdaten an Ratten (s. Abb. 1.1 unten) gegenübergestellt.

Vom theoretischen Standpunkt aus kann das Modell die wesentlichen, experimentellen Eigenschaften qualitativ gut nachbilden: Mit der Zellschwellung (gesunder $\rightarrow$ ischämischer Zustand) sinkt die Diffusionskonstante im Extrazellulärraum D_1 sowie der ADC, der Volumenanteil der intrazellulären Komponente p_2 steigt.

Die mangelnde quantitative Übereinstimmung mag dadurch erklärt werden, daß die komplizierte Morphologie eines zellulären Gewebes, d.h. anisotrope Diffusion, Verteilung von Zelldurchmesser sowie intrazelluläre Strukturen, nicht berücksichtigt ist.

2.2.5 Zusammenfassung

Mit einer Monte-Carlo-Simulation ist es möglich, das NMR-Experiment zur Messung der Diffusion in biologischem Gewebe auf dem Rechner nachzubilden. Dabei können einerseits kürzere Diffusionszeiten und größere Gradientenstärken verwirklicht werden als sie experimentell zugänglich sind. Andererseits kann die Variation physiologischer Parameter wie Diffusionskonstanten, Permeabilitäten und Volumenanteil in nachgebildeten Gewebestrukturen zu einem tieferen Verständnis der Wasserdiffusion in Gehirngewebe führen.

Mit zweidimensionalen Zellmodellen wurde behinderte Diffusion im Extrazellulärraum und der Einfluß von Austausch zwischen Zellkompartimenten auf das Diffusionssignal bei hohen b-Werten untersucht.

In einem dreidimensionalen Zellmodell wurden Zellschwellungen und Permeabilitätsänderungen untersucht, welche als grundlegende, mögliche Faktoren der Änderung des Diffusionskontrastes während Ischämie im Gehirn diskutiert werden.

2.3 Analytisches Modell – Beschränkte Diffusion und Austausch

Basierend auf den analytischen Formeln für beschränkte Diffusion (Stejskal und Tanner, Glg. 2.8) und für ein Diffusionsmodell mit Austausch (Kärger, Glg. 2.14) wird in diesem Abschnitt versucht, schrittweise ein analytisches Modell für die Diffusion in Zellkulturen zu entwickeln.

Kompartimentierung in biologischem Gewebe, gemessen mit Kernspinresonanz, muß bezüglich der vielschichtigen Parameter wie chemische Verschiebung, Spindichte, Relaxationszeiten, Diffusions- und Perfusionseigenschaften kritisch hinterfragt und diskutiert werden [30, 31]. Nachdem sich NMR-Diffusionsmessungen zur frühzeitigen Detektion von Gehirninfarkten etabliert haben, wurde in den letzten zehn Jahren verstärkt nach qualitativen und quantitativen Erklärungen des Diffusionskontrastes gesucht. Dies wird v. a. dadurch erschwert, daß die physiologischen Parameter und deren kompliziertes Zusammenwirken in Gewebe nur unzureichend bekannt sind.

Erste Erklärungen des Zusammenhangs zwischen einer Langzeitdiffusionskonstante und der Permeabilität der Zellmembran stellte Crick [32] vor, Tanner [33] und Meerwall *et al.* [34] erarbeiteten eindimensionale Modelle zur Diffusion an planparallelen Membranen, welche jedoch keine verschiedenen Diffusionskonstanten in den Kompartimenten berücksichtigen konnten. Erweiterungen mit Berücksichtigung von extrazellulären Diffusionswegen [35, 36] sind in der Anwendbarkeit sehr eingeschränkt.

Wesentliche Impulse kamen von Theorien der Diffusion in porösen Medien, woraus das Konzept der behinderten Diffusion (Tortuosität) [37], q-Raum-Messungen [13, 38, 39] sowie S/V-Bestimmungen [10, 11, 40, 41] entwickelt wurden. Auf Grund der umfangreichen Literatur wird auf die Übersichtsartikel von Kärger *et al.* [16], Szafer *et al.* [42] und Le Bihan [9] verwiesen.

Von den neuesten Modellen sind v. a. die von Latour *et al.* [43] (Theorie des effektiven Mediums), Norris *et al.* [44] (Modell der scheinbaren Beschränkung) und Szafer *et al.* [25] (quantitative ADC-Modelle) zu nennen. Stanisz *et al.* [45] konnten mit einem analytischen Ansatz sowohl die Diffusionszeitabhängigkeit, als auch die Gewebeanisotropie von Messungen am optischen Nerv eines Rindes quantifizieren.

Das im Folgenden dargestellte Modell folgt Tanner in der Modellierung der beschränkten Diffusion, seinen Messungen der Austauschzeit an Hefezellen [12, 46] und Andrasko, der Permeabilitätsmessungen an Erythrocyten mit der Kärgerformel für Austausch modellierte [47]. Schematisch ist das Modell in Abb. 2.10 mit allen wesentlichen Parametern dargestellt.

Die Diffusion im Extrazellulärraum wird als frei bzw. behindert angenommen (D_{extra}), intrazellulär ist die Diffusion durch die Zellmembran beschränkt (D_{intra}).

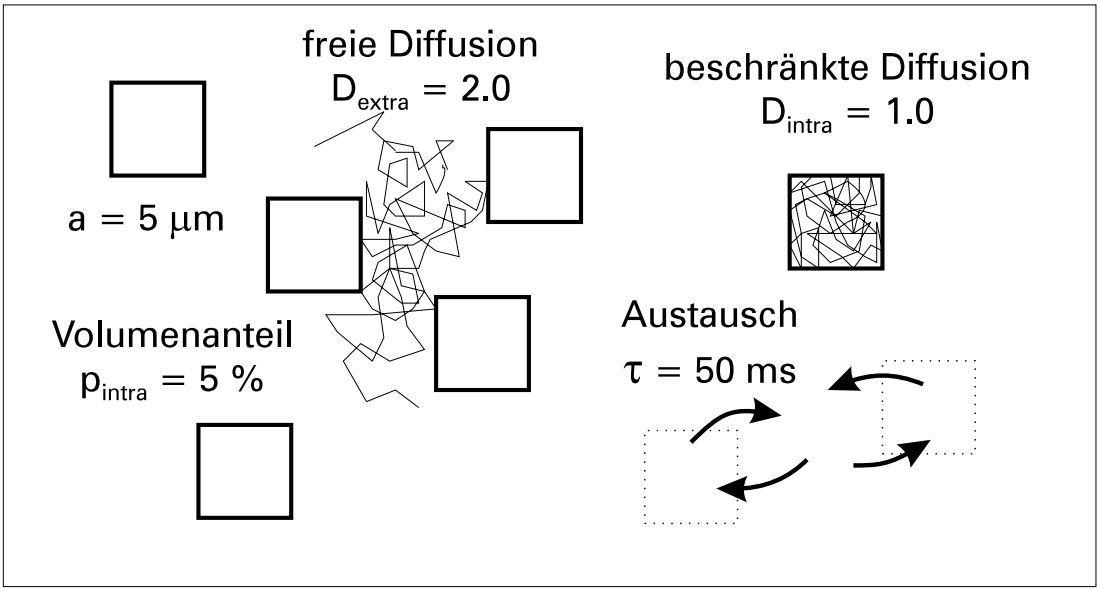


Abbildung 2.10: Zweikomponentenmodell für Zellkulturen mit freier und beschränkter Diffusion und Austausch

Dabei werden Kästen variabler Länge a angenommen, welche um einen Mittelwert verteilt sein kann. Das Volumenverhältnis der beiden Komponenten wird durch die relativen Volumenanteile p_{intra} und p_{extra} beschrieben, wobei $p_{\text{intra}} + p_{\text{extra}} = 1$ ist. Der Austausch zwischen beiden Kompartimenten wird im Kärgermodell mit einer intrazellulären Lebensdauer τ_{intra} als Sprungaustausch betrachtet.

Die Modellannahmen werden Schritt für Schritt verfeinert und die Ergebnisse der numerischen Rechnung als Signalabfall *vs.* b-Wert und q^2 dargestellt:

- Zwei Kompartimente ohne Austausch, Zellmembran ist undurchlässig
- Austausch mit Kärgerformel
- modifizierte Kärgerformel mit beschränkter, intrazellulärer Diffusion
- verteilte Kastenlängen
- Variation von intrazellulärem Volumen und intrazellulärer Austauschzeit
- Modell für ischämische Schwellung im Gehirn

Die Einheiten der Diffusionskonstanten sind $[D] = 10^{-3}$ mm^2/s, Längeneinheiten wie die der Kastenlänge oder deren Standarabweichung ist $[a, \sigma_a] = \mu$m. Gradientstärken werden in $[G] = $ mT/m, alle Zeiten wie Gradientendauern, Diffusionszeiten und Austauschzeiten werden in $[\delta, \Delta, \tau] = $ ms angegeben. In der Näherung kurzer Gradientenpulse ($\delta \to 0$) wird die Diffusionszeit t_D gleich dem Gradientenabstand Δ, t_D und Δ werden im Folgenden synonym verwendet.

2.3.1 Zwei Kompartimente ohne Austausch – beschränkte intrazelluläre Diffusion

Der einfachste Fall eines Zellmodells liegt vor, wenn man die Permeabilität der Zellmembran gleich Null setzt. Das Gesamtsignal setzt sich aus der Summe der Einzelsignale in den Kompartimenten zusammen

$$\begin{aligned} S &= S_{\text{extra,frei}} + S_{\text{intra,beschränkt}} \\ &= p_1 \cdot \exp(-\tilde{q}^2 D_1 \Delta) + p_2 \cdot E(q, a, D_2, \Delta) \quad . \end{aligned} \tag{2.20}$$

Die extrazelluläre Diffusion ist frei, die intrazelluläre beschränkt in einem Kasten der Länge a.

Die Auftragung des logarithmierten Signals *vs.* b-Wert erweist sich immer dann als günstig, wenn freie Diffusion vorliegt. Aus der negativen Steigung kann die Diffusionskonstante abgelesen bzw. mit linearer Regression berechnet werden (s. Glg. 2.4). Im Falle beschränkter Diffusion ist hingegen die Auftragung *vs.* q-Wert bzw. q^2 angebracht. Nach Erreichen der Beschränkung müssen die Signalabschwächungen unabhängig von der Diffusionszeit sein (s. Glg. 2.8). Für das Zweikomponentenmodell werden deshalb meist beide Auftragungen desselben Datensatzes gezeigt.

In Abb. 2.11 ist die Signalabschwächung *vs.* b-Wert bzw. q^2 bei Diffusionszeiten $\Delta = 8 \ldots 1000$ dargestellt.

Die freie Diffusion der ersten, extrazellulären Komponente ist daran zu erkennen, daß die Kurven für verschiedene Diffusionszeiten in der Auftragung *vs.* b-Wert bei kleinen b-Werten übereinander liegen. Die Steigung entspricht der Diffusionskonstanten $D_1 = 2.0$. Die zweite, intrazelluläre Komponente zeigt hingegen eine starke Abhängigkeit von der Diffusionszeit, bei $\Delta = 1000$ ist die scheinbare Diffusionskonstante nahezu Null. Den relativen intrazellulären Volumenanteil kann man aus dem Achsenabschnitt der zweiten Komponente ablesen und beträgt $p_2 = 0.05 \sim e^{-3}$.

Die Charakteristik der beschränkten Diffusion ist in der Auftragung *vs.* q^2 zu erkennen. Ab der Diffusionszeit von $\Delta = 20$ erreicht $S(q^2)$ eine Asymptote, die je nach Geometrie des beschränkenden Objekts und in Abhängigkeit vom q-Wert mehr oder weniger stark gekrümmt ist.

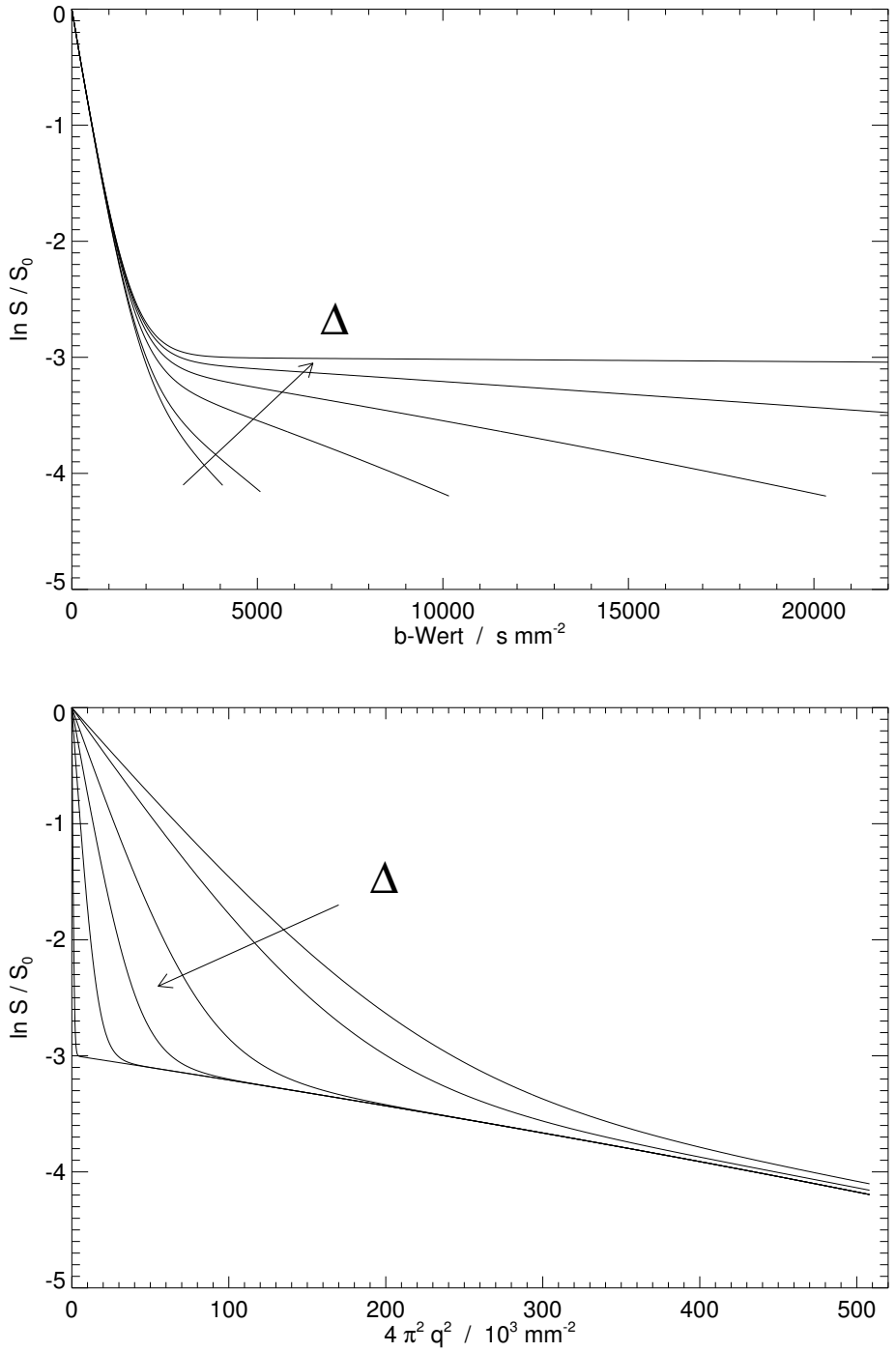


Abbildung 2.11: Zwei Kompartimente ohne Austausch: freie und beschränkte Diffusion mit $D_{1,2} = 2.0/1.0$, $p_{1,2} = 0.95/0.05$, $a = 5$, $\delta = 8$, $G = 333$, $\Delta = (8, 10, 20, 40, 100, 1000)$.

2.3.2 Zwei Kompartimente mit Austausch – analytisches Modell nach Kärger

Wenn man nun berücksichtigt, daß die Zellmembran durchlässig ist, und intra- und extrazelluläres Wasser austauschen, kann man das Diffusionsmodell von Kärger (s. Glg. 2.14) anwenden, welches eine intrazelluläre Austauschzeit τ_2 einführt. Die Signalabschwächung nach Glg. 2.14

$$S = S(q^2, \Delta, D_1, D_2, p_2, \tau_2) \tag{2.21}$$

wird abhängig von vier physiologischen Parametern D_1, D_2, p_2, τ_2.

In Abb. 2.12 ist die Signalabschwächung *vs.* b bzw. q^2 mit einer intrazellulären Austauschzeit von $\tau_2 = 50$ bei Diffusionszeiten $\Delta = 8 \ldots 100$ dargestellt. Um beide Komponenten deutlich zu unterscheiden, wurde die intrazelluläre Diffusionskonstante sehr klein zu $D_2 = 0.1$ gewählt.

Die Steigung in der Auftragung *vs.* b-Wert bleibt für beide Komponenten (extra- und intrazelluläre Diffusion) konstant, in beiden Kompartimenten diffundiert Wasser frei.

Die Gleichungen von Kärger nähern den tatsächlichen Diffusionsvorgang in der Weise an, daß den Teilchen in einem Kompartiment eine Aufenthaltsdauer zugeordnet wird und der Austausch instantan, d. h. sprunghaft erfolgt. Eine wirklichkeitsnähere Beschreibung der Brownschen Diffusionsbewegung in der Nähe und durch die Zellmembran müßte die Dicke und die Permeabilität der Zellmembran, sowie evt. Oberflächenwechselwirkungen berücksichtigen.

Reduziert auf die wesentlichste Funktion wird jedoch die Diffusion über die Zellmembran und der damit verbundene Austausch zwischen den Kompartimenten mit einer Aufenthaltsdauer τ_2 in der Kärgerformel ausreichend beschrieben.

Dieser Austausch ist deutlich in der Auftragung von $\ln S$ *vs.* b (Abb. 2.12 oben) an der zweiten, intrazellulären Komponente zu sehen. Die Steigung und damit die Diffusionskonstante bleibt konstant, der Achsenabschnitt nimmt jedoch mit der Austauschzeit τ_2 ab.

In der Auftragung $\ln S$ *vs.* q^2 (Abb. 2.12 unten) wird noch einmal bestätigt, daß *keine* beschränkte Diffusion vorliegt, da weder die Steigung der ersten noch die der zweiten Komponente konstant bleibt bzw. mit zunehmender Diffusionszeit eine Asymptote erreicht.

Die Kärgerformel nach Glg. 2.14 modelliert also die freie Diffusion in zwei Kompartimenten unter Berücksichtigung eines sprunghaften Austauschs.

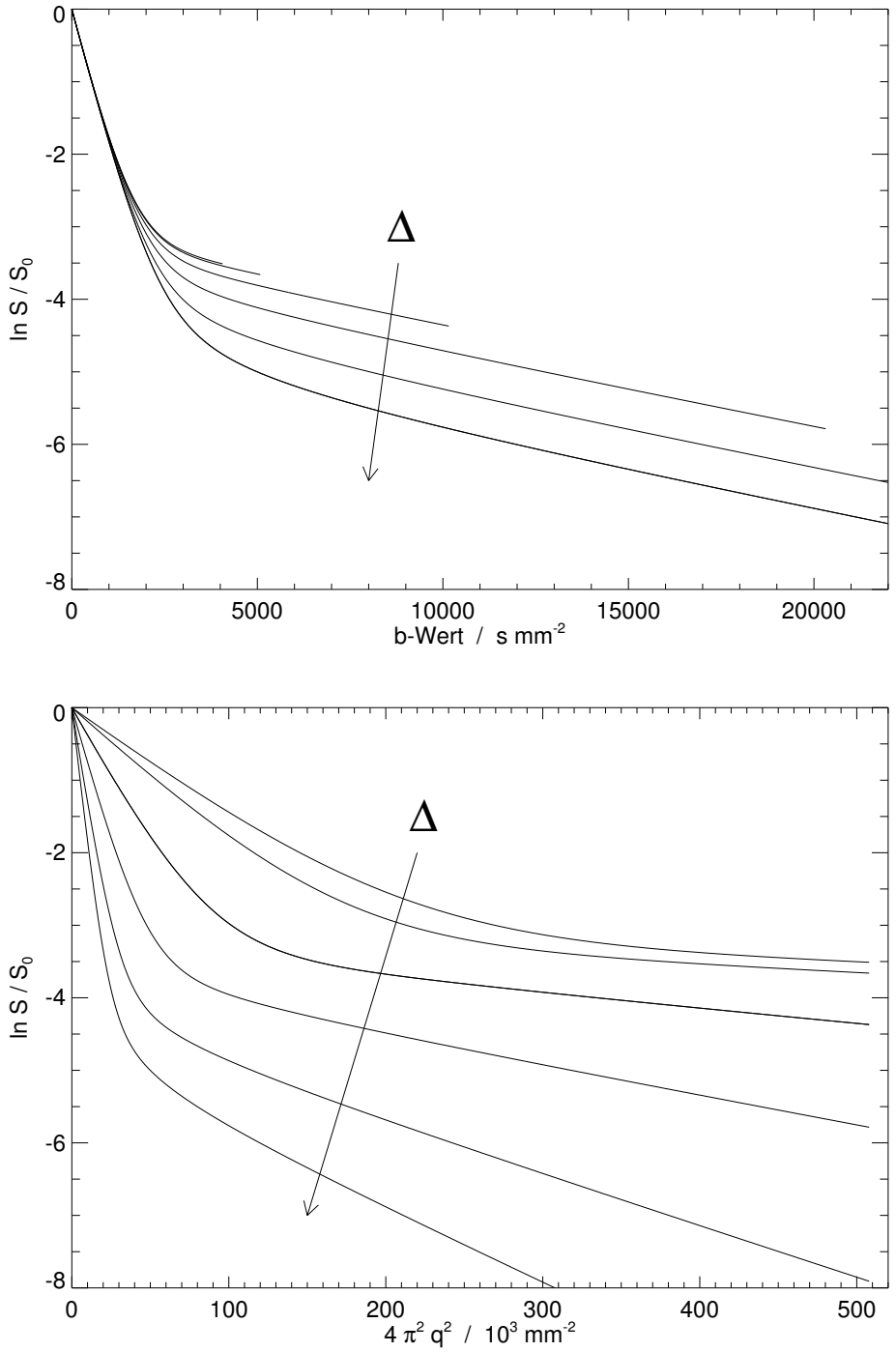


Abbildung 2.12: Zwei Kompartimente mit Austausch (intrazelluläre Austauschzeit $\tau_2 = 50$) nach dem Kärgermodell. $D_{1,2} = 2.0/0.1$, $p_2 = 0.05$, $\delta = 8$, $G = 333$, $\Delta = (8, 10, 20, 40, 70, 100)$.

2.3.3 Analytisches Modell nach Kärger mit beschränkter intrazellulärer Diffusion

Möchte man die Beschränkung der intrazellulären Diffusion berücksichtigen, muß das Kärgermodell modifiziert werden. Der fixe Wert für die intrazelluläre Diffusionskonstante D_2 wird durch eine scheinbare, intrazelluläre Diffusionskonstante, die von der Diffusionszeit abhängt, ersetzt:

$$D_{\text{app,intra}} = -\frac{\partial \ln E}{\partial \tilde{q}^2} \cdot \frac{1}{\Delta} \approx \frac{-\ln E_\Delta(q_1) + \ln E_\Delta(q_2)}{(\tilde{q}_1^2 - \tilde{q}_2^2)\Delta} \tag{2.22}$$

und als partielle Ableitung der Tannerformel $E_\Delta(q)$ aus Glg. 2.8 für beschränkte Diffusion in einem Kasten der Länge a berechnet. Eingesetzt in die Kärgerformel (Glg. 2.14) ist die Signalabschwächung

$$S = S(q^2, \Delta, D_1, D_2, p_2, \tau_2, a) \tag{2.23}$$

wieder abhängig von den zwei experimentellen Parametern q^2, Δ und den vier physiologischen D_1, D_2, p_2, τ_2. Hinzu kommt ein morphologischer Parameter, die Kastenlänge a.

Das Ergebnis der numerischen Berechnung ist in Abb. 2.13 mit einer tatsächlichen, intrazellulären Diffusionskonstante von $D_2 = 1.0$ und einer intrazellulären Austauschzeit von $\tau_2 = 50$ bei Diffusionszeiten $\Delta = 8 \ldots 100$ dargestellt.

In der Auftragung *vs.* b-Wert ist einerseits die freie Diffusion der ersten, extrazellulären Komponente, andererseits eine deutliche Abhängigkeit der zweiten von der Diffusionszeit zu erkennen. Die negative Steigung von $\ln S$ *vs.* b, also die scheinbare Diffusionskonstante des Intrazellulärraums, nimmt zunehmend ab. Bei $\Delta \sim 50$ erreichen die Kurven eine Einhüllende (Enveloppe) und fallen dann wieder ab, was durch den intrazellulären Austausch begründet ist.

Betrachtet man die Steigung der Kurven in der Auftragung *vs.* q^2, wird die der zweiten Komponente für Diffusionszeiten $\Delta > 20$ konstant. Der Abfall des Achsenabschnitts hängt von der Austauschzeit ab. Gezeigt sind die Kurven für die singuläre Austauschzeit $\tau_2 = 50$. Die konstante Steigung ist das Charakteristikum von beschränkter Diffusion, welche in diesem Falle über die Kärgerformel mit dem Austausch der Komponenten kombiniert ist.

Dies bedeutet eine Erweiterung des Konzepts der total beschränkten Diffusion (Tanner) zum *Modell der beschränkten Diffusion an permeablen Grenzen*, kurz als „beschränkte Diffusion mit Austausch“ (Tanner-Kärger-Modell) bezeichnet.

Das Erreichen der konstanten Steigung hängt noch von der Größe der tatsächlichen intrazellulären Diffusionskonstante ab. Die Spins durchlaufen nämlich im Mittel nach der Zeit $t = a^2/2D$ die Länge des Kastens a und erfahren den Übergang von der freien zur beschränkten Diffusion. Bei einer Diffusionskonstante $D_2 = 1.0$ ist dies für $a = 5$ bei $\Delta = 12.5$ erreicht:

D_2	2.0	1.0	0.25
$\Delta = a^2/2D$	6.25	12.5	50

Zum Vergleich mit Abb. 2.13 (unten) sind in Abb. 2.14 die Signalabschwächungen *vs.* q^2 für die intrazellulären Diffusionskonstanten $D_2 = 2.0$ und $D_2 = 0.25$ aufgetragen, die den Übergang zur beschränkten Diffusion bei verschiedenen Diffusionszeiten zeigen. Die intrazelluläre Diffusionskonstante bestimmt das Verhalten der Signalabschwächung also nur bei kurzen Diffusionszeiten bis zum Erreichen der Beschränkung.

Die modifizierte Kärgerformel mit zeitabhängiger, intrazellulärer Diffusionskonstante beschreibt also beschränkte Diffusion an permeablen Grenzen in einem System mit zwei Komponenten, welche austauschen.

2.3.4 Extraktion relevanter Parameter

Mit der theoretischen Modellierung der Diffusionsabschwächung zeigt sich eine vielschichtige Abhängigkeit des NMR-Signals von experimentellen und physiologischen Parametern. Im Folgenden werden im Hinblick auf durchzuführende Experimente und deren Interpretation zwei Auswertemethoden entwickelt, die sowohl auf die numerisch gerechneten als auch experimentelle Daten Anwendung finden können und in dieser Weise einen Vergleich zwischen dem analytischen Modell und den Experimenten (s. Kap. 3) zulassen:

- Bestimmung der Austauschzeit mit dem *cg*-Experiment
- Bestimmung einer scheinbaren Verschiebung r_{app}
  und einer scheinbaren Diffusionskonstante D_{app}

Das Signal S ist im Stejskal/Tanner-Experiment abhängig von der Gradientenstärke, der Gradientendauer und des Abstands der Gradientenpulse. Beim sog. *ct*-Experiment ('constant diffusion time') bleibt der Abstand und damit die Diffusionszeit konstant und die Gradientenstärke wird variiert, beim sog. *cg*-Experiment ('constant gradient') bleibt die Stärke konstant und die Diffusionszeit wird variiert (s. Abb. 2.15)[4].

[4]Einflüsse der Gradientendauer δ sollen hier nicht betrachtet werden (siehe dazu [26]).

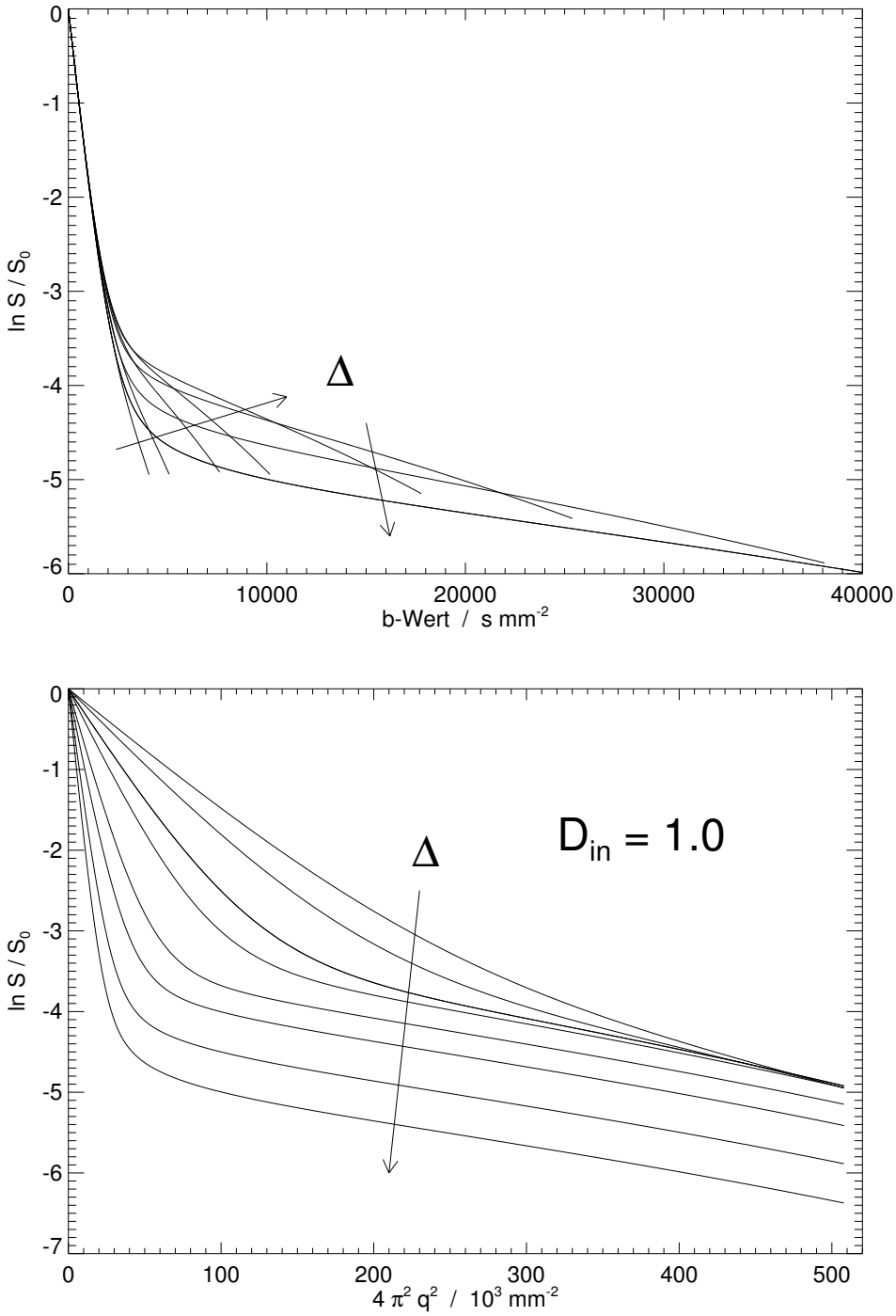


Abbildung 2.13: Zwei Kompartimente mit Austausch in einem modifizierten Kärgermodell mit beschränkter intrazellulärer Diffusion in einem Kasten der Länge $a = 5$. $D_{1,2} = 2.0/1.0$, $p_2 = 0.05$, $\tau_2 = 50$, $\delta = 8$, $G = 333$, $\Delta = (8, 10, 15, 20, 35, 50, 70, 100)$.

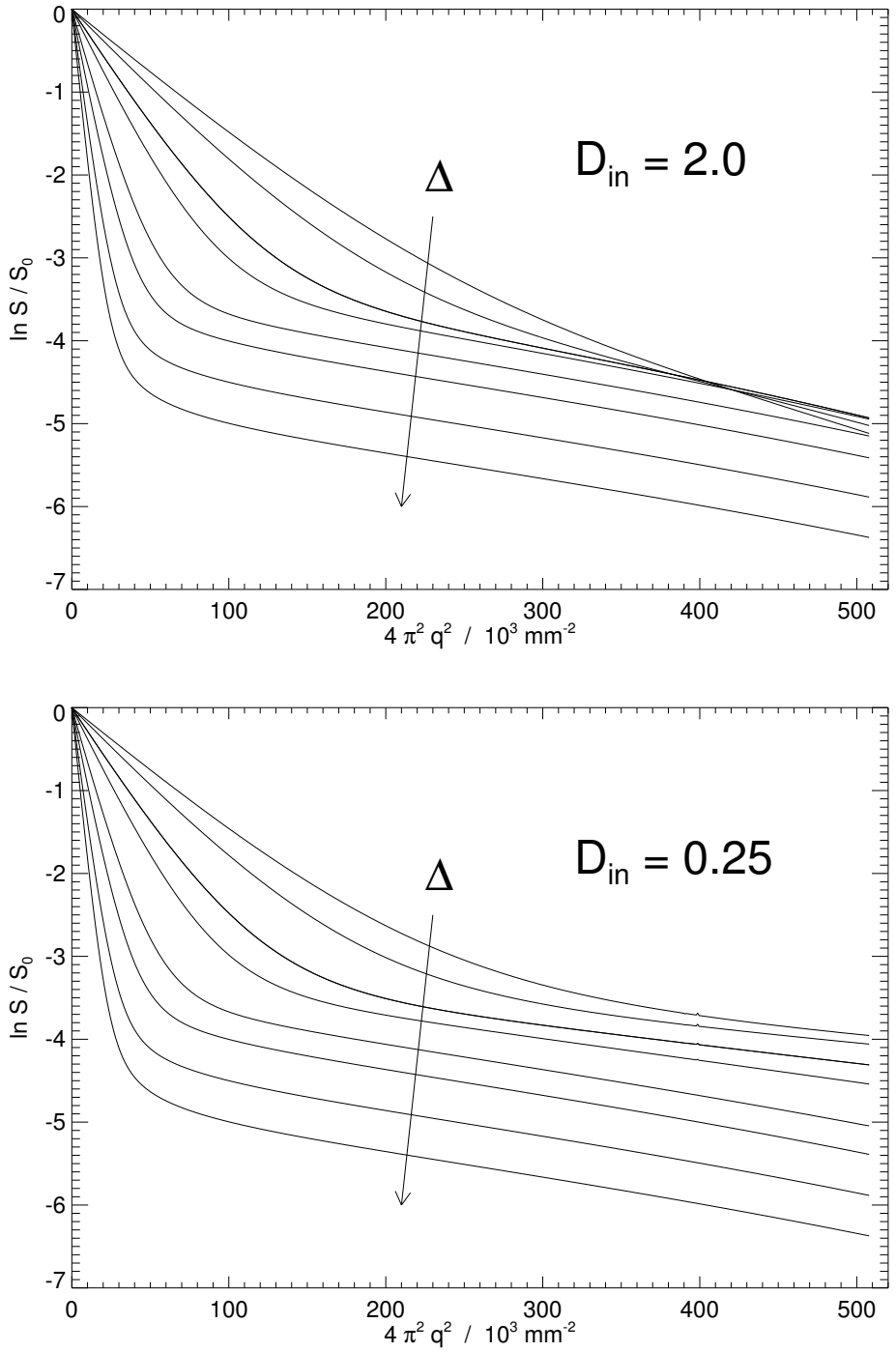


Abbildung 2.14: Modelldaten wie in Abb. 2.13 mit der intrazellulären Diffusionskonstante $D_2 = 2.0$ **(oben)** und $D_2 = 0.25$ **(unten)**.

Mit dem Stejskal/Tanner-Experiment kann man also einen zweidimensionalen Datensatz $S(q^2, t_D)$ erhalten:

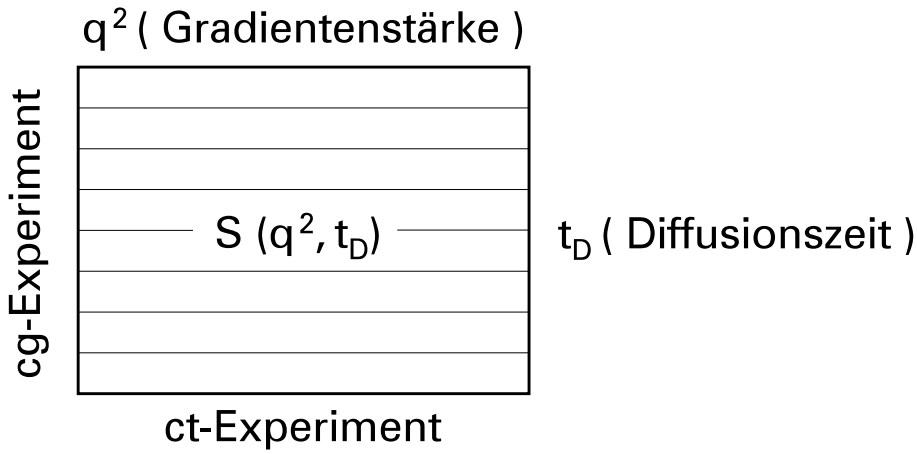


Abbildung 2.15: Experimentführung bei einer Diffusionsmessung mit gepulsten Gradienten nach Stejskal/Tanner als *ct*- oder *cg*-Experiment.

Bisher wurde die Signalabschwächung $\ln S$ nur als *ct*-Experiment, also über $\tilde{q}^2$ oder $b = \tilde{q}^2 \cdot t_D$ aufgetragen. In Abb. 2.16 ist $\ln S$ in Abhängigkeit von der Diffusionszeit als *cg*-Experiment mit drei ausgewählten Werten für q^2 dargestellt. Zusätzlich sind die intrazellulären Diffusionskonstanten D_2 (verschiedene Strichelung) variiert, wobei die intrazellulären Spins die Beschränkung bei unterschiedlich langer Diffusionszeit t_D erreichen. Daraus resultieren die Unterschiede für Diffusionszeiten $t_D < 50$; für $t_D > 50$ fallen bei allen q-Werten die *cg*-Kurven zusammen.

Bestimmung der Austauschzeit

Aus dem *cg*-Experiment kann die intrazelluläre Austauschzeit bestimmt werden, wie es schon 1976 Andrasko [47] und 1983 Tanner [46] an Erythrocyten bzw. Hefezellen durchführten:

$$\tau_{\text{intra}} = -\left(\left. \frac{\partial \ln S(\tilde{q}^2, t_D)}{\partial t_D} \right|_{q=\text{const}} \right)^{-1} . \tag{2.24}$$

Aus den gerechneten Daten ergibt sich für τ_{intra} bei den verschiedenen Diffusionskonstanten D_2 und q-Werten mit linearer Regression im Bereich $t_D = [39 \ldots 97]$ (s. Tab. 2.3):

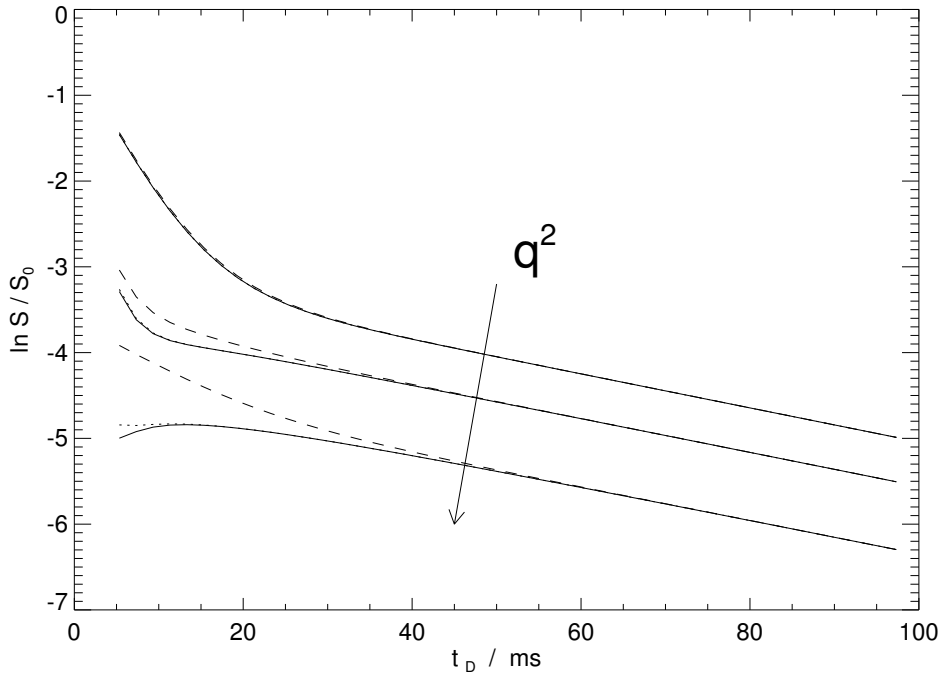


Abbildung 2.16: Zweikomponentenmodell (Parameter wie in Abb. 2.13) in der *cg*-Auftragung gegen die Diffusionszeit. Der Wert für $\tilde{q}^2$ beträgt $(98/249/488) \cdot 10^3$ mm^{-2} jeweils bei den intrazellulären Diffusionskonstanten $D_2 = [2.0(—)/1.0(\cdots)/0.25(- - -)]$.

τ_{intra}		$\tilde{q}^2$ 98	249	488
D_2	2.0	50.2	51.0	52.2
	1.0	50.2	51.0	52.2
	0.25	50.1	50.6	50.7

Tabelle 2.3: Bestimmung der Austauschzeiten τ_{intra} aus der Steigung des *cg*-Experiments von Abb. 2.16 (lineare Regression im Bereich $t_D = [39 \ldots 97]$).

Die Werte für die Austauschzeiten τ_{intra} (Standardabweichung $\sigma_\tau = \pm 0.1$) liegen also nahe dem eingesetzten Wert von $\tau_2 = 50$.

Nach der Auswertung der Steigung der *cg*-Kurven werden nun die Steigungen der *ct*-Kurven ($\ln S$ *vs.* b oder q^2) verwendet, um scheinbare Verschiebungen und scheinbare Diffusionskonstanten zu bestimmen[5].

[5]Diffusion ist frei, wenn die Steigung der *ct*-Kurven *vs.* b bei verschiedenen Diffusionszeiten konstant bleibt bzw. ist behindert, wenn die Steigung der *ct*-Kurven *vs.* q oder q^2 konstant bleibt.

Bestimmung der scheinbaren Verschiebung und der scheinbaren Diffusionskonstante

Definiert man die Steigung m eines ct-Experiments durch

$$m := -\left.\frac{\partial \ln S(\tilde{q}^2, t_D)}{\partial \tilde{q}^2}\right|_{t_D=\text{const}} \tag{2.25}$$

ergibt sich die (scheinbare) Verschiebung r_{app} und die (scheinbare) Diffusionskonstante D_{app} zu

$$r_{\text{app}} := \sqrt{6m} \qquad D_{\text{app}} := \frac{m}{t_D} \quad . \tag{2.26}$$

Diese Ausdrücke sind so definiert, daß für den Fall freier Diffusion r_{app} und D_{app} jeweils die tatsächlichen Werte für die mittlere Verschiebung ('mean displacement')

$$<r> = \sqrt{\overline{(r' - r)^2}}$$

und die freie Diffusionskonstante D liefern.

Nach Glg. 2.26 ist für freie Diffusion ($\ln S = -\tilde{q}^2 D\ t_D$) die Steigung $m = Dt_D$, die mittlere Verschiebung

$$r_{\text{app}} = \sqrt{6Dt_D} = <r>$$

und die Diffusionskonstante $D_{\text{app}} = D$. Im Falle beschränkter Diffusion sind diese Ausdrücke nicht mehr so einfach analytisch ableitbar und werden numerisch bestimmt.

In Abb. 2.17 sind die Daten für das modifizierte Kärgermodell mit beschränkter Diffusion ($D_2 = 1.0$) ausgewertet (vgl. Abb. 2.13). Für Werte $\tilde{q}^2 = [3 \ldots 449] \cdot 10^3$ mm^{-2} ist die scheinbare Verschiebung r_{app} und scheinbare Diffusionskonstante D_{app} nach Glg. 2.26 mit linearer Regression bestimmt.

Die scheinbare Verschiebung r_{app} ist bei kleinen Werten für $\tilde{q}^2$ linear über $\sqrt{t_D}$ (freie Diffusion) und geht für $\tilde{q}^2 > 150 \cdot 10^3$ mm^{-2} gegen die Kastenlänge $a = 5\ \mu$m (beschränkte Diffusion). Die scheinbare Diffusionskonstante D_{app} geht für kleine $\tilde{q}^2$ gegen die des Extrazellulärraums $D_1 = 2.0$ und zeigt für $\tilde{q}^2 > 150 \cdot 10^3$ mm^{-2} das typische Verhalten für beschränkte Diffusion, d. h. ist umgekehrt proportional zur Diffusionszeit.

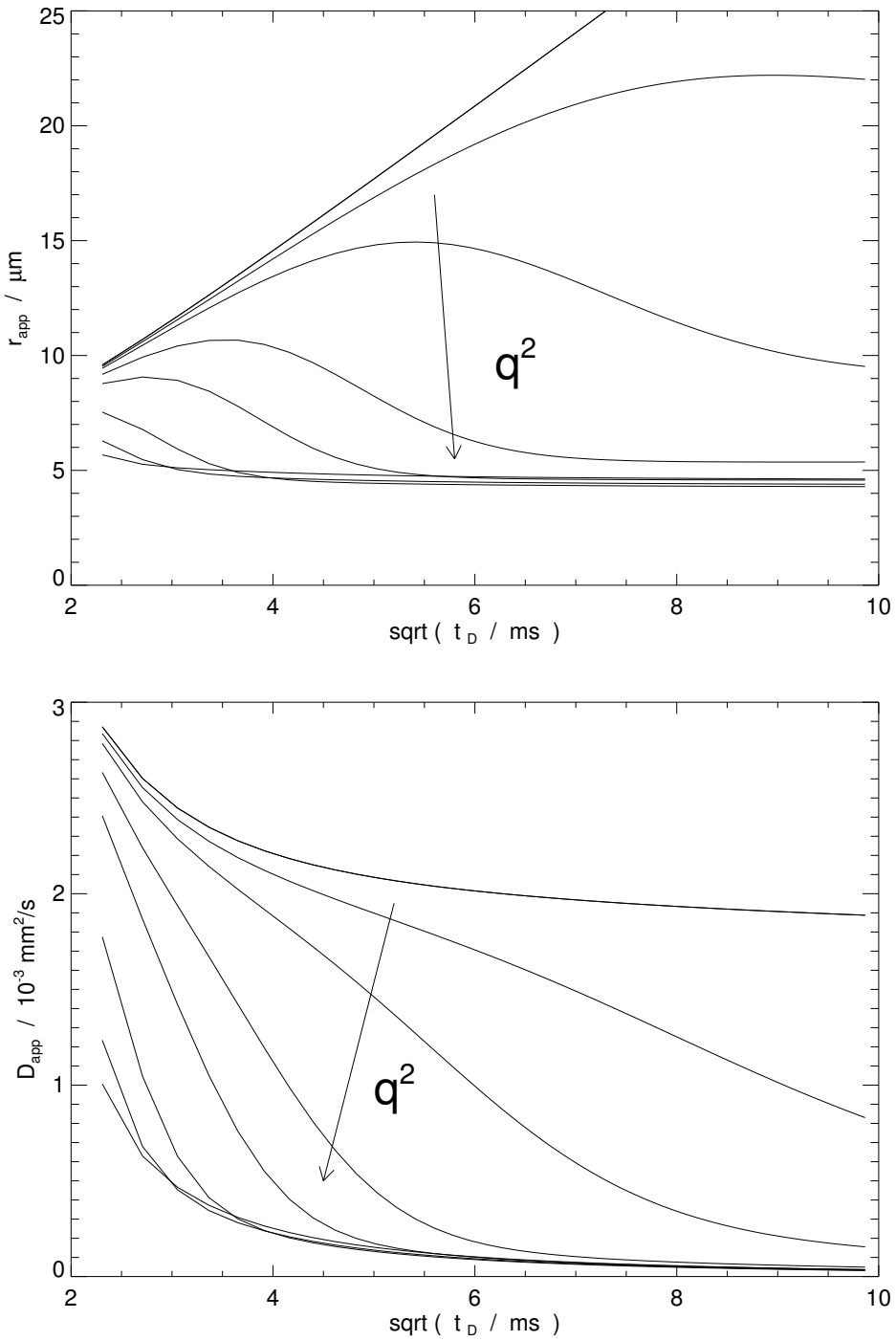


Abbildung 2.17: Zwei Kompartimente mit Austausch in einem modifizierten Kärgermodell mit $D_2 = 1.0$ (Parameter wie in Abb. 2.13). Die Auswertung der gerechneten Daten erfolgt nach Glg. 2.26 zur Bestimmung der scheinbaren Verschiebung r_{app}, sowie der scheinbaren Diffusionskonstante D_{app} bei $\tilde{q}^2 = (3, 25, 49, 98, 148, 249, 350, 449) \cdot 10^3\ \mathrm{mm}^{-2}$.

2.3.5 Zwei Kompartimente mit Verteilung der Kastenlängen

Bisher wurde immer nur eine feste Kastenlänge in den Modellrechnungen berücksichtigt. Um den in der Natur vorliegenden Zellgrößenverteilungen eher gerecht zu werden, werden im Folgenden die mit $f(a_i)$ gewichteten Signale unterschiedlicher Kastenlängen a_i addiert:

$$S = (\sum_i f(a_i))^{-1} \cdot \sum_i f(a_i) \cdot S(q^2, \Delta, D_1, D_2, p_2, \tau_2, a_i)$$

$$f(a_i) = \exp\left(-\frac{(a_i - \bar{a})^2}{2\sigma_a^2}\right) \tag{2.27}$$

Dabei wird für $f(a_i)$ eine Normalverteilung um den Mittelwert $\bar{a}$ mit der Standardabweichung σ_a angenommen (FWHM $= 2\sigma \cdot \sqrt{2\ln 2} \sim 2.35 \cdot \sigma$). Der Wertebereich für a_i ist $[\bar{a} - 3\sigma, \bar{a} + 3\sigma]$ und für a_i sind nur positive Werte zugelassen.

Einen Vergleich mit verschiedenen Breiten der Verteilung σ_a liefert Abb. 2.18. Der Mittelwert der Kastenlänge wurde zu $\bar{a} = 5$ gewählt. Eine Verteilung mit $\sigma_a = 1$ (Daten nicht gezeigt) weicht nur wenig von der Modellrechnung ohne Verteilung ab (s. Abb. 2.13). Deutlich zeigt sich eine Abrundung der Signalabschwächung erst bei $\sigma_a = 5$ (oben). Die Signale $E(q, a_i)$ der beschränkten, intrazellulären Komponente zeigen in der Auftragung *vs.* q^2 verschiedene Steigungen, was in der Addition der Einzelsignale zu der kontinuierlichen Verteilung im Zweikomponentenmodell führt.

Als Extremfall ist noch eine Kurvenschar mit $\sigma_a = 20$ aufgetragen (unten). Dabei ist zu beachten, daß fast die ganze linksseitige Seite der Verteilung fehlt, da Kastenlängen < 0 aus physikalischen Gründen nicht zugelassen sind, d.h. der Schwerpunkt der Verteilung liegt höher als $\bar{a}$. Erkennbar ist dies in einer Absenkung des Achsenabschnitts der zweiten Komponente.

In den Abb. 2.19 und 2.20 ist eine Modellrechnung mit der Standardabweichung $\sigma_a = 10$ bei den intrazellulären Diffusionskonstanten $D_2 = 1.0/2.0/0.25$ und den Diffusionszeiten $\Delta = 8 \ldots 100$ zum Vergleich dargestellt. Je nach Größe der Diffusionskonstante D_2 wird der Übergang von freier zu beschränkter Diffusion früher oder später erreicht, danach bleibt die Krümmung der Kurven erhalten.

Zusammenfassend führt eine Verteilung des morphologischen Parameters a (Kastenlänge) zu einer Verteilung der Steigungen in den Signalabschwächungen. Der Absolutwert der tatsächlichen, intrazellulären Diffusionskonstante wirkt sich nur bei kurzen Diffusionszeiten deutlich aus.

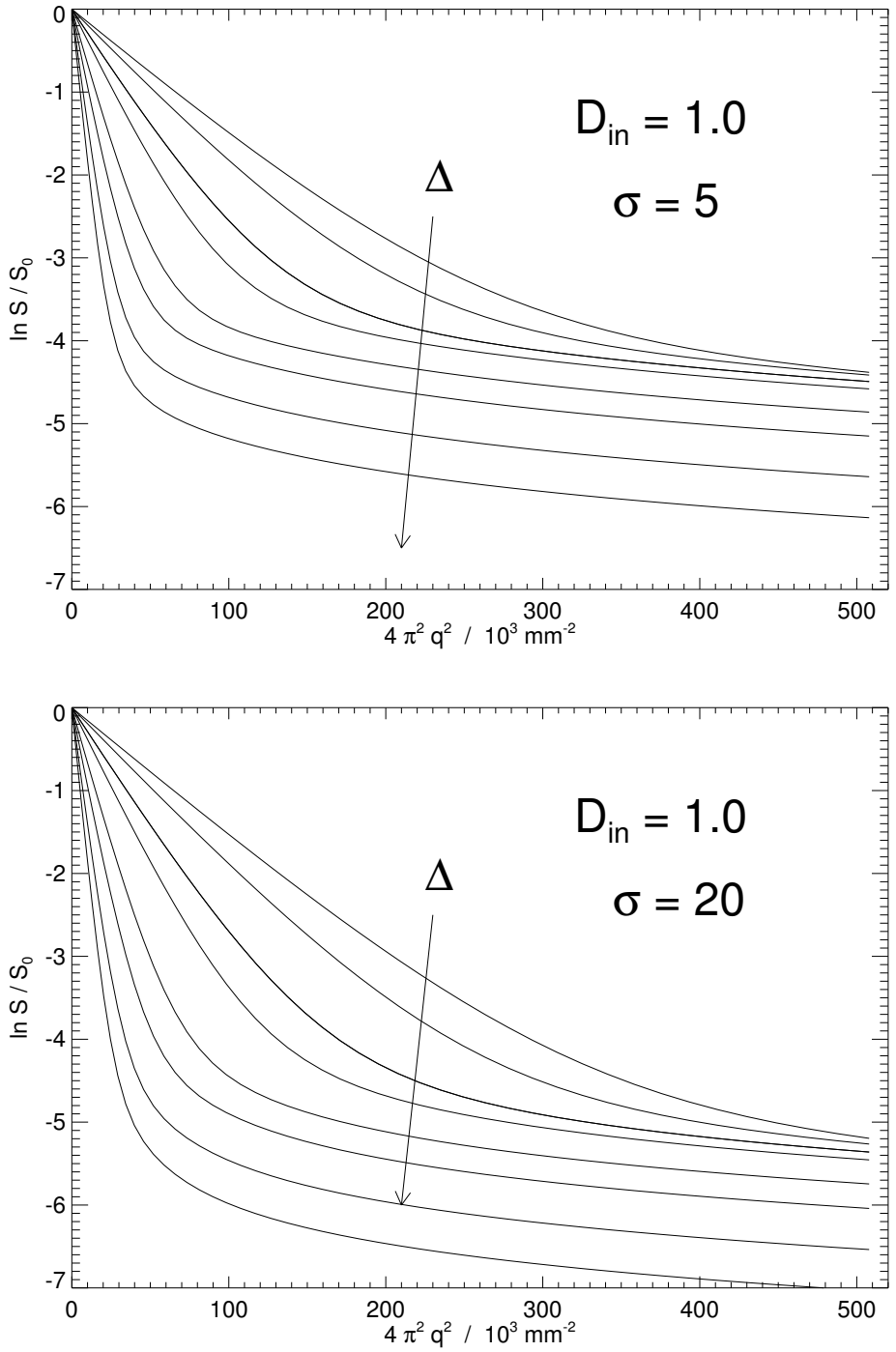


Abbildung 2.18: Modellrechnung mit normalverteilten Kastenradien um $\bar{a} = 5$, $\sigma_a = 5$ **(oben)** und $\sigma_a = 20$ **(unten)** (Parameter wie in Abb. 2.13).

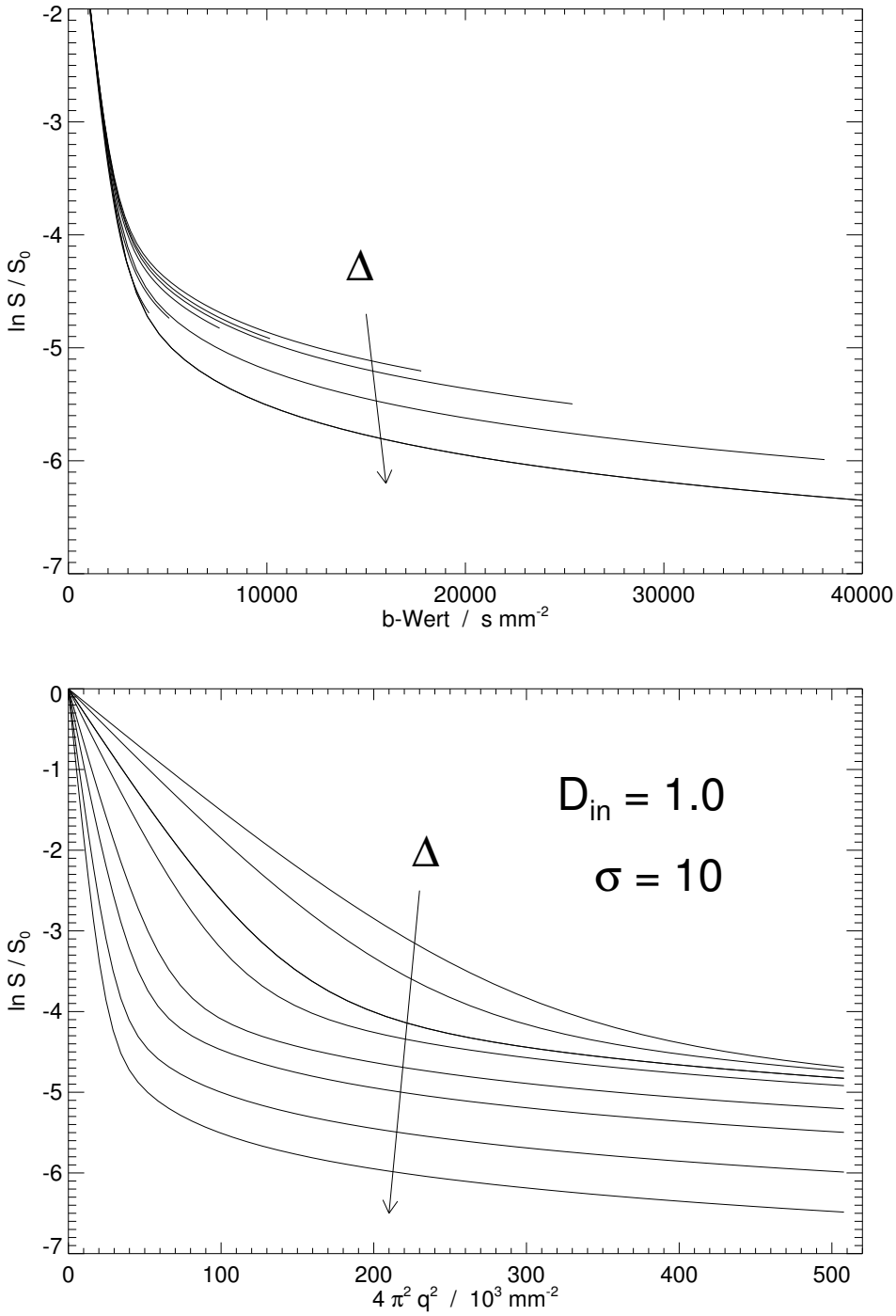


Abbildung 2.19: Normalverteilte Kastenradien a_i mit $\sigma_a = 10$, $D_2 = 1.0$ (Parameter wie in Abb. 2.13, $\Delta = (8, 10, 15, 20, 35, 50, 70, 100)$).

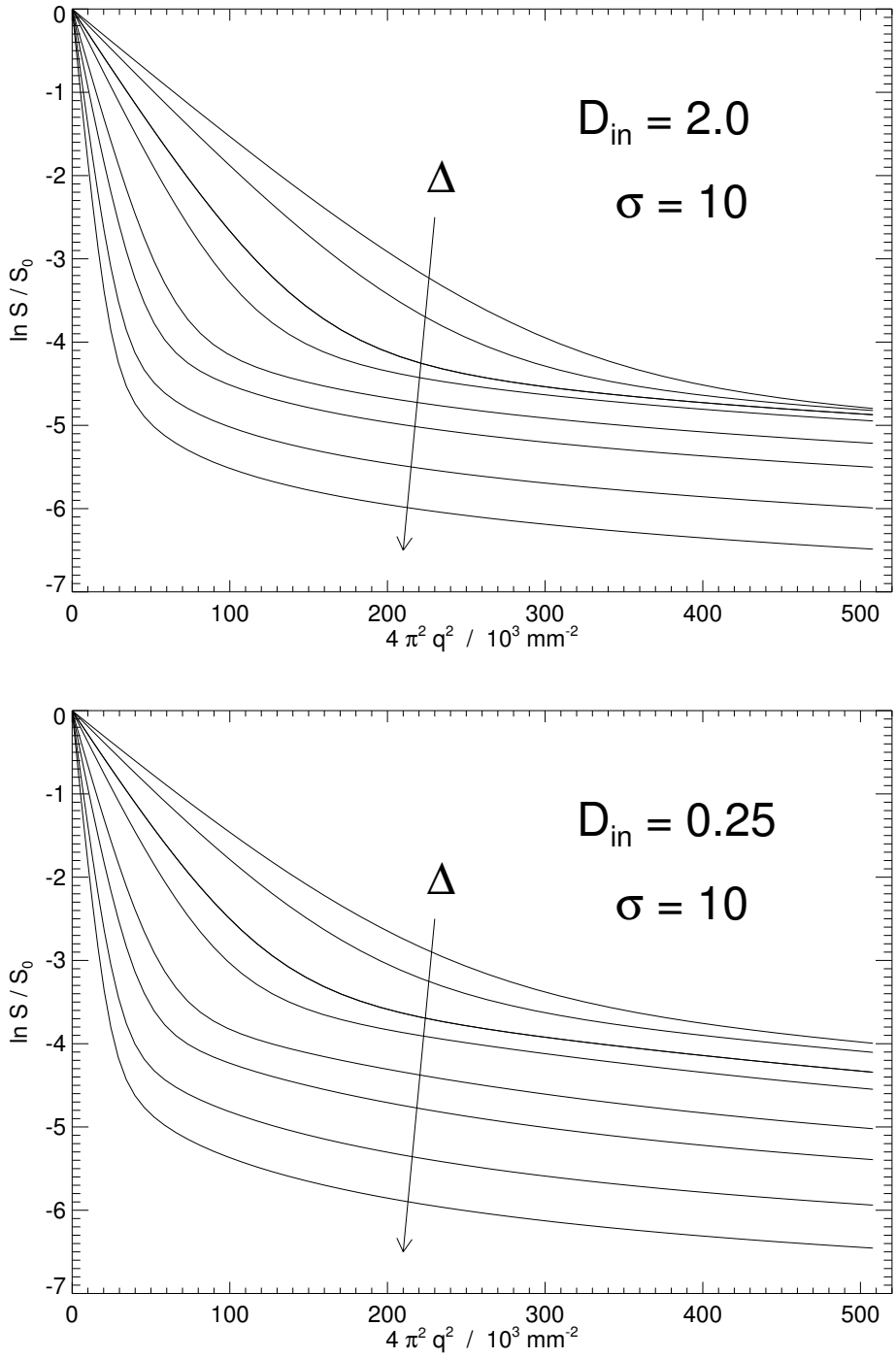


Abbildung 2.20: Wie Abb. 2.19 mit $D_2 = 2.0$ **(oben)** und $D_2 = 0.25$ **(unten)**.

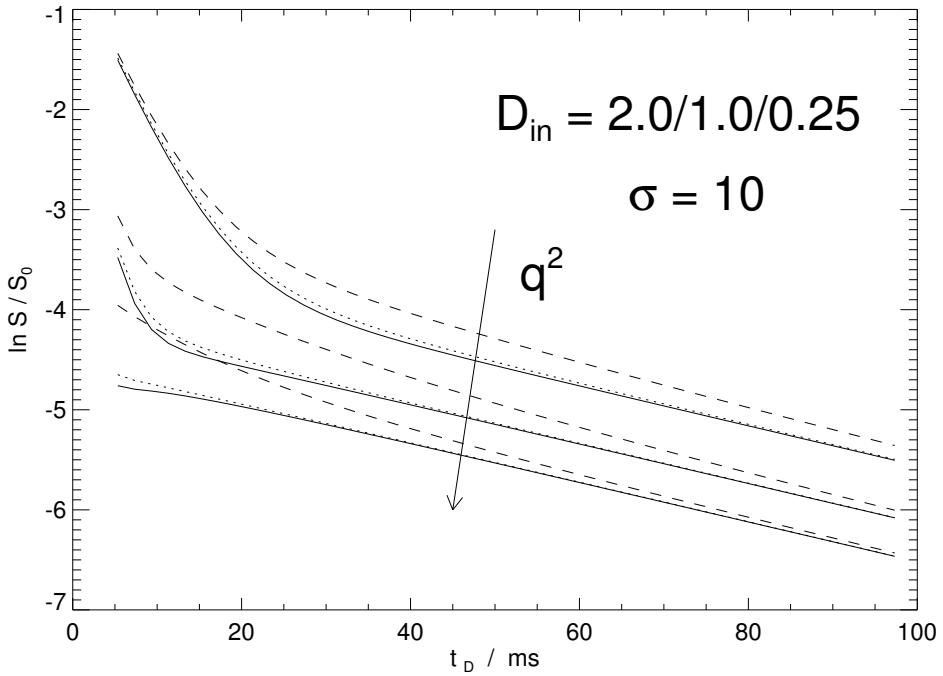


Abbildung 2.21: Zweikompartimentmodell wie in Abb. 2.19 in der *cg*-Auftragung gegen die Diffusionszeit. Der Wert für $\tilde{q}^2$ beträgt $(98/249/488) \cdot 10^3$ mm^{-2} jeweils bei den intrazellulären Diffusionskonstanten $D_2 = [2.0(—)/1.0(\cdots)/0.25(- - -)]$.

τ_{intra}		$\tilde{q}^2$ 98	249	488
	2.0	49.6	50.7	50.9
D_2	1.0	48.0	50.1	50.6
	0.25	43.7	43.4	46.4

Tabelle 2.4: Bestimmung der Austauschzeiten τ_{intra} aus der Steigung des *cg*-Experiments von Abb. 2.21 (lineare Regression im Bereich $t_D = [39 \ldots 97]$).

Bestimmung der Austauschzeit

Nach Glg. 2.24 läßt sich aus der Auftragung der Daten als *cg*-Experiment *vs.* Diffusionszeit (s. Abb. 2.21) die Austauschzeit τ_{intra} bestimmen. Bei den verschiedenen Diffusionskonstanten D_2 und q-Werten ergibt sich τ_{intra} mit linearer Regression im Bereich $t_D = [39 \ldots 97]$ (s. Tab. 2.4).

Die Werte für die ermittelten Austauschzeiten τ_{intra} (Standardabweichung $\sigma_\tau = \pm 0.1$) liegen bei $D_2 = 2.0/1.0$ nahe dem eingesetzten Wert von $\tau_2 = 50$, weichen für kleine intrazelluläre Diffusionskonstanten $D_2 = 0.25$ insbesondere für kleine $\tilde{q}^2$ erheblich davon ab. Der Grund dafür liegt wieder darin, daß die intrazellulären Beschränkungen noch nicht vollständig erreicht sind.

Bestimmung der scheinbaren Verschiebung und der scheinbaren Diffusionskonstante

Die Auswertung der Daten nach Glg. 2.26 mit Verteilung der Kastenlängen a_i liefert für die scheinbare Verschiebung r_{app} und die scheinbare Diffusionskonstante D_{app} ähnliche Ergebnisse wie bei den Daten ohne Verteilung (s. Abb. 2.17) in Bezug auf den Übergang (freie $\rightarrow$ beschränkte Diffusion) von kleinen zu großen $\tilde{q}^2$-Werten (Daten nicht gezeigt).

Das Verhalten bei mittleren bis großen $\tilde{q}^2$-Werten ist dagegen verschieden und von der Verteilung der Kastenlängen a_i bestimmt (siehe Abb. 2.22, 2.23). Während die Werte für r_{app} und D_{app} ohne eine Verteilung der a_i bei großen $\tilde{q}^2$ nahezu zusammenfallen, zeigen sie mit einer Kastenlängenverteilung unterschiedliche Asymptoten abhängig von $\tilde{q}^2$. Dies ist auf die kontinuierliche Änderung der Steigung der ct-Kurven in der Auftragung *vs.* $\tilde{q}^2$ zurückzuführen.

Die asymptotischen Werte der mittleren Verschiebung liegen unabhängig von der intrazellulären Diffusionskonstante im Bereich $r_{\text{app}} = [3 \ldots 5]$. Dies bedeutet, daß durch die Größe des q-Wertes und damit der Gradientenstärke der Anteil in der Diffusionsabschwächung selektiert wird, welcher durch beschränkte Diffusion an Grenzen kleineren bzw. größeren Abstandes bestimmt ist. Zum Beispiel wird bei hohen Gradienten ($\tilde{q}^2 = 402$) Diffusionssignal von Beschränkungen des Abstands $r_{\text{app}} = 3$ μm erhalten (s. Abb. 2.22 oben). Die entsprechenden scheinbaren Diffusionskonstanten haben nur in dem Sinne anschauliche Bedeutung, daß der Signalabfall mit höheren b-Werten nur noch so langsam zu beobachten ist, als ob das System scheinbar derartig kleine Diffusionskonstanten hätte – der tatsächliche Grund für den langsamen Signalabfall liegt jedoch in den morphologischen Beschränkungen.

Um einen späteren Vergleich mit dem Experiment zu haben, sind die scheinbaren Diffusionskonstanten D_{app} bei der Diffusionszeit $\sqrt{t_D} = 3.5$ ausgewertet und in Tab. 2.5 dargestellt.

$D_{\text{app}}(t_D = 12.25)$		$\tilde{q}^2$ 148	249	402
D_2	2.0	1.20	0.33	0.13
	1.0	1.13	0.35	0.15
	0.25	0.86	0.26	0.16
Experiment		1.12	0.62	0.47

Tabelle 2.5: Bestimmung der scheinbaren Diffusionskonstanten D_{app} bei der Diffusionszeit $t_D = 12.25$ aus Abb. 2.22, 2.23 und 3.11.

Im Vergleich zum Modell ohne Verteilung zeigen die Daten eine viel stärkere Streuung bei verschiedenen D_2 und sind stark von $\tilde{q}^2$ abhängig.

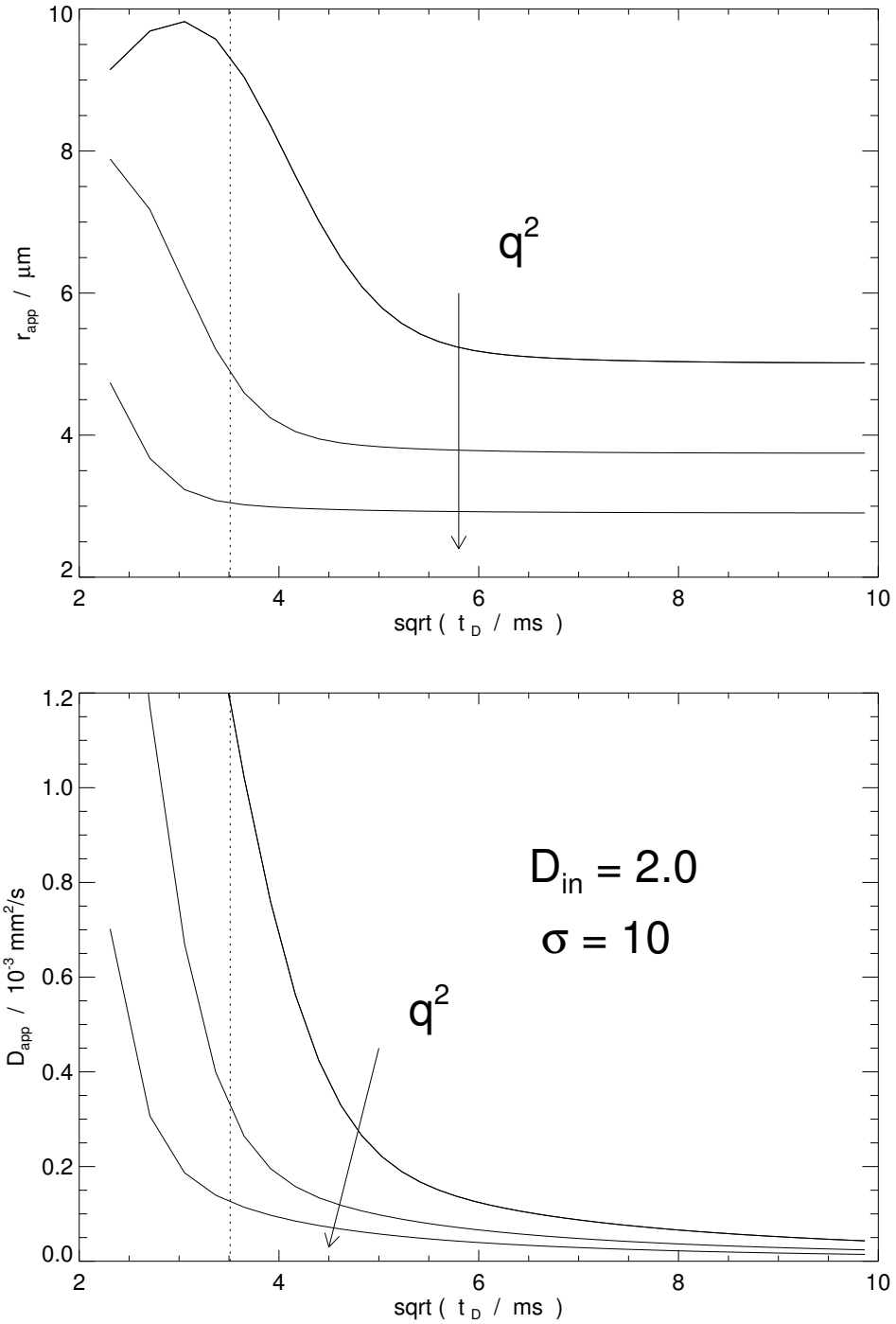


Abbildung 2.22: Zweikompartimentmodell mit $D_2 = 2.0$ wie in Abb. 2.19. Auswertung der gerechneten Daten nach Glg. 2.26 zur Bestimmung der mittleren Verschiebung r_{app} sowie der (scheinbaren) Diffusionskonstante D_{app} bei $\tilde{q}^2 = (148, 249, 402) \cdot 10^3\ \text{mm}^{-2}$.

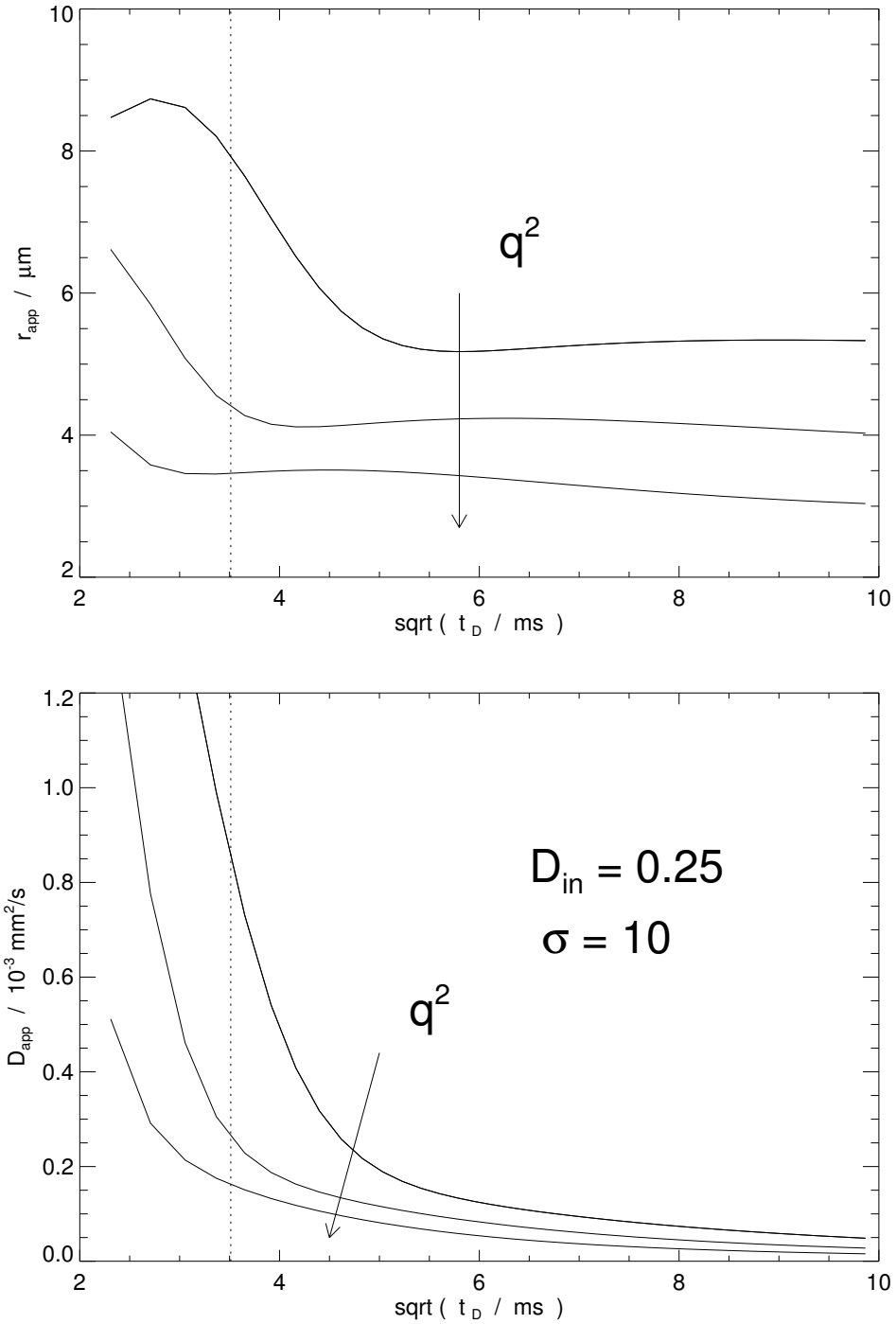


Abbildung 2.23: Modelldaten wie in in Abb. 2.22 mit der intrazellulären Diffusionskonstante $D_2 = 0.25$.

2.3.6 Zweikomponentenmodell mit Variation des intrazellulären Volumens und der intrazellulären Austauschzeit

Nachdem in das modifizierte Tanner/Kärger-Modell die Verteilung der Kastenlängen einbezogen ist (Glg. 2.27), liegt ein analytisches Modell vor, mit dem die Diffusionsabschwächung in Zellkulturen simuliert werden kann.

Im Folgenden wird nun eine Kurvenschar für eine Zellschwellung und eine Permeabilitätsänderung dargestellt. Die experimentellen Parameter mit $\delta = 10$ und $G_{\max} = 333$ entsprechen einem typischen *ct*-Experiment.

In Abb. 2.24 (oben) ist der relative intrazelluläre Volumenanteil von $p_2 = [0.05 \ldots 0.10]$ bei konstanter Austauschzeit variiert, was einer Schwellung um 100 % entspricht. Bei kleinen b-Werten fallen die Kurven zusammen (freie Diffusion im Extrazellulärraum), bei hohen b-Werten ändert sich mit dem intrazellulären Volumen der Achsenabschnitt der zweiten Komponente (beschränkte Diffusion im Intrazellulärraum), während die Steigung und Krümmung der Kurve erhalten bleibt. Für b-Werte > 4000 s/mm^2 stimmt die relative Änderung des Signals S exakt mit der eingestellten Änderung von p_2 überein. Für kleine b-Werte weicht jedoch die relative Änderung stark davon ab, da der Anteil der extrazellulären Komponente am Signal zunimmt.

In Abb. 2.24 (unten) ist die intrazelluläre Austauschzeit von $\tau_2 = [30 \ldots 70]$ bei konstantem Volumenverhältnis variiert, was eine Änderung der Permeabilität der Zellmembran simuliert. Dabei zeigt sich eine ähnliche Änderung der zweiten, intrazellulären Komponente wie bei einer Variation des intrazellulären Volumens. Mit steigender Austauschzeit, d. h. fallender Membranpermeabilität, steigt das Signal der Diffusionsabschwächung bei hohen b-Werten. Wenn zum Beispiel das Signal bei $\tau_2 = 50$ als Bezugspunkt gewählt wird ($S_{\text{rel}}(\tau_2 = 50) = 100$ %), ändert sich S_{rel} bei $b = 25000$ s/mm^2 gemäß

τ_2 / ms	30	50	70
S_{rel}	64 %	100 %	121 %

Aus diesen Simulationen kann man folgern, daß eine Zu- bzw. Abnahme der Signalintensität bei hoher Diffusionswichtung durch eine Zu- bzw. Abnahme des intrazellulären Volumens und/oder der intrazellulären Austauschzeit hervorgerufen wird. Wenn man aus physiologischen Gründen Membranpermeabilitätsänderungen ausschließen kann, ist das NMR-Signal bei hohen b-Werten direkt proportional zum intrazellulären Volumen — kann also verwendet werden, um relative Zellvolumenänderungen zu messen. Eine direkte Aussage über den absoluten, intrazellulären Volumenanteil kann *nicht* getroffen werden und ist nur mit passender Modellierung der Zellmorphologie unter Kenntnis der Austauschzeit möglich.

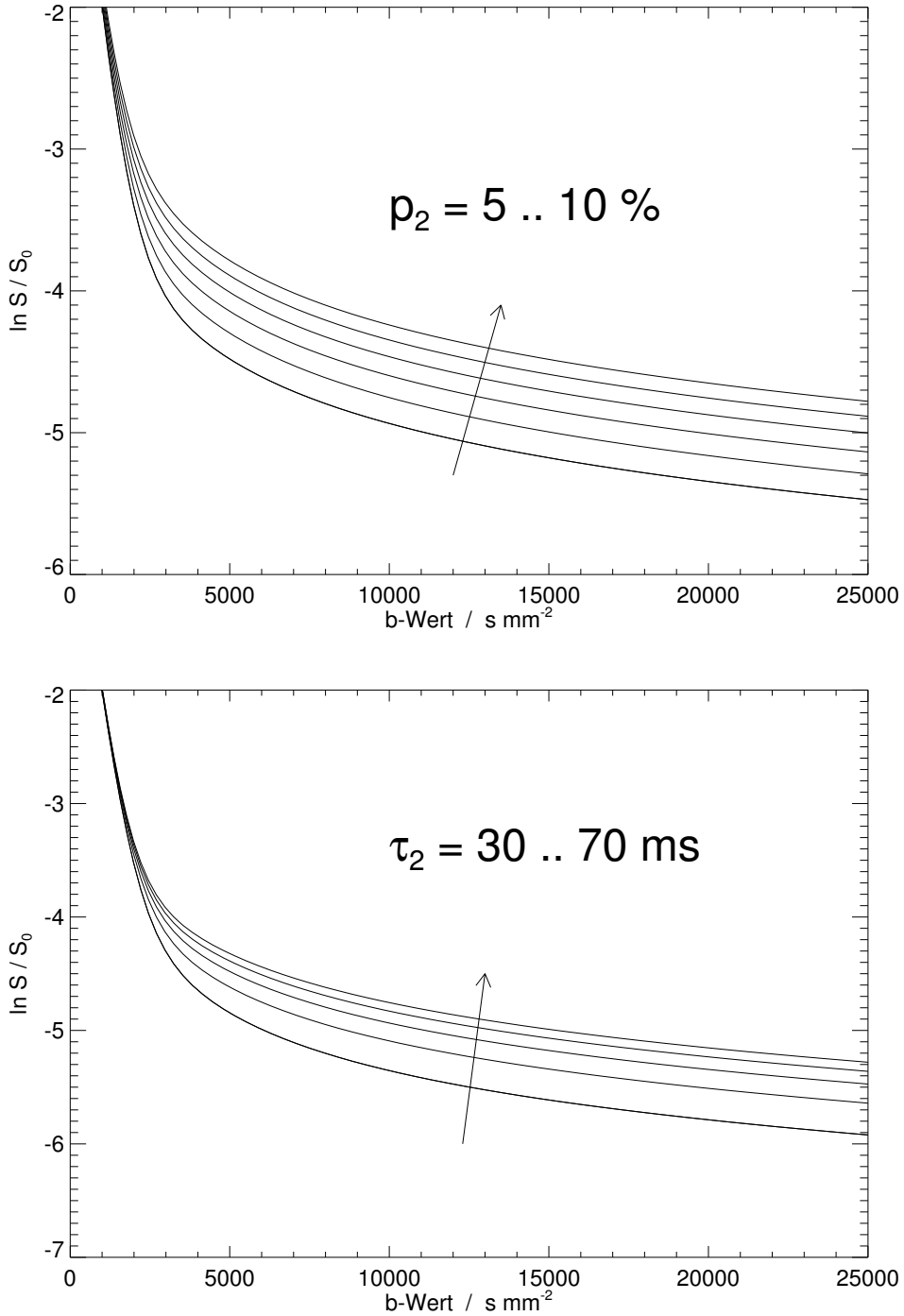


Abbildung 2.24: Modellsimulation eines ct-Experiments mit einer Zellschwellung von $p_2 = (0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10)$, $\tau_2 = 50$ **(oben)** und einer Änderung der Austauschzeit von $\tau_2 = (30, 40, 50, 60, 70)$, $p_{1,2} = 0.95/0.05$ **(unten)**. Parameter: $D_{1,2} = 2.0/1.0$, $\bar{a} = 5$, $\sigma_a = 10$, $\delta = 10$, $G_{\max} = 333$.

2.3.7 Diffusionsmodell für ischämisches Gewebe

Zum Vergleich mit den experimentellen Daten von neugeborenen, ausgewachsenen und toten Ratten (Abb. 1.1) wird im Folgenden die Diffusionsabschwächung in Gewebe modelliert. Die während der Ischämie in Gehirngewebe auftretende Zellschwellung [48] wird durch eine Änderung des intrazellulären Volumens simuliert.

Im Extrazellulärraum des Gewebes ist die Diffusion nicht mehr frei und kann durch behinderte Diffusion beschrieben werden. Der Diffusionspropagator ist noch gaußförmig, die mittlere Verschiebung bzw. die Diffusionskonstante jedoch um den Tortuositätsfaktor λ^2 scheinbar erniedrigt. Die intrazelluläre Diffusion ist durch die Zellmembran beschränkt und wird durch beschränkte Diffusion an permeablen Grenzen modelliert. Die theoretische Beschreibung erfolgt wieder mit dem modifizierten Tanner/Kärgermodell mit Verteilung der Kastenlängen (siehe Glg. 2.27), wobei die physiologischen Parameter an die Situation in Gewebe angepaßt werden müssen.

Die Austauschzeit wird gemäß der Messung am Rattenhirn in Abschnitt 3.6 im Vergleich zur Situation bei Zellkulturen von $\tau_2 = 50$ auf $\tau_2 = 25$ reduziert. Die intrazelluläre Diffusionskonstante $D_2 = 1.0$, sowie die Kastenlänge $\bar{a} = 5$ mit Verteilungsbreite $\sigma_a = 10$ bleiben unverändert. Die Veränderung im relativen Volumenverhältnis des Gewebes während der Ischämie wird durch das intrazelluläre Volumen $p_2 = [70 \ldots 95]$ % erfaßt. Für die extrazelluläre Diffusionskonstante gilt $D_1 = D_{\text{frei}}/\lambda^2$ mit der Selbstdiffusionskonstante $D_{\text{frei},310K} = 3.0$.

In Rechnersimulationen an digitalisierten Gehirnschnitten wurde gezeigt, daß der Tortuositätsfaktor λ direkt mit dem extrazellulären Volumenanteil $\alpha = 1 - p_2$ korreliert ist

$$\lambda = \alpha^{-l} \qquad l \ldots \text{Tortuositätsexponent} \tag{2.28}$$

und auf ein empirisches Gesetz von Archie zurückgeführt werden kann, welches die Ausbreitung von Wasser in porösen Medien beschreibt [24]. Der für die zweidimensionalen Gehirnschnitte gefundene Tortuositätsexponent beträgt $l = 0.41$. Anschaulich bedeutet dies, daß mit Verkleinerung des Extrazellulärraums längere Diffusionswege um die Zelle herum zurückgelegt werden müssen, um die gleiche mittlere Verschiebung zu erzielen. In einem zwei- bzw. dreidimensionalen Modell müßte sich auf Grund der Geometrie der Tortuositätsexponent unterscheiden.

Experimentell wurden in [49] die Änderungen des Tortuositätsfaktors λ und des extrazellulären Volumenanteils α bei neugeborenen Ratten während cerebraler Ischämie mittels Iontophorese bestimmt und mit Änderungen des ADC korreliert. Dabei ergaben sich unterschiedliche Werte für Messungen in grauem und weißem Hirngewebe. Der Tortuositätsexponent $l = -\ln\lambda/\ln\alpha$ ändert sich vom gesunden zum ischämischen Zustand der Ratten in grauem Hirngewebe von $l = [0.31 \ldots 0.25]$, in weißem Hirngewebe von $l = [0.46 \ldots 0.23]$.

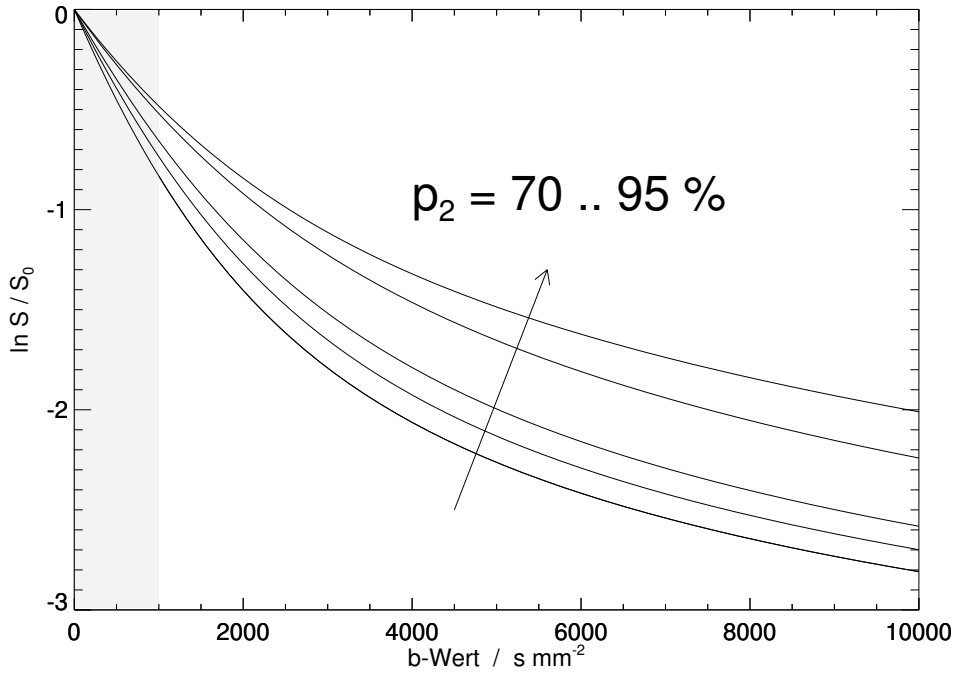


Abbildung 2.25: Modellsimulation der Diffusionsabschwächung in Gehirngewebe während ischämischer Zellschwellung mit $p_2 = (0.70, 0.75, 0.80, 0.90, 0.95)$ und $\lambda = (1.4, 1.5, 1.6, 2.0, 2.3)$. Parameter: $D_{0,2} = 3.0/1.0$, $\tau_2 = 25$, $\bar{a} = 5$, $\sigma_a = 10$, $\delta = 15$, $G_{\max} = 200$.

Für die Modellierung in Abb. 2.25 werden mit den Änderungen im intrazellulären Volumen p_2 folgende Werte für den Tortuositätsfaktor λ verwendet:

p_2 / %	70	75	80	90	95
λ	1.4	1.5	1.6	2.0	2.3
$D_{\text{frei}}/\lambda^2$	1.53	1.33	1.17	0.75	0.56

Tabelle 2.6: Tortuositätsfaktor λ, der bei entsprechendem intrazellulären Volumen p_2 in der Modellrechnung in Abb. 2.25 verwendet wird und Diffusionskonstante der behinderten Diffusion im Extrazellulärraum.

Dies entspricht einem mittleren Tortuositätsexponenten $l \approx 0.29$. In Tab. 2.6 ist ebenfalls die scheinbare Diffusionskonstante der behinderten Diffusion im Extrazellulärraum aus dem Tortuositätsfaktor berechnet.

In Abb. 2.25 ist das Ergebnis der Modellrechnung gezeigt. Wie bei den simulierten Kurven für Zellen tritt bei hohen b-Werten eine zweite Komponente mit einer erheblich kleineren, scheinbaren Diffusionskonstante auf. Mit Zunahme des intrazellulären Volumens bleibt die Steigung der zweiten Komponente nahezu gleich, das Signal bei hohen b-Werten nimmt zu.

Mit linearer Regression kann man den ADC bei kleinen b-Werten im Bereich $b = [0 \ldots 1000]$ s/mm^2 bestimmen: er fällt mit steigendem intrazellulären Volumen von ADC = 0.84 auf 0.49. Das Experiment (siehe Abb. 1.1, [6]) mit den Werten ADC = 0.85/0.70/0.37 (neugeborene/erwachsene/tote Ratte) zeigt ähnliche Ergebnisse. Bei hohen b-Werten weichen die Kurven der Modellrechnung jedoch von den experimentell gemessenen Diffusionsabschwächungen ab.

Der Grund dafür dürfte die mangelnde Einbeziehung der komplexen Morphologie des Gehirngewebes sein. Experimentell [49] wurden einerseits unterschiedliche Werte für die Tortuosität und den ADC in grauem und weißem Gehirngewebe von gesunden Ratten festgestellt, andererseits wurden nach ischämischer Gewebeschwellung ähnliche Werte bei neugeborenen und ausgewachsenen Ratten, wie auch in grauem und weißem Gehirngewebe gemessen.

Um den Einfluß der intrazellulären Diffusionskonstante auf den ADC im Modell zu prüfen, sind in Tab. 2.7 die Werte für den ADC in Abhängigkeit von dem intrazellulären Volumenanteil p_2 und der intrazellulären Diffusionskonstante D_2 berechnet.

ADC		p_2 / %				
		70	75	80	90	95
D_2	2.0	0.94	0.84	0.76	0.63	0.59
	1.0	0.84	0.74	0.66	0.53	0.49
	0.25	0.63	0.53	0.44	0.29	0.25
Experiment		0.85		0.70	0.37	

Tabelle 2.7: Modellrechnung für die scheinbare Diffusionskonstante bei kleinen b-Werten (ADC) in Abhängigkeit von dem intrazellulären Volumenanteil p_2 und der intrazellulären Diffusionskonstante D_2 im Vergleich mit den experimentellen Daten [6].

Mit einem Wert $D_2 = 1.0$ scheint die Modellrechnung am besten mit den experimentell gefundenen Werten für den ADC übereinzustimmen, die entsprechenden Werte für $D_2 = 0.25$ sind fast um einen Faktor zwei zu klein.

2.3.8 Zusammenfassung

Mit einem analytischen Modell wurde in diesem Kapitel versucht, die Diffusionsabschwächung eines NMR-Experiments für Zellsysteme zu erklären. Für den intrazellulären Anteil des diffusionsgewichteten Signals erwies sich die Diffusion 'beschränkt an permeablen Grenzen'. Diese neue Begriffsbildung erweiterte die 'total beschränkte' intrazelluläre Diffusion um die Eigenschaft des Austauschs mit dem Extrazellulärraum. Die Beschreibung erfolgte durch eine Kombination der Formel für beschränkte Diffusion nach Tanner mit der Formel für Austausch in einem Zweikomponentensystem nach Kärger. In der erweiterten Form wurden Verteilungen der Kastenlängen miteinbezogen, wodurch eine größere Übereinstimmung mit den Experimenten erreicht werden kann.

Die physiologischen Parameter eines Zellsystems wurden durch den intrazellulären Volumenanteil, durch die intra- und extrazellulären Diffusionskonstanten, durch die intrazelluläre Austauschzeit und durch eine Verteilung der Kastenlängen charakterisiert.

Methodisch wurde gezeigt, daß mit einer systematischen Darstellung eines zweidimensionalen Datensatzes freie und beschränkte Diffusion in der Auftragung gegen den b-Wert und den q-Wert unterschieden und Parameter wie Austauschzeit, scheinbare Verschiebung und scheinbare Diffusionskonstante ermittelt werden können. Dies ist im Hinblick auf die Auswertung der experimentellen Daten von entscheidender Bedeutung.

Für Experimente an Zellkulturen wurden Modellrechnungen mit Variation des intrazellulären Volumens und der intrazellulären Austauschzeit durchgeführt. Danach wird durch hohe Diffusionswichtung ausschließlich intrazelluläres Signal selektiert, welches sich sowohl mit dem Volumen als auch der Austauschzeit ändert. Dies begründet eine nichtinvasive Methode zur Messung von Änderungen des intrazellulären Volumens mit Diffusionsgradienten.

Mit dem analytischen Modell wurde auch versucht, die Diffusionsabschwächung in Gewebe für eine ischämische Zellschwellung zu quantifizieren. Wie bei den Modellrechnungen für Zellen tritt bei hohen b-Werten eine zweite Komponente mit kleinerer scheinbarer Diffusionskonstante auf. Bei Zellschwellung steigt das intrazelluläre Signal bei hohen b-Werten, wodurch der ADC zusätzlich abgesenkt wird. Die ADC-Erniedrigung in Gehirngewebe wird somit gleichermaßen durch Änderungen des Diffusionsverhaltens im Extra- wie Intrazellulärraum hervorgerufen.

Kapitel 3

Diffusionsgewichtete ^{1}H-NMR-Messungen an Zellkulturen und Ratten

3.1 Einleitung

Nach der theoretischen Modellierung der beschränkten Diffusion in zellulären Systemen mit Austausch werden in diesem Kapitel diffusionsgewichtete ^{1}H-NMR-Experimente an klonalen Zellkulturen und an der Ratte *in vivo* gezeigt. Im Vergleich der Modellsimulation mit den Messungen werden charakteristische Parameter der intrazellulären Diffusion in perfundierten Gliomzellen extrahiert und versucht, ähnliche Experimente an der Ratte durchzuführen. Als Experiment zur Untersuchung der Grundlagen des Diffusionskontrastes in Gehirngewebe läßt sich aus den gewonnenen physiologischen Parametern ein geschlossenes Modell der ADC-Änderungen im Gehirn während Ischämie entwickeln.

Die Diffusionsmessungen an den Gliomzellkulturen bei kleinst- bis größtmöglichen Diffusionszeiten dienen als experimentelle Grundlage für das analytische Modell. Für die intrazelluläre Komponente der Diffusionsabschwächung ist mit steigender Diffusionszeit der verstärkte Einfluß der Beschränkung durch die Zellmembran wie auch der Austausch von intra- und extrazellulärem Wasser über dieselbe zu sehen.

Durch hohe Gradientenstärken wird auf Grund der (scheinbar) erniedrigten Diffusionskonstante ausschließlich intrazelluläres Wasser selektiert. Dies wird methodisch dazu verwendet, um in Anwendungen Änderungen des intrazellulären Volumens und Änderungen der intrazellulären Austauschzeit unter verschiedensten physiologischen Bedingungen mit hoher zeitlicher Auflösung darzustellen. Die folgende Bestimmung der intrazellulären Austauschzeit mit diffusionsgewichteter Bildgebung am Rattenhirn liefert einen wichtigen Parameter für die Modellierung der Diffusionsabschwächung während einer Ischämie in Gehirngewebe.

Im Folgenden werden, beispielhaft für die umfangreiche Literatur, wichtige experimentelle Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die richtungsweisend für die vorliegende Arbeit waren, zusammengefaßt.

J. E. Tanner und E. O. Stejskal haben Mitte der sechziger Jahre sowohl theoretisch als auch experimentell die Grundlagen der Diffusionsmessung mit gepulsten Magnetfeldgradienten gelegt und beschränkte Diffusion an Glimmerschichten, Hefe, Äpfeln, Tabak und Ölemulsionen untersucht [1, 12].

Andrasko [47, 50, 51] bestimmte mit Diffusionsgradienten die Austauschzeit von Erythrocyten und konnte mit einem Hg-Reagenz dieselbe stark erhöhen. Wie erst seit wenigen Jahren bekannt ist, werden dadurch Wasserkanäle in der Zellmembran und damit der Austausch von Wasser blockiert.

Stout *et al.* [52, 53] wendeten die Technik auf *Chlorella* Zellmembranen und *Eleodea* Pflanzenzellen an, Tanner noch einmal 1983 auf Hefezellen [46] und ermittelten Austauschzeiten und Permeabilitäten.

Die andere NMR-Methode zur Bestimmung der Austauschzeit basiert auf der Markierung des Extrazellulärraums mit Mn^{2+}-Ionen und Trennung der Signalkomponenten auf Grund unterschiedlicher Relaxationszeiten (Colon und Outhred [54, 55]). Damit wurde die Membranpermeabilität von Erythrocyten umfangreich untersucht [56–58], angetrieben durch die langjährige Suche nach Membranproteinen, die selektiv für Wasser durchlässig sind [59]. Ein Vergleich vieler Literaturwerte für Austauschzeiten, gemessen mit NMR und THO (radioaktive ^{3}H-Markierung), lieferten Herbst *et al.* [60, 61].

Der Nachweis von Aquaporinen in Zellen des Gehirngewebes [62–65] stützte die Vermutung, daß bei den pathophysiologischen Vorgängen während der Ischämie im Gehirn auch eine Änderung der Membranpermeabilität für Wasser beteiligt sein könne [29]. Überblicke über die Literatur der Aquaporine sind in [66–74] dargestellt.

Neben der Untersuchung der Austauschzeit von zellulären Systemen ist die Aufklärung der tatsächlichen Größe der intrazellulären Diffusionskonstante sowie der Einfluß von Beschränkungen auf dieselbe von großer Bedeutung für das Verständnis der Diffusionsabschwächung in Gehirngewebe und in Zellkulturen.

Während mit NMR-Methoden eine Erniedrigung der intrazellulären Diffusionskonstante um den Faktor zehn und mehr im Verhältnis zum Wert für freie Diffusion festzustellen ist, wurde mit quasielastischer Neutronenstreuung nur eine Erniedrigung um Faktor drei gemessen [75, 76]. Dies wird durch beschränkte Diffusion innerhalb der Zelle erklärt, wodurch die Diffusionskonstante bei NMR-Messungen *scheinbar* erniedrigt wird.

In Untersuchungen an Zellkulturen stellten einige Arbeitsgruppen multiexponentielle Diffusionsabschwächungen fest [5, 77–80]. Mit Messungen in Abhängigkeit von der Diffusionszeit wurde dabei versucht, den Einfluß der beschränkten Diffusion und von Oberflächenrelaxationseffekten [43, 81] aufzuzeigen.

3.2 Experimentelle Bedingungen

3.2.1 Präparation der Zellkulturen

Es wurden drei verschiedene Zellkulturen verwendet, die U. Flögel, N. Serkova und J. Henke aus unserer Arbeitsgruppe präparierten: F98 Gliomzellen (Tumorzellen der Ratte), primäre Astrocyten (von neugeborenen Ratten) und KB-Zellen (humane, epitheloide Carcinomazellen). Die Präparation, verwendete Materialien sowie die Perfusionsapparatur ist schon an anderer Stelle ausführlich beschrieben [82–84].

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in DMEM ('Dulbecco's modified Eagle's medium') bei $T = 310$ K unter Begasung mit einem Gemisch aus 90 % Luft und 10 % CO_2. Für die NMR-Experimente werden die Zellen in BMG-Fäden (Basalmembrangel) eingebettet, unter sterilen Bedingungen in ein 8 mm-NMR-Röhrchen mit Perfusionseinsatz eingebracht und bei 310 K mit dem Kulturmedium perfundiert (begast mit 95/5 % O_2/CO_2).

Die wesentlichen Elemente der Perfusionsanlage bestehen aus einer peristaltischen Pumpe, dem Probenröhrchen mit Perfusionseinsatz und dem Vorratsgefäß mit Medium. Die Temperierung des Mediums erfolgt durch ein Wasserbad, die des NMR-Röhrchens mit den Zellen über die Temperiereinheit des Spektrometers. Die Zuführungsschläuche bestehen aus gasdichtem Material (Viton), um den Gasaustausch mit der Umgebung zu minimieren. Die extrazellulären Bedingungen können dann leicht durch den Austausch des Vorratsgefäßes mit dem Medium verändert werden. Bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min erfolgt die Wirkung auf die Zellen ungefähr 5 min nach Mediumwechsel.

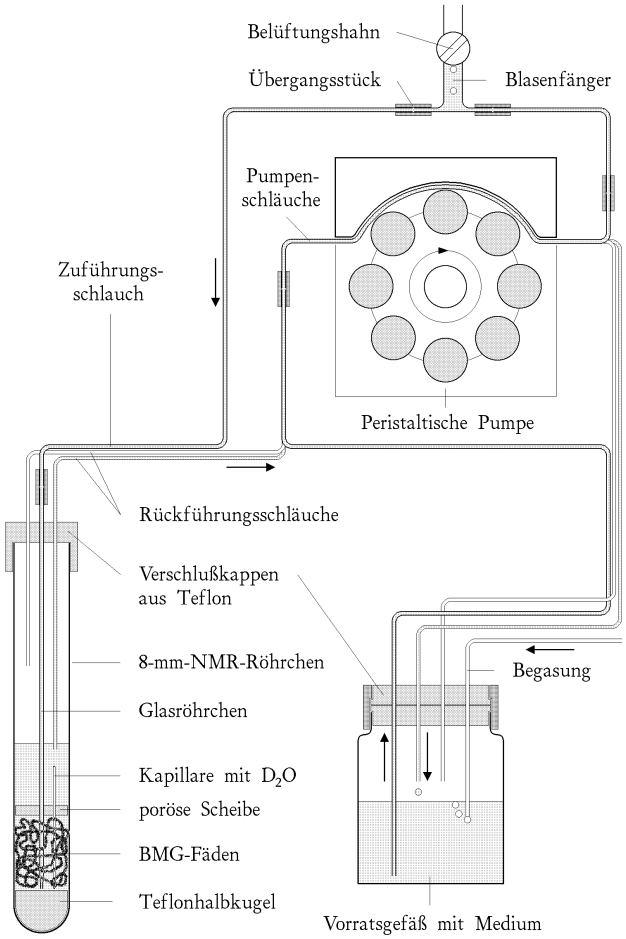


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Perfusionsanlage, aus [83].

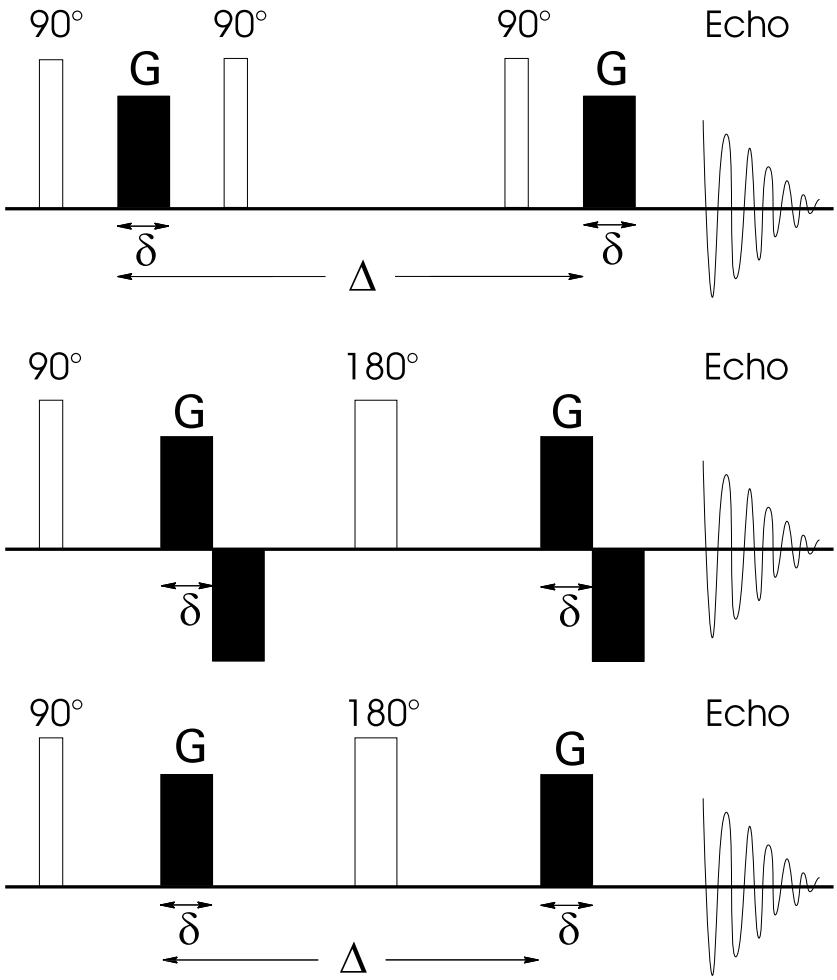


Abbildung 3.2: Pulssequenzen für diffusionsgewichtete ^{1}H-NMR-Spektren: stimuliertes Echo **(oben)** und Spinecho mit bipolaren **(Mitte)** und unipolaren **(unten)** Gradientenpulsen.

3.2.2 Spektroskopische Messungen am AMX 360

Die spektroskopischen Messungen an den perfundierten Zellkulturen wurden an einem AMX 360 (360 MHz / 8.4 T) der Fa. Bruker, Karlsruhe durchgeführt. Die maximal verfügbare Gradientenstärke in z-Richtung betrug bei dem 8 mm-Probenkopf $G_{\max} = 333$ mT/m.

Die verwendeten Pulssequenzen sind in Abb. 3.2 dargestellt: stimuliertes Echo mit drei 90°-HF-Pulsen (oben) und Spinecho (90°-180°-HF-Pulse) mit bipolaren (Mitte) und unipolaren (unten) Gradientenpulsen. Die Sequenzen ergeben ohne Gradienten ein Echosignal der Intensität S_0, welches durch Diffusionsbewegung zwischen den Gradientenpulsen gemäß Glg. 2.4 abgeschwächt wird.

Das Signal S ist von der Gradientenstärke G und der Diffusionszeit $t_D = \Delta - \delta/3$ abhängig und erlaubt, eine Serie von Diffusionswichtungen als ct-Experiment

(Gradientenabstand Δ konstant, G variiert) oder als cg-Experiment (Gradientenstärke G konstant, Δ variiert) durchzuführen (vgl. Abb. 2.15).

Mit Einstrahlung von Hochfrequenzpulsen zur Anregung der ^{1}H-Kernspins und dem Anlegen von Magnetfeld-Gradientenpulsen erhält man eine Serie von Signalen in der Empfängerspule ('free induction decays'), welche mit selbstgeschriebener Software unter IDL V4.0.1 (Research Systems, Inc.) ausgewertet werden. Nach einer Basislinienkorrektur werden die Daten in der Zeitdomäne mit der Fouriertransformation frequenzanalysiert und automatisch phasenkorrigiert. Dabei wird die Phase des komplexen ^{1}H-Signals bis zum Maximum des Realteils gedreht. Nach Korrektur der Basislinie im Frequenzraum wird das Signal mit der IDL-Funktion `INT_TABULATED()` integriert, welche mit der 5-Punkt-Newton-Cotes Integrationsformel arbeitet.

Die Darstellung der Signalabschwächung mit steigendem Gradienten oder steigender Diffusionszeit erfolgt meist logarithmiert.

3.2.3 Bildgebung am BIOSPEC 4.7 T

Die diffusionsgewichtete Bildgebung an Wistarratten wurde mit einem BIOSPEC 4.7 T (200 MHz) Horizontalsystem der Fa. Bruker, Karlsruhe durchgeführt. Mit dem abgeschirmten Gradientenrohr (200 mm Innendurchmesser) waren Magnetfeldgradienten von 150 mT/m in allen drei Raumrichtungen möglich. Die Hochfrequenzanregung erfolgte mit einer sattelförmigen Volumenspule (Philips, Hamburg, $\varnothing = 94$ mm), die Signaldetektion mit einer aktiv entkoppelten Oberflächenspule ($\varnothing = 16$ mm). Die Narkose der Tiere wurde mit einem Halothananteil von 0.8-1.5 % in einem N_2O/O_2-Gemisch (66/33 %) durchgeführt.

Zur Diffusionswichtung wird die Spinechosequenz mit unipolaren Gradientenpulsen (s. Abb. 3.2, unten) in allen drei Richtungen verwendet. Für die Bildgebung ist an der Stelle des Spinechosignals eine UFLARE-Sequenz mit Phasenzyklus gesetzt, welche ausführlich in [85–87] beschrieben ist. Wegen der hohen Diffusionsgradienten, die das Signal stark abschwächen, wird bei einer 32×32 Bildmatrix die Voxelgröße zu $1 \times 1 \times 5$ mm^3 gewählt und mit Phasenzyklus gemittelt.

Analog zu den Experimenten an den Zellkulturen werden ct-Experimente bei verschiedenen Diffusionszeiten durchgeführt. Zur Bildrekonstruktion werden die Echozüge mit verschiedener Phase einmal addiert, dann subtrahiert, woraus jeweils ein Bild durch Fouriertransformation erzeugt wird. Durch Addition der getrennt rekonstruierten Bilder wird bei dieser UFLARE-Variante ('phase cycled UFLARE') ein Signal-/Rauschgewinn von Faktor $\sqrt{2}$ gegenüber UFLARE mit einem Echo ('displaced UFLARE') erreicht. Mit einer Serie von ct-diffusionsgewichteten Bildern kann dann für jeden der 32×32 Bildpunkte eine ct-Kurve dargestellt werden.

3.3 Diffusionsmessungen an Gliomzellkulturen bei verschiedenen Diffusionszeiten

3.3.1 Kontrollmessungen

Mit den verschiedenen Pulssequenzen wurden Diffusionsmessungen an Wasser, Isopropanol und den BMG-Fäden (ohne Zellen) durchgeführt, um die Verläßlichkeit der Methoden und Materialien zu prüfen.

Messungen an Wasser und Isopropanol

Die Kontrollmessungen an den isotropen Flüssigkeiten Wasser und Isopropanol wurden als *ct*-Experimente durchgeführt, d.h. die Gradientenstärke bei gleicher Diffusionszeit variiert. Für die Messungen an Wasser wurde die Temperatur niedrig gewählt, um bei großen Gradientenstärken noch ausreichend Signalintensität zu erhalten und damit größere maximale b-Werte zu erreichen.

Alle Diffusionsabschwächungen *vs.* b-Wert zeigten sehr gute Linearität mit einem Signal/Rauschverhältnis von ca. 3000 für S_0 (eine Anregung, ohne Mittelung), d. h. bei einer Abschwächung von $1/3000 \approx \exp(-8)$ verschwindet das Signal im Rauschen. In Tab. 3.1 sind die Messungen und die mit linearer Regression erhaltenen Diffusionskonstanten dargestellt (Literaturwerte aus [88]).

	Wasser	Wasser	Isopropanol
Meßsequenz	Spinecho	stim. Echo	Spinecho
Diffusionszeit / ms	52	97	17
Temperatur / K	283	283	298
D / 10^{-3} mm^{2}s^{-1}	1.366 ± 0.002	1.345 ± 0.002	0.685 ± 0.001
$D_{\text{Lit.}}$ / 10^{-3} mm^{2}s^{-1}	1.36	1.36	0.649
max. b-Wert / smm^{-2}	5676	6165	9225
max. Abschwächung	$\exp(-7.8)$	$\exp(-8.2)$	$\exp(-6.3)$

Tabelle 3.1: Kontrollmessungen der Diffusionskonstante von Wasser und Isopropanol

Messungen an BMG-Fäden in Medium ohne Zellen

Eine wichtige Kontrollmessung für die Zellexperimente ist ein *ct*-Experiment an BMG-Fäden in Medium, in welche jedoch keine Zellen eingebettet sind[1].

[1] Bei der Verwendung von Kunststoffkügelchen ('beads') für die Zellpräparation zeigt sich eine signifikante Abweichung von der Monoexponentialität schon ohne Zellen [80]. Diese ist auf die beschränkte Diffusion in den porösen Strukturen der Kügelchen zurückzuführen.

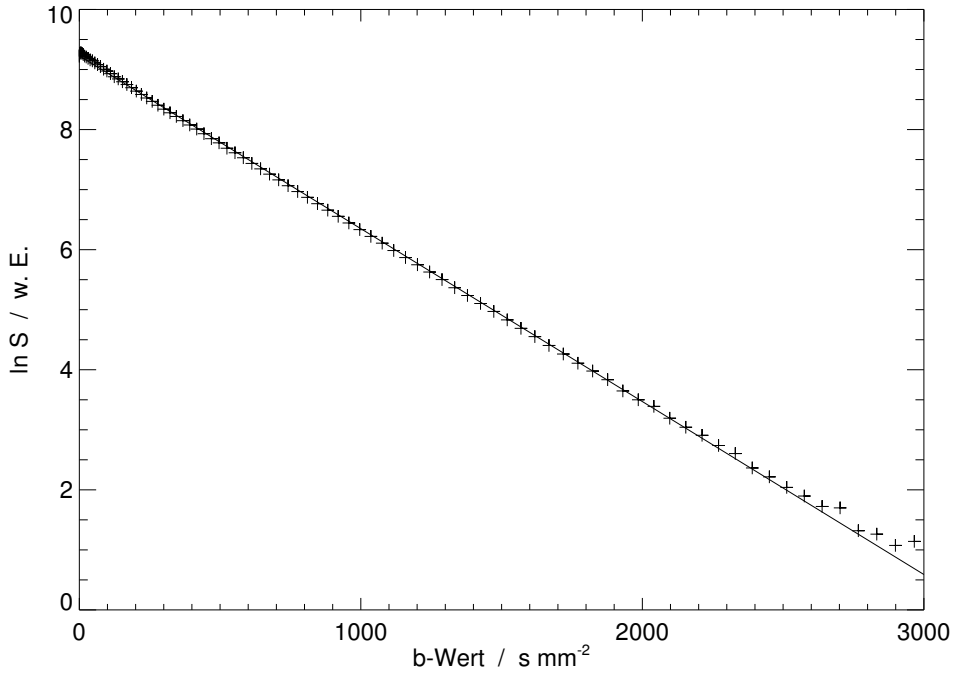


Abbildung 3.3: Wasserdiffusionsmessung (ct) an BMG-Fäden in Medium ohne Zellen. Meßparameter: $t_D = 32$ ms, $\delta = 8$ ms, $G = 100$ mT/m, $T = 310$ K.

In Abb. 3.3 ist eine Messung an Basalmembrangelfäden in dem Medium DMEM bei $T = 310$ K dargestellt.

Die Signalabschwächung zeigt gute Linearität bis $b = 2800$ s/mm^2, danach verschwindet das Signal im Rauschen. Eine lineare Regression im Bereich $b = [0 \ldots 2500]$ s/mm^2 liefert $D = (2.89 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s im Vergleich zum Literaturwert $D_{\mathrm{Lit},310K} = 3.01 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s. Dies bedeutet, daß der Einfluß der Gelfäden auf die Diffusion von Wasser vernachlässigbar ist.

Bei genauer Betrachtung kann man eine leichte Krümmung bei kleinen b-Werten erkennen. Dort ist die Diffusionskonstante größer als 2.89 und kommt dem Literaturwert näher. Vermutlich ist der Signalabfall biexponentiell mit leicht unterschiedlichen Diffusionskonstanten: die eine Komponente besteht aus dem frei diffundierenden Wasser außerhalb der Gelfäden, die andere zeigt behinderte Diffusion innerhalb der Fäden, welche die Diffusionskonstante etwas erniedrigt.

3.3.2 Kurze Diffusionszeiten – Spinechosequenz mit bipolaren Gradientenpulsen

Um an F98 Gliomzellen die Diffusionsabschwächung *vs.* b-Wert bei kurzen Diffusionszeiten zu bestimmen, wurde die Spinechosequenz mit bipolaren Gradientenpulsen benutzt und die Gradientenstärke variiert (ct-Experiment). Um den Einfluß verschiedener T_2-Zeiten auszuschalten, wird die Echozeit bei verschiedenen Diffusionszeiten konstant gehalten, indem in der Pulssequenz passende Füllzeiten eingeführt werden.

In Abb. 3.4 (oben) ist bei konstanter Echozeit die Diffusionszeit von $t_D = [5.3 \ldots 20]$ ms variiert. Die erste Komponente bei kleinen b-Werten zeigt für alle Diffusionszeiten gleichen Signalabfall und kann auf Grund der Diffusionskonstante dem freien, extrazellulären Wasser zugeordnet werden. Die zweite Komponente bei hohen b-Werten stammt von intrazellulärem Wasser (vgl. mit Abb. 3.3) und steigt mit zunehmender Diffusionszeit an.

Eine Temperaturerniedrigung von $T = 310$ K auf $T = 283$ K sollte den Literaturwert von $D_{\mathrm{Lit},310K} = 3.01$ auf über die Hälfte $D_{\mathrm{Lit},283K} = 1.36$ senken. In Abb. 3.4 (unten) ist die Erniedrigung der Steigung der ersten Komponente bei niedrigerer Temperatur zu sehen. Lineare Regression im Bereich $b = [0 \ldots 250]$ smm^{-2} liefert

$$D_{310K} = (2.87 \pm 0.06) \longrightarrow D_{283K} = (1.73 \pm 0.04)$$

Gegenüber den Literaturwerten sind die experimentell gefunden Diffusionskonstanten bei der hohen Temperatur erniedrigt und bei der tiefen Temperatur erhöht. Dies liegt daran, daß das Perfusionsmedium mit Raumtemperatur in das Spektrometer fließt und durch den temperierten Gasstrom nicht ganz aufgeheizt bzw. abgekühlt wird.

Ähnlich wie für die extrazelluläre Diffusionskonstante würde man auch für die intrazelluläre Diffusion eine starke Temperaturabhängigkeit erwarten. Die Steigungen der zweiten Komponente ändern sich mit der Temperatur jedoch kaum, nur die Signale steigen leicht an.

3.3.3 Lange Diffusionszeiten – stimulierte Echosequenz

Mit der stimulierten Echosequenz kann man die Diffusionsabschwächung bei sehr langen Diffusionszeiten messen. Bei dieser Dreipulssequenz wird die transversale Magnetisierung nach der Anregung longitudinal gespeichert. Dies ist möglich, da die longitudinale Relaxationszeit T_1 (im Sekundenbereich) erheblich länger als die transversale Relaxationszeit T_2 (im 100 ms-Bereich) ist. Da zur Änderung der Diffusionszeit immer nur das Zeitintervall zwischen dem zweiten und dritten 90°-Puls variiert wurde, ist der Einfluß unterschiedlicher T_2-Zeiten eliminiert.

ct-Experimente bei sehr langen Diffusionszeiten und bei verschiedenen Temperaturen

In Abb. 3.5 (oben) ist eine Serie von ct-Experimenten an F98 Zellen bei Diffusionszeiten von $t_D = [100 \ldots 2000]$ ms dargestellt. Die erste Komponente der Signalabschwächung kann wieder vorwiegend dem extrazellulären Wasser mit freier Diffusionskonstante zugeordnet werden. In der Abnahme der ersten Komponente ist mit steigender Diffusionszeit der Einfluß der T_1-Relaxation deutlich zu sehen. Die zweite Komponente bei hohen b-Werten stammt ausschließlich von intrazellulärem Wasser, wobei bemerkenswert ist, daß sogar bei einer Diffusionszeit von $t_D = 2000$ ms noch Signal detektierbar ist. Korrigiert man alle Kurven auf das Signal S_0 ohne Gradienten bei kleinster Diffusionszeit (nicht gezeigt), ist mit steigender Diffusionszeit eine Abnahme der zweiten, intrazellulären Komponente zu beobachten. Dies steht im Gegensatz zur Situation bei sehr kurzen Diffusionszeiten (s. Abb. 3.4 oben), wo die zweite, intrazelluläre Komponente zunimmt.

In Abb. 3.5 (unten) sind die Signalabfälle für $t_D = 100$ und 600 ms jeweils bei den Temperaturen $T = 283$ und 310 K abgebildet. Auffällig ist, daß $\ln S(b)$ selbst bei kleinen b-Werten stark gekrümmt ist und somit auf eine kontinuierliche Verteilung der Diffusionskonstante schließen läßt. Die Diffusionskonstante fällt bei kleinen b-Werten mit der Temperatur von

$$D_{310K} = (2.04 \pm 0.1) \longrightarrow D_{283K} = (1.28 \pm 0.1)$$

Die lineare Regression für $b = [25 \ldots 200]$ smm^{-2} ist auf Grund der starken Krümmung jedoch ungenügend, was sich in den im Vergleich mit den Literaturwerten abgesenkten Diffusionskonstanten wiederspiegelt. Während sich die Steigung der ersten Komponente mit der Temperatur deutlich ändert, bleibt die Steigung der zweiten Komponente vergleichsweise konstant. Der gleiche Effekt wurde schon bei kurzen Diffusionszeiten (s. Abb. 3.4 unten) beobachtet und deutet darauf hin, daß intrazelluläres Diffusionssignal nicht durch freie Diffusion, welche stark temperaturabhängig ist, erklärt werden kann.

Zweidimensionales *ct*-Experiment mit intra- und extrazellulärer Komponente

Da die Diffusionsabschwächung von den zwei experimentellen Parametern G (Gradientenstärke) und t_D (Diffusionszeit) abhängt, liegt es nahe, ein vollständiges, zweidimensionales Datenfeld $S(\tilde{q}^2, t_D)$ zu messen (vgl. Abb. 2.15). Wenn genügend ct-Experimente bei verschiedenen Diffusionszeiten bzw. cg-Experimente bei verschiedenen Gradientenstärken durchgeführt werden, kann der Datensatz $S(\tilde{q}^2, t_D)$ in beiden Richtungen ausgewertet werden.

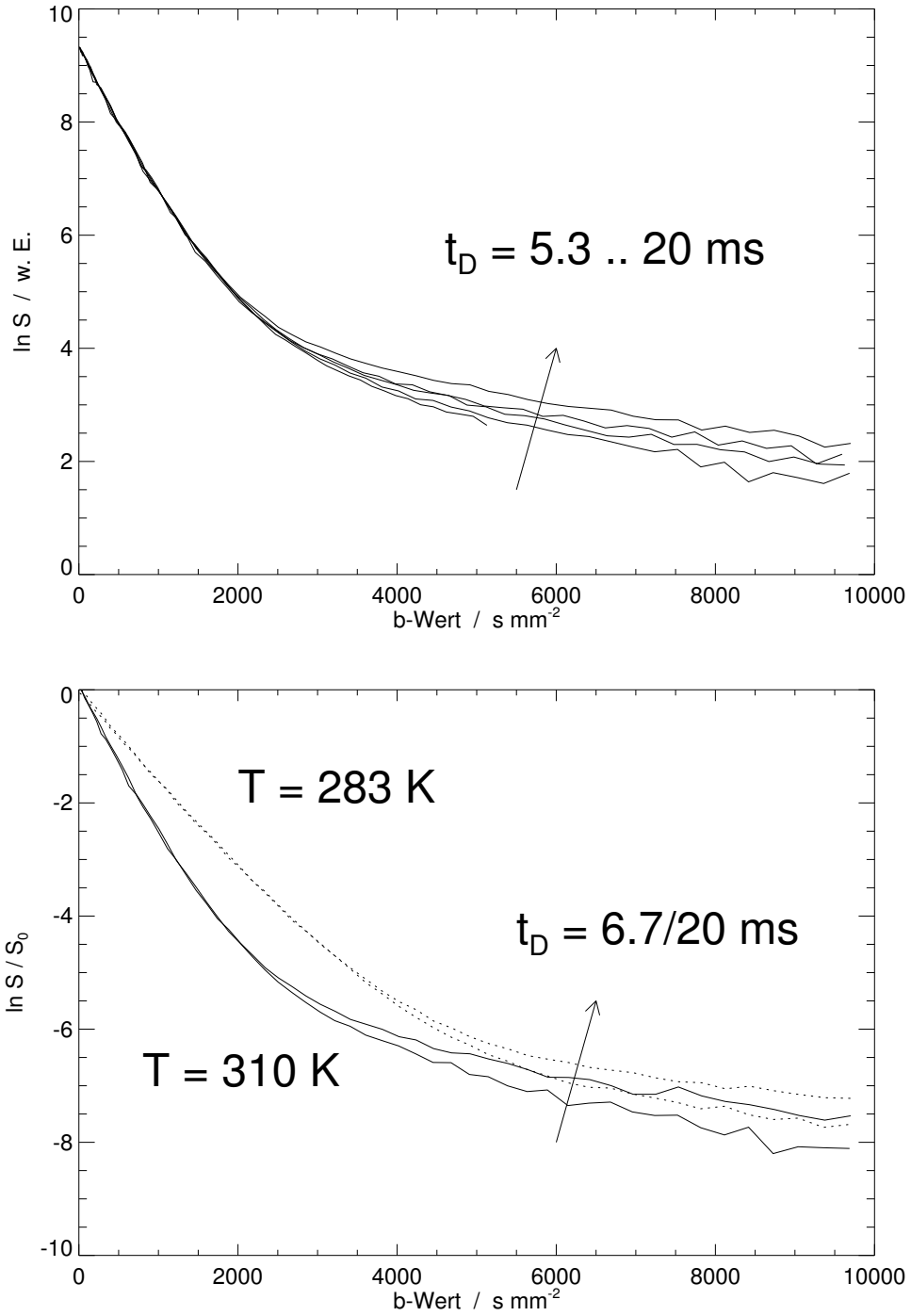


Abbildung 3.4: *ct*-Experiment an F98 Zellen mit bipolaren Diffusionsgradienten bei Diffusionszeiten von $t_D = (5.3, 6.7, 9.3, 13.3, 20)$ ms und $T = 310$ K **(oben)** bzw. $t_D = (6.7, 20)$ ms und $T = (283, 310)$ K **(unten)**, $\tau_{\mathrm{Echo}} = 128$ ms.

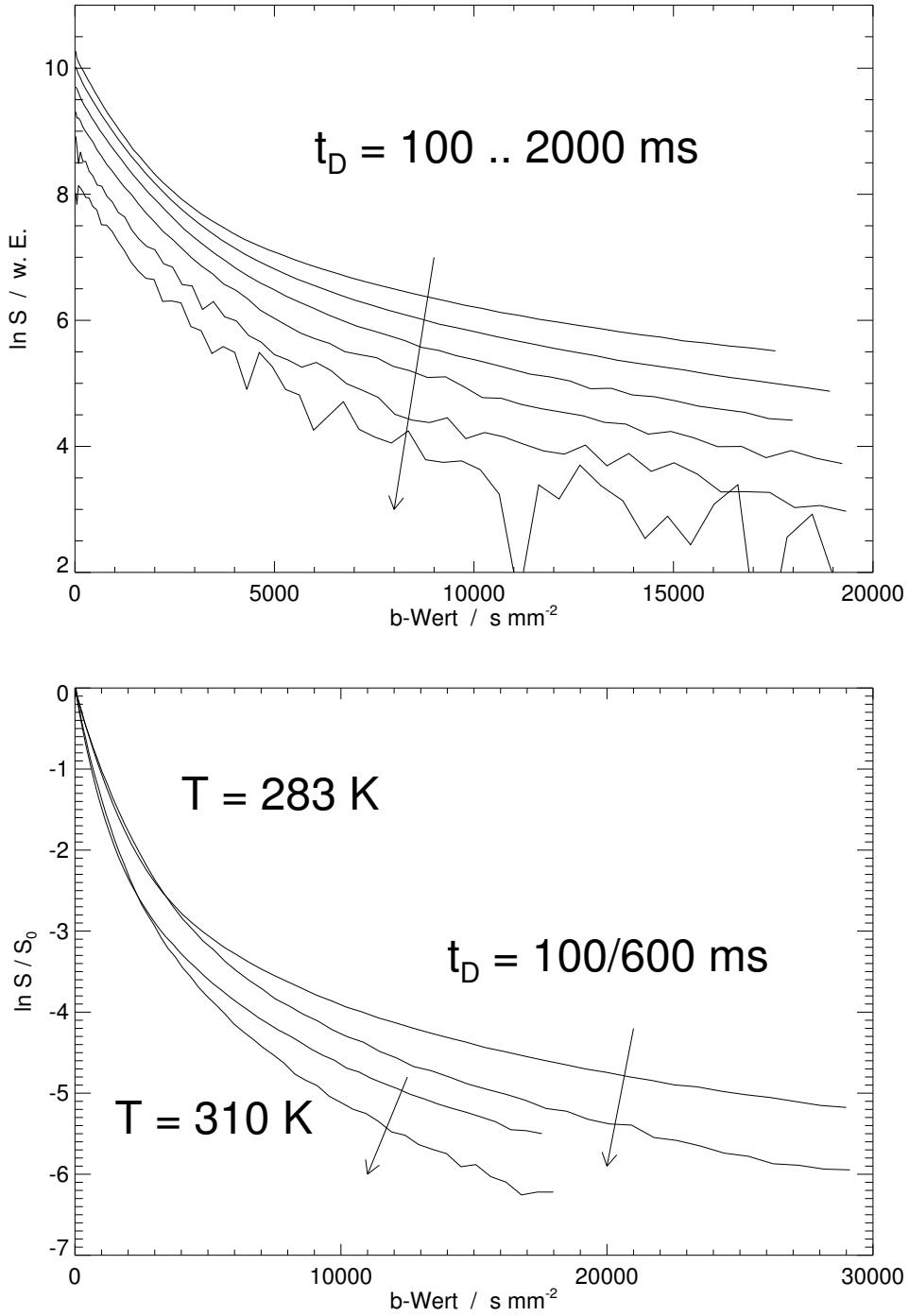


Abbildung 3.5: ct-Experiment an F98 Zellen mit stimuliertem Echo bei Diffusionszeiten von $t_D = (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000)$ ms und $T = 283$ K **(oben)** bzw. $t_D = (100, 600)$ ms und $T = (283, 310)$ K **(unten)**, $\delta = 10$ ms.

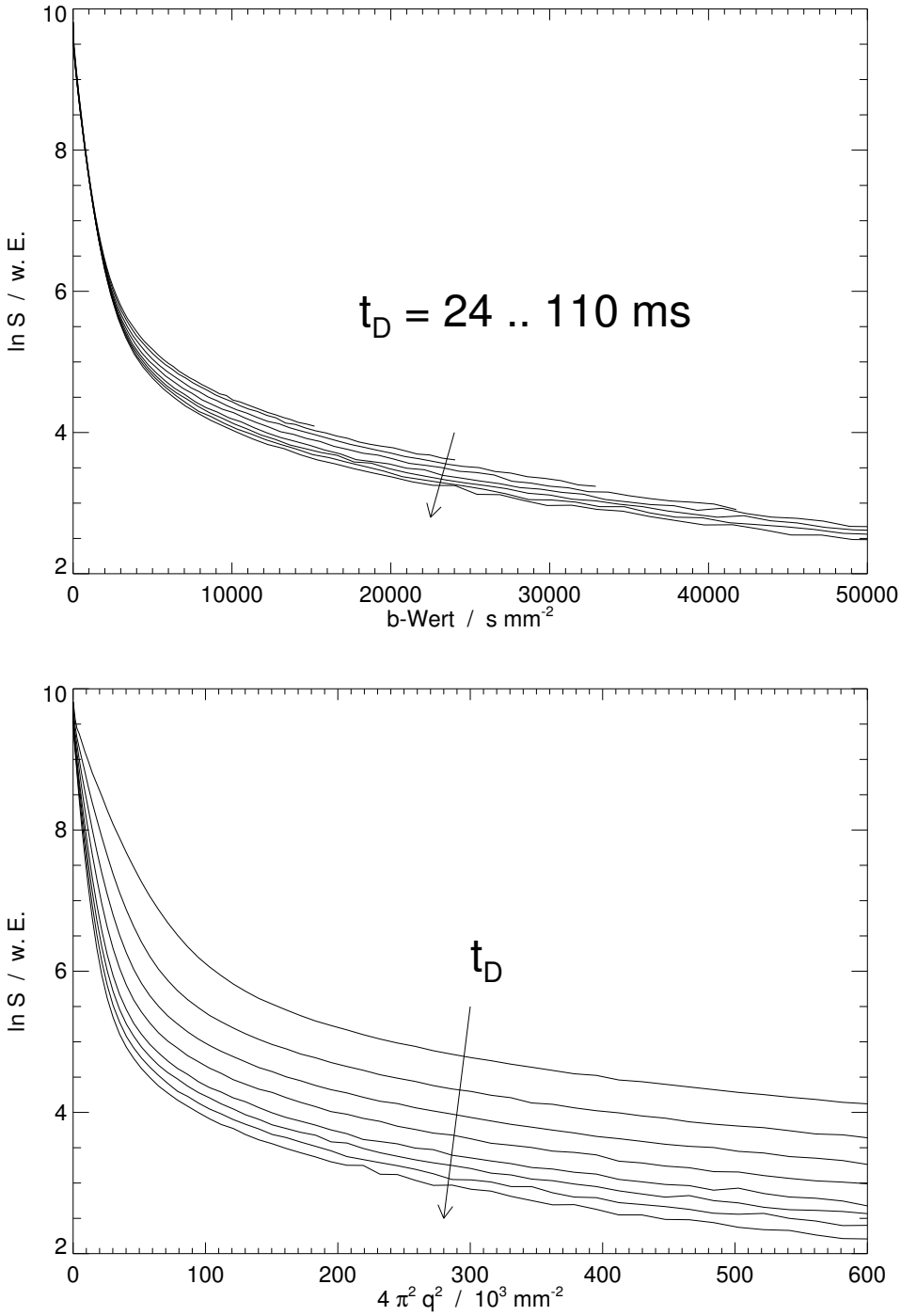


Abbildung 3.6: Zweidimensionales ct-Experiment an F98 Zellen mit stimuliertem Echo bei Diffusionszeiten von $t_D = (24.4, 38.6, 52.8, 67, 81.2, 90.7, 100.2, 109.7)$ ms in der Auftragung *vs.* b-Wert und $\tilde{q}^2$, $\delta = 10$ ms, $T = 310$ K, $b_{\max} = 70000$ s/mm^2.

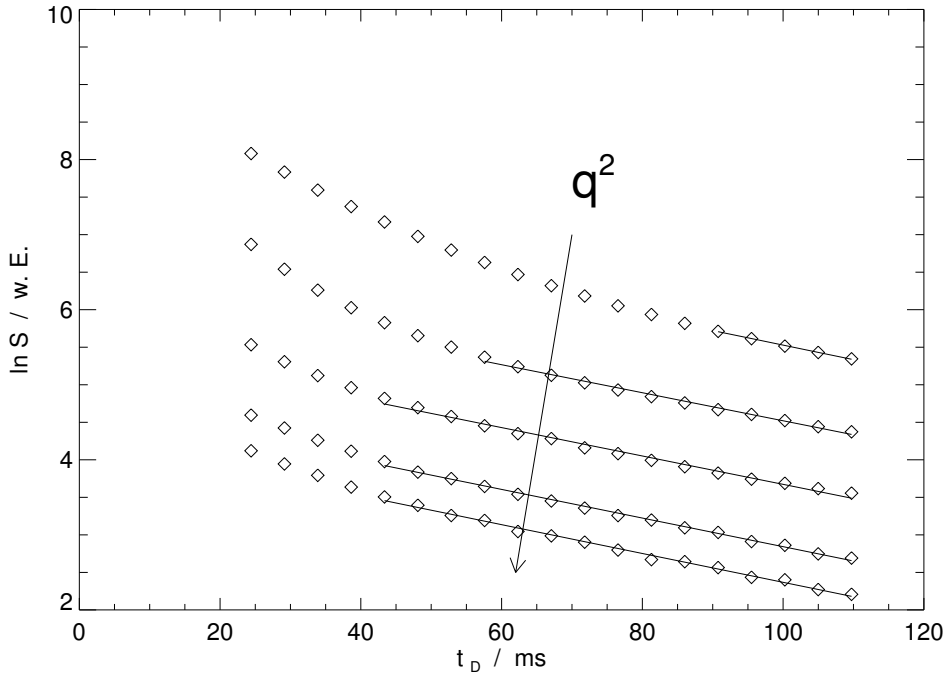


Abbildung 3.7: Daten aus Abb. 3.6 als *cg*-Experiment *vs.* Diffusionszeit aufgetragen, $\tilde{q}^2 = (30/65/150/365/601) \cdot 10^3$ mm^{-2}.

In Abb. 3.6 ist ein zweidimensionales Experiment als Serie von *ct*-Kurven *vs.* b-Wert und $\tilde{q}^2$ gezeigt. In der Auftragung *vs.* b-Wert (oben) fallen bei kleinen b-Werten die Kurven für alle Diffusionszeiten zusammen. Dies bedeutet, daß diese erste Komponente freies Diffusionsverhalten zeigt und dem extrazellulären Wasser zuzuordnen ist. Die zweite Komponente (intrazelluläres Signal) zeigt in der Auftragung *vs.* $\tilde{q}^2$ (unten) ein charakteristisches Verhalten. Die Steigung bleibt konstant, nur der entsprechende Achsenabschnitt nimmt mit zunehmender Diffusionszeit ab. Im Vergleich mit der Theorie (s. S. 32) bedeutet dies beschränkte Diffusion an permeablen Grenzen.

In Abb. 3.7 ist sind die Daten aus Abb. 3.6 als *cg*-Experiment bei fünf q-Werten gezeigt. Aus dieser Auftragung gegen die Diffusionszeit ist die intrazelluläre Austauschzeit nach Glg. 2.24 zu bestimmen und ergibt mit linearer Regression

$\tilde{q}^2$ / 10^3 mm^{-2}	30	65	150	362	601
τ_{intra} / ms	51.6	53.5	52.9	52.4	52.1

(der verwendete Regressionsbereich ist in Abb. 3.7 eingezeichnet, $\sigma_\tau = 1.4$ ms). Verläßlich auswertbar sind nur *cg*-Daten bei hohen Werten für $\tilde{q}^2$. Die intrazelluläre Austauschzeit beträgt dort $\tau_{\text{intra}} = (52.1 \pm 1.4)$ ms.

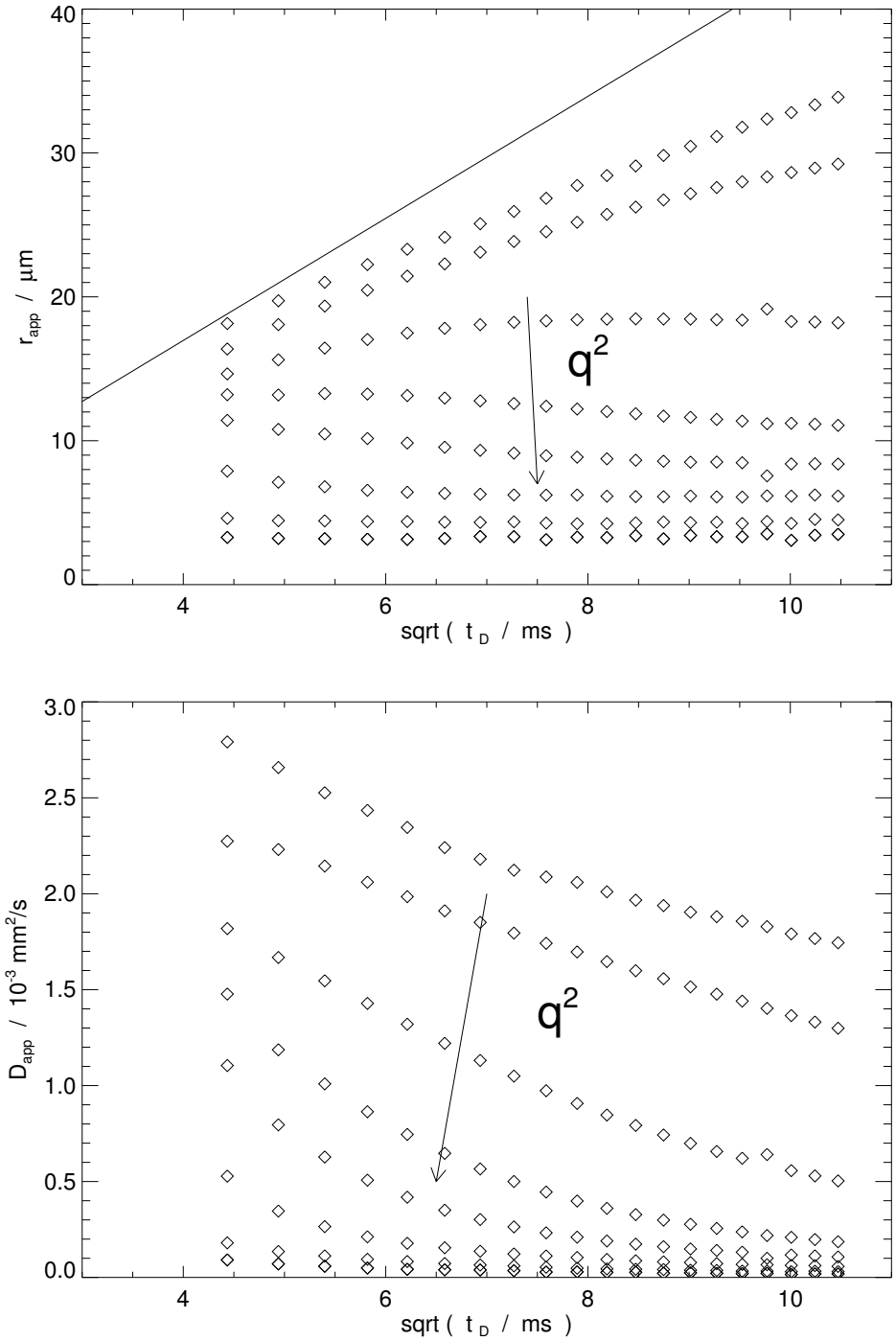


Abbildung 3.8: Auswertung der Daten aus Abb. 3.6 zur Bestimmung der scheinbaren Verschiebung r_{app} und scheinbaren Diffusionskonstante D_{app} bei $\tilde{q}^2 = (4.5/8.8/30/57/87/150/300/541) \cdot 10^3\ \mathrm{mm}^{-2}$.

Wertet man die Steigungen von $\ln S$ *vs.* $\tilde{q}^2$ der Daten aus Abb. 3.6 nach Glg. 2.26 aus, erhält man für die jeweiligen q-Werte die scheinbare Verschiebung r_{app} (Abb. 3.8, oben) bzw. die scheinbare Diffusionskonstante D_{app} (unten).

Wie bei den Modelldaten in Abb. 2.17 wird $r_{\text{app}} \propto \sqrt{t_D}$ bei sehr kleinen $\tilde{q}^2$ (freie Diffusion). Für die intrazelluläre, beschränkte Komponente (hohe q-Werte) bleibt r_{app} konstant und liegt in Abhängigkeit vom q-Wert zwischen $[3 \ldots 6]$ μm.

Die scheinbare Diffusionskonstante D_{app} wird mit zunehmendem $\tilde{q}^2$ und zunehmender Diffusionszeit sehr klein, für $\tilde{q}^2 > 500 \cdot 10^3$ mm^{-2} ist $D_{\text{app}} < 0.1 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

Zweidimensionales *ct*-Experiment bis 600 ms

Die stimulierte Echosequenz wurde schon bei der Messung in Abb. 3.5 verwendet, um lange Diffusionszeiten zu realisieren. Die Datenaufnahme einer Serie von *ct*-Experimenten gelang mit einer Einschränkung des Wertebereichs für $\tilde{q}^2$ für Diffusionszeiten $t_D = [100 \ldots 600]$ ms bei einer Gradientendauer von $\delta = 3.5$ ms (Daten nicht gezeigt). Dabei waren jedoch auf Grund des nicht mehr vernachlässigbaren Einflusses der T_1-Relaxation und der zu kleinen q-Werte die Austauschzeiten nicht mehr bestimmbar.

3.3.4 Übergang von freier zu beschränkter Diffusion – Spinechosequenz

In den vorangegangen Abschnitten wurden Diffusionsabschwächungen bei kurzen und bei langen Diffusionszeiten gezeigt (Spinechosequenz mit bipolaren Gradienten bzw. stimulierte Echosequenz). Die Stejskal/Tanner-Spinechosequenz mit unipolaren Gradienten (s. Abb. 3.2) erlaubt Experimente bei mittleren Diffusionszeiten, wobei im Gegensatz zur stimulierten Echosequenz die Echozeit immer konstant gehalten werden kann und keine zusätzlichen Signalabschwächungen auf Grund von T_2- oder T_1-Relaxation auftreten.

In Abb. 3.9 ist ein zweidimensionaler Datensatz (Serie von *ct*-Experimenten) *vs.* b-Wert und $\tilde{q}^2$ aufgetragen. Um die Empfängereinheit des Spektrometers (Analog/Digitalkonverter) besser auszusteuern, wurde erst ab $\tilde{q}^2 > 100 \cdot 10^3$ mm^{-2} begonnen, das Signal aufzunehmen. Betrachtet man die Kurven *vs.* b-Wert (oben) mit steigender Diffusionszeit, so erreichen diese erst eine Einhüllende bei $t_D \sim 60$ ms und fallen dann wieder ab. Im Vergleich dazu zeigte die zweite Komponente der Experimente bei kurzen Diffusionszeiten $t_D = 5.3 \ldots 20$ ms (Abb. 3.4) ebenso eine Zunahme an Signal, bei langen Diffusionszeiten $t_D > 100$ ms (Abb. 3.5) eine Abnahme.

In der Auftragung *vs.* $\tilde{q}^2$ weichen nur die Kurven für $t_D = 12.3/14.8$ ms von den anderen in den Steigungen ab. Bei größeren Diffusionszeiten bleiben die Steigungen der *ct*-Kurven gleich, fallen jedoch mit t_D ab.

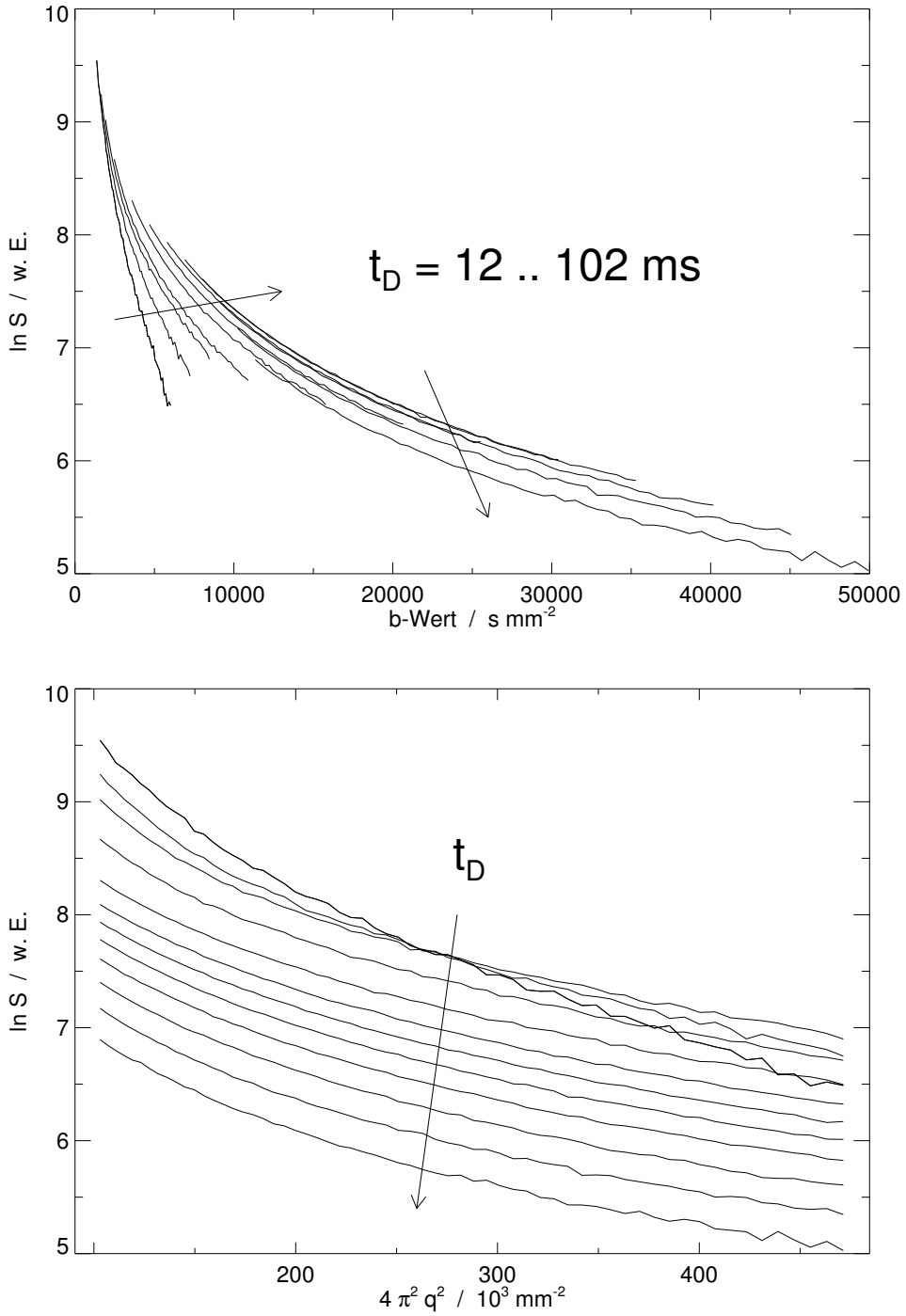


Abbildung 3.9: Zweidimensionales *ct*-Experiment an F98 Zellen mit unipolaren Gradienten (Spinecho) bei Diffusionszeiten von $t_D = [12.3, 14.8, 17.3, 22.3, 32.3, \ldots, 102.2]$ ms in der Auftragung *vs.* b-Wert und q-Wert, $\delta = 8$ ms, $\tau_{\mathrm{Echo}} = 120$ ms, $T = 310$ K.

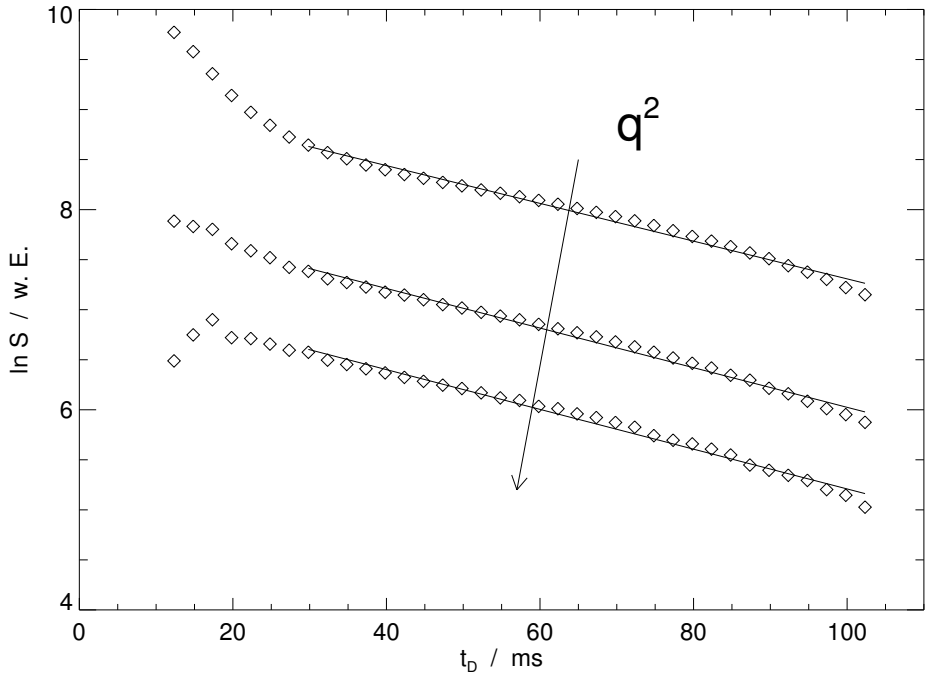


Abbildung 3.10: Daten aus Abb. 3.9 in der Auftragung als *cg*-Experiment *vs.* Diffusionszeit, $\tilde{q}^2 = (103/251/488) \cdot 10^3$ mm^{-2}.

Aus diesem zweidimensionalen Datensatz $S(\tilde{q}^2, t_D)$ lassen sich wieder die Steigungen der *cg*- bzw. der *ct*-Kurven auswerten und die Parameter $\tau_{\text{intra}}, r_{\text{app}}$ und D_{app} bestimmen. In Abb. 3.10 sind die Daten aus Abb. 3.9 als *cg*-Experiment bei drei q-Werten (niedrigster, mittlerer und höchster q-Wert) gezeigt.

Mit linearer Regression im Bereich $t_D = [30 \ldots 105]$ ms ergibt sich nach Glg. 2.24 die intrazelluläre Austauschzeit τ_{intra} zu:

$\tilde{q}^2$ / 10^3 mm^{-2}	103	251	488
τ_{intra} / ms	53.0 ± 1.3	50.5 ± 1.0	50.3 ± 1.0

Wertet man die Steigungen von $\ln S$ *vs.* $\tilde{q}^2$ der Daten aus Abb. 3.9 nach Glg. 2.26 aus, erhält man die scheinbare Verschiebung r_{app} und die scheinbare Diffusionskonstante D_{app}. Dies ist in Abb. 3.11 für niedrige, mittlere und hohe q-Werte dargestellt.

Die scheinbare Verschiebung r_{app} erreicht ab einer Diffusionszeit von etwa 17 ms (Übergang der freien zur beschränkten Diffusion) einen konstanten Wert, der bei hohen q-Werten zwischen $r_{\text{app}} = [4 \ldots 6]$ μm liegt.

Die scheinbare Diffusionskonstante D_{app} fällt dann reziprok mit der Diffusionszeit ab und liegt für $\tilde{q}^2 > 400 \cdot 10^3$ mm^{-2} im Bereich $D_{\text{app}} < 0.2 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

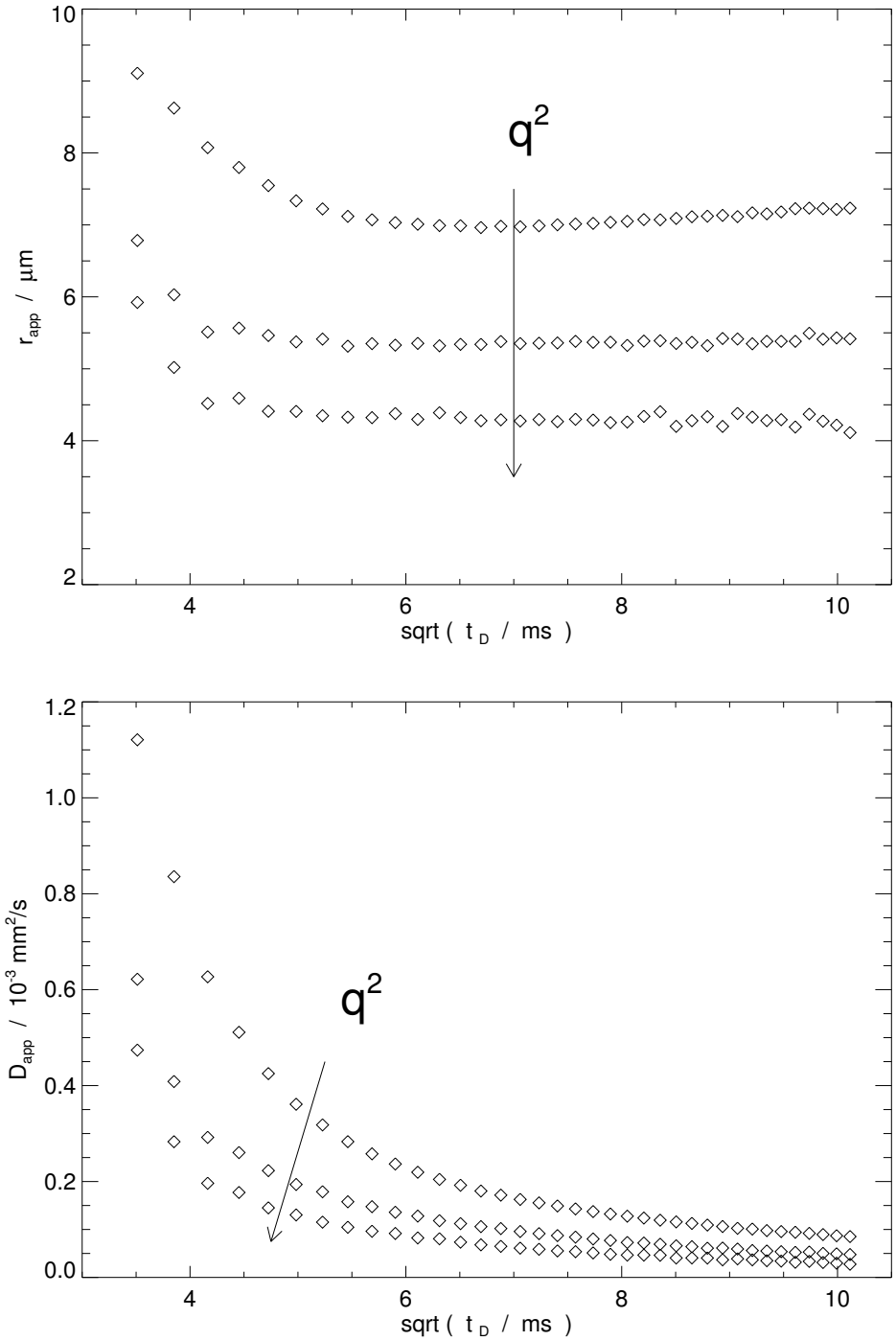


Abbildung 3.11: Auswertung der Daten aus Abb. 3.9 zur Bestimmung der scheinbaren Verschiebung r_{app} und scheinbaren Diffusionskonstante D_{app} bei $\tilde{q}^2 = (150/251/400) \cdot 10^3$ mm^{-2}.

3.3.5 Diskussion

Die Kontrollmessungen an den isotropen Flüssigkeiten Wasser und Isopropanol zeigten sehr gute Linearität bis zu einer Diffusionsabschwächung von $\exp(-8) \approx 1/3000$. Auch in dem Medium DMEM mit BMG-Fäden (ohne Zellen) war der Signalabfall monoexponentiell, wie es der Theorie der freien Diffusion entspricht.

Mit Einbettung der Zellen in die BMG-Fäden tritt von kurzen bis langen Diffusionszeiten $t_D = [6.7 \ldots 2000]$ ms eine zweite Komponente bei hohen b-Werten auf, welche eine (scheinbar) niedrigere Diffusionskonstante zeigt und von intrazellulärem Wasser stammt. Bei einer Temperaturerniedrigung um 27 K wird die negative Steigung der ersten Komponente bei niedrigen b-Werten, wie für freie Diffusion erwartet, ungefähr halbiert, während die Steigung der zweiten, intrazellulären Komponente vergleichsweise konstant bleibt. Zusammen mit der Beobachtung, daß die Steigungen der Diffusionsabschwächung kontinuierlich verteilt sind, deutet dies darauf hin, daß die intrazelluläre Diffusion nicht mehr frei ist und Eigenschaften der beschränkten Diffusion zeigt.

Wie im Theorieteil gezeigt wurde, können mit einem zweidimensionalen Datensatz $S(\tilde{q}^2, t_D)$ freie und beschränkte Diffusion der verschiedenen Komponenten voneinander unterschieden werden. Die erste Komponente bei kleinen b-Werten zeigt freie Diffusion, die zweite bei hohen q-Werten beschränkte Diffusion an permeablen Grenzen.

Aus den Steigungen des zweidimensionalen Datensatzes lassen sich wie in der Modellrechnung die Parameter τ_{intra} (Austauschzeit), r_{app} (scheinbare Verschiebung) und D_{app} (scheinbare Diffusionskonstante) bestimmen. Mit dem Spinechoexperiment bei mittleren Diffusionszeiten ($t_D = [12 \ldots 102]$ ms) ist genau ein Zeitbereich erfaßt, der die Experimente bei kurzen und langen Diffusionszeiten verbindet. Die intrazelluläre Komponente der Diffusionsabschwächung zeigt unterhalb $t_D < 20$ ms den Übergang von der freien zur beschränkten Diffusion. Anschaulich bedeutet dies, daß immer mehr Teilchen die Zellmembran erreichen und in ihrer freien Ausbreitung eingeschränkt werden. Bei der Diffusionszeit $t_D = 17$ ms erreicht dann die scheinbare Verschiebung einen konstanten Wert.

Eindeutig läßt sich die intrazelluläre Austauschzeit aus den cg-Kurven bestimmen, sie beträgt $\tau_{\text{intra}} = (51 \pm 3)$ ms (Größtfehler).

Die von $\tilde{q}^2$ abhängigen Werte der scheinbaren Verschiebung r_{app} müssen mit den Ergebnissen der Modellrechnung verglichen werden. Wie in der Modellrechnung zeigt sich in den Experimenten, daß durch den q-Wert Signale aus bestimmten Kompartimenten selektiert werden.

Bei sehr kleinen q-Werten sind dies Signale aus dem extrazellulären Kompartiment mit freier Diffusion (r_{app} ist direkt proportional zu $\sqrt{t_D}$), bei größeren q-Werten sind dies Signale aus den intrazellulären Kompartimenten mit beschränkter Diffusion an permeablen Grenzen (r_{app} wird konstant). Mit einer Verteilung

der Zelldurchmesser der intrazellulären Kompartimente wird dies noch komplizierter: der asymptotische Wert für r_{app} ist für unterschiedliche $\tilde{q}^2$ verschieden. Dies bedeutet, daß mit $\tilde{q}^2$, also der Gradientenstärke, Signale von intrazellulären Kompartimenten mit ganz bestimmtem Zelldurchmesser selektiert werden.

Schwierig ist die Abschätzung der tatsächlichen, intrazellulären Diffusionskonstante D_{intra} aus den Kurven für die scheinbaren Diffusionskonstanten D_{app}. Für eine genaue Bestimmung von D_{intra} sind Experimente bei Diffusionszeiten $t_D < 10$ ms *und* hohen q-Werten nötig, eine Anforderung, die unsere verfügbare Hardwareausrüstung übersteigt. Möglich sind nur Abschätzungen aus dem Vergleich von Modellrechnungen (s. Abb. 2.22, 2.23 und Tab. 2.5) und den experimentellen Ergebnissen (s. Abb. 3.11). Danach scheint ein plausibler Wert bei $D_{\text{intra}} = (1.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s (geschätzter Fehler) zu liegen.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit denen anderer Forschungsgruppen gut überein.

Van Zijl *et al.* [5] zeigten die Trennbarkeit von intra- und extrazellulärem Signal mit Diffusionsgradienten an MCF-7 Tumorzellen, welche in Agarosegel präpariert waren. Die intrazelluläre Diffusionskonstante bei b-Werten $b = [5000 \ldots 11000]$ smm^{-2} ($t_D = 142$ ms) betrug $D_{\text{app}} = 0.11 \cdot 10^{-3}$ mm^2/s. Sie beobachteten einen multiexponentiellen Signalabfall, der nicht an ein biexponentielles Modell anzupassen war. Ihre Behauptung, daß aus dem Achsenabschnitt der zweiten Komponente das intrazelluläre Volumen bestimmt werden kann, erweist sich nach den Modellrechnungen von Kapitel 2 als unzutreffend. Ihre Vermutungen, daß mit diffusionszeitabhängigen Messungen die Einflüsse der beschränkten Diffusion und des Austausches auf D_{app} geklärt werden können, werden in dieser Arbeit experimentell und theoretisch bestätigt.

Van der Veen *et al.* [79] zeigten an Erythrocyten, daß Diffusionsabschwächungen bis zu $b = 50000$ smm^{-2} ($t_D = 72$ ms) noch mehr von einem biexponentiellen Modell abweichen. Die scheinbare, intrazelluläre Diffusionskonstante erniedrigte sich bei Zeiten von $t_D = [13 \ldots 78]$ ms auf $D_{\text{app}} = [0.11 \ldots 0.01] \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

Pilatus *et al.* [80] zeigten in ausgedehnten Zellstudien eine Diffusionszeitabhängigkeit der Signalabschwächung im Bereich $t_D = [8 \ldots 107]$ ms (b-Werte bis 12000 smm^{-2}). Die mit einem biexponentiellen Modell erhaltenen Werte für $D_{\text{app}} = [0.5 \ldots 0.2] \cdot 10^{-3}$ mm^2/s sind auf Grund der unzureichenden theoretischen Modellierung und des zu klein gewählten b-Wertebereichs (Anteil der extrazellulären Diffusion) größer als die anderer Arbeitsgruppen.

3.4 Intrazelluläres Signal unter verschiedenen physiologischen Randbedingungen

Führt man ein Diffusionsexperiment an Zellkulturen in BMG-Fäden durch, erreicht man durch hohe Diffusionsgradienten eine Selektion ausschließlich des intrazellulären Signals. Wie in der Modellrechnung in Kap. 2.3.6 gezeigt wurde, kann eine Änderung der Signalintensität bei hoher Diffusionswichtung durch eine Änderung des intrazellulären Volumens und/oder der intrazellulären Austauschzeit hervorgerufen werden. Eine Permeabilitätsänderung von Zellmembranen für Wasser ist erst zu erwarten, wenn direkt die Aquaporine blockiert werden. Dies ist Gegenstand von Kapitel 3.5.

Im Folgenden werden perfundierte Zellkulturen unter osmotischem Stress, unter Behandlung mit Immunsuppressiva und unter apoptotischen Bedingungen betrachtet. Mit diffusionsgewichteter ^{1}H-NMR-Spektroskopie können an diesem experimentellen Zellmodell die Änderungen des intrazellulären Volumens mit hoher zeitlicher Auflösung bestimmt werden.

3.4.1 Intrazelluläres Volumen unter osmotischem Stress

Die Osmolarität des Perfusionsmediums wurde über den NaCl-Gehalt modifiziert, gegenüber dem isotonen Medium wurde der Salzgehalt abgesenkt (hypoton) bzw. angehoben (hyperton), siehe dazu [82, 83]. Mit dem Wechsel von dem isotonen zu einem hypo- bzw. hypertonen Medium verändern Zellen ihr Volumen, da auf Grund der unterschiedlichen intra- und extrazellulären osmotischen Drucke Wasser in die Zellen ein- bzw. ausströmt.

In Abb. 3.12 ist die Änderung der Diffusionsabschwächung bei hypotonem (oben) und hypertonem Stress (unten) abgebildet. Während die freie, extrazelluläre Komponente nahezu unverändert bleibt, spiegelt die zweite das intrazelluläre Volumen wieder. Bei Zellschwellung nimmt das Signal zu, bei Zellschrumpfung entsprechend ab.

Darstellung intrazellulären Volumens mit dem *ct*-Experiment ('*ct*-monitoring')

Um mit möglichst hoher Zeitauflösung Änderungen im intrazellulären Volumen darzustellen, nimmt man nur intrazelluläres Signal bei hohen Gradienten auf. Zur Minimierung von Schwankungen kann ein *ct*-Experiment zum Beispiel bei b-Werten von $b = [15000 \ldots 25000]$ s/mm^2 aufgenommen werden ('*ct*-monitoring'). Mit einer linearen Regression erhält man aus der negativen Steigung die scheinbare, intrazelluläre Diffusionskonstante. Der Achsenabschnitt ist proportional zum jeweiligen, intrazellulären Volumen.

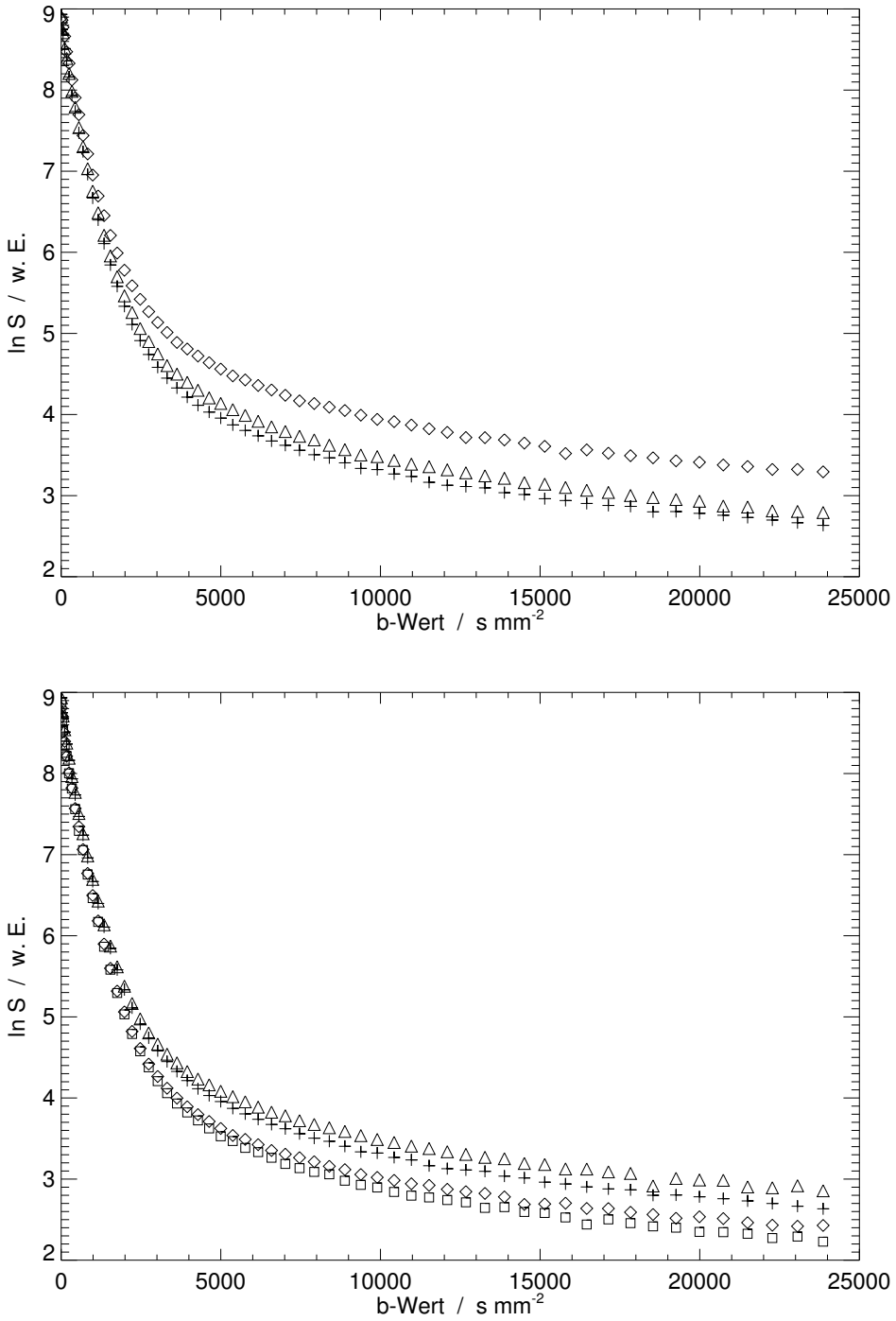


Abbildung 3.12: *ct*-Experimente an primären Astrocyten unter iso-, hypo- und hyperosmotischen Bedingungen, Kontrollmessungen zum '*ct*-monitoring' in Abb. 3.13: $\triangle$(0:00 h) / $\diamond$(1:00) / $+$(3:15) **(oben)** / $\square$(4:00) / $\diamond$(5:00) / $\triangle$(6:00) **(unten)** ($t_D = 31.7$ ms, $\delta = 10$ ms).

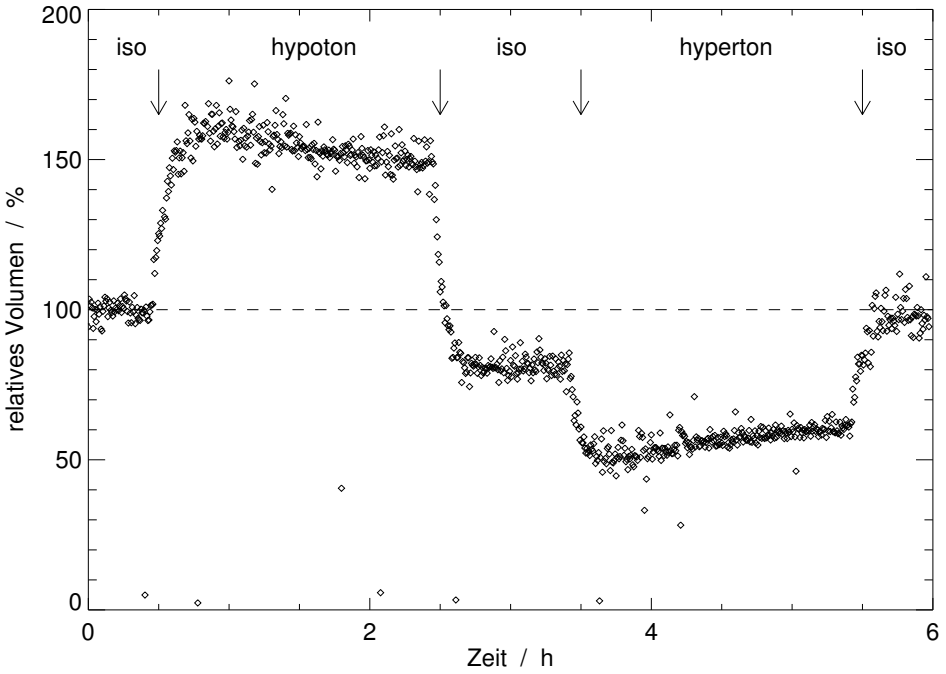


Abbildung 3.13: Darstellung intrazellulären Volumens ('*ct*-monitoring') von primären Astrocyten unter osmotischem Stress. Medienwechsel: isoton (Kontrolle) - hypoton (0:30 h) - isoton (2:30 h) - hyperton (3:30 h) - isoton (5:30 h). *ct*-Experiment: $t_D = 31.7$ ms, $\delta = 10$ ms, $b = [15108 \ldots 24270]$ s/mm^2 .

In Abb. 3.13 ist mit einer Zeitauflösung von 24 s das relative, intrazelluläre Volumen von primären Astrocyten unter osmotischem Stress dargestellt ('*ct*-monitoring'). Die Schwell- bzw. Schrumpfreaktion zeigt sich innerhalb von Minuten, nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes regelt die Zelle das Volumen in zwei Stunden um ca. 10 % zurück. Das Kontrollniveau nach der Zellschwellung ist um 20 % niedriger als am Anfang des Experiments. Die scheinbare Diffusionskonstante bleibt während des gesamten Experiments konstant und beträgt $D = (0.038 \pm 0.003) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

Darstellung intrazellulären Volumens über 6 h ('*ct*-monitoring')

In Abb. 3.14 (oben) ist ein Langzeitexperiment über 6 h dargestellt. Nach einer Stunde isotoner Kontrolle werden die F98 Gliomzellen einem hypotonen Stress ausgesetzt. Sie zeigen wie gewohnt eine schnelle Volumenzunahme auf über 200 % des Ausgangsvolumens, welche sich nach 30 min auf 165 % einstellt. Darauf erfolgt die regulatorische Volumenabnahme innerhalb der nächsten 5 h auf einen Wert von ca. 130 %. Die scheinbare Diffusionskonstante bleibt nahezu konstant und beträgt $D = (0.062 \pm 0.001) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

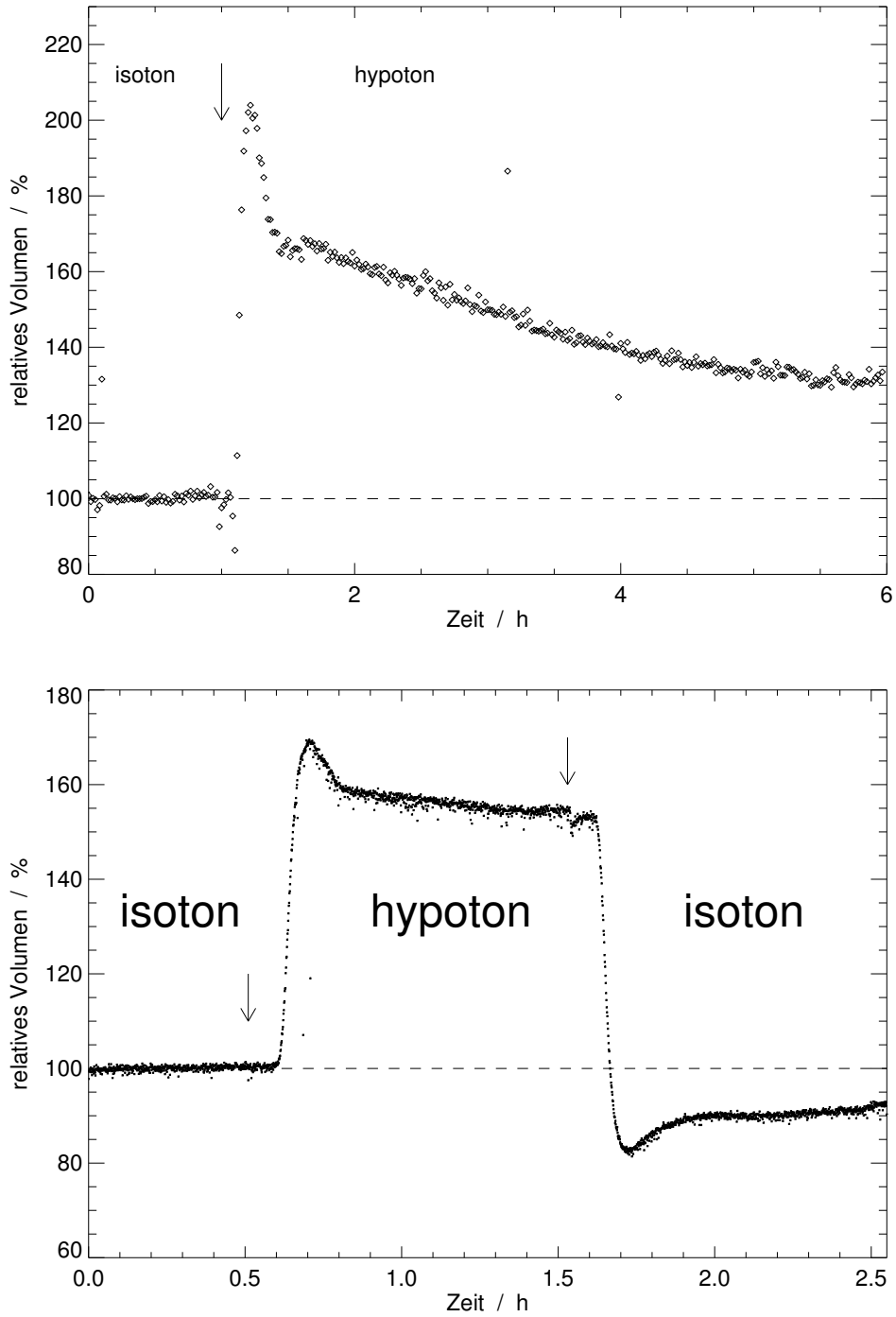


Abbildung 3.14: Intrazelluläres Volumen von F98 Zellen unter hypotonem Stress **(oben)**. Medienwechsel: isoton(Kontrolle) - hypoton (1 h) - isoton (21 h). ct-Experiment: $t_D = 31.7$ ms, $\delta = 10$ ms, $b = [15108 \ldots 24270]$ s/mm^2. Hochzeitaufgelöste Volumenmessung **(unten)** bei festem b-Wert $b = 15000$ s/mm^2, zeitliche Auflösung $t_R = 3.5$ s.

Darstellung intrazellulären Volumens mit höchster Zeitauflösung

Um bestmögliche Zeitauflösung in der Darstellung von Änderungen des intrazellulären Signals zu erreichen, kann man statt eines *ct*-Experiments jeweils nur ein Signal bei einer hohen, festen Gradientenstärke messen. Dabei geht die Information der zeitlichen Entwicklung der scheinbaren Diffusionskonstante verloren. Die zeitliche Auflösung ist nur durch die longitudinale T_1-Relaxationszeit auf Wiederholzeiten im Sekundenbereich nach unten begrenzt.

Eine Messung mit einer Zeitauflösung von $t_R = 3.5$ s ist in Abb. 3.14 (unten) an F98 Gliomzellen unter hypotonem Stress dargestellt. Die Pfeile markieren jeweils den Medienwechsel. Wie man sieht, benötigt das neue Medium ca. 5 min Zeit, um durch die Perfusionsschläuche bis zu den Zellen zu gelangen und die Zellen schwellen zu lassen. Der Anstieg des intrazellulären Volumens kann höchstens mir der Zeitauflösung gemessen werden, mit der das neue Medium die Zellen perfundieren und damit die Zellschwellung hervorrufen kann. Mit der Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min und einem Probenvolumen von 0.5 ml dauert es also mindestens weitere 30 Sekunden, bis alle Zellen mit neuem Medium durchströmt sind. Die Anstiegszeit der zellulären Schwellung beträgt nach Abb. 3.14 ungefähr 3 min.

3.4.2 Astrocytenschwellung mit Immunsuppressiva

In Zusammenarbeit mit N. Serkova wurde der Einfluß von Immunsuppressiva auf das Zellvolumen mittels '*ct*-monitoring' untersucht. Ausführlich sind die Ergebnisse bereits in [84, 89] diskutiert.

In Abb. 3.15 (oben) ist die Reaktion von primären Astrocyten auf Cyclosporin A (5 μg/ml) dargestellt. Nach der zweistündigen Kontrollmessung steigt das intrazelluläre Volumen sofort nach Zugabe des Immumsuppressivums an und erreicht innerhalb einer Stunde ca. 125 % des Kontrollvolumens. Mit dem Wechsel des Mediums zurück zu den Kontrollbedingungen nach zweistündiger Einwirkung erreicht das intrazelluläre Volumen innerhalb weniger Minuten wieder das Kontrollniveau.

Die scheinbare Diffusionskonstante bleibt während der gesamten Messung konstant und beträgt $D = (0.051 \pm 0.002) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

Die Streuung des intrazellulären Volumens beträgt ca. ± 5 % um den Kontrollwert. Dies ermöglichte in einem ähnlichen Experiment nach Gabe des Immunsuppressivums Rapamycin (5 μg/ml) die Detektion einer statistisch signifikanten Volumenzunahme auf 104 % des Kontrollvolumens.

Diese Zellschwellungen könnten mit Ursache der beobachteten Nebenwirkungen dieser Medikamente auf den Menschen sein. Methodisch zeigen die Messungen, daß mit NMR nichtinvasiv und mit hoher Zeitauflösung und Genauigkeit das physiologische Verhalten von Zellsystemen untersucht werden kann.

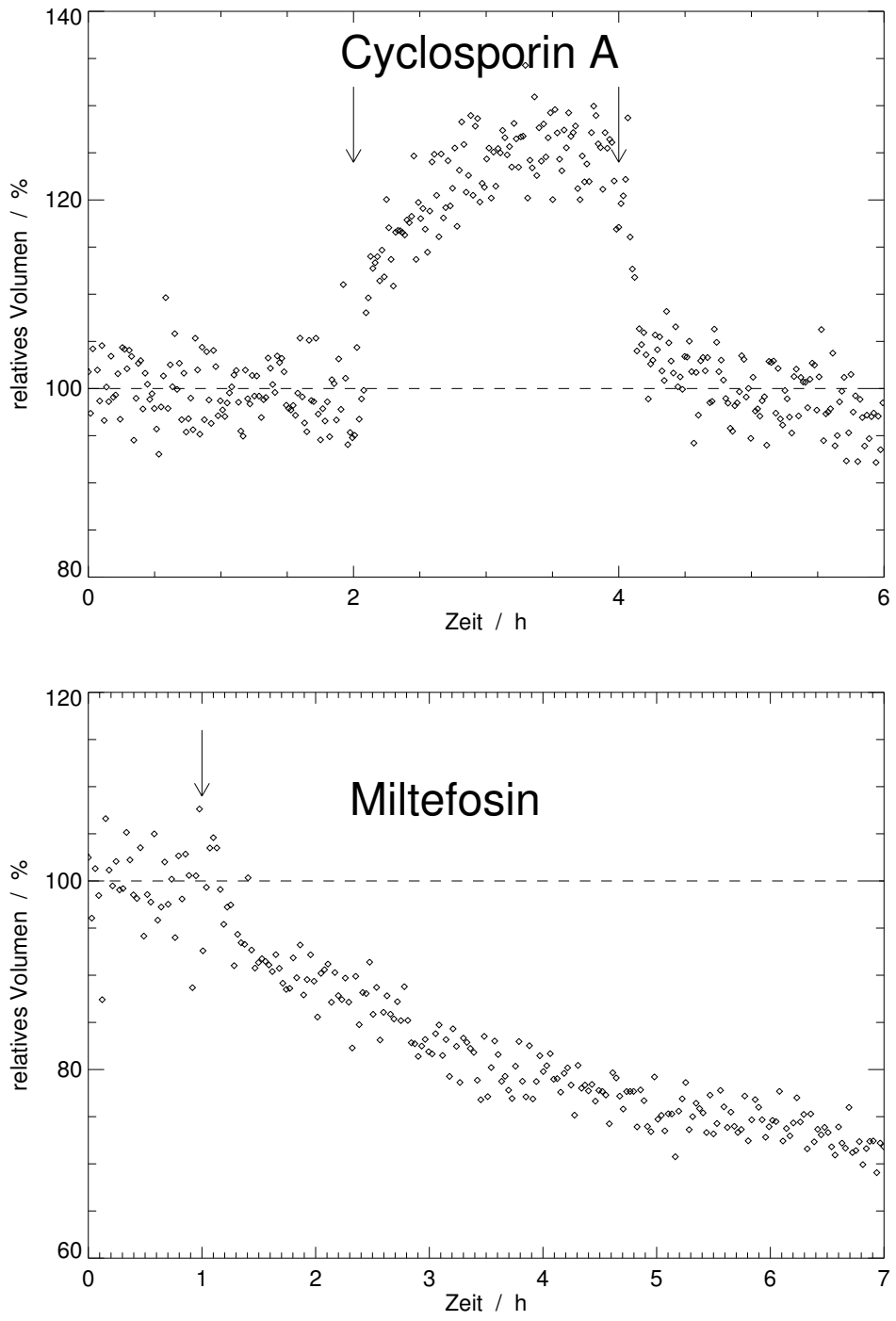


Abbildung 3.15: Intrazelluläre Volumenzunahme von primären Astrocyten unter Behandlung mit Cyclosporin A (2 h) **(oben)** und apoptotische Schrumpfung von KB Epithelzellen nach Zugabe von Miltefosin **(unten)**. *ct*-Experiment: $t_D = 31.7$ ms, $\delta = 10$ ms, $b = [15108 \ldots 24270]$ s/mm^2.

3.4.3 Zellvolumenabnahme während Apoptose

Apoptose ist ein unter physiologischen Bedingungen stattfindender Zelltod, der durch extra- und intrazelluläre Signale ausgelöst wird. Die Apoptose wird durch genetische Informationen, die in der DNA der Zelle vorliegen, gesteuert. In der Anfangsphase findet eine Schrumpfung der Zelle statt, an die sich die Fragmentierung der Zelle in kleine Zellkörper ('apoptotic bodies') anschließt. Diese Körper werden vom umgebenden Gewebe aufgenommen und verdaut [90].

In Zusammenarbeit mit J. Henke wurde versucht, die Zellschrumpfung während der Apoptose an KB-Zellen mittels '*ct*-monitoring' des intrazellulären Volumens darzustellen [91, 92].

In Abb. 3.15 (unten) ist die Reaktion von KB-Zellen auf Hexadecylphosphocholin (Miltefosin, 70 μM) gezeigt. Nach einstündiger Kontrollmessung zeigt sich innerhalb 30 min eine Volumenverringerung auf 90 % des Kontrollvolumens und eine im folgenden Zeitverlauf weitere Abnahme bis auf ungefähr 70 %. Die scheinbare Diffusionskonstante bleibt während der gesamten Messung konstant und beträgt $D = (0.046 \pm 0.002) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

Die hier mit NMR-Methoden gemessene Volumenabnahme steht in guter Übereinstimmung mit der in der Literatur berichteten Zellschrumpfung während Apoptose auf 60 % des Ausgangsvolumens [93].

3.4.4 Diskussion

Die Methode der Darstellung intrazellulären Volumens mit diffusionsgewichteter ^{1}H-NMR wurde in unserer Arbeitsgruppe von T. Niendorf und U. Flögel entwickelt [82, 83, 94]. In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem AMX 360 NMR-Spektrometer eine hohe zeitliche Auflösung und deutlich reduzierte Signalschwankungen von zum Teil weniger als ±3 % erreicht werden.

Zusammenfassend wurden bei hypoosmotischem Stress folgende Beobachtungen gemacht:

- In den ersten fünf Minuten verdoppelt sich ungefähr das Zellvolumen. Die Zellschwellung wird in der ersten Phase der aktiven Volumenregulation ('RVD... regulatory volume decrease') auf ungefähr 160 % des Kontrollvolumens gesenkt. Zellchargen, welche vorher anderer Behandlung ausgesetzt waren (siehe zum Beispiel Abb. 3.14, unten) oder primäre Astrocyten, zeigen diese große Schwellung auf 200 % nur in geringerem Umfang oder gar nicht.

- In der zweiten Phase des RVD wird das Zellvolumen erheblich langsamer rückreguliert und zeigt eine ungefähr zehnprozentige Abnahme des relativen Volumens von 160 auf 150 % des Kontrollwertes. In der Langzeitmessung nimmt das Zellvolumen noch weiter ab.

- Nach erneutem Wechsel des Mediums zu isotonen Bedingungen ist in den meisten Fällen die schnelle Volumenregulation ('RVI... regulatory volume increase') innerhalb der ersten fünf Minuten zu beobachten. Das sich danach einstellende Volumen beträgt jedoch nur 80 bis 90 % des Anfangskontrollwertes. Interessanterweise wurde der Kontrollwert von 100 % nach weiterem hypertonem Stress wieder erreicht (s. Abb. 3.13).

Mit optischen Methoden wurde gezeigt, daß der Wasseraustausch bei osmotischem Stress in der Größenordnung von 100 ms erfolgt. Wenn dabei Aquaporine blockiert werden, ändern sich die Permeabilitäten und Austauschzeiten um den Faktor zwei bis drei [95–97].

Die aktive Volumenregulation der Zelle erfolgt zunächst durch Austausch von anorganischen Ionen wie Na^+, K^+, Cl^-, HCO_3^- (schnell verfügbar) und später von organischen Osmolyten, in Gehirn vornehmlich Taurin und *myo*-Inosit [83, 98]. In [99–101] wurde gezeigt, daß Kalium- und Chloridkanäle bei der Volumenregulation geöffnet werden. Der Chloridkanal scheint dabei nicht nur selektiv für die Chloridionen, sondern für viele Zellosmolyte durchgängig zu sein.

Bei der Aktivierung der Kanäle könnte auch das Cytoskelett beteiligt sein. Mit Änderungen des Zellvolumens wurden veränderte Strukturen in den Aktinfilamenten festgestellt [102]. Eine Hypothese lautet, daß Proteine die an der Volumenregulation beteiligt sind, über die Verbindung mit den Filamenten gesteuert werden. Andererseits könnten die Filamente direkt mit den Kanälen gekoppelt sein und deren Aktivität regeln. In [103] wird der Einfluß von mechanosensitiven Membranproteinen beschrieben, die durch Dehnungen der Zellmembran, wie sie bei jeder Formänderung der Zelle auftreten, ihren Eigenschaften ändern.

Eine Erklärung des erniedrigten Kontrollwertes nach hypotonem Stress ist in der Literatur noch nicht gegeben. Man könnte sich jedoch vorstellen, daß während des RVD Osmolyte von der Zelle abgegeben werden, die nach Rückkehr zum Kontrollmedium fehlen. Dadurch ist die Osmolarität des als „isoton“ deklarierten Kontrollmediums nunmehr hypertonisch und läßt die Zellen über das Kontrollniveau hinaus schrumpfen.

Bei diffusionsgewichteten ^{1}H-NMR-Messungen mit hohen Gradienten ist bei der experimentellen Durchführung besonders auf eine stabile Temperierung zu achten. Schwankungen der Temperatur von wenigen Kelvin führen zu starken Signaländerungen bei hohen b-Werten, welche als Zellvolumenänderung fehlinterpretiert werden könnten.

Bei den durchgeführten Experimenten fällt auf, daß die Signalschwankungen in den Messungen unterschiedlich sind. Experimentell mußte bei dem 'ct-monitoring' immer ein Kompromiß zwischen besserer Zeitauflösung und schlechterem Signal/Rauschverhältnis auf Grund kürzerer Wiederholzeiten eingegangen werden. Verwendet man nur ein Signal bei festem b-Wert, ist zeitliche Auflösung sehr hoch und die Signalschwankung kleiner als $\pm 3\%$, der Parameter D_{app} kann dann jedoch zeitlich nicht erfaßt werden.

3.5 Einfluß von Hg-Reagenzien auf die intrazelluläre Austauschzeit

Neben den intra- und extrazellulären Diffusionskonstanten D_1, D_2 bilden das intrazelluläre Volumen p_2 und die intrazelluläre Austauschzeit τ_2 die vier physiologischen Parameter des analytischen Modells aus Kapitel 2. Experimentell sind Änderungen des intrazellulären Volumens leicht zu realisieren und im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Um die intrazelluläre Austauschzeit zu verändern, kann man Quecksilberverbindungen verwenden, welche die Wasserkanäle in der Zellmembran blockieren und damit die Permeabilität verringern.

3.5.1 Wirkung von pCMBS auf Gliomzellen

Die Wirkung von pCMBS ('p-Chlormercuriobenzosulfonat') auf die Permeabilität der Zellmembran für Wasser ist an Erythrocyten eingehend untersucht [56–58]. pCMBS bindet selektiv an SH-Gruppen, bei Hg-empfindlichen Aquaporinen an Cys189, und blockiert damit die Durchlässigkeit der Wasserporen [66–74]. An Oocyten des *Xenopus laevis* wurde die Reversibilität der Blockade und die Möglichkeit der Auswaschung der Hg-Verbindung mit β-Mercaptoethanol gezeigt [67,68]. Im Gehirn wurde jedoch gerade der Wasserkanal AQP4 (MIWC) nachgewiesen, der Hg-unempfindlich ist und nicht mit pCMBS blockiert werden kann [62–65, 104]. Neueste Untersuchungen an Primärkulturen, C6 und F98 Gliomzellen zeigten, daß sowohl Hg-empfindliche als auch Hg-unempfindliche Aquaporine vorhanden sind [105].

In Abb. 3.16 ist die Änderung der Diffusionsabschwächung unter osmotischem Stress und Behandlung mit 2 mM pCMBS bei F98 Zellen dargestellt. Der Wechsel des isotonen Mediums zum hypotonen nach 30 min führt zu einer Zellschwellung auf ca. 200 % des Kontrollvolumens und wird von der Zelle auf ca. 140 % rückreguliert. Nach Zugabe von 2 mM pCMBS zu dem hypotonen Medium (2:00 h) beginnt das intrazelluläre Volumen nach 15 min rapide anzusteigen und erreicht nach einstündiger Wirkung des Hg-Reagenz über 450 % des Kontrollvolumens.

In Abb. 3.16 (oben) sind Kontrollmessungen über den gesamten b-Wertebereich gezeigt. Das Signal bei hohen b-Werten ändert sich von dem Kontrolwert in isotonem Medium (100 %) auf 160 % in hypotonem Medium und nach einstündiger pCMBS-Einwirkung auf 450 %. In Abb. 3.16 (unten) ist das intrazelluläre Volumen als Ergebnis der Auswertung der Messung im b-Wertebereich $b = [15108 \ldots 24270]$ s/mm^2 dargestellt ('ct-monitoring'). Die scheinbare Diffusionskonstante bleibt während der gesamten Messung konstant und beträgt $D = (0.061 \pm 0.002) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s.

Nach dreistündiger Meßzeit mußte die Messung abgebrochen werden, da auf Grund der starken Volumenzunahme die BMG-Fäden platzten, die Zellen ausgespült wurden und das detektierbare Signal schlagartig abfiel.

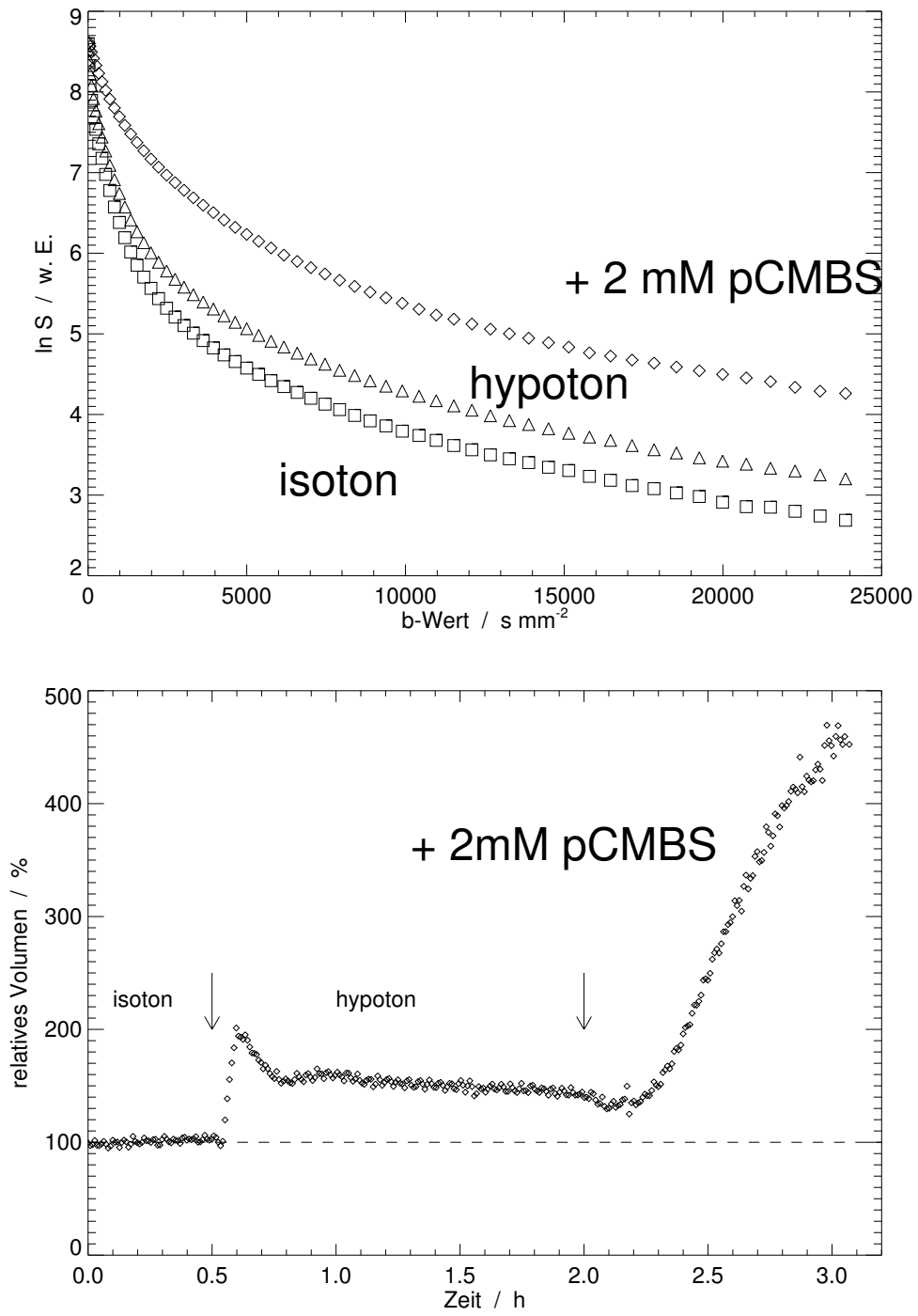


Abbildung 3.16: Änderung der Diffusionsabschwächung an F98 Zellen unter hypoosmotischem Stress und Zugabe von pCMBS. *ct*-Kontrollexperimente bei 0:14 / 1:00 / 3:00 h **(oben)** und '*ct*-monitoring' **(unten)**. Medienwechsel: isoton (Kontrolle) - hypoton (0:30 h) - hypoton + 2 mM pCMBS (2:00 h) . $t_D = 31.7$ ms, $\delta = 10$ ms.

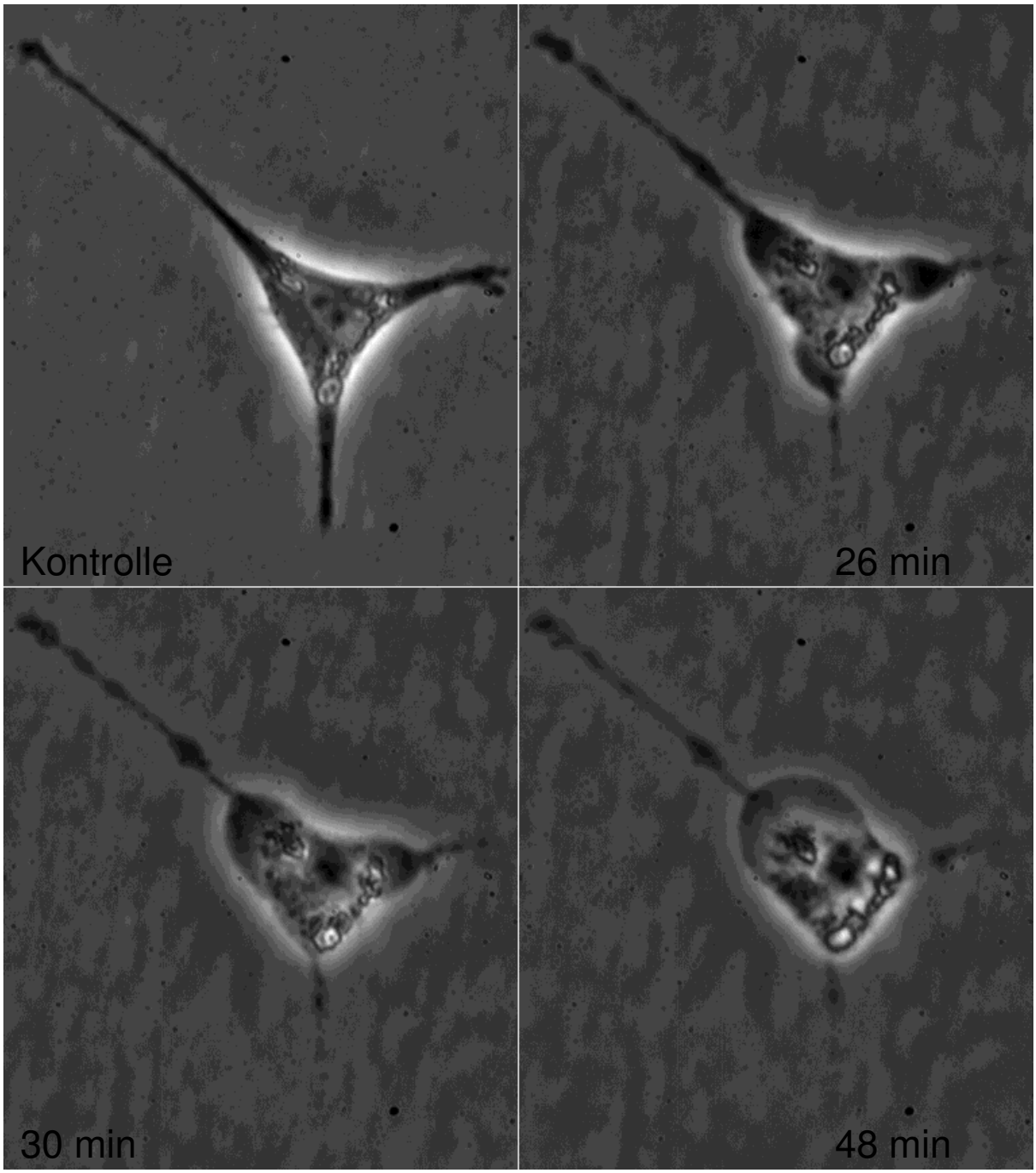


Abbildung 3.17: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer F98 Gliomzelle unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit 2 mM pCMBS.

In Abb. 3.17 sind lichtmikroskopische Aufnahmen einer F98 Zelle in normalem Zustand und nach Behandlung mit 2 mM pCMBS gezeigt. Leichte Zellschwellungen sind schon nach 10 min zusehen, besonders stark verändert sich die Zellform ungefähr 30 min nach Zugabe des Hg-Reagenzes. Beginnend mit Ausstülpungen an den Dendriten löst sich die Membran vom Cytoskelett und es bilden sich Wassersäcke, die je nach Ausbildung die Zelle eher rund oder ausgebeult anschwellen lassen.

3.5.2 Bestimmung der Austauschzeit mit dem *cg*-Experiment

Ziel der Behandlung der F98 Zellen mit Hg-Reagenzien ist der Nachweis einer möglichen Änderung der Permeabilität für Wasser durch die Zellmembran. Wenn die Permeabilität durch Blockierung der Aquaporine verringert wird, sollte sich die Austauschzeit für das intrazelluläre Wasser erhöhen. Mit dem *cg*-Experiment kann die intrazelluläre Austauschzeit τ_{intra} bestimmt werden.

In Abb. 3.18 ist ein *cg*-Experiment an F98 Zellen bei kleinen bis großen Gradientenstärken dargestellt. Die Austauschzeit wird nach Glg. 2.24 mit linearer Regression ausgewertet und ergibt

G / mT/m	83	167	250	316
τ_{intra} / ms	60.1 ± 0.4	51.2 ± 0.4	48.5 ± 0.3	50.6 ± 0.6
D / 10^{-3}mm^2/s	0.335 ± 0.002	0.098 ± 0.001	0.046 ± 0.001	0.028 ± 0.001

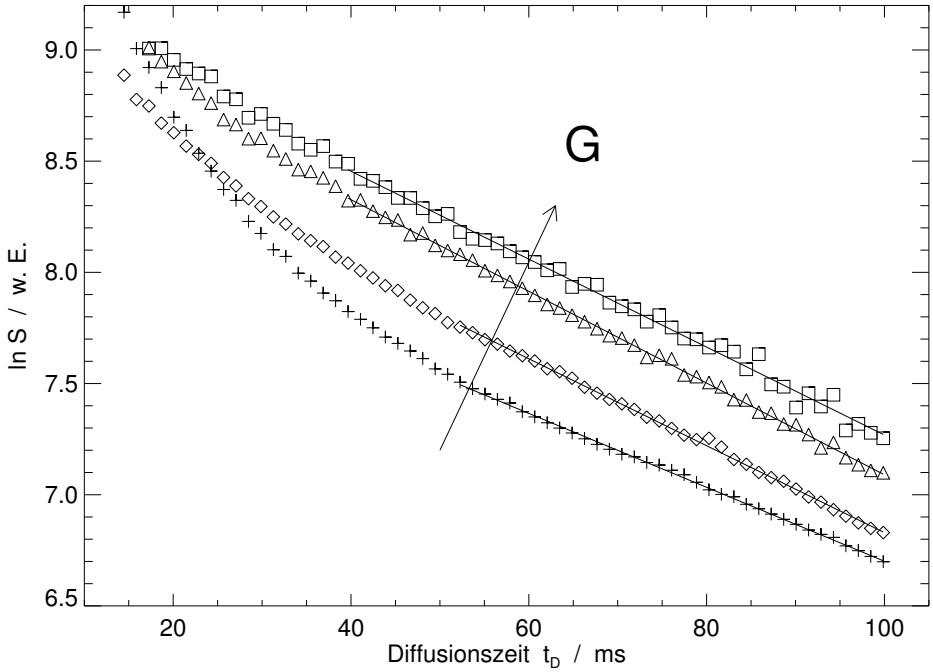
Der jeweils verwendete Bereich ist in Abb. 3.18 eingezeichnet. Zuverlässig ist die intrazelluläre Austauschzeit wiederum nur bei hohen Gradientenstärken, d.h. bei hohen q-Werten, zu ermitteln (vgl. Abb. 3.7) und ergibt $\tau_{\text{intra}} = (50.6 \pm 0.6)$ ms.

In Abb. 3.18 (unten) sind dieselben Daten *vs.* b-Wert aufgetragen, mit linearer Regression erhält man die scheinbare Diffusionskonstante D_{app}, welche ebenfalls in obiger Tabelle eingetragen sind.

Beim Vergleich der *cg*-Daten bei verschiedenen Gradientenstärken in Abb. 3.18 ist zu beachten, daß sie nicht mit gleicher Empfängerempfindlichkeit gemessen sind. Bei hohen Gradientenstärken, d.h. bei hohen b-Werten, ist die absolute Signalabschwächung im Vergleich zu niedrigen sehr viel stärker.

3.5.3 Kombiniertes *ct*/*cg*-Experiment – intrazelluläres Volumen und Austauschzeit

Um das intrazelluläre Volumen wie auch die intrazelluläre Austauschzeit zeitaufgelöst darzustellen, wird im Folgenden ein Doppelexperiment, welches abwechselnd durchgeführt wird, verwendet.



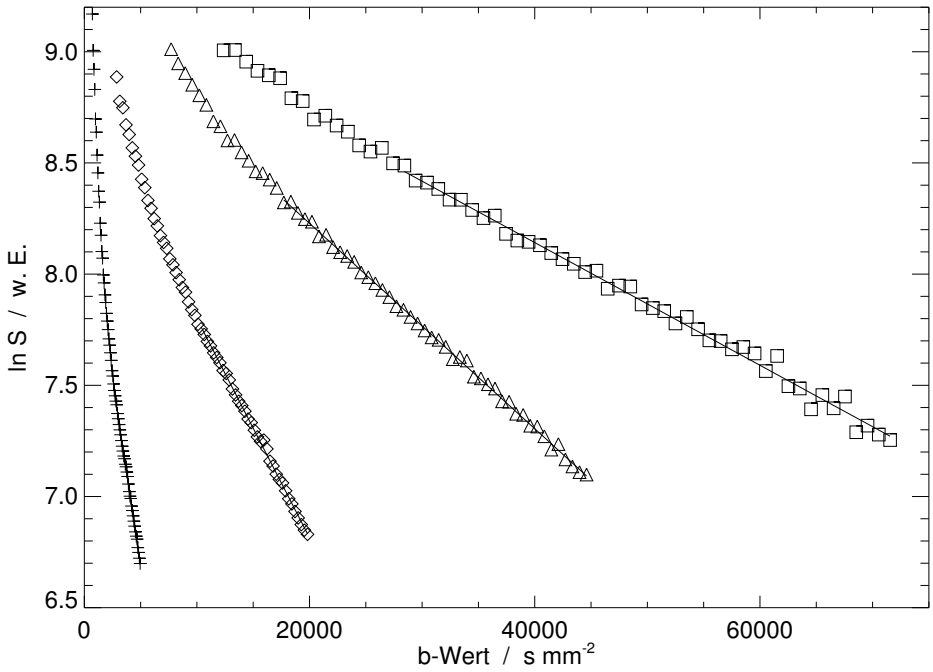


Abbildung 3.18: *cg*-Experimente an F98 Zellen bei $G = (83, 167, 250, 316)$ mT/m in der Auftragung *vs.* Diffusionszeit **(oben)** bzw. *vs.* b-Wert **(unten)**. $\tau_{\text{Echo}} = 120$ ms, $\delta = 10$ ms.

Mit einem wiederholten *ct*-Experiment läßt sich das intrazelluläre Volumen sowie die scheinbare, intrazelluläre Diffusionskonstante messen ('*ct*-monitoring'), mit einem wiederholten *cg*-Experiment die zeitliche Entwicklung der intrazellulären Austauschzeit darstellen. Es wird also jeweils ein *ct*- und ein *cg*-Experiment mit einer Zeitauflösung von 70 s durchgeführt ('*ct*-/*cg*-monitoring').

In Abb. 3.19 ist (oben) das Ergebnis des *ct*-Experiments, das relative intrazelluläre Volumen, und (unten) das Ergebnis des *cg*-Experiments, die intrazelluläre Austauschzeit, gezeigt. Nach 30 Minuten wird zu den F98 Zellen 0.5 mM pCMBS zugegeben, das Zellvolumen steigt innerhalb einer Stunde nur leicht bis 115 % an. Nach eineinhalbstündiger Einwirkung ist ein linearer Anstieg auf über 180 % des Kontrollvolumens zu beobachten. Die zugehörige intrazelluläre Diffusionskonstante steigt von $D_{\text{app}} = (0.054 \pm 0.001)$ der Kontrolle auf $D_{\text{app}} = (0.064 \pm 0.002) \cdot 10^{-3}$ mm^2/s unter Hg-Behandlung. Synchron steigt dabei die intrazelluläre Austauschzeit von $\tau_{\text{intra}} = (51.9 \pm 1.0)$ ms auf $\tau_{\text{intra}} = (59.0 \pm 1.1)$ ms nach zweistündiger Einwirkung von pCMBS.

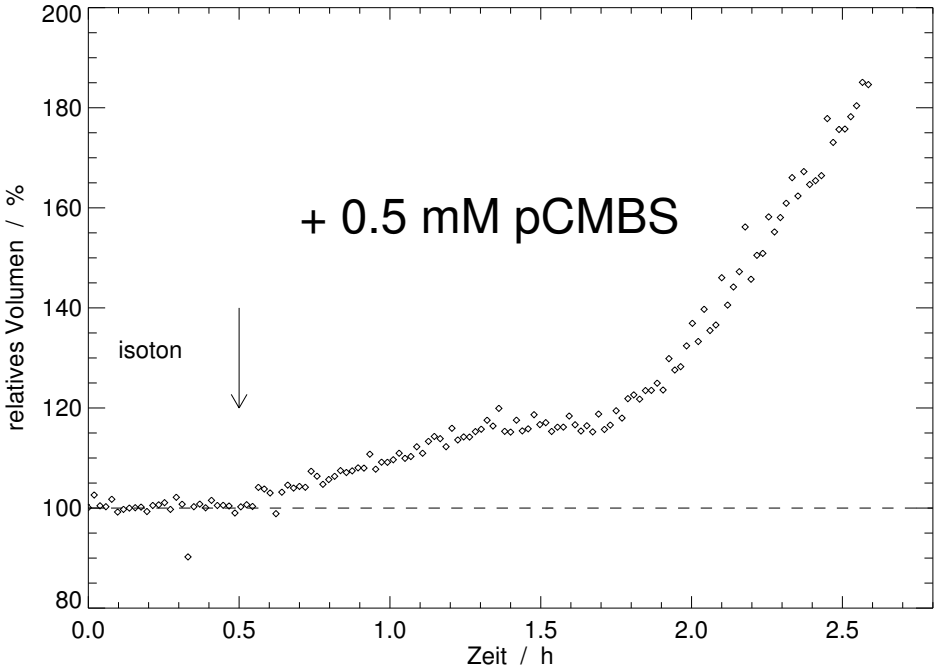
3.5.4 Diskussion

Neben der Blockierung der Hg-empfindlichen Aquaporine zeigt pCMBS noch eine Reihe weiterer toxischer Wirkungen auf die Zelle [102, 106, 107]. Die anfängliche, leichte Zellschwellung nach Behandlung mit pCMBS ist mit einer Erniedrigung der intrazellulären K^+-Konzentration und einer Aufnahme von Na^+ verbunden, was zu einer Zelldepolarisierung führt. Der Grund liegt in der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch die Hg-organische Verbindung.

Längerfristig zerstört pCMBS die F-Aktinfilamente. Bei der anfänglichen Zellschwellung kann das Cytoskelett den osmotischen Kräften noch entgegenwirken, nach ca. 30 min reißen die Filamente von der Zellmembran und lassen das intrazelluläre Volumen rapide ansteigen. Dabei ist die Wirkung von pCMBS stark von der Konzentration abhängig.

Brookes *et al.* [108–110] zeigten eine spezifische Hemmung des Glutamattransportes in Astrocytenkulturen durch $HgCl_2$, welche mit einer intrazellulären Azidifizierung gekoppelt ist.

Die durchgeführten Experimente konnten in Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen die Zunahme des intrazellulären Volumens zeigen. Da jedoch methodisch sowohl Änderungen des intrazellulären Volumens als auch der Austauschzeit das diffusionsgewichtete NMR-Signal beeinflussen, müßte das Volumen konstant gehalten werden, um Änderungen in der Austauschzeit quantifizieren zu können. Dazu bräuchte man andere Reagenzien, welche ohne diese breite toxische Wirkung die Aquaporine blockieren und damit die Permeabilität erniedrigen können.



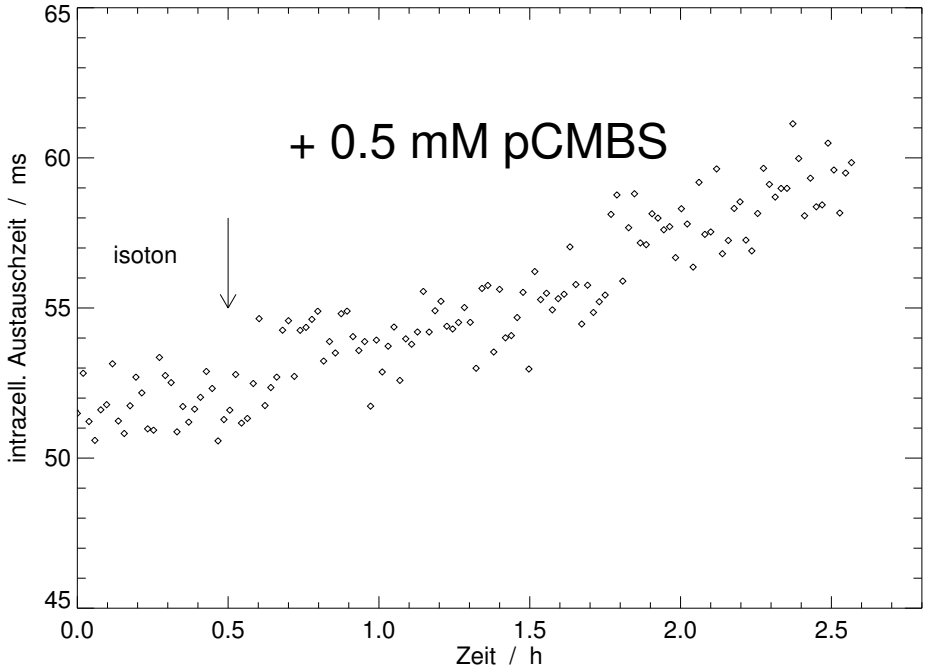


Abbildung 3.19: Kombiniertes '*ct*-/*cg*-monitoring' des intrazellulären Volumens und der intrazellulären Austauschzeit von F98 Zellen unter Einwirkung von pCMBS. Medienwechsel: isoton (Kontrolle) - isoton mit 0.5 mM pCMBS (0:30 h). *ct*-Experiment: $t_D = 31.7$ ms, $\delta = 10$ ms, $b = [15108 \ldots 24270]$ s/mm^2; *cg*-Experiment: $G = 250$ mT/m, $\delta = 8$ ms, $\tau_{\mathrm{Echo}} = 120$ ms, $t_D = [42.3 \ldots 98.3]$ ms.

3.6 Diffusionsgewichtete Bildgebung an Ratten bei verschiedenen Diffusionszeiten

Die an perfundierten Gliomzellen durchgeführten Experimente mit diffusionsgewichteter ^{1}H-NMR-Spektroskopie zeigten in Übereinstimmung mit der theoretischen Modellierung, daß die intrazelluläre Diffusion von Wasser durch die beschränkte Diffusion an permeablen Grenzen charakterisiert werden kann. Für das Verständnis der Diffusionvorgänge während der Ischämie im Gehirn ist es wichtig, die gewonnenen theoretischen Erkenntnisse und neuen experimentellen Methoden auf die Situation in Gehirngewebe zu übertragen.

Als Modell für das menschliche Gehirn werden Diffusionsexperimente an narkotisierten Wistarratten in einem Tiertomographen durchgeführt, an dem erheblich höhere Magnetfeldgradientenstärken zur Verfügung stehen als an einem Ganzkörpertomographen. Analog zu den Experimenten an Zellkulturen werden ct-Experimente bei verschiedenen Diffusionszeiten durchgeführt. Aus der Zeitabhängigkeit der Kurven kann eine mittlere, intrazelluläre Austauschzeit für das Rattenhirn angegeben werden, welche in Kap. 2.3.7 als Parameter in das analytische Modell eingeht.

Für die Bildgebung an Wistarratten *in vivo* wird die UFLARE-Sequenz mit einem ct-Experiment verwendet (s. Kap. 3.2.3). Bei konstanter Echozeit sind die ct-Experimente bei gleichen q-Werten, d. h. Gradientenstärken ausgeführt.

In Abb. 3.20 sind die ct-Kurven eines ausgewählten Voxels im Striatum bei Diffusionszeiten von $t_D = [14 \ldots 60]$ ms dargestellt (32×32 Bildmatrix, Voxelgröße $1{\times}1{\times}5$ mm^3). In der Auftragung *vs.* b-Wert (oben) ist auf Grund der starken Streuung der Meßwerte keine Diffusionszeitabhängigkeit zu erkennen. Die scheinbare Diffusionskonstante (negative Steigung) nimmt mit zunehmendem b-Wert stark ab. In der Auftragung *vs.* $\tilde{q}^2$ (unten) nimmt die Signalkomponente bei hohen q-Werten mit zunehmender Diffusionszeit ab.

In Analogie zu den theoretischen Modellrechnungen und den zweidimensionalen ct-Experimenten an Zellen kann aus der Konstanz der Steigungen geschlossen werden, daß die intrazelluläre Diffusion in Gewebe beschränkt ist. Aus dem Signalabfall der vier Kurven kann nach Glg. 2.24 die intrazelluläre Austauschzeit mit linearer Regression für jedes Voxel bestimmt werden.

Daraus ergibt sich eine Verteilung von Austauschzeiten über das gesamte Rattenhirn, welche in Abb. 3.21 als Histogramm dargestellt ist. Die Anpassung der Verteilung an eine Gaußkurve liefert für zwei durchgeführte Messungen $\tau_{\text{intra}} = (26.5 \pm 5.4)$ ms und $\tau_{\text{intra}} = (24.0 \pm 4.5)$ ms.

Zusammenfassend zeigen diese diffusionsgewichteten Bildgebungsexperimente bei hohen q-Werten, daß auch in Gehirngewebe die intrazelluläre Diffusion mit der Theorie der beschränkten Diffusion an permeablen Grenzen beschrieben werden kann. Die mittlere, intrazelluläre Austauschzeit des Rattenhirns kann zu $\tau_{\text{intra}} = (25 \pm 6)$ ms angegeben werden.

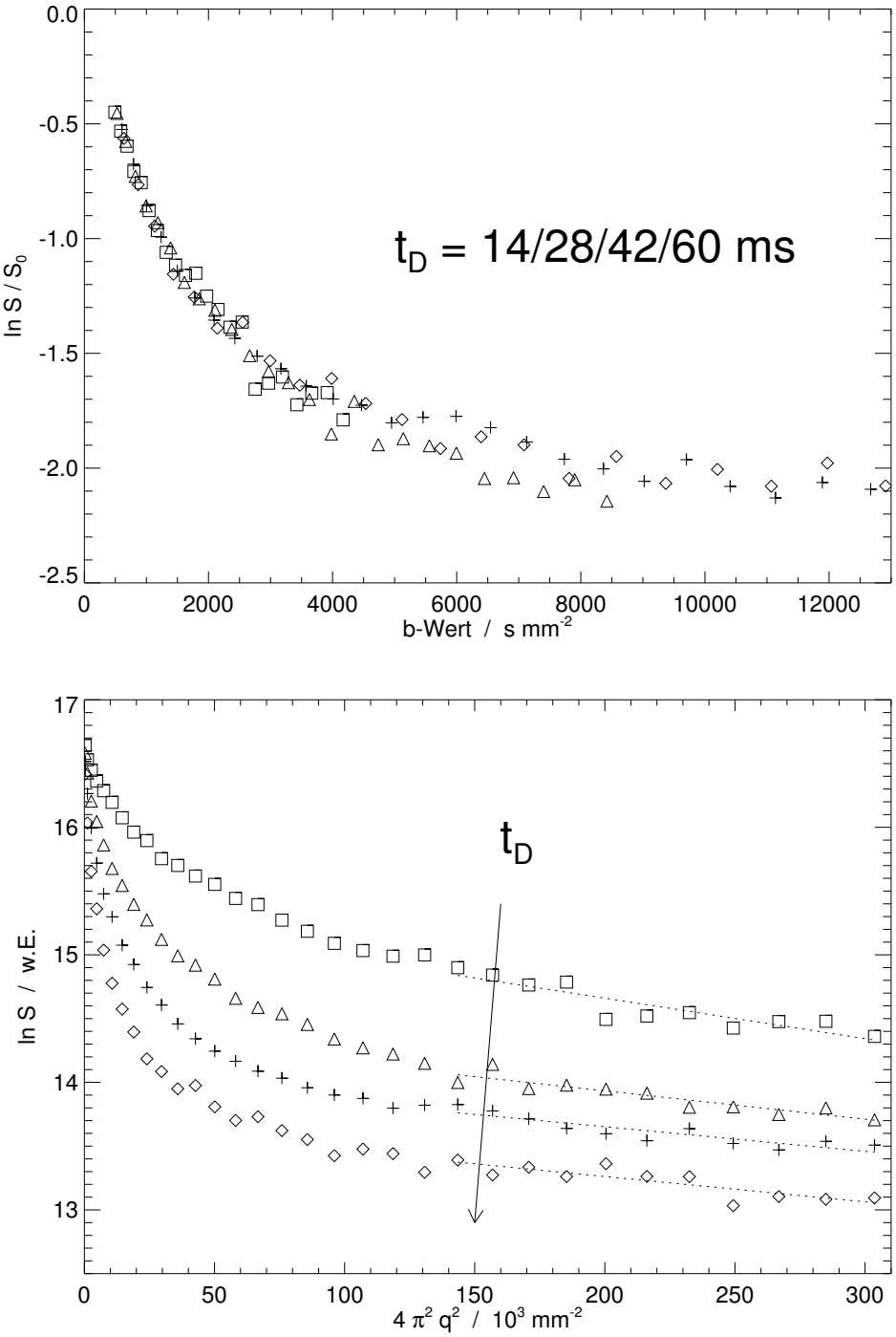


Abbildung 3.20: ct-Bildgebungsexperiment bei $t_D = [13.7(\square), 27.7(\triangle), 41.7(+), 59.7(\diamond)]$ ms. Dargestellt sind die Daten eines ausgewählten Voxels aus dem Striatum. Parameter: 32×32 Bildmatrix, Voxelgröße $1\times1\times5$ mm^3, Mittelungen $N = 28$, $\delta = 10$ ms, $\tau_{\mathrm{Echo}} = 80.5$ ms.

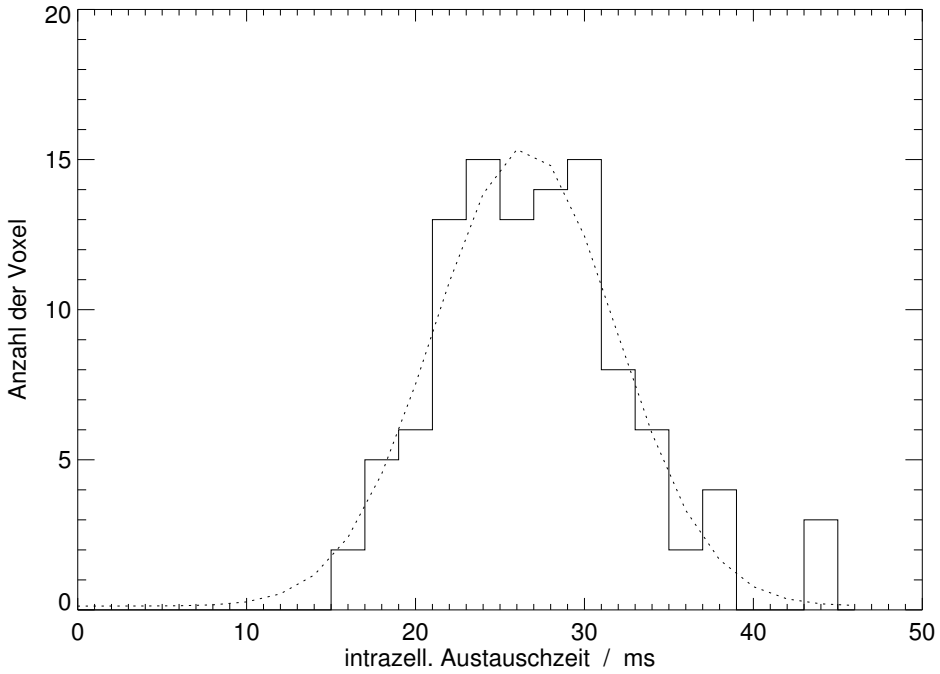


Abbildung 3.21: Histogrammverteilung der intrazellulären Austauschzeiten im Rattenhirn mit Anpassung an eine Gaußkurve, bestimmt aus einer Serie von diffusionsgewichten *ct*-Bildgebungsexperimenten (siehe Text).

Ausblick

Weitere diffusionsgewichtete Experimente an Ratten sind erforderlich, um die Grundlagen des Diffusionskontrastes im Gehirn besser zu verstehen.

Einerseits können systematische Experimente bei kurzen Diffusionszeiten *und* hohen q-Werten Aufschluß über die tatsächliche, intrazelluläre Diffusionskonstante ergeben. Der Übergang von der freien zur beschränkten Diffusion im Intrazellulärraum liegt vermutlich in einem Zeitbereich ($t_D < 10$ ms), der noch mit NMR-Methoden am lebenden Organismus untersucht werden kann. In solchen zeitabhängigen Messungen können vielleicht auch die extrazellulären von den intrazellulären Anteilen des diffusionsgewichteten Signals getrennt werden.

Andererseits sind die Gewebeeigenschaften im Gehirn stark anisotrop und müssen experimentell wie theoretisch berücksichtigt werden. Dies wird bei kleinen b-Werten mit der Messung eines makroskopischen Diffusionstensors [111–115] erreicht.

Eine vollständige Modellierung der Diffusion von Wasser in gesundem und pathologischen Gehirngewebe muß nicht nur die physiologischen Vorgänge bei der Zellschwellung, sondern auch eventuelle Permeabilitätsänderungen, Änderungen der Perfusion wie auch die morphologische Anisotropie berücksichtigen.

Literaturverzeichnis

[1] E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.*, 42(1):288, 1965.

[2] E. O. Stejskal. Use of spin echoes in a pulsed magnetic-field gradient to study anisotropic, restricted diffusion and flow. *J. Chem. Phys.*, 43(10):3597, 1965.

[3] M. E. Moseley, K. Butts, M. A. Yenari, M. Marks, and A. de Crespigny. Clinical aspects of DWI. *NMR in Biomed.*, 8:387, 1995.

[4] D. Davis, J. Ulatowski, S. Eleff, M. Izuta, S. Mori, D. Shungu, and P. C. M. van Zijl. Rapid monitoring of changes in water diffusion coefficients during reversible ischemia in cat and rat brain. *Magn. Res. Med.*, 31:454, 1994.

[5] P. C. M. van Zijl, C. T. W. Moonen, P. Faustino, J. Pekar, O. Kaplan, and J. S. Cohen. Complete separation of intracellular and extracellular information in NMR spectra of perfused cells by diffusion-weighted spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3228, 1991.

[6] T. Niendorf, R. M. Dijkhuizen, D. G. Norris, M. van L. Campagne, and K. Nicolay. Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue: Implications for DWI. *Magn. Res. Med., in press*, 36, 1996.

[7] H. Weingärtner. Self diffusion in liquid water. A reassessment. *Zeitschrift für phys. Chemie*, 132:129, 182.

[8] P. T. Callaghan. Principles of nuclear magnetic resonance microscopy. *Clarendon Press, Oxford*, 1991.

[9] D. Le Bihan. Molecular diffusion, tissue microdynamics and microstructure. *NMR in Biomed.*, 8:375, 1995.

[10] P. P. Mitra, P. N. Sen, and L. M. Schwartz. Short-time behavior of the diffusion coefficient as a geometrical probe of porous media. *Phys. Rev. B*, 47(14):8565, 1993.

[11] L. L. Latour, P. P. Mitra, R. L. Kleinberg, and C. H. Sotak. Time-dependent diffusion coefficient of fluids in porous media as a probe of surface-to-volume ratio. *J. Magn. Res. A*, 101:342, 1993.

[12] J. E. Tanner and E. O. Stejskal. Restricted self-diffusion of protons in colloidal systems by the pulsed-gradient, spin-echo method. *J. Chem. Phys.*, 49(4):1768, 1968.

[13] P. T. Callaghan, A. Coy, D. MacGowan, K. J. Packer, and F. O. Zelaya. Diffraction-like effects in NMR diffusion studies of fluids in porous solids. *Nature*, 351:467, 1991.

[14] J. R. Zimmerman and W. E. Brittin. Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems: Lifetime of a water molecule in an adsorbing phase on silica gel. *J. Phys. Chem.*, 61:1328, 1957.

[15] H. Winkler and A. Gutsze. On two-component NMR relaxation. *Adv. Mol. Rel. Int. Proc.*, 21:159, 1981.

[16] J. Kärger, H. Pfeifer, and W. Heink. Principles and application of self-diffusion measurements by nuclear magnetic resonance. *Adv. Magn. Res.*, 12:1, 1988.

[17] J. W. Haus and K. W. Kehr. Diffusion in regular and disordered lattices. *Phys. Rep.*, 150(5,6):263, 1987.

[18] J. R. Hunter, P. D. Craig, and H. E. Phillips. On the use of random walk models with spatially variable diffusivity. *J. Comp. Phys.*, 106:366, 1993.

[19] B. P. Hills, K. M. Wright, and P. S. Belton. The effects of restricted diffusion in nuclear magnetic resonance microscopy. *Magn. Res. Imag.*, 8:755, 1990.

[20] W. B. Hyslop and P. C. Lauterbur. Effects of restricted diffusion on microscopic NMR imaging. *J. Magn. Res.*, 94:501, 1991.

[21] B. Pütz, D. Barsky, and K. Schulten. Edge enhancement by diffusion in microscopic magnetic resonance imaging. *J. Magn. Res.*, 97:27, 1992.

[22] T. A. Zawodzinski, T. E. Springer, M. Neeman, and L. O. Sillerud. Diffusion barriers in pulsed-gradient spin-echo NMR microscopy. *Israel J. Chem.*, 32(2), 1992.

[23] B. Pütz. Diffusionseffekte in der Kernspintomographie und Kernspinmikroskopie. *Dissertation, TU München*, 1994.

[24] H.-G. Lipinski. Monte Carlo simulation of extracellular diffusion in brain tissues. *Phys. Med. Biol.*, 35(3):441, 1990.

[25] A. Szafer, J. Zhong, and J. C. Gore. Theoretical model for water diffusion in tissues. *Magn. Res. Med.*, 33:697, 1995.

[26] M. L. G. Joy and R. M. Henkelman. Relative echo height is independently related to gradient amplitude, duration, and separation if diffusion is restricted. *Proc. Soc. Magn. Res., Berlin*, page 1205, 1992.

[27] C. Nicholson and M. Phillips. Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J. Physiol.*, 321:225, 1981.

[28] A. Lehmenkühler, E. Sykova, J. Svoboda, K. Zilles, and C. Nicholson. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*, 55:351, 1993.

[29] J. A. Helpern, R. J. Ordidge, and R. A. Knight. The effect of cell membrane water permeability on the apparent diffusion coefficient of water. *Proc. Soc. Magn. Res., Berlin*, page 1201, 1992.

[30] P. S. Belton and R. G. Ratcliffe. NMR and compartmentation in biological tissues. *Prog. NMR Spec.*, 17:241, 1985.

[31] K. Zierler. A critique of compartmental analysis. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:531, 1981.

[32] F. Crick. Diffusion in embryogenesis. *Nature*, 255:420, 1970.

[33] J. E. Tanner. Transient diffusion in a system partitioned by permeable barriers. application to NMR measurement. *J. Chem. Phys.*, 69(4):1748, 1978.

[34] E. von Meerwall and R. D. Ferguson. Interpreting pulsed-gradient spin-echo diffusion experiments with permeable membranes. *J. Chem. Phys.*, 74(12):6956, 1981.

[35] W. R. Redwood, E. Rall, and W. Perl. Red cell membrane permeability deduced from bulk diffusion coefficients. *J. Gen. Phys.*, 64:706, 1974.

[36] B. Klösgen, H. Schönert, and B. Deuticke. Measurement of rapid membrane permeability in cell suspensions by application of a generalized capillary method. *Biochim. Biophys. Acta*, 939:29, 1988.

[37] P. P. Mitra and P. N. Sen. Effects of microgeometry and surface relaxation on NMR pulsed-field-gradient experiments: Simple pore geometries. *Phys. Rev. B*, 45(1):143, 1992.

[38] D. G. Cory and A. N. Garroway. Measurement of translational displacement probabilities by NMR: An indicator of compartmentation. *Magn. Res. Med.*, 14:435, 1990.

[39] M. D. King, J. Houseman, S. A. Roussel, N. van Bruggen, S. R. Williams, and D. G. Gadian. q-space imaging of the brain. *Magn. Res. Med.*, 32:707, 1994.

[40] P. P. Mitra, P. N. Sen, L. M. Schwartz, and P. Le Doussal. Diffusion propagator as a probe of the structure of porous media. *Phys. Rev. Lett.*, 68(24):3555, 1992.

[41] P. N. Sen, L. M. Schwartz, P. P. Mitra, and B. I. Halperin. Surface relaxation and the long-time diffusion coefficient in porous media: Periodic geometries. *Phys. Rev. B*, 49(1):215, 1994.

[42] A. Szafer, J. Zhong, A. W. Anderson, and J. C. Gore. Diffusion-weighted imaging in tissues: Theoretical models. *NMR in Biomed.*, 8:289, 1995.

[43] L. L. Latour, K. Svoboda, P. P. Mitra, and C. H. Sotak. Time-dependent diffusion of water in a biological model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1229, 1994.

[44] D. G. Norris, T. Niendorf, and D. Leibfritz. Healthy and infarcted brain tissues studied at short diffusion times: the origin of apparent restriction and the reduction in apparent diffusion coefficient. *NMR in Biomed.*, 7:304, 1994.

[45] G. J. Stanisz, A. Szafer, G. A. Wright, and R. M. Henkelman. An analytical model of restricted diffusion in bovine. *Magn. Res. Med., in press*, 1996.

[46] J. E. Tanner. Intracellular diffusion of water. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224(2):416, 1983.

[47] J. Andrasko. Water diffusion permeability of human erythrocytes studied by a pulsed gradient NMR technique. *Biochim. Biophys. Acta*, 428:304, 1976.

[48] A. W. Anderson, J. Zhong, O. A. C. Petroff, A. Szafer, B. R. Ransom, J. W. Prichard, and J. C. Gore. Effects of osmotically driven cell volume changes on diffusion-weighted imaging of the rat optic nerve. *Magn. Res. Med.*, 35:162, 1996.

[49] A. van der Toorn, E. Sykova, R. M. Dijkhuizen, I. Vorisek, L. Vargova, E. Skobisova, M. van L. Campagne, T. Reese, and K. Nicolay. Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia. *Magn. Res. Med.*, 36:52, 1996.

[50] J. Andrasko and S. Forsen. NMR study of rapid water diffusion across lipid bilayers in dipalmitoyl lecithin vesicles. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 60(2):813, 1974.

[51] J. Andrasko. Measurement of membrane permeability to slowly penetrating molecules by a pulse gradient NMR method. *J. Magn. Res.*, 21:479, 1976.

[52] D. G. Stout, R. M. Cotts, and P. L. Steponkus. The diffusional water permeability of *elodea* leaf cells as measured by NMR. *Can. J. Bot.*, 55:1623, 1977.

[53] D. G. Stout, P. L. Steponkus, L. D. Bustard, and R. M. Cotts. Water permeability of *chlorella* cell membranes by NMR. *Plant Physiol.*, 62:146, 1978.

[54] T. Conlon and R. Outhred. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique. *Biochim. Biophys. Acta*, 288:354, 1972.

[55] R. Outhred and T. Conlon. The volume dependence of the erythrocyte water diffusion permeability. *Biochim. Biophys. Acta*, 318:446, 1973.

[56] G. Benga, V. I. Pop, O. Popescu, and V. Borza. On measuring the diffusional water permeability of human red blood cells and ghosts by nuclear magnetic resonance. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 21:87, 1990.

[57] G. Benga, H. Matei, T. Borza, D. Porutiu, and C. Lupse. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. V-rabbit. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B(2):281, 1993.

[58] G. Benga. Water channels in membranes. *Cell Biol. Int.*, 18(8):829, 1994.

[59] R. I. Macey and J. Brahm. Osmotic and diffusional water permeability in red cells: Methods and interpretations. *Water Transport in Biological Membranes, CRC-Press, Boca Raton, Florida*, II:25, 1989.

[60] M. D. Herbst and J. H. Goldstein. Cell water transport measurement by NMR. A three-compartment model which includes cell aggregation. *J. Magn. Res.*, 60:299, 1984.

[61] M. D. Herbst and J. H. Goldstein. A review of water diffusion measurement by NMR in human red blood cells. *Am. J. Physiol.*, 256:C1097, 1989.

[62] J. S. Jung, R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban, and P. Agre. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:13052, 1994.

[63] H. Hasagawa, T. Ma, W. Skach, M. A. Mattay, and A. S. Verkman. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J. Biol. Chem.*, 269(8):5497, 1994.

[64] B. Yang, T. Ma, and A. S. Verkman. cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. *J. Biol. Chem.*, 270(39):22907, 1995.

[65] A. Frigeri, M. A. Gropper, C. W. Turck, and A. S. Verkman. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:4328, 1995.

[66] R. I. Macey. Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.*, 246:C195, 1984.

[67] A. S. Verkman. Water channels in cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 54:97, 1992.

[68] P. Agre, G. M. Preston, B. L. Smith, J. S. Jung, S. Raina, C. Moon, W. B. Guggino, and S. Nielsen. Aquaporin CHIP: The archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.*, 265:F463, 1993.

[69] C. H. van Os, P. M. T. Deen, and J. A. Dempster. Aquaporins: Water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1197:291, 1994.

[70] M. J. Chrispeels and P. Agre. Aquaporins: Water channel proteins of plant and animal cells. *TIBS*, 19:421, 1994.

[71] T. Walz, B. L. Smith, P. Agre, and Engel A. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J.*, 13(13):2985, 1994.

[72] M. A. Knepper. The aquaporin family of molecular water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6255, 1994.

[73] P. Agre, D. Brown, and S. Nielsen. Aquaporin water channels: Unanswered questions and unresolved controversies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:472, 1995.

[74] D. L. Connolly, C. M. Shanahan, and P. L. Weissberg. Water channels in health and disease. *Lancet*, 347:210, 1996.

[75] P. K. Seitz, D. C. Chang, C. F. Hazlewood, H. E. Rorschach, and J. S. Clegg. The self-diffusion of water in artemia cysts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210(2):517, 1981.

[76] E. C. Trantham, H. E. Rorschach, J. S. Clegg, C. F. Hazlewood, R. M. Nicklow, and N. Wakabayashi. Diffusive properties of water in artemia cysts as determined from quasi-elastic neutron scattering spectra. *Biophys. J.*, 45:927, 1984.

[77] K. J. Packer and T. C. Sellwood. Proton magnetic resonance studies of hydrated stratum corneum. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, 74:1592, 1978.

[78] P. T. Callaghan, K. W. Jolley, and R. S. Humphrey. Diffusion of fat and water in cheese as studied by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance. *J. Coll. Int. Sci.*, 93(2):521, 1983.

[79] J. W. C. van der Veen, P. van Gelderen, J. H. N. Creyghton, and W. M. M. J. Bovee. Diffusion in red blood cell suspensions: Separation of the intracellular and extracellular NMR sodium signal. *Magn. Res. Med.*, 29:571, 1993.

[80] U. Pilatus, H. Shim, D. Artemov, D. Davis, and J. van Zijl P. C. M., Glickson. Intracellular volume and apparent diffusion constants of perfused cancer cell cultures as measured by NMR. *Magn. Res. Med., in press*, 36, 1996.

[81] K. G. Helmer, B. J. Dardzinski, and C. H. Sotak. The application of porous-media theory to the investigation of time-dependent diffusion in *in vivo* systems. *NMR in Biomed.*, 8:297, 1995.

[82] U. Flögel, T. Niendorf, N. Serkova, A. Brand, J. Henke, and D. Leibfritz. Changes in organic solutes, volume, energy state, and metabolism associated with osmotic stress in a glial cell line: A multinuclear NMR study. *Neurochem. Res.*, 20(7):793, 1995.

[83] U. Flögel. NMR-Untersuchungen zur Anoxie, Ischämie, pH- und Volumen-Regulation in Gehirnzellkulturen. *Dissertation, Universität Bremen*, 1994.

[84] N. Serkova. Einfluß von immunsuppressiven Medikamenten auf den Stoffwechsel von neuronalen und glialen Zellinien nachgewiesen mit multinuklearer NMR-Spektroskopie. *Dissertation, Universität Bremen*, 1996.

[85] D. G. Norris. Ultrafast low-angle RARE: U-FLARE. *Magn. Res. Med.*, 17:539, 1991.

[86] D. G. Norris, P. Börnert, T. Reese, and D. Leibfritz. On the application of ultra-fast RARE experiments. *Magn. Res. Med.*, 27:142, 1992.

[87] D. G. Norris and P. Börnert. Coherence and interference in ultrafast RARE experiments. *J. Magn. Res. A*, 105:123, 1993.

[88] Landolt-Börnstein. Zahlenwerte und Funktionen. *Springer*, 5a:581, 1969.

[89] N. Serkova, J. Pfeuffer, U. Flögel, and D. Leibfritz. Astrocyte swelling and changes in metabolite concentrations during immunosuppressive stress. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., New York*, page 106, 1996.

[90] A. H. Wyllie, J. F. R. Kerr, and A. R. Curie. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cyt.*, 68:251, 1980.

[91] J. Henke, U. Flögel, J. Pfeuffer, J. Engelmann, and D. Leibfritz. Miltefosine induced apoptosis in a human tumour cell line monitored by C13-NMR spectroscopy. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., New York*, page 1128, 1996.

[92] J. Henke, U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Multinuclear NMR study of membrane lipids during apoptosis induced by miltefosine in human KB cells. *MAG*MA*, Supp. IV(2):107, 1996.

[93] P. R. Walker, C. Smith, T. Youdale, J. LeBlanc, J. F. Whitefield, and M. Sikorska. Topoisomerase II - reactive chemotherapeutic drugs induces apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.*, 51:1078, 1991.

[94] T. Niendorf. Entwicklung diffusionsgewichteter NMR-Methoden und ihre Anwendung zur Charakterisierung der Wasserdiffusion in gesundem und ischämischem Gehirngewebe. *Dissertation, Universität Bremen*, 1995.

[95] M. P. E. van Heeswijk and C. H. van Os. Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J. Membrane Biol.*, 92:183, 1986.

[96] R. Ye and A. S. Verkman. Simultaneous optical measurements of osmotic and diffusional water permeability in cells and liposomes. *Biochem.*, 28(2):824, 1989.

[97] A. N. van Hoek, M. D. de Jong, and C. H. van Os. Effects of dimethylsulfoxide and mercurial sulfhydryl reagents on water and solute permeability of rat kidney brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1030:203, 1990.

[98] L. Faff-Michalak, A. Reichenbach, D. Dettmer, K. Kellner, and J. Albrecht. K^+-, hypoosmolarity-, and NH_4^+-induced taurine release from cultured rabbit müller cells: Role of Na^+ and Cl^- ions and relation to cell volume changes. *Glia*, 10:114, 1994.

[99] G. Roy. Channels for amino acids and metabolites activated by cell volume regulation. *Jpn. J. Physiol.*, 44(2):37, 1994.

[100] E. Brochiero, U. Banderali, S. Lindenthal, C. Raschi, and J. Ehrenfeld. Basolateral membranechloride permeability of A6 cells: Implication in cell volume regulation. *Pflugers Arch*, 431(1):32, 1995.

[101] J. K. Foskett, M. M. M. Wong, G. Sue a Quan, and M. A. Robertson. Isosmotic modulation of cell volume and intracellular ion activities during stimulation of single exocrine cells. *J. Exp. Zool.*, 268:104, 1994.

[102] J. W. Mills, E. M. Scwiebert, and B. A. Stanton. Evidence for the role of actin filaments in regulating cell swelling. *J. Exp. Zool.*, 268:111, 1994.

[103] P. A. Watson. Function follows form: Generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB J.*, 5:2013, 1991.

[104] A. Frigeri, M. A. Gropper, F. Umenishi, M. Kawashima, D. Brown, and A. S. Verkman. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J. Cell. Sci.*, 108(9):2993, 1995.

[105] S. Bröer. *Universität Tübingen, pers. Mitteilung.*

[106] A. Kleinzeller and J. W. Mills. K^+-induced swelling of the dogfish shark rectal gland cells is associated with changes of the cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*, 1014:40, 1989.

[107] A. Kleinzeller, G. W. Booz, J. W. Mills, and F. N. Ziyadeh. pCMBS-induced swelling of dogfish rectal gland cells: Role of the Na^+,K^+-ATPase and the cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*, 1025:21, 1990.

[108] N. Brookes. Specificity and reversibility of the inhibition by $HgCl_2$ of glutamate transport in astrocyte cultures. *J. Neurochem.*, 50:1117, 1988.

[109] N. Brookes and D. A. Kristt. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by $HgCl_2$ and methylmercury in astrocytes: Selectivity and reversibility. *J. Neurochem.*, 53:1228, 1989.

[110] T. N. Nagaraja and N. Brookes. Mercuric chloride uncouples glutamate uptake from the countertransport of hydroxyl equivalents. *Am. J. Physiol., in press*, page C177, 1996.

[111] P. J. Basser, J. Mattiello, and D. LeBihan. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys. J.*, 66:259, 1994.

[112] P. J. Basser, J. Mattiello, and D. LeBihan. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J. Magn. Res. B*, 103:247, 1994.

[113] J. Mattiello, P. J. Basser, and D. LeBihan. Analytical expressions for the b matrix in NMR diffusion imaging and spectroscopy. *J. Magn. Res. A*, 108:131, 1994.

[114] R. M. Henkelman, G. J. Stanisz, J. K. Kim, and M. J. Bronskill. Anisotropy of NMR properties of tissues. *Magn. Res. Med.*, 32:592, 1994.

[115] C. Beaulieu and P. S. Allen. Determinants of anisotropic water diffusion in nerves. *Magn. Res. Med.*, 31:394, 1994.

Veröffentlichungen

J. Pfeuffer, C. Meier, W. Dreher, and D. Leibfritz. Modelling of changes in the ADC during ischemic tissue swelling: Influences of intracellular restrictions and extracellular tortuosity. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., Vancouver, submitted*, 1997.

J. Pfeuffer, S. Bröer, A. Bröer, U. Flögel, and D. Leibfritz. Water channels in glial cells detected by diffusion weighted ^{1}H NMR spectroscopy. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., Vancouver, submitted*, 1997.

U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Metabolic regulation during recovery from chronic osmotic stress in glial cells studied by multinuclear NMR spectroscopy. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., Vancouver, submitted*, 1997.

U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Alterations in glial cell metabolism during oxygen deprivation studied by multinuclear NMR spectroscopy. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., Vancouver, submitted*, 1997.

C. Zwingmann, U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Changes in cell volume and organic osmolytes in glial cells during exposure to NH_4Cl studied by NMR spectroscopy. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., Vancouver, submitted*, 1997.

N. Serkova, U. Flögel, J. Pfeuffer, U. Christians, and D. Leibfritz. Assessment of the mechanism of astrocyte swelling induced by the immunosuppressants using multinuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta, submitted*, 1997.

J. Pfeuffer, U. Flögel, N. Serkova, W. Dreher, and D. Leibfritz. Water diffusion measurements in perfused cell cultures: Can mercurials induce permeability changes in glial cells ? *MAG*MA*, Supp. IV(2):264, 1996.

U. Flögel, W. Willker, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Alterations in glial metabolism during chronic osmotic stress studied by ^{13}C-NMR spectroscopy. *MAG*MA*, Supp. IV(2):105, 1996.

J. Henke, U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Multinuclear NMR study of membrane lipids during apoptosis induced by miltefosine in human KB cells. *MAG*MA*, Supp. IV(2):107, 1996.

N. Serkova, J. Pfeuffer, U. Flögel, and D. Leibfritz. NMR application to the evaluation of volume regulation in primary astrocytes under pathological conditions. *EENC Paris*, page 339, 1996.

N. Serkova, U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Astrocyte swelling and metabolic alterations upon osmotic stress by multinuclear MRS. *J. Neurochem.*, 66(Supp. 2):S91, 1996.

U. Flögel, W. Willker, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Regulation of glial lipid metabolism during osmotic stress studied by ^{13}C-NMR spectroscopy. *Neurochemistry, ed. by A. W. Teelken and J. Korf, Plenum, New York*, 1996.

J. Pfeuffer, U. Flögel, N. Serkova, W. Dreher, and D. Leibfritz. Restricted diffusion and exchange of water in perfused cell cultures studied by two-dimensional MR measurements. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., New York*, page 261, 1996.

N. Serkova, J. Pfeuffer, U. Flögel, and D. Leibfritz. Astrocyte swelling and changes in metabolite concentrations during immunosuppressive stress. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., New York*, page 106, 1996.

N. Serkova, U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Volume regulation and metabolic alterations in primary astrocytes upon osmotic stress. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., New York*, page 101, 1996.

J. Henke, U. Flögel, J. Pfeuffer, J. Engelmann, and D. Leibfritz. Miltefosine induced apoptosis in a human tumour cell line monitored by C13-NMR spectroscopy. *Proc. Int. Soc. Magn. Res., New York*, page 1128, 1996.

U. Flögel, J. Pfeuffer, and D. Leibfritz. Effect of ibuprofen on swelling-induced alterations in cell metabolism, studied by multinuclear NMR spectroscopy. *Research Report, Dolorgiet*, 1995.

J. Pfeuffer, D. G. Norris, T. Niendorf, and D. Leibfritz. Monte Carlo modelling of pulsed gradient spin echo experiments in ischemic brain tissue. *Proc. Soc. Magn. Res., Nice*, page 1382, 1995.

A. Grupp, J. Pfeuffer, and M. Mehring. ^{13}C hyperfine interaction in the triplet state of C_{60}: An electron spin echo envelope modulation study. Fullerides and fulleroids. *World Scientific Publishing*, 1995.

J. Pfeuffer. Hyperfein-Korrelationsspektroskopie mit Puls-ESR. *Diplomarbeit, Uni Stuttgart*, 1994.

J. Pfeuffer and H. Presting. Modellierung von Rekombinationsmechanismen beim Stromtransport in p-n-Übergängen. *Forschungsbericht Daimler-Benz*, 1992.

Zum Beschluß bedanke ich mich bei

... Herrn Prof. Dr. Dieter Leibfritz für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, seine Offenheit zur Diskussion und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

... Herrn Dr. Wolfgang Dreher für ein immer offenes Betreuerohr, seine geduldige Auseinandersetzung mit dem anfänglichen Theoriewirrwarr bis zur klaren Formung der Gedanken und seine außerordentlichen Beiträge zur Hebung der philosophisch-moralischen Melodie der Tomographiker.

... Herrn Dr. David Norris für die Einführung in das Dickicht der Diffusion – anfangs undurchdringbar scheinend konnten mir seine Ideen und Ratschläge den Weg weisen.

... Herrn Dr. Ulrich Flögel für die fruchtbare, wechselseitige Zusammenarbeit bei allen Zellmessungen – sein sonniges Gemüt ist mir Trost bei jeder Bremer Wetterlage.

... Herrn Prof. Dr. Adalbert Mayer-Heinricy für die Begutachtung und sein immer freundliches und aufmunterndes Interesse an dieser Arbeit.

... der Ernst A. C. Lange-Stiftung für die großzügige Unterstützung – die 'SUN SPARC20 workstation' war mir in allen Arbeitsgebieten wichtiges Werkzeug und Grundlage der Simulationen, der theoretischen Berechnungen und Auswertung der experimentellen Daten.

... Herrn Prof. Dr. Gunter-Otto Kirst und Nicole für die Hilfestellung bei der digitalen Bildanalyse der Hg-behandelten Zellen.

... Wolfgang, Alexander, Ellen und Christian für die Korrekturlesungen.

... allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft: Wolfgang, Stefan, Alexander, Christian, Andreas – Uli, Annette, Nathalie, Urthe, Joachim, Jörn, Claudia, Kristine – Wieland, Johannes, Torsten, Kai – Marion, Frau Matthes, Frau Erxleben, Werner, Herrn Schulze sowie Heinz und den Mitarbeitern der Glasbläserei und der Mechanikwerkstatt.

... meiner Frau Ulrike für die Hilfe bei medizinischen Fragen und den geübten Großmut, wenn ich wieder mal morgens schon weg war und abends spät eintrudelte.

... *ganz besonders meinen Eltern* für die stete Unterstützung während der langen Jahre meines Studiums.