

ANGEWANDTE CHEMIE

102. Jahrgang 1990

Heft 1

Seite 1–118

NMR-Mikroskopie – Grundlagen, Grenzen und Anwendungsmöglichkeiten

Neue analytische
Methoden (39)

Von Winfried Kuhn*

Professor Karl Hermann Hausser zum 70. Geburtstag gewidmet

Ein neues Anwendungsgebiet der NMR-Spektroskopie, neben der Aufklärung von Molekülstrukturen und dem Studium biochemischer Prozesse und morphologischer Phänomene (als NMR-Tomographie), eröffnet die NMR-Mikroskopie. Sie eignet sich als bildgebendes Verfahren sowohl für die Untersuchung biologischer Objekte wie Pflanzen und Kleintiere als auch für die Beobachtung mikroskopischer Strukturen und Strukturänderungen in Polymeren und keramischen Materialien. Die NMR-Mikroskopie kann auch als volumenselektive Spektroskopie, mit der die NMR-spezifischen Parameter – Spindichte ρ , chemische Verschiebung δ , Relaxationszeiten T_1 und T_2 – orts aufgelöst quantitativ bestimmt werden können, betrieben werden. Die vielen inzwischen sehr gut entwickelten Meßmethoden ermöglichen durch sehr schnelle Bildgebung das Studium dynamischer Prozesse im Millisekundenbereich, so daß nicht nur bei sich bewegenden Objekten das Objekt artefaktfrei abgebildet, sondern auch die Diffusionskonstanten isotroper wie anisotroper Diffusion bestimmt werden können – bei letzterer im Prinzip sogar der komplette Diffusionstensor. Die orts aufgelöste Bestimmung der Relaxationszeiten liefert Informationen über molekulare Beweglichkeiten und Bindungsverhältnisse, z. B. die Bindung von Wasser oder anderen Lösungsmitteln an Polymere, die Beweglichkeit von Flüssigkeiten in Polymeren oder keramischen Materialien oder die dreidimensionale Form von Poren in porösen Werkstoffen. Im biologisch-medizinischen Bereich ermöglicht die NMR-Mikroskopie die Beobachtung von Wachstumsprozessen auf der Zellebene, embryologische Studien, die Entwicklung therapeutischer Konzepte im Tierversuch unter oft drastischer Reduktion der Zahl der Tierversuche und, als volumenselektive Spektroskopie durchgeführt, das Studium des Energiestoffwechsels in vivo.

1. Einleitung

Das physikalische Phänomen der Kernspinresonanz wurde 1946 von Felix Bloch und Edward Purcell entdeckt^[1, 2] und hat sich seither wohl zum faszinierendsten Hilfsmittel für Physiker, Chemiker, Biologen und Mediziner entwickelt. Noch in den siebziger Jahren wurde die NMR-Spektroskopie praktisch ausschließlich zur Strukturaufklärung in

der Chemie und zur Bestimmung molekularer Strukturmerkmale wie magnetischer Abschirmungstensoren, elektrischer Feldgradientensensoren und Kopplungstensoren in der Molekülphysik eingesetzt. Ende der siebziger Jahre und in den achtziger Jahren wurde dann ihre Bedeutung für die Untersuchung biochemischer Prozesse in vivo und in vitro, als bildgebendes Verfahren (NMR-Tomographie) zur Beobachtung morphologischer Veränderungen von Gewebe und als diagnostisches Hilfsmittel in der klinischen Praxis erkannt. Die Bildgebung auf der Basis spezieller spektroskopischer Techniken ermöglicht schließlich volumenselektive (lokalisierte) Spektroskopie.

[*] Dr. W. Kuhn
Fraunhofer-Institut für zerstörungsfreie Prüfverfahren
Hauptabteilung Medizintechnik
Ensheimer Straße 48, D-6670 St. Ingbert

In der klinischen Diagnostik werden NMR-Tomographie-systeme mit resistiven (normalleitenden) oder supraleitenden Magneten mit horizontaler Bohrung und Bohrungsdurchmessern zwischen 60 und 100 cm verwendet, wobei die Magnetfeldstärken zwischen 0.23 und 2.4 T liegen. Diese Feldstärken entsprechen Protonenresonanzfrequenzen von 9.6 bzw. 100 MHz. Magnetische Feldgradienten von ca. 10 mTm^{-1} (1 Gcm^{-1}) beschränken die räumliche Auflösung bei Ganzkörperanwendungen auf bestenfalls etwa 5 mm^3 .

Abbildung 1 zeigt als Beispiel für die klinische Anwendung der NMR-Tomographie einen Sagittalschnitt durch



Abb. 1. Sagittalschnitt durch einen menschlichen Kopf. Schichtdicke 5 mm, Pixel-Auflösung 1 mm^2 , Feldstärke 0.28 T, Spin-Echo-Bild als Summe aus acht Echos einer Multiecho-Aufnahme.

den menschlichen Kopf. Die Magnetfeldstärke war 0.28 T, was einer Protonenresonanzfrequenz von 11.6 MHz entspricht. Die Auflösung in der Bildebene, die als Pixel-Auflösung bezeichnet wird (das kleinste Bildelement wird als *Pixel* bezeichnet), beträgt etwa 1 mm^2 .

Spricht man von räumlicher Auflösung, so muß im allgemeinen unterschieden werden zwischen der Auflösung in der Schnittebene – üblicherweise als Pixel-Auflösung bezeichnet

– und der Auflösung in der zur Schnittebene orthogonalen Schicht. Die Pixel-Auflösung ist normalerweise deutlich höher als die Auflösung in der beobachteten Schicht. In der NMR-Tomographie wird in seltenen Fällen eine räumlich isotrope Auflösung erreicht. Gründe für die unterschiedliche Auflösung in der Bildebene und in der Tiefe, d. h. in Richtung der selektierten Schicht, sind einerseits gerätebedingt und andererseits das in der NMR-Bildgebung erreichbare Signal/Rausch-Verhältnis.

In einem zweidimensionalen NMR-Bildgebungsexperiment wird die Selektion einer Schicht üblicherweise durch einen selektiven Hochfrequenzpuls in Anwesenheit eines konstanten magnetischen Feldgradienten vorgenommen. Der selektive Hochfrequenzpuls hat eine definierte Frequenzbandbreite bei einer vorgegebenen Pulsform. Die Dicke der Schicht wird durch die Bandbreite dieses Pulses und die Stärke des magnetischen Feldgradienten bestimmt. Eine isotrope Ortsauflösung in einem zweidimensionalen Experiment erfordert daher sehr schmalbandige selektive Pulse oder sehr starke Feldgradienten. Beides ist, aus unterschiedlichen Gründen, schwierig zu realisieren (siehe Abschnitt 3.2).

Bei dreidimensionalen Aufnahmen gelten die Einschränkungen hinsichtlich selektivem Puls und Feldgradienten nicht, da zur Anregung der Kernspins in der gewünschten Schicht keine selektiven Pulse erforderlich sind. Die Ortsinformation wird dem NMR-Signal durch zwei sich in der Stärke verändernde orthogonale Feldgradienten in Form einer Kodierung der Phasenlage des Signals aufgeprägt. Insofern ist eine räumlich isotrope Auflösung bei einem dreidimensionalen Experiment leichter erreichbar. Das im kleinsten detektierbaren Volumenelement, dem *Voxel*, erreichbare Signal/Rausch-Verhältnis und die Größe des zu untersuchenden Objekts bestimmen dann letztendlich die in den Bildern erreichbare Ortsauflösung.

In der biologisch-medizinischen Forschung – bei der NMR-spektroskopischen in-vivo-Beobachtung von Stoffwechselvorgängen und von morphologischen Gewebsveränderungen im Tierversuch – werden Magnete mit horizontaler Bohrung und Bohrungsdurchmessern zwischen 15 und 40 cm sowie Magnetfeldstärken zwischen 7.05 (^1H : 300 MHz) und 4.7 T (200 MHz) eingesetzt. Die mit diesen Geräten erreichbaren räumlichen Auflösungen bei Feldgradienten von maximal 100 mTm^{-1} liegen im Bereich von etwa 1 mm^3 .

Eine völlig neue Dimension sowohl hinsichtlich der räumlichen Auflösung als auch hinsichtlich des Zugangs zu mole-



Dr. Winfried Kuhn, geboren am 5. Februar 1949, studierte von 1971–1976 Physikalische Technik an der Fachhochschule Aachen und anschließend bis 1980 Physik an der Technischen Hochschule Aachen und an der Universität Heidelberg. Nach der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg bei Prof. Dr. K. H. Hausser fertigte er von 1980–1983 seine Doktorarbeit am gleichen Institut bei Prof. U. Haeberlen an. Von 1982–1986 war er Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Leiter der Funktionseinheit Instrumentelle Analytik im Fachbereich Chemie/Biologie der Universität Bremen. Anschließend entwickelte er bis 1989 bei der Fa. Bruker in Rheinstetten das NMR-Mikroskop. Seit dem 1. April 1989 ist er Leiter der Arbeitsgruppe Magnetische Resonanz am Fraunhofer-Institut für zerstörungsfreie Prüfverfahren in St. Ingbert.

kularen Informationen eröffnet sich dem Forscher durch die jüngste Anwendung der NMR-Spektroskopie, die NMR-Mikroskopie. Ein erstes Beispiel für die Realisierbarkeit eines NMR-Mikroskops wurde 1986 in *Nature* publiziert^[3]. Die Autoren untersuchten Froscheier und erhielten erstmalig Bilder mit einer wirklich mikroskopischen Auflösung von $13 \times 13 \times 250 \mu\text{m}^3$. NMR-Mikroskopie wird erst durch Magneten mit höchsten Feldstärken und starken magnetischen Feldgradienten möglich. Die höchste für NMR-Spektroskopie nutzbare Magnetfeldstärke ist heute 14.1 T (600 MHz Protonenresonanzfrequenz); die üblicherweise für NMR-Mikroskopie verwendeten Magnetfeldstärken liegen zwischen 7.05 (300 MHz) und 14.1 T. In Tabelle 1 sind typische Kenngrößen und Anwendungsbereiche der derzeit verwendeten Systeme zusammengefaßt.

Tabelle 1. Vergleich der Kenngrößen von NMR-Bildgebungssystemen.

	¹ H-Resonanzfrequenz [MHz]	Feldstärke [T]	Objektgröße [cm]	Auflösung [μm^3]	Anwendung auf
NMR-Tomographie (klinische Diagnostik)	9.6–100	0.23–2.4	< 100	ca. 5	Kopf und Extremitäten
Tomographie und in-vivo-Spektroskopie (biomedizinische Forschung)	41–200	1.0–4.7	< 30	ca. 2	Tiere bis zur Größe des Kaninchens
„Mini-Imaging“	300–400	7.05–9.4	< 12	ca. 5×10^{-3}	Tiere bis zur Größe der Ratte
NMR-Mikroskopie	200–600	4.7–14.1	< 2.5	ca. 10^{-5}	Mäuse, Insekten, Polymere

Kommerzielle NMR-Mikroskope werden als Zusatz zu Hochauflösungs- und Festkörper-NMR-Spektrometern angeboten und bestehen aus einem Probenkopf mit integriertem Gradientensystem, einer Ansteuerungseinheit für das Gradientensystem zur Erzeugung von Gradientenpulsen und einer Modulationseinheit für hochfrequente elektromagnetische Wellen, mit der sowohl eine Amplituden- als auch eine Phasenmodulation der Hochfrequenzpulse möglich ist. Mit diesen Gradientensystemen sind Gradientenstärken von ca. 1 T m^{-1} erreichbar; die höchste bisher erzielte räumliche Auflösung in meinem Labor und wohl auch weltweit liegt bei $10 \times 10 \times 100 \mu\text{m}^3$ ^[4]. Diese Auflösung entspricht einem Voxel der Größe 10^{-5} mm^3 (Abb. 2).

Für die Bildgebung durch Nutzen der Kernspinresonanz werden mehrere Synonyme verwendet. In der Medizin spricht man von Kernspin-Tomographie oder „Magnetic Resonance Imaging“ (MRI). Benutzt werden auch die Begriffe „NMR-Bildgebung“ oder „Ortsaufgelöste Kernresonanz“. Für Bildgebung mit hoher Auflösung werden die Bezeichnungen „Mini-Imaging“ bei Auflösungen bis etwa $100 \times 100 \times 1000 \mu\text{m}^3$ und „Micro-Imaging“ oder „NMR-Mikroskopie“ bei Auflösungen besser als $100 \times 100 \times 1000 \mu\text{m}^3$ benutzt.

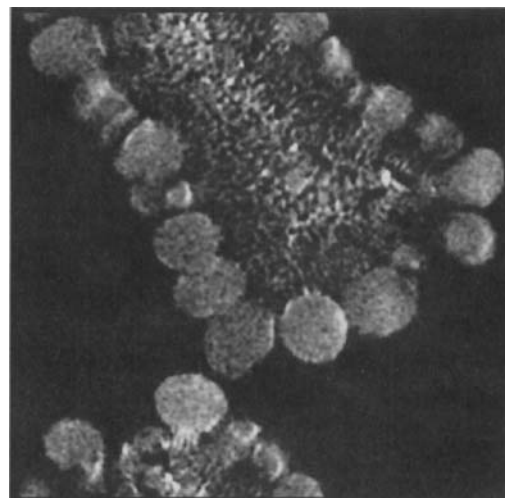


Abb. 2. Schnitt durch ein Eiskraut-Blatt (*Mesembryanthemum crystallinum*). Das Blatt dieser Pflanze ist mit Oxalatkristallen bedeckt. Sichtbar sind im Blattquerschnitt die Leitbündel und einzelne Pflanzenzellen. Das Spin-Echo-Bild wurde bei einer Feldstärke von 7.05 T aufgenommen. Schichtdicke $100 \mu\text{m}$, Pixel-Auflösung $10^2 \mu\text{m}^2$.

2. Grundlagen der NMR-Bildgebung

Bei einem konventionellen NMR-Experiment befindet sich die Probe in einem statischen, homogenen Magnetfeld der magnetischen Induktion B , die gemäß Gleichung (1) mit der magnetischen Feldstärke H über die Induktionskonstante μ_0 und die relative Permeabilität μ_r verknüpft ist.

$$B = \mu_0 \mu_r H \quad (1)$$

In einer Probe mit identischen Kernen in identischer Umgebung, z. B. die Protonen im Wasser, erfahren alle Spins im Probenvolumen die gleiche magnetische Induktion B und haben nach der Resonanzbedingung (2) die gleiche Reso-

$$\omega = \gamma B \quad (2)$$

nanzfrequenz ω . Die Proportionalitätskonstante γ ist das gyromagnetische Verhältnis des Kernels, eine kernspezifische Größe.

Kerne in unterschiedlicher magnetischer Umgebung, wie sie im allgemeinen in chemischen Verbindungen vorliegen, weisen dagegen unterschiedliche Resonanzfrequenzen auf, die im NMR-Spektrum zu separierten Signalen mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen δ führen.

Dies bedeutet, daß eine Lokalisierung der Kerne im molekularen Bereich, d. h. eine Zuordnung der Spektrensignale zu bestimmten Positionen der Kerne im Molekül, möglich ist, nicht aber eine räumliche Lokalisierung des Kernels oder Moleküls in der Probe, da gleiche Kernspezies an jedem Ort $r = (x, y, z)$ der Probe die gleiche Resonanzfrequenz haben.

Es gibt somit keine Möglichkeit, in einem homogenen, statischen Magnetfeld B_0 über die Resonanzfrequenz der Kernspins im Probenvolumen eine räumliche Lokalisierung der Kerne vorzunehmen. Den Weg zu einer ortsaufgelösten NMR-Spektroskopie wiesen Anfang der siebziger Jahre unabhängig voneinander Damadian^[5] und Lauterbur^[6]. Sie wird ermöglicht durch die Überlagerung des homogenen,

statischen Magnetfeldes B_0 mit einem zeitabhängigen, linearen Gradientenfeld $G(r, t)$ [Gl. (3)]. Da das Gradientenfeld

$$B(r, t) = B_0 + G(r, t) \quad (3)$$

$G(r, t)$ durch eine lineare Ortsabhängigkeit charakterisiert ist und die Resonanzfrequenz der Kernspins nach der Resonanzbedingung (2) dem Magnetfeld $B(r, t)$, in dem sie sich befinden, proportional ist, erhält man nun einen linearen Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenz ω und dem Ort r des Kernspins in der Probe [Gl. (4)]. Die lineare Orts-

$$\omega(r, t) = \gamma B(r, t) \quad (4)$$

abhängigkeit des Gradientenfeldes $G(r, t)$ ist gleichbedeutend damit, daß die magnetischen Feldgradienten *konstant* sind.

Welche Anteile des Gradientenfeldes zur Überlagerung der Felder B_0 und $G(r, t)$ beitragen, wird aus der Richtungsableitung des Gradientenfeldes nach den drei Raumrichtungen ersichtlich, in der der Feldgradient durch einen Tensor mit neun Komponenten dargestellt wird [Gl. (5)].

$$\text{grad } G(r, t) = \begin{pmatrix} \frac{\partial B_x}{\partial x} & \frac{\partial B_x}{\partial y} & \frac{\partial B_x}{\partial z} \\ \frac{\partial B_y}{\partial x} & \frac{\partial B_y}{\partial y} & \frac{\partial B_y}{\partial z} \\ \frac{\partial B_z}{\partial x} & \frac{\partial B_z}{\partial y} & \frac{\partial B_z}{\partial z} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Im Experiment beträgt die Induktion des statischen Magnetfeldes B_0 etwa 8 T, die des Gradientenfeldes $G(r, t)$ etwa 0.001 T. Die Feldkomponenten senkrecht zum statischen Magnetfeld sind deshalb vernachlässigbar, und nur die Komponente des Gradientenfeldes parallel zu B_0 trägt zur Ortsabhängigkeit der Resonanzfrequenz bei (Abb. 3). In der

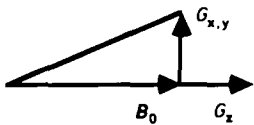


Abb. 3. Beitrag der Gradientenfelder G_x und $G_{x,y}$ zu B_0 . Nur die Komponente parallel zu B_0 liefert einen Beitrag zum resultierenden Magnetfeld $B(r, t)$.

Praxis beeinflussen demnach nur die Tensorkomponenten g_x , g_y und g_z [Gl. (6) – (8)] die Resonanzfrequenz der Kern-

$$g_x = \left(\frac{\partial B_z}{\partial x} \right) \quad (6)$$

$$g_y = \left(\frac{\partial B_z}{\partial y} \right) \quad (7)$$

$$g_z = \left(\frac{\partial B_z}{\partial z} \right) \quad (8)$$

spins in der Probe. Diese Komponenten lassen sich als die Komponenten eines Feldgradientenvektors g auffassen.

Die Superposition der Magnetfelder und ihre Wirkung auf die Resonanzfrequenzen der Kernspins wird durch Abbildung 4 veranschaulicht. Für $-x_0, -y_0, -z_0 < x, y, z < 0$ wird das statische Magnetfeld B_0 durch das Gradientenfeld

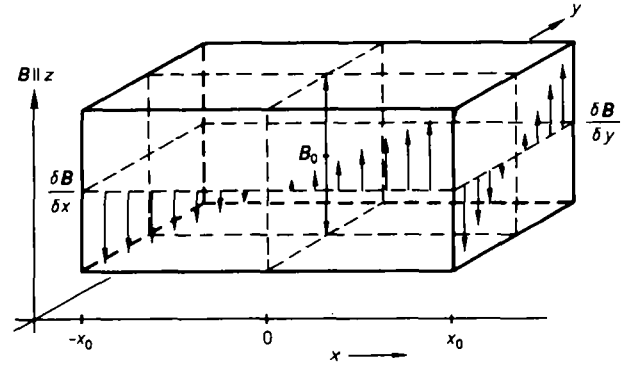


Abb. 4. Darstellung der dreidimensionalen Verteilung eines Gradientenfeldes $G(r)$. Das Gradientenfeld verändert sich linear über das Probenvolumen. Für $-x_0, -y_0, -z_0 < x, y, z < 0$ ist das resultierende Magnetfeld $B(r) < B_0$, für $0 < x, y, z < x_0, y_0, z_0$ wird $B(r) > B_0$.

$G(x, y, z)$ abgeschwächt, und für $0 < x, y, z < x_0, y_0, z_0$ wird es verstärkt [Gl. (9) und (10)].

$$B(x, y, z) = B_0 + G(x, y, z) \quad (9)$$

$$B(x, y, z) = B_0 + gr \quad (10)$$

Wegen der Resonanzbedingung (2) ist demnach die Resonanzfrequenz der Kernspins in der linken Hälfte des Quaders von Abbildung 4 kleiner, in der rechten dagegen größer als ω_0 [Gl. (11)]. Die Frequenzspreizung und damit die erreich-

$$\omega(r) = \omega_0 + \gamma gr \quad (11)$$

bare räumliche Auflösung sind somit direkt proportional zur Gradientenstärke $|g|$ und zu den Objektdimensionen $\Delta r = (\Delta x, \Delta y, \Delta z)$ [Gl. (12)]. Folglich bestimmt die Gradienten-

$$\Delta \omega = \gamma g \Delta r \quad (12)$$

tenstärke die maximale räumliche Auflösung, die bei der NMR-Bildgebung erreichbar ist.

3. Experimentelle Verfahren der NMR-Mikroskopie

Die Kernspins in einer Probe werden durch gepulste Einstrahlung kohärenter elektromagnetischer Wellen angeregt, wobei die Hochfrequenzpulse im allgemeinen ein nicht scharf definiertes Frequenzspektrum von einigen kHz bis mehreren hundert kHz, abhängig von der Länge des Pulses, um die Resonanzfrequenz ω_0 der Kerne im statischen Magnetfeld $B_0 = (0, 0, B_0)$ aufweisen. Im folgenden wird der Einfachheit halber vorausgesetzt, daß das statische Magnetfeld zur z -Richtung eines willkürlich gewählten Koordinatensystems parallel ist und somit nur noch die z -Komponente B_0 dieses Magnetfeldes betrachtet werden muß. Da die Kerne nach kohärenter Anregung auch kohärente elektromagnetische Wellen abstrahlen, die durch eine geeignete Spule detektiert werden, lassen sich eine große Anzahl von Pulsexperimenten auf eine Probe anwenden und dadurch jeweils andere charakteristische Parameter dem Experimentator zugänglich machen.

In der NMR-Spektroskopie an Flüssigkeiten werden solche Pulsexperimente z. B. zur Separation von Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen verwendet und in der Festkörper-NMR-Spektroskopie z. B. zur Verschmälerung von Signalen oder zur Entkopplung physikalischer Wechselwirkungen wie der Dipol-Dipol-Kopplung von Protonen oder von Protonen und ^{13}C -Kernen.

In der NMR-Bildgebung gibt es inzwischen ebenfalls eine große Anzahl unterschiedlichster Pulssequenzen, die z. B. eine sehr schnelle Bildgebung ermöglichen oder Bildkontraste mit den Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxationszeiten der Kerne in der Probe gewichten. Unter den vielen Methoden der Bilderzeugung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie haben sich für die Praxis nach dem heutigen Stand der Technik nur drei als bedeutend herausgestellt, die in den nächsten Abschnitten besprochen werden sollen.

3.1. Projektions-Rekonstruktions-Verfahren

Diese Methode, die von *Lauterbur* in den Anfängen der NMR-Bildgebung angewendet wurde, kommt heute nur noch in Spezialfällen, z. B. beim Polymer-Imaging oder auch bei der orts aufgelösten Bestimmung der Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxationszeiten (Relaxometrie), zum Einsatz^[7]. Gründe hierfür sind die langen Meßzeiten und die relativ komplizierte Datenauswertung. Die Methode hat durch die Verwendung statischer magnetischer Feldgradienten allerdings den Vorteil, daß Pulssequenzen mit sehr kurzen Zeiten zwischen der Anregung der Kerne und der Detektion des Signals und damit die Bildgebung von Proben möglich sind, deren Kerne sehr kurze Spin-Spin-Relaxationszeiten haben. Darüber hinaus ermöglicht sie bei verhältnismäßig langen Spin-Spin-Relaxationszeiten die Detektion sehr vieler Spin-Echos. Dies macht man sich bei der Relaxometrie zunutze, um eine multiexponentielle Anpassung an die Relaxationskurve zu erreichen und hieraus eine Gewebescharakteristik zu definieren.

3.2. Spin-Echo-Methoden, die auf einer Hahnschen Spin-Echo-Pulsfolge basieren

Nach der Methode von *E. Hahn*^[8] werden Spin-Echos mit einer 90° - τ - 180° -Echo-Pulsfolge erzeugt (Abb. 5), bei der die

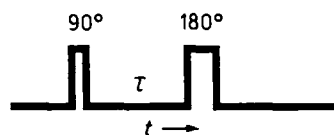


Abb. 5. Hahn-Spin-Echo-Pulssequenz. Das Spinsystem wird zunächst durch einen breitbandigen 90° -Puls angeregt; nach einer Zeit τ wird die Magnetisierung durch einen 180° -Hochfrequenzpuls refokussiert. Beide Pulse sind nichtselektiv, d. h. sie sind durch eine große (ca. 100 kHz), nicht scharf definierte Anregungsbandbreite charakterisiert.

Transversalkomponenten M_{xy} der Magnetisierung M in der Zeit τ unter dem Einfluß von lokalen Inhomogenitäten des statischen Magnetfeldes und von physikalischen Wechselwirkungen der Kerne ihre Phasenkohärenz verlieren, d. h. dephasieren.

Durch den 180° -Hochfrequenzpuls läßt sich die Magnetisierung aber wieder refokussieren, was zu einem kohärenten Zustand der Spins und damit zu einem detektierbaren Echo führt. Die Änderung der Magnetisierung während eines solchen Pulsperiments ist in Abbildung 6 dargestellt.

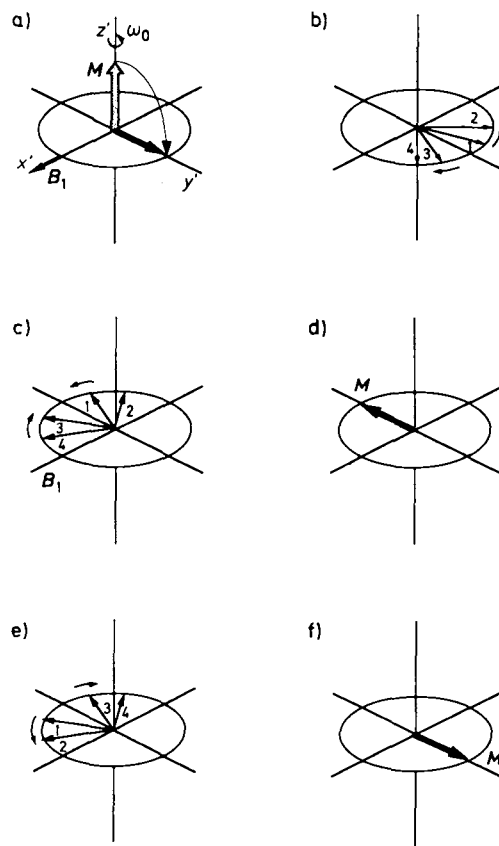


Abb. 6. Änderung der Magnetisierung während eines Spin-Echo-Experiments. a) Im mit der Resonanzfrequenz ω_0 rotierenden Koordinatensystem liegt die Magnetisierung M parallel zur Richtung z' des statischen Magnetfeldes $B(r) = (0, 0, B_0)$. Der 90° -Puls, der durch ein Hochfrequenzfeld B_1 parallel zu x' erzeugt wird, dreht die Magnetisierung im Falle der Resonanz in die y' -Richtung. b) Lokale Feldinhomogenitäten und Feldgradienten bewirken, daß die Magnetisierung in ihre Einzelkomponenten auffächert (dephasiert). c) Der 180° -Puls nach der Zeit τ rotiert die Magnetisierungskomponenten um die x' -Achse, wobei die Einzelkomponenten ihre Laufrichtung beibehalten. d) Dies führt nach der Zeit 2τ wieder zu einem kohärenten Zustand, der als Spin-Echo bezeichnet wird. Dieses Spin-Echo kann detektiert werden. e) Die Dephasierung der Magnetisierung beginnt von neuem. f) Ein weiterer 180° -Puls nach der Zeit τ führt wiederum nach der Zeit 2τ zu einem kohärenten Zustand. Die Schritte b)–f) können so oft wiederholt werden, bis die Transversalkomponenten M_{xy} aufgrund von Spin-Gitter-Relaxationsprozessen vollständig verschwunden sind.

Eine Ortsselektion der Kerne läßt sich nun durch geeignete Kombination einer Spin-Echo-Sequenz, wie sie in Abbildung 5 dargestellt ist, mit magnetischen Gradientenfeldern erreichen. Auf der in Abbildung 7 dargestellten Bildgebungsmethode basieren alle anderen noch zu diskutierenden Spin-Echo-Sequenzen.

Zur Beschreibung der Pulssequenz wird ein mit der Resonanzfrequenz ω_0 rotierendes Koordinatensystem zugrunde gelegt. Nach dem 90° -Anregungspuls P1, der bei diesem Experiment aufgrund seiner Bandbreite alle isotopengleichen Kerne anregt, befindet sich die Magnetisierung M im Falle der Resonanz auf der y' -Achse des rotierenden Koordinatensystems, d. h. sie ist identisch mit ihrer Komponente

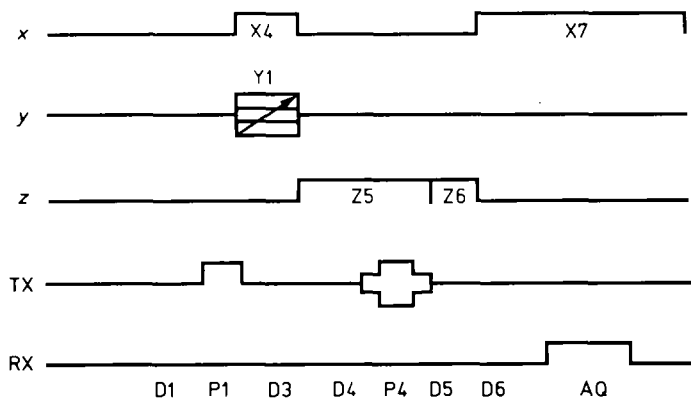


Abb. 7. Die grundlegende Spin-Echo-Pulssequenz mit x-, y- und z-Gradienten, die auf der in Abbildung 5 gezeigten Hahn-Pulsfolge basiert; TX = Transmitter-Kanal; RX = Empfänger-Kanal. Nach dem breitbandigen 90°-Puls P1 dephasiert die Magnetisierung in der Zeit D3 wegen lokaler Feldinhomogenitäten und gezielt angelegter magnetischer Feldgradienten X4 und Y1 mit definierter Amplitude und Dauer. Während eines zweidimensionalen Bildgebungsexperiments wird die Amplitude von Y1 entsprechend Gleichung (13) um Inkremente $\Delta Y1$ verändert. X4 dephasiert die Magnetisierung in der $x'-y'$ -Ebene des rotierenden Koordinatensystems. Nach dem schichtenselektiven 180°-Puls P4, der in Anwesenheit des Gradienten Z5 erfolgt, wird die Magnetisierung durch den „Lesegradienten“ X7 zu einem Spin-Echo refokussiert, das in der Zeit AQ detektiert wird. Die Amplitude des Gradienten Z5 und die Bandbreite des selektiven HF-Pulses P4 bestimmen die Dicke der selektierten Schicht; die Amplitude des Gradienten X7 bestimmt die Pixel-Auflösung.

M_y . Unter dem Einfluß des Dephasierungsgradienten X4 und lokaler Feldinhomogenitäten dephasieren die Transversalkomponenten der Magnetisierung in der $x'-y'$ -Ebene. In der gleichen Zeit, in der der Gradient X4 anliegt, wird auch der inkrementierbare Phasenkodierungsgradient Y1 eingeschaltet. Dieser Gradient prägt dem NMR-Signal eine für seine Stärke I charakteristische Phase φ auf, die während des Experiments um Inkremente $\Delta\varphi$ verändert wird, indem die Stärke I von Y1 um ein definiertes Inkrement $\Delta Y1$ zu- oder abnimmt. Die Stärke I eines Gradienten g_α ($\alpha = x, y, z$) ist durch sein Zeitintegral gegeben [Gl. (12')].

$$I = \int_0^t g_\alpha dt \quad (12')$$

Für ein zweidimensionales Bild beispielsweise, das durch eine Matrix von 256×256 Punkten dargestellt werden soll, benötigt man in der zweiten Bilddimension 256 Einzelerperimente, wobei die Phase φ des NMR-Signals am Ort y sich entsprechend Gleichung (13) ändert.

$$\Delta\varphi = \gamma \int \Delta Y1 y dt \quad (13)$$

Abbildung 8a zeigt phasenkodierte Spin-Echos, wobei die Phasenkodierung durch unterschiedliche Gradientenstärken hervorgerufen wurde. Die phasenkorrigierten Fourier-Transformierten dieser Spin-Echos sind in Abbildung 8b wiedergegeben. Die Kodierung der Ortsinformation in der ersten Dimension erfolgt während der Detektion des Signals durch Anlegen des x-Gradienten X7, des sogenannten Lesegradienten, der die durch X4 dephasierte Magnetisierung rephasiert und somit zu einem Spin-Echo führt. Eine vollständige Rephasierung des Signals ist nur bei Erfüllung der Gleichheitsbedingung (14) möglich, wobei die in der Zeit D3

durch den Gradienten X4 dephasierte Transversalmagnetisierung entsprechend Abbildung 7 während der Zeit D6, die im Experiment zur Stabilisierung des Lesegradienten X7 dient, und der Datenaufnahmezeit AQ rephasiert wird.

$$\int_0^{D3} X4 dt = \int_0^{D6 + AQ/2} X7 dt \quad (14)$$

Wenn Bedingung (14) erfüllt ist, erscheint ein Spin-Echo mit dem Echomaximum zur Zeit $AQ/2$. Das bedeutet zugleich, daß ein symmetrisches Echo detektiert wird, was Voraussetzung für die spätere Fourier-Transformation der Daten ist.

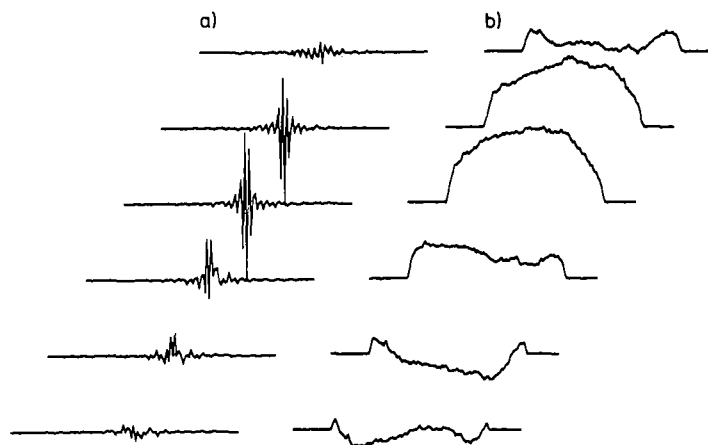


Abb. 8. a) Phasenkodierte Spin-Echos aus einem zweidimensionalen Spin-Echo-Experiment. b) Fourier-Transformierte der Spin-Echos. Es sind phasen-kodierte eindimensionale Profile der Probe in Richtung des Lesegradienten X7 abgebildet, dessen Amplitude die Profilweite definiert.

Zur Schichtenselektion in einem zweidimensionalen Bildgebungsexperiment dient der schichtenselektive 180°-Hochfrequenz(HF)puls P4 (Abb. 7) mit definierter Anregungsbandbreite $\Delta\omega$ in Anwesenheit eines Gradienten Z5 senkrecht zu der Richtung, in der die Scheibe selektiert wird. Hochfrequenzpulse mit definierter Bandbreite werden durch Amplituden- und Phasenmodulation der elektromagnetischen Welle mit der Trägerfrequenz ν_0 erhalten. Die Dauer des Pulses bestimmt entsprechend dem Fourier-Theorem die Anregungsbandbreite im Frequenzbereich und seine Trägerfrequenz die Lage der selektierten Schicht. In unserem Beispiel ist der Gradient parallel zur z-Richtung des Koordinatensystems und die selektierte Scheibe senkrecht dazu.

Für Schichtenselektion werden üblicherweise Hochfrequenzpulse mit einer $\sin(x)/x$ - oder einer Hermite-Modulation^[9] verwendet. Ein $\sin(x)/x$ -Puls von 4 ms Dauer ergibt dann nach der Fourier-Transformation einen angenäherten Rechteckpuls mit einer Bandbreite von 1170 Hz. Bei einer Stärke des z-Gradienten von 100 mTm^{-1} entspricht dies nach Gleichung (15) einer Schichtdicke von $270 \mu\text{m}$ ($\Delta z =$

$$\Delta z = \frac{\Delta\omega}{\gamma g} \quad (15)$$

Schichtdicke, $\Delta\omega$ = Bandbreite des Hochfrequenzpulses, γ = gyromagnetisches Verhältnis des Kerns ($\gamma_{\text{H}} = 42.58 \text{ MHz T}^{-1}$, g = Gradientenstärke in Richtung der gewählten Schicht).

Abbildung 9 zeigt zwei in der Praxis angewendete schichtenselektive Hochfrequenzpulse. Diese Pulse zeichnen sich durch eine für die Scheibenselektion recht günstige Pulsgeometrie aus: Der $\sin(x)/x$ -Puls (Abb. 9a) hat sehr steile Flanken und ein flaches Plateau, was einer scharf definierten rechteckigen Schicht bei homogener Anregungsintensität aller Kerne in dieser Schicht entspricht, neigt allerdings bei Pulsleistungen, wie sie für einen 180° -Puls erforderlich sind, zu Seitenbandenmodulationen, die eine partielle Anregung von Kernen benachbarter Schichten zur Folge haben. Der Hermite-Puls (Abb. 9c) hat etwas flachere Flanken, aber eine bessere Seitenbandencharakteristik. Die Abbildungen 9b und 9d zeigen die Fourier-Transformierten der in den Abbildungen 9a bzw. 9c dargestellten Hochfrequenzpulse.

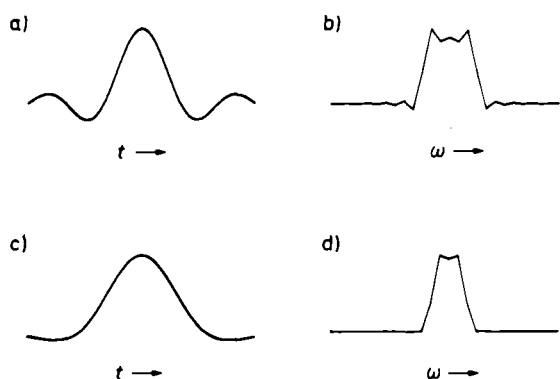


Abb. 9. Modulationen der Hochfrequenzwelle zur Erzeugung schichtenselektiver Pulse. a) $\sin(x)/x$ -Modulation. b) Fourier-transformiertes und phasenkorrigiertes Spektrum von (a). c) Hermite-Modulation. d) Fourier-transformiertes und phasenkorrigiertes Spektrum von (c).

Prinzipiell läßt sich jede beliebige Schicht einer Probe allein durch die Wahl des Gradienten oder einer Kombination mehrerer Gradienten und die Wahl der Trägerfrequenz des schichtenselektiven Hochfrequenzpulses selektieren; eine mechanische Veränderung der Position der Probe im Magneten ist im allgemeinen nicht erforderlich. In Abbildung 10 ist die Schichtenselektion durch Veränderung der Resonanzfrequenz in Anwesenheit eines schichtenselektiven Gradienten dargestellt.

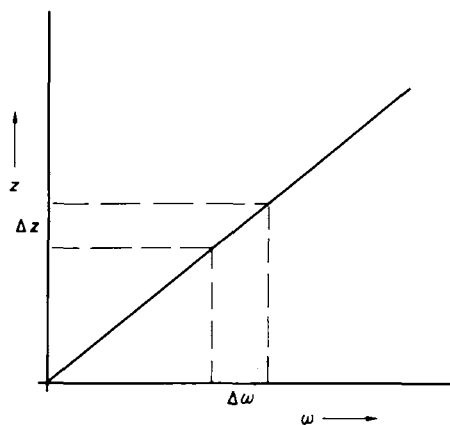


Abb. 10. Zusammenhang zwischen Frequenzbereich $\Delta \omega$ und Schichtdicke Δz bei Anwesenheit eines Gradienten in z -Richtung. Die Steigung der Geraden ist gegeben durch die Amplitude des Schichtengradienten. Die Schichtdicke ist bei gegebener Gradientenstärke proportional zum Frequenzbereich des selektiven HF-Pulses.

Die Spin-Echo-Methoden, und darunter fallen alle Pulssequenzen, die einen 180° -Refokussierungspuls enthalten, sind unempfindlich gegenüber Inhomogenitäten des statischen Magnetfeldes und liefern deshalb Bilder mit sehr guten Signal/Rausch-Verhältnissen und exzellenter Wiedergabe der Objektprofile. Da bei ihnen eine 90° - 180° -Pulssequenz angewendet wird, muß die Magnetisierung aber vor jeder neuen Anregung weitgehend relaxiert sein, was in der Praxis eine minimale Wartezeit zwischen dem Ende der Detektion und der nächsten Anregung der Kerne von mindestens T_1 , besser 3–5mal T_1 , erfordert. Diese Wartezeit, die in vielen Fällen in der Größenordnung von Sekunden liegt, führt zu relativ langen Meßzeiten.

3.2.1. Mehrschichten-Bildgebung

Durch Mehrschichten-Bildgebung (Multislice Imaging) können mehrere Schichten, z. B. 4, 8, 16 oder 32 Schichten, in der gleichen Zeit abgebildet werden, die bei einem Einschichten(single-slice)-Spin-Echo-Experiment für die Detektion einer einzigen Schicht erforderlich ist. Die Kerne werden hierbei durch schichtenselektive 90° - und 180° -Hochfrequenzpulse angeregt. Da die Anregungsbandbreite und auch das Anregungsprofil für beide Pulse gleich sein muß (beide Pulse wirken auf die Magnetisierung der gleichen Schicht), müssen die Pulse in der Leistung unterschiedlich sein. Da sie eine je nach Pulsform unterschiedliche Flankencharakteristik haben (Abb. 9) oder gar Seitenbanden erzeugen, ist eine Überlappung von Signalen benachbarter Schichten kaum zu vermeiden. Durch eine intelligente Anregungsfolge, angeregt werden z. B. bei einem Achtschichtenexperiment die Schichten in der Reihenfolge 1, 3, 5, 7, 2, 4, 6, 8, werden die Überlappungseffekte minimal gehalten. Da die Magnetisierung bereits angeregter Schichten nach der Detektion relaxieren kann, während die Magnetisierung der übrigen Schichten angeregt und detektiert wird, kann die bei einem single-slice-Experiment zur Relaxation der Spins erforderliche Wartezeit zur Aufnahme der Signale mehrerer Schichten genutzt werden, so daß der Gesamtzeitbedarf für das Experiment nicht verändert wird. Abbildung 11 zeigt die grundlegende Puls-

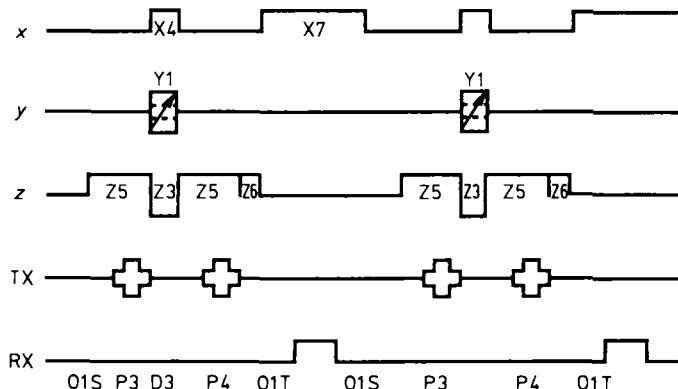


Abb. 11. Multislice-Pulssequenz mit schichtenselektivem 90° - (P3) und 180° -Puls (P4). Im Unterschied zu der in Abbildung 7 gezeigten Pulssequenz wird hier das Spinsystem durch den selektiven HF-Puls P3 mit definierter Bandbreite angeregt, wobei während dieses Pulses der Schichtengradient Z5 angelegt wird. Während des Pulses P3, der eine typische Dauer von mehreren Millisekunden hat, dephasiert die Magnetisierung unter dem Einfluß von Z5. Diese Auffächerung wird durch den negativen Gradienten Z3, der für die Dauer von D3 in der gleichen Richtung wie Z5 angelegt wird und gemäß Gleichung (16) mit Z5 verknüpft ist, rückgängig gemacht. Die Frequenz O1S definiert die Lage der gewählten Schicht, die Frequenz O1T ist die Empfängerfrequenz.

sequenz für eine Mehrschichten-Bildgebung mit zwei selektiven Anregungspulsen und den entsprechenden Gradientensequenzen für die Ortskodierung der Magnetisierung.

Der negative Gradient Z3, dessen Stärke durch (16) definiert ist, refokussiert in der Zeit D3 die unter dem Einfluß

$$Z3 = \frac{-Z5 \times P3}{2 \times D3} \quad (16)$$

von Z5 während des selektiven Hochfrequenzpulses P3 dephasierte Magnetisierung. In Abbildung 12 ist die Schichtenselektion mit der in Abbildung 11 dargestellten Pulssequenz skizziert.

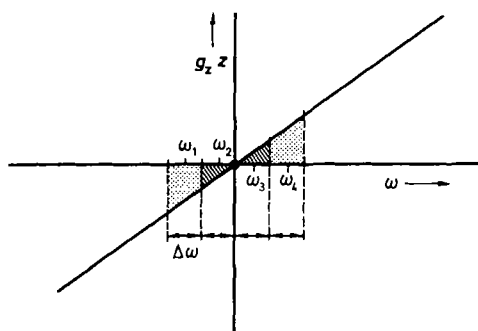


Abb. 12. Mehrschichtenselektion. Die Resonanzfrequenz ω ändert sich im Feldgradienten g_z linear mit der Ortskoordinate in z -Richtung. ω_1 bis ω_4 sind die Resonanzfrequenzen der Kerne in den Schichten 1–4. $\Delta\omega$ ist die Frequenzbreite einer Schicht, bestimmt durch die Dauer des selektiven HF-Pulses. Die einzelnen Schichten werden folgendermaßen angeregt: erst Schicht 2 mit der Frequenz ω_2 , dann Schicht 4 mit der Frequenz ω_4 , anschließend Schicht 1 mit ω_1 und zuletzt Schicht 3 mit ω_3 . Diese Anregungsfolge verhindert ein Überlappen der Signale benachbarter Schichten und ermöglicht das Relaxieren der Kerne in den bereits angeregten Schichten während der Anregung und Detektion in den nachfolgenden Schichten. Bei diesem Experiment beträgt die Repetitionszeit der Pulsfolge nur 1/4 der Repetitionszeit eines Einschichten-Experiments.

3.2.2. Multiecho-Bildgebung

Multiecho-Bildgebung basiert auf einer Hahnschen Pulssequenz. Anstatt eines einzelnen Echos werden jedoch mehrere Echos, erzeugt durch eine Folge von schichtenselektiven 180° -Hochfrequenzpulsen, detektiert und als separate Datensätze gespeichert. Jedes dieser Echos ist in gleicher Weise phasenkodiert, so daß aus jedem Echo ein komplettes Bild rekonstruiert werden kann. Abbildung 13 zeigt die von mir verwendete Multiecho-Pulssequenz, bei der der Phasenrefokussierungsgradient Y2 die unter Einwirkung des Phasenkodierungsgradienten Y1 dephasierte Magnetisierung refokussiert.

Da die Intensität eines Spin-Echos nach Gleichung (17) exponentiell von der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 abhängt,

$$M_{x,y}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (17)$$

erhält man nach der Rekonstruktion T_2 -gewichtete Bilder. Für isotrope Rotationsdiffusion ist T_2 mit der Beweglichkeit der Moleküle über die Rotationskorrelationszeit τ_c korreliert [Gl. (18)]^[17]. I ist die Kernspinnquantenzahl und $r = |r|$ der

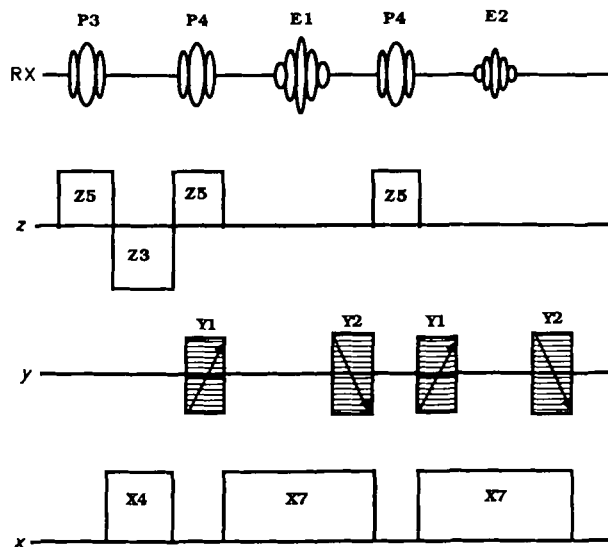


Abb. 13. Multiecho-Pulssequenz für eine Schicht. Die Kerne werden hier wie bei einem Mehrschichten-Experiment schichtenselektiv durch schmalbandige HF-Pulse (P3, P4) in Anwesenheit von magnetischen Feldgradienten (Z5) angeregt. Im Unterschied zu den bereits beschriebenen Methoden (Abb. 7 und 12) wird bei einem Multiecho-Experiment nicht ein einziges Echo, sondern eine Serie von Echos (E1, E2, ...) detektiert, wobei die Echos durch wiederholte Anwendung von selektiven 180° -Pulsen (P4) nach einer einzigen 90° -Anregung (P3) des Spinsystems erzeugt werden. Im Unterschied zu den Einzelecho-Methoden wird hier nach der Detektion eines Echos die durch den Phasengradienten Y1 verursachte Dephasierung der Magnetisierung durch den Gradienten Y2 wieder aufgehoben; die beiden Gradientenstärken ändern sich dabei von Phaseninkrement zu Phaseninkrement umgekehrt proportional zueinander. Der Vorteil dieser Methode ist eine Verlängerung der Zeit bis zum totalen Zerfall der Transversalmagnetisierung. Die Echoamplitude fällt bei diesem Experiment mit der Relaxationszeit T_2 ab. Da im Experiment bis zu 128 Echos detektiert werden können, läßt sich T_2 ortsaufgelöst bestimmen. Dadurch wird eine parameterselaktive Bildanalyse ermöglicht [7].

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{5} \gamma^4 \left(\frac{h}{2\pi} \right)^2 I(I+1) r^{-6} \cdot \left(3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (18)$$

Abstand der wechselwirkenden Kerne, ω die Resonanzfrequenz und h das Plancksche Wirkungsquantum.

Multiecho-Bildgebung bietet nun die Möglichkeit, die Spin-Spin-Relaxationszeiten T_2 der Kerne räumlich aufgelöst zu bestimmen, d. h. in einzigartiger Weise Informationen über die Moleküldynamik in bestimmten Bereichen der Probe zu erhalten. Aus den aus einer Multiecho-Sequenz rekonstruierten Bildern läßt sich ein sogenanntes T_2 -Bild berechnen. In ihm ist die Bildintensität proportional zu T_2 und gibt somit Einblick in die Homogenität der T_2 -Relaxation. Aus den Intensitätsprofilen können T_2 -Gradienten räumlich aufgelöst quantitativ bestimmt werden. Die Aufsummierung aller T_2 -gewichteten Bilder ergibt ein außerordentlich kontrastreiches Bild, das häufig sonst kaum sichtbare Feinstrukturen erkennen läßt.

Denkbare Anwendungen dieser Methode im Bereich der Polymerforschung sind z. B. die quantitative Erfassung der Bindungen von Wasser- oder anderen Lösungsmittelprotonen an Polymerketten und deren räumliche Verteilung über das Polymervolumen. Weiterhin bietet die Methode die Möglichkeit, über die T_2 -Gewichtung der aus den Spin-Echos rekonstruierten Bilder beim Menschen, aber auch im Tierversuch mit hoher räumlicher Auflösung malignes und gesundes Gewebe zu charakterisieren. Multiecho-Bildge-

bung ist somit sicherlich eine der wertvollsten Methoden der Bildgebung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sowohl hinsichtlich der Kontrastierung der Bilder als auch der Untersuchung von Moleküldynamik-Parametern.

3.2.3. „Chemical-shift“-selektive Bildgebung

Chemical-shift-selektive Bildgebung ist wohl die bildgebende Methode, die am typischsten für die NMR-Bildgebung überhaupt ist. Mit ihr werden Bilder nur von den Kernen erzeugt, die durch eine bestimmte chemische Verschiebung ausgezeichnet sind. So kann z. B. selektiv die räumliche Verteilung des Wasser- oder des Fettgehalts in einer Gewebeprobe, einem Organ *in vivo* oder einer Pflanze abgebildet werden. Die Abbildung der Verteilung anderer Metaboliten, z. B. von anorganischem Phosphat oder Kreatinphosphat durch ^{31}P -NMR-Bildgebung oder von ^{13}C -markierten Substanzen durch ^{13}C -NMR-Bildgebung, scheint ebenfalls möglich. Die Anwendung dieser Methode ist bei hohen Magnetfeldstärken relativ einfach, da die chemische Verschiebung der Kerne in Hz proportional zur Stärke des statischen Magnetfeldes wächst und die in Frage kommenden Signale im Spektrum im allgemeinen gut separiert sind.

Die zu detektierende Kernspezies wird im Experiment durch einen schmalbandigen Hochfrequenzpuls, z. B. einen Gauß-förmigen Puls mit einer Bandbreite von wenigen hundert Hz, selektiv angeregt, und nur diese Spezies wird auch detektiert (Abb. 14). Der weitere Verlauf des Experiments ist

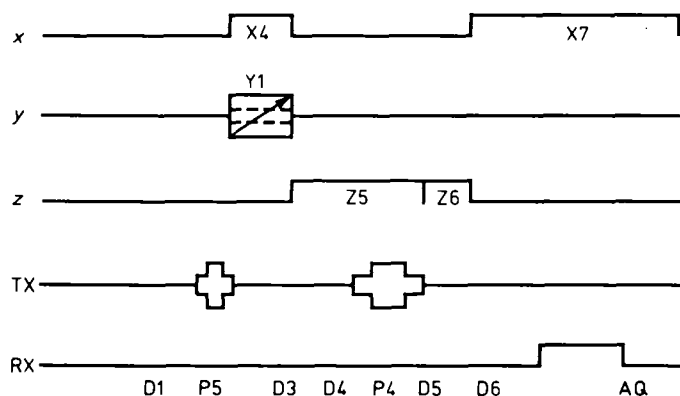


Abb. 14. Pulssequenz zur Aufnahme eines chemical-shift-selektiven Bildes. Die Selektion nach der chemischen Verschiebung einer Kernspezies erfolgt durch einen Gauß-förmigen schmalbandigen 90° -Puls P5, dessen Trägerfrequenz der Resonanzfrequenz der zu selektierenden Kernspezies entspricht. Der weitere Verlauf der Pulssequenz ist identisch mit dem in Abbildung 7 gezeigten.

dann ein normales Spin-Echo-Experiment wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, allerdings mit dem Unterschied, daß während der Spin-Echo-Sequenz nur noch die nach der chemischen Verschiebung selektiv angeregte Magnetisierung durch die Hochfrequenzpulse manipuliert und detektiert wird.

Die Abbildungen 15 und 16 demonstrieren die exzellente Selektion chemisch verschiedener Kernspezies, hier Fett- und Wasserprotonen, in einem „Phantom“, einem 10 mm-NMR-Röhrchen, gefüllt mit Wasser, in dem sich ein 5 mm-Röhrchen, gefüllt mit Öl, befindet. Dieses Experiment wurde bei 11.74 T, entsprechend 500 MHz Protonenresonanzfrequenz, durchgeführt.

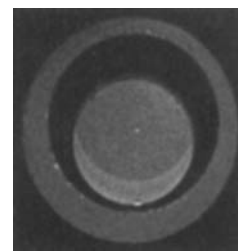


Abb. 15. Protonenbild eines Phantoms, das aus einem 10 mm-NMR-Röhrchen, gefüllt mit Wasser, besteht, welches ein mit Öl gefülltes 5 mm-Röhrchen enthält. Meßfrequenz ist 500 MHz. Die relative chemische Verschiebung der Lipid- zu den Wasserprotonen ist deutlich zu erkennen.

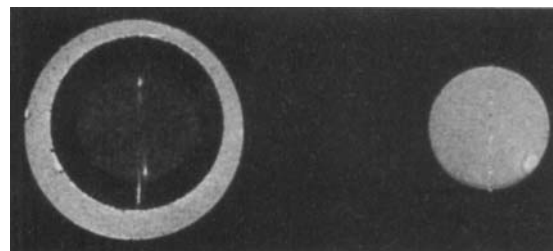


Abb. 16. Links: Chemical-shift-selektives Bild der Wasserprotonen der Probe von Abbildung 15. Rechts: Chemical-shift-selektives Bild der Lipidprotonen der Probe von Abbildung 15. Die Anregung erfolgte in beiden Fällen durch einen selektiven Gauß-Puls mit einer Bandbreite von ca. 600 Hz.

3.2.4. T_1 -Bildgebung

Die Rückkehr der Magnetisierung ins thermische Gleichgewicht nach der Anregung durch einen 90° -Hochfrequenzpuls wird durch die beiden Relaxationszeiten T_1 und T_2 bestimmt. T_2 beschreibt den Zerfall der Phasenkohärenz des Spinsystems, T_1 die Relaxation der Magnetisierung parallel zum statischen Magnetfeld.

Die T_1 -Relaxation verläuft gemäß Gleichung (19). Zur Bestimmung von T_1 werden in der NMR-Spektroskopie In-

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (19)$$

version-Recovery-^[11] und Saturation-Recovery-Pulssequenzen^[12] eingesetzt. Durch Kombination dieser Pulssequenzen mit bildgebenden Methoden (Abb. 17) sind T_1 -gewichtete Bilder zugänglich, aus denen sich T_1 orts aufgelöst bestimmen läßt. Dies läßt einerseits Rückschlüsse auf die Beweglichkeit von Molekülen in verschiedenen Bereichen der Probe zu und ermöglicht andererseits bei unterschiedlichen T_1 -Zeiten eine stärkere Kontrastierung des Bildes.

Abbildung 17a zeigt eine Inversion-Recovery-Bildgebungssequenz. Bei dieser Pulsfolge wird die z-Komponente M_z der Magnetisierung durch den 180° -Puls invertiert. Nach der Wartezeit VD, in der die Longitudinalkomponente der Magnetisierung durch Spin-Gitter-Relaxation zunimmt, wird durch ein Spin-Echo-Experiment dieser Anteil der Gesamtmagnetisierung detektiert. Die Echoamplitude ist dabei durch beide Relaxationszeiten bestimmt [Gl. (20)]. TR

$$M_y(t) = M_0(1 - \beta e^{-\frac{VD}{T_1}})(1 - 2e^{-\frac{TR}{T_2}}e^{-\frac{TE}{2T_1}} + e^{-\frac{TE}{T_2}}) \quad (20)$$

ist die Repetitionszeit des Experiments, TE die Spin-Echo-Zeit, β ist 2 für Inversions-Recovery- und 1 für Saturation-Recovery-Messungen.

In Abbildung 17b ist eine Saturation-Recovery-Bildgebungssequenz dargestellt. Hierbei wird die Magnetisierung durch eine schnelle Folge von 90° Pulsen gesättigt. Der weitere Verlauf des Experiments entspricht dem des Inversion-Recovery-Experiments.

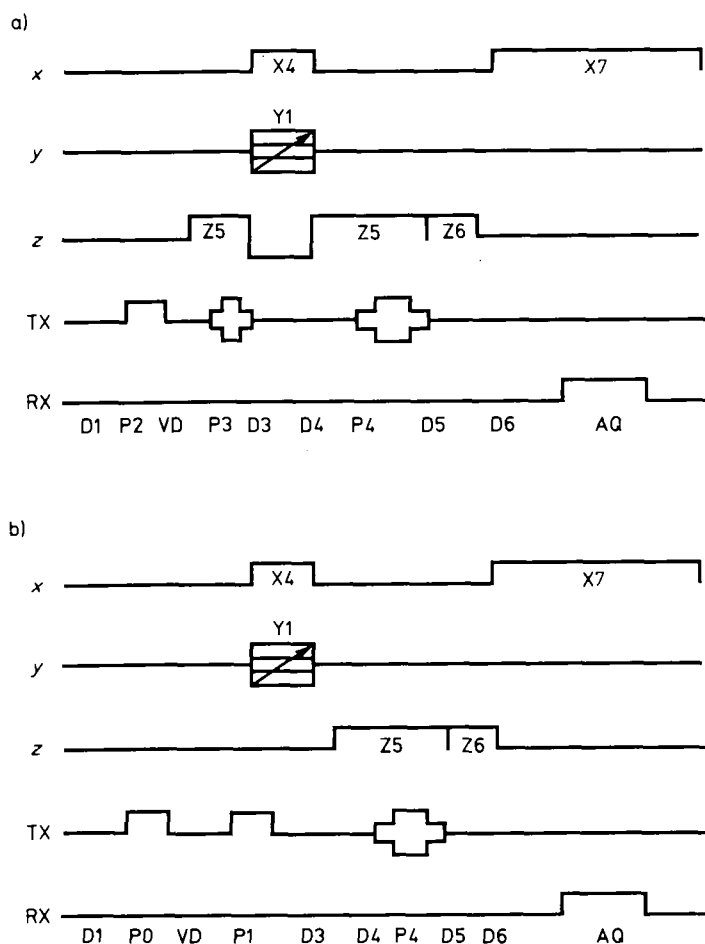


Abb. 17. a) Inversion-Recovery-Bildgebungssequenz. Zu Beginn der Pulssequenz wird die Magnetisierung durch einen breitbandigen 180° -Puls P2 invertiert. Nach einer Wartezeit VD, in der die Magnetisierung entlang der z-Achse parallel zu B_0 relaxieren kann, wird ein konventionelles Spin-Echo-Experiment (Abb. 7) durchgeführt. Die Bilder sind je nach Länge der Wartezeit VD stark T_1 -gewichtet. Eine Serie von Inversion-Recovery-Bildern mit unterschiedlichen Wartezeiten VD ermöglicht die orts aufgelöste T_1 -Bestimmung. b) Saturation-Recovery-Bildgebungssequenz. Nach der Sättigung der Magnetisierung durch eine aperiodische Puls-Sättigungsfolge P0, bei der der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen nach einer geometrischen Folge abnimmt, verläuft das Experiment analog zu dem von Abbildung 17a. Die Saturation-Recovery-Pulsfolge hat im Vergleich zur Inversion-Recovery-Pulsfolge den Vorteil, daß keine Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anwendungen der Pulsfolge erforderlich ist, da die Magnetisierung gesättigt wird und nicht das thermische Gleichgewicht erreichen muß. Dies ermöglicht eine schnelle T_1 -gewichtete Bildgebung.

Da T_1 ebenfalls mit der Molekülbeweglichkeit korreliert und außerdem eine deutliche Abhängigkeit von $1/(1 + \omega^2 \tau_c^2)$ zeigt (siehe Abschnitt 4.2), ist die T_1 -Gewichtung der Bilder eine hervorragende Möglichkeit zur Visualisierung moleküldynamischer Eigenschaften. Wegen der Feldstärkeabhängigkeit von T_1 eignen sich diese Methoden auch zur orts aufgelösten, feldstärkeabhängigen T_1 -Bestimmung. Hieraus erhält man Informationen über die zur Relaxation beitragenden physikalischen Wechselwirkungen wie „chemical-shift“-Anisotropie oder eingeschränkte molekulare Beweglichkeit.

3.3. Gradientenumkehrmethoden

Messungen mit den in den Abschnitten 3.2 bis 3.2.4 beschriebenen Spin-Echo-Methoden sind im allgemeinen zeitraubend, da zwischen den Einzelexperimenten eine Wartezeit für die Relaxation der longitudinalen Magnetisierung von mindestens T_1 , besser aber 3–5 mal T_1 erforderlich ist. Um eine schnelle Bildgebung zu ermöglichen, ist in den letzten Jahren eine große Zahl von Pulssequenzen entwickelt worden. Die populärsten und für die NMR-Mikroskopie bedeutendsten sind die FLASH (Fast Low Angle Shot)-Methoden^[13], die die Magnetisierung statt mit einem 180° -Refokussierungspuls durch das Umschalten des Dephasierungsgradienten refokussieren (Abb. 18).

Bei dieser Pulssequenz wird das Spinsystem mit einem schichtenselektiven Hochfrequenzpuls mit kleinem Pulswinkel angeregt. Unter dem Einfluß des Gradienten X9 dephasiert die Magnetisierung in der x' - y' -Ebene, gleichzeitig bewirkt der Gradient Y1 eine Phasenkodierung in der zweiten Dimension der zu detektierenden Schicht. Nach einer Zeit D3 wird der Gradient X9 invertiert; dies führt zur Rephasierung der Magnetisierung in der beobachteten Schicht und letztlich wieder zu einem kohärenten Zustand, der als „Gradienten-Echo“ detektiert wird. Die FLASH-Sequenz hat den Vorteil kurzer Repetitionszeiten TR, so daß in sehr kurzer Zeit, 100 ms bis wenige s, ein Bild aufgenommen werden kann.

Der Nachteil dieser Methode ist ihre Sensibilität gegen Inhomogenitäten des statischen Magnetfeldes. Da in der FLASH-Sequenz der 180° -Hochfrequenzpuls fehlt, wird nur die Magnetisierung refokussiert, die durch den Gradienten X9 dephasiert wurde; Magnetisierung, die durch Feldinhomogenitäten oder Suszeptibilitätssprünge an Grenzflächen dephasiert wurde, wird durch die Invertierung des Gradienten

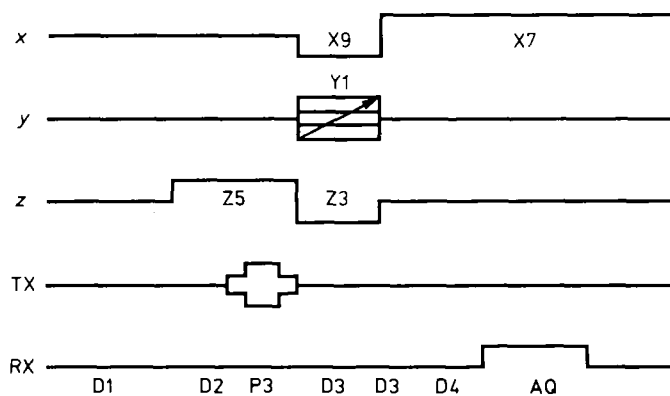


Abb. 18. Pulssequenz zur schnellen Bildgebung mit der FLASH-Methode [13]. Die Magnetisierung wird durch den schichtenselektiven HF-Puls P3 in Anwesenheit des Schichtengradienten Z5 um einen kleinen Winkel aus der z-Achse gekippt. Die x-y-Komponenten von M werden dann durch die Gradienten X9 und Y1 während der Zeit D3 dephasiert. Gleichzeitig mit dem Abschalten des Y1-Gradienten wird der X9-Gradient zum Lesegradienten X7 umgeschaltet, der das umgekehrte Vorzeichen wie X9 hat. Dies führt zu einer Rephasierung der Magnetisierung in der x' - y' -Ebene und zu einem „Gradienten-Echo“.

ten nicht beeinflußt. Sie trägt daher nicht oder nur sehr wenig zum Signal bei, was zu einem schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis als beim Spin-Echo-Experiment führt.

Allerdings kann dies auch einen besseren Kontrast im Bild zur Folge haben.

Da sich bei Gradientenumkehrmethoden zu Beginn der Pulssequenz die Magnetisierung nicht notwendigerweise im thermischen Gleichgewicht befinden muß, sind sie die zur Zeit einzigen praktikablen Methoden für schnelle Bildgebung. In Verbindung mit kurzen Akquisitionszeiten und sehr kurzen Gradientenstabilisierungszeiten von weniger als 100 µs, wie sie bei einem Mikroskopie-System möglich sind, lassen sich mit Gradientenumkehrmethoden Bilder mit einer Matrixgröße von 128 × 64 in etwa 100 ms aufnehmen^[14]. Diese sehr kurzen Bildaufnahmezeiten ermöglichen die Verfolgung relativ schneller Kinetiken durch NMR-Bildgebung. Die Abbildung 19 zeigt Bilder eines mit ca. 2 Hz rotierenden Glasröhrchens, das mit Wasser gefüllt ist und einen rechteckigen Plastikstab enthält. Trotz der Rotation der Probe sind die Bilder bemerkenswert scharf.

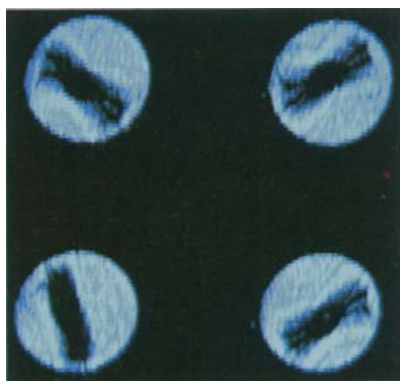


Abb. 19. Bilder eines mit 2 Hz rotierenden Röhrchens, in dem sich Wasser und ein Plastikstab befinden. Die Bilder wurden mit einer „Snapshot-FLASH“-Sequenz [14] bei einer Meßzeit von etwa 90 ms pro Bild und einer Matrixgröße von 128 × 64 Punkten aufgenommen. Die Gradientenstärken betrugen 300 mT m⁻¹ für den Lese- und Phasenkodierungsgradienten und 200 mT m⁻¹ für den schichtenselektiven Gradienten. Die Messungen wurden bei einer Magnetfeldstärke von 7.05 T vorgenommen.

4. Kontrastbestimmende Parameter

Im Gegensatz zur Röntgentomographie, die nur die Absorption der Röntgenstrahlen als kontrastbestimmenden Parameter kennt, werden Bildkontraste in der NMR-Bildgebung durch die Dichte und die Relaxationszeiten T_1 und T_2 der untersuchten Kerne bestimmt. Durch geeignete Wahl der Aufnahmeparameter lassen sich auf diese Weise Bildkontraste erzeugen, die in einer wohldefinierten Beziehung zu bestimmten physikalischen Eigenschaften des untersuchten Objekts stehen.

Bei der Aufnahme eines Bildes mit einer Spin-Echo-Pulssequenz wird der Bildkontrast für jedes Pixel durch die Signalstärke $S(TE, TR)$ [Gl. (21)]^[15] des Voxels bestimmt, das diesem Pixel entspricht. Durch geeignete Wahl der Para-

$$S(TE, TR) = \rho \left(1 - 2e^{-\frac{TR}{T_1}} e^{-\frac{TE}{2T_2}} + e^{-\frac{TR}{T_1}} e^{-\frac{TE}{T_2}} \right) \quad (21)$$

meter Spin-Echo-Zeit TE und Repetitionszeit TR lassen sich gemäß (21) die Bildkontraste nach der Spindichte ρ oder den Relaxationszeiten T_1 und T_2 gewichten.

Für die Gradientenumkehrmethode ist die Signalstärke durch Gleichung (22)^[16] bestimmt. Durch Variation von

$$S = \rho \frac{(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}) e^{-\frac{TE}{T_2}} \sin \theta}{1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} e^{-\frac{TR}{T_2}} - (e^{-\frac{TR}{T_1}} - e^{-\frac{TR}{T_2}}) \cos \theta} \quad (22)$$

Pulswinkel θ , Spin-Echo-Zeit TE und Repetitionszeit TR lassen sich auch mit dieser Methode unterschiedliche Bildkontraste erzeugen.

4.1. Spindichte

Die Spindichte ρ entspricht der Zahl der Kerne einer bestimmten Spezies, z. B. Wasserprotonen, Lipidprotonen, in einem definierten Volumenelement. Aus der Intensität der Signale im Spektrum oder aus den Integralen der Bildprofile kann dann auf die relative und bei einer Intensitätseichung auch auf die absolute Häufigkeit einer Spezies, z. B. eines Metaboliten, geschlossen werden.

Reine Spindichte-Bilder erhält man mit einer Spin-Echo-Pulsfolge bei der Meßparameterwahl $TR \gg T_1$ und $TE \ll T_2$. Für diese Parameter ist die Signalstärke $S(TE, TR)$ nur noch eine Funktion der Spindichte ρ , d. h. der Bildkontrast wird ausschließlich durch die Häufigkeit der Kerne im entsprechenden Voxel bestimmt. In diesem Fall lassen die Profile eine quantitative Bestimmung der Metaboliten zu. Häufig wählt man aus Gründen der Meßzeitersparnis eine kürzere Repetitionszeit TR mit $TR = T_1$.

Für den Fall, daß weiterhin $TE \ll T_1$ und $TE \ll T_2$ gilt, ist die Intensität S des NMR-Signals gemäß Gleichung (21) 0.63 ρ und damit ebenfalls unabhängig von weiteren Parametern.

4.2. Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

Die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 beschreibt die Rückkehr der z-Komponente der Magnetisierung ins thermische Gleichgewicht nach einer Anregung des Spinsystems durch einen Hochfrequenzpuls. Bei der ¹H-NMR-Bildgebung charakterisiert sie praktisch ausschließlich die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Protonen; bei anderen Kernen, z. B. ³¹P in Adenosintriphosphat, sind aber auch Wechselwirkungen aufgrund der magnetischen Anisotropie der Phosphorkerne als Relaxationsmechanismen denkbar. Für die Relaxationsrate $1/T_1$ im Falle homonuclearer Dipol-Dipol-Kopplung der Kernspins I bei isotroper Bewegung erhält man Gleichung (23)^[17], aus der ersichtlich ist, daß $1/T_1$ mit der Korre-

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{5} \gamma^4 \left(\frac{h}{2\pi} \right)^2 I(I+1) r^{-6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (23)$$

relationszeit τ_c der beobachteten Moleküle korreliert. Bei eingeschränkter Beweglichkeit der Moleküle, dies ist im allgemeinen bei biologischen, aber auch bei Polymerproben der Fall, wird $1/T_1$ eine Funktion der Resonanzfrequenz ω der Kernspins und somit von der verwendeten Magnetfeldstärke abhängig. Aus T_1 -gewichteten Bildern und aus räumlich aufgelösten T_1 -Messungen (siehe Abschnitt 3.2.4) lassen sich bei bekannten Korrelationszeiten mittlere Molekülabstände r und bei bekanntem r Korrelationszeiten τ_c abschätzen.

Aus Gleichung (21) lassen sich die experimentellen Bedingungen für T_1 -gewichtete Spin-Echo-Bilder ableiten: Für $TE \ll T_1$, T_2 erhält man Gleichung (24). Eine analoge Bedingung für die Gradientenumkehrmethode [Gl. (25)] ergibt sich aus (22) durch Wahl von $TE \ll T_2$ und $TR \gg T_2$.

$$S(TR, T_1) = \rho \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}\right) \quad (24)$$

gung für die Gradientenumkehrmethode [Gl. (25)] ergibt sich aus (22) durch Wahl von $TE \ll T_2$ und $TR \gg T_2$.

$$S(\theta) = \rho \sin \theta \quad (25)$$

4.3. Spin-Spin-Relaxationszeit T_2

Wie die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 zeigt auch die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 eine Abhängigkeit von der Korrelationszeit der Moleküle^[17], allerdings ist wegen des konstanten Faktors $3\tau_c$ in Gleichung (26) [= Gleichung (18)] die Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke bedeutend geringer. Dies macht T_2 zum idealen Parameter für die Cha-

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{5} \gamma^4 \left(\frac{\hbar}{2\pi}\right)^2 I(I+1) r^{-6} \cdot \left(3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2}\right) \quad (26)$$

rakterisierung der Moleküldynamik, da sich T_2 -Werte unabhängig von der Meßfrequenz miteinander vergleichen lassen.

Reine T_2 -gewichtete Bilder erhält man durch die Wahl $TR \gg T_1$, aus der für die Signalintensität als Funktion der Spin-Echo-Zeit TE und der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 Gleichung (27) folgt. Der Bildkontrast wird in diesem Fall

$$S(TE, T_2) = \rho e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (27)$$

nur noch durch die Spindichte ρ und das Verhältnis TE/T_2 bestimmt.

5. Grenzen der räumlichen Auflösung des NMR-Mikroskops

Die erreichbare räumliche Auflösung des NMR-Mikroskops ist durch physikalische und technische Faktoren limitiert^[18]. Physikalische Faktoren sind die Linienbreite und die chemische Verschiebung der NMR-Signale sowie Diffusionsprozesse und Suszeptibilitätssprünge innerhalb des untersuchten Objekts und an seinen Grenzflächen. Technische Faktoren können Magnetfeldinhomogenitäten oder -instabilitäten, Nichtlinearitäten des magnetischen Gradientenfeldes und das erreichbare Signal/Rausch-Verhältnis sein.

5.1. Physikalische Grenzen

5.1.1. Linienbreite des NMR-Signals

Die Linienbreite $\Delta\nu$ eines NMR-Signals ist als die Breite eines Lorentz-Signals bei halber Signalthöhe definiert [Gl. (28)], wobei T_2 wieder die Spin-Spin-Relaxationszeit der

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi T_2} \quad (28)$$

Kerne ist. Aus den Gleichungen (12) und (28) ergibt sich für die bei gegebenem T_2 erreichbare räumliche Auflösung Δx Gleichung (29).

$$\Delta x = \frac{2}{\gamma g_x T_2} \quad (29)$$

Im folgenden werden drei in der Praxis häufig auftretende Fälle betrachtet: NMR-Mikroskopie an a) wasserähnlichen Proben, b) biologischem Material, c) Festkörpern.

In wasserähnlichen Proben betragen die T_2 -Werte mehrere hundert Millisekunden bis zu Sekunden, und sowohl hinsichtlich T_1 [Gl. (23)] als auch hinsichtlich T_2 [Gl. (26)] liegt der Fall des „extreme narrowing“ vor, d. h. die Terme $\omega^2 \tau_c^2$ sind sehr viel kleiner als Eins und deshalb vernachlässigbar. Die Relaxationsgeschwindigkeiten sind damit nicht mehr feldstärkeabhängig. Nach Gleichung (29) ist z. B. bei Proben mit $T_2 = 1$ s für eine $10 \mu\text{m}$ -Pixel-Auflösung eine Gradientenstärke von 0.7 mTm^{-1} erforderlich. In biologischem Material kann die Linienbreite des NMR-Signals je nach Umgebung der Kerne bis zu 100 Hz sein; dies entspricht einem T_2 -Wert von etwa 3 ms . Um hier eine räumliche Auflösung von $10 \mu\text{m}$ zu erreichen, ist eine Gradientenstärke von mindestens 235 mTm^{-1} erforderlich. In Festkörpern kann die Linienbreite von Protonensignalen aufgrund der Dipol-Dipol-Kopplung der Protonen sogar bis zu 50 kHz betragen. Für eine Auflösung von 1 mm würde hier schon eine Gradientenstärke von 1100 mTm^{-1} benötigt. Diese sehr starken Gradienten müßten in etwa $20 \mu\text{s}$ geschaltet werden, was enorme Wirbelströme in den elektrisch leitenden Teilen des Magneten, die eine starke Rückwirkung auf die Magnetisierung hätten, induzieren würde und auch aus Gründen der Selbstinduktion praktisch nicht realisierbar ist.

Aus diesen Betrachtungen wird ersichtlich, daß Auflösungen im μm -Bereich für wasserähnliche und biologische Proben erreichbar sein sollten, daß sie aber für Festkörper mit den beschriebenen Spin-Echo- und Gradientenumkehrmethoden nicht erreichbar sind. Mögliche Techniken hierfür sind die Kombination aus rotierenden Gradienten mit der MAS (Magic Angle Spinning)-Frequenz der Probe^[19] oder von Multipulssequenzen mit Bildgebungsmethoden^[20–22] oder das Arbeiten mit Hochfrequenzpuls-Feldgradienten^[23].

Glücklicherweise liegen die Spin-Spin-Relaxationszeiten vieler Polymere im ms -Bereich, so daß bei ihnen eine räumlich hochaufgelöste Bildgebung mit konventionellen Methoden möglich ist.

5.1.2. Chemische Verschiebung

Die magnetische Umgebung einer Kernsorte in einer Probe kann sehr stark ortsabhängig sein. Sie ist charakterisiert durch die chemische Verschiebung δ der Resonanzsignale im Spektrum, die gemäß Gleichung (30) definiert ist.

$$\delta = \frac{\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Referenz}}}{\omega_{\text{Referenz}}} \quad (30)$$

δ ist beispielsweise abhängig vom pH-Wert, von der Anwesenheit paramagnetischer Ionen, die sich in bestimmten Regionen der Probe anreichern können, und von der Temperatur. Dies führt zu einer Spreizung $\Delta\nu$ der Resonanzfrequenzen dieser Kernsorte über einen bestimmten Frequenzbe-

reich. Der Frequenzbereich der chemischen Verschiebung einer Kernsorte, und damit auch die Spreizung $\Delta\nu$, ist proportional der verwendeten Magnetfeldstärke B_0 [Gl. (31)], wobei die Größe von $\Delta\delta$ ein Maß für die Unterschiede in der magnetischen Umgebung der Kerne ist.

$$\Delta\nu = \gamma \Delta\delta B_0 10^{-6} \quad (31)$$

Für die bei einem gegebenen Bereich der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ einer Kernsorte und bei vorgegebener Magnetfeldstärke B_0 erreichbare räumliche Auflösung Δx erhält man mit den Gleichungen (12) und (31) den Ausdruck (32).

$$\Delta x = \frac{1}{g} \gamma \Delta\delta B_0 10^{-6} \quad (32)$$

Um z. B. eine Auflösung von 10 μm zu erreichen, ist bei einer Feldstärke von 9.4 T (400 MHz Protonenresonanzfrequenz) und einem chemischen Verschiebungsbereich von $\Delta\delta \approx 0.05$ für Wasser in biologischem Material eine Gradientenstärke von 50 mTm^{-1} erforderlich.

5.1.3. Molekulare Diffusion

Hinsichtlich des Einflusses der molekularen Diffusion auf die in der NMR-Mikroskopie erreichbare räumliche Auflösung sind zwei Aspekte zu betrachten.

a) Molekulare Diffusion ist sicherlich ein auflösungslimitierender Faktor, wenn die Moleküle, deren Kerne beobachtet werden, zwischen der Anregung durch einen Hochfrequenzpuls und der Detektion das kleinste detektierbare Volumenelement, das Voxel, verlassen und in ein benachbartes Voxel hineindiffundieren.

Die für eine noch wohldefinierte Auflösung maximal erlaubte Zeit bei einem Spin-Echo-Experiment läßt sich mit Hilfe der klassischen Thermodynamik^[24] grob abschätzen. Betrachtet wird ein Teilchenpaket, das sich zum Zeitpunkt $t = 0$ im Zentrum $x = 0$ des Voxels befindet. Unter dem Einfluß Brownscher Molekularbewegung diffundiert das Teilchenpaket mit der Diffusionskonstanten D nach dem zweiten Fickschen Gesetz in der Zeit t um Δx auseinander [Gl. (33)]. In einem Spin-Echo-Experiment ist die räumliche

$$\Delta x = \sqrt{x^2} = \sqrt{2Dt} \quad (33)$$

Auflösung demnach nur noch dann definiert, wenn die Moleküle das Voxel, in dem ihre Kerne angeregt wurden, während der Spin-Echo-Zeit TE nicht verlassen, d. h. wenn die Beziehung (34) gilt.

$$TE \leq \frac{(\Delta x)^2}{2D} \quad (34)$$

Dies bedeutet z. B. für ein Voxel von 10 μm Kantenlänge und eine Probe aus reinem Wasser mit einer Diffusionskonstanten $D = 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, daß $TE < 25 \text{ ms}$ bleiben muß. In biologischem Material oder in Polymeren ist die Diffusionskonstante im allgemeinen deutlich kleiner als in reinem Wasser, und TE eines NMR-Mikroskopie-Experiments liegt normalerweise im Bereich von 1–20 ms, so daß unter den genannten Annahmen die molekulare Diffusion die erreichbare Auflösung nicht limitiert.

b) Nach Carr und Purcell^[25] relaxiert die transversale Magnetisierung unter dem Einfluß der Relaxationszeit T_2 und magnetischer Feldgradienten $|G|$ bei Anwesenheit von Diffusion entsprechend Gleichung (35). Dies führt offen-

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} e^{-\frac{1}{12} \gamma^2 G^2 D t^3} \quad (35)$$

sichtlich dann zu einer Linienverbreiterung, wenn der Diffusionsterm M_D (36) etwa gleich groß wie der T_2 -Term M_{T_2} (37)

$$M_D = e^{-\frac{1}{12} \gamma^2 G^2 D t^3} \quad (36)$$

$$M_{T_2} = e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (37)$$

wird. Für Wasser mit einer Diffusionskonstanten $D = 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ läßt sich hieraus z. B. die Gradientenstärke für eine gewünschte Auflösung von 10 μm zu 4 mTm^{-1} errechnen. Da in einem NMR-Mikroskop in jedem Fall Gradientenstärken deutlich größer als 4 mTm^{-1} erreichbar sind, ist die molekulare Diffusion bei Raumtemperatur in der Praxis keine Limitierung der räumlichen Auflösung.

5.2. Technische Grenzen

Neben physikalischen Faktoren sind als Limitierungen für die erreichbare räumliche Auflösung auch technische, z. B. Magnetfeldinhomogenitäten, zeitliche Schwankungen des statischen Magnetfeldes, mangelnde Gradientenfeldlinearität und schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis, zu berücksichtigen.

5.2.1. Homogenität und Stabilität des statischen Magnetfeldes

Die Homogenität supraleitender Hochfeldmagnete, wie sie heutzutage in der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie verwendet werden, ist durch den Inhomogenitätsfaktor f [Gl. (38)] charakterisiert, dessen Wert etwa $3 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$ ist.

$$f = \frac{\Delta B}{B_0} \quad (38)$$

Um eine definierte Auflösung zu erhalten, muß die Inhomogenität oder Instabilität ΔB des statischen Magnetfeldes B_0 während der gesamten Meßzeit kleiner oder höchstens gleich der durch den Gradienten über das Voxel erzeugten Inhomogenität sein [Gl. (39)].

$$\Delta B = g \Delta x \quad (39)$$

Unter Berücksichtigung des Inhomogenitätsfaktors f erhält man für die Pixel-Auflösung Gleichung (40). Demnach

$$\Delta x = f \frac{B_0}{g} \quad (40)$$

ist mit einem 10T-Magneten bei einer Gradientenstärke von 100 mTm^{-1} eine maximale Auflösung von 3 μm und bei 750 mTm^{-1} eine von 0.4 μm erreichbar. Vorausgesetzt ist in beiden Fällen eine Meßzeit von maximal einer Stunde. Bei einem „Übernachtexperiment“ von 15 h erzielt man nur

noch eine Auflösung von 45 μm bei 100 und 6 μm bei 750 mTm^{-1} . Magnetfeldinhomogenitäten und -instabilitäten können demnach die räumliche Auflösung in der NMR-Mikroskopie limitieren.

5.2.2. Linearität des magnetischen Gradientenfeldes

Magnetische Feldgradienten sind meist nur in der Theorie konstante Größen. In der Praxis ist schon aus geometrischen Gründen – eine Spule hat eine endliche Länge und ein aus Platzgründen vorgegebenes Länge/Durchmesser-Verhältnis – ein konstanter Feldgradient über die gesamte Spulenlänge und den Spulendurchmesser nicht realisierbar. Durch den Bau des Gradientensystems und die räumliche Ausdehnung der Spulen – normalerweise sind die Spulendrähte mehrlagig gewickelt – sind weitere Störungen der Linearität des Gradientenfeldes zu erwarten.

Dies bedeutet, daß die magnetischen Feldgradienten innerhalb einer Gradientenspule abhängig vom Ort sind und nur durch eine Reihenentwicklung des Gradienten [Gl. (41)] annähernd beschrieben werden können.

$$g = g(x) = a_1 g_1 x + a_2 g_2 x^2 + a_3 g_3 x^3 + \dots \quad (41)$$

Gradientenfeld-Nichtlinearitäten führen zu Fehlern bei der Abbildung des untersuchten Objekts und damit verbunden zu einer Verschlechterung der räumlichen Auflösung in den nichtlinearen Bereichen des Gradientenfeldes. Kommerziell erhältliche Gradientensysteme erzeugen im Zentrum des Gradientensystems Gradientenfelder mit Nichtlinearitäten in der Ebene von etwa 1% auf einem Durchmesser von ca. 10 mm und 3% auf einem Durchmesser von ca. 20 mm. Diese Nichtlinearitäten machen sich im Bild nicht als Störungen bemerkbar.

5.2.3. Signal/Rausch-Verhältnis

Wie in jedem NMR-Experiment bestimmt auch in der NMR-Mikroskopie das Signal/Rausch-Verhältnis S/N die Meßzeit und die erreichbare Auflösung. Eine Vergrößerung des Signal/Rausch-Verhältnisses eines NMR-Signals um den Faktor 2 ergibt die gleiche S/N-Verbesserung im Bild oder eine um den Faktor 4 kürzere Meßzeit für das gleiche S/N bei konstanter Auflösung. Das Signal/Rausch-Verhältnis bei der Aufnahme eines hochauflösten NMR-Spektrums an einer ganzen Probe ist jedoch nicht identisch mit dem S/N in einem Bild, da bei der Aufnahme eines Bildes das NMR-Signal aus einer definierten Schicht auf alle Pixel des Bildes verteilt wird. Das S/N pro Pixel ist deshalb deutlich schlechter als in einem eindimensionalen Spektrum.

Eine Erhöhung der Auflösung in der Ebene um den Faktor 2 in beiden Dimensionen reduziert das Voxel-Volumen um den Faktor 4 und erfordert eine um den Faktor 16 größere Zahl von Akkumulationen für das gleiche Signal/Rausch-Verhältnis. Bei einer Reduktion der Schichtdicke um den Faktor 2 ist für gleiches S/N eine vierfach größere Zahl von Datenakkumulationen bei konstanter Auflösung in der Ebene erforderlich. Die Volumenabhängigkeit des S/N, gegeben nach Hoult und Richards^[26] gemäß (42), ist der be-

$$\frac{S}{N} \sim V \quad (42)$$

deutendste Limitierungsfaktor in der NMR-Mikroskopie. Gleichung (42) besagt z. B., daß sich bei einer Verbesserung der räumlichen Auflösung von 100³ μm^3 auf 10³ μm^3 das Signal/Rausch-Verhältnis um den Faktor 1000 verschlechtert und damit die Zahl der Akkumulationen für gleiches S/N um den Faktor 10⁶ wächst. Vorausgesetzt wird bei dieser Betrachtung gleiches Probenvolumen und damit auch gleicher Durchmesser der Sende- und Empfangsspule. Aus (42) läßt sich auch eine Abhängigkeit des S/N von der Resonanzfrequenz ableiten [Gl. (43)]. Diese Abhängigkeit, darge-

$$\frac{S}{N} \sim \sqrt[4]{\omega_0} \quad (43)$$

stellt in Abbildung 20, zeigt, daß aus S/N-Gründen NMR-Mikroskopie sinnvoll nur bei möglichst hohen Feldstärken betrieben werden kann.

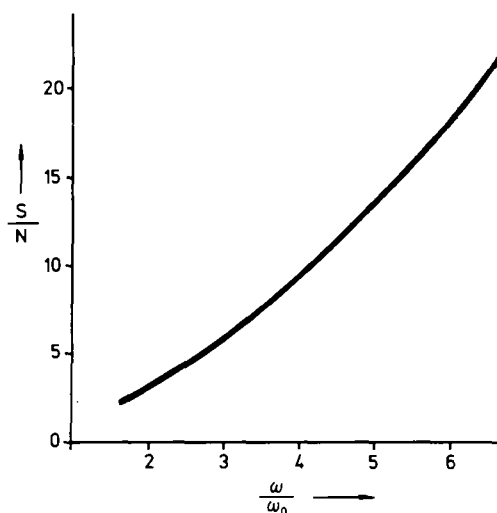


Abb. 20. Signal/Rausch-Verhältnis als Funktion der Resonanzfrequenz ω und damit der Feldstärke des statischen Magnetfeldes [Gl. (43)] bezogen auf $\omega_0 = 100 \text{ MHz}$ ($S/N \equiv 1$).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Abhängigkeit des S/N von der Bandbreite $\Delta\omega$ des Empfängers oder der Spektrenweite des aufgenommenen Bildes. Der Zusammenhang (44) zeigt, daß mit abnehmender Bandbreite das Rauschen

$$\frac{S}{N} \sim \frac{1}{\sqrt{\Delta\omega}} \quad (44)$$

geringer wird. Zugleich verlängert sich dabei aber die Zeit für die Datenakquisition. Da zudem bei der Spin-Echo-Bildgebung die Echos wegen der Datenverarbeitung (Fourier-Transformation) symmetrisch aufgenommen werden müssen, d. h. das Echomaximum nach der Hälfte der Datenaufnahmezeit detektiert werden muß, wird die Spin-Echo-Zeit TE der Pulssequenz mit abnehmender Bandbreite länger, sofern die Zahl der aufzunehmenden Datenpunkte konstant bleibt. Dies führt zu Intensitätsverlusten aufgrund der T_2 -Relaxation und somit zu einem schlechteren S/N. Die beiden Sachverhalte sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

Die Kühlung des Empfangssystems ist eine weitere, aber wenig praktikable Möglichkeit zur Reduzierung des Rau-

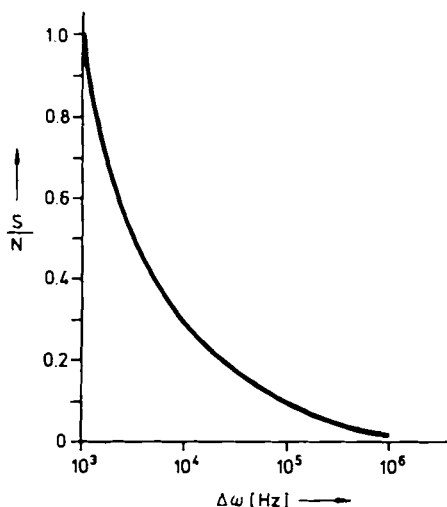


Abb. 21. Signal/Rausch-Verhältnis als Funktion der Bandbreite $\Delta\omega$ des Empfängers [Gl. (44)].

schens, da im allgemeinen die Probe, insbesondere bei biologischen Objekten, auf eine bestimmte Temperatur temperiert sein muß, so daß eine Isolationsschicht zwischen Empfangsspule und Probe erforderlich wäre. Diese führt aber zu einem ungünstigeren Füllfaktor der Spule und somit wiederum zu einem schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis.

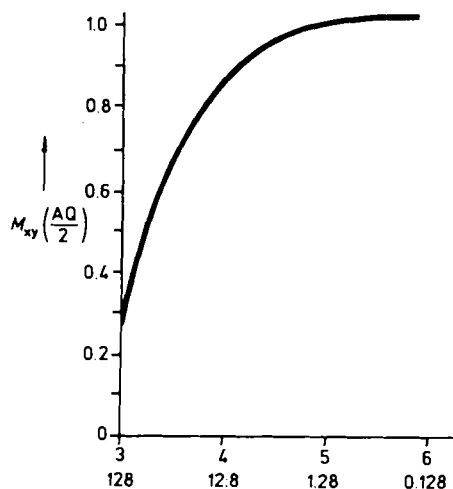


Abb. 22. Signalamplitude $M_{xy}(t)$ nach halber Akquisitionszeit für $T_2 = 100$ ms und Datenaufnahmezeiten zwischen 128 μ s und 128 ms (untere Beschriftung der Abszissenachse: t [ms]) für 512 Datenpunkte und Bandbreiten $\Delta\omega$ von 1–100 kHz (obere Beschriftung der Abszissenachse: $\lg(\Delta\omega)$).

Zusammenfassend gilt, daß zumindest bei Proben mit relativ langen Spin-Spin-Relaxationszeiten und demzufolge schmalen Resonanzsignalen, wie sie z. B. von biologischen Materialien erhalten werden, das Signal/Rausch-Verhältnis der einzige limitierende Faktor für die erreichbare räumliche Auflösung in der NMR-Mikroskopie ist.

6. Anwendungsbereiche der NMR-Mikroskopie

Wie aus Abschnitt 5 ersichtlich, wird das NMR-Mikroskop aus Empfindlichkeitsgründen den Auflösungsbereich

eines optischen Mikroskops (ca. $0.5 \mu\text{m}$) in absehbarer Zukunft kaum erreichen. Aber obwohl es schon von seiner Natur her keine Konkurrenz zu einem optischen Mikroskop sein kann und zu diesem auch aus Kostengründen nicht konkurrenzfähig ist, gibt es eine Reihe sinnvoller Anwendungsgebiete für das NMR-Mikroskop. Beispiele sind

- die zerstörungsfreie Untersuchung von Proben auch über längere Zeiträume, z. B. für die Beobachtung von Krankheitsbildern am Tiermodell oder der langsamen Diffusion von Flüssigkeiten in Polymere;
- die Abbildung von Spindichten zur quantitativen Erfassung von Substanzkonzentrationen;
- die chemical-shift-selektive Bildgebung zur Bestimmung der räumlichen Verteilung von Substanzen in einer Probe;
- die Untersuchung von dynamischen Prozessen mit Relaxationszeit-gewichteten Bildern (siehe die Abschnitte 3.2.2 und 3.2.4);
- die Bestimmung dynamischer Eigenschaften durch Messung der Diffusionskonstanten^[27–29] verschiedener Spezies oder der Diagonalelemente des Diffusionstensors; sogar eine komplette Bestimmung des Diffusionstensors scheint möglich;
- die Spektroskopie an definierten Teilvolumina der ganzen Probe^[30–36] und die mehrdimensionale spektroskopische Bildgebung^[37, 38];
- die Bestimmung von Fließgeschwindigkeiten und Flußprofilen von Flüssigkeiten und Schmelzen in Kapillaren und Röhren^[39, 40].

Diese Aufzählung zeigt die beispiellose Vielfalt der Einsatzmöglichkeiten der NMR-Mikroskopie, die vor allem auf den ganz speziellen Charakteristika der NMR-Spektroskopie beruhen. Im folgenden werden einige wenige Anwendungsbeispiele vorgestellt.

6.1. Biomedizinische Anwendungen

Der Bereich der biomedizinischen Anwendungen umfaßt Pharmaforschung, Pharmakokinetik, Therapiekontrolle sowie biochemische und biophysikalische Grundlagenforschung am Tiermodell bis zur Tiergröße Maus und Ratte, an Zellkulturen und Gewebeproben in vitro und in vivo. Die erreichbare räumliche Auflösung beträgt bei Mäusen 50–130 μm , bei der Ratte ca. 150 μm und bei Zellkulturen und Gewebeproben bis zu weniger als 10 μm .

Die Abbildungen 23 und 24 sind Beispiele für die Anwendung der NMR-Mikroskopie in der Arterioskleroseforschung^[10] und zeigen Protonenbilder eines Arterienteils, aufgenommen unter in-vitro-Bedingungen. Abbildung 23a entspricht einem Längsschnitt; der intensitätsschwache Bereich stammt von Wasserprotonen und der intensitätsstarke von einer Überlagerung von Wasser- und Lipidprotonen. Die hohe Intensität der Lipidprotonensignale ist eine Folge der relativ kurzen Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 von einigen 100 ms für diese Protonen. Dies führt zur praktisch vollständigen Relaxation zwischen den Einzelexperimenten und so zu einem intensiven Signal, während das Wasserprotonensignal wegen des relativ großen T_1 -Wertes von ca. 1 s bei den gewählten Meßbedingungen teilgesättigt ist. Abbil-

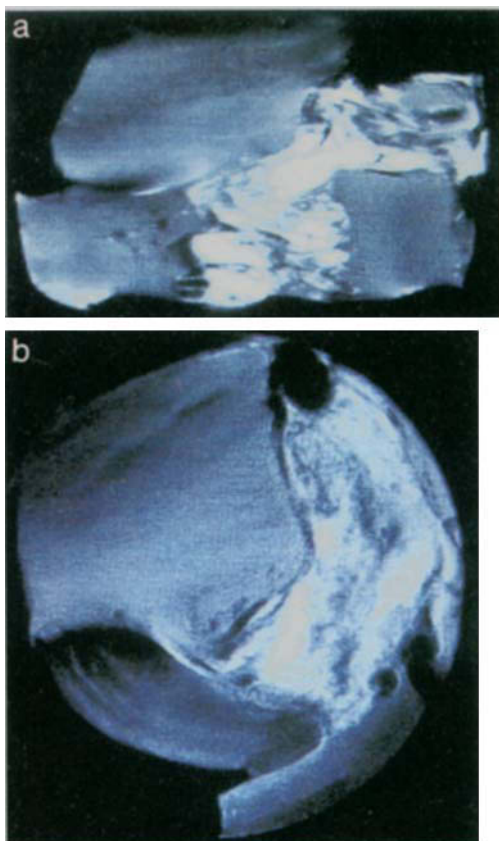


Abb. 23. Gewebeprobe aus einer Arterie, $B_0 = 7.05 \text{ T}$. a) x-z-Schnitt, Protonenbild. Es wurde keine Selektion nach der chemischen Verschiebung vorgenommen. Deutlich zu erkennen sind zwei im Kontrast sehr unterschiedliche Regionen. Aufgrund der Meßparameter, $TR = 500$, $TE = 6.56 \text{ ms}$, sollte der hellere Bildteil die Lipidprotonenverteilung widerspiegeln, da die Spin-Gitter-Relaxationszeit dieser Protonen wenige 100 ms beträgt, während T_1 der Wasserprotonen im Bereich von 1–3 s liegt. Die Auflösung beträgt in der x-Richtung $36 \mu\text{m}$ und in der z-Richtung $92 \mu\text{m}$ bei einer Schichtdicke von $900 \mu\text{m}$. $g_x = 100$, $g_z = 50 \text{ mTm}^{-1}$. b) x-y-Schnitt, Protonenbild. Die Pixel-Auflösung in der Ebene ist jetzt $36 \times 36 \mu\text{m}^2$ bei einer Schichtdicke von $900 \mu\text{m}$. Auch hier gibt der hellere Bildteil die Verteilung des Lipids wieder. $g = 100 \text{ mTm}^{-1}$.

dung 23 b zeigt einen zu dem von Abbildung 23 a senkrechten Schnitt; in ihr sind die beiden Bereiche sehr gut zu erkennen.

Abbildung 24 ist nun ein chemical-shift-selektives Bild (siehe Abschnitt 3.2.3) des Lipidprotonensignals in der glei-



Abb. 24. Chemical-shift-selektives Lipidprotonenbild der gleichen Arterienprobe wie bei Abbildung 23 b. Wegen der kurzen Spin-Gitter-Relaxationszeit der Lipidprotonen konnte bei dieser Messung die Repetitionszeit TE auf 200 ms herabgesetzt werden. Die übrigen Parameter sind identisch mit denen für Abbildung 23 b.

chen Blickrichtung wie für Abbildung 23 b^[10]. Die Lipidprotonen wurden mit einem schmalbandigen (Bandbreite ca. 600 Hz) Gauß-förmigen 90° -Puls angeregt. Sehr deutlich ist die Abgrenzung des Lipidbereichs erkennbar, dessen kontrastreiche Strukturen durch die Unterdrückung des Wassersignals sichtbar wurden. In weiteren Studien^[41] konnten aus chemical-shift-selektiven Saturation-Recovery-Bildgebungsexperimenten (siehe Abschnitt 3.2.4) orts aufgelöst die Spin-Gitter-Relaxationszeiten der Wasser- und der Lipidprotonen ermittelt werden. Hieraus ließen sich Aussagen über die an der Plaque-Bildung beteiligten Lipide machen.

In Abbildung 25 sind Schnitte durch den Abdominalbereich einer mit Pentobarbital narkotisierten gesunden Maus gezeigt. In Abbildung 25 a sind sehr klar die Wirbelsäule, das Rückenmark, die Rückenmuskulatur, Nieren, Magen, Milz und Leber zu erkennen. Abbildung 25 b ist ein „Zoom-Image“ des Nierenbereichs. Die Pixel-Auflösung beträgt hier $60 \times 60 \mu\text{m}^2$ bei einer Schichtdicke von $800 \mu\text{m}$. Abbildung 25 c zeigt zum Vergleich das Bild einer extrahierten Mäuseniere mit einer Auflösung von $36 \times 36 \times 320 \mu\text{m}^3$.

Am Tiermodell Maus konnte dann der Verlauf einer Ceruletid-induzierten Pankreatitis über einen Zeitraum von acht Stunden verfolgt werden^[42] (Abb. 25 d).

Den Einfluß der Spin-Echo-Zeit TE auf den Bildkontrast zeigt Abbildung 26. Hier sind zwei Schnitte durch den Abdominalbereich einer Maus mit einer Repetitionszeit TR von 3 s und einem TE -Wert von 32 (Abb. 26 a, b) bzw. 12 ms (Abb. 26 c, d) dargestellt. Die Gewebsbereiche mit verhältnismäßig kurzen T_2 -Werten der Protonen liefern bei $TE = 32 \text{ ms}$ keinen Signalbeitrag, sondern werden erst bei $TE = 12 \text{ ms}$ sichtbar.

Die NMR-Mikroskopie ist nicht nur in der tierexperimentellen Forschung, sondern auch in der Pflanzenforschung vielseitig einsetzbar. Die Abbildungen 27 a und 27 b zeigen jeweils die gleiche Schnittebene durch ein Blatt der Pflanze *Bryophyllum tubiflore*. In der NMR-mikroskopischen Aufnahme (Abb. 27 a) sind die Leitbündel und die Zellen, die bei dieser Pflanze ca. $40 \mu\text{m}$ groß sind, zu erkennen. Die Kontraständerungen im Bereich der Zellen sind eine Folge der Suszeptibilitätsänderungen an den Zellmembranen. In der zum Vergleich gezeigten lichtmikroskopischen Aufnahme (Abb. 27 b) sind die Zellen zwar klar zu erkennen, die Dimensionen der Leitbündel aber nicht eindeutig zu bestimmen. Abbildung 28 zeigt eine Spin-Echo-Zeit-Studie an einem *Mesembryanthemum-crystallinum*-Blatt^[4]. Die intensitätsschwachen Bereiche der Epidermis bei großem TE sind auf die sehr kurzen Spin-Spin-Relaxationszeiten der Wasserprotonen in diesen Regionen zurückzuführen. Mit kleiner werdendem TE erscheinen diese Regionen heller und bei sehr kleinem TE (4 ms) erhält man im gesamten Bild etwa gleiche Signalintensität. Dies läßt sich dahingehend interpretieren, daß in den Randregionen des Blattes die Wassermoleküle relativ unbeweglich sind, möglicherweise durch eine feste Bindung an Zellkompartimente, im übrigen aber die Protonendichte über den Blattquerschnitt, mit Ausnahme der Leitbündel, fast konstant ist.

Weitere Anwendungen der NMR-Mikroskopie sind die Bestimmung des Selbstdiffusionskoeffizienten von Wasser in Pflanzen^[43] und der Änderung des Wassergehalts in Pflanzenstämmen^[44], die Verfolgung der Wachstumsstadien von Algen^[45] sowie das Studium der Morphologie mit Relaxationsreagentien^[46]. Erste Messungen zum Wassertransport

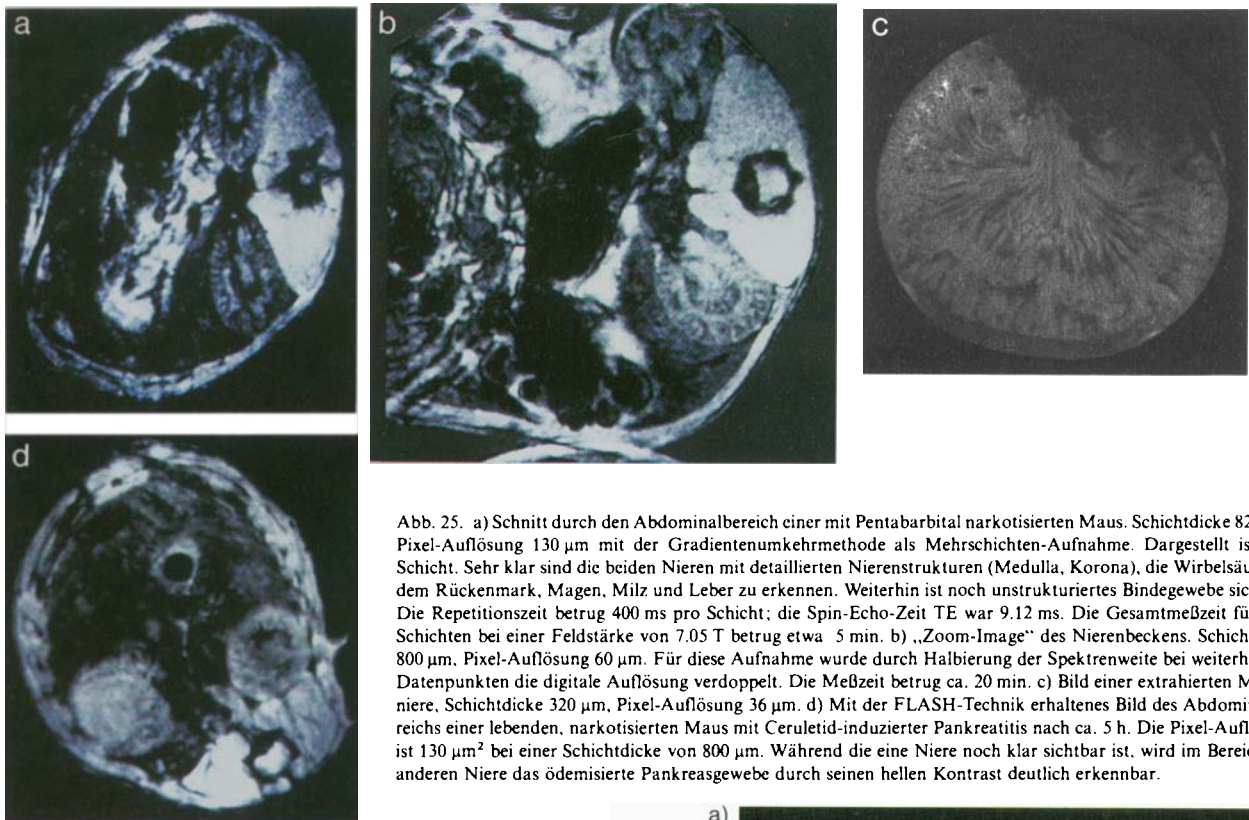


Abb. 25. a) Schnitt durch den Abdominalbereich einer mit Pentobarbital narkotisierten Maus. Schichtdicke 825 μm , Pixel-Auflösung 130 μm mit der Gradientenumkehrmethode als Mehrschichten-Aufnahme. Dargestellt ist eine Schicht. Sehr klar sind die beiden Nieren mit detaillierten Nierenstrukturen (Medulla, Korona), die Wirbelsäule mit dem Rückenmark, Magen, Milz und Leber zu erkennen. Weiterhin ist noch unstrukturiertes Bindegewebe sichtbar. Die Repetitionszeit betrug 400 ms pro Schicht; die Spin-Echo-Zeit TE war 9.12 ms. Die Gesamtmeßzeit für acht Schichten bei einer Feldstärke von 7.05 T betrug etwa 5 min. b) „Zoom-Image“ des Nierenbeckens. Schichtdicke 800 μm , Pixel-Auflösung 60 μm . Für diese Aufnahme wurde durch Halbierung der Spektrumsbreite bei weiterhin 256 Datenpunkten die digitale Auflösung verdoppelt. Die Meßzeit betrug ca. 20 min. c) Bild einer extrahierten Mäuseniere, Schichtdicke 320 μm , Pixel-Auflösung 36 μm . d) Mit der FLASH-Technik erhaltenes Bild des Abdominalbereichs einer lebenden, narkotisierten Maus mit Ceruletin-induzierter Pankreatitis nach ca. 5 h. Die Pixel-Auflösung ist 130 μm^2 bei einer Schichtdicke von 800 μm . Während die eine Niere noch klar sichtbar ist, wird im Bereich der anderen Niere das ödemisierte Pankreasgewebe durch seinen hellen Kontrast deutlich erkennbar.

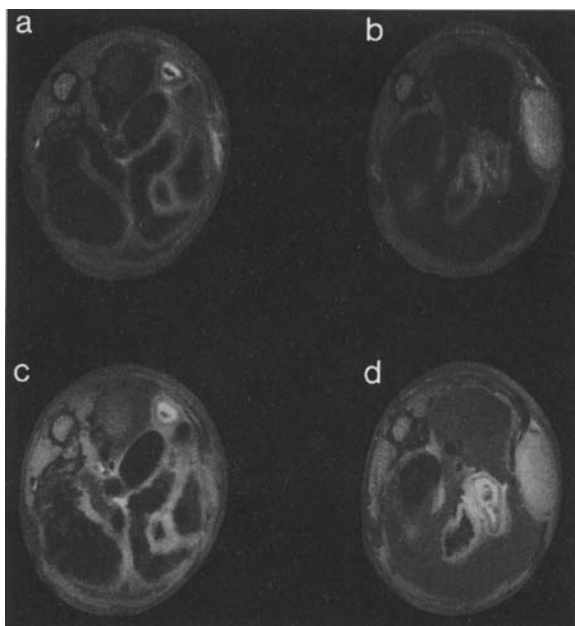


Abb. 26. Spin-Echo-Bilder des Abdominalbereichs einer narkotisierten Maus mit implantiertem Tumor. Pixel-Auflösung 100² μm^2 , Schichtdicke 500 μm . TR = 3 s. a) Schicht 1, TE = 32 ms. b) Schicht 2, TE = 32 ms. c) Schicht 1, TE = 12 ms. d) Schicht 2, TE = 12 ms, Feldstärke 9.4 T (mit freundlicher Genehmigung von M. Mathingly).

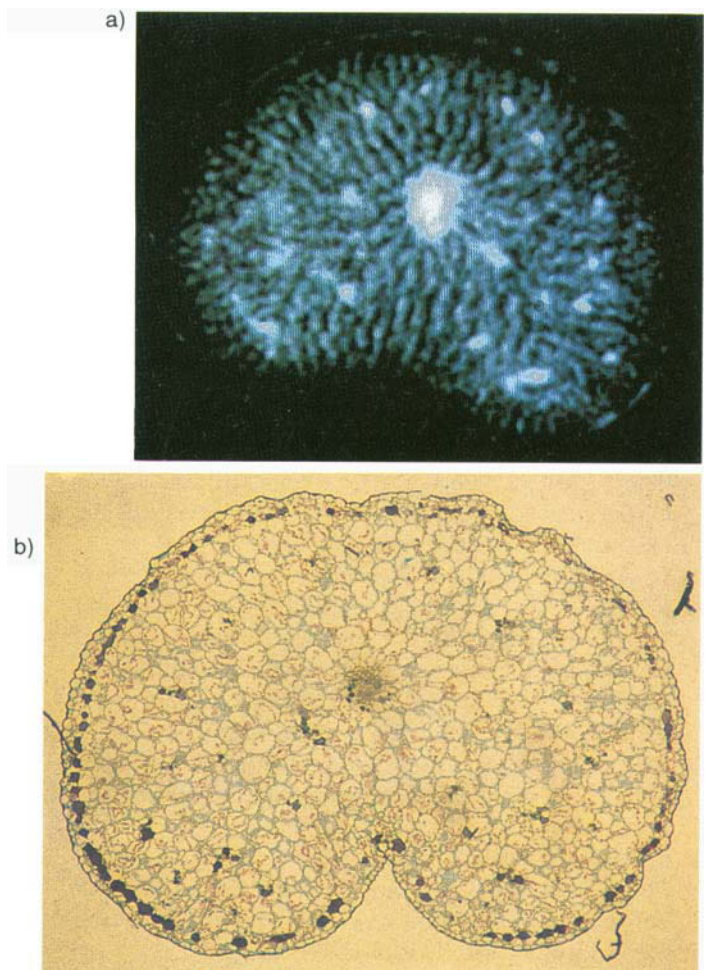


Abb. 27. Querschnitt durch ein *Bryophyllum-tubiflore*-Blatt. a) NMR-mikroskopische Aufnahme (7.05 T) mit einer Auflösung von $15 \times 15 \times 250 \mu\text{m}^3$. Klar erkennbar sind die Leitbündel, die einzelnen Pflanzenzellen und die Epidermis. b) Lichtmikroskopische Aufnahme. Die Zellen haben einen Durchmesser von ca. 40 μm (mit freundlicher Genehmigung von Dr. W. Hartung, Universität Würzburg).

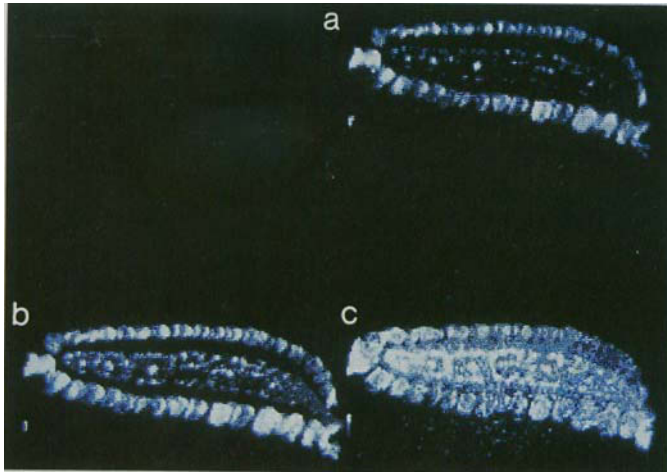


Abb. 28. Spin-Echo-Bilder von *Mesembryanthemum crystallinum* bei unterschiedlichen TE-Werten. a) TE = 18.24 ms. b) TE = 11.00 ms. c) TE = 4.40 ms.

in Pflanzen mit ^{17}O -NMR-Bildgebung (Verwendung von ^{17}O -markiertem Wasser) sind ebenfalls berichtet worden^[47]. Diese und andere Arbeiten^[48] zeigen, daß $\text{H}_2\ ^{17}\text{O}$ eine sehr gute und für die biomedizinische Anwendung sehr geeignete Sonde ist, da seine Protonen ein kleineres T_1 aufweisen als die Protonen von „normalem“ Wasser und es nicht toxisch ist. NMR-mikroskopische Untersuchungen an intakten multizellularen Tumorsphäroiden sind in den letzten Jahren ebenfalls publiziert worden^[49].

6.2. Anwendungen im Bereich der Materialwissenschaften

NMR-Mikroskopie kann ein sehr wertvolles Hilfsmittel bei der Untersuchung der Struktur und Dynamik von Festkörpern wie Polymeren, keramischen Materialien oder Baustoffen sein^[50, 51]. Je nach der Aufnahmetechnik sind dabei statische und zeitabhängige Bilder erhältlich. Blümich und Spiess^[52] führten folgende Untersuchungen an Materialien beispielhaft an:

- Porenverteilung in ungesinterten Keramiken^[53]: Aus Protonendichtebildern aufgesaugter Flüssigkeiten wurde die radiale Verteilung der Porendichte bestimmt.
- Bindemittelverteilung in ungesinterten Keramiken^[54]: Als Bindemittel werden niedermolekulare Polymere und Wachse verwendet. Bei der zu erwartenden Signalbreite kann Bildgebung mit hoher Auflösung erreicht werden.
- Schadstoffverteilung in Holz^[55]: Schadstoffe können die Relaxationszeiten der Wasserprotonen im Holz verändern. Neben der Verteilung von Schadstoffen dürfte auch die von Schutzstoffen wie Fungiziden und Bakteriziden beobachtbar sein.
- Flüssigkeitsverteilung in Polymeren^[56]: Die Verteilung von Flüssigkeiten wie Wasser oder anderen Lösungsmitteln in Polymeren und die Diffusion der Flüssigkeit in Polymere oder andere Werkstoffe ist nachweisbar^[57–60].
- Dehnungsinduzierte Kristallisation^[61]: Die Relaxationszeiten der Polymerprotonen werden durch dehnungsinduzierte Kristallisation verändert.
- Inhomogene Temperaturverteilung^[62]: Diese kann z. B. in Schmelzen auftreten.

- Die Vernetzung von Polymeren^[63]: Sie kann als Funktion mehrerer orts- und relaxationszeitabhängiger Größen untersucht werden.
- Diffusionsprozesse: Sowohl die Diffusion von Flüssigkeiten in Festkörper als auch die Interdiffusion von Flüssigkeiten lassen sich verfolgen.

Abbildung 29 zeigt die Interdiffusion von Wasser und Ethanol. Sehr klar ist die Grenzfläche zwischen den Flüssigkeiten zu erkennen. Dies ist auf den Unterschied in den Sus-

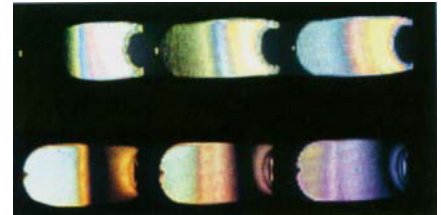


Abb. 29. Chemical-shift-selektive Spin-Echo-Bilder der Interdiffusion von Ethanol in Wasser über einen Zeitraum von 18 h. Die obere Zeile zeigt die Diffusion des Ethanols in das Wasser anhand der Protonen der Methylgruppe; unten ist die entsprechende Wasser-Verteilung abgebildet. Zur chemical-shift-selektiven Anregung diente ein Gauß-förmiger Hochfrequenzpuls mit einer Anregungsbandbreite von ca. 700 Hz. Die Ortsauflösung beträgt in der Bildebene etwa 30 μm .

zeptibilitäten beider Flüssigkeiten zurückzuführen, der starke lokale magnetische Feldgradienten und damit eine Dephasierung der Magnetisierung in der Grenzschicht zur Folge hat. Durch chemical-shift-selektive Bildgebung kann bei diesem Experiment der zeitliche Verlauf der Diffusion selektiv für Wasser (unten) und Ethanol (oben) beobachtet werden; die Konzentrationsverhältnisse erhält man dabei zu jedem Zeitpunkt orts aufgelöst unmittelbar aus den Profilen.

Abbildung 30 zeigt das Spin-Echo-Bild (TE = 4.5 ms) von glasfaserverstärkten Kunststoffen, die unterschiedliche Anteile Wasser (1–20 %) enthalten. Deutlich sind die Glasfaser-



Abb. 30. Spin-Echo-Bild aus 20 Aufnahmen von glasfaserverstärkten Epoxidharzstäben mit unterschiedlichem Wassergehalt. Pixel-Auflösung 138 μm . Schichtdicke ca. 1 mm, TE = 4.5 ms, TR = 1 s.

strukturen zu erkennen. Die Auflösung beträgt hier 138 μm in der Ebene bei einer Schichtdicke von ca. 1 mm. Die Aufnahmen zeigen die Profile der Proben in z-Richtung, d. h. es wurde keine Schichtenselektion vorgenommen.

6.3. Dynamische NMR-Mikroskopie

Eine interessante und neue Anwendung der NMR-Mikroskopie, die von Callaghan et al.^[64] entwickelt wurde, ist die orts aufgelöste Messung molekularer Diffusionseigenschaften. Dabei dient als Sonde die Phasenverschiebung des NMR-Signals, die auf die Spindiffusion im Gradientenfeld bei intensiven Gradientenpulsen zurückzuführen ist. Angewendet wird die Methode der gepulsten Gradienten (PGSE, Pulsed Gradient Spin Echo)^[65]. Der Zerfall der Transversalmagnetisierung in Anwesenheit eines Feldgradienten und unter dem Einfluß von Diffusionsprozessen ist durch Gleichung (35) gegeben. Gemessen wird die Wahrscheinlichkeit $P(\mathbf{r} - \mathbf{r}', \Delta)$, mit der sich die Kerne, die sich zur Zeit t am Ort \mathbf{r} befinden, aufgrund molekularer Diffusion in der Zeit $\Delta = t' - t$ zum Ort \mathbf{r}' bewegen. Die PGSE-Methode läßt sich mit einer bildgebenden Pulssequenz kombinieren^[64] (Abb. 31), so daß die Wahrscheinlichkeitsverteilung P unmittelbar und räumlich aufgelöst bestimmt werden kann.

Bei der Überlagerung von Selbstdiffusion und Fluß ist P eine Gauß-Funktion, deren Halbwertsbreite durch den molekularen Selbstdiffusionskoeffizienten und deren Maximumlage durch die lokale Geschwindigkeit der Teilchen bestimmt ist. Bei der von Callaghan et al. beschriebenen Methode wird die Halbwertsbreite der Gauß-Funktion und die Lage ihres Maximums für jedes Pixel im Bild berechnet. Hieraus erhält man getrennte Bilder für die molekulare Diffusion und die Fluß-Geschwindigkeit.

Diese Methode zur orts aufgelösten Bestimmung von Diffusionskoeffizienten und zur Abbildung von Geschwindigkeitsprofilen ist sehr vielseitig anwendbar. So konnte der Wassertransport in Pflanzen am Beispiel von Weizenkörnern sowohl hinsichtlich der Transportmechanismen als auch der Transportwege untersucht werden^[43]. Die Diffusionskonstante des Wassers wurde dabei für die verschiedenen Regionen des Weizenkorns in vivo orts aufgelöst bestimmt: Für die Leitbündel ergab sich eine Diffusionskonstan-

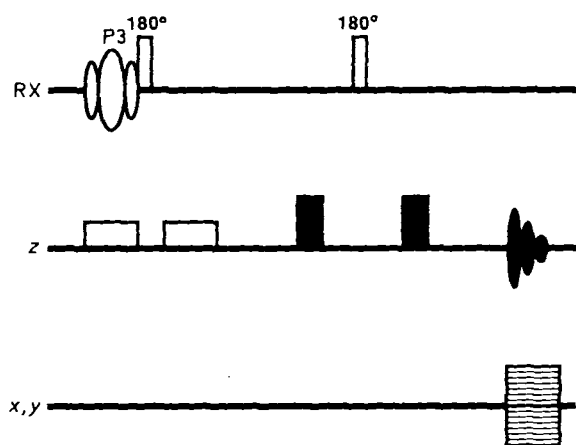


Abb. 31. Von Callaghan et al. [64] entwickelte Pulsfolge zur orts aufgelösten Untersuchung von Diffusionsprozessen. Nach der scheinbar selektiven Anregung durch einen selektiven 90° -Puls P3 in Anwesenheit eines Gradienten wird ein starker magnetischer Feldgradient (mehrere 1000 mTm^{-1}) für kurze Zeit eingeschaltet. Die Magnetisierung dephasiert unter dem Einfluß von Diffusion und Spin-Spin-Relaxation. Nach dem 180° -Puls wird der gleiche Gradient wieder eingeschaltet und somit die Magnetisierung mit Ausnahme des Anteils, der durch Diffusion dephasiert ist, rephasiert. Detektiert wird das Spin-Echo in Anwesenheit zweier orthogonaler Gradienten, die eine Ortsauflösung bewirken.

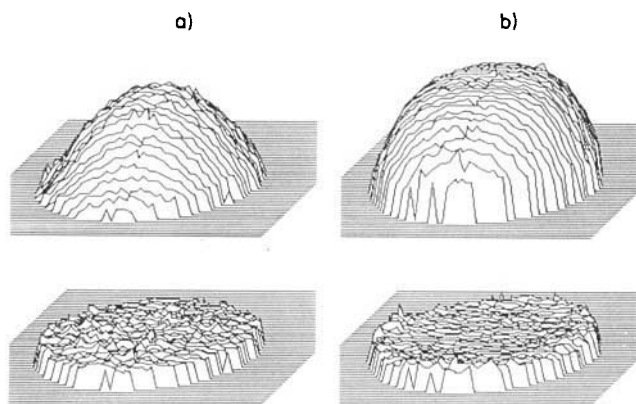


Abb. 32. Geschwindigkeitsprofile (oben) und Profile der longitudinalen Diffusion (unten) von wäßrigen PEO-Lösungen in einer Kapillare mit $700 \mu\text{m}$ Innendurchmesser (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Callaghan). a) PEO-Konzentration 0.5%. Die maximale Geschwindigkeit beträgt 6.0 mm s^{-1} . Die Flüssigkeit zeigt Newtonsches Verhalten und ein Poiseuillesches Geschwindigkeitsprofil. b) PEO-Konzentration 4.5%. Die maximale Geschwindigkeit beträgt ebenfalls 6.0 mm s^{-1} . Die Flüssigkeit zeigt aber in diesem Fall aufgrund der höheren Scherkräfte am Rand der Kapillare ein nicht-Newtonsches Verhalten. Das Profil der longitudinalen Diffusion ist im Vergleich zu dem von Abbildung 32a vergrößert.

te D von $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und für das Endosperm eine von $5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

Bei Polymeren wurde diese Methode z. B. zur Untersuchung des Geschwindigkeits- und Diffusionsprofils in wäßrigen Lösungen von Polyethylenoxid (PEO) herangezogen^[66]. Dazu wurden wäßrige Lösungen von PEO mit hohem Druck durch eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von $700 \mu\text{m}$ gepreßt. Abbildung 32 zeigt „stacked plots“ der gemessenen Profile für die Geschwindigkeit und die Diffusion von viskosen PEO-Lösungen durch die Kapillare. Abbildung 32a gibt das Verhalten einer Lösung mit niedriger PEO-Konzentration (0.5%) wieder. Die Lösung verhält sich wie eine Newtonsche Flüssigkeit und zeigt ein Poiseuillesches Geschwindigkeitsprofil. Entsprechend der höheren PEO-Konzentration (4.5%) der Lösung läßt Abbildung 32b ein nicht-Newtonsches Verhalten der Flüssigkeit erkennen und zeigt ein den am Rand der Kapillare auftretenden größeren Scherkräften entsprechendes Geschwindigkeitsprofil. In der Abbildung sind zusätzlich unten die Diffusionsprofile der beiden Lösungen dargestellt, aus denen eine größere longitudinale Selbstdiffusion der höher konzentrierten Flüssigkeit abzulesen ist.

7. Perspektiven

Die NMR-Mikroskopie steckt noch in den Anfängen der methodischen und apparativen Entwicklung, so daß ihre ganze Anwendungsbreite noch nicht abschätzbar ist. Der Einsatz von Mikroresonatoren könnte die Untersuchung an einzelnen Zellen oder kleinen Zellverbänden und metabolische Studien an diesen ermöglichen. Pixel-Auflösungen von ca. $1 \mu\text{m}$ sind denkbar. Mit Miniresonatoren könnten Biopsieproben sowohl morphologisch als auch biochemisch mit hoher räumlicher und spektroskopischer Auflösung studiert werden. Von Vorteil ist hierbei das Arbeiten bei sehr hohen Magnetfeldstärken, wie sie z. B. ein 11.7 T (500 MHz)-Widebore oder ein 14.1 T (600 MHz)-Magnet zur Verfügung stel-

len. Auch die NMR-Spektroskopie bei noch stärkeren Magnetfeldern sollte in Zukunft möglich sein.

Mit speziellen Pulssequenzen zur empfindlichen Detektion seltener Kerne wie ^{13}C in markierten Substanzen über Polarisationstransfer^[67] können metabolische Reaktionswege und die Verteilung von Metaboliten durch volumenselektive Spektroskopie verfolgt werden. Die gleichen Informationen sind durch volumenselektive Spectreneditierung, wie sie von Kimmich et al.^[68, 69] vorgeschlagen wird, zu erwarten.

Die Beobachtung schneller dynamischer Prozesse ist in den Bereich des Möglichen gerückt^[70] (siehe auch Abschnitt 3). Dieselben Methoden ermöglichen zudem die artefaktfreie Beobachtung von Bewegungen. Die Kombination von Gradienten- und Probenrotation wie auch die Null- und die Multiquanten-Bildgebung werden hochaufgelöste Festkörperbilder in absehbarer Zeit zur Routine werden lassen und einen völlig neuen Zugang zu orts aufgelösten dynamischen Studien im Festkörper eröffnen.

Dafür, daß sie mir die Entwicklung des NMR-Mikroskops ermöglicht haben, bedanke ich mich bei Prof. G. Laukien und Herrn T. Keller (Bruker, Rheinstetten). Bei vielen Problemen waren mir die Herren Dr. D. Müller und Dr. Mark Mattingly sowie viele Kollegen bei den Firmen Bruker (Karlsruhe), Spectrospin (Zürich) und Bruker (Billerica, MA, USA), eine große Hilfe. Mein Dank gilt in besonderem Maße Prof. Dr. K. H. Hausser und Prof. Dr. U. Haebleren am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, für viele Diskussionen und wertvolle Anregungen sowie Priv.-Doz. Dr. Dr. G. Rohr, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg, Dr. W. E. Hull, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, und Prof. Dr. A. Haase, Universität Würzburg, für zahlreiche gemeinsame Experimente. Für die Erlaubnis, die in gemeinsamen Experimenten entstandenen Bilder hier publizieren zu dürfen, bedanke ich mich bei Prof. M. Asdente, Universität Mailand, Prof. U. Zimmermann, Universität Würzburg, Dr. M. Mattingly, Bruker (Billerica), und Dr. Dr. G. Rohr, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg.

Eingegangen am 21. März 1989 [A 744]

- [1] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.* 69 (1946) 127.
- [2] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* 69 (1946) 37.
- [3] J. B. Aguayo, S. J. Blackband, J. Schoeniger, M. A. Mattingly, M. Hintermann, *Nature (London)* 322 (1986) 190.
- [4] L. Walter, A. Balling, U. Zimmermann, A. Haase, W. Kuhn, *Planta*, im Druck.
- [5] R. Damadian, *Science (Washington)* 171 (1971) 1151.
- [6] P. C. Lauterbur, *Nature (London)* 242 (1973) 190.
- [7] K. Gersonde, T. Tolxdorff, L. Fesberg, *Magn. Reson. Med.* 2 (1985) 390.
- [8] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* 80 (1950) 580.
- [9] W. S. Warren, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 5437.
- [10] L. Pavesi, P. L. Oreste, A. Colombo, W. Kuhn, E. Tremoli, M. Asdente, *Proc. 8th Int. Symp. Atheroscler.* (Siena, Italien 1988).
- [11] R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein, D. E. Phelps, *J. Chem. Phys.* 48 (1968) 383.
- [12] R. Freeman, H. Hill, *J. Chem. Phys.* 54 (1971) 3367.
- [13] A. Haase, J. Frahm, D. Matthaei, W. Hänicke, K. D. Merboldt, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 217.
- [14] A. Haase, *Magn. Reson. Med.*, im Druck.
- [15] R. Graumann, A. Oppelt, E. Stetter, *Magn. Reson. Med.* 3 (1986) 707.
- [16] D. D. Stark, W. G. Bradley: *Magnetic Resonance Imaging*, Mosby, St. Louis, MO, USA 1988.
- [17] H. W. Spiess, *NMR Basic Princ. Prog.* 15 (1978).
- [18] F. Laukien: *Feasibility Study of an NMR Microscope*, Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA, USA 1984.
- [19] D. G. Gory, J. W. M. van Os, W. S. Veeman, *J. Magn. Reson.* 76 (1988) 543.
- [20] S. Emid, J. H. N. Creyghton, *Physica B128* (1985) 81.
- [21] P. J. McDonald, J. J. Attard, D. G. Taylor, *J. Magn. Reson.* 72 (1987) 224.
- [22] G. C. Chingas, J. B. Miller, A. N. Garroway, *J. Magn. Reson.* 66 (1986) 530.
- [23] H. M. Cho, C. J. Lee, D. N. Shykind, D. P. Weitekamp, *Phys. Rev. Lett.* 55 (1985) 1923.
- [24] R. Becker: *Theorie der Wärme*, Springer, Berlin 1975.
- [25] H. Y. Carr, E. M. Purcell, *Phys. Rev.* 94 (1954) 630.
- [26] D. I. Hoult, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* 24 (1976) 71.
- [27] R. A. Meyer, T. R. Brown, *J. Magn. Reson.* 76 (1988) 393.
- [28] J. Stepisnik, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 17 (1985) 187.
- [29] P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 19 (1987) 1.
- [30] D. I. Hoult, *J. Magn. Reson.* 33 (1979) 183.
- [31] M. Garwood, T. Schleich, B. D. Ross, G. B. Matson, W. D. Winters, *J. Magn. Reson.* 65 (1985) 239.
- [32] M. R. Bendall, R. E. Gordon, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 365.
- [33] R. J. Ordidge, A. Connelly, J. A. B. Lohman, *J. Magn. Reson.* 66 (1986) 283.
- [34] W. P. Aue, S. Müller, T. A. Cross, J. Seelig, *J. Magn. Reson.* 56 (1984) 350.
- [35] P. R. Luyten, A. J. H. Marien, B. Sijtsma, J. A. den Hollander, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 148.
- [36] A. Haase, *Magn. Reson. Med.* 3 (1986) 963.
- [37] A. A. Maudsley, S. K. Hilal, W. H. Perman, H. E. Simon, *J. Magn. Reson.* 51 (1983) 147.
- [38] A. Haase, D. Matthaei, *J. Magn. Reson.*, im Druck.
- [39] P. C. Lauterbur, *Nature (London)* 336 (1988) 310.
- [40] C. F. Jenner, Y. Xia, C. D. Eccles, P. T. Callaghan, *Nature (London)* 336 (1988) 399.
- [41] M. Asdente, L. Pavesi, P. L. Oreste, A. Colombo, W. Kuhn, E. Tremoli: *Evaluation of Atherosclerotic Lesions Using NMR Microimaging (Atherosclerosis (Berlin))*, im Druck.
- [42] W. Kuhn, G. Rohr: *Imaging of Cerulein-Induced Pancreatitis in the Mouse by NMR Microscopy (Magn. Reson. Biol. Syst. Proc. Int. Conf. 13th (ICMRBS) (Madison, WI, USA 1988))*.
- [43] C. D. Eccles, P. T. Callaghan, C. F. Jenner, *Biophys. J.* 53 (1988) 77.
- [44] G. A. Johnson, J. Brown, P. J. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 2752.
- [45] L. G. Harrison, S. D. Luck, B. Munasinghe, L. D. Hall, *J. Cell Sci.* 91 (1988) 79.
- [46] A. Connelly, J. A. B. Lohman, B. C. Loughman, H. Quiquampoix, R. G. Ratcliff, *J. Exp. Bot.* 38 (1987) 1713.
- [47] G. D. Mateescu, G. M. Yvars, D. I. Pazara, N. A. Alldridge, J. C. LaManna, W. D. Lust, M. Mattingly, W. Kuhn: *Combined $^{17}\text{O}/^1\text{H}$ Magnetic Resonance Microscopy in Plants, Animals and Materials: Present Status and Potential (Proc. 3rd Conf. Int. Isot. Soc. (Innsbruck 1988))*.
- [48] G. D. Mateescu, G. M. Yvars, D. I. Pazara, N. A. Alldridge, J. C. LaManna, W. D. Lust, M. Mattingly, W. Kuhn: *Oxygen-17: A Physiological, Biochemical and Anatomical MRI Contrast Agent (Proc. Annu. Meet. Soc. Magn. Reson. Med. 7th (San Francisco 1988))*.
- [49] L. O. Sillerud, J. P. Freyer, M. Mattingly: *Proton NMR Microscopy of Intact Multicellular Tumor Spheroids (Proc. Annu. Meet. Soc. Magn. Reson. Med. 6th (New York 1987))*.
- [50] J. L. Koenig, *Eur. Spectrosc. News* 80 (1988) 36.
- [51] B. Blümich, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1460; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1406.
- [52] B. Blümich, H. W. Spiess, *Proc. BMFT Symp. Materialforschung* (Hamm 1988).
- [53] W. A. Ellingson, J. L. Ackerman, L. Garrido, J. D. Weyand, R. A. diMilia, *Ceram. Eng. Sci. Proc.* 8 (1987) 503.
- [54] L. Garrido, J. L. Ackerman, W. A. Ellingson, J. D. Weyand, *Proc. Conf. Compos. Adv. Ceram.* (Cocoa Beach, FL, USA 1988).
- [55] L. D. Hall, V. Vasantham, *Wood Sci. Technol.* 20 (1986) 329.
- [56] W. P. Rothwell, D. R. Holecek, J. A. Kershaw, *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 22 (1984) 241.
- [57] S. Blackband, P. Mansfield, J. R. Barnes, A. Clague, S. A. Rice, *SPE Form. Eval.* 1 (1986) 31.
- [58] L. D. Hall, V. Rajanayagam, C. Hall, *J. Magn. Reson.* 68 (1986) 185.
- [59] G. C. Chingas, J. Miliken, H. A. Resing, T. Tsang, *Synth. Met.* 12 (1985) 131.
- [60] S. Blackband, P. Mansfield, *J. Phys. C* 19 (1986) L49.
- [61] J. L. Ackerman, *Application Note*, Doty Scientific Instruments, USA 1988.
- [62] B. H. Suits, D. White, *J. Appl. Phys.* 60 (1986) 3772.
- [63] P. O. Frickland, *Int. SAMPE Tech. Conf.* 18 (1986) 876.
- [64] P. T. Callaghan, C. D. Eccles, Y. Xia, *J. Phys. E* 21 (1988) 820.
- [65] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* 42 (1965) 288.
- [66] Y. Xia, P. T. Callaghan, *Makromolekulare Chemie, Symposia Series* (1988), im Druck.
- [67] L. O. Sillerud, D. B. van Hulsteyn, R. H. Griffey, *J. Magn. Reson.* 76 (1988) 380.
- [68] A. Knüttel, R. Kimmich, K.-H. Spohn, *J. Magn. Reson.* 81 (1989) 570.
- [69] A. Knüttel, R. Kimmich, *J. Magn. Reson.* 78 (1988) 205.
- [70] R. J. Ordidge, R. Coxon, A. Howseman, B. Chapman, R. Turner, M. Stehling, P. Mansfield, *Magn. Reson. Med.* 8 (1988) 110.