

Aus der  
Radiologischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie

**Untersuchung des  $^1\text{H}$ -Signalverhaltens von Kollagen in  
organisiertem und hydrolysiertem Zustand in der  
Magnetresonanztomographie und -spektroskopie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Lober, Tobias Michael**

**2023**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. Fritz Schick
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. S. Ehnert
Tag der Disputation:	20.01.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Motivation und Aufgabenstellung .....	1
1.2	Medizinische Anwendung der MR-Bildgebung von kollagenhaltigem Gewebe .....	2
1.3	Aktueller Stand der Forschung .....	3
1.4	Gliederung der vorliegenden Arbeit .....	4
<b>2</b>	<b>Kollagen</b> .....	<b>5</b>
2.1	Fibrilläre Kollagene .....	5
2.1.1	Grundstruktur .....	5
2.1.2	Sekundär- und Tertiärstruktur.....	6
2.1.3	Biosynthese.....	7
2.1.4	Fibrilläre Kollagentypen .....	9
2.2	Gelatine .....	11
2.2.1	Eigenschaften.....	11
2.2.2	Herstellung .....	12
2.3	Kollagenhydrolysat .....	14
2.3.1	Herstellung .....	14
2.3.2	Eigenschaften.....	15
2.4	Kollagen in menschlichem Gewebe .....	16
2.4.1	Sehnengewebe .....	16
2.4.2	Skelettmuskulatur .....	16
2.4.3	Knochengewebe.....	17
2.4.4	Knorpelgewebe .....	17

<b>3</b>	<b>Grundlagen der Magnetresonanztomographie .....</b>	<b>18</b>
3.1	Physikalisches Prinzip .....	18
3.1.1	Kernspin und Magnetisierung.....	18
3.1.2	Hochfrequenz-Anregung .....	19
3.1.3	Relaxation .....	20
3.2	Ortskodierung .....	22
3.2.1	Schichtselektive Anregung .....	22
3.2.2	Kodierung der Signalintensitäten der Bildelemente .....	23
3.3	Bildrauschen und räumliche Auflösung.....	25
3.3.1	Ursachen des Rauschens .....	25
3.3.2	Qualität des empfangenen Kernresonanzsignals .....	25
3.4	Kontraste .....	26
3.4.1	T <sub>1</sub> -Gewichtung.....	26
3.4.2	T <sub>2</sub> -Gewichtung.....	27
3.4.3	Protonendichtegewichtung .....	27
3.5	Ultrashort Echo Time (UTE) Imaging.....	28
3.5.1	Gewebe mit kurzer Relaxationszeit T <sub>2</sub> .....	28
3.5.2	Herausforderungen der UTE-Bildgebung .....	29
3.5.3	Praktische Umsetzung.....	29
3.6	Magnetresonanzspektroskopie .....	31
3.6.1	Grundprinzip.....	31
3.6.2	Metabolitensignale .....	32
3.6.3	Signalverarbeitung und Messsequenzen.....	33
3.6.4	Zusammenhang zwischen FID-Spektroskopie und UTE- Bildgebung .....	34

<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
4.1	Messmethoden .....	36
4.1.1	Magnetresonanztomograph.....	36
4.1.2	UTE-Sequenz.....	37
4.1.3	Spektroskopie-Sequenzen .....	38
4.2	Prüfkörper .....	40
4.2.1	Messzylinder .....	40
4.2.2	Kollagenpulver.....	40
4.2.3	Gelatine .....	41
4.2.4	Sehne und Skelettmuskulatur.....	41
4.2.5	Enzymatische Behandlung .....	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
5.1	UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Kollagenhydrolysat .....	47
5.1.1	Lösung von Kollagenpulver in Wasser .....	47
5.1.2	Lösung von Kollagenpulver in Deuteriumoxid .....	54
5.1.3	Eigenschaften der spektralen Komponenten von gelöstem Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O und D <sub>2</sub> O.....	60
5.1.4	Enzymatisch verdaute Lösung von Kollagenpulver in Wasser ..	67
5.2	UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Gelatine .....	70
5.2.1	Lösung von Gelatinepulver in Wasser .....	70
5.2.2	Enzymatisch verdaute Lösung von Gelatinepulver in Wasser...	77
5.3	UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Sehngewebe .....	80
5.3.1	Gesundes Sehngewebe .....	80
5.3.2	Magic-Angle-Effekt von Sehngewebe.....	86
5.3.3	Enzymatisch verdautes Sehngewebe.....	88

5.3.4	Eigenschaften der spektralen Komponenten von Sehngewebe .....	91
5.3.5	Mechanisch zerkleinertes Sehngewebe .....	94
5.4	UTE-Bildgebung und Spektroskopie kollagenhaltiger Komponenten von Skelettmuskulatur .....	109
5.4.1	Muskelseptum .....	109
5.4.2	Muskel-Sehnen-Übergang.....	111
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
6.1	UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Kollagenhydrolysat .....	112
6.1.1	Lösung von Kollagenpulver in Wasser .....	112
6.1.2	Lösung von Kollagenpulver in Deuteriumoxid .....	113
6.1.3	Eigenschaften der spektralen Komponenten von gelöstem Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O und D <sub>2</sub> O.....	114
6.2	UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Sehngewebe .....	115
6.2.1	Gesundes Sehngewebe .....	115
6.2.2	Magic-Angle-Effekt von Sehngewebe.....	117
6.2.3	Enzymatisch verdautes Sehngewebe.....	119
6.3	Methodisches Vorgehen .....	120
6.4	Schlussfolgerung .....	122
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>132</b>
	Abbildungsverzeichnis.....	132
	Tabellenverzeichnis.....	137
	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>139</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>140</b>

# Abkürzungsverzeichnis

a.u.	Absolute units
$B_0$	Statisches Magnetfeld des Magnetresonanztomographen
CT	Computertomographie
$D_2O$	Deuteriumoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Gly	Glycin
$H_2O$	Wasser
HF	Hochfrequenz
Hyp	Hydroxyprolin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Magnetisierung
$M_0$	Gleichgewichtslage der Magnetisierung
$M_l$	Longitudinale Magnetisierung
MR	Magnetresonanz
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
$M_t$	Transversale Magnetisierung
OVS	Outer Volume Suppression
ppm	parts per million
Pro	Prolin
PRP	Platelet-Rich Plasma
ROI	Region of interest
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode
STIR	Short time inversion recovery
T	Tesla
$T_1$	Longitudinale Relaxationszeit

T <sub>2</sub>	Transversale Relaxationszeit
T <sub>2</sub> <sup>*</sup>	Longitudinale Relaxationszeit bei Inhomogenitäten
T <sub>E</sub>	Echozeit
T <sub>I</sub>	Inversionszeit
T <sub>M</sub>	Mixing Time
T <sub>R</sub>	Repetitionszeit
TMS	Tetramethylsilan
UTE	Ultrashort Echo Time
Val	Valin
VIBE	Volumetric interpolated breath-hold examination



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation und Aufgabenstellung

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein Verfahren mit zunehmender klinischer Bedeutung. Verglichen mit der Computertomographie (CT) ergeben sich verschiedene Vor- und Nachteile: Die Magnetresonanztomographie arbeitet nicht mit Röntgenstrahlung, die mutagene und teratogene Schäden hervorrufen kann, benötigt jedoch eine vergleichsweise lange Untersuchungszeit. In der Computertomographie werden absolute Werte der Strahlenabsorption gemessen, die dem abgebildeten Gewebe zugeordnet werden können. In der Magnetresonanztomographie ist eine direkte Korrelation zwischen der Signalintensität und der Protonendichte im Gewebe nicht ohne Weiteres gegeben. Es lassen sich jedoch auch ohne Kontrastmittel vielfältige Gewebeeigenschaften mittels Magnetresonanztomographie untersuchen.

Kollagen kommt im menschlichen Körper in verschiedenen Zustandsformen vor: In Sehnen und in fibrotisch verändertem Gewebe liegt Kollagen in organisierter Form vor und die Moleküle sind wenig beweglich angeordnet. Chronische Entzündungen hingegen führen dazu, dass Kollagenmoleküle im extrazellulären Raum in Flüssigkeit gelöst und frei beweglich sind. Die Vermehrung der extrazellulären Matrix bei einer Fibrose entsteht in vielen Fällen durch eine chronische Entzündungsreaktion, so dass die beiden beschriebenen Zustände auch gleichzeitig auftreten können. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, den Einfluss der verschiedenen Zustandsformen von Kollagen auf die Magnetresonanz-Eigenschaften vergleichend zu untersuchen. Das übergeordnete Ziel besteht darin, charakteristische Signaleigenschaften von Kollagen zu identifizieren und diese auf molekularer Ebene chemischen Strukturen zuzuordnen. Dieser Versuch wurde durch den unterschiedlichen molekularen Organisationsgrad der zu untersuchenden Kollagenproben in organisierter und hydrolysierte Form unterstützt.

## **1.2 Medizinische Anwendung der MR-Bildgebung von kollagenhaltigem Gewebe**

Die Beurteilung von kollagenreichen Strukturen wie Sehnen, Bändern und Menisken ist in der muskuloskelettalen Bildgebung von großer Bedeutung. Die Magnetresonanztomographie ermöglicht in vielen Fällen eine nichtinvasive Diagnosestellung, auf deren Grundlage die Indikation für eine weiterführende Therapie gestellt werden kann.

Außerdem kann in verschiedenen Organen eine Fibrose entstehen. Unter einer Fibrose versteht man eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes, welches überwiegend aus Kollagen besteht. Ein Beispiel ist die Leberfibrose, die zu einer Leberzirrhose voranschreiten und zu einer irreversiblen Funktionseinschränkung der Leber führen kann. In der Lunge kann eine Lungenfibrose als restriktive Lungenerkrankung die mechanischen Eigenschaften des Organs und den Gasaustausch erheblich beeinträchtigen. Auch im Myokard gibt es das Krankheitsbild einer fokalen oder diffusen Fibrose. Die Tatsache, dass die diffuse Myokardfibrose häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden kann, war der Anlass für weiterführende Untersuchungen durch Siu et al. (40). Eine Fibrose der Skelettmuskulatur liegt beispielsweise bei Erkrankungen aus der Gruppe der progressiven Muskeldystrophien vor. Das rote Knochenmark weist bei der primären Myelofibrose, einer myeloproliferativen Erkrankung, ebenfalls fibrotische Veränderungen auf.

Die Herausforderung besteht darin, eine Fibrose bereits während ihres Entstehungsprozesses möglichst früh diagnostizieren und differentialdiagnostisch gegen andere Erkrankungen abgrenzen zu können. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die vorhandenen magnetresonanztomographischen Verfahren weiterzuentwickeln und speziell auf die Darstellung von Kollagen zugeschnittene Messprotokolle einzusetzen. Eine frühzeitige Diagnose ist für den Krankheitsverlauf der Patientinnen und Patienten insbesondere dann vorteilhaft, wenn eine geeignete Therapie zur Verfügung steht und das Outcome verbessern kann.

### 1.3 Aktueller Stand der Forschung

Es gibt bereits einige Arbeiten zu den MR-Signaleigenschaften von Kollagen und das Interesse an diesem Thema ist in den letzten Jahren gestiegen. Früh wurde Nasenknorpel vom Rind im nativen und im enzymatisch verdauten Zustand mittels MR-Spektroskopie untersucht (38). Es wurden Arbeiten veröffentlicht, deren Gegenstand der Einfluss körperlicher Aktivität auf die Achillessehnen gesunder Versuchspersonen war. Dabei standen die Hydratation der Sehnen (43) und die Veränderung der  $T_2$ - und  $T_2^*$ -Werte (15) im Mittelpunkt. Ebenfalls an Versuchspersonen wurden die Signaleigenschaften von gesunden und pathologisch veränderten Patellarsehnen vergleichend untersucht (27). Experimentelle Arbeiten wurden mit isolierten Sehnen menschlicher Körperspender durchgeführt. In einer Studie erfolgte die Betrachtung der  $T_2^*$ -Werte, wenn Sehnen mechanischer Belastung ausgesetzt wurden (6). Mit dem Ziel, die frühzeitige Diagnose einer Myokardfibrose mittels Magnetresonanztomographie zu ermöglichen, wurde Kollagen im hydrolysierten Zustand untersucht (40). Intensive Bemühungen galten auch der wasserselektiven Darstellung von schnell relaxierendem Gewebe wie Kollagen (42). Für die Erforschung der Hydratation von Knorpel und Knochen mittels Magnetresonanzspektroskopie wurde unter anderem Gelenknorpel vom Schwein untersucht (20). In weiteren Arbeiten wurden die Signaleigenschaften verschiedener kollagenhaltiger Gewebe mittels Magnetization Transfer (MT) Imaging und Ultrashort Echo Time (UTE) Imaging gemessen. Die Messobjekte waren Rinderknochen und Knochen gesunder Probanden (41), Knochen von menschlichen Körperspendern (21) und Sehnen der Rotatorenmanschettenmuskeln menschlicher Körperspender (52). Die Signaleigenschaften der Achillessehnen gesunder Versuchspersonen wurden mit denen eines Probanden mit Psoriasis-Arthritis verglichen (18). Außerdem erfolgte an gesunden Probandinnen eine Untersuchung der altersbedingten Kollagenabnahme in Sehnen der unteren Extremität (22). Araujo et al. (2) beschäftigten sich mit der quantitativen UTE-Bildgebung der schnell relaxierenden Signalkomponenten in der Skelettmuskulatur gesunder Probanden.

## 1.4 Gliederung der vorliegenden Arbeit

Zu Beginn werden der molekulare Aufbau von Kollagen und die daraus resultierenden biochemischen Eigenschaften vorgestellt. Von diesen Grundlagen ausgehend wird der Herstellungsprozess von Gelatine und Kollagenhydrolysat dargestellt, um das Verständnis für deren unterschiedliche molekulare Struktur zu vermitteln. Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den allgemeinen Grundlagen der Magnetresonanztomographie. Das Verständnis der physikalischen Grundlagen ist essentiell, um Messsequenzen anzuwenden, die entstehenden Artefakte zu verstehen und die gemessenen Daten auszuwerten. Die für die Messungen verwendeten Methoden Ultrashort Echo Time (UTE) Imaging, FID-Spektroskopie und volumenselektive STEAM-Spektroskopie werden genauer erläutert. Das Material und die Geräte, die zur Anwendung kamen, werden beschrieben. Es folgt eine Darstellung der durchgeführten Experimente. Die Ergebnisse werden präsentiert und im Rahmen der Diskussion in einen größeren Kontext gestellt. Im letzten Teil wird die Arbeit zusammengefasst.

Das Ziel der durchgeführten Experimente bestand darin, die verschiedenen Zustandsformen von Kollagen im menschlichen Körper modellhaft zu untersuchen, indem Kollagen zuerst im hydrolysierten und anschließend im organisierten Zustand *in vitro* untersucht wird. Mit allen Proben wurden ähnliche Messungen mittels UTE-Bildgebung und Magnetresonanzspektroskopie durchgeführt. Dabei bestand die Hypothese, dass Kollagen im organisierten Zustand schneller relaxiert als im frei beweglichen Zustand. Beginnend mit in Wasser gelöstem Kollagenpulver und Gelatine nimmt im Verlauf der Messungen der Organisationsgrad des Kollagens bis hin zu tierischen Sehnen zu. Sehnenewebe wurde unter anderem mit dem Enzym Kollagenase behandelt und anschließend mittels UTE-Bildgebung und STEAM-Spektroskopie untersucht. Das Messprotokoll, das zur Anwendung kam, wurde aus einem früheren Forschungsprojekt an der Sektion für Experimentelle Radiologie übernommen und an die jeweiligen Gegebenheiten angepasst.

## 2 Kollagen

Kollagen ist ein zahlreich vorkommendes Strukturprotein im menschlichen Körper. Ein Drittel der gesamten Proteinmenge besteht aus Kollagen, das die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix bildet. Kollagen ist zu großen Teilen aus drei parallel ausgerichteten helikalen Polypeptidsträngen, die linksgängig sind, aufgebaut. Im Folgenden werden der molekulare Aufbau und die verschiedenen Formen von Kollagen beschrieben und erläutert.

### 2.1 Fibrilläre Kollagene

#### 2.1.1 Grundstruktur

Die molekulare Struktur aller Kollagene ist dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Domäne mit dem Motiv der Kollagen-Tripelhelix vorkommt. Charakteristisch für diese Konformation sind sich wiederholende Sequenzen aus drei Aminosäuren, wobei jede dritte Aminosäure Glycin ist. Bei diesen Tripletsequenzen nach dem Schema Gly-X-Y ist X häufig Prolin und Y in vielen Fällen Hydroxyprolin. Außerdem kann in Y-Position Hydroxylysin vorkommen, das Glycosylierungen und kovalente Quervernetzungen ermöglicht. (26)

Die Vielzahl an Matrixproteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften kommt zustande, indem tripelhelikale und globuläre Domänen kombiniert werden. Momentan sind 40 verschiedene Kollagenketten bekannt, die sich zu 27 unterschiedlichen trimeren Kollagenmolekülen zusammenlagern können. Der Unterschied zwischen den einzelnen Kollagentypen besteht in der Länge der tripelhelikalen Abschnitte, Unterbrechungen in der Tripelhelix und dem Vorkommen zusätzlicher globulärer Domänen. (26)

Fibrilläre Kollagene kommen zahlreich in der extrazellulären Matrix von Haut, Knochen, Knorpel, Sehnen und Bändern vor. Sie können sich zu charakteristischen Faserstrukturen zusammenlagern. Klinisch relevante fibrilläre Kollagene sind insbesondere Kollagen Typ I, II, III, V und XI. Im elektronenmikroskopischen Bild kann man den Aufbau aus quer gestreiften Fibrillen erkennen. In Abhängigkeit vom zugehörigen Gewebe wiederholen sich die Fibrillen in Abständen zwischen 64 und 67 nm. Die Funktion der fibrillären Kollagene besteht in der Bildung fester, zugbelastbarer Fasern. Die Eigenschaften werden je nach Gewebe optimiert, so dass sowohl die Faserdicke als auch die dreidimensionale Anordnung in verschiedenen Geweben unterschiedlich sind. Glykoproteine, Proteoglykane und die Copolymerisation unterschiedlicher Kollagentypen tragen zu den gewebsspezifischen Eigenschaften und den Wechselwirkungen mit anderen Suprastrukturen der Matrix bei. (26)

Die Polypeptidketten der einzelnen fibrillären Kollagene zeichnen sich durch ähnliche Aminosäuresequenzen und Domänenstrukturen aus. Sie besitzen eine zentrale tripelhelikale Domäne, die ohne Unterbrechung aus über 300 Gly-X-Y-Einheiten besteht. An beiden Enden dieses charakteristischen Strukturmerkmals befinden sich tripelhelikale Telopeptide, die jeweils aus etwa 20 Aminosäuren bestehen. Diese werden für die Quervernetzung der Kollagenmoleküle benötigt. (26)

### **2.1.2 Sekundär- und Tertiärstruktur**

Kollagen besitzt aufgrund der besonderen Aminosäuresequenz mit dem Schema Gly-X-Y eine spezielle Sekundärstruktur, die sich wesentlich von einer  $\alpha$ -Helix unterscheidet. Der Abstand zwischen zwei Aminosäuren in Längsrichtung ist mit 0,286 nm fast doppelt so groß wie bei einer  $\alpha$ -Helix. Die Kollagenhelix ist langgestreckt und es erfolgt keine Stabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb einer Kette. Das liegt darin begründet, dass die Carbonyl- und Amidgruppen fast senkrecht zur Achse der Kollagenhelix und nicht parallel zu ihr stehen. Lagern sich drei Kollagenhelices zu einer rechtsgängigen Tripelhelix

zusammen, so können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Polypeptidketten gebildet werden. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau der Kollagen-Tripelhelix. (26)



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kollagen-Tripelhelix  
[Quelle: in Anlehnung an (19)]

Aus der charakteristischen Struktur des Kollagens resultiert, dass jede dritte Aminosäure im Zentrum der Tripelhelix liegt. Diese Aminosäure muss aus sterischen Gründen Glycin sein, damit die Zusammenlagerung der Einzelstränge nicht durch die Seitengruppen beeinträchtigt wird. Die Sequenz für Kollagen ist generell  $(\text{Gly-X-Y})_n$  und muss zwischen den drei Einzelsträngen nicht komplett identisch sein. Wasserstoffbrückenbindungen entstehen zwischen dem Glycin eines Strangs und der Aminosäure X des benachbarten Strangs. Daneben tragen hydrophobe Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Tripelhelix bei. Sie existieren zwischen den Seitenketten der anderen Aminosäuren. (26)

### 2.1.3 Biosynthese

Auf die einzelnen intra- und extrazellulären Schritte der Biosynthese der fibrillären Kollagene wird hier nicht im Detail eingegangen. Es sei auf die gängigen Lehrbücher der Biochemie verwiesen. Im Folgenden werden die Modifikationen der Kollagenmoleküle, die für die räumliche Struktur und für die physikochemischen Eigenschaften relevant sind, genauer beschrieben. (8)

In der Y-Position des Gly-X-Y-Triplets kommen häufig die Iminosäure Prolin und die Aminosäure Lysin vor. Fast alle Y-Prolinreste und einige der Y-Lysinreste werden enzymatisch hydroxyliert. Hierfür wird Vitamin C benötigt. Sowohl die Hydroxylierung zu Hydroxyprolin beziehungsweise Hydroxylysin als auch das Vorkommen der Iminosäure Prolin im Allgemeinen tragen zur Stabilität der Kollagen-Tripelhelix bei. Prolin und Hydroxyprolin induzieren stereoelektronisch Ringkonformationen. Deren Stabilität bewirkt, dass Prolin in X-Position und Hydroxyprolin in Y-Position die Denaturierungstemperatur der Kollagene erhöhen. Die Denaturierungstemperatur liegt ungefähr bei der Körpertemperatur, so dass Kollagene abgebaut werden können. Dadurch wird ein homöodynamischer Gewebsumsatz möglich. (8)

Im Laufe der Proteinbiosynthese des Kollagens kommen die einzelnen Ketten als Prokollagenpolypeptide vor. Innerhalb der C-Propeptide bilden sich Disulfidbrücken, nachdem die Prokollagenpolypeptide freigesetzt worden sind. Die C-Propeptide wechselwirken miteinander, was ausschlaggebend für die Auswahl und Zusammenlagerung der drei Einzelketten einer Tripelhelix ist. Die Struktur der C-Polypeptide bestimmt sowohl bei Homo- als auch bei Heterotrimeren die Kettenauswahl. Im Anschluss wird die Faltung eingeleitet. Diese beginnt am C-terminalen Ende und setzt sich bis zum N-terminalen Ende fort. (8)

Die einzelnen Aminosäuren, zwischen denen Wechselwirkungen auftreten, sind um etwa 67 nm gegeneinander versetzt angeordnet. Dadurch entstehen homologe Regionen von circa 67 nm Länge. Dieser Abstand wird als D-Periodizität bezeichnet und ermöglicht das Zustandekommen maximaler hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen benachbarten Molekülen. Daraus resultiert die elektronenmikroskopisch sichtbare Querstreifung des fibrillären Kollagens. Allerdings beträgt die Länge eines Kollagenmoleküls 300 nm, was kein ganzzahliges Vielfaches der D-Periodizität ist. Es entstehen nämlich in regelmäßigen Abständen Lücken, in die fibrillenassoziierte Makromoleküle eingelagert werden können. Der Umfang der Kollagenmoleküle kann vergrößert werden, indem Hydroxylysinreste glykosyliert werden. Der Effekt ist außerhalb der Lücken



besonders stark. Glykosylierungen in den Überlappungsbereichen kommen beispielsweise in den locker organisierten Fibrillen der Cornea vor, im Gegensatz dazu aber nicht in fest organisierten Sehnen. (8)

Zur Stabilisierung werden die Kollagenfibrillen miteinander quervernetzt. An diesen Quervernetzungen sind Lysin- und Hydroxylisinreste im N-terminalen Telo-peptid beteiligt. Das wird ermöglicht, indem durch das Enzym Lysyloxidase eine oxidative Desaminierung der Reste zu Allysin erfolgt. Zwischen den Allysinresten benachbarter Polypeptidketten können sich kovalente Quervernetzungen der Seitenketten ausbilden. Chemisch betrachtet liegt diesem Ergebnis eine Aldolkondensation oder die Bildung einer Schiff'schen Base zugrunde. In speziellen Fällen können durch Umlagerungen Produkte entstehen, die nicht mehr säureempfindlich sind. (8)

#### **2.1.4 Fibrilläre Kollagentypen**

Kollagenfibrillen sind je nach Gewebe unterschiedlich dick und auf unterschiedliche Weise dreidimensional vernetzt. In Sehnen ist beispielsweise eine hohe Stabilität gegen Zugbelastung notwendig. Deshalb sind alle Fibrillen parallel angeordnet. In der Haut haben die Fibrillen keine Vorzugsrichtung und liegen gebündelt vor, um den Anforderungen an eine Dehnung in alle Richtungen gerecht zu werden. In Knorpelgewebe bilden die Fasern ein Netzwerk in allen drei Raumdimensionen aus. (8)

Kollagen Typ I ist das am häufigsten vorkommende Kollagen. Es bildet besonders zugfeste Fibrillen und kommt in der Haut, in Knochen, Sehnen und Bändern vor. Kollagen Typ II ist vorwiegend im hyalinen Knorpel, aber auch im Glaskörper zu finden. Die anderen fibrillenbildenden Kollagentypen kommen hauptsächlich mit Kollagen Typ I oder II gemeinsam vor. So wird Kollagen Typ III in dehnbaren Geweben wie der Haut oder Gefäßen in der Regel gemeinsam mit Kollagen Typ I exprimiert. Die Kollagentypen V und XI bilden Fibrillen und kommen als Neben-

komponenten vor. Man findet Kollagen Typ V in der Haut und in der Cornea zusammen mit Kollagen Typ I. Kollagen Typ XI ist im Knorpel, Knochen und Glaskörper eine Nebenkomponekte von Kollagen Typ I und II. (8)

Fibrilläre Kollagene können durch spezielle Matrixmetalloproteinasen gespalten werden, die als Kollagenasen bezeichnet werden. Bei Matrixmetalloproteinasen handelt es sich um eine Gruppe zinkabhängiger Proteasen, die als inaktive Proformen gebildet werden. Bei einzelnen Matrixmetalloproteinasen ist die Substratspezifität sehr hoch. Eine einzige Gly-Ile/Leu-Bindung ist für die Spaltung von Kollagen Typ I, II und III durch bestimmte Kollagenasen verantwortlich. Infolge dessen nimmt die thermische Stabilität der Tripelhelix ab. Diese kann durch Gelatinasen, eine andere Subgruppe der Matrixmetalloproteinasen, weiter abgebaut werden. (8)

## 2.2 Gelatine

### 2.2.1 Eigenschaften

Gelatine kommt in der Lebensmittelindustrie als Geliermittel und als Stabilisator zum Einsatz. In der pharmazeutischen Industrie wird Gelatine zur Beschichtung von Implantaten, zur Herstellung von Kapseln und als Ersatzmittel für Blutplasma verwendet. Im technischen Bereich ist Gelatine als Trägermaterial und als Emulgator relevant. In der Regel handelt es sich bei Gelatine um ein Geliermittel tierischen Ursprungs, das vom Schwein stammt. (19)

Bei Gelatine ist charakteristischerweise eine thermoreversible Sol-Gel-Umwandlung möglich. Darunter versteht man, dass die Viskosität einer erwärmten wässrigen Gelatinelösung während des Abkühlvorgangs zunimmt. Das entstandene Gel lässt sich wieder in eine wässrige Lösung überführen, wenn es erwärmt wird. Dabei ist die Gelfestigkeit grundsätzlich variabel. Oberhalb einer bestimmten Temperatur, die von der chemischen Struktur abhängt, geht die Reversibilität der Sol-Gel-Umwandlung jedoch verloren, da eine zunehmende Denaturierung der Proteine erfolgt. Der niedrige Schmelzpunkt von Gelatine ermöglicht eine unkomplizierte Verarbeitung. Gelatine kann große Mengen an Wasser binden. Die Aufnahme von Flüssigkeit durch einen Feststoff nennt man Quellung. Die Quellungsfähigkeit von Gelatine hängt vom vorherrschenden pH-Wert ab. (19)

In Gelatine ist die charakteristische Struktur des Kollagens nur noch teilweise vorhanden. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die helikalen Strukturen sind zu einem erheblichen Teil aufgelöst, weil intra- und intermolekulare Quervernetzungen beim Herstellungsprozess gespalten worden sind. Außerdem werden Peptidbindungen hydrolytisch gespalten. Dadurch werden die einzelnen Polypeptidketten des Kollagens verkürzt. Die Hydrolysevorgänge, die zur partiellen Zerstörung der Strukturmerkmale des Kollagens führen, sind sowohl thermisch als auch chemisch bedingt. (19)

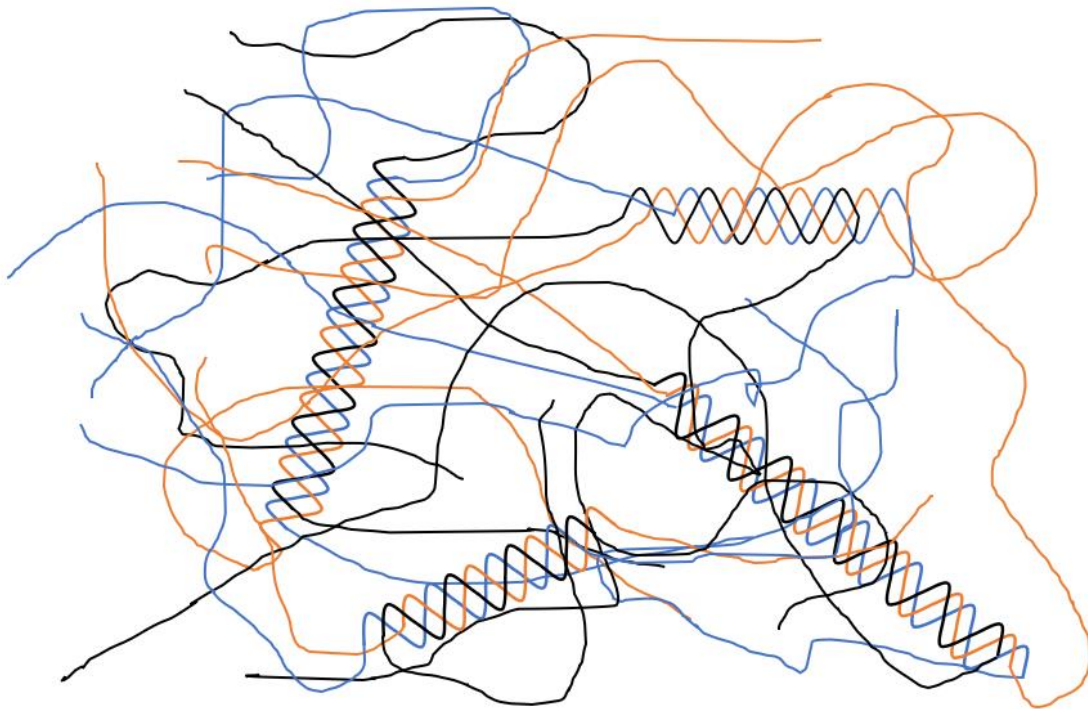


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Gelatine  
 [Quelle: in Anlehnung an (19)]

## 2.2.2 Herstellung

Bei der Herstellung von Gelatine werden durch chemische und thermische Verfahrensschritte die Bindungen, die zur Stabilisierung des Kollagens beitragen, teilweise zerstört. Das Produkt ist eine geknäuelte Molekülstruktur, deren Faltung beim Abkühlen zufällig erfolgt. Kooperative Wechselwirkungen, die dabei zerstört werden, sind Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte. An den Wasserstoffbrückenbindungen sind die peptidische Aminogruppe des Glycins einer Kette, peptidische Carbonylgruppen in den anderen beiden Ketten, Hydroxylgruppen der Hydroxyprolinreste und Wasserstoffatome beteiligt. Ionische Wechselwirkungen treten zwischen hydrophoben Bereichen mit einem hohen Anteil an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin und hydrophilen Bereichen mit einem hohen Anteil an polaren Aminosäuren auf. Außerdem werden intra- und intermolekulare kovalente Quervernetzungen zerstört.

(19)

Werden Schweineschwarten zur Gewinnung von Gelatine verwendet, so erfolgt die Vorbehandlung thermisch und säurekatalysiert. Dabei werden vor allem Peptidbindungen innerhalb der einzelnen Kollagenketten gespalten. Der Prozess dauert nur drei Tage, da der Quervernetzungsgrad des Kollagens niedrig ist. Im Gegensatz dazu wird Ossein oder Rinderspalt als Ausgangsstoff alkalisch vorbehandelt. Es werden vermehrt intra- und intermolekulare Quervernetzungen hydrolytisch gespalten. Die Struktur des Kollagens wird schonend umgewandelt, allerdings dauert die alkalische Vorbehandlung mehrere Wochen. (19)

Nach der Vorbereitung werden die Materialien mit Warmwasser versetzt und mehrstufig extrahiert. Man beginnt mit den niedrigsten Temperaturen und erhält dabei die höchste Gallertfestigkeit der ausgeschmolzenen Gelatine. Das verbliebene teilextrahierte Material wird anschließend bei einer höheren Wassertemperatur extrahiert. Das erfolgt so oft, bis die Gelatine komplett in Lösung gegangen ist. Im Anschluss wird die Gelatinelösung gereinigt, mit mehrstufigen Vakuum-Eindampfanlagen eingedickt, getrocknet und gemahlen. Das endgültige Produkt ist Gelatine in Pulverform. (19)

## 2.3 Kollagenhydrolysat

### 2.3.1 Herstellung

Bei Kollagen handelt es sich um ein Protein, das ausschließlich aus menschlichem und tierischem Gewebe gewonnen werden kann. Zur Herstellung von Kollagenhydrolysat verwendet man kollagenreiches Gewebe wie Haut, Bindegewebe oder Knochen. Neben Gewebe von Schwein, Rind und Geflügel können auch Gräten oder Flossen von Fischen verwendet werden. Das Gewebe durchläuft den Prozess der Gelatineherstellung, wie er bereits beschrieben wurde. Mit der entstandenen Gelatine wird daraufhin eine enzymatische Hydrolyse durchgeführt. Bei der Hydrolyse entstehen spezifische kleinere Peptide. Welche Produkte genau entstehen, hängt von den angewendeten Enzymen und von den Hydrolysebedingungen ab. In jedem Fall entsteht ein Gemisch vieler unterschiedlicher kleiner Peptide. (1)

Die bei der enzymatischen Hydrolyse entstandenen Produkte werden gereinigt und konzentriert. Dadurch kann die gewünschte Peptidfraktion isoliert und getrocknet werden. Es entsteht Pulver, mit dem ein Kollagenhydrolysat hergestellt werden kann. Abbildung 3 zeigt die molekulare Struktur des Pulvers. Die Eigenschaften des Produktes werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. So sind neben dem im verwendeten Gewebe vorherrschenden Kollagentyp die Art und das Alter des Tieres von Bedeutung. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl die Zusammensetzung des Ausgangsmaterials als auch die Herstellungsbedingungen die Eigenschaften des Kollagenhydrolyсата bestimmen. (1)

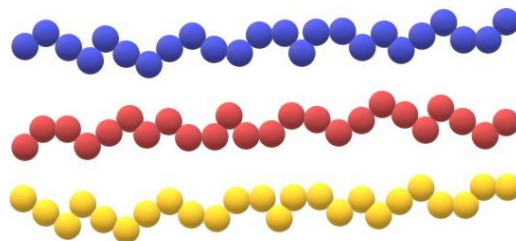


Abbildung 3: Aufbau von Kollagen in Pulverform [Quelle: in Anlehnung an (1)]

### 2.3.2 Eigenschaften

Die Peptide, die bei der enzymatischen Hydrolyse entstehen, haben Molekularmassen zwischen 0,3 und 8 kDa. Daraus ergibt sich rechnerisch eine Länge der Peptidketten von zwei bis 72 Aminosäuren, wenn man die durchschnittliche Molekularmasse einer Aminosäure von etwa 110 Da zugrunde legt. Die Molekularmasse des Ausgangsstoffs Gelatine beträgt ungefähr 100 kDa. Für Kollagenhydrolysat ist davon auszugehen, dass sich die tatsächliche Länge der Peptide über einen breiteren Bereich erstreckt. (1)

Kollagenhydrolysat wird als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben und das Pulver in gelöster Form peroral aufgenommen. Peptide können dem Organismus nur zugänglich gemacht werden, wenn sie im Lumen des Gastrointestinaltrakts resistent gegenüber Säure und abbauenden Enzymen sind. Di- und Tripeptide werden im Darm durch spezifische Transporter über die Enterozyten in den Blutkreislauf aufgenommen. Längere Peptidketten können parazellulär über Tight junctions transportiert werden. Ihre helikale Struktur bleibt dabei erhalten. (1)

Bioaktive Peptidbestandteile in Kollagenhydrolysat zeichnen sich durch repetitive Sequenzen der Amino- beziehungsweise Iminosäuren Pro-Hyp-Gly aus. Diese Sequenz geht mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Proteasen einher. Kollagenpeptide können im Organismus eine Stimulation von Chondrozyten, Osteoblasten oder Fibroblasten bewirken und als Eiweißquelle dienen. Die genannten Funktionen entstehen durch bestimmte Peptide. Im Gegensatz dazu kann eine antioxidative oder antientzündliche Wirkung auch durch das Hydrolysatgemisch insgesamt entstehen. Grundsätzlich gilt für die verschiedenen Kollagenhydrolysate jedoch, dass die Wirkungen von der Ausgangssubstanz und den Herstellungsbedingungen abhängig sind und daher für jedes Produkt gesondert in geeigneten Studien untersucht werden müssen. (1)

## **2.4 Kollagen in menschlichem Gewebe**

### **2.4.1 Sehnengewebe**

Sehnen sind überwiegend aus straffem kollagenem Bindegewebe aufgebaut. Die Kollagenfasern kommen in dicken Bündeln vor und sind parallel angeordnet, da das Gewebe einer Zugbelastung in eine Richtung ausgesetzt ist. Es handelt sich hauptsächlich um das fibrilläre Kollagen Typ I, das meist relativ dicke Fibrillen bildet. (29, 32)

### **2.4.2 Skelettmuskulatur**

Skelettmuskulatur enthält mehrere bindegewebige Komponenten. Eine Faszie aus straffem Bindegewebe und das darunterliegende Epimysium aus lockerem Bindegewebe umgeben einen Muskel. Bindegewebssepten, die vom Epimysium ausgehen und als Perimysium bezeichnet werden, unterteilen den Muskel in größere primäre und kleinere sekundäre Muskelfaserbündel. Ein Primärbündel hat einen Durchmesser von circa 1 mm und umfasst etwa 200 Muskelfasern. Unter dem Endomysium versteht man das Bindegewebe innerhalb eines Primärbündels, das jede einzelne Muskelfaser umgibt. Das Endomysium besteht aus retikulären Fasern. (33) Dabei handelt es sich um netzartig angeordnete Kollagenfasern vom Typ III, die dünne Bündel mit dünnen Kollagenfibrillen ausbilden. Außerdem kommt im Endomysium Kollagen Typ VI vor. (32)

Am Muskel-Sehnen-Übergang liegen myotendinöse Verbindungen vor. An den Enden der Muskelfaser ist die Oberfläche der Zellmembran durch Einfaltungen stark vergrößert. Kollagenfibrillen ragen in die Einfaltungen hinein und sind an der Basallamina befestigt. Die Basallamina ist mit den Kollagenfibrillen des Endomysiums verbunden. (33) Am Muskel-Sehnen-Übergang kommt unter anderem Kollagen Typ VI vor (32).



### **2.4.3 Knochengewebe**

Die Extrazellulärmatrix von Knochengewebe ist hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen aufgebaut. Die Kollagenfibrillen bestehen überwiegend aus Kollagen Typ I. Bei den meisten Knochen im menschlichen Körper handelt es sich um Lamellenknochen. Das bedeutet, dass die extrazelluläre Matrix aus 3 µm bis 5 µm dicken Schichten von gleichsinnig ausgerichteten, mineralisierten Kollagenfibrillen gebildet wird. Diese Schichten werden als Lamellen bezeichnet. Die Verlaufsrichtung der Kollagenfibrillen ändert sich zwischen den einzelnen Lamellen. Hydroxylapatit-Kristalle lagern sich an der Oberfläche und im Inneren der Kollagenfibrillen an. Nicht mineralisiertes Kollagen kommt im Endost an der inneren und im Periost an der äußeren Knochenoberfläche vor. Das straffe Bindegewebe des Periosts enthält Kollagenfasern, die in das eigentliche Knochengewebe einstrahlen. (32)

### **2.4.4 Knorpelgewebe**

Hyaliner Knorpel hat eine extrazelluläre Matrix, in der Kollagenfibrillen und Proteoglykane vorkommen. Die Kollagenfibrillen sind dünn und bestehen aus Kollagen Typ II mit Beimengungen von Kollagen Typ IX und XI. Sie sind senkrecht zur freien Oberfläche des Knorpels orientiert und strahlen in das Perichondrium, eine bindegewebige Knorpelhaut, ein. In der unmittelbaren Umgebung der einzelnen Chondrozyten gibt es Kollagenfibrillen aus Kollagen Typ VI. Gelenkknorpel ist eine Sonderform des hyalinen Knorpels und besitzt kein Perichondrium. Die Kollagenfibrillen sind arkadenartig angeordnet. Sie verlaufen teilweise tangential und teilweise radiär zur Gelenkfläche. (32)

Menisken sind aus Faserknorpel aufgebaut und sorgen im Kniegelenk dafür, dass der Druck gleichmäßig auf die artikulierenden Knochen übertragen wird (50). Faserknorpel enthält neben Kollagen Typ II auch kräftig ausgeprägte Kollagenfasern vom Typ I und elastische Fasern (32).

## 3 Grundlagen der Magnetresonanztomographie

Im Folgenden wird das physikalische Prinzip der Magnetresonanztomographie und der Magnetresonanzspektroskopie erläutert. Diese Informationen ermöglichen ein besseres Verständnis der durchgeführten Messungen.

### 3.1 Physikalisches Prinzip

#### 3.1.1 Kernspin und Magnetisierung

Eine wichtige Eigenschaft von Atomkernen ist ihr Eigendrehimpuls, aufgrund dessen sie sich stets um ihre eigene Achse drehen. Dabei entsteht ein Magnetfeld, weil durch die Bewegung der positiven Ladung der Kerne ein elektrischer Strom erzeugt wird. Dieses Magnetfeld besitzt eine Dipolcharakteristik und ist zur Drehachse symmetrisch. Für die Bildgebung sind die Kerne von Wasserstoffatomen von hoher Relevanz, weil ihr häufiges Vorkommen eine hohe Auflösung von menschlichem Gewebe ermöglicht. (37)

In einem Magnetresonanztomographen wird ein zwischen 0,2 T und 7 T starkes statisches Magnetfeld  $B_0$  angelegt. Die Rotationsachsen der einzelnen Kerne richten sich infolge dessen entweder parallel oder antiparallel zu  $B_0$  aus. Dabei besteht ein geringer Überschuss an Kernen, die sich entlang des äußeren Magnetfeldes orientieren, gegenüber den umgekehrt orientierten Kernen. Dieser Überschuss erzeugt in Abhängigkeit von der Anzahl der Wasserstoffkerne eine makroskopische Magnetisierung  $M$ , welche im Gleichgewichtszustand in Richtung und Orientierung mit  $B_0$  übereinstimmt. Um die makroskopische Magnetisierung messbar zu machen, werden die Wasserstoffatome mit einem Hochfrequenzpuls angeregt und damit die makroskopische Magnetisierung in Rotation versetzt. (37)

### 3.1.2 Hochfrequenz-Anregung

Der Magnetisierungsvektor  $M$  wird zum besseren Verständnis in zwei Teilkomponenten in Bezug auf  $B_0$  zerlegt, nämlich die longitudinale Magnetisierung  $M_l$  und die transversale Magnetisierung  $M_t$ . Die Quermagnetisierung  $M_t$  führt stets eine Rotationsbewegung mit einer bestimmten Frequenz aus. Diese Larmor-Frequenz ist proportional zu  $B_0$  und von der Kernsorte abhängig, wobei man für Wasserstoffkerne etwa 42,58 MHz je Tesla Feldstärke annehmen kann. Die Rotation von  $M_t$  induziert in einer Empfängerspule eine hochfrequente Spannung, die als Signal registriert wird. (37)

Im Ruhezustand liegt ausschließlich eine Längsmagnetisierung  $M_l$  vor, die zumindest teilweise in signalgebende Quermagnetisierung überführt werden muss. Dies erfolgt mithilfe eines Hochfrequenz-Senders, der senkrecht zum statischen Magnetfeld  $B_0$  ein Hochfrequenz-Magnetfeld  $B_1$  erzeugt. Stimmt die Larmor-Frequenz ungefähr mit der eingestrahlten Hochfrequenz überein, so kommt es zu einem Resonanzeffekt. Der Magnetisierungsvektor  $M$  bleibt in seinem Betrag konstant und wird von der Längsausrichtung zunehmend in Querausrichtung geklappt. Die Spitze des Magnetisierungsvektors  $M$  beschreibt während des Vorgangs eine Spiralbahn auf der Oberfläche einer gedachten Kugel. Die entstehende transversale Magnetisierung  $M_t$  beginnt unmittelbar mit der Larmor-Frequenz zu rotieren. (37)

Es kann festgelegt werden, wie weit sich der Magnetisierungsvektor  $M$  vom Gleichgewichtszustand entfernt, indem Stärke und Dauer des Hochfrequenz-Pulses entsprechend gewählt werden. Ein  $90^\circ$ -Puls überführt die longitudinale Komponente der Magnetisierung vollständig in Quermagnetisierung. Das Ergebnis eines Pulses mit  $180^\circ$ -Flipwinkel ist die Umkehrung des Magnetisierungsvektors  $M$ . Wählt man einen Flipwinkel von beispielsweise  $50^\circ$ , so endet die Spiralbewegung, bevor der Äquator der gedachten Kugel erreicht wird. Diese Maßnahmen stellen die technischen Möglichkeiten dar, durch die die nicht messbare Längsmagnetisierung  $M_l$  in signalgebende Quermagnetisierung  $M_t$  überführt werden kann. (37)

### 3.1.3 Relaxation

Der Magnetisierungsvektor  $M$  kehrt nach der Störung durch einen HF-Puls wieder in den Gleichgewichtszustand  $M_0$  zurück. Die Vorgänge, die dazu führen, werden als Relaxation bezeichnet. Die Relaxationsvorgänge laufen sowohl in Längs- und Querrichtung als auch für verschiedene Gewebe mit jeweils unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Daher finden die für  $M_t$  und  $M_l$  getrennt betrachteten Relaxationseigenschaften neben der Protonendichte, das heißt der Dichte der  $^1\text{H}$ -Atome im Gewebe, Anwendung als kontrastgebende Gewebeeigenschaften. (37)

Für die Längsmagnetisierung  $M_l$  gilt, dass sämtliche Werte zwischen  $M_0$  und  $-M_0$  durch HF-Pulse mit Flipwinkeln von  $0^\circ$  bis  $180^\circ$  erreicht werden können. Von diesem Startwert ausgehend nähert sich  $M_l$  exponentiell der Gleichgewichts-Längsmagnetisierung an. Dabei wird Energie an die Umgebung abgegeben, weshalb von einer Spin-Gitter-Relaxation gesprochen wird. (47) Die Zeitkonstante  $T_1$  gibt an, nach welcher Zeit ein Gewebe auf etwa 37 % ( $1/e$ ) der ursprünglichen Differenz von der Gleichgewichtsmagnetisierung in Längsrichtung relaxiert ist. Nach einem  $90^\circ$ -Puls ist zu Beginn des Relaxationsvorgangs keine Längsmagnetisierung vorhanden. Abbildung 4 zeigt, dass sich die Kurve exponentiell  $M_0$  annähert. Liegt  $B_0$  bei 1,5 T, so haben diverse Organgewebe  $T_1$ -Werte von ungefähr 1 s. Die Werte für freie Flüssigkeit liegen mit bis zu 4 s wesentlich höher, wohingegen Fettgewebe mit  $T_1 \approx 300$  ms deutlich schneller relaxiert. (37)

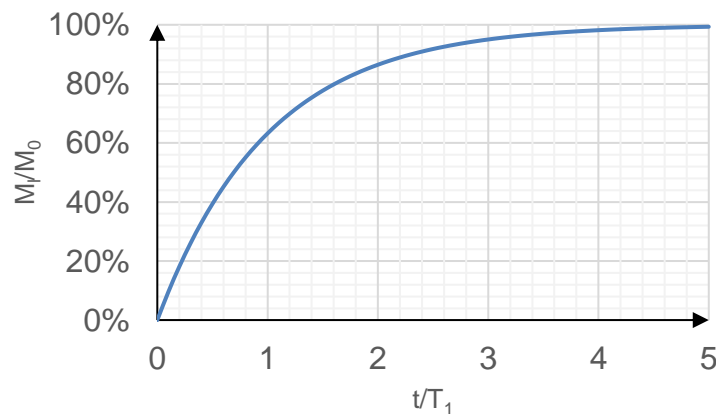


Abbildung 4: Graphische Darstellung der  $T_1$ -Relaxation nach  $90^\circ$ -Anregung  
20

Die Quermagnetisierung  $M_t$  hängt ebenfalls vom Flipwinkel des HF-Pulses ab und nähert sich exponentiell dem Wert „null“ an. Die Zeitkonstante  $T_2$  gibt an, nach welcher Zeit ein Gewebe auf etwa 37 % ( $1/e$ ) der ursprünglichen Quermagnetisierung relaxiert ist. Die maximale Quermagnetisierung kommt nach einem  $90^\circ$ -Puls zustande und sinkt durch die Querrelaxation ab, wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Der Querrelaxation liegen Spin-Spin-Wechselwirkungen zugrunde (47). Zeitlich konstante Inhomogenitäten des äußeren Magnetfelds  $B_0$  bewirken, dass die transversale Magnetisierung in der Realität häufig schneller mit der Zeitkonstanten  $T_2^*$  zerfällt. Der  $T_2^*$ -Effekt kann durch Spinechosequenzen korrigiert werden. Für Parenchymgewebe liegt  $T_2$  meist unter 150 ms und ist kleiner als  $T_1$ . Tumoren und Entzündungen können zu einer Verlängerung von  $T_2$  führen, während Flüssigkeiten mit  $T_2$ -Werten von über 1 s auch in transversaler Richtung langsam relaxieren. Kollagenhaltige Gewebe wie Sehnen und Knochen weisen sehr kurze  $T_2$ -Werte auf, da ihre Struktur fest eingebundene Wassermoleküle und weitere Wasserstoffatome beinhaltet. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit ihrer Querrelaxation sind mit den Standard-Untersuchungsmethoden häufig keine Signale messbar. (37)

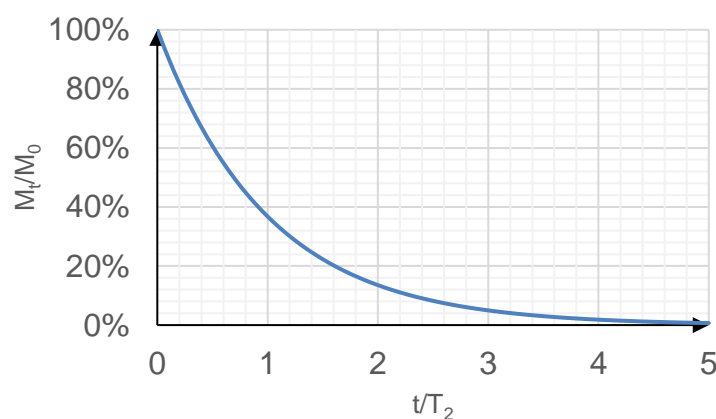


Abbildung 5: Graphische Darstellung der  $T_2$ -Relaxation nach  $90^\circ$ -Anregung

Längs- und Querrelaxation finden gleichzeitig statt, weshalb die Länge des Magnetisierungsvektors durch Relaxation verkürzt werden kann. Nach einem  $180^\circ$ -Puls findet ausschließlich longitudinale Relaxation statt, weil keine transversale Magnetisierung vorliegt. Im Umkehrpunkt der longitudinalen Relaxation sinkt die Länge von  $M$  in diesem speziellen Fall auf null ab. (37)

## 3.2 Ortskodierung

Bei der Magnetresonanztomographie besteht die Schwierigkeit darin, dass von einer Spule nur ein eindimensionales Signal aufgenommen wird. In der Empfängerspule wird eine Spannung induziert, die durch alle Quermagnetisierungen im Untersuchungsgebiet beeinflusst wird. Um eine Ortskodierung durchführen zu können, müssen die Signale aus jedem Gewebebezirk, der einem Bildelement entsprechen soll, eindeutig identifizierbar sein. Gradientenspulen verändern das statische Magnetfeld  $B_0$  so, dass die Feldstärke entlang einer beliebigen Richtung im Raum gleichmäßig zunimmt. Das führt dazu, dass die Larmor-Frequenz ortsabhängig ist. Ein nennenswertes Signal kann allerdings nur dann gemessen werden, wenn die einzelnen Quermagnetisierungsvektoren eine Vorzugsrichtung aufweisen. Die Effekte der unterschiedlich schnellen Rotation der Magnetisierungsvektoren können rückgängig gemacht werden, indem man den Gradienten zunächst in eine und anschließend in die entgegengesetzte Richtung aktiviert. Die rephasierten Anteile der Quermagnetisierungen erzeugen ein messbares Signal, das als Echo bezeichnet wird. Das Ziel der Ortskodierung besteht darin, jedem messbaren eindimensionalen Signal seine räumliche Herkunft zuzuordnen. (37)

### 3.2.1 Schichtselektive Anregung

Für die zweidimensionalen Bilder, welche die Magnetresonanztomographie erzeugt, muss im Raum in der dritten Dimension eine Schicht mit einer bestimmten Dicke ausgewählt werden. Normalerweise erfolgt dies, indem nur diese Schicht mit einem HF-Puls angeregt wird. Dadurch entstehen ausschließlich innerhalb der Schicht Quermagnetisierungen, die zum Signal beitragen. Das Schalten eines Feldgradienten ermöglicht, dass die Resonanzbedingung nur innerhalb einer Schicht erfüllt ist und diese Schicht angeregt wird. (37)

Die Schichtdicke wird durch die Steilheit des Schichtselektionsgradienten beeinflusst. Ein steiler Gradient geht mit einer hohen Frequenzzunahme entlang des

Schichtselektionsgradienten einher und hat zur Folge, dass eine dünnere Schicht als bei einem weniger steilen Gradienten angeregt wird. Außerdem wirken sich die Dauer und die Einhüllende des HF-Pulses auf den angeregten Frequenzbereich aus. Je kürzer der HF-Puls ist, desto breiter ist der Bereich angeregter Larmor-Frequenzen, was mit der Anregung einer dickeren Schicht einhergeht. Die Schichtposition kann man verschieben, indem man die Frequenz des HF-Pulses ändert. Die Orientierung der Schicht wird durch die Richtung des Schichtselektionsgradienten festgelegt und kann dementsprechend verändert werden. (37)

Im Ablauf einer Bildgebungssequenz wird die schichtselektive Anregung bewirkt, indem ein frequenzselektiver HF-Puls während der Anwesenheit des Schichtselektionsgradienten eingestrahlt wird. Das Ein- und Ausschalten des Gradienten dauert jeweils wenige Hundert Mikrosekunden, innerhalb derer die Stärke des erzeugten Magnetfeldes ansteigt beziehungsweise abfällt. Im Anschluss an den Schichtselektionsgradienten wird ein umgekehrt geschalteter Gradient eingeschaltet, der als Rephasierungsgradient bezeichnet wird. Der Schichtselektionsgradient bewirkt während der HF-Anregung unterschiedliche Larmor-Frequenzen innerhalb einer endlich dicken Schicht. Die dadurch entstandenen Phasenverschiebungen werden durch den Rephasierungsgradienten kompensiert. Nach dem Abschalten des Rephasierungsgradienten zeigen sämtliche Quermagnetisierungsanteile in die gleiche Richtung und erzeugen ein maximales Signal in der Empfängerspule. (37)

### **3.2.2 Kodierung der Signalintensitäten der Bildelemente**

Die schichtselektive Anregung durch einen HF-Puls macht die Quermagnetisierung innerhalb der gesamten bildgebenden Schicht messbar. Das ermöglicht jedoch noch nicht, den Summenvektor in seine Anteile zu zerlegen und Informationen für die einzelnen Bildelemente zu generieren. Deshalb werden zwei zusätzliche Gradienten entlang der beiden Achsen, die das Bild aufspannen, geschaltet. Dadurch kann die Larmor-Frequenz ortsabhängig innerhalb eines bestimmten Zeitraums geändert werden. Die unterschiedlichen Larmor-

Frequenzen bewirken eine Dephasierung der Quermagnetisierungsvektoren innerhalb der aufgenommenen Schicht. Die Folge sind ein veränderter Summenvektor und ein verändertes Signal. Werden viele Messpunkte aufgenommen, so wird es möglich, die Signalintensitäten eindeutig einzelnen Bildelementen zuzuordnen. (37)

Normalerweise entspricht die Anzahl der Messpunkte der Anzahl der Bildelemente des rekonstruierten Magnetresonanztomogramms. Die Informationen über Länge und Richtung des Summenvektors der Quermagnetisierung werden für jeden Messpunkt ermittelt. Die räumliche Zuordnung erfolgt, indem die einzelnen Messpunkte in den k-Raum, einen Rohdatenraum, einsortiert werden. Die beiden Achsen werden mittels Frequenzkodierung und Phasenkodierung kodiert, wie in Abbildung 6 dargestellt ist. Es ist frei wählbar, für welche Achse welche Art der Kodierung angewendet wird. (37)

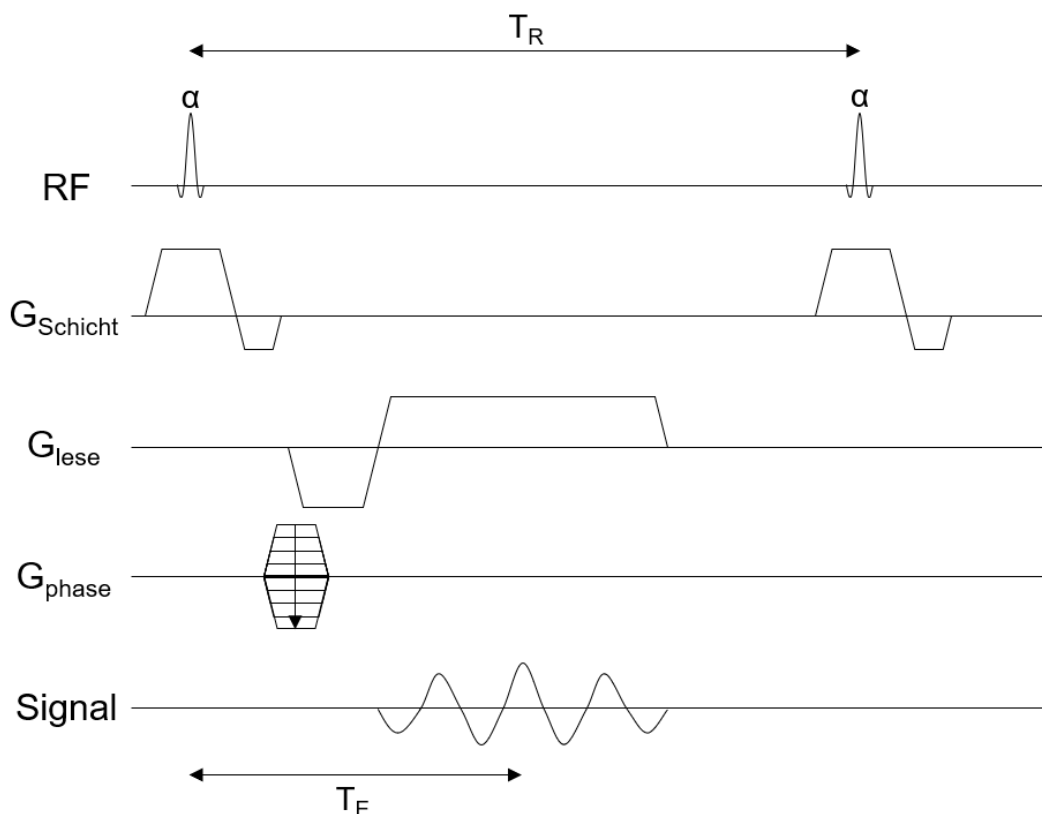


Abbildung 6: Sequenzablauf zur Rohdatenaufnahme einer Zeile im k-Raum  
[Quelle: in Anlehnung an (37)]



## **3.3 Bildrauschen und räumliche Auflösung**

### **3.3.1 Ursachen des Rauschens**

In der Magnetresonanztomographie werden schwache Signale durch Spulen gemessen. Teilweise bewegt sich die Signalstärke in der Größenordnung des Hochfrequenzrauschens, weshalb eine Abgrenzung schwierig ist. Hochfrequenzrauschen entsteht durch die Wärmebewegung von Materie und ist überall vorhanden. Die Emission elektromagnetischer Strahlung in allen Frequenzbereichen erzeugt das Rauschen. Das Rauschsignal ließe sich deutlich reduzieren, indem man die Temperatur in die Nähe des absoluten Nullpunkts absenkt. In der Praxis wird die Hochfrequenzstrahlung äußerer Quellen durch Abschirmvorrichtungen des Messraums so weit wie möglich aus dem Messprozess eliminiert. (37)

### **3.3.2 Qualität des empfangenen Kernresonanzsignals**

Das empfangene Kernresonanzsignal hat eine umso höhere Qualität, je günstiger das Verhältnis zwischen der Amplitude des Signals selbst und der Amplitude des Rauschens ist. Eine kleine Empfangsspule ist nur für einen begrenzten Raumbezirk in ihrer unmittelbaren Umgebung empfindlich und empfängt dementsprechend wenig Hochfrequenzrauschen. Die Magnetisierung der Protonen im Gewebe liefert einen hohen Anteil der in der Empfangsspule induzierten Spannung und damit des Signals. Da die Empfindlichkeit für weiter entfernte Gewebereale stark abnimmt, muss zur Darstellung größerer Körperbereiche entweder eine relativ große Empfangsspule oder viele kleine Empfangsspulen im Sinne einer Phased-Array-Technik eingesetzt werden. (37)

## 3.4 Kontraste

Der Grauwert eines Pixels im Magnetresonanztomogramm gibt die jeweils gemessene Signalintensität an. Je höher die Signalintensität in einem Gewebeareal ist, desto heller wird das zugehörige Pixel im Bild dargestellt. Die Intensität des gemessenen Signals hängt von der Gewebeart, der Kontrastgewichtung und dem Abstand von der Empfängerspule ab. (45)

### 3.4.1 $T_1$ -Gewichtung

Die Repetitionszeit  $T_R$  ist als Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anregungen derselben Schicht definiert. Innerhalb dieser Zeitspanne findet die Längsrelaxation statt, durch die die Spins eine zunehmende Längsmagnetisierung aufbauen. Daher hat die Repetitionszeit einen wesentlichen Einfluss darauf, wie viel Längsmagnetisierung im nächsten Schritt angeregt werden kann. Dieser Einfluss ist bei einer kurzen Repetitionszeit besonders stark. Das Ausmaß der Längsrelaxation wird durch  $T_1$  bestimmt. Die Spins aus Gewebearealen mit kurzem  $T_1$  relaxieren schnell in Längsrichtung. Sie erzeugen bei der nächsten Anregung eine hohe Signalintensität und werden im Bild hell dargestellt. Im Gegensatz dazu reicht die Repetitionszeit bei Geweben mit langem  $T_1$  nur für eine teilweise Relaxation aus. Hier steht im nächsten Schritt entsprechend wenig Längsmagnetisierung zur Verfügung, weshalb die Signalintensität niedrig ist. Wählt man eine lange Repetitionszeit, so haben die Gewebe unabhängig von  $T_1$  ausreichend Zeit, um zu relaxieren. In diesem Fall unterscheidet sich die Signalintensität zwischen den einzelnen Geweben kaum. Die  $T_2$ -Gewichtung wird durch die Wahl einer langen Echozeit niedrig gehalten. (45)

Eine starke  $T_1$ -Gewichtung ist durch die Wahl einer kurzen Repetitionszeit zu erreichen. Die Konsequenz einer zu kurzen Repetitionszeit ist jedoch, dass bei allen weiteren Anregungen weniger Längsmagnetisierung zur Verfügung steht und die Signalintensität absinkt. Dieser Effekt wird als Sättigung bezeichnet. Man

kann bei Gradientenecho-Sequenzen einer übermäßigen Sättigung entgegenwirken, indem man einen reduzierten Flipwinkel wählt. (45)

### **3.4.2 T<sub>2</sub>-Gewichtung**

Die Echozeit  $T_E$  umfasst die Zeitspanne zwischen der Anregung und der Messung des Magnetresonanzsignals. Zum Zeitpunkt der Messung hat die Querrelaxation bereits gewirkt. Wählt man eine kurze Echozeit, so ist die Querrelaxation noch nicht weit fortgeschritten und die einzelnen Signalintensitäten unterscheiden sich kaum. Bei längeren Echozeiten haben die Spins aus Gewebereichen mit niedrigen  $T_2$ -Werten bereits an Signalintensität verloren und erscheinen im Bild dunkel. Gewebe mit längerem  $T_2$  hingegen werden hell dargestellt, da sie noch eine hohe Quermagnetisierungskomponente aufweisen. Daher lässt sich eine starke  $T_2$ -Gewichtung durch die Wahl einer langen Echozeit erzeugen. Der exakte einzustellende Wert für  $T_E$  hängt grundsätzlich von der Fragestellung ab. (45)

Für eine starke  $T_2$ -Gewichtung muss eine lange Repetitionszeit gewählt werden, um die  $T_1$ -Kontrastierung in Grenzen zu halten. In der Regel werden Fast-Spinchesequenzen verwendet, weil sie eine akzeptable Gesamtmesszeit ermöglichen.

### **3.4.3 Protonendichtegewichtung**

In vielen Fällen ist eine Aussage über die Protonendichte im Gewebe aufschlussreich. Um die Anzahl anregbarer Spins pro Volumeneinheit darzustellen, müssen die  $T_1$ - und  $T_2$ -Gewichtung möglichst gering bleiben. Dies wird durch die Kombination einer langen Repetitionszeit mit einer kurzen Echozeit erreicht. Die zugehörigen Bilder werden als protonendichtegewichtet oder intermediärgewichtet bezeichnet. (45)

## 3.5 Ultrashort Echo Time (UTE) Imaging

### 3.5.1 Gewebe mit kurzer Relaxationszeit $T_2$

Zur Darstellung von Gewebe mit sehr kurzen  $T_2$ -Werten ist es erforderlich, die Methode des Ultrashort Echo Time (UTE) Imaging anzuwenden. Dabei ist nicht ganz klar definiert, was man unter kurzen beziehungsweise ultrakurzen Echozeiten versteht. Im Folgenden sollen diejenigen Gewebearten im menschlichen Körper betrachtet werden, bei denen aufgrund der schnellen transversalen Relaxation mit konventionellen Techniken kein nennenswertes Signal messbar ist. Bestimmte Gewebe haben sehr kurze  $T_2$ -Werte. Modellhaft kann man  $T_2$  beziehungsweise  $T_2^*$  zwischen 1 ms und 10 ms als „kurz“, zwischen 0,1 ms und 1 ms als „ultrakurz“ und kleiner als 0,1 ms als „superkurz“ klassifizieren. Auf dieser Grundlage kommen unterschiedliche Pulssequenzen zum Einsatz. UTE-Bildgebung kann auch bei anderen Atomkernen als Wasserstoffkernen angewendet werden. (51)

Es ist davon auszugehen, dass die meisten Gewebe mehrere Komponenten der transversalen Relaxation mit unterschiedlichen Relaxationseigenschaften enthalten. Wasserstoffkernen in frei beweglichen Wassermolekülen sind höhere  $T_2$ -Werte zuzuordnen als Protonen, die in Makromolekülen wie Proteinen gebunden sind. Dementsprechend kann ihr Signal in konventionellen Sequenzen nicht gemessen werden. Berechnungen haben ergeben, dass in manchen Geweben etwa 20 % bis 30 % des Signals von Wasserstoffkernen aus diesem Grund nicht erfasst werden. (51)

Fest gebundene Wasserstoffkerne kommen beispielsweise in kollagenreichem Gewebe vor. Die Matrixstruktur des Kollagens und die konstanten Winkel zwischen den einzelnen Protonen tragen zur schnellen transversalen Relaxation und damit zu den kurzen  $T_2$ -Werten kollagenreicher Gewebe bei. Das Vorkommen von Wasserstoffkernen innerhalb großer Moleküle scheint generell mit kurzen  $T_2$ -Werten verbunden zu sein. (51)

### 3.5.2 Herausforderungen der UTE-Bildgebung

Die Bildgebung von Gewebe mit ultrakurzen  $T_2$ -Werten verursacht Probleme, die bei der konventionellen Bildgebung mittels Kernspintomographie nicht existieren. Erfolgt eine sehr schnelle Querrelaxation, so ist die Dauer des HF-Pulses in Anbetracht der sehr kurzen Relaxationszeit  $T_2$  vergleichsweise lang. Aufgrund dessen fällt das Signal bereits während des HF-Pulses ab. Unter diesen Umständen wird der gewünschte Flipwinkel nicht in allen Fällen erreicht. Der effektive Flipwinkel hängt von  $T_2$  ab. Ein Lösungsansatz dieses Problems wäre, die Amplitude des HF-Pulses zu erhöhen und seine Dauer zu verkürzen. Um einen bestimmten Flipwinkel zu erreichen, muss das Integral der Pulsamplitude über der Zeit konstant sein. Die Energie des HF-Pulses hängt quadratisch von der Pulsamplitude und linear von der Pulsdauer ab. Daher ist mit einer höheren Amplitude und einer geringeren Dauer des HF-Pulses ein konstanter Flipwinkel nicht ohne Weiteres zu erreichen. (51)

Die Datengewinnung stellt ebenfalls eine Herausforderung dar. Während der Dauer des Phasenkodierungsimpulses fällt das Signal bei ultrakurzen  $T_2$ -Werten bereits so weit ab, dass es nicht mehr gemessen werden kann. Die Datengewinnung muss daher bereits unmittelbar nach der Anregung durch den HF-Puls beginnen. Das Zentrum des Rohdatenraums wird ohne Kodiergradienten erreicht. Für die weiteren Datenpunkte werden die benötigten Gradienten eingeschaltet. Die Ortskodierung wird mittels Radialabtastung beziehungsweise spiralförmiger Abtastung des  $k$ -Raums innerhalb einer kürzeren Zeit durchgeführt. Die Folge ist, dass mit einer Anregung normalerweise nur für eine bestimmte Trajektorie im  $k$ -Raum Daten aufgenommen werden können. (51)

### 3.5.3 Praktische Umsetzung

In Abbildung 7 ist der Ablauf einer 3D-„stack of spirals“-UTE-Sequenz dargestellt. Es kommt ein nichtselektiver RF-Puls zur Anwendung, um kurze Echozeiten zu

ermöglichen. Zur Schichtkodierung wird ein Phasenkodierungsgradient verwendet. Unmittelbar nach dem Phasenkodierungsgradienten beginnt das spiralförmige Auslesen ausgehend vom Zentrum des k-Raums. Die Echozeit TE entspricht der Zeitspanne zwischen der maximalen Intensität des RF-Pulses und dem Auslesen des k-Raum-Zentrums. (35)

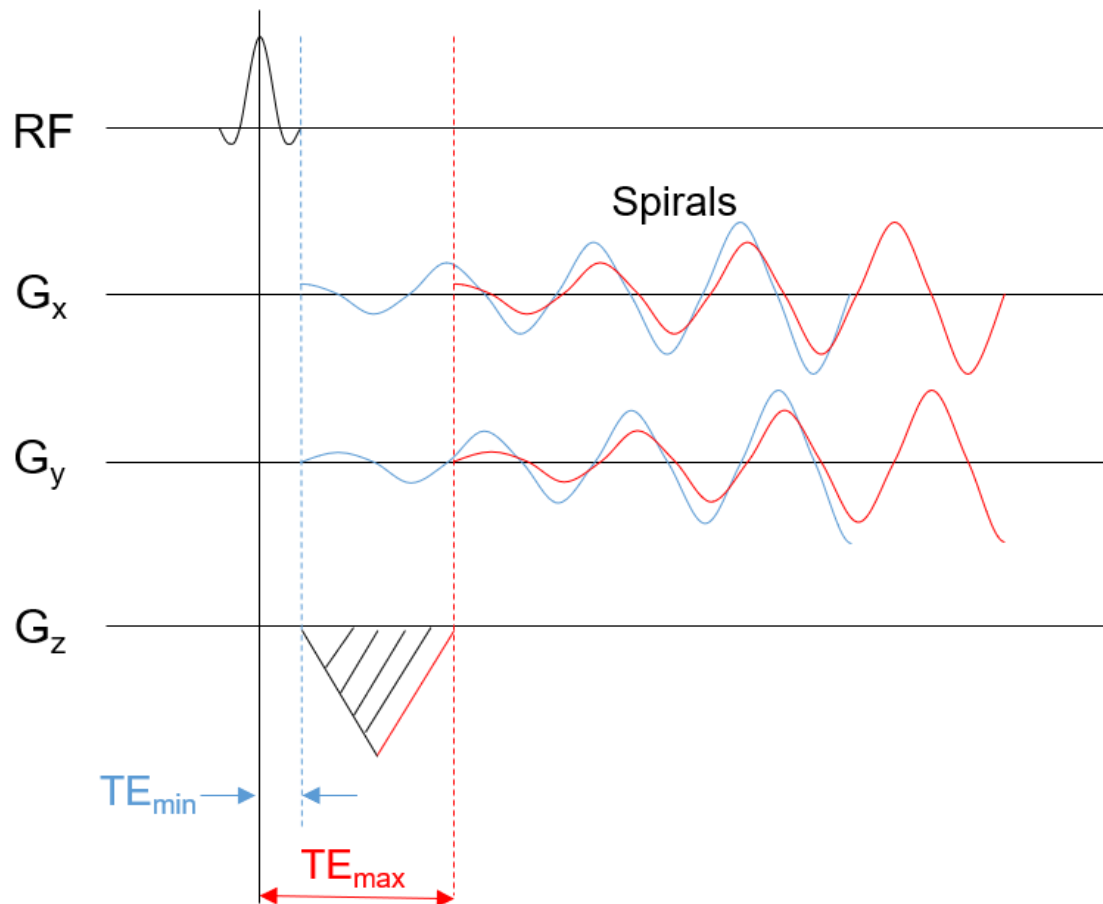


Abbildung 7: Ablauf einer 3D-„stack-of-spirals“-UTE-Sequenz  
 [Quelle: in Anlehnung an (35)]

## 3.6 Magnetresonanzspektroskopie

### 3.6.1 Grundprinzip

Mithilfe der Magnetresonanzspektroskopie ist es möglich, Informationen über die chemische Zusammensetzung und den Metabolismus von Gewebe zu gewinnen. Die Informationen werden gemittelt über ein festgelegtes Volumen ermittelt. Neben den Signalen von Wasser- und Fettmolekülen werden in der Regel auch Signale von gelösten Molekülen gemessen, sofern diese Wasserstoffatome in ausreichender Konzentration enthalten. Diese Metaboliten sind teilweise quantitativ in so geringer Menge vorhanden, dass das zugehörige Signal kaum zu messen ist. Um das Signal der Metaboliten in der Magnetresonanzspektroskopie messbar zu machen, muss in manchen Fällen das Wassersignal unterdrückt werden. (44)

Die Frequenzen der Metabolitensignale unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Position der Wasserstoffatome innerhalb des Moleküls. Dies wird als Chemical Shift bezeichnet. Damit man die Werte unabhängig von der Feldstärke angeben kann, erfolgt die Angabe in „parts per million“ (ppm). Kennt man für zwei verschiedene Metaboliten die Werte in ppm, so kann man die absolute Frequenzdifferenz bestimmen, indem man die Differenz in ppm mit der Feldstärke und dem gyromagnetischen Verhältnis des Wasserstoffkerns multipliziert. Das für die Berechnung benötigte gyromagnetische Verhältnis für Protonen beträgt 42,58 MHz/T. (44)

Häufig ist der Frequenzbereich zwischen den Fettsignalen und den Wassersignalen von Interesse. Die innerhalb dieses Intervalls messbaren Signale können bestimmten Molekülen und Substanzgruppen zugeordnet werden. Unter bestimmten Voraussetzungen sind die Substanzkonzentration und das Integral des zugehörigen Peaks im Spektrum zueinander proportional. (44)

In vielen Fällen werden Signale aus einem kleinen definierten Volumen empfangen. Dieses Vorgehen wird als Single-Voxel-Technik bezeichnet und hat den

Vorteil, dass keine Frequenz- und Phasenkodierung vorgenommen werden muss. Die gemittelten Werte aus dem Gewebeareal können innerhalb einer relativ kurzen Zeit aufgenommen werden. Mit Multi-Voxel-Techniken werden Signale aus größeren Bereichen ihrem jeweiligen Entstehungsort zugeordnet. Aufgrund der hierfür erforderlichen Ortskodierung ist die Aufnahmezeit meist länger. Dafür wird es möglich, die räumliche Verteilung der Metabolitenkonzentrationen zu beurteilen. (44)

### 3.6.2 Metabolitensignale

Die Echozeit beeinflusst die Signalintensität der einzelnen Metaboliten in Wasserstoffspektren. Es gibt Metabolitensignale, die bei kurzen Echozeiten sehr deutlich dargestellt werden, bei längeren Echozeiten im Spektrum aber kaum sichtbar sind. Das liegt daran, dass die Signale bei langen Echozeiten aufgrund kurzer  $T_2$ -Werte bereits zu stark abgesunken sind. Koppelnde Wasserstoffkerne, wie sie zum Beispiel in Laktat vorhanden sind, führen zu Signalen mit abweichender Phase. Signale in der Magnetresonanzspektroskopie können bei veränderter Echozeit sowohl quantitativen als auch qualitativen Änderungen unterworfen sein. (44)

Die Angabe der absoluten Metabolitenkonzentration in  $\mu\text{mol/l}$  ist nicht ohne Weiteres möglich. Daher greift man auf ein Referenzsignal im selben Spektrum zurück. Der Vergleich mit dem Referenzsignal ermöglicht zumindest einen relativen Vergleich der Metabolitensignale. Untersucht man eine pathologische Gewebeveränderung mit der Single-Voxel-Technik, so kann man ein zweites Spektrum zum Vergleich aufnehmen. Dieses kann beispielsweise aus der korrespondierenden Position der anderen Körperhälfte stammen und wird ebenfalls mittels Single-Voxel-Technik aufgenommen. (44)

Das Signal-Rausch-Verhältnis ist bei geringer Metabolitenkonzentration ungünstig und hängt von der Feldstärke ab. Besonders für die quantitative Metabolitenbestimmung ist es wichtig, das Wassersignal erfolgreich zu unterdrücken. Für



relative Vergleiche sollte man die Wasserunterdrückung und die Echozeit konstant halten. (44)

### 3.6.3 Signalverarbeitung und Messesequenzen

Bei der MR-Spektroskopie wird in der Empfängerspule der Abfall der Quermagnetisierung gemessen. Dieser wird als Free Induction Decay (FID) bezeichnet. Das empfangene Signal ist zeitabhängig und wird mittels Fourier-Transformation in Amplitude und Frequenz umgerechnet. Der FID ist ein komplexes Signal und besteht aus zwei Teilen, die um  $90^\circ$  phasenverschoben sind. Die Komponente in x-Richtung wird als Realteil und die Komponente in y-Richtung als Imaginärteil bezeichnet. In der Regel wird der Realteil verwendet, um Spektren auszuwerten. Nach der Phasenkorrektur besteht der Realteil aus der Absorptionskomponente und der Imaginärteil aus der Dispersionskomponente. (12)

Um die Qualität der Spektren zu verbessern, werden vor der Fourier-Transformation üblicherweise mehrere FIDs aufgenommen und addiert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass sich die Rauschsignale teilweise aufheben, weil sie zwischen den einzelnen Messungen unterschiedlich sind. Das Metabolitensignal hingegen bleibt über alle Aufnahmen hinweg erhalten und wird daher addiert. Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ist proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der Akquisitionen. Es ist als Quotient aus der Intensität des Peaks oberhalb der Baseline und der Standardabweichung des Rauschsignals definiert. (12)

STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode) ist ein Verfahren, um eine volumen-selektive Single-Voxel-Spektroskopie durchzuführen. Das stimulierte Echo wird durch drei zueinander senkrechte schichtselektive  $90^\circ$ -RF-Pulse erzeugt. Außerdem sorgen drei Schichtgradienten und drei Spoilergradienten dafür, dass die Spins innerhalb des Voxels rephasieren und die Spins außerhalb des Voxels dephasieren. In den Zeitintervallen zwischen dem ersten und zweiten RF-Puls sowie zwischen dem dritten RF-Puls und dem stimulierten Echo findet die Querrelaxation statt. Das Intervall zwischen dem zweiten und dritten RF-Puls ist

für die Längsrelaxation empfindlich. Diese Zeit wird als Mixing Time  $T_M$  bezeichnet und ermöglicht eine Wassersuppression, ohne die Echozeit zu verlängern. Der Ablauf einer STEAM-Sequenz ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt. (36)

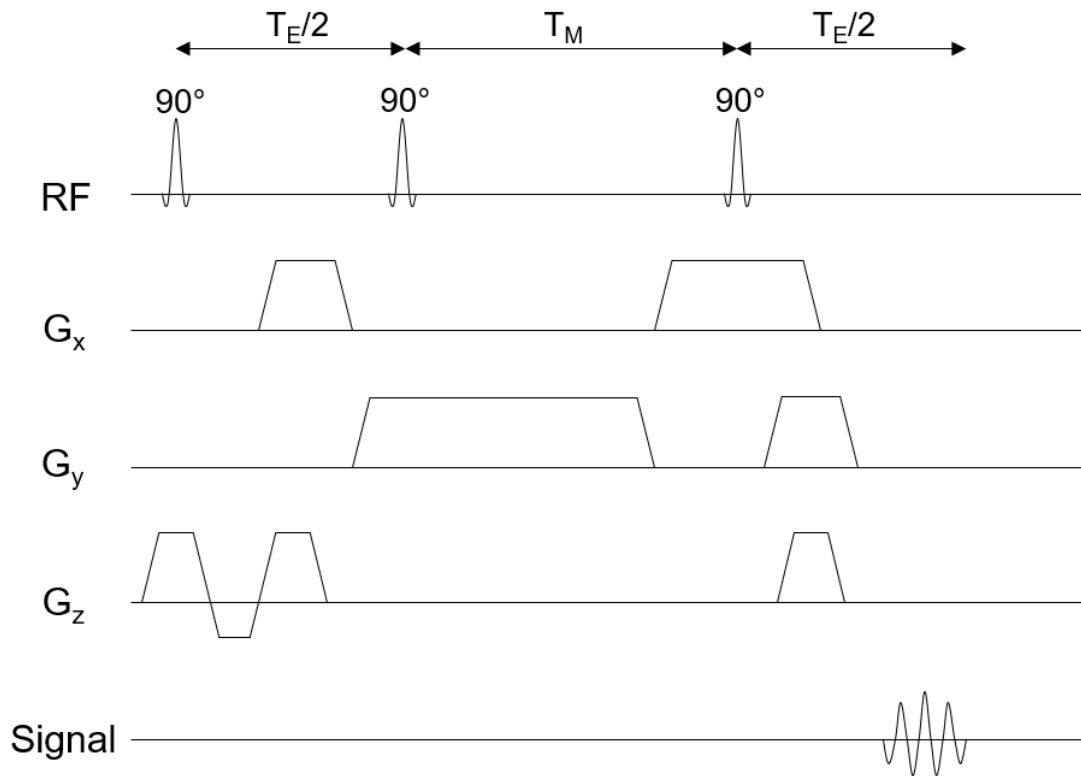


Abbildung 8: Ablauf einer STEAM-Sequenz [Quelle: in Anlehnung an (36)]

### 3.6.4 Zusammenhang zwischen FID-Spektroskopie und UTE-Bildgebung

Bei der UTE-Bildgebung wird ein absolutes Signal gemessen, welches der Quadratwurzel aus der Summe des realen Anteils im Quadrat und des imaginären Anteils im Quadrat entspricht. Dieses Magnitudensignal kann für unterschiedliche Echozeiten ermittelt und als Funktion der Echozeit dargestellt werden. Bei der FID-Spektroskopie wird zusätzlich die Phaseninformation genutzt, um ein Spektrum zu generieren. Wenn mehrere UTE-Bilder mit verschiedenen Echozeiten

aufgenommen werden, weisen UTE-Sequenzen messtechnisch eine hohe Übereinstimmung mit der sogenannten „pulse-acquire“ FID-Spektroskopie auf. Bei der UTE-Bildgebung wird allerdings nur die Signalmagnitude ermittelt, was keine spektrale Zuordnung der Einzelsignalbeiträge erlaubt. Bei der in Abbildung 9 gezeigten FID-Spektroskopie, die nicht volumenselektiv ist, wird der FID nach nur einem Anregepuls gemessen, wodurch man mittels Fourier-Transformation ein Spektrum mit einer kurzen Echozeit erhält.

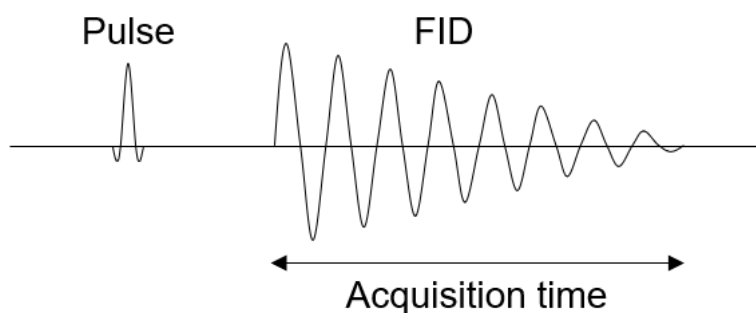


Abbildung 9: Ablauf einer FID-Spektroskopie

Zum Vergleich der Frequenzbereiche von FID-Spekten mit den Oszillationsfrequenzen des Signals in der UTE-Bildgebung muss die chemische Verschiebung der Signalanteile in ppm in eine Frequenz in Hz umgerechnet werden. Die Werte für die chemische Verschiebung in ppm sind in der Regel als Differenz zum Signal von Tetramethylsilan (TMS) angegeben, das definitionsgemäß bei 0 ppm liegt. Das Wassersignal befindet sich bei 4,7 ppm. Die chemische Verschiebung zu Wasser in Hz erhält man, indem man die ppm-Differenz zwischen dem betrachteten Signal und Wasser mit der Larmorfrequenz multipliziert. Die chemische Verschiebung in Hz ist von der Feldstärke  $B_0$  abhängig, wohingegen die Werte in ppm von  $B_0$  unabhängig sind. (16)

## 4 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden beschrieben und die untersuchten Proben und Prüfkörper vorgestellt. Es erfolgt eine Vorstellung des Magnetresonanztomographen, an dem die Messungen durchgeführt wurden. Die Auswertung der Datensätze mithilfe spezieller Software wird erläutert.

### 4.1 Messmethoden

#### 4.1.1 Magnetresonanztomograph

Alle Messungen der vorliegenden Arbeit erfolgten am Magnetom Prisma<sup>Fit</sup> der Firma Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland. Es handelt sich um einen Ganzkörper-Magnetresonanztomographen mit der Feldstärke 3 T. Die Feldstärke des Tomographen wird durch einen supraleitenden, heliumgekühlten Magneten aufrechterhalten. Die Anregungsfrequenz des Tomographen für Wasserstoff  $^1\text{H}$  beträgt etwa 128 MHz. Dieser Wert ergibt sich aus der Larmorfrequenz, die vom gyromagnetischen Verhältnis abhängig ist und bei circa 42,6 MHz je Tesla Feldstärke liegt. Um die Homogenität des Magnetfeldes zu verbessern, werden Shim-Spulen verwendet. Die Öffnung des Tomographen hat einen Durchmesser von 60 cm. Im Zentrum beträgt die Magnetfeldinhomogenität innerhalb von 40 cm Durchmesser maximal 0,25 ppm. Die Stärke des Ortskodiergradienten beträgt in allen drei Raumrichtungen maximal 80 mT/m. Die Anstiegsgeschwindigkeit des Ortskodiergradienten liegt entlang allen drei Achsen jeweils bei bis zu 200 T/m/s.

Die Messungen am beschriebenen MR-Tomographen mit 3 T Feldstärke wurden mit einer 15-Kanal-Sende-Empfangs-Kniespule beziehungsweise einer 64-Kanal-Sende-Empfangs-Kopfspule durchgeführt. Die Ganzkörperspule erwies sich

für die durchzuführenden Messungen als ungeeignet, da sie einen großen Abstand zum Untersuchungsobjekt hat. Dieser führt zu einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis. Bei den verwendeten Knie- und Kopfspulen handelt es sich um Phased-Array-Spulen, die auch als Matrixspulen bezeichnet werden. Mehrere kleine Spulen werden parallel ausgelesen und können aufgrund des kleineren Spulendurchmessers näher am Untersuchungsobjekt platziert werden (46). Dadurch kann ein stärkeres Signal empfangen werden und das Signal-Rausch-Verhältnis wird verbessert (46).

Ein externer Steuerungsrechner wurde verwendet, um die Messprotokolle zu konfigurieren. Die Bildrekonstruktion erfolgte durch einen vorgeschalteten Rechner.

#### **4.1.2 UTE-Sequenz**

Der Signalabfall wurde mit einer UTE-Sequenz gemessen. Die verwendete Sequenz UTE Spiral VIBE basiert auf der Arbeit von John O. Mugler III, University of Virginia. Die spiralförmige Bildrekonstruktion und das Design der Spirals erfolgen auf der Grundlage der Arbeit von Josef Pfeuffer (MR DL NEURO) und Algorithmen von Craig H. Meyer, University of Virginia, und Samuel William Fielden, University of Virginia. Die Sequenz wurde im Rahmen eines früheren Forschungsprojekts an der Sektion für Experimentelle Radiologie in Tübingen modifiziert (48). In Tabelle 1 sind die verwendeten Sequenzparameter angegeben.

Unter Berücksichtigung eines ausgewählten Volumenareals wurden Daten zum Abfall der Signalintensität in Abhängigkeit von der Echozeit aufgenommen. Die Werte der einzelnen Messpunkte wurden am Magnetresonanztomographen ermittelt und mit Matlab R2019b (MathWorks, Natick, MA, USA) und Microsoft Excel 2016 ausgewertet.

Tabelle 1: Sequenzparameter der verwendeten UTE-Sequenz

Aufnahmeparameter	Einstellung
$T_R$	22 ms
$T_E$	0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; ...; 17,75 ms
Matrix	128 x 128
Flipwinkel	5°
Schichtdicke	1 mm bzw. 2 mm
Mittlungen	1

#### 4.1.3 Spektroskopie-Sequenzen

Darüber hinaus wurde mit den Proben und Prüfkörpern eine Magnetresonanzspektroskopie durchgeführt. Die angewendete Technik war in der Regel eine STEAM-Single-Voxel-Spektroskopie mit unterschiedlichen Voxelgrößen. Das MRS-Paket wurde entwickelt von Edward J. Auerbach und Malgorzata Marjanska und zur Verfügung gestellt durch die University of Minnesota unter C2P-Einverständnis. In Tabelle 2 sind die Messparameter der verwendeten STEAM-Sequenz aufgeführt.

Die Echozeit  $T_E$ , die Repetitionszeit  $T_R$  und die Anzahl der Mittlungen wurden zwischen den verschiedenen Messungen teilweise verändert. Diese Aufnahmeparameter sind bei den einzelnen STEAM-Spektren der vorliegenden Arbeit jeweils angegeben. Die STEAM-Spektren wurden teilweise mit Wassersättigung aufgenommen. Auch dies ist jeweils mit angegeben.

Tabelle 2: Sequenzparameter der verwendeten STEAM-Sequenz

<b>Aufnahmeparameter</b>	<b>Einstellung</b>
<b>T<sub>R</sub></b>	1500; 2000 ms
<b>T<sub>E</sub></b>	5,4; 6; 8; 10; ...; 20; 25; 30; ...; 70; 80; 90; 100 ms
<b>T<sub>M</sub></b>	75 ms
<b>Vektorgroße</b>	1024
<b>Bandbreite</b>	2000 Hz
<b>Akquisitionsdauer</b>	512 ms
<b>Mittlungen</b>	16; 32; 64; 100; 128; 200; 256

Weitere Spektren wurden mittels Free Induction Decay (FID) Spectroscopy aufgenommen. Die Dauer des Hochfrequenzpulses der FID-Spektroskopie betrug 0,10 ms. Das Auslesen der Daten begann 0,15 ms nach dem Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Dauer des HF-Pulses vergangen war. Aus der eingestellten Akquisitionsdauer von 1024 ms und der Vektorgroße von 2048 ergibt sich eine Dwell Time von 0,25 ms. Der Zeitabstand zwischen der Aufnahme von zwei Messpunkten lag also bei 0,25 ms. Auch die FID-Spektroskopie erfolgte teilweise mit Wassersättigung.

Die Rohdaten der Spektroskopie-Messungen wurden jeweils mithilfe der Software jMRUI v5.2 ausgewertet. Wie in Kapitel 3.6.3 genauer beschrieben, wurde der FID mit der Methode der Fourier-Transformation in Frequenz und Amplitude umgerechnet. Mittels Phasenkorrektur wurde anschließend der Realteil mit den Absorptionslinien im Spektrum zur Darstellung gebracht.

## 4.2 Prüfkörper

### 4.2.1 Messzylinder

Für die verwendeten Proben kamen Polypropylen-Röhrchen der Firma Greiner mit einem Volumen von 50 ml zur Anwendung. Die Röhrchen, wie in Abbildung 10 gezeigt, haben eine zylindrische Form mit einem konischen Boden. Ihr Durchmesser beträgt 30 mm, die Höhe liegt insgesamt bei 115 mm.



Abbildung 10: Leeres 50-ml-Polypropylen-Röhrchen

### 4.2.2 Kollagenpulver

Für die Prüfkörper wurde gewerblich erhältliches Kollagenpulver, das Kollagen Typ I und Typ III enthält, verwendet. Dabei handelte es sich um NeoCell Super Collagen Type I and III Powder der Firma NeoCell, Irvine, CA, USA. Ein Hydrolysat wurde hergestellt, indem das Kollagenpulver in Wasser ( $H_2O$ ) beziehungsweise Deuteriumoxid ( $D_2O$ ) gelöst wurde. Das verwendete  $D_2O$  hatte eine Reinheit von 99,9 %. Es wurden 50%ige und 25%ige und Lösungen in  $H_2O$  und eine 50%ige Lösung in  $D_2O$  hergestellt. Die Prozentwerte für die Lösungen sind in Massenprozent angegeben. Für eine 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser wurde beispielsweise die gleiche Masse an Wasser und Kollagenpulver verwendet. Für die FID-Spektroskopie wurden die Proben in handelsüblichen



Tischtennisbällen gemessen. Um die Eigenschaften von Kollagenhydrolysat in der Spektroskopie zu untersuchen, wurden weitere Lösungen von Kollagenpulver in Wasser mit Konzentrationen zwischen 2 % und 50 % hergestellt. Die Konzentrationen waren im Einzelnen 2,00 %, 4,01 %, 5,99 %, 8,04 %, 9,09 %, 16,68 %, 28,56 %, 37,50 %, 44,44 % und 50,00 %.

### **4.2.3 Gelatine**

Für weitere Messungen wurde Gelatine hergestellt, indem Gelatine in Kristallform von der Firma Carl Roth GmbH & Co. in warmem destilliertem Wasser aufgelöst wurde. Es handelte sich um Gelatine mit einer angegebenen Gallertfestigkeit zwischen 150 und 170 Bloom und einem Eiweißanteil von 83 % bis 91 %. Die Gelatine wurde aus Schweineschwarten hergestellt. In erwärmtem Wasser wurden 25 % Gelatinepulver gelöst. Die Lösungen wurden anschließend gekühlt, so dass ein gallertiges Produkt entstand.

### **4.2.4 Sehne und Skelettmuskulatur**

Darüber hinaus wurden Messungen an Sehnen und Muskeln vom Rind durchgeführt. Bei den Messobjekten handelte es sich um Ansatzsehnen der Oberschenkelmuskulatur, die in Verbindung mit einem Teil des Muskels vorlagen. Die Sehnen wurden vom Städtischen Schlachthof Balingen zur Verfügung gestellt. Aus Muskel-Sehnen-Präparaten vom Oberschenkel, die aus mehreren Muskeln mit Ansatzsehne bestanden, wurden Muskeln mit der zugehörigen Sehne herauspräpariert. Es erfolgte die Entfernung von peritendinösem und perimuskulärem Fettgewebe. Für die Messungen wurde unter anderem ein Sehnenpräparat, welches auch den Muskel-Sehnen-Übergang enthielt, vorbereitet. Ein weiteres Präparat mit Muskelgewebe wurde ebenfalls zurechtgeschnitten, nachdem die Muskelfaszie entfernt wurde. Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 11 eine Sehne, an der Messungen durchgeführt wurden, dargestellt. Das Muskelpräparat

ist in Abbildung 12 zu sehen. Die Messobjekte wurden in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung in Polypropylen-Röhrchen gemessen.



Abbildung 11: Sehnenpräparat



Abbildung 12: Muskelpräparat

Für weitere Messungen wurde Sehngewebe zerkleinert. Zuerst wurde das Material von zwei Sehnen mit einem Skalpell in Würfel mit etwa 3 bis 5 mm Kantenlänge geschnitten und anschließend bei  $-25\text{ °C}$  eingefroren. Die eigentliche Zerkleinerung erfolgte mit einer Schneidmühle in einem Labor der Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie an der Universität Tübingen. Die kleine Schneidmühle ist in Abbildung 13 dargestellt. Sie wurde an ein Kühlthermostat mit der Solltemperatur  $-25\text{ °C}$  angeschlossen, um das Sehngewebe im gefrorenen und damit festen Zustand schneiden zu können. Dieser Prozess wurde mit jedem der kleinen Würfel einzeln durchlaufen. Das Ergebnis waren Stücke von zerkleinertem Sehnenmaterial, deren Durchmesser ungefähr  $0,25\text{ mm}$  betrug. Abbildung 14 zeigt einen Teil des zerkleinerten Gewebes.



Abbildung 13: Schneidmühle



Abbildung 14: Zerkleinertes Sehngewebe

Insgesamt ergaben sich drei solche kleinen Röhrchen mit zerkleinertem Sehngewebe. Um Messungen durchführen zu können, wurde der Inhalt jedes Röhrchens in ein 50-ml-Polypropylen-Röhrchen umgefüllt und es wurden jeweils 15 ml der Pufferlösung „Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline, with calcium und

magnesium chloride“ (DPBS) hinzugegeben. In Abbildung 15 sind zwei der entstandenen Proben zu sehen.



Abbildung 15: Zerkleinertes Sehngewebe mit Pufferlösung

Nach der Messung der Präparate wurden zu zwei der drei Präparate jeweils 20 mg Collagenase B, aufgelöst in 5 ml DPBS, hinzugegeben. Ein Präparat diente als Kontrollpräparat und es wurden 5 ml DPBS hinzugefügt. Im Anschluss wurden die drei Polypropylen-Röhrchen gemäß den Herstellerangaben für das Enzym Collagenase B für 24 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach einer Ruhephase von weiteren 24 Stunden bei Kühlschranktemperatur wurden die Präparate einer weiteren Messung unterzogen.

Eines der drei Präparate wurde nach Zugabe von weiteren 10 mg Collagenase B für weitere 56 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis keine festen Bestandteile mehr zu sehen waren. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der vollständigen enzymatischen Verdauung.

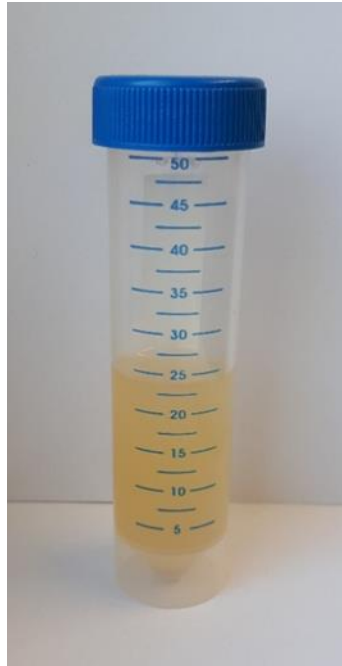


Abbildung 16: Enzymatisch abgebautes Sehngewebe in flüssiger Form

#### 4.2.5 Enzymatische Behandlung

Mit einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser, einer 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser und einer Rindersehne wurden Messungen durchgeführt, nachdem sie mit einem Enzym behandelt worden waren. Das verwendete Produkt heißt Kollagenase B und wird aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* gewonnen. Es wurde bei Sigma Aldrich bestellt und hat eine hohe Kollagenase-Aktivität. Kollagenase ist eine Protease mit einer hohen Spezifität für kollagenspezifische Aminosäureabfolgen und wird auch als Clostridiopeptidase A bezeichnet. In der Sequenz Pro-X-Gly-Pro, die hauptsächlich in Kollagen vorkommt, spaltet das Enzym Kollagenase die Peptidbindung an der Stelle Pro-X. Bei X handelt es sich häufig um eine neutrale Aminosäure. Die Sequenz Pro-X-Gly-Pro kommt mit einer hohen Frequenz in Kollagen vor, jedoch selten in anderen Proteinen. Das Enzym Kollagenase kann Kollagenfibrillen, die eine trihelikale Struktur aufweisen und in Bindegewebe vorkommen, abbauen. Die Funktionsweise des Enzyms ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

Das verwendete Produkt Collagenase B enthält neben der Kollagenase weitere Enzyme: Es besitzt ebenfalls eine gewisse Clostripain-Aktivität. Clostripain ist eine Protease und spaltet Proteine an der Carboxyl-Bindung von Arginin. Außerdem enthält Collagenase B eine Trypsin-ähnliche Protease und eine neutrale Protease. Diese Enzyme, die bei der Herstellung zur eigentlichen Kollagenase hinzugefügt werden, bewirken, dass auch andere Proteine als Kollagen abgebaut werden können.

Collagenase B liegt in gefriergetrockneter Form vor. Das Enzym muss für die Anwendung in einer Pufferlösung aufgelöst und anschließend bei 37 °C inkubiert werden. Als Pufferlösung wurde Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) mit Calciumchlorid und Magnesiumchlorid verwendet. Bei den Proben, bei denen eine enzymatische Verdauung erfolgte, war die Konzentration des Enzyms Collagenase B in der Pufferlösung in der Regel 1,0 mg/ml.

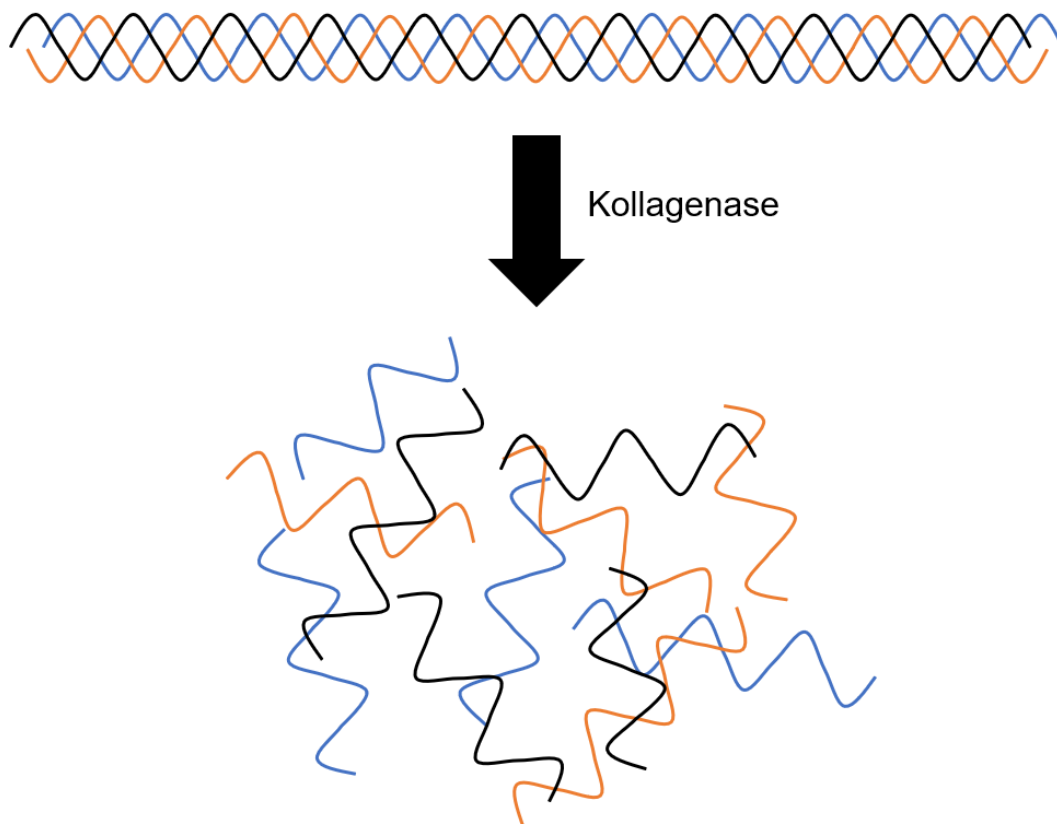


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Auflösung der Kollagen-Tripelhelix durch das Enzym Kollagenase

## 5 Ergebnisse

### 5.1 UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Kollagenhydrolysat

#### 5.1.1 Lösung von Kollagenpulver in Wasser

Der Abfall der Signalintensität mit zunehmender Echozeit  $T_E$  wurde für eine 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit der beschriebenen UTE-Sequenz gemessen. Die Schichtdicke betrug 1 mm und es kam die Kniespule zur Anwendung.

In Abbildung 18 ist die Signalintensität in Abhängigkeit von der Echozeit dargestellt. Die Amplitude des Signals variiert mit einer Periodendauer von etwa 2 ms. Innerhalb der ersten 3 ms wird die Amplitude der Signalvariation deutlich kleiner. Danach ist keine starke Veränderung der Amplitude mehr zu beobachten. Zum Zeitpunkt 9 ms findet einmalig ein etwa 2 ms andauernder Abfall der Signalintensität statt. Im Anschluss wird das Muster mit einer Periodendauer von etwa 2 ms fortgesetzt. Das beschriebene charakteristische Muster weist eine komplizierte irreguläre Zeitabhängigkeit auf, welche durch die Überlagerung mehrerer Frequenzkomponenten zustande kommt.

Für eine 25%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser wurde der Abfall der Signalintensität ebenfalls mit der beschriebenen UTE-Sequenz untersucht. Die Messbedingungen waren identisch mit denen bei der Messung der 50%igen Lösung. Es wurde wieder die Kniespule verwendet. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Qualitativ konnten dieselben Charakteristika wie beim Signalabfall der 50%igen Lösung identifiziert werden. Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ist bei der niedrigeren Konzentration jedoch schlechter.

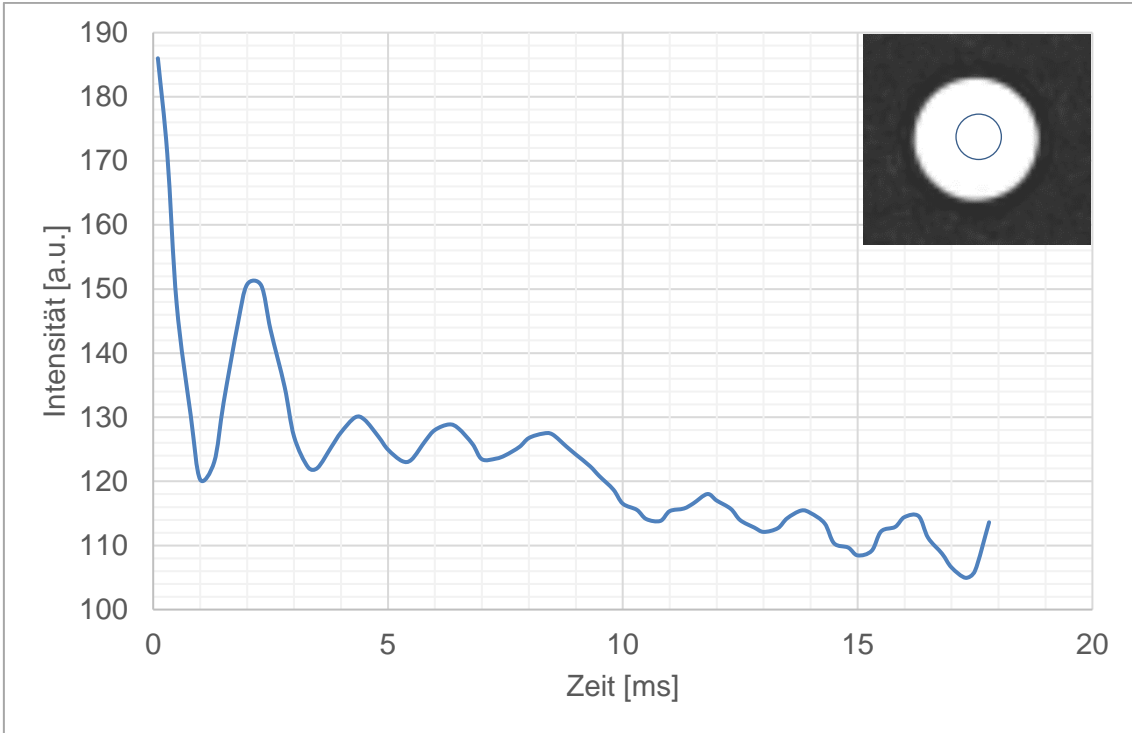


Abbildung 18: Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit Lokalisation der ROI

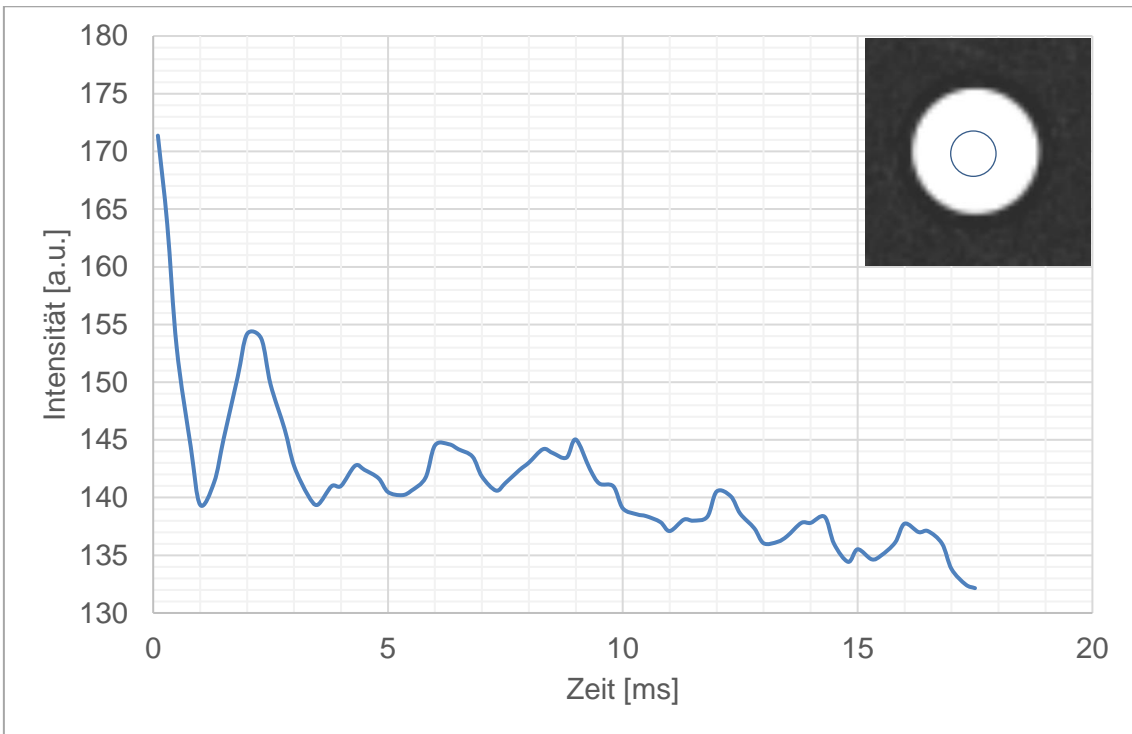


Abbildung 19: Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 25%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit Lokalisation der ROI



Die Abbildungen 18 und 19 zeigen jeweils eine abfallende Signalintensitätskurve mit scheinbar periodischen Anteilen. Mithilfe von Matlab 2019b wurde der Versuch unternommen, den Verlauf der Signalintensität für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit folgender Gleichung zu beschreiben:

$$S(T_E) = S_{0,s} \cdot \cos(2\pi f_s \cdot T_E) \cdot e^{-\frac{T_E}{T_{2,s}^*}} + S_{0,l} \cdot e^{-\frac{T_E}{T_{2,l}^*}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Das Signal wird durch eine schnell abfallende exponentielle Komponente, die periodisch oszilliert, und eine langsam abfallende exponentielle Komponente beschrieben. Anhand der ermittelten Parameter wurde der Anteil der beiden Signalkomponenten berechnet:

$$Fraction_s = \frac{S_{0,s}}{S_{0,s} + S_{0,l}} \cdot 100 \% \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$Fraction_l = \frac{S_{0,l}}{S_{0,s} + S_{0,l}} \cdot 100 \% \quad (\text{Gleichung 3})$$

Die Kurvenanpassung ist in Abbildung 20 graphisch dargestellt. Es ergaben sich mit  $R^2 = 0,9312$  die in Tabelle 3 aufgeführten Werte. Abbildung 20 zeigt, dass Gleichung 1 den tatsächlichen Abfall der Signalintensität nur näherungsweise beschreibt. Für die ersten 3 ms konnte der Verlauf der Signalintensität mit einer hohen Genauigkeit modelliert werden. Ab dem Zeitpunkt 6 ms berücksichtigt die Ausgleichskurve die Oszillation nicht mehr ausreichend. Gleichung 1 geht davon aus, dass die Amplitude der Oszillation exponentiell mit der Zeit abfällt. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Amplitude ab dem Zeitpunkt 3 ms relativ konstant bleibt. Ebenso kann die Gleichung die Beobachtung, dass die Signalintensität nach 9 ms einmalig abfällt und die Oszillation für einen kurzen Zeitraum unterbrochen wird, nicht modellieren. Es treten also mehrere Signalkomponenten mit verschiedenen Frequenzen auf, die zum Gesamtsignal beitragen.

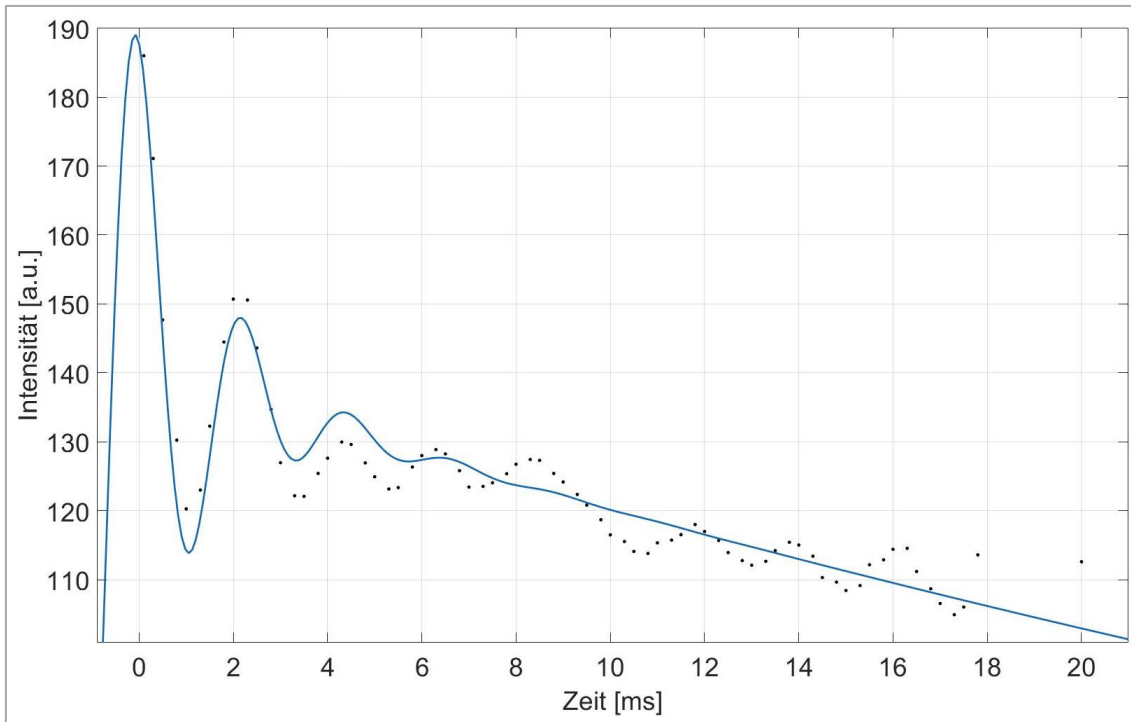


Abbildung 20: Kurvenanpassung der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O

Tabelle 3: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O

Parameter	95%-Konfidenzintervall
$T_{2,s}^* = 1,628 \text{ ms}$	1,322 ms; 2,120 ms
$f_s = 445,2 \text{ Hz}$	426,4 Hz; 462,3 Hz
$Fraction_s = 25,20 \%$	22,00 %; 28,21 %
$T_{2,l}^* = 64,39 \text{ ms}$	59,21 ms; 70,62 ms
$Fraction_l = 74,80 \%$	71,79 %; 78,00 %

Mit der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser wurde eine sogenannte „pulse-acquire“ MR-Spektroskopie ohne Volumenselektivität durchgeführt. Dabei

kam die 64-Kanal-Sende-Empfangs-Kopfspule zur Anwendung. Die Spektroskopie erfolgte über eine Bandbreite von 2000 Hz mit einer Transmitterfrequenz von circa 123,3 MHz. Die Abtastzeit betrug 0,5 ms. In Abbildung 21 ist das Spektrum einer Free Induction Decay (FID) Spectroscopy mit Wassersättigung zu sehen. Die Hauptsignalkomponenten des Kollagens treten in drei Frequenzbereichen auf. Diese liegen bei ungefähr 0,8 ppm, 1,3 ppm und 1,8 ppm. Das abgebildete Spektrum wurde mit Wassersättigung aufgenommen und weist zudem kleinere Signalanteile bei 6,8 ppm, 7,2 ppm und 8,6 ppm auf. Die beschriebenen Signalkomponenten sind in Abbildung 21 nummeriert.

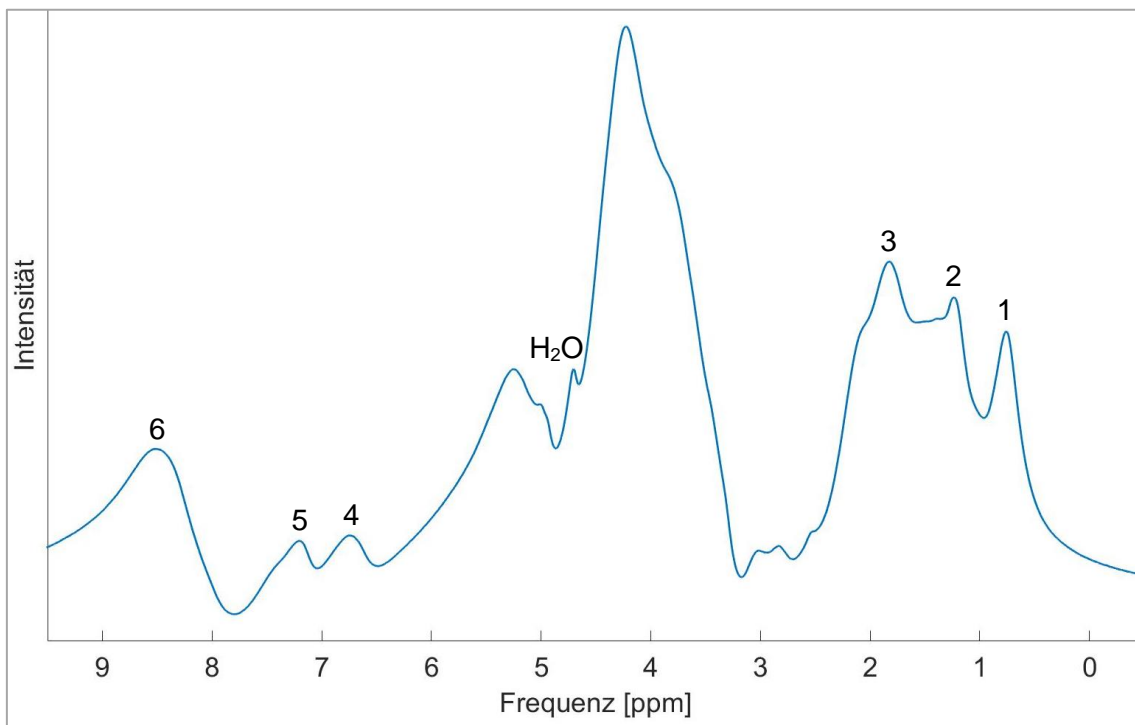


Abbildung 21: FID-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser (mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Unter Berücksichtigung der Transmitterfrequenz von etwa 123,26 MHz ergeben sich für die einzelnen Signalkomponenten des FID-Spektrums die in Tabelle 4

aufgeführten chemischen Verschiebungen zu Wasser. Die Werte für 0,8 ppm, 1,2 ppm und 1,8 ppm liegen in demselben Bereich wie die berechnete Oszillationsfrequenz für das absolute Signal in der UTE-Bildgebung. Diese betrug circa 445,2 Hz. Die Signalkomponenten im Frequenzbereich von 0,8 ppm bis 1,8 ppm tragen einen größeren Anteil zum Magnitudensignal der UTE-Bildgebung bei als die Signalbereiche zwischen 6,7 ppm und 8,5 ppm. Das ist der Fall, weil die Fläche unter der Kurve zwischen 0,8 ppm und 1,8 ppm größer ist als im Bereich von 6,7 ppm bis 8,5 ppm.

Tabelle 4: Chemische Verschiebungen der Signalkomponenten der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser im FID-Spektrum

<b>Chemische Verschiebung zu TMS</b>	<b>Chemische Verschiebung zu H<sub>2</sub>O</b>
<b>0,8 ppm</b>	480,7 Hz
<b>1,2 ppm</b>	431,4 Hz
<b>1,8 ppm</b>	357,5 Hz
<b>6,7 ppm</b>	246,5 Hz
<b>7,2 ppm</b>	308,2 Hz
<b>8,5 ppm</b>	468,4 Hz

Abbildung 22 zeigt das STEAM-Spektrum der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser, das mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, Wassersättigung, 16 Mittlungen und einer Voxelgröße von 10 x 10 x 20 mm aufgenommen wurde. Es sind vier charakteristische Signalbereiche bei 0,8 ppm, 1,3 ppm, 1,9 ppm und 2,2 ppm zu erkennen. Weitere Signalbereiche liegen bei 2,7 ppm, 2,9 ppm und 3,7 ppm. Außerdem sieht man Signalbereiche bei 6,6 ppm, 7,15 ppm und 8,1 ppm. Sechs charakteristische Signalbereiche sind in Abbildung 22 durchnummeriert, um ein besseres Verständnis der im Folgenden bestimmten  $T_2$ -Werte dieser Signalbereiche zu vermitteln.

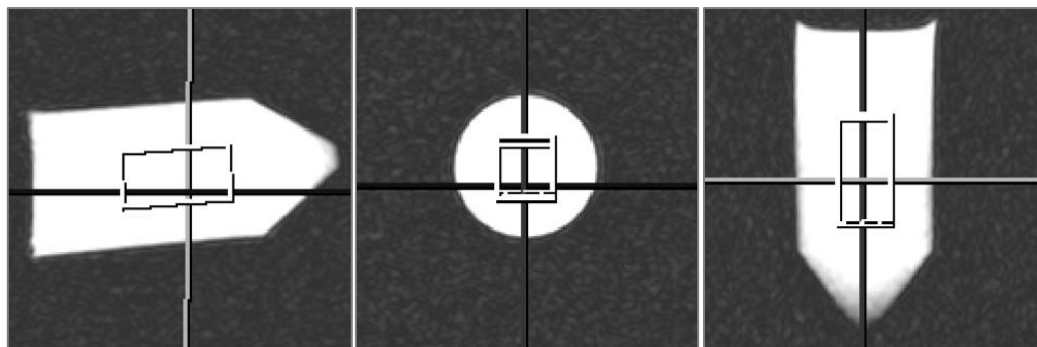
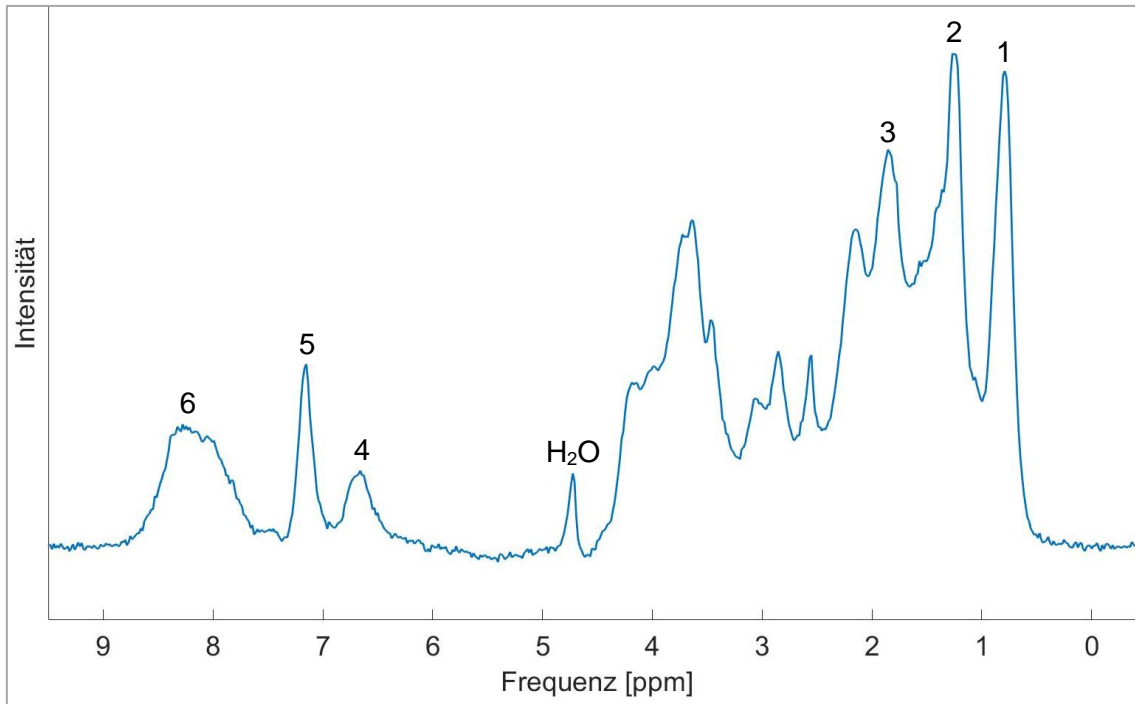


Abbildung 22: STEAM-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser wurden weitere STEAM-Spektren mit einer unterschiedlichen Anzahl an Aquisitionen aufgenommen. Die Messparameter waren  $T_R = 1500$  ms,  $T_E = 5,4$  ms und  $10 \times 10 \times 20$  mm Voxelgröße. Die Spektroskopie wurde mit Wassersättigung durchgeführt und für die Anzahl der Mittlungen galt  $n = 1; 4; 16; 64; 256$ . Für die in Abbildung 22 beschrifteten sechs Signalbereiche wurde in jedem Spektrum das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt. Die Berechnung erfolgte, indem jeweils die

maximale Signalintensität über der Baseline durch die Standardabweichung des Rauschens dividiert wurde. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 5: Signal-Rausch-Verhältnis der Signalbereiche der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser in STEAM-Spektren mit unterschiedlicher Anzahl an Mittlungen ( $T_E = 5,4$  ms)

<b>Anzahl Mittlungen</b>	<b>SNR 0,8 ppm</b>	<b>SNR 1,3 ppm</b>	<b>SNR 1,8 ppm</b>	<b>SNR 6,6 ppm</b>	<b>SNR 7,1 ppm</b>	<b>SNR 8,1 ppm</b>
<b>n = 1</b>	21,6	21,4	16,4	3,2	6,9	5,2
<b>n = 4</b>	52,1	50,4	36,6	7,0	14,7	11,3
<b>n = 16</b>	100,3	102,4	75,2	12,8	33,9	23,1
<b>n = 64</b>	168,4	170,1	124,5	18,0	50,3	35,3
<b>n = 256</b>	279,3	280,0	205,5	31,7	83,2	58,8

### 5.1.2 Lösung von Kollagenpulver in Deuteriumoxid

Mit der Kopfspule wurde der Abfall der Signalintensität für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in  $D_2O$  gemessen. Dabei kam die beschriebene UTE-Sequenz mit einer Serie variabler Echozeiten bei einer Schichtdicke von 2 mm zur Anwendung. Die in Abbildung 23 dargestellte Kurve weist qualitativ dieselben Charakteristika wie die Kurve für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser auf: Die Signalintensität führt eine Oszillation mit einer Periodendauer von etwa 2 ms durch. Die Amplitude der Oszillation sinkt innerhalb der ersten 3 ms deutlich ab und bleibt anschließend relativ konstant. Zum Zeitpunkt 9 ms sind ein Absinken der Signalintensität und eine kurze Unterbrechung des Oszillationsmusters zu erkennen.

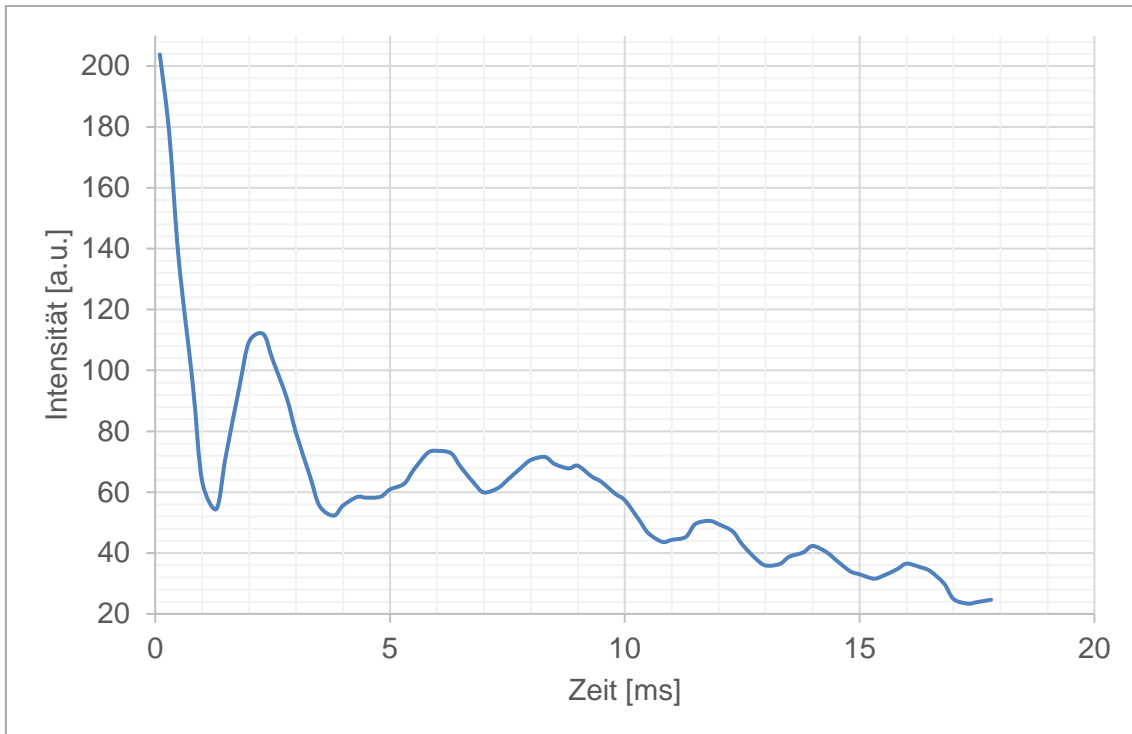


Abbildung 23: Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O

Für das UTE-Magnitudensignal der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O wurden ebenfalls gemäß Gleichung 1 die Parameter nach einem Modell mit zwei Signalkomponenten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgelistet. Hierbei gelten dieselben Limitationen für die Anwendung des Modells wie bei der Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O. Der T<sub>2</sub><sup>\*</sup>-Wert der schnell abfallenden Signalkomponente war um etwa 17 % niedriger als bei der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser. Die Frequenz der Oszillation betrug circa 394,9 Hz und lag damit ungefähr 11 % unter dem Wert für in Wasser gelöstes Kollagenpulver gleicher Konzentration. Der T<sub>2</sub><sup>\*</sup>-Wert der langsam abfallenden Signalkomponente wich um etwa 79 % deutlich nach unten ab. Die Signalfraktion der schnell relaxierenden Komponente war mit circa 51 % für die Lösung in D<sub>2</sub>O etwa doppelt so hoch wie für H<sub>2</sub>O. Diese Ergebnisse kamen zustande, weil D<sub>2</sub>O kaum signalgebende Wasserstoffkerne enthält.

Tabelle 6: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O

<b>Parameter</b>	<b>95%-Konfidenzintervall</b>
$T_{2,s}^* = 1,345 \text{ ms}$	1,057 ms; 1,848 ms
$f = 394,9 \text{ Hz}$	371,0 Hz; 418,7 Hz
$Fraction_s = 51,13 \%$	44,99 %; 56,57 %
$T_{2,l}^* = 13,75 \text{ ms}$	12,38 ms; 15,45 ms
$Fraction_l = 48,87 \%$	43,43 %; 55,01 %

Mit der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O wurde eine FID-Spektroskopie durchgeführt. Diese erfolgte mit der Kopfspule über eine Bandbreite von 2000 Hz mit einer Transmitterfrequenz von circa 123,3 MHz. Die Abtastzeit betrug 0,5 ms. Das FID-Spektrum wurde mit Wasserunterdrückung aufgenommen und ist in Abbildung 24 zu sehen. In diesem Spektrum und in den folgenden Spektren, die in der vorliegenden Arbeit abgebildet sind, ist die senkrechte Achse mit der Intensität der Übersichtlichkeit halber nicht explizit eingezeichnet. Die Signalkomponenten von Kollagen befinden sich bei 0,8 ppm, 1,2 ppm und 1,8 ppm sowie bei 6,7 ppm, 7,2 ppm und 8,4 ppm. Die Signalbereich bei 6,7 ppm und 8,4 ppm weisen eine niedrigere Intensität als bei der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O auf.



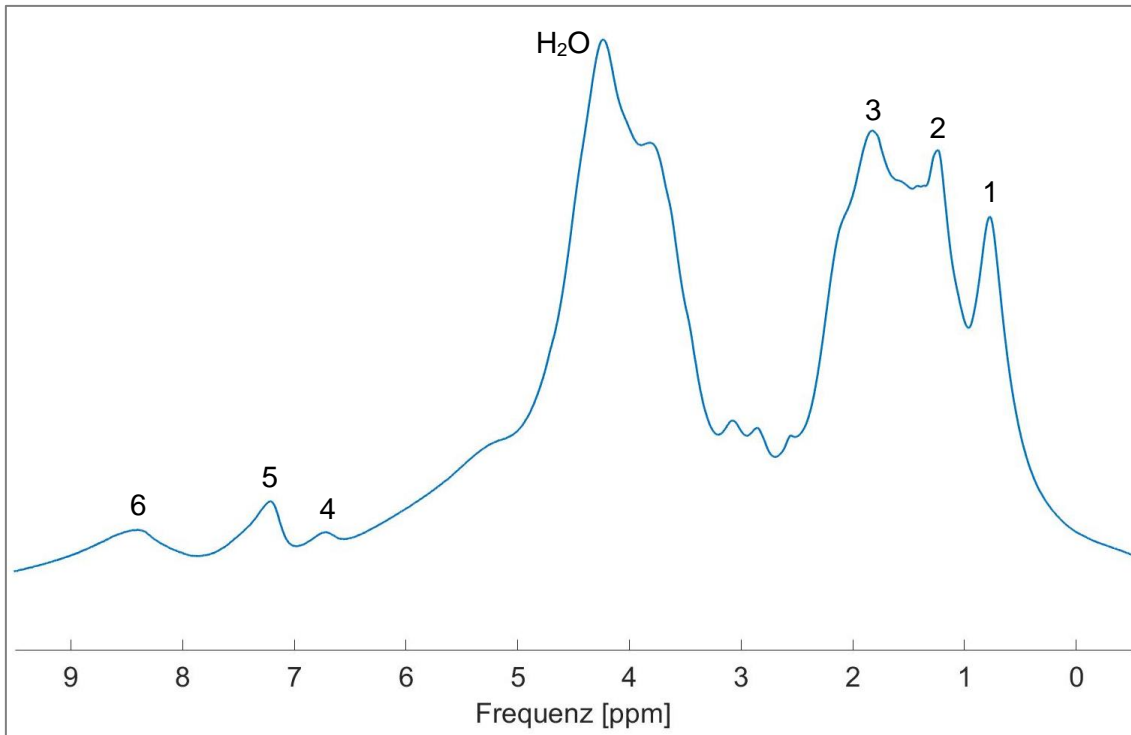


Abbildung 24: FID-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O (mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O wurde eine STEAM-Single-Voxel-Spektroskopie mit den Aufnahmeparametern  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, 100 Mittlungen,  $10 \times 10 \times 10$  mm Voxelgröße und mit Wassersättigung durchgeführt. Das Spektrum ist in Abbildung 25 zu sehen und zeigt ebenfalls die typischen hochintensiven Frequenzbereiche bei 0,8 ppm, 1,3 ppm, 1,9 ppm und 2,2 ppm. Weitere Signalbereiche liegen bei 2,6 ppm, 2,9 ppm und 3,7 ppm. Die Signalbereiche bei 6,7 ppm und 8,1 ppm sind weniger deutlich als bei der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser zu erkennen. Bei 7,2 ppm ist auch bei der Lösung in D<sub>2</sub>O ein Frequenzbereich mit erhöhter Intensität sichtbar. Bei den gleichen Frequenzen wie im Spektrum der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser sind sechs Signalbereiche markiert und durchnummeriert. Abbildung 26 zeigt den Vergleich mit dem STEAM-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit denselben

Messparametern. Bei der Messung war auch die Empfindlichkeit für das Rauschen gleich, so dass die beiden STEAM-Spektren in Abbildung 26 gleich skaliert sind und miteinander verglichen werden können.

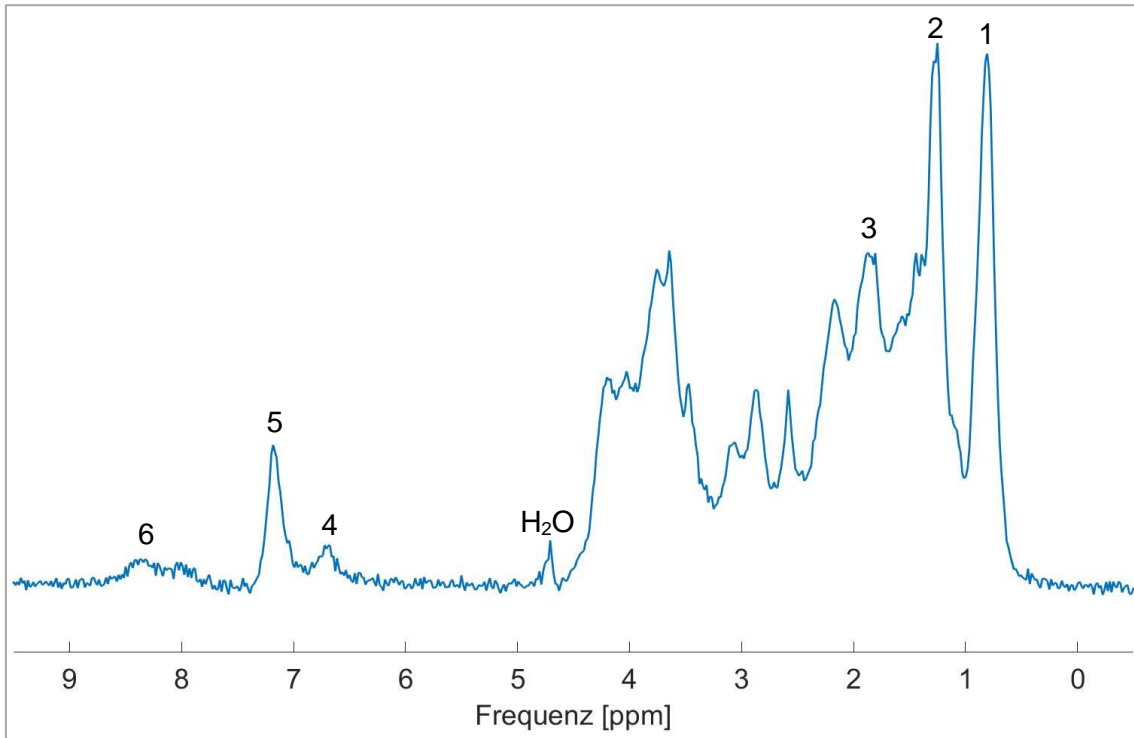


Abbildung 25: STEAM-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O (T<sub>E</sub> = 5,4 ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

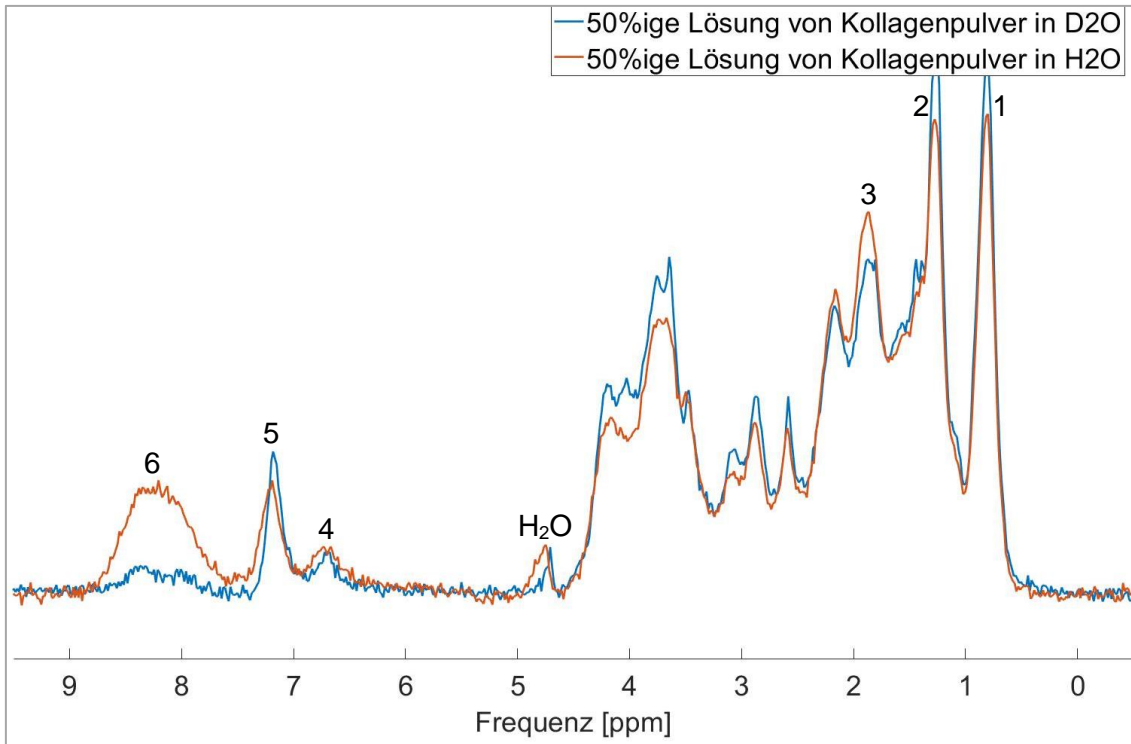


Abbildung 26: STEAM-Spektren 50%iger Lösungen von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Der Oszillationsfrequenz von 394,9 Hz in der UTE-Bildgebung entspricht eine chemische Verschiebung von etwa 1,50 ppm relativ zu TMS in der Spektroskopie. Das ergibt eine gute Übereinstimmung mit den Signalbereichen von 0,8 ppm bis 2,2 ppm im aufgenommenen STEAM-Spektrum von gelöstem Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O, das in Abbildung 25 zu sehen ist. Diese sind mit den Signalbereichen des in Wasser gelösten Kollagenpulvers identisch. Für die Lösung in H<sub>2</sub>O konnte man bei 8,1 ppm eine Signalkomponente erkennen. Diese war in D<sub>2</sub>O weniger deutlich vorhanden, während sich für die Signalbereiche bei 6,7 ppm und 7,2 ppm die Intensität kaum veränderte. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass den Wassermolekülen, die sich den Kollagenmolekülen anlagern, eine chemische Verschiebung von 8,1 ppm zuzuordnen ist. Im Gegensatz dazu müssten die chemischen Verschiebungen zwischen 0,8 ppm und 2,2 ppm, bei 6,7 ppm und 7,2 ppm durch Protonen im Kollagenmolekül selbst oder durch fest gebundene, nicht austauschbare Wassermoleküle entstehen.

### 5.1.3 Eigenschaften der spektralen Komponenten von gelöstem Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O

Für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O wurden Spektren mit unterschiedlichen Echozeiten aufgenommen, um den transversalen Signalabfall der kollagenspezifischen Signale zu untersuchen. Die Single-Voxel-Spektroskopie wurde mit einer STEAM-Sequenz durchgeführt, wobei das Voxel 10 x 10 x 20 mm groß war und die Spektren mit Wassersättigung und mit 100 Mittlungen aufgenommen wurden. Die Serie variabler Echozeiten umfasste Werte zwischen  $T_E = 5,4$  ms und  $T_E = 100$  ms. Die Repetitionszeit  $T_R$  lag bei 1500 ms und für  $T_E = 100$  ms aus messtechnischen Gründen bei 2000 ms.

In den phasenkorrigierten Spektren wurden die maximalen Intensitätswerte der sechs Frequenzbereiche, die in den Abbildungen 22 und 25 markiert sind, in Bezug auf die Baseline gemessen. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die maximale Intensität der Signale in Abhängigkeit von der Echozeit. Die Intensitäten fallen weitgehend stetig ab, wobei die Kurven für die Signale 4, 5 und 6 leichte Oszillationen aufweisen.

Die Probe mit der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O wurde einem identischen Messprozess unterzogen. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen für diese Lösung die maximale Intensität der einzelnen Frequenzbereiche in Bezug auf die Baseline. Qualitativ zeigten sich ähnliche Kurvenverläufe wie für die Lösung in H<sub>2</sub>O. Für beide Proben wurde mithilfe von Matlab eine mono-exponentielle Kurvenanpassung für sämtliche Signale durchgeführt. Für den Signalanteil der 50%igen Lösung in H<sub>2</sub>O bei 0,8 ppm ist die entsprechende Ausgleichskurve exemplarisch in Abbildung 31 gezeigt. Die sich hieraus ergebenden Zeitkonstanten für den transversalen Signalabfall der Signalkomponenten sind in Tabelle 7 aufgelistet.

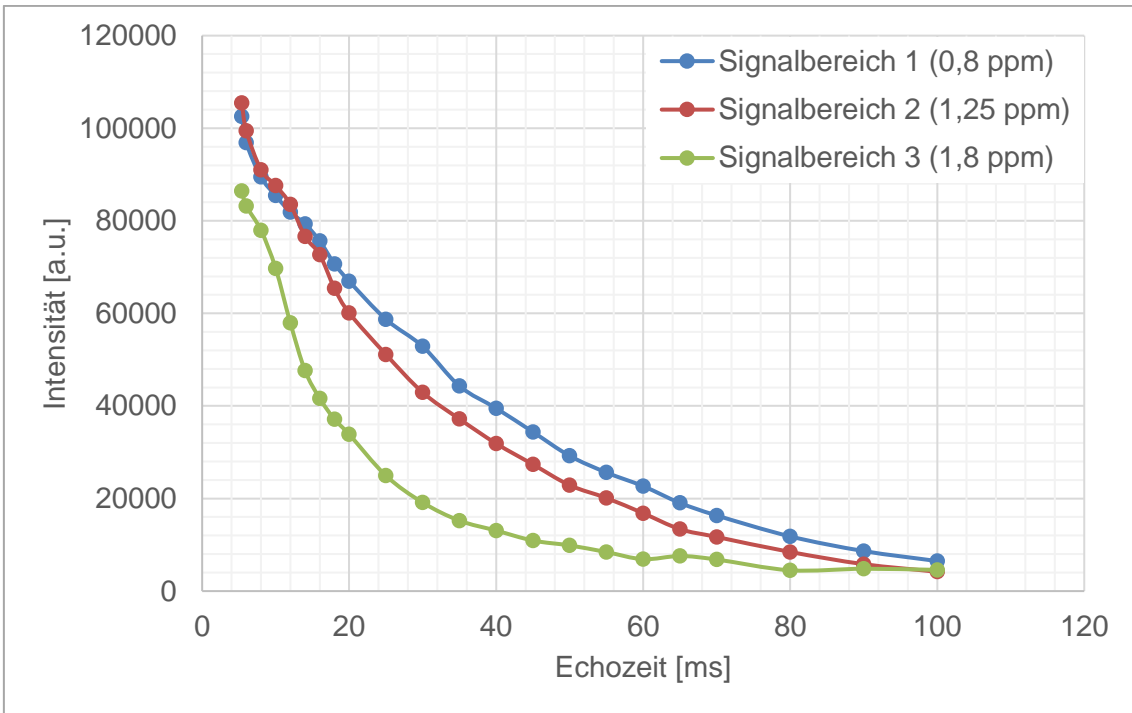


Abbildung 27: Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität der charakteristischen Kollagen-Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O

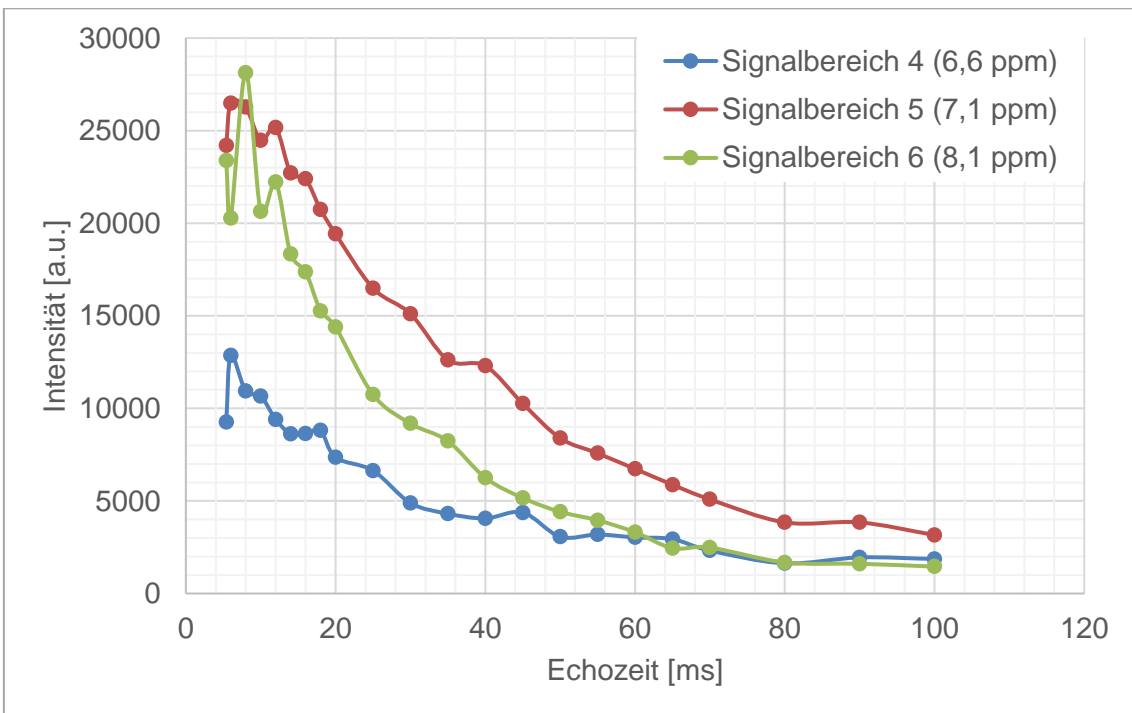


Abbildung 28: Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität weiterer Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O

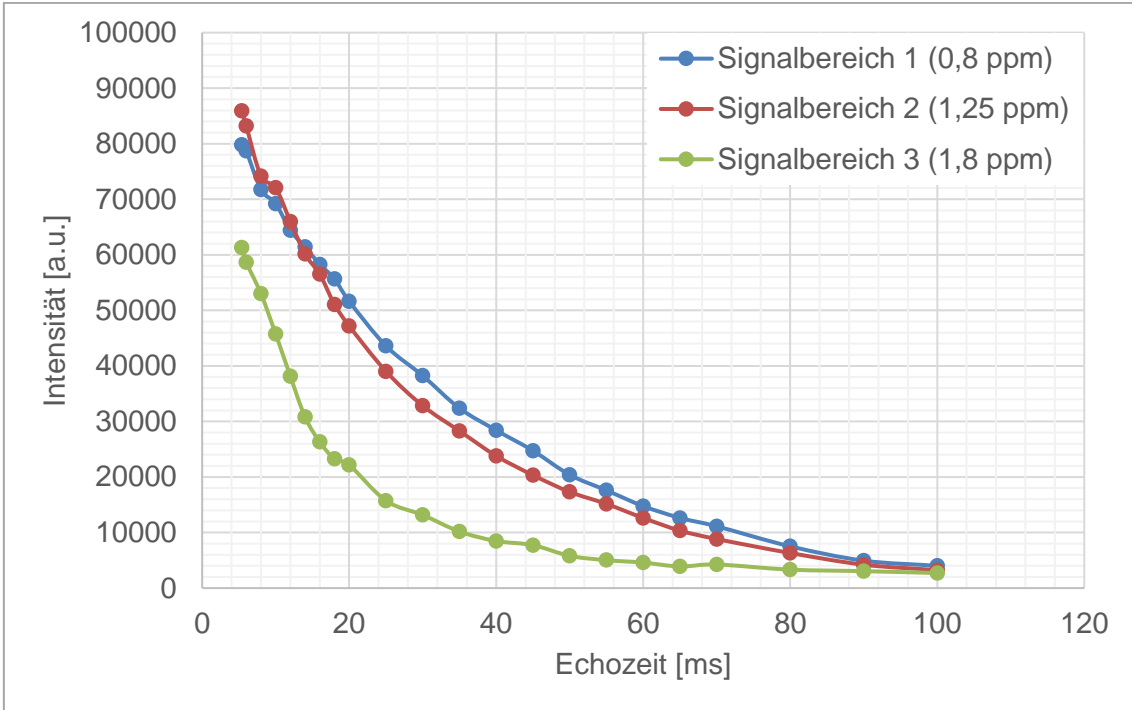


Abbildung 29: Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität der charakteristischen Kollagen-Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O

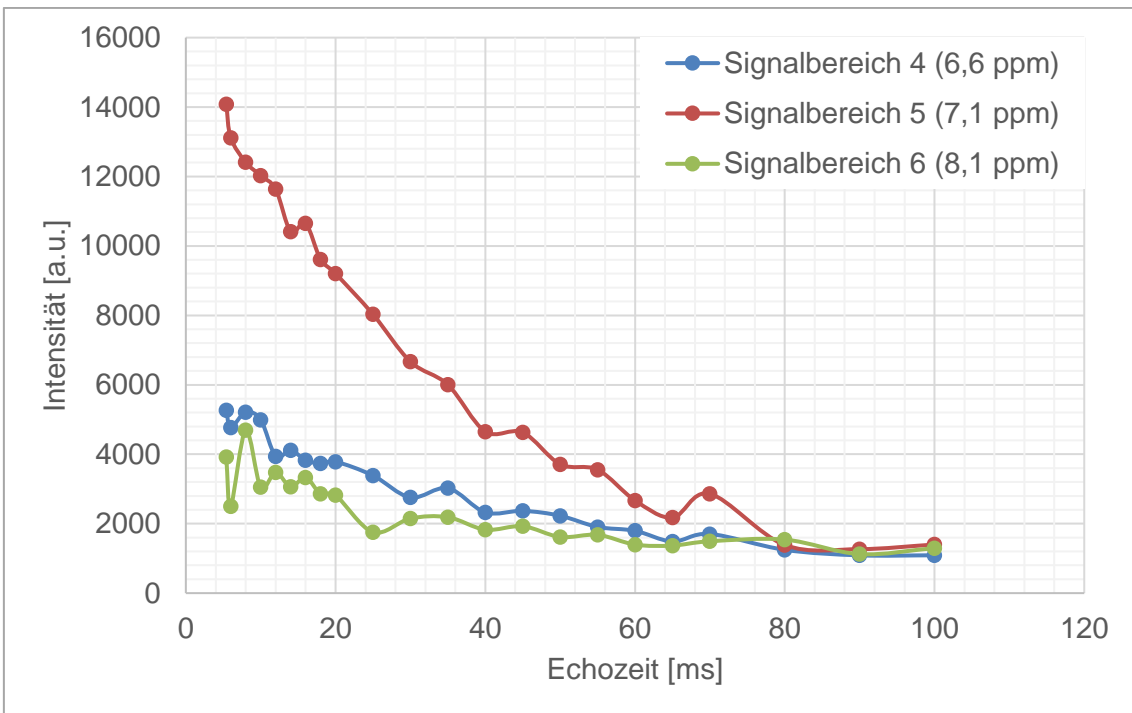


Abbildung 30: Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität weiterer spektraler Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D<sub>2</sub>O

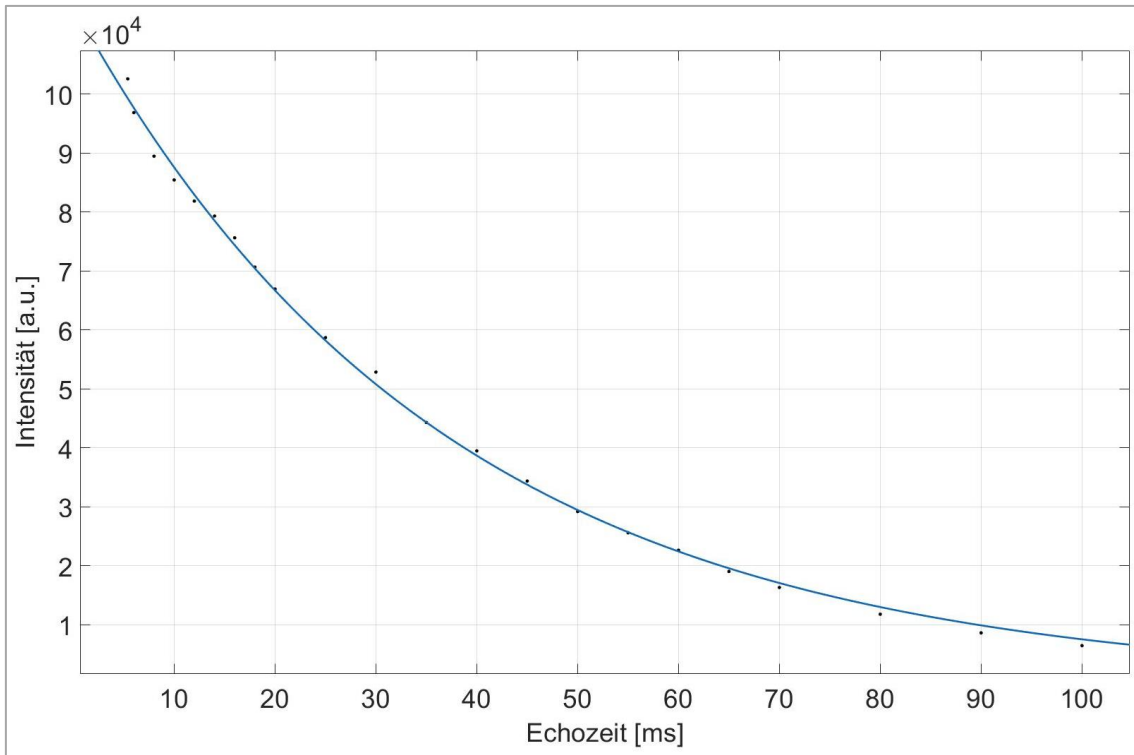


Abbildung 31: Mono-exponentielle Kurvenanpassung für die maximale Intensität des Frequenzbereichs bei 0,8 ppm im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in  $H_2O$

Tabelle 7: Ermittelte Zeitkonstanten  $T_2$  für den transversalen Signalabfall der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum von 50%iger Lösung von Kollagenpulver in  $H_2O$  und  $D_2O$

	<b><math>T_2</math> für Lösung in <math>H_2O</math></b>	<b><math>T_2</math> für Lösung in <math>D_2O</math></b>
<b>Signalbereich 1</b> <b>(0,8 ppm)</b>	36,74 ms (35,66 ms; 37,88 ms)	32,97 ms (32,34 ms; 33,62 ms)
<b>Signalbereich 2</b> <b>(1,25 ppm)</b>	29,33 ms (28,51 ms; 30,19 ms)	27,26 ms (26,36 ms; 28,22 ms)
<b>Signalbereich 3</b> <b>(1,8 ppm)</b>	16,78 ms (15,24 ms; 18,67 ms)	15,20 ms (13,72 ms; 17,04 ms)
<b>Signalbereich 4</b> <b>(6,6 ppm)</b>	38,46 ms (33,42 ms; 45,29 ms)	52,33 ms (47,33 ms; 58,55 ms)
<b>Signalbereich 5</b> <b>(7,1 ppm)</b>	40,67 ms (37,76 ms; 44,05 ms)	35,35 ms (33,65 ms; 37,24 ms)
<b>Signalbereich 6</b> <b>(8,1 ppm)</b>	26,59 ms (22,99 ms; 31,52 ms)	65,88 ms (50,71 ms; 93,90 ms)

Vergleicht man die  $T_2$ -Werte der Signalkomponenten der Lösung von Kollagenpulver in  $H_2O$  in den STEAM-Spektren mit der Lösung in  $D_2O$ , so fällt auf, dass die Werte für die drei charakteristischen Kollagen-Signalbereiche bei 0,8 ppm, 1,25 ppm und 1,8 ppm übereinstimmen. Daher ist davon auszugehen, dass diese Komponenten durch Protonen im Kollagenmolekül selbst erzeugt werden. Ihr Signal scheint unabhängig vom Lösungsmittel gleich schnell abzufallen. Bei 7,1 ppm unterschieden sich die Zeitkonstanten kaum, so dass hier ein vergleichbarer molekularer Ursprung anzunehmen ist. Die spektrale Komponente bei 8,1 ppm war für die Lösung in  $D_2O$  nur mit einer niedrigen Intensität vorhanden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass dieser Signalbereich durch Molekülbereiche erzeugt wird, bei denen ein rascher Austausch von Wasserstoffatomen stattfindet.



Um die Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Kollagen-Konzentration zu untersuchen, wurden mehrere Lösungen von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Kollagenkonzentrationen lagen zwischen 2 % und 50 %. Für jede Konzentration wurden STEAM-Spektren für ein 10 x 10 x 20 mm großes Voxel aufgenommen. Die Spektroskopie erfolgte für die Echozeiten T<sub>E</sub> = 5,4; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100 ms mit T<sub>R</sub> = 1500 ms, mit Wassersättigung und 16 Averages. Für T<sub>E</sub> = 100 ms musste aus messtechnischen Gründen T<sub>R</sub> = 2000 ms gewählt werden.

In sämtlichen phasenkorrigierten Spektren wurde die maximale Intensität der Signalbereiche 1 bis 3 in Bezug auf die Baseline bestimmt. Der Abfall der Intensität in Abhängigkeit von der Echozeit wurde jeweils mit einem mono-exponentiellen Modell angepasst. Daraus ergab sich für jede Konzentration und jeden Frequenzbereich eine Zeitkonstante. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 32. Die zugrundeliegenden Werte sind in Tabelle 8 aufgelistet.

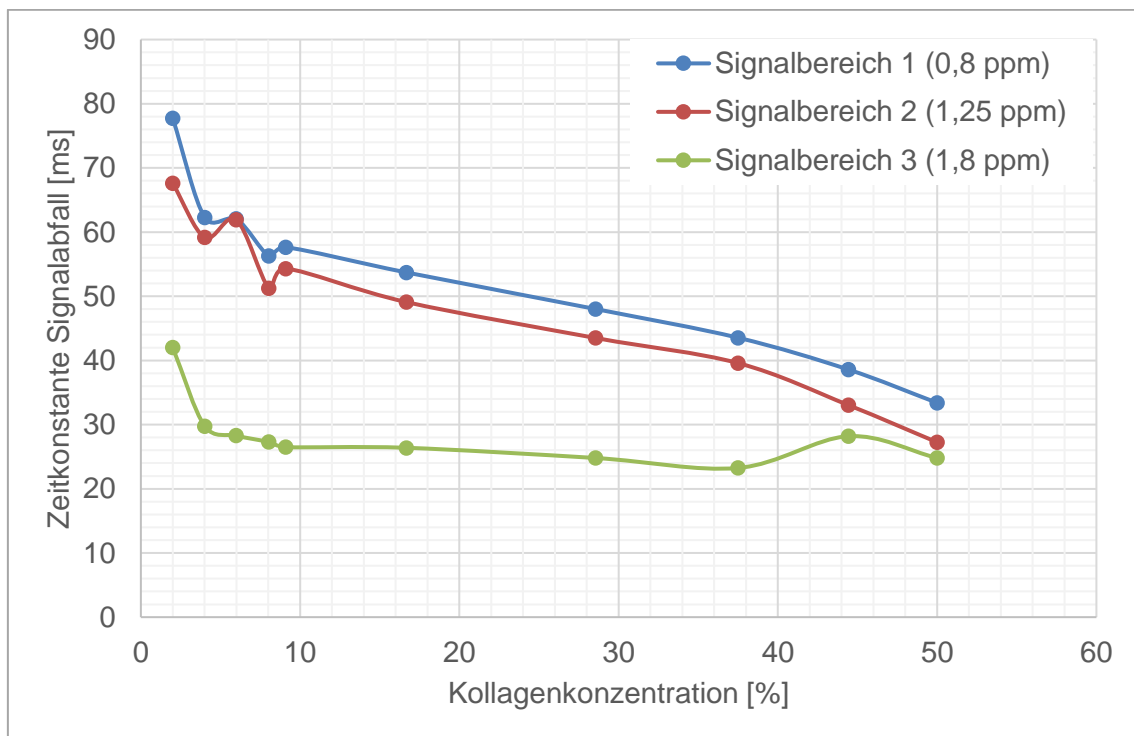


Abbildung 32: Zeitkonstanten T<sub>2</sub> für den Signalabfall der maximalen Intensität der Kollagen-Frequenzbereiche in der STEAM-Spektroskopie für Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O

Tabelle 8: T<sub>2</sub>-Werte für die maximale Intensität der Kollagen-Signalbereiche in der STEAM-Spektroskopie für Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O

<b>Konzentration</b>	<b>Signalbereich 1 (0,8 ppm)</b>	<b>Signalbereich 2 (1,25 ppm)</b>	<b>Signalbereich 3 (1,8 ppm)</b>
<b>2,00 %</b>	77,76 ms	67,61 ms	42,02 ms
<b>4,01 %</b>	62,27 ms	59,17 ms	29,77 ms
<b>5,99 %</b>	62,07 ms	61,92 ms	28,29 ms
<b>8,04 %</b>	56,27 ms	51,28 ms	27,29 ms
<b>9,09 %</b>	57,64 ms	54,32 ms	26,50 ms
<b>16,68 %</b>	53,71 ms	49,09 ms	26,39 ms
<b>28,56 %</b>	48,01 ms	43,50 ms	24,80 ms
<b>37,50 %</b>	43,54 ms	39,59 ms	23,25 ms
<b>44,44 %</b>	38,57 ms	33,03 ms	28,19 ms
<b>50,00 %</b>	33,40 ms	27,25 ms	24,80 ms

Es konnte gezeigt werden, dass der transversale Signalabfall der drei charakteristischen Kollagen-Frequenzbereiche von der Konzentration abhängig ist. Je niedriger die Kollagenkonzentration ist, desto länger sind die T<sub>2</sub>-Werte in der STEAM-Spektroskopie mit verschiedenen Echozeiten.

Die Bestimmung der Zeitkonstanten für den transversalen Signalabfall wurde ebenfalls mit einer 33,33%igen Lösung von Kollagenpulver, die mit Collagenase B enzymatisch behandelt worden war, durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine 33,33%igen Lösung von Kollagenpulver in DPBS untersucht. Die Zeitkonstanten für alle drei Frequenzbereiche waren nach der enzymatischen Behandlung um 13 % bis 15 % höher als für die Kontrollprobe.

Ein weiterer Einflussfaktor, welcher die Relaxation der drei Signalbereiche verlangsamt, ist die Messtemperatur des Kollagenhydrolysats. Eine 33,33%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser wurde auf 37 °C erwärmt und bei dieser Temperatur gemessen. Die Zeitkonstanten lagen um 9 % bis 17 % höher als bei einer Kontrollprobe gleicher Konzentration, die bei Raumtemperatur aufbewahrt und gemessen wurde.

#### **5.1.4 Enzymatisch verdaute Lösung von Kollagenpulver in Wasser**

Es wurde untersucht, wie sich die enzymatische Behandlung einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit Collagenase B auf den Verlauf der Signalintensität auswirkt. Hierzu wurden zwei Proben hergestellt, von denen die Kollagenprobe 1 24 Stunden lang bei 37 °C mit Collagenase B inkubiert wurde. Um Einflüsse durch die Temperatur auszuschließen, wurde die Kollagenprobe 2 ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C gelagert. Anschließend wurde mit der Kopfspule eine Bildgebung mit der beschriebenen UTE-Sequenz durchgeführt. Abbildung 33 zeigt den Verlauf der Signalintensität beider Proben.

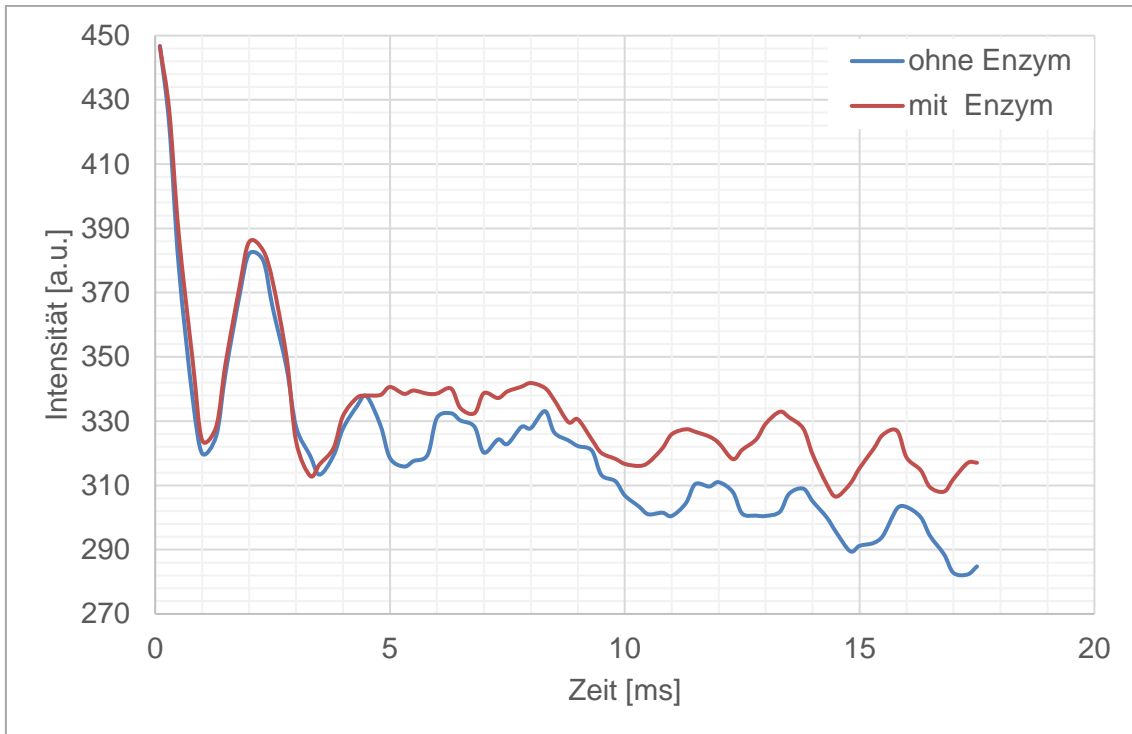


Abbildung 33: Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in DPBS nach der enzymatischen Behandlung und als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Kurvenanpassung nach Gleichung 1 aufgeführt. Diese zeigen im Wesentlichen nur geringfügige Unterschiede. Lediglich die langsam relaxierende Signalkomponente relaxiert bei der enzymatisch behandelten Lösung langsamer als bei der Lösung, die ohne Hinzugabe eines Enzyms erwärmt wurde. Das entsprechende Korrelat in Abbildung 33 ist die höhere Signalintensität der Probe mit Collagenase B ab dem Zeitpunkt  $T_E = 4,5$  ms. In den STEAM-Spektren mit  $T_E = 5,4$  ms zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der enzymatisch behandelten Probe und der Kontrollprobe.

Tabelle 9: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in DPBS nach der enzymatischen Behandlung (Kollagenprobe 1) und als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung (Kollagenprobe 2)

Parameter	Kollagenprobe 1	Kollagenprobe 2
$T_{2,s}^*$	1,803 ms (1,367 ms; 2,648 ms)	1,852 ms (1,481 ms; 2,472 ms)
$f$	436,7 Hz (415,6 Hz; 457,7 Hz)	446,4 Hz (429,9 Hz; 463,0 Hz)
$T_{2,l}^*$	116,5 ms (100,0 ms; 139,7 ms)	74,52 ms (68,07 ms; 82,37 ms)
$Fraction_s$	20,14 % (16,44 %; 23,62 %)	20,35 % (17,56 %; 23,02 %)
$Fraction_l$	79,86 % (76,38 %; 83,56 %)	79,65 % (76,98 %; 82,44 %)
$R^2$	0,8356	0,9273

Die Ergebnisse der UTE-Bildgebung nach der enzymatischen Verdauung der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser unterscheiden sich nicht wesentlich vom Kurvenverlauf und den Signalparametern ohne enzymatische Behandlung. Das verwendete Enzym Collagenase B zerstört Amidbindungen innerhalb der Polypeptidketten der kollagenösen Tripelhelix. Das Kollagenpulver, welches zur Herstellung von Kollagenhydrolysat verwendet wurde, besteht jedoch aus Peptiden, die deutlich kürzer als in organisiertem Kollagen sind. Daher ist davon auszugehen, dass die Kollagenase in Kollagenhydrolysat keinen messbaren Einfluss auf die molekulare Struktur hat beziehungsweise den Organisationsgrad nicht wesentlich beeinflusst. Daher wurden die Signaleigenschaften durch die enzymatische Verdauung kaum verändert.

## 5.2 UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Gelatine

### 5.2.1 Lösung von Gelatinepulver in Wasser

Die 25%ige Lösung von Gelatinepulver in Wasser wurde mit der beschriebenen UTE-Sequenz mit einer Serie variabler Echozeiten untersucht. Die Messungen wurden mit der Kopfspule und mit einer Schichtdicke von 2 mm durchgeführt. Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, sinkt die Signalintensität innerhalb der ersten 5 ms besonders stark ab. Ab diesem Zeitpunkt fällt die Signalintensität deutlich langsamer ab. Sie bleibt teilweise konstant oder steigt leicht an. Aus dem Diagramm geht hervor, dass die Signalintensität mehrere Oszillationen ausführt. Die Amplitude der Oszillationen sinkt mit zunehmender Echozeit ab. Die starken Schwankungen der Intensität entstehen durch die Überlagerung der Signalanteile mit unterschiedlichen Frequenzen.

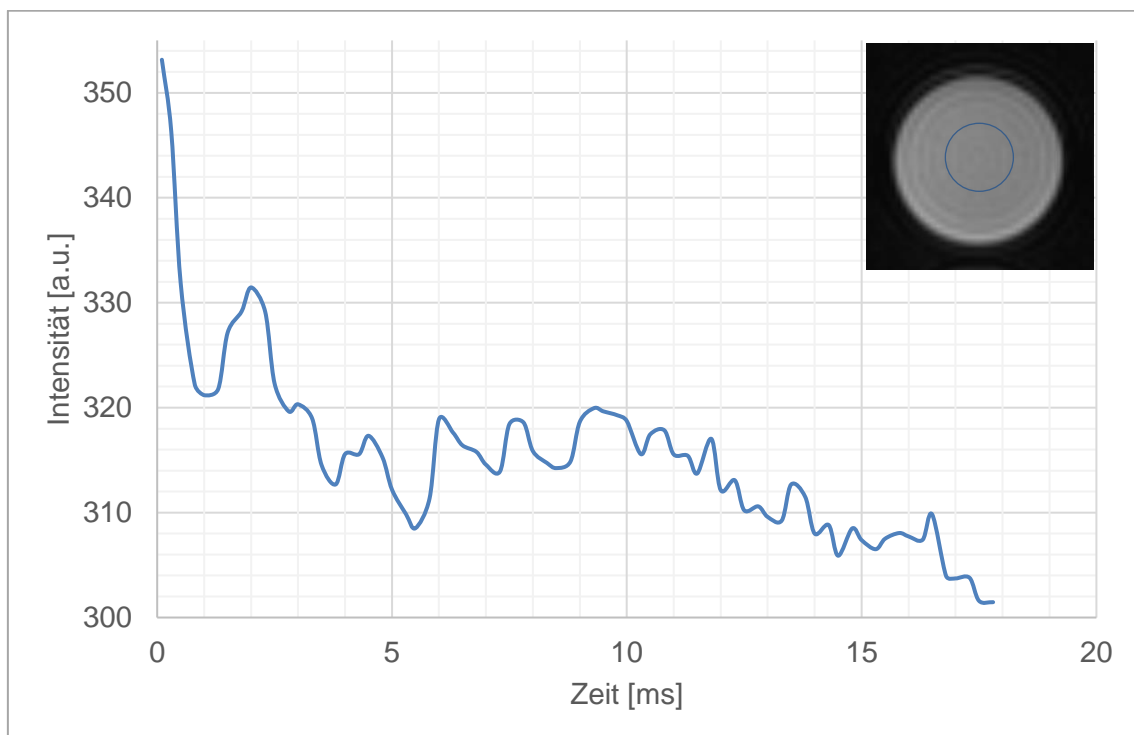


Abbildung 34: Signalintensität von 25%iger Gelatinelösung in einer UTE-Sequenz mit Lokalisation der ROI

Mithilfe von Matlab wurde eine Kurvenanpassung anhand von Gleichung 1 durchgeführt. Diese ergab mit einem Bestimmtheitsfaktor von  $R^2 = 0,7919$  die in Tabelle 10 aufgeführten Signalparameter. Die in Abbildung 35 eingezeichnete Näherungskurve zeigt, dass die mathematische Beschreibung des Signalabfalls ausschließlich die langsame Oszillationskomponente berücksichtigt.

Tabelle 10: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 25%ige Lösung von Gelatinepulver in  $H_2O$

Parameter	95%-Konfidenzintervall
$T_{2,s}^* = 6,297 \text{ ms}$	4,225 ms; 12,37 ms
$f = 97,42 \text{ Hz}$	88,47 Hz; 106,4 Hz
$Fraction_s = 4,01 \%$	2,73 %; 5,26 %
$T_{2,l}^* = 306,2 \text{ ms}$	255,0 ms; 383,3 ms
$Fraction_l = 95,99 \%$	94,74 %; 97,27 %

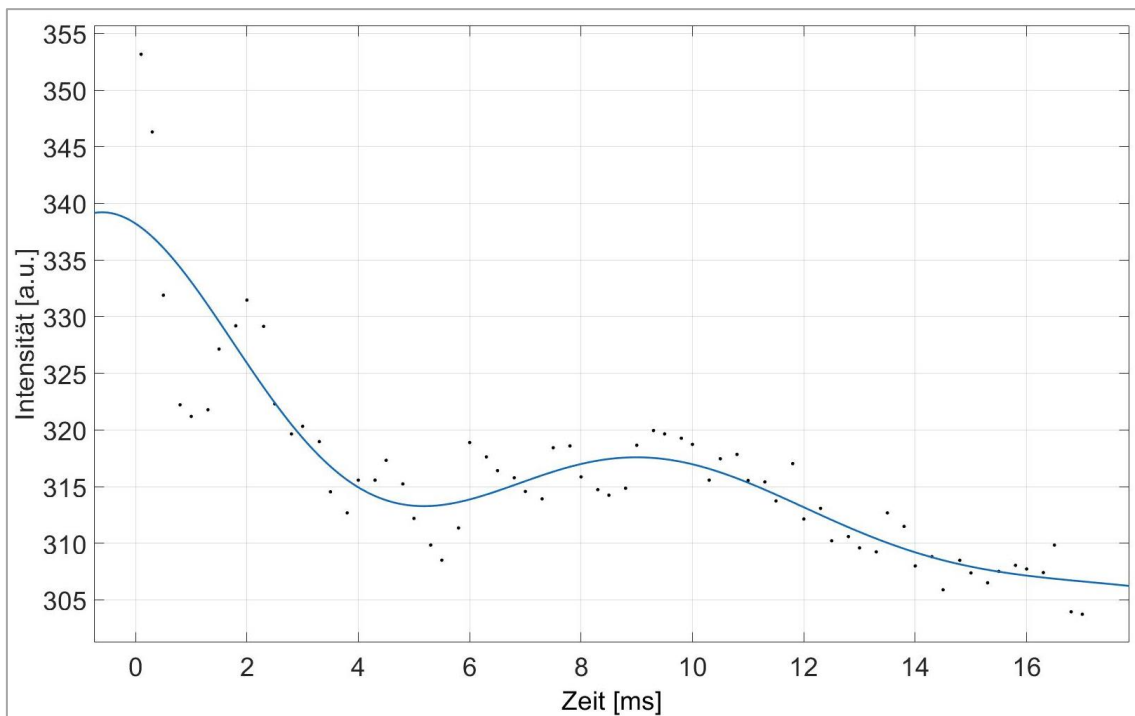


Abbildung 35: Kurvenanpassung der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 25%ige Lösung von Gelatinepulver in  $H_2O$

Die 25%ige Lösung von Gelatinepulver in Wasser wurde auch mittels STEAM-Spektroskopie untersucht. Das STEAM-Spektrum, das in Abbildung 36 dargestellt ist, wurde mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, Wassersättigung, 128 Mittlungen und  $10 \times 10 \times 10$  mm Voxelgröße aufgenommen. Signalkomponenten sind bei 0,8 ppm, 1,25 ppm, 1,9 ppm und 2,2 ppm zu sehen. Ebenso liegen bei 6,6 ppm, 7,1 ppm und 8,2 ppm Signalbereiche. Weitere signalgebende Frequenzbereiche befinden sich bei 2,9 ppm und 3,8 ppm.

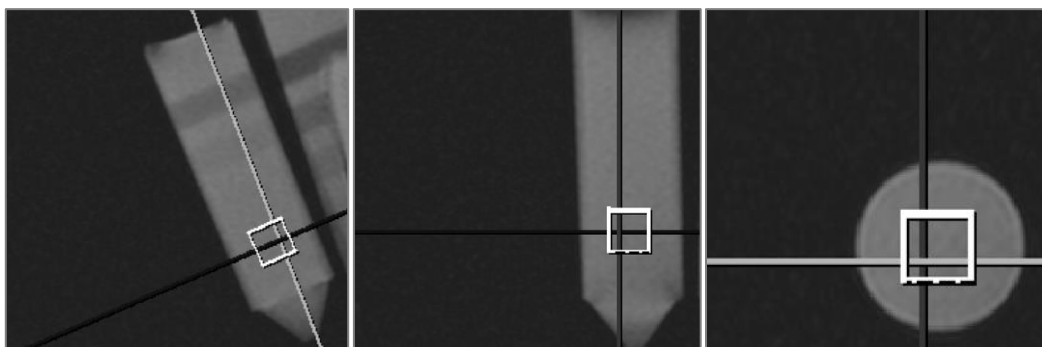
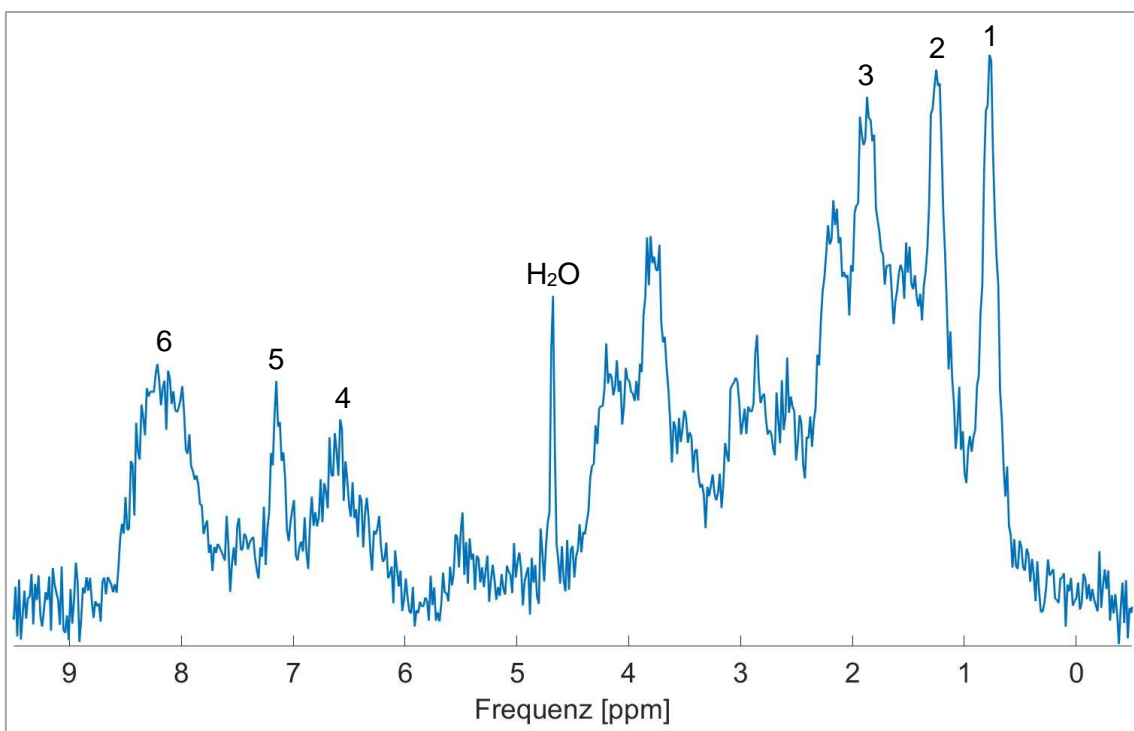


Abbildung 36: STEAM-Spektrum einer 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten



Die schnell relaxierende Signalkomponente der 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser mit  $T_2^* = 6,3$  ms trug in der UTE-Bildgebung lediglich circa 4,0 % zum Gesamtsignal bei. Die Übereinstimmung der ermittelten Signalparameter mit dem tatsächlichen Signalabfall ist mit  $R^2 = 0,7919$  eher niedrig. Dennoch war die Modellierung der langsamen Oszillationskomponente mit einer Frequenz von etwa 97,42 Hz möglich. Diese Frequenz entspricht einer chemischen Verschiebung von ungefähr 3,5 ppm relativ zu TMS. In Übereinstimmung dazu weist das Spektrum der Gelatinelösung eine Signalkomponente zwischen 3,9 ppm und 3,8 ppm auf. Die schnelle Oszillationskomponente konnte zwar nicht mathematisch beschrieben werden, dürfte jedoch mit einer Frequenz von circa 500 Hz den für Kollagen charakteristischen Signalbereichen zwischen 2,2 ppm und 0,7 ppm zuzuordnen sein.

In Abbildung 37 ist das STEAM-Spektrum einer 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser im Vergleich zum STEAM-Spektrum einer 25%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser dargestellt. Die beiden Spektren wurden jeweils mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, Wassersättigung, 128 Mittlungen und  $10 \times 10 \times 10$  mm Voxelgröße aufgenommen. Die gleiche Verstärkereinstellung bei der Aufnahme beider Spektren führte dazu, dass die Amplitude des Rauschens ähnlich ist. Aufgrund dessen sind die Spektren in Abbildung 37 gleich skaliert und können hinsichtlich der Signalintensität miteinander verglichen werden.

Die Signalbereiche im STEAM-Spektrum der Gelatinelösung stimmten weitgehend mit denen von gelöstem Kollagenpulver überein, wiesen allerdings für Kollagenpulver eine deutlich höhere Intensität auf. In Gelatine liegt Kollagen teilweise in der tripelhelikalen Form vor, in gelöstem Kollagenpulver hingegen ausschließlich in Form frei beweglicher Peptidketten. Daher sprechen die in Abbildung 37 dargestellten Spektren dafür, dass frei bewegliches Kollagen in den charakteristischen Chemical-Shift-Bereichen Signalkomponenten mit einer höheren Intensität erzeugt als fest in einer Tripelhelix gebundenes Kollagen.

Die erwähnten Frequenzkomponenten zwischen 0,7 ppm und 2,2 ppm traten auch bei gelöstem Kollagenpulver unabhängig vom Lösungsmittel H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O auf. Sie werden daher vermutlich sowohl bei Gelatine als auch bei Kollagenpulver durch fest gebundene und nicht austauschbare Wasserstoffkerne verursacht. Die Signalkomponenten zwischen 6,6 ppm und 8,2 ppm traten bei Wasser als Lösungsmittel stets auf, bei Kollagenpulver, das in Deuteriumoxid gelöst ist, jedoch teilweise mit einer niedrigeren Intensität. Dies kommt wahrscheinlich durch den Austausch von <sup>1</sup>H-Atomen, die beispielsweise in Hydroxylgruppen gebunden sind, zustande. Die Frequenzkomponente bei ungefähr 3,8 ppm trat in allen drei erwähnten Fällen auf und ist daher vermutlich mit fest gebundenen Wassermolekülen assoziiert.

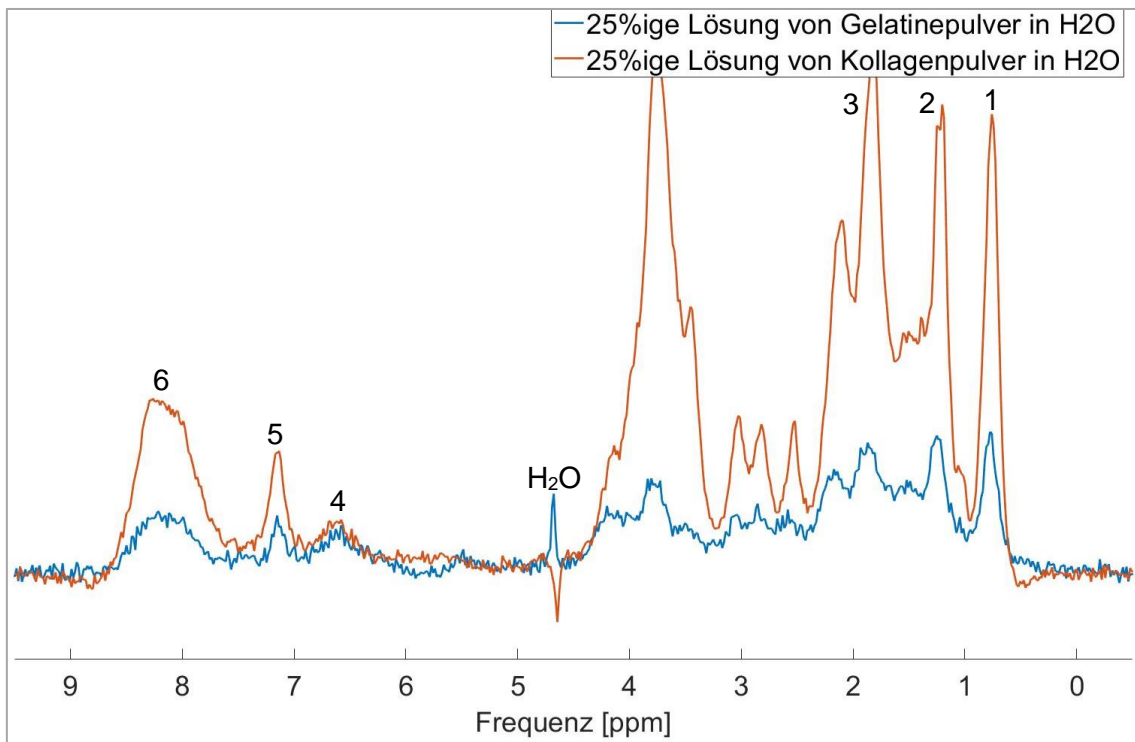


Abbildung 37: STEAM-Spektren einer 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser und einer 25%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Eine 25%ige Lösung von Gelatinepulver in Wasser wurde im Wärmeschrank über mehrere Stunden bei 65 °C erwärmt. Anschließend wurde eine STEAM-Spektroskopie mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms,  $10 \times 10 \times 10$  mm Voxelgröße, 128 Mittlungen und mit Wassersättigung durchgeführt. Das zugehörige STEAM-Spektrum ist in Abbildung 38 dargestellt. Je nach Temperatur ändert sich der Chemical-Shift-Bereich, in dem das Wassersignal auftritt (31). Das STEAM-Spektrum ist so dargestellt, dass die für Kollagen charakteristischen Signalkomponenten bei den bekannten ppm-Bereichen auftreten. Die Qualität des STEAM-Spektrums ist bei identischen Messparametern deutlich besser als bei der nicht erwärmten 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser.

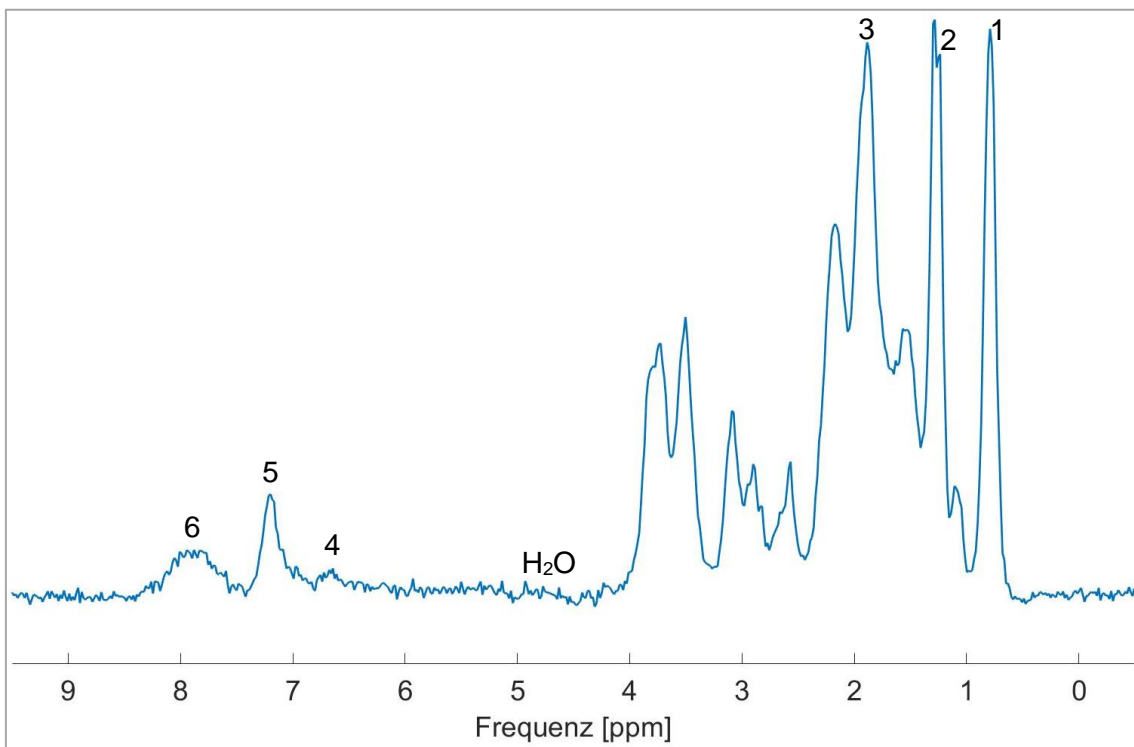


Abbildung 38: STEAM-Spektrum einer auf 65 °C erwärmten 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Abbildung 39 zeigt einen Vergleich zwischen den STEAM-Spektren der erwärmten und der nicht erwärmten 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser mit den genannten Messparametern. Die Vergleichbarkeit zwischen den

beiden Spektren ist bei gleicher Skalierung gegeben, weil die Verstärkereinstellung gleich war und daher das Rauschen ähnlich ist. In Abbildung 39 ist zu sehen, dass die Intensität der spektralen Signalbereiche bei der erwärmten Lösung deutlich höher ist. Nach dem Abkühlen der erwärmten Gelatinelösung wurde diese wieder fest. Die einzelnen Signalbereiche im STEAM-Spektrum zeigten eine niedrigere Intensität als im erwärmten Zustand, aber eine höhere Intensität als bei der 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser, die nicht über mehrere Stunden erwärmt worden war. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Kollagen Signalkomponenten mit einer höheren Intensität hervorruft, wenn es in frei beweglichem Zustand vorliegt. Die Erwärmung führt vermutlich dazu, dass die feste Bindung der tripelhelikalen Domänen in Gelatine teilweise gelöst wird.

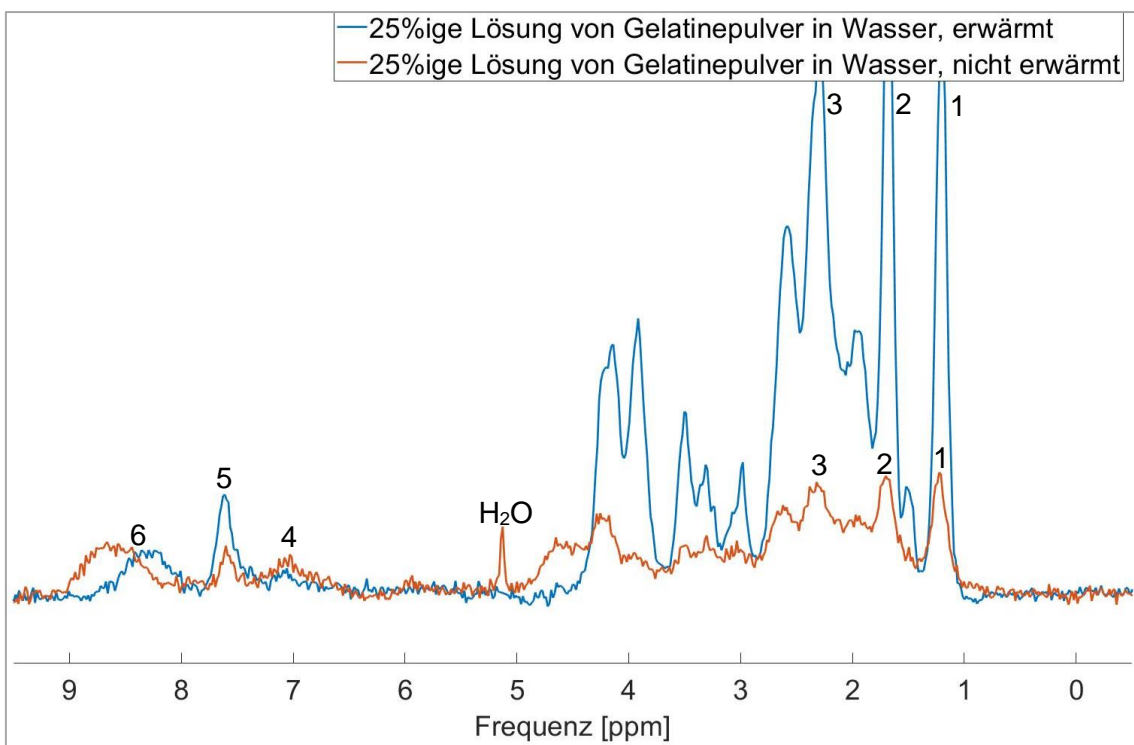


Abbildung 39: STEAM-Spektren einer auf 65 °C erwärmten und einer nicht erwärmten 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

## 5.2.2 Enzymatisch verdaute Lösung von Gelatinepulver in Wasser

Eine 25%ige Lösung von Gelatinepulver in Wasser wurde unter der Fragestellung untersucht, inwiefern die enzymatische Behandlung mit dem Enzym Collagenase B das MR-Signal verändert. Hierzu wurde die Gelatineprobe 1 für eine Dauer von 24 Stunden bei 37 °C mit Collagenase B inkubiert. Die Gelatineprobe 2 diente zur Kontrolle und wurde ohne enzymatische Behandlung für 24 Stunden bei 37 °C aufbewahrt. Bei Raumtemperatur wurden mit der Kopfspule Messungen der abgekühlten Proben mit der beschriebenen UTE-Sequenz durchgeführt. Auffällig war, dass die enzymatisch behandelte Probe nicht zu einer gallertigen Lösung erstarrte, sondern flüssig blieb.

In Abbildung 40 ist der Abfall der Signalintensität dargestellt. Die Kurve der enzymatisch behandelten Probe zeigt Oszillationen mit einer Periodendauer von etwa 2 ms und einen längeren Signalabfall nach 8 bis 9 ms. Am stärksten fällt die Signalintensität innerhalb der ersten Millisekunde ab. Damit weist die Kurve für die enzymatisch behandelte Gelatineprobe qualitativ dieselben Charakteristika auf, die auch bei in Wasser gelöstem Kollagenpulver vorhanden sind.

Die Kurve für die Kontrollprobe ohne Enzym in Abbildung 40 hat Eigenschaften, die für die 25%ige Lösung von Gelatinepulver in Wasser bereits beschrieben wurden. Die Kurve für den Signalabfall zeigt gleichzeitig zwei Oszillationsmuster, die eine Periodendauer von ungefähr 10 ms und 2 ms haben. Die Signalintensität sinkt innerhalb der ersten 5 ms besonders stark, steigt im Rahmen der langsamen Oszillation bei höheren Echozeiten jedoch wieder an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die beiden Kurven deutlich unterscheiden. Die Kurve der Kontrollprobe mit in Wasser gelöstem Gelatinepulver stimmt mit dem in Abbildung 34 gezeigten Signalabfall einer vergleichbaren Probe, die nicht erwärmt worden war, qualitativ überein. Die enzymatisch behandelte Gelatinelösung hingegen zeigte in der UTE-Bildgebung einen Signalverlauf, der wesentliche Charakteristika der Lösungen von Kollagenpulver in Wasser aufweist, wie in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

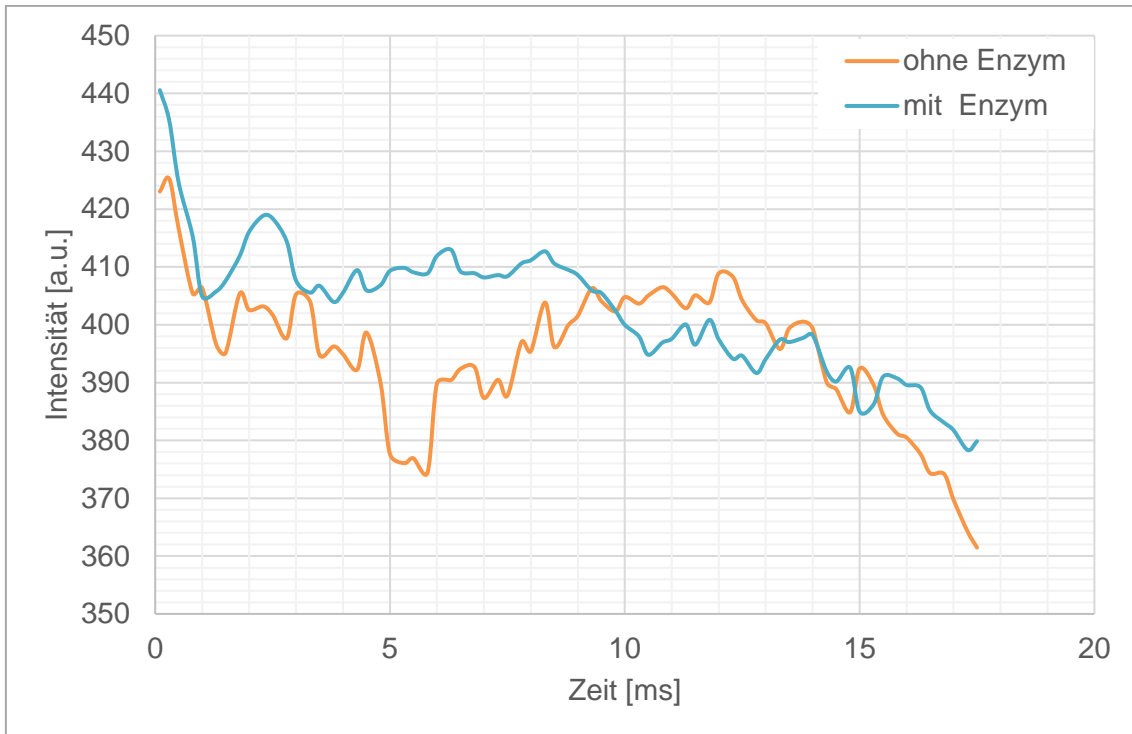


Abbildung 40: Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 25%ige Lösung von Gelatinepulver in DPBS nach der enzymatischen Behandlung und als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung

Die STEAM-Spektren der enzymatisch behandelten Probe und der Kontrollprobe zeigten bei der Echozeit 5,4 ms dieselben Signalbereiche. Abbildung 41 zeigt einen Vergleich der beiden STEAM-Spektren mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, 100 Mittlungen,  $10 \times 10 \times 10$  mm Voxelgröße und mit Wassersättigung. Die beiden Spektren wurden mit gleicher Verstärkereinstellung und Empfindlichkeit aufgenommen und können daher bei gleicher Skalierung miteinander verglichen werden. Das Spektrum der enzymatisch behandelten Gelatinelösung weist eine höhere Intensität für die kollagenspezifischen spektralen Komponenten auf. Es ist möglich, dass durch die enzymatische Behandlung ein Teil des tripelhelikal gebundenen Kollagens in die frei bewegliche Form überführt wurde und aufgrund dessen im STEAM-Spektrum Signalkomponenten mit höherer Intensität erzeugt.

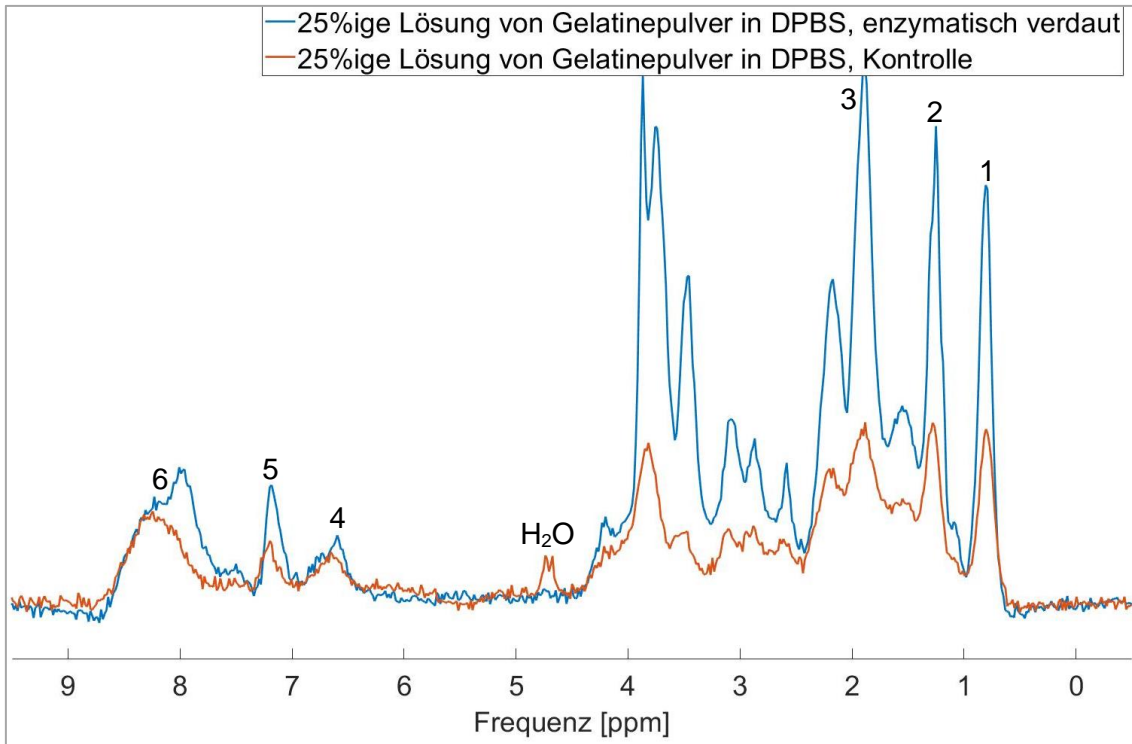


Abbildung 41: STEAM-Spektren für die mit Kollagenase behandelte 25%ige Lösung von Kollagenpulver in DPBS und die nicht enzymatisch behandelte Kontrolle ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Bei der enzymatischen Verdauung der 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser fiel auf, dass sich im weiteren Verlauf keine gallertige Masse bildete, sondern die Lösung flüssig blieb. Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, dass der Organisationsgrad der tripelhelikalen Kollagenstrukturen durch die Kollagenase so weit zerstört wurde, dass kein fester oder gallertiger Aggregatzustand erreicht werden konnte. Die Ergebnisse der UTE-Bildgebung und der STEAM-Spektroskopie wiesen eine hohe Übereinstimmung mit der Lösung von Kollagenpulver in Wasser auf. Dies deutet darauf hin, dass nach der enzymatischen Behandlung von Gelatine keine tripelhelikale Struktur des Kollagens mehr vorlag, sondern kürzere Polypeptidketten wie in Kollagenpulver.

## 5.3 UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Sehnen- gewebe

### 5.3.1 Gesundes Sehnen-gewebe

Ein Polypropylen-Röhrchen mit einer Rindersehne in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung wurde im Magnetresonanztomographen in einem Winkel von etwa  $30^\circ$  zwischen dem statischen Magnetfeld  $B_0$  und der Verlaufsrichtung der Sehne ausgerichtet. Für die Messung wurde die Kopfspule verwendet. Die bereits beschriebene UTE-Sequenz kam mit einer Schichtdicke von 2 mm zur Anwendung. Für ein kreisförmiges Areal im Zentrum der Sehne wurde die Entwicklung der Signalintensität in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt und ist in Abbildung 42 dargestellt. Im Wesentlichen ist ein exponentieller Abfall der Signalintensität festzustellen.

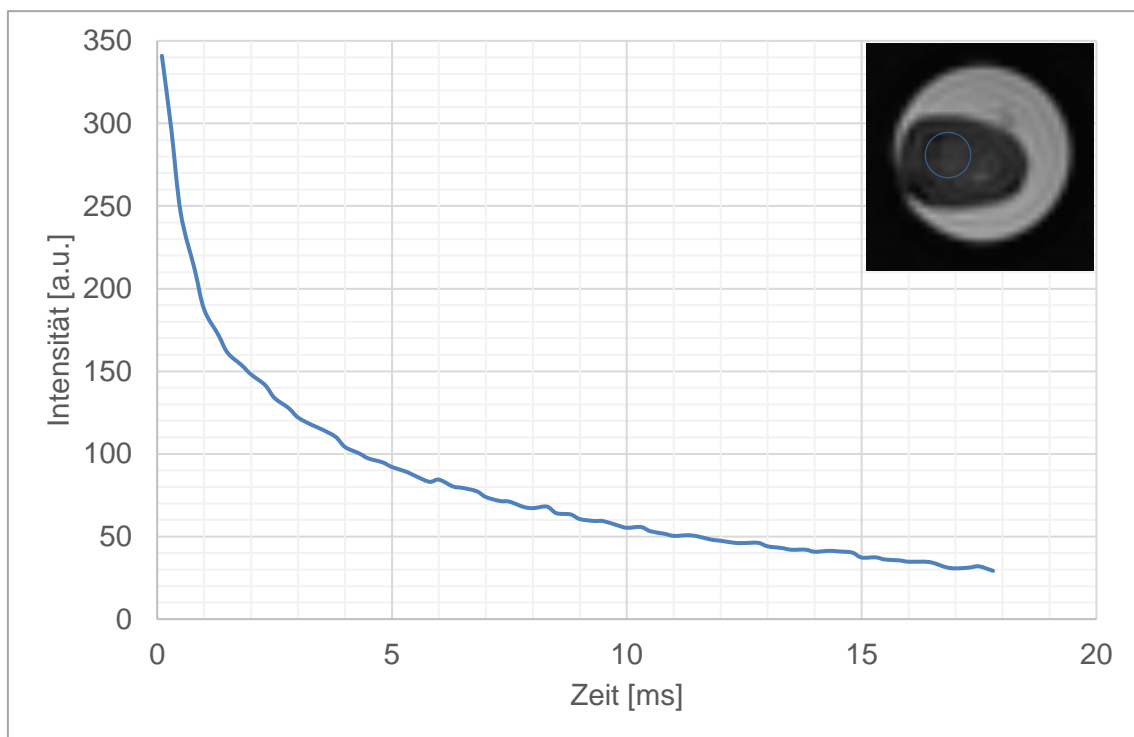


Abbildung 42: Signalintensität von Sehnen-gewebe in einer UTE-Sequenz mit Lokalisation der ROI



Der Signalabfall von Sehngewebe kann näherungsweise durch ein bi-exponentielles Modell mit einer schnell abfallenden und einer langsam abfallenden Signalkomponente beschrieben werden. Die Signalparameter wurden anhand folgender Gleichung mithilfe von Matlab ermittelt:

$$S(T_E) = S_{0,s} \cdot e^{-\frac{T_E}{T_{2,s}^*}} + S_{0,l} \cdot e^{-\frac{T_E}{T_{2,l}^*}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Die Anteile der beiden Signalkomponenten wurden mit den Gleichungen 2 und 3 berechnet.

Die Anpassung der Kurve ist in Abbildung 43 zu sehen. Die Berechnungen führten mit einer Bestimmtheit von  $R^2 = 0,997$  zu den in Tabelle 11 aufgelisteten Ergebnissen.

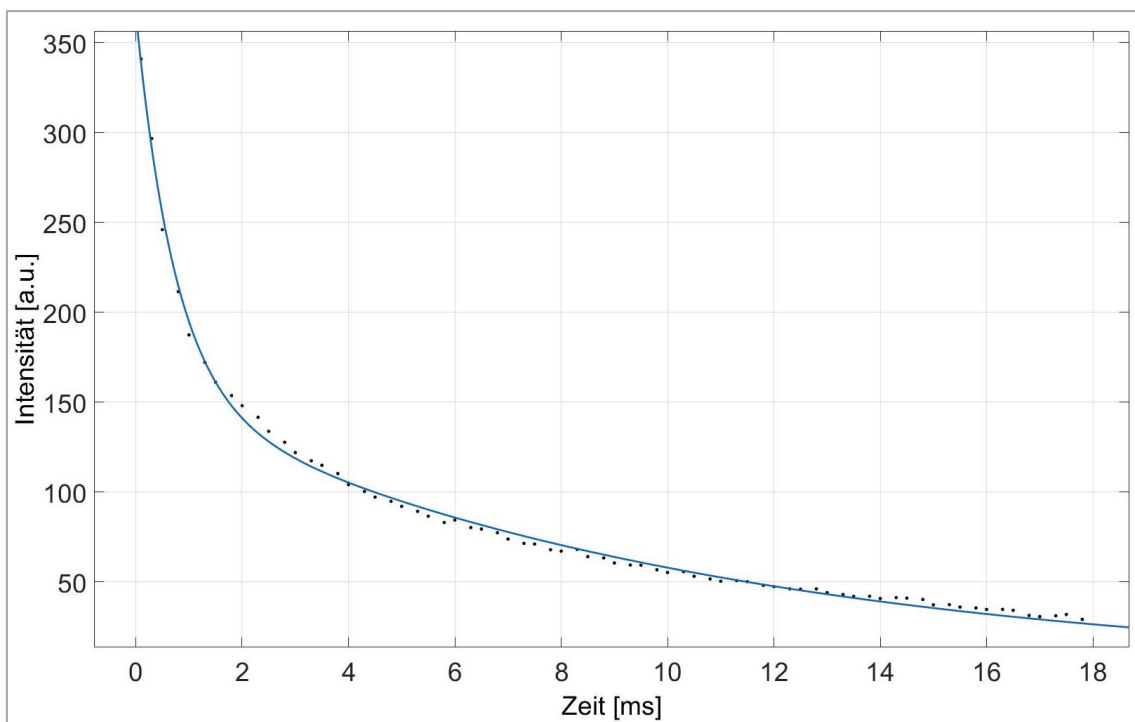


Abbildung 43: Kurvenanpassung der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe

Tabelle 11: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe

<b>Parameter</b>	<b>95%-Konfidenzintervall</b>
$T_{2,s}^* = 0,7391 \text{ ms}$	0,6863 ms; 0,8000 ms
$Fraction_s = 57,87 \%$	56,22 %; 59,49 %
$T_{2,l}^* = 10,20 \text{ ms}$	9,823 ms; 10,61 ms
$Fraction_l = 42,13 \%$	40,51 %; 43,78 %

Es wurde eine MR-Spektroskopie des Sehngewebes durchgeführt. Der Winkel zwischen  $B_0$  und der Längsrichtung der Sehne betrug  $30^\circ$ . Das in Abbildung 44 dargestellte Spektrum entstand durch eine STEAM-Single-Voxel-Spektroskopie mit einer Voxelgröße von  $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}$ . Es wurde mit  $T_E = 5,4 \text{ ms}$ ,  $T_R = 2000 \text{ ms}$ , Wassersättigung, 256 Mittlungen und 2000 Hz Bandbreite aufgenommen. Neben dem Wassersignal bei 4,7 ppm ist ein prominenter Signalbereich bei 5,7 ppm zu sehen. Das liegt vermutlich darin begründet, dass das Wassersignal nicht vollständig unterdrückt werden konnte. In weiteren Messungen von Sehnen konnte der Signalbereich bei 5,7 ppm jedoch nicht zuverlässig reproduziert werden. Außerdem tritt bei 1,3 ppm eine Signalkomponente auf. Diese liegt in dem ppm-Bereich, in dem sich bei der Spektroskopie des Kollagenhydrolysats drei charakteristische Signalbestandteile befanden.

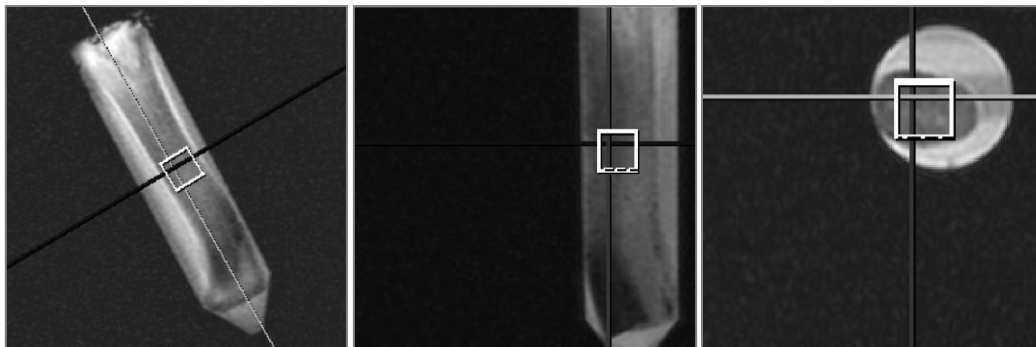
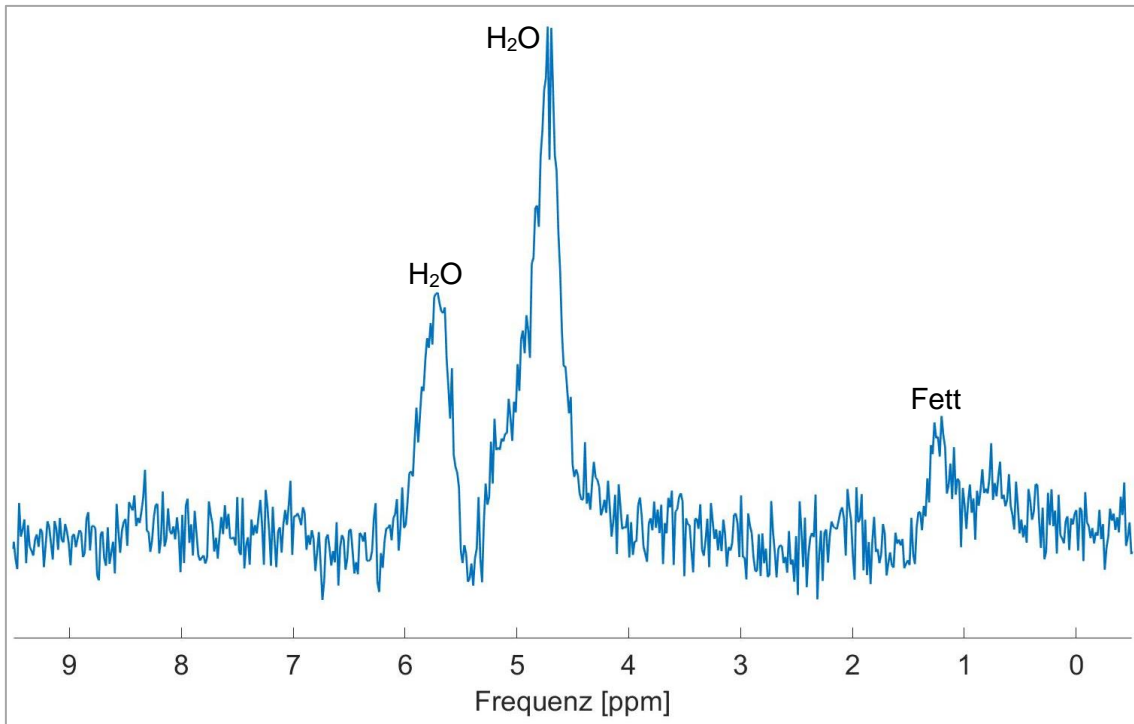


Abbildung 44: STEAM-Spektrum von Sehngewebe ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen

Das Sehnenpräparat wurde bei circa  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und 14 Tage nach der ersten Messung erneut mit der beschriebenen UTE-Sequenz untersucht, um eine eventuell auftretende Veränderung von  $T_2^*$  und eine Verschiebung der Signalfractionen zu untersuchen. Die Sehne wurde in einem Winkel von  $30^{\circ}$  zwischen ihrer Längsrichtung und  $B_0$  gemessen. Die Messung mit einer Serie variabler Echozeiten ergab die in Abbildung 45 dargestellte Entwicklung der Intensität.

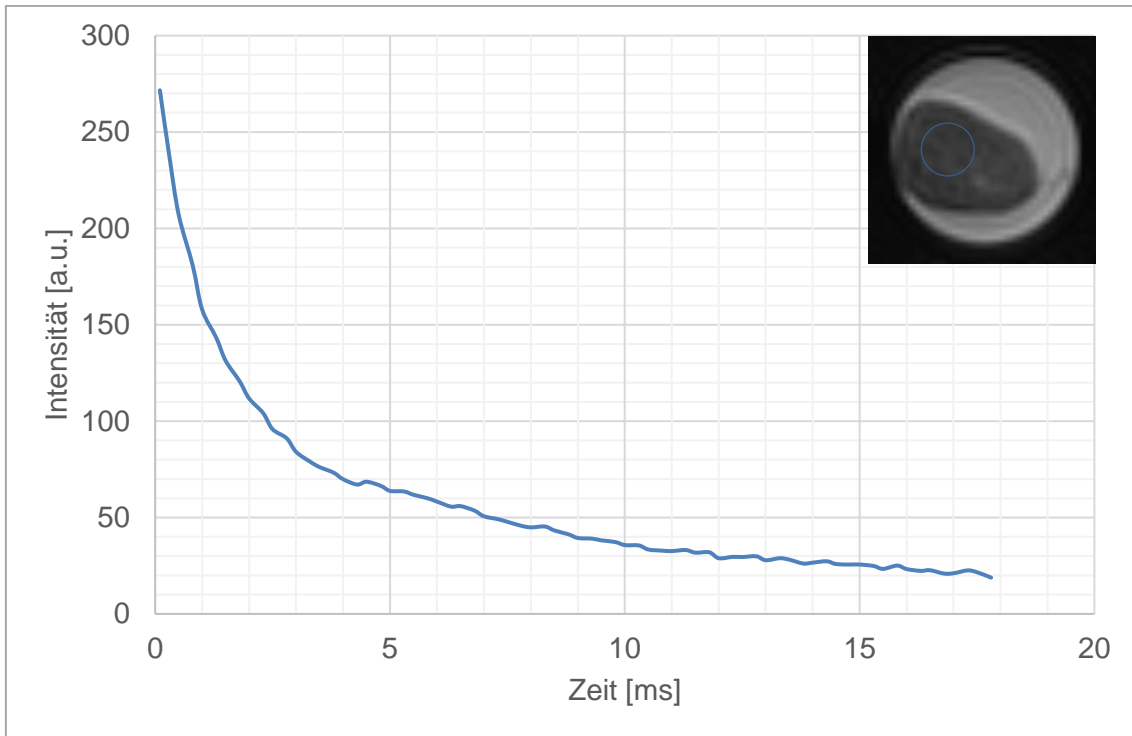


Abbildung 45: Signalintensität von Sehngewebe in einer UTE-Sequenz nach 14 Tagen mit Lokalisation der ROI

Die Signalintensität in Abhängigkeit von der Zeit wurde mithilfe eines bi-exponentiellen Modells gemäß Gleichung 4 beschrieben. Die  $T_2^*$ -Werte und die Signalfractionen der beiden Signalkomponenten, die sich bei der Kurvenanpassung mit Matlab mit  $R^2 = 0,9986$  ergaben, sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe nach 14 Tagen

Parameter	95%-Konfidenzintervall
$T_{2,s}^* = 1,061 \text{ ms}$	1,013 ms; 1,113 ms
$Fraction_s = 65,62 \%$	64,32 %; 66,91 %
$T_{2,l}^* = 10,58 \text{ ms}$	10,16 ms; 11,03 ms
$Fraction_l = 34,38 \%$	33,09 %; 35,68 %

In Abbildung 46 ist ein Spektrum des Sehnenpräparats dargestellt, das nach weiteren sieben Tagen aufgenommen wurde. Der Winkel zwischen  $B_0$  und der Längsrichtung der Sehne blieb unverändert bei  $30^\circ$ . Die Messparameter bei dieser Single-Voxel-Spektroskopie waren  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, 200 Mittlungen, Wassersättigung und  $10 \times 10 \times 20$  mm Voxelgröße. Neben dem Wassersignal bei 4,7 ppm ist eine Signalkomponente bei 1,1 ppm zu sehen. Bei 1,9 ppm kann man einen weiteren Signalbereich identifizieren.

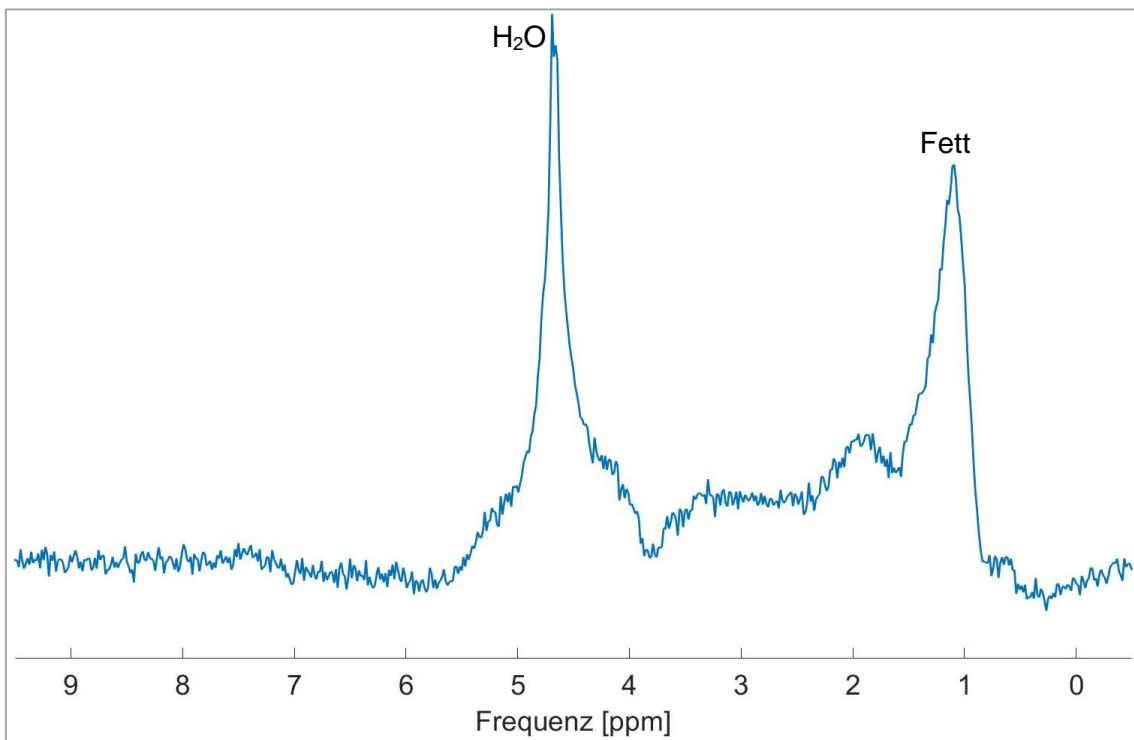


Abbildung 46: STEAM-Spektrum von Sehnenewebe nach 21 Tagen ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung)

Das STEAM-Spektrum des Sehnenpräparats nach 21 Tagen zeigte zahlreiche Charakteristika, die mit dem ursprünglichen Spektrum übereinstimmten. Es konnte ein Signalbereich bei ungefähr 1,2 ppm reproduziert werden. Möglicherweise wurde diese Signalkomponente jedoch durch Fettgewebe in der Sehne und nicht durch Kollagen verursacht. Der beschriebene Peak überlagert den Bereich, in dem bei Kollagenhydrolysat und Gelatine vier charakteristische Peaks auftraten. Aus technischen Gründen ist die Auflösung der Spektren von Sehnenewebe begrenzt.

### 5.3.2 Magic-Angle-Effekt von Sehngewebe

Um den Einfluss des Magic-Angle-Effekts auf die  $T_2^*$ -Werte von Sehngewebe zu untersuchen, wurden Messungen mit unterschiedlichen Winkeln zwischen der Verlaufsrichtung der Sehne und dem statischen Magnetfeld  $B_0$  durchgeführt. Für die Winkel  $0^\circ$ ,  $55^\circ$  und  $90^\circ$  wurden die  $T_2^*$ -Werte und die zugehörigen Signalfraktionen mithilfe der beschriebenen UTE-Sequenz bestimmt. Abbildung 47 zeigt die Signalintensität in Abhängigkeit von der Echozeit. Es zeigt sich im Wesentlichen ein exponentielles Absinken der Signalintensität für alle drei Winkel bei vernachlässigbaren Oszillationen.

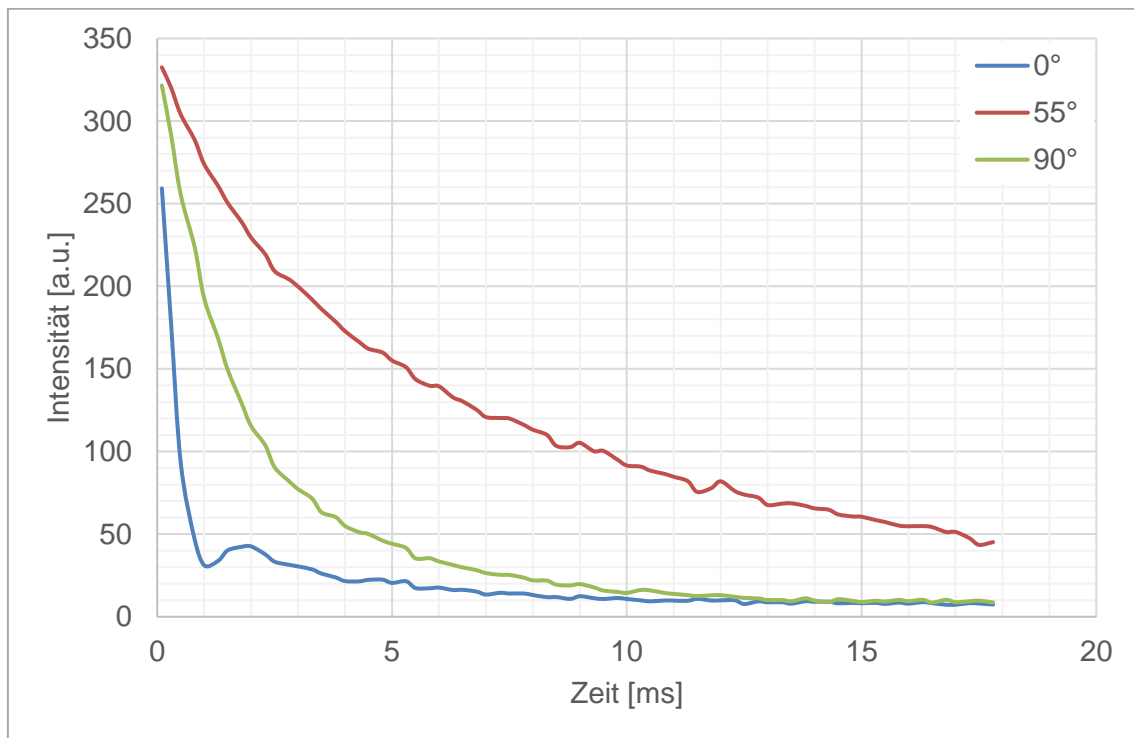


Abbildung 47: Signalintensität einer Sehne in unterschiedlicher Orientierung zum Magnetfeld in einer UTE-Sequenz

Bei  $0^\circ$  fällt die Signalintensität am schnellsten ab. Bei der Messung mit der Echozeit 1 ms sind 12,01 % der Signalintensität des Zeitpunkts 0,05 ms vorhanden. Am langsamsten fällt das Signal ab, wenn die Sehne in einem Winkel von etwa  $55^\circ$  zum statischen Magnetfeld orientiert ist. 82,39 % der Signalintensität, die zum

Zeitpunkt 0,05 ms gemessen wurde, sind nach 1 ms noch vorhanden. Die Kurve für den Winkel 90° lässt einen Abfall der Signalintensität mit einer Geschwindigkeit, die zwischen der für 0° und 55° einzuordnen ist, erkennen. Nach 1 ms ist die ursprünglich gemessene Signalintensität bei 0,05 ms auf 59,97 % abgesunken. Die Werte, die anhand eines bi-exponentiellen Modells mithilfe von Matlab ermittelt wurden, sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe in unterschiedlicher Orientierung zum Magnetfeld

<b>Parameter</b>	<b>0°</b>	<b>55°</b>	<b>90°</b>
<b><math>T_{2,s}^*</math></b>	0,3063 ms (0,2801 ms; 0,3377 ms)	1,987 ms (1,826 ms; 2,179 ms)	1,452 ms (1,399 ms; 1,510 ms)
<b><math>T_{2,l}^*</math></b>	8,418 ms (7,252 ms; 10,02 ms)	11,23 ms (10,90 ms; 11,58 ms)	7,819 ms (7,148 ms; 8,628 ms)
<b><math>Fraction_s</math></b>	88,96 % (87,19 %; 90,61 %)	33,78 % (31,73 %; 35,83 %)	82,21 % (80,17 %; 84,27 %)
<b><math>Fraction_l</math></b>	11,04 % (9,39 %; 12,81 %)	66,22 % (64,17 %; 68,27 %)	17,79 % (15,73 %; 19,83 %)
<b><math>R^2</math></b>	0,985	0,9994	0,9992

### 5.3.3 Enzymatisch verdautes Sehngewebe

Es wurde untersucht, wie die enzymatische Verdauung von Sehngewebe mittels einer Kollagenase die  $T_2^*$ -Werte und ihre zugehörigen Signalfraktionen verändert. Hierzu wurden UTE-Messungen mit zwei Sehnenpräparaten durchgeführt. Für beide Präparate wurden die Werte in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung ermittelt. Das Sehnenpräparat 1 wurde anschließend nach Injektion von Kollagenase B in die Sehne 24 Stunden lang zusätzlich in einer Lösung mit Kollagenase B bei 37 °C inkubiert und ist in Abbildung 48 zu sehen. Das Sehnenpräparat 2 wurde ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C aufbewahrt, jedoch nicht enzymatisch behandelt. Der Winkel zwischen der Verlaufsrichtung der Sehne und dem Magnetfeld des Tomographen betrug etwa 20°.



Abbildung 48: MR-Bild des mit Kollagenase B behandelten Sehnenpräparats

Abbildung 49 zeigt den Verlauf der Signalintensität für das Sehnenpräparat 1 vor der enzymatischen Behandlung, nach der enzymatischen Behandlung in der Peripherie der Sehne und an der Injektionsstelle der Enzym-Lösung. In Tabelle 14 sind die zugehörigen Signalparameter aufgeführt. Sie wurden mithilfe eines bi-exponentiellen Modells ermittelt.



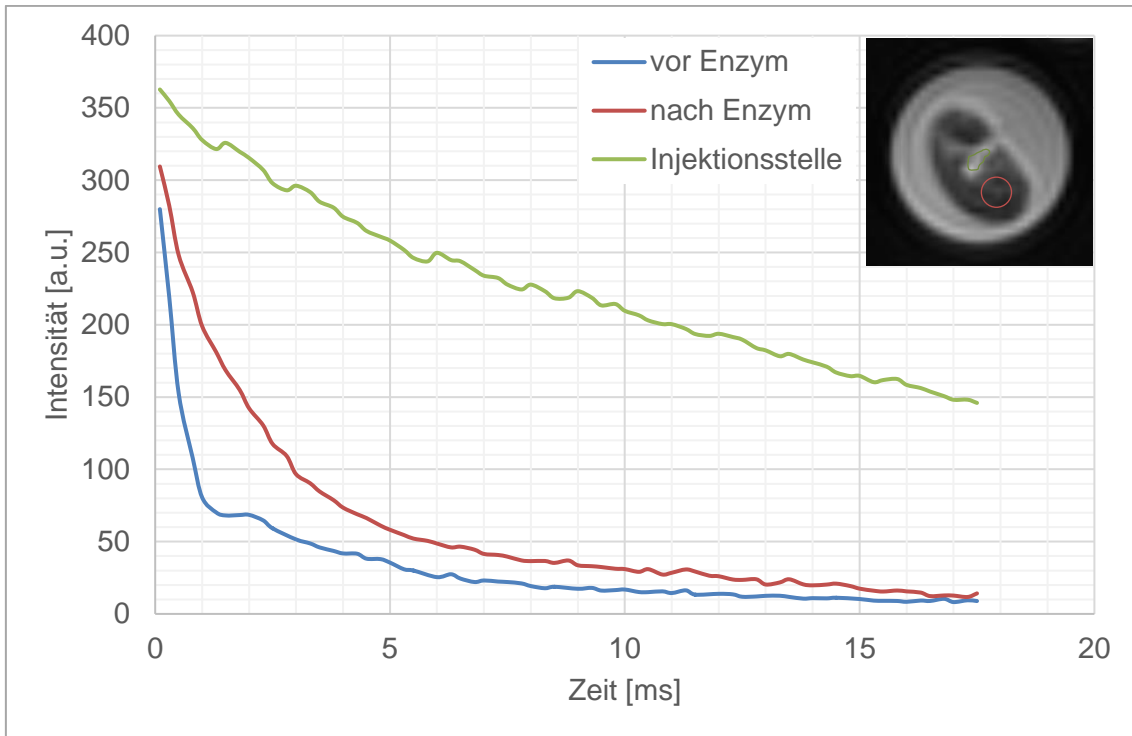


Abbildung 49: Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 1 vor und nach der enzymatischen Behandlung mit Lokalisation der ROIs

Tabelle 14: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 1 vor und nach der enzymatischen Behandlung

Parameter	Vor Enzym	Nach Enzym	Injektionsstelle
$T_{2,s}^*$	0,4259 ms (0,3909 ms; 0,4677 ms)	1,717 ms (1,636 ms; 1,808 ms)	2,074 ms (1,539 ms; 3,181 ms)
$T_{2,l}^*$	6,472 ms (5,974 ms; 7,067 ms)	10,57 ms (9,606 ms; 11,74 ms)	22,79 ms (21,79 ms; 23,89 ms)
$Fraction_s$	77,22 % (75,09 %; 79,26 %)	76,63 % (74,21%; 79,06 %)	11,98 % (9,84 %; 14,13 %)
$Fraction_l$	22,78 % (20,74 %; 24,91 %)	23,37 % (20,94 %; 25,79 %)	88,02 % (85,87%; 90,16 %)
$R^2$	0,9933	0,9988	0,9969

Abbildung 50 zeigt den Abfall der Signalintensität für das Sehnenpräparat 2 vor und nach der 24-stündigen Erwärmung. Mittels bi-exponentieller Kurvenanpassung wurden die entsprechenden Signalparameter ermittelt. Diese sind in Tabelle 15 aufgelistet.

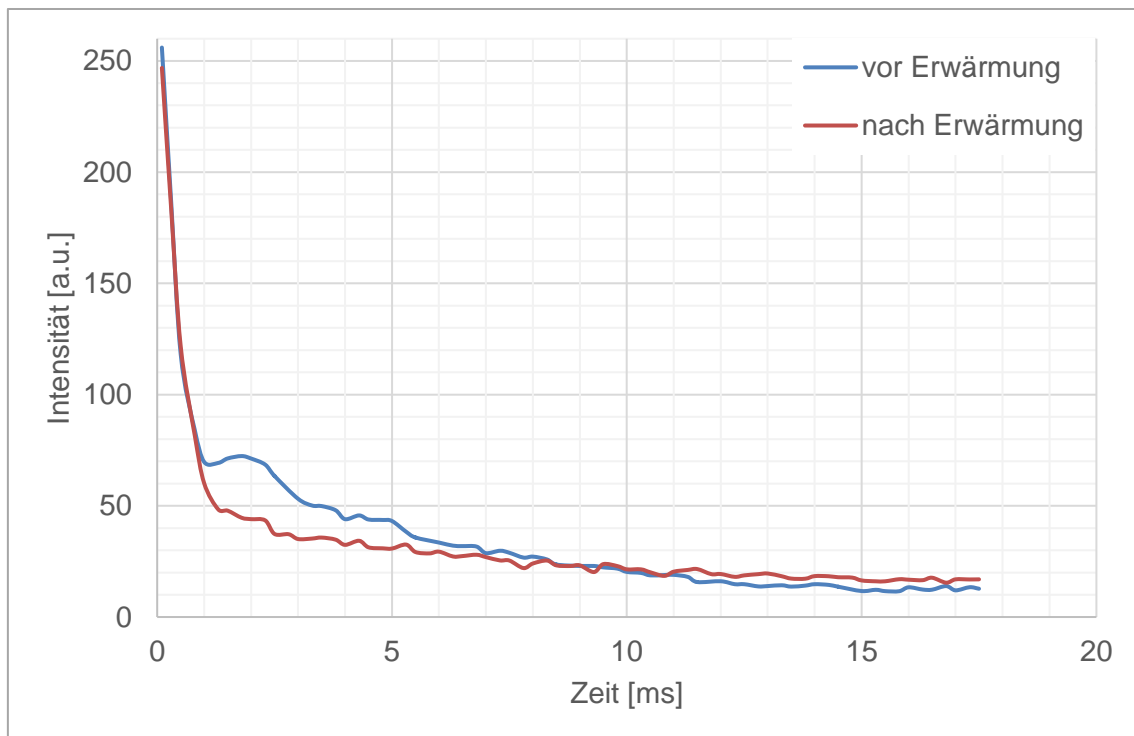


Abbildung 50: Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 2 als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung

Tabelle 15: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 2 als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung

Parameter	Vor Erwärmung	Nach Erwärmung
$T_{2,s}^*$	0,3046 ms (0,2765 ms; 0,3392 ms)	0,4369 ms (0,4182 ms; 0,4570 ms)
$T_{2,l}^*$	7,559 ms (7,062 ms; 8,130 ms)	16,06 ms (14,81 ms; 17,54 ms)
$Fraction_s$	75,71 % (73,56 %; 77,72 %)	86,13 % (85,28 %; 86,95 %)
$Fraction_l$	24,29 % (22,28 %; 26,44 %)	13,87 % (13,05 %; 14,72 %)
$R^2$	0,9911	0,9962

### 5.3.4 Eigenschaften der spektralen Komponenten von Sehnen- gewebe

Im Spektrum von Sehngewebe gibt es einen Frequenzbereich mit erhöhter Signalintensität bei 1,3 ppm. Um die Eigenschaften dieses Frequenzbereichs zu untersuchen, wurden Spektren mit einer Serie variabler Echozeiten aufgenommen. Die volumenselektive STEAM-Spektroskopie erfasste ein Voxel von 10 x 10 x 20 mm Größe im Zentrum des Sehnenpräparats. Sie wurde mit  $T_R = 1370$  ms,  $T_M = 30$  ms, 256 Akquisitionen, mit Wassersättigung und mit Outer Volume Suppression (OVS) durchgeführt. Die Outer Volume Suppression stellt sicher, dass das Spektrum nicht durch Gewebe beeinflusst wird, das außerhalb des Voxels liegt. Die verwendeten Echozeiten lagen zwischen  $T_E = 5,4$  ms und  $T_E = 100$  ms. Abbildung 51 zeigt das Spektrum, das für  $T_E = 5,4$  ms aufgenommen wurde.

In den phasenkorrigierten Spektren wurde die maximale Intensität des Frequenzbereichs bei 1,3 ppm jeweils in Bezug auf die Baseline ausgemessen. Die Werte wurden in Abbildung 52 graphisch in Abhängigkeit von den Echozeiten dargestellt. Die Kurve zeigt im Wesentlichen einen exponentiellen Abfall der maximalen Intensität des Signalbereichs. Daher wurde mithilfe von Matlab eine mono-exponentielle Kurvenanpassung durchgeführt. Das Ergebnis für die Zeitkonstante des transversalen Signalabfalls ist in Tabelle 16 aufgeführt.

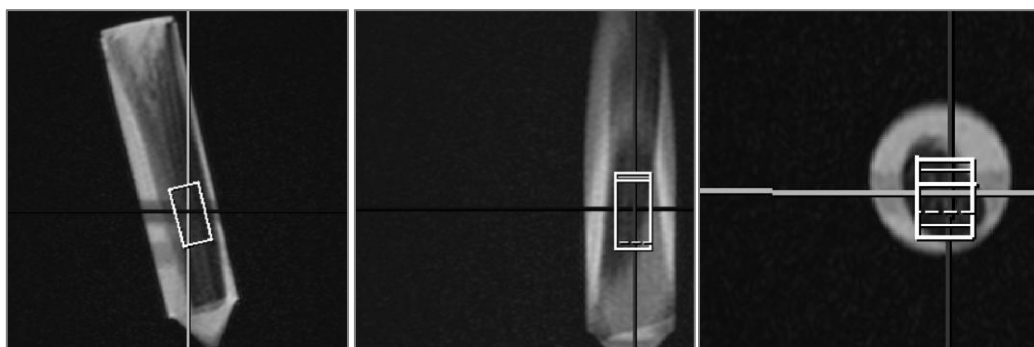
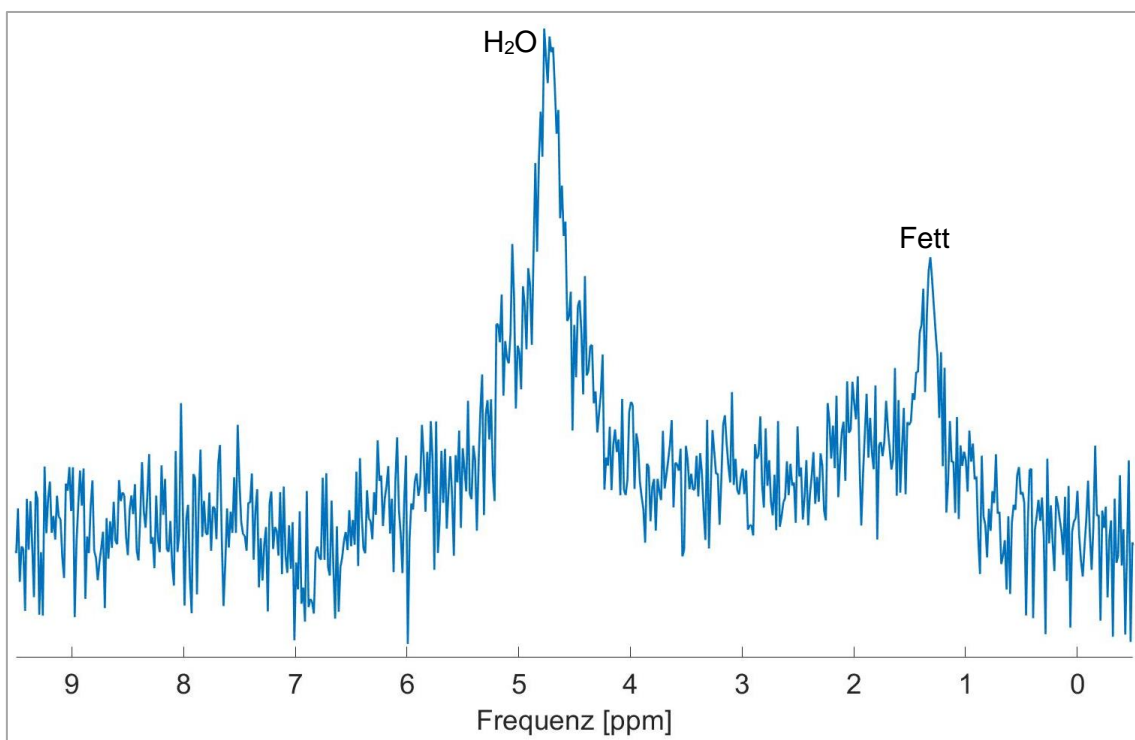


Abbildung 51: STEAM-Spektrum von Sehngewebe mit OVS (Outer Volume Suppression) bei  $T_E = 5,4$  ms und mit Wasserunterdrückung mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen

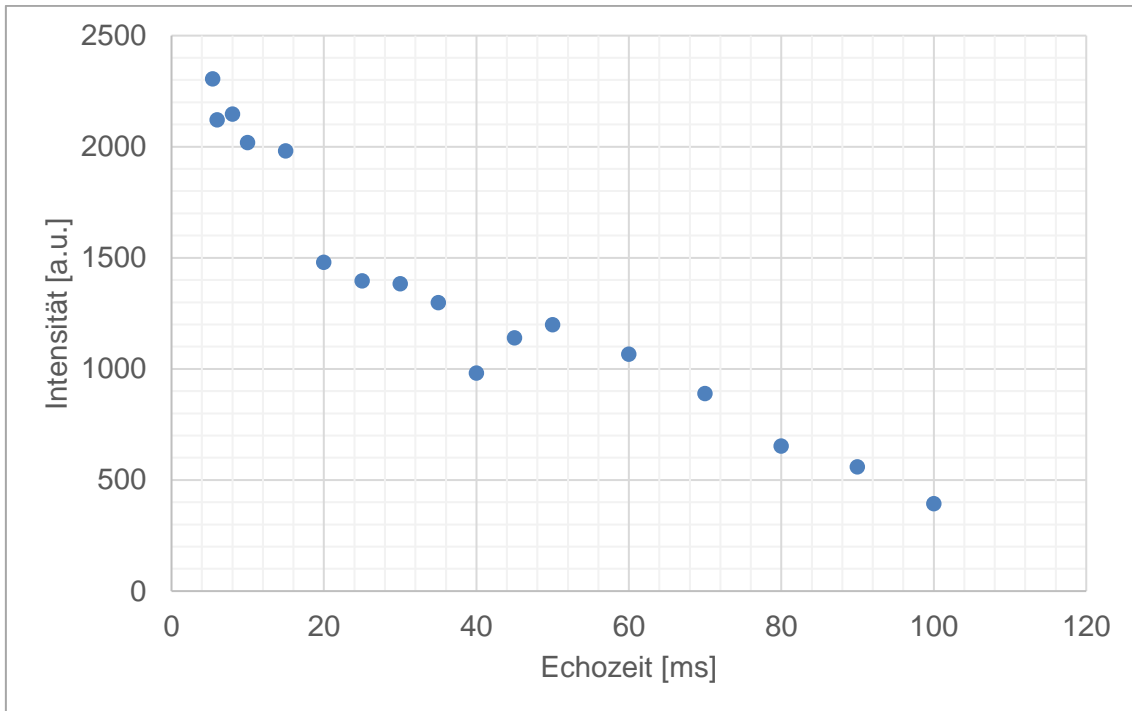


Abbildung 52: Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität des Frequenzbereichs bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für Sehngewebe

Tabelle 16: Ermittelter  $T_2$ -Wert der spektralen Komponente bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für Sehngewebe

$T_2$	95%-Konfidenzintervall
<b>60,83 ms</b>	52,74 ms; 71,89 ms
<b><math>R^2 = 0,9511</math></b>	

Die maximale Intensität des Signalbereichs bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum zeigte einen transversalen Signalabfall mit einer Zeitkonstanten von etwa 61 ms. Der Signalabfall in Sehngewebe erfolgte deutlich langsamer als bei der 50%-igen Lösung von Kollagenpulver in  $H_2O$  beziehungsweise  $D_2O$ . Hier lagen für die drei charakteristischen Kollagen-Signalkomponenten zwischen 0,8 ppm und

2,2 ppm die Zeitkonstanten für den transversalen Signalabfall zwischen 15,2 ms und 36,7 ms. Die spektrale Komponente bei 1,3 ppm in Sehnengewebe hat davon abweichende Eigenschaften. Die Zeitkonstante liegt näher an dem Wert, der für das Fettsignal in Muskelgewebe ermittelt wurde. Deswegen besteht die Vermutung, dass die Signalkomponente bei 1,3 ppm in Sehnengewebe nicht durch Kollagen, sondern durch geringe Mengen an Fettgewebe innerhalb der Sehne zustande kommt.

### **5.3.5 Mechanisch zerkleinertes Sehnengewebe**

Für die drei Präparate mit mechanisch zerkleinertem Sehnengewebe in DPBS wurde ebenfalls eine volumenselektive STEAM-Single-Voxel-Spektroskopie durchgeführt. Das Voxel war jeweils 13 x 13 x 13 mm groß. Die Spektren wurden mit 256 Mittlungen,  $T_R = 1500$  ms, ohne Wassersättigung und mit unterschiedlichen Echozeiten aufgenommen. Die verwendeten Echozeiten lagen zwischen  $T_E = 5,4$  ms und  $T_E = 100$  ms. In den Spektren zeigte sich bis zu einer Echozeit von 50 ms ein Signalbereich bei 1,3 ppm. Da das Signal in diesem Frequenzbereich bei höheren Echozeiten nicht mehr zu sehen war, wurden die entsprechenden Spektren bei der quantitativen Auswertung nicht berücksichtigt. Auch in diesem Fall besteht die Möglichkeit, dass die Signalkomponente bei 1,3 ppm durch geringe Mengen an Fettgewebe und nicht durch Kollagen hervorgerufen wird.

In den phasenkorrigierten Spektren von  $T_E = 5,4$  ms bis  $T_E = 50$  ms wurde für jedes Präparat die maximale Signalintensität der Signalkomponente bei 1,3 ppm in Bezug auf die jeweilige Baseline ausgemessen. Dabei zeigte sich im Wesentlichen ein exponentieller Abfall der Signalintensität in Abhängigkeit von der Echozeit. Mithilfe von Matlab wurde eine mono-exponentielle Kurvenanpassung durchgeführt. Diese ergab für jedes der drei Präparate eine Zeitkonstante für den transversalen Signalabfall. Die ermittelten Konstanten sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Ermittelte  $T_2$ -Werte des Frequenzbereichs bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für zerkleinertes Sehngewebe

$T_2$		
<b>Präparat 1</b>	14,52 ms	(10,73 ms; 22,46 ms) $R^2 = 0,9166$
<b>Präparat 2</b>	11,36 ms	(8,651 ms; 16,56 ms) $R^2 = 0,9403$
<b>Präparat 3</b>	9,960 ms	(6,002 ms; 29,31 ms) $R^2 = 0,7759$

Die mechanische Zerkleinerung des Sehngewebes allein verursachte keine wesentliche Veränderung des STEAM-Spektrums. Es zeigte sich nach wie vor ein Signal bei 1,3 ppm, dessen Intensität mit zunehmender Echozeit exponentiell abfiel. Die entsprechenden Zeitkonstanten waren mit 10,0 ms bis 14,5 ms niedriger als für eine native Sehne. Hierbei spielte vermutlich unter anderem der Magic-Angle-Effekt eine Rolle, wonach sich bei Gewebe mit einem hohen Organisationsgrad die Geschwindigkeit der  $T_2$ -Relaxation in Abhängigkeit von der Orientierung zum statischen Magnetfeld verändert. Während die Kollagenfasern des nativen Sehnenpräparats in einem bestimmten Winkel zu  $B_0$  orientiert waren, war dies für das mechanisch zerkleinerte Sehngewebe nicht der Fall. Stattdessen lagen viele unterschiedliche Orientierungen der Kollagenfasern zum statischen Magnetfeld vor.

Die Beobachtung, dass die mechanische Zerkleinerung von Sehngewebe das Spektrum nicht wesentlich verändert hat, liegt vermutlich darin begründet, dass die molekulare Struktur des Kollagens nicht beeinflusst wurde. Die Größe der Sehnenstücke war nach der mechanischen Zerkleinerung mit etwa 250  $\mu\text{m}$  zu groß, um Veränderungen auf molekularer Ebene hervorzurufen.

Die Präparate 1 und 3 wurden 24 Stunden lang bei 37 °C mit dem Enzym Collagenase B behandelt. Das Präparat 2 diente als Kontrolle und wurde ohne Hinzugabe eines Enzyms ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Anschließend wurden die Proben 24 Stunden lang bei etwa 5 °C im Kühlschrank aufbewahrt, um nach einer Aufwärmphase bei Raumtemperatur am 3T-MRT spektroskopisch untersucht zu werden.

Die Spektroskopie erfolgte für die Präparate 1 und 3 mit einheitlichen Messparametern. Es wurde jeweils eine volumenselektive Single-Voxel-Spektroskopie mit einer STEAM-Sequenz durchgeführt. Das gemessene Voxel war 13 x 13 x 13 mm groß. Die Spektren wurden mit Wassersättigung und mit 256 Mittlungen aufgenommen.  $T_E$  lag zwischen 5,4 ms und 200 ms. Für die Echozeiten unter 100 ms wurde eine Repetitionszeit von  $T_R = 1500$  ms gewählt. Ab  $T_E = 100$  ms wurde  $T_R$  auf 2000 ms erhöht. Abbildung 53 zeigt das Spektrum des enzymatisch verdauten Präparats 1 bei  $T_E = 5,4$  ms.

Das abgebildete Spektrum für Präparat 1 zeigt Signalkomponenten mit einer hohen Intensität bei 0,8 ppm, 1,25 ppm und 1,9 ppm. Bei den chemischen Verschiebungen 6,7 ppm, 7,15 ppm und 7,9 ppm liegen ebenfalls Signalbereiche, deren Intensität niedriger ist. Das Spektrum von Präparat 3 ist in Abbildung 54 zu sehen und zeigt dieselben Charakteristika, wohingegen sich das Spektrum von Präparat 2 durch die 24-stündige Erwärmung nicht verändert hat.



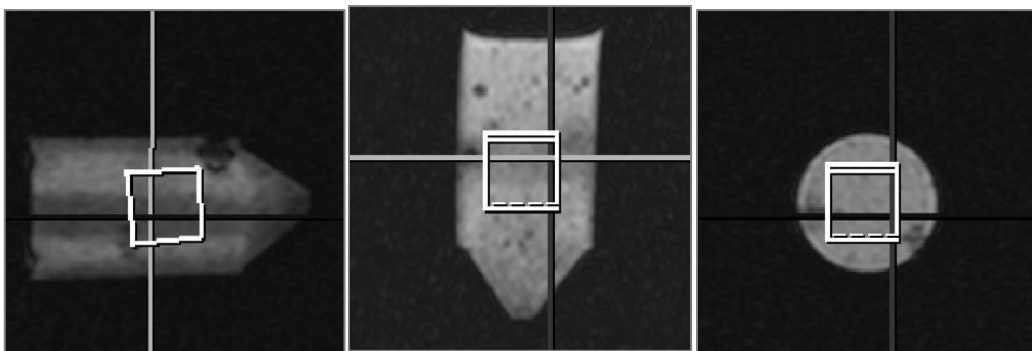
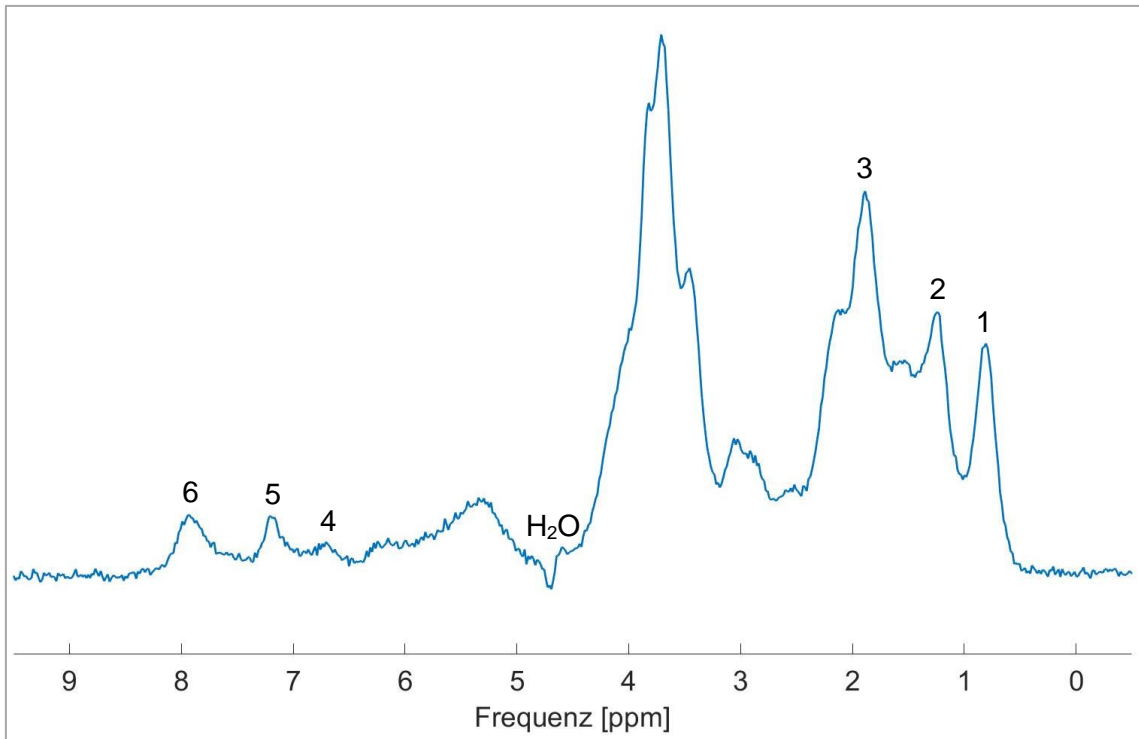


Abbildung 53: STEAM-Spektrum des mechanisch zerkleinerten und enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 1 ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

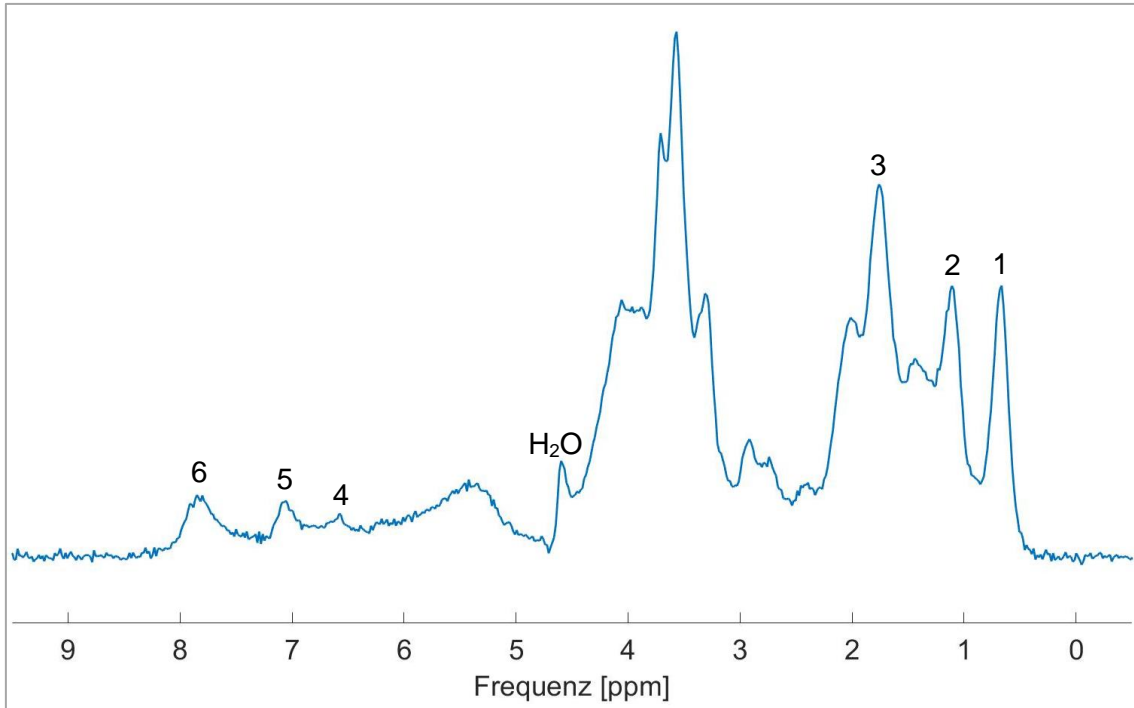


Abbildung 54: STEAM-Spektrum des mechanisch zerkleinerten und enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 3 ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Die Sehnenpräparate 1 und 3 waren in gleicher Weise mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut worden. Für die quantitative Auswertung der Spektren der Sehnenpräparate 1 und 3 wurden die maximalen Signalintensitäten der sechs beschriebenen Frequenzbereiche im Spektrum in Bezug auf die Baseline ausgemessen. Dies erfolgte für die phasenkorrigierten Spektren von  $T_E = 5,4$  ms bis einschließlich  $T_E = 150$  ms. Die maximale Intensität der Frequenzbereiche wurde in Abhängigkeit von der Echozeit aufgetragen. Die entsprechenden Diagramme für das Präparat 3 sind in den Abbildungen 55 und 56 zu sehen. Insbesondere die Signalkomponenten bei 0,8 ppm, 1,25 ppm und 1,9 ppm weisen einen exponentiellen Abfall der Signalintensität mit ansteigendem  $T_E$  auf. Für alle Signaltbereiche wurde eine mono-exponentielle Kurvenanpassung mit Matlab durchgeführt. Die errechneten Zeitkonstanten für den transversalen Signalabfall sind für Präparat 3 in Tabelle 18 aufgeführt.

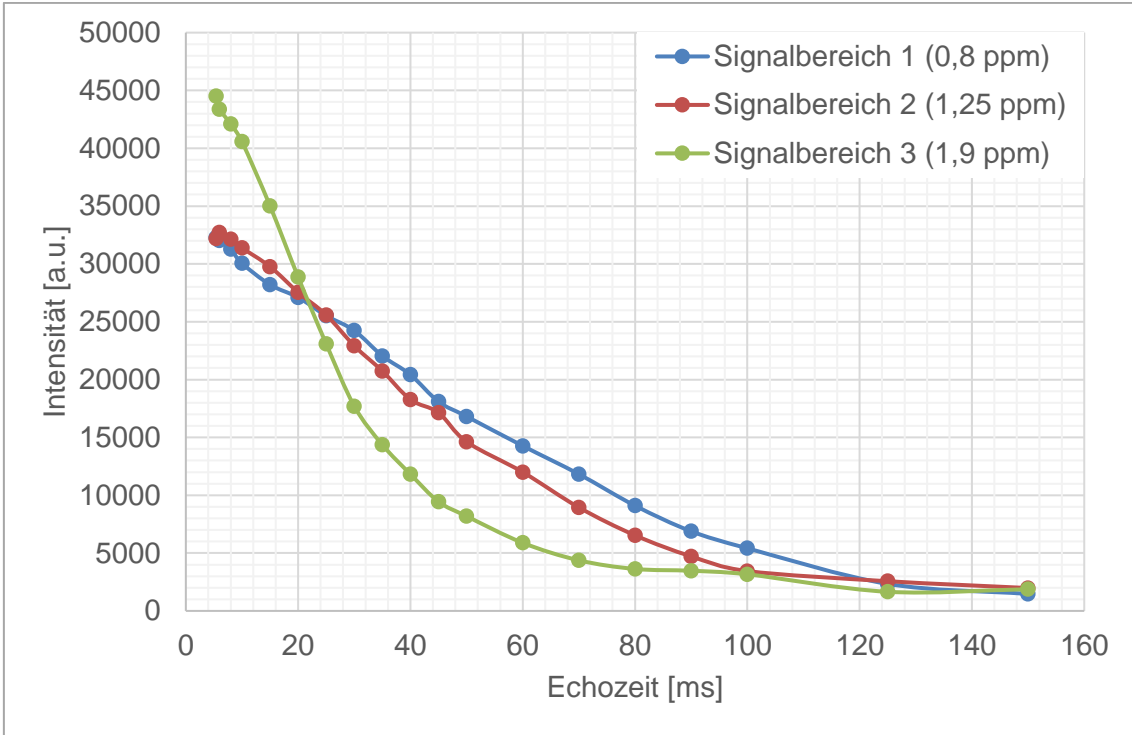


Abbildung 55: Abfall der maximalen Intensität der Kollagen-Signalbereiche im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 3

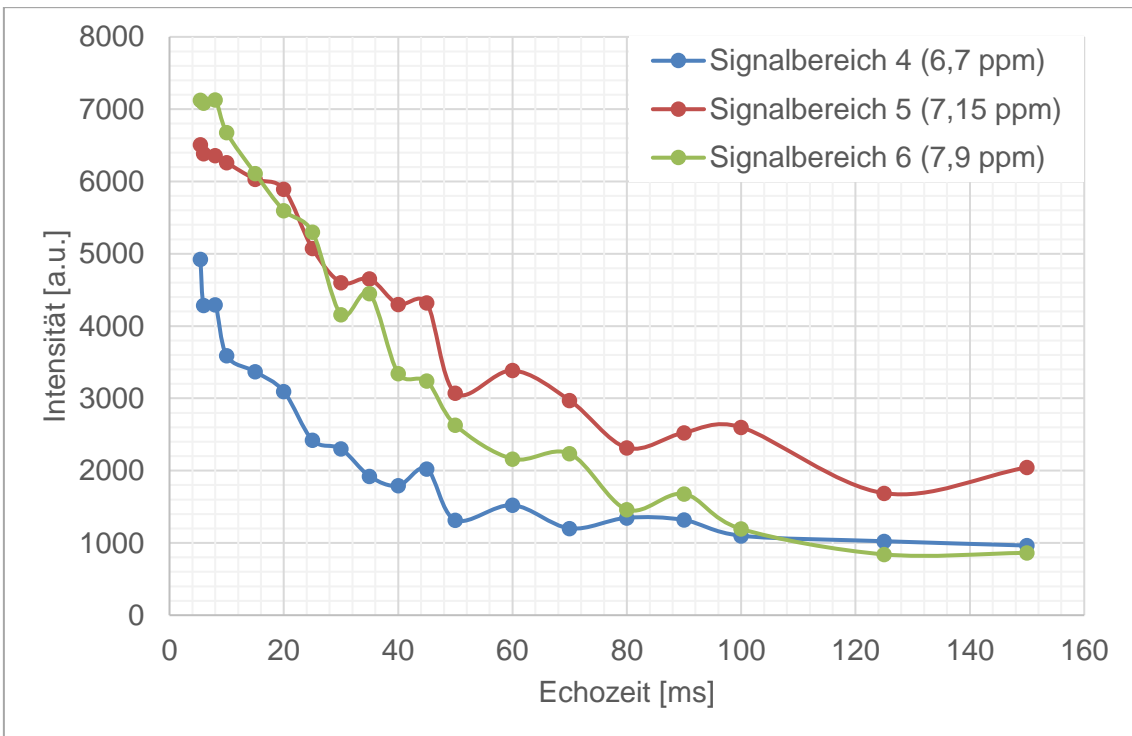


Abbildung 56: Intensitätsabfall weiterer Signalbereiche im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 3

Tabelle 18: Ermittelte  $T_2$ -Werte der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 3

$T_2$		
<b>Signalbereich 1 (0,8 ppm)</b>	61,27 ms	(56,18 ms; 67,43 ms) $R^2 = 0,9848$
<b>Signalbereich 2 (1,25 ppm)</b>	51,81 ms	(51,81 ms; 57,11 ms) $R^2 = 0,9853$
<b>Signalbereich 3 (1,9 ppm)</b>	27,46 ms	(25,55 ms; 29,67 ms) $R^2 = 0,9925$
<b>Signalbereich 4 (6,7 ppm)</b>	52,11 ms	(42,41 ms; 67,57 ms) $R^2 = 0,8941$
<b>Signalbereich 5 (7,15 ppm)</b>	87,41 ms	(77,22 ms; 100,7 ms) $R^2 = 0,9579$
<b>Signalbereich 6 (7,9 ppm)</b>	50,56 ms	(46,58 ms; 55,28 ms) $R^2 = 0,9865$

Die Auswertung der Spektren für das mechanisch zerkleinerte und anschließend enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 1 erfolgte in analoger Weise. Tabelle 19 zeigt die mithilfe von Matlab ermittelten Zeitkonstanten für den transversalen Signalabfall der sechs Signalbereiche. Für das Kontrollpräparat 2 wurde der Signalbereich bei 1,3 ppm ausgewertet, wie das für alle drei Präparate vor der enzymatischen Verdauung durchgeführt worden war. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 19: Ermittelte  $T_2$ -Werte der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 1

$T_2$		
<b>Signalbereich 1 (0,8 ppm)</b>	62,97 ms	(57,50 ms; 69,64 ms) $R^2 = 0,9831$
<b>Signalbereich 2 (1,25 ppm)</b>	52,66 ms	(48,40 ms; 57,77 ms) $R^2 = 0,9867$
<b>Signalbereich 3 (1,9 ppm)</b>	28,30 ms	(26,40 ms; 30,51 ms) $R^2 = 0,993$
<b>Signalbereich 4 (6,7 ppm)</b>	72,36 ms	(61,92 ms; 87,03 ms) $R^2 = 0,9405$
<b>Signalbereich 5 (7,15 ppm)</b>	89,53 ms	(80,19 ms; 101,4 ms) $R^2 = 0,9683$
<b>Signalbereich 6 (7,9 ppm)</b>	52,71 ms	(47,17 ms; 59,77 ms) $R^2 = 0,9753$

Tabelle 20: Ermittelter  $T_2$ -Wert des Signals bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte Sehnenpräparat 2

$T_2$		
<b>Präparat 2</b>	13,03 ms	(8,873 ms; 24,49 ms) $R^2 = 0,8577$

Nach der enzymatischen Verdauung mit Collagenase B konnten mittels STEAM-Spektroskopie mehrere Signalbereiche identifiziert werden. Diese stimmten mit den Signalkomponenten im STEAM-Spektrum von in Wasser gelöstem Kollagenpulver überein. Die Signalbereiche bei 0,8 ppm, 1,25 ppm und 1,9 ppm wiesen

T<sub>2</sub>-Werte auf, die alle drei in einem festen Verhältnis zu denen der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O stehen. Aufgrund der erzielten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Enzym Kollagenase das Kollagen des Sehnenwes so stark abgebaut hat, dass die Abbauprodukte sich in der Flüssigkeit gelöst haben. Kollagenase baut die Polypeptidketten des Kollagens zu kürzeren Fragmenten ab und entwindet dadurch auch die tripelhelikale Struktur des Kollagens. Daher erscheint es plausibel, dass kürzere Peptidketten das Abbauprodukt des Kollagens sind. Diesen Organisationsgrad weist Kollagen auch in Pulverform auf.

Das Sehnenpräparat 3 wurde nach Zugabe von weiteren 10 mg Kollagenase B so lange bei 37 °C inkubiert, bis keine festen Bestandteile mehr zu sehen waren. Abbildung 57 zeigt den Signalabfall, der mittels UTE-Bildgebung gemessen wurde. Es sind Oszillationen mit einer Periodendauer von ungefähr 2 ms zu erkennen. Nach etwa 9 ms fällt die Signalintensität für eine Dauer von circa 2 ms durchgehend ab, bevor sich das Oszillationsmuster fortgesetzt.

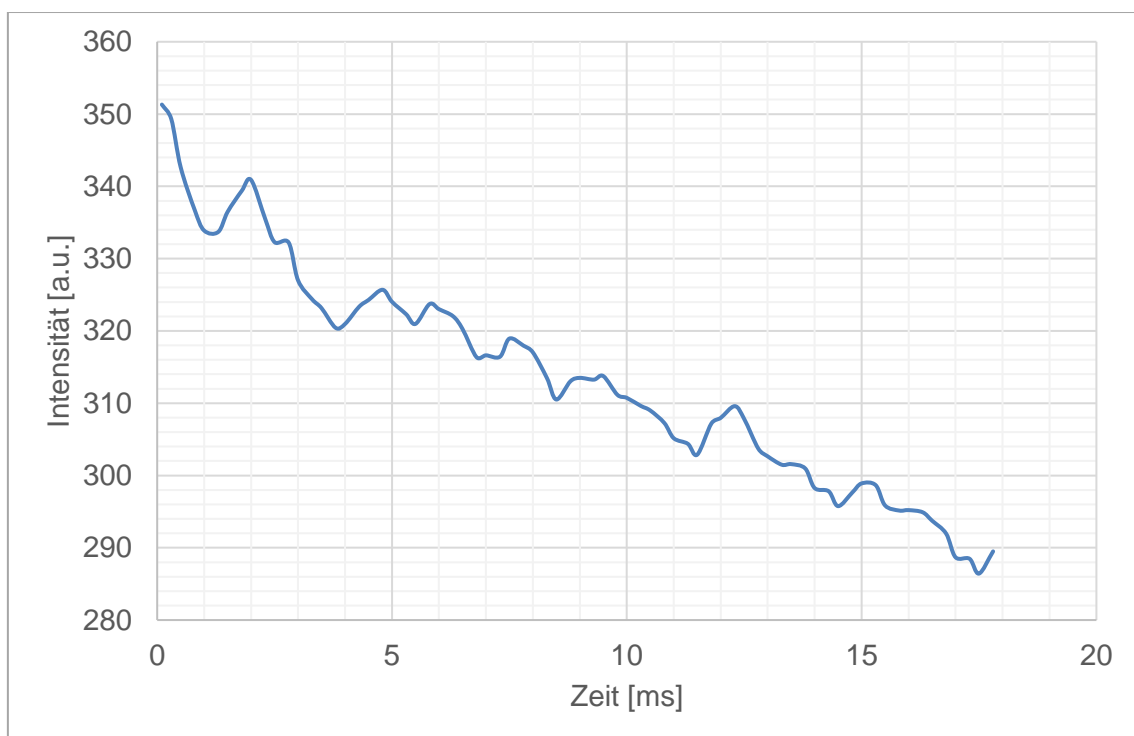


Abbildung 57: Signalintensität des vollständig enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 3 in einer UTE-Sequenz

Abbildung 58 zeigt ein STEAM-Spektrum des vollständig enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 3, das mit  $13 \times 13 \times 13$  mm Voxelgröße, 256 Mittlungen,  $T_R = 1500$  ms,  $T_E = 5,4$  ms und mit Wassersättigung aufgenommen wurde. In diesem Spektrum sind mehrere Signalbereiche mit einer chemischen Verschiebung zwischen 0,5 ppm und 3,0 ppm zu erkennen. Weitere Spektren wurden für Echozeiten bis  $T_E = 150$  ms aufgenommen. Auch hier wurde quantitativ ausgewertet, mit welchen Zeitkonstanten die maximale Intensität der Signalkomponenten 1 bis 6 abnimmt. Tabelle 21 zeigt die zugehörigen Ergebnisse.

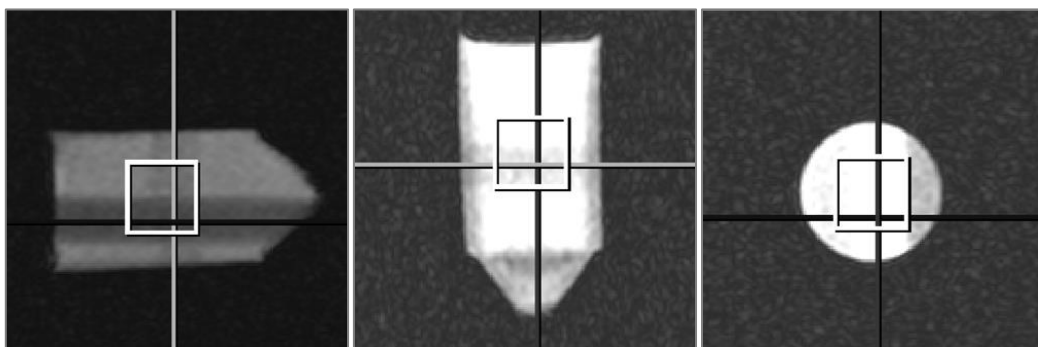
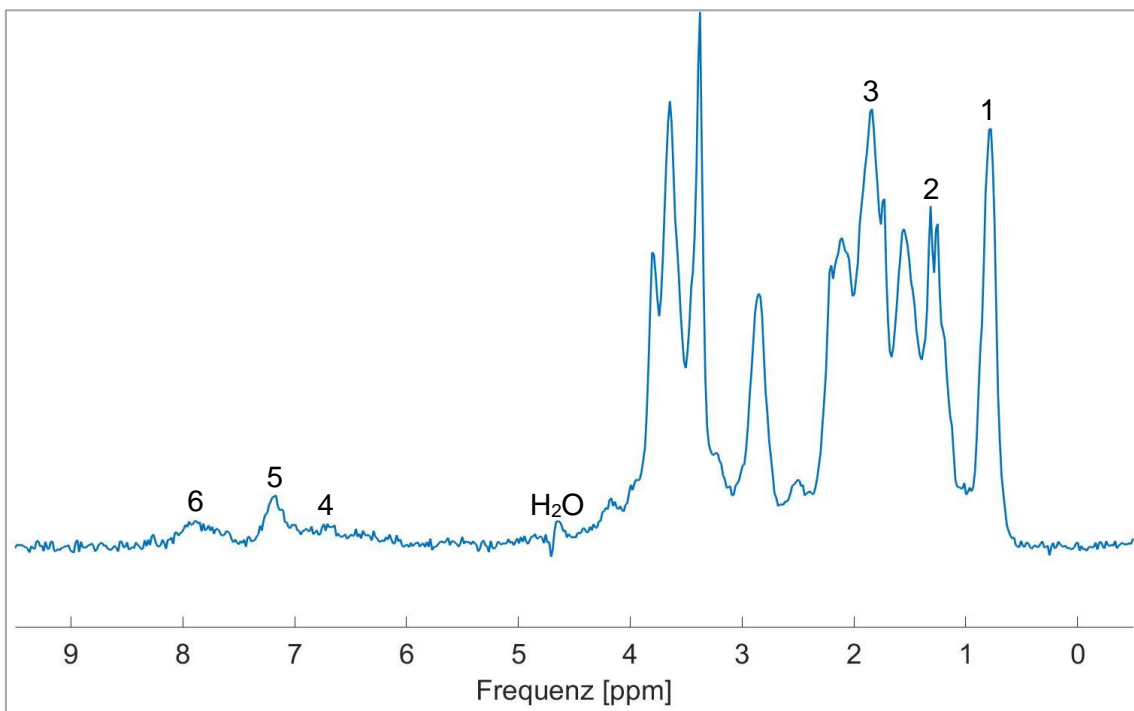


Abbildung 58: STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdautem Sehnenewebe in flüssiger Form ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Das STEAM-Spektrum von vollständig in den flüssigen Zustand überführtem Sehngewebe zeigte schmalere Signalbereiche als die Spektren von enzymatisch verdaulichem Sehngewebe, welches noch feste Bestandteile enthielt. Das lag vermutlich daran, dass bei der Spektroskopie einer Flüssigkeit ein besserer Shim möglich ist. Dadurch wurden weitere Frequenzkomponenten sichtbar, die den Aminosäuren Prolin, Lysin und Valin zugeordnet werden können. Außerdem ist eine größere Menge an Kollagen in Lösung gegangen, nachdem das komplette Sehngewebe enzymatisch verdaut worden war.

Sowohl die STEAM-Spektroskopie als auch der Signalabfall in der UTE-Bildgebung wiesen für Sehngewebe, welches komplett in den flüssigen Zustand überführt worden war, dieselben Charakteristika wie für die Lösung von Kollagenpulver in Wasser auf. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass das Enzym Kollagenase B das Kollagen des Sehngewebes soweit abgebaut hat, dass das gelöste Kollagen in einer ähnlichen Form wie in Kollagenpulver vorliegt. Diese Vermutung ist mit der Funktionsweise des Enzyms Kollagenase vereinbar. Das Enzym spaltet kollagenspezifische Peptidbindungen und erzeugt dadurch kürzere Peptidketten. Infolge dessen wird auch die Tripelhelix des Kollagens aufgelöst.



Tabelle 21: Ermittelte  $T_2$ -Werte der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum für das Sehnenpräparat 3 in flüssiger Form

$T_2$		
<b>Signalbereich 1 (0,8 ppm)</b>	64,60 ms	(58,93 ms; 71,43 ms) $R^2 = 0,9827$
<b>Signalbereich 2 (1,25 ppm)</b>	62,34 ms	(57,01 ms; 68,73 ms) $R^2 = 0,9838$
<b>Signalbereich 3 (1,9 ppm)</b>	51,60 ms	(44,70 ms; 60,98 ms) $R^2 = 0,9515$
<b>Signalbereich 4 (6,7 ppm)</b>	111,8 ms	(84,39 ms; 165,8 ms) $R^2 = 0,7817$
<b>Signalbereich 5 (7,15 ppm)</b>	94,07 ms	(81,97 ms; 110,4 ms) $R^2 = 0,9494$
<b>Signalbereich 6 (7,9 ppm)</b>	84,46 ms	(66,53 ms; 115,7 ms) $R^2 = 0,8519$

Vergleicht man die Zeitkonstanten für den transversalen Signalabfall der spektralen Komponenten bei 0,8 ppm und 1,25 ppm für das in den flüssigen Zustand überführte Sehngewebe mit den Werten für die unterschiedlichen Konzentrationen an Kollagenpulver, so ist davon auszugehen, dass die erzeugte Lösung einen Kollagen-Massenanteil von ungefähr 4 % bis 6 % hatte. Die entsprechenden STEAM-Spektren zeigten auch qualitativ eine hohe Übereinstimmung. Der relativ niedrige Kollagenanteil kam unter anderem dadurch zustande, dass Sehngewebe neben Kollagen auch relevanten Mengen an Wasser enthält.

Abbildung 59 vergleicht das STEAM-Spektrum des vollständig enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 3 mit dem STEAM-Spektrum desselben Präparats, als dieses lediglich mechanisch zerkleinert war und in Flüssigkeit gemessen wurde. Für beide STEAM-Spektren waren die Messparameter  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, 256 Mittlungen und 13 x 13 x 13 mm Voxelgröße. Die STEAM-

Spektren wurden mit Wassersättigung aufgenommen. Die Spektren können bei gleicher Skalierung miteinander verglichen werden, weil in beiden Fällen mit der gleichen Verstärkereinstellung gemessen wurde. Es ist zu erkennen, dass die kollagenspezifischen spektralen Komponenten erst nach dem Abbau des organisierten Kollagens durch das Enzym Kollagenase im STEAM-Spektrum sichtbar geworden sind.

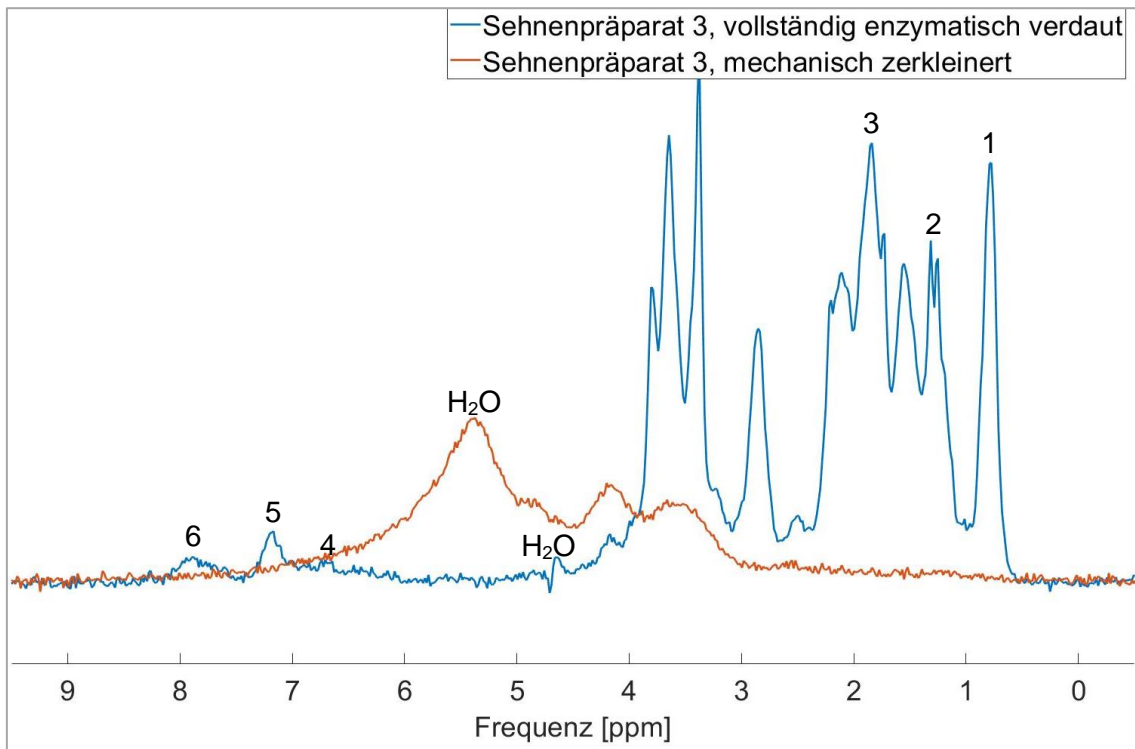


Abbildung 59: STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdaulichem Sehnen- gewebe in flüssiger Form im Vergleich zum Zustand vor der enzymatischen Behandlung ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Vergleicht man die STEAM-Spektren der unterschiedlichen Konzentrationen von gelöstem Kollagenpulver in Wasser mit dem STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdaulichem Sehnen- gewebe, so zeigt die 6%ige Lösung die höchste Übereinstimmung damit. Die beiden STEAM-Spektren wurden mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, 256 Mittlungen,  $13 \times 13 \times 13$  mm Voxelgröße und mit Wassersättigung aufgenommen und sind in Abbildung 60 zu sehen. Der

Vergleich ist auch in diesem Fall bei gleicher Skalierung möglich, weil beide Spektren mit der gleichen Empfindlichkeit für das Rauschen aufgenommen wurden. Insbesondere die spektralen Komponenten mit chemischen Verschiebungen zwischen 0,8 ppm und 2,2 ppm zeigen qualitativ und quantitativ eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden STEAM-Spektren. Die Signalebereiche zwischen 6 ppm und 9 ppm weisen im STEAM-Spektrum der 6%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser eine höhere Intensität auf.

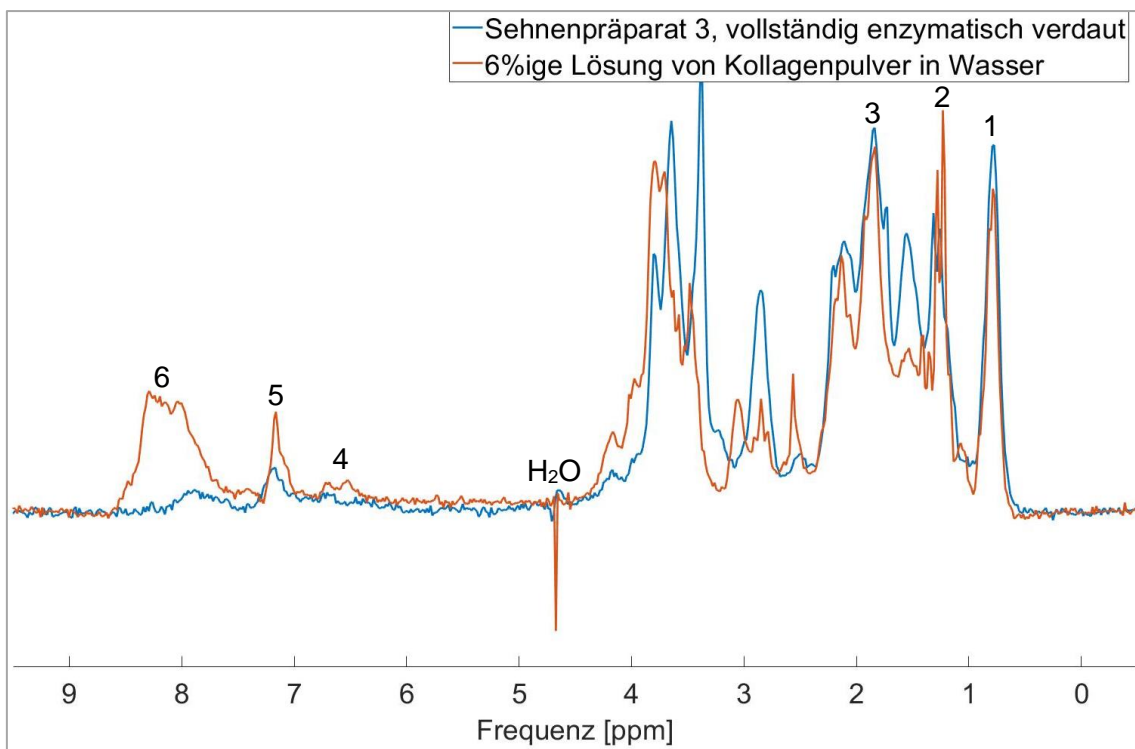


Abbildung 60: STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdautem Sehnenewebe in flüssiger Form im Vergleich zu 6%iger Lösung von Kollagenpulver in Wasser ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten

Im Frequenzbereich zwischen 0 ppm und 3 ppm ist es möglich, die Herkunft der einzelnen spektralen Komponenten bestimmten Aminosäuren zuzuordnen. Vergleicht man die NMR-Spektren der Aminosäuren Lysin, Valin, Prolin und Hydroxyprolin als Referenz (49) mit dem vorliegenden Spektrum, so erhält man

die in Abbildung 61 gezeigte Zuordnung. Diese Aminosäuren kommen mit einer relativ hohen Häufigkeit in Kollagen vor.

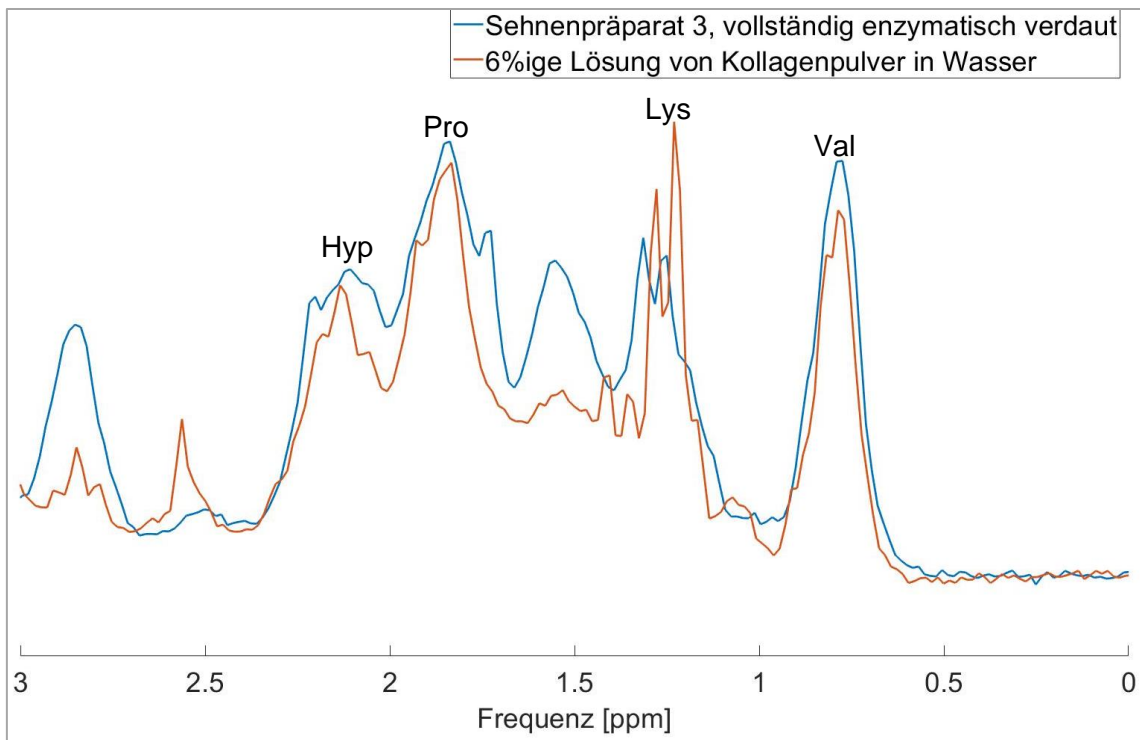


Abbildung 61: Zuordnung der spektralen Komponenten in den STEAM-Spektren ( $T_E = 5,4$  ms, mit Wasserunterdrückung) von vollständig enzymatisch verdautem Sehnenewebe und 6%iger Lösung von Kollagenpulver in Wasser zu bestimmten Aminosäuren

## 5.4 UTE-Bildgebung und Spektroskopie kollagenhaltiger Komponenten von Skelettmuskulatur

### 5.4.1 Muskelseptum

Das Muskelpräparat, das für die Messung verwendet wurde, enthielt ein kräftig ausgeprägtes Muskelseptum. Für dieses Muskelseptum wurde ebenfalls der Abfall der Signalintensität ermittelt, indem ein länglicher Bereich im Zentrum des Muskelseptums umfahren und dessen Fläche den ermittelten Werten zugrunde gelegt wurde. Die Entwicklung der Signalintensität ist in Abbildung 62 zu sehen. Der Kurvenverlauf lässt im Wesentlichen einen exponentiellen Abfall der Signalintensität erkennen. Zwischen den Zeitpunkten 0,05 ms und 17,75 ms fällt die Signalintensität um etwa 83,03 % ab. Die Signalintensität sinkt relativ schnell ab und oszilliert über das gesamte dargestellte Zeitintervall mit einer Periodendauer von ungefähr 2 ms. Ein starker Abfall der Signalintensität zum Zeitpunkt 9 ms, wie für Kollagenhydrolysat zu beobachten war, konnte hier nicht identifiziert werden.

Für das Muskelseptum wurde trotz der leichten Oszillationen eine biexponentielle Kurvenanpassung nach Gleichung 4 durchgeführt. Für die kurze und die lange Signalkomponente wurden mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9937$  die Werte ermittelt, die in Tabelle 22 aufgeführt sind.

Das Muskelseptum zeigte in der UTE-Bildgebung eine schnell abfallende Signalkomponente mit  $T_2^* = 0,42$  ms. Trotz der niedrigen Signalfraktion der schnell relaxierenden Komponente von ungefähr 15 % bestätigten die Ergebnisse, dass im Muskelseptum Kollagen enthalten ist. Die fest gebundenen Wasserstoffkerne sind der kurzen Signalkomponente zuzuordnen. Die ermittelten Werte für das Muskelseptum weisen Charakteristika auf, die auch für Sehngewebe gezeigt werden konnten.

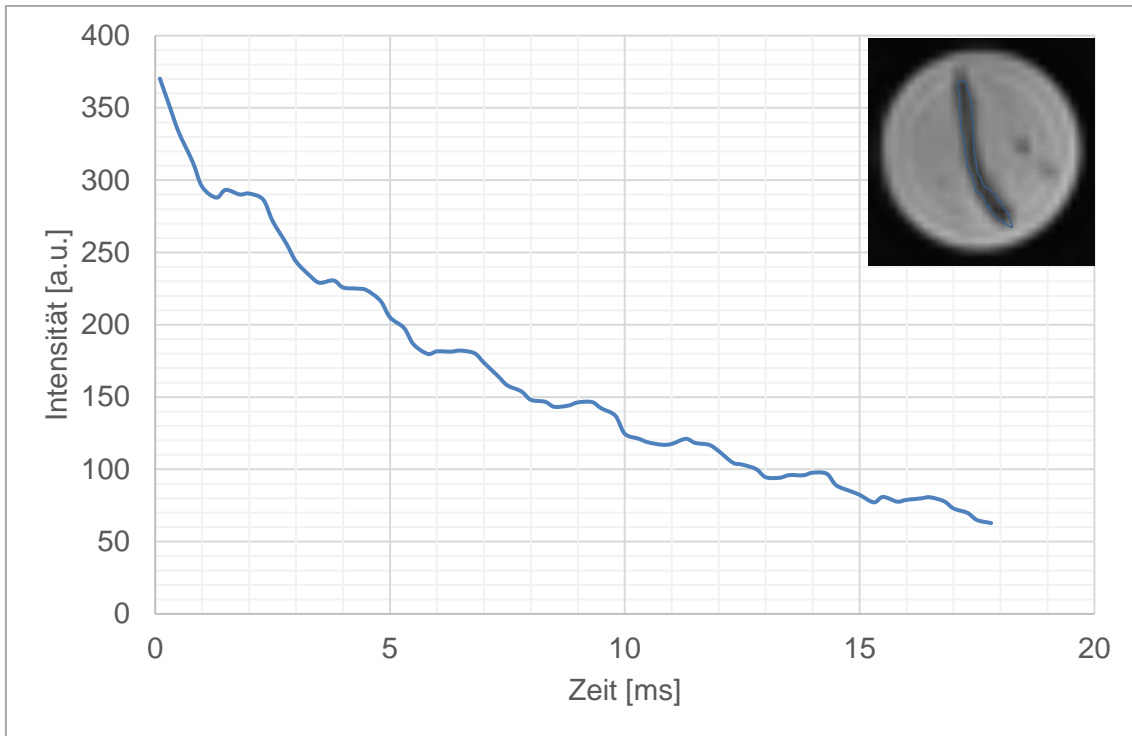


Abbildung 62: Signalintensität eines Muskelseptums in einer UTE-Sequenz mit Lokalisation der ROI

Tabelle 22: Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Muskelseptum

Parameter	95%-Konfidenzintervall
$T_{2,s}^* = 0,4168 \text{ ms}$	0,2581 ms; 1,083 ms
$Fraction_s = 14,87 \%$	10,11 %; 19,30 %
$T_{2,l}^* = 10,84 \text{ ms}$	10,54 ms; 11,16 ms
$Fraction_l = 85,13 \%$	80,70 %; 89,89 %

## 5.4.2 Muskel-Sehnen-Übergang

Am Muskel-Sehnen-Übergang gehen die beiden beteiligten Gewebearten ineinander über. Abbildung 63 zeigt das Spektrum eines 10 x 10 x 20 mm großen Voxels, das jeweils etwa zur Hälfte Muskel- und Sehnenewebe beinhaltet. Die STEAM-Spektroskopie erfolgte mit  $T_E = 5,4$  ms,  $T_R = 1500$  ms, 256 Mittlungen und ohne Wassersättigung. Wie im Spektrum des Muskelgewebes ist im Frequenzbereich bei 1,3 ppm eine erhöhte Signalintensität vorhanden.

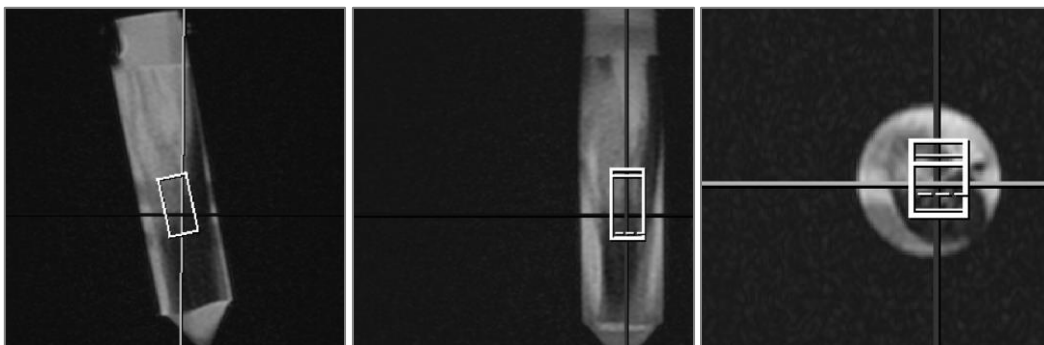
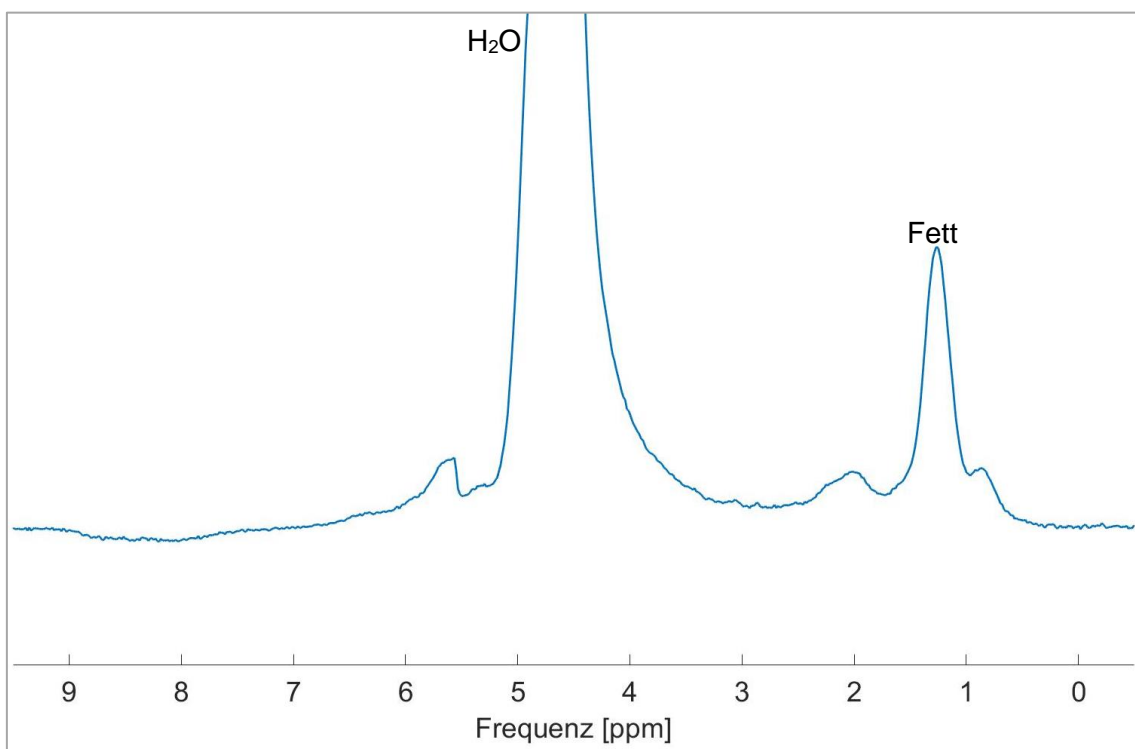


Abbildung 63: STEAM-Spektrum des Muskel-Sehnen-Übergangs ( $T_E = 5,4$  ms, ohne Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen

## 6 Diskussion

### 6.1 UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Kollagenhydrolysat

#### 6.1.1 Lösung von Kollagenpulver in Wasser

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen mit denen von Siu et al. (40) verglichen. Siu et al. (40) führten ebenfalls Messungen von Kollagenhydrolysat mit einer UTE-Sequenz mit variablen Echozeiten durch. Auch in dieser Studie kam NeoCell Super Collagen Type I and III Powder zum Einsatz. Die verwendete bi-exponentielle Beschreibung der Signalintensität durch Gleichung 1 geht davon aus, dass sich das gesamte Magnitudensignal als Summe von zwei Signalkomponenten beschreiben lässt. Nach diesem Modell oszilliert eine Signalkomponente mit einer bestimmten Frequenz und ihr wird ein kurzer  $T_2^*$ -Wert zugeordnet. Siu et al. (40) gehen davon aus, dass diese schnell relaxierende Signalkomponente durch die Protonen im Kollagenmolekül selbst entsteht. Die andere Signalkomponente nach Gleichung 1 hat ein längeres  $T_2^*$  und wird laut Siu et al. (40) durch Wassermoleküle hervorgerufen.

Für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser stimmten die ermittelten Anteile der beiden Signalkomponenten gut mit den Ergebnissen von Siu et al. (40) überein. Verglichen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lagen die  $T_2^*$ -Werte bei Siu et al. (40) jedoch für die schnell abfallende Signalkomponente um etwa 56 % niedriger und für die langsam abfallende Komponente um circa 82 % niedriger. Teilweise können diese Abweichungen dem  $T_2^*$ -Effekt zugeschrieben werden, da Siu et al. (40) einen Scanner mit 7 T Feldstärke verwendeten. Die Frequenz, mit der das Kollagensignal oszilliert, weist zwischen den beiden Messungen eine gute Übereinstimmung auf. Dabei wurde berücksichtigt, dass  $B_0$  bei Siu et al. (40) 7 T betrug.



Das FID-Spektrum und das STEAM-Spektrum von in Wasser gelöstem Kollagenpulver zeigten jeweils drei bis vier Signalbereiche mit chemischen Verschiebungen zwischen 0,7 ppm und 2,2 ppm. Sowohl Kaflak-Hachulska et al. (25) als auch Siu et al. (40) konnten diese Signalkomponenten in den entsprechenden Frequenzbereichen ebenfalls identifizieren. Die ermittelte Oszillationsfrequenz von 445,2 Hz entspricht einer chemischen Verschiebung von ungefähr 1,09 ppm. Damit passt das aufgenommene Spektrum, in dem sich die Signalbereiche in diesem Bereich gruppieren, gut mit der berechneten Frequenz zusammen. Siu et al. (40) konnten in ihren Messungen eine vergleichbare Korrelation zwischen Frequenz und Spektrum bei 1,1 ppm feststellen. Bei Kaflak-Hachulska et al. (25) befand sich für gelöstes Kollagenpulver Typ I eine Signalkomponente bei 1,5 ppm.

### **6.1.2 Lösung von Kollagenpulver in Deuteriumoxid**

Ma et al. (34) führten bei menschlichen Achillessehnen und kortikalem Knochengewebe vom Rind einen Austausch von  $H_2O$  zu  $D_2O$  durch. Die Messungen mittels UTE-Bildgebung ergaben bei Ma et al. (34), dass die Signalintensität nach dem Austausch schneller abfällt. Ein schnellerer Intensitätsabfall bei Lösung in  $D_2O$  konnte für Kollagenpulver auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Die Messwerte widersprechen allerdings der Schlussfolgerung von Ma et al. (34), dass Protonen, die in Kollagen gebunden sind, mit UTE-Sequenzen nicht detektiert werden können. Dem gegensätzlichen Fazit von Siu et al. (34), die ebenfalls mit Kollagenpulver arbeiteten, ist auf der Grundlage der durchgeführten Messungen zuzustimmen. Ähnliche Ergebnisse wie für den Austausch von  $H_2O$  zu  $D_2O$  berichteten Ma et al. (34) für die Entfernung der austauschbaren Wassermoleküle mittels Gefriertrocknung.

Es ist zu berücksichtigen, dass sich die Struktur des Kollagens zwischen menschlichem und tierischem Gewebe, das Ma et al. (34) untersuchten, und Kollagenhydrolysat wesentlich unterscheidet. Im hydrolysierten Zustand liegen kurze Peptide vor. Die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur von nativem Kollagen ist

teilweise beziehungsweise vollständig zerstört. Aufgrund dessen ist die Vergleichbarkeit zwischen den Messungen von Siu et al. (40), denen der vorliegenden Arbeit und den Untersuchungen von Ma et al. (34) limitiert.

### **6.1.3 Eigenschaften der spektralen Komponenten von gelöstem Kollagenpulver in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O**

Es konnte gezeigt werden, dass der transversale Signalabfall der drei charakteristischen Kollagen-Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum von der Konzentration von Kollagenpulver in Wasser abhängig ist. Je niedriger die Kollagenkonzentration ist, desto höher sind die T<sub>2</sub>-Werte in der STEAM-Spektroskopie mit verschiedenen Echozeiten. Für Kollagenkonzentrationen unter 10 % konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht ausnahmslos gezeigt werden. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass die Konzentrationen der Proben relativ nah beieinander lagen. Außerdem wird das Signal-Rauschen-Verhältnis bei niedrigen Konzentrationen schlechter.

Für die Chemical-Shift-Bereiche bei 0,8 ppm und 1,25 ppm zeigte sich für die Konzentrationen größer als 10 % ein linearer Zusammenhang. Dieser setzte sich für die Konzentrationen unter 10 % nicht ohne Weiteres fort. Siu et al. (40) untersuchten unterschiedliche Konzentrationen von Kollagenpulver in Wasser mittels UTE-Bildgebung und schlossen dabei niedrige Konzentrationen von ihrer Auswertung aus. Grund dafür waren bei Siu et al. (40) Schwierigkeiten bei der Anpassung der Signalparameter. Dennoch sind die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit nützlich zur groben Abschätzung des Kollagenanteils anderer Proben, die beispielsweise aus Sehngewebe hergestellt worden sind.

## 6.2 UTE-Bildgebung und Spektroskopie von Sehnen- gewebe

### 6.2.1 Gesundes Sehnen-gewebe

Der Signalabfall von gesundem Sehnen-gewebe wurde mit der beschriebenen UTE-Sequenz mit variablen Echozeiten untersucht. Mathematisch wurde die Signalintensität in Abhängigkeit von der Echozeit als Summe zweier Exponential-funktionen angepasst. Die Intensität beider Signalkomponenten fällt hierbei jeweils exponentiell ab.

Juras et al. (24) zeigten, dass die Ermittlung der  $T_2^*$ -Werte anhand eines solchen bi-exponentiellen Modells einem mono-exponentiellen Modell überlegen ist. Die-  
sem Ergebnis lagen Untersuchungen zur Diagnose einer Tendinopathie der Achillessehne zugrunde. Du et al. (11) untersuchten verschiedene menschliche und tierische Gewebe aus dem Bewegungsapparat und kamen zu dem Schluss, dass Knorpel, Menisken, Bänder, Sehnen und Knochengewebe durch einen bi-exponentiellen Signalabfall in UTE-Sequenzen mit variablen Echozeiten be-schrieben werden können. Arbeiten, die die Aussagekraft des mono- und bi-ex-  
ponentiellen Modells vergleichend untersuchten, kamen zu dem Ergebnis, dass das bi-exponentielle Modell besser geeignet ist (6, 7, 24). Daneben gibt es auch Studien, in denen bei Sehnen ein mono-exponentieller Signalabfall für die Be-rechnung von  $T_2^*$  angenommen wurde (15).

Die UTE-Messungen einer Sehne vom Rind ergaben  $T_2^*$ -Werte von etwa 0,74 ms für die schnell abfallende Signalkomponente und circa 10 ms für die langsamer abfallende Komponente. In mehreren Studien wurden unter unter-schiedlichen Fragestellungen die  $T_2^*$ -Werte für Sehnen-gewebe mit einer bi-ex-  
ponentiellen Analyse ermittelt (6, 7, 9, 23, 24).  $T_2^*$  lag für die schnell relaxierende Signalkomponente zwischen 0,3 ms und 1,3 ms und für die langsam relaxierende Komponente zwischen 8,2 ms und 20,4 ms. Die in der vorliegenden Arbeit ge-messenen  $T_2^*$ -Werte für Sehnen-gewebe lagen in beiden Fällen innerhalb des

jeweiligen Intervalls und stimmen insofern mit den bisherigen Untersuchungen überein. Der Anteil, den die schnell abfallende Signalkomponente zum Gesamtsignal beiträgt, lag bei Du et al. (11) für die Achillessehne vom Rind bei 71 %. In der vorliegenden Arbeit wurde mit etwa 58 % eine niedrigere Signalfraktion ermittelt.

Sehnen weisen zwar einen einheitlichen histologischen Aufbau auf, dennoch müssen diverse Einflussfaktoren auf die Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen berücksichtigt werden. Die Lokalisation der Sehne und die Spezies, von der die Sehne stammt, können Unterschiede in den  $T_2^*$ -Werten und den Signalfraktionen verursachen. Ebenso ist von Bedeutung, ob die jeweiligen Messungen in vivo oder in vitro durchgeführt wurden. Bei in-vitro-Messungen sind Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter des Präparats und der Zusammensetzung der Flüssigkeit, in der es aufbewahrt und gemessen wurde, zu erwarten. Der Magic-Angle-Effekt muss berücksichtigt werden, da sich  $T_2^*$  je nach Orientierung der Sehnenfasern zum statischen Magnetfeld  $B_0$  teilweise stark verändert (14). Alle genannten Punkte führen dazu, dass die ermittelten  $T_2^*$ -Werte und die Fraktionen der beiden Signalkomponenten nur eingeschränkt mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen werden können.

Diaz et al. (9) untersuchten Sehngewebe mittels UTE-Bildgebung mit variablen Echozeiten, um gebundenes und freies Wasser zu quantifizieren. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgenommene STEAM-Spektrum einer Sehne ist in Abbildung 44 dargestellt. Es zeigte eine Signalkomponente bei 1,3 ppm. In diesem Frequenzbereich liegen auch die für Kollagenhydrolysat charakteristischen Signalkomponenten. Daher wäre es möglich, dass die chemischen Verschiebungen in diesem Bereich durch Wasserstoffkerne im Kollagenmolekül zustande kommen, wenngleich möglicherweise auch ein Fettsignal vorliegt.

Die erneute Messung der Sehne mittels UTE-Bildgebung nach 14 Tagen ergab einen leicht angestiegenen  $T_2^*$ -Wert von ungefähr 1,1 ms für die schnell abfallende Signalkomponente. Ihre Signalfraktion lag mit 66 % ebenfalls höher. Im Gegensatz dazu blieb der  $T_2^*$ -Wert der langsam abfallenden Signalkomponente konstant. Sämtliche Werte liegen innerhalb der Intervalle der Werte, die mithilfe

eines bi-exponentiellen Modells für Sehnengewebe ermittelt wurden (6, 7, 9, 23, 24). In Anbetracht der Tatsache, dass die Abweichungen gering sind, ist davon auszugehen, dass der Organisationsgrad von Sehnengewebe innerhalb der untersuchten Zeitspanne lediglich geringen Einflüssen unterlag.

### **6.2.2 Magic-Angle-Effekt von Sehnengewebe**

Berendsen (4) stellte 1962 fest, dass die Querrelaxation von Sehnengewebe von der Orientierung zum Magnetfeld abhängig ist. Er konnte bei einem Winkel von  $55^\circ$  zwischen der Längsrichtung der Sehne und  $B_0$  eine um den Faktor fünf höhere Signalintensität als bei  $0^\circ$  messen. Untersuchungen von Fullerton et al. (13) zufolge verändern Variationen des Winkels zwischen der Verlaufsrichtung der Sehne und dem statischen Magnetfeld  $B_0$  die Intensität der gemessenen Spin-echo-Signale um den Faktor sechs. Dies kommt durch Dipoleffekte zustande. Krasnosselskaia et al. (28) kamen zu dem Ergebnis, dass sich die Amplitude des FID-Signals in vergleichbarer Weise verändert. Der Magic-Angle-Effekt konnte für die Achillessehnen menschlicher Körperspender (10), die oberflächlichen Beugesehnen von Pferden in vitro (39) und die Sehnen der Rotatorenmanschette menschlicher Körperspender (52) nachgewiesen werden. Die erwähnten Untersuchungen haben übereinstimmend ergeben, dass  $T_2^*$  für den magischen Winkel von circa  $55^\circ$  ein Maximum hat und die Signalintensität in  $T_2$ -gewichteten Bildern unter diesem Winkel am höchsten ist (5). Bei einem Winkel von  $90^\circ$  sind die Signalintensität und  $T_2^*$  geringfügig höher als bei  $0^\circ$  (5).

Für die Achillessehne ermittelten Fullerton et al. (13) einen Anstieg von  $T_2$  von 0,6 ms auf 22 ms und Henkelman et al. (17) einen Anstieg von 7 ms auf 23 ms, wenn die Sehne in einem Winkel von  $55^\circ$  statt  $0^\circ$  zum Magnetfeld ausgerichtet wurde. Die UTE-Messungen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass der  $T_2^*$ -Wert der schnell abfallenden Signalkomponente von etwa 0,3 ms auf 2,0 ms ansteigt, wenn der Winkel von  $0^\circ$  auf  $55^\circ$  verändert wird. Dies entspricht einem Anstieg ungefähr um den Faktor sechs. Für die Zeitpunkte 5 ms, 10 ms und

15 ms wurde jeweils der Quotient der Signalintensitäten bei 55° und 0° berechnet. Die bei 55° gemessene Intensität lag jeweils um den Faktor 7,3 bis 8,6 höher als bei 0°. Diese Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeiten von Fullerton et al. (13) und Krasnosselskaia et al. (28).

Neben dem  $T_2^*$ -Wert der schnell abfallenden Signalkomponente ist auch die zugehörige Signalfraktion ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Geschwindigkeit, mit der die Signalintensität abfällt. Mit der Ausrichtung der Sehne im 55°-Winkel zum Magnetfeld wurde der Anteil, den die schnell abfallende Komponente zum Gesamtsignal beiträgt, deutlich niedriger. Er lag für 55° bei ungefähr 34 %, wohingegen er bei der entlang dem Magnetfeld orientierten Sehne etwa 89 % betrug. Wurde die Sehne senkrecht zum Magnetfeld ausgerichtet, so trug die schnelle Signalkomponente einen Anteil von circa 82 % zum Gesamtsignal bei. Der zugehörige  $T_2^*$ -Wert lag bei circa 1,5 ms und war damit höher als bei 0°. Die Signalintensität lag bei 90° um den Faktor 2,2 höher als bei 0°, wenn die Echozeit 5 ms betrug. Für  $T_E = 10$  ms betrug der Faktor ungefähr 1,3.

Eigentlich würde man lediglich eine  $T_2^*$ -Änderung bei gleichbleibenden Anteilen der Signalfractionen erwarten, weil sich die molekulare Zusammensetzung der Sehne nicht in Abhängigkeit von der Orientierung zum Magnetfeld ändert. Die bi-exponentielle Anpassung der Intensität des Magnitudensignals als Funktion der Echozeit hat jedoch die aufgeführten Ergebnisse ergeben. Dabei handelt es sich um mathematische Anpassungen der gemessenen Werte, die entsprechend kritisch hinterfragt werden müssen.

Li und Mirowitz (30) verwendeten verschiedene Sequenzen, um Werte für die unterschiedliche Signalintensität in Abhängigkeit von der Orientierung der Sehne zum Magnetfeld zu ermitteln. Diese stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

### 6.2.3 Enzymatisch verdautes Sehngewebe

Die durchgeführten Messungen haben gezeigt, dass die  $T_2^*$ -Werte bei Sehngewebe nach der lokalen Injektion einer Kollagenase ansteigen. Bachmann et al. (3) behandelten ebenfalls Sehnenpräparate enzymatisch und führten ein  $T_2^*$ -Mapping durch. In der genannten Arbeit konnte nach der Behandlung mit hochkonzentrierter Kollagenase B ein signifikanter Anstieg von  $T_2^*$  an der Injektionsstelle nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von Sehnen mit einem Enzym, welches die Querverbindungen von Kollagen zerstört, bei Bachmann et al. (3) nicht zu einer signifikanten Veränderung der  $T_2^*$ -Werte im Vergleich zu den Kontrollpräparaten. In Anbetracht der Tatsache, dass auch in der vorliegenden Arbeit das Enzym Kollagenase B verwendet wurde, konnten die Ergebnisse von Bachmann et al. (3) bestätigt werden. Rahal et al. (14) behandelten Sehngewebe mit einer anderen Kollagenase. Sie stellten in der  $T_2^*$ -gewichteten Bildgebung einen Intensitätsanstieg an der Injektionsstelle des Enzyms fest.

Wenn eine enzymatische Lösung an einer bestimmten Stelle in eine Sehne injiziert wird, kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die veränderten Signaleigenschaften durch das Enzym oder die Flüssigkeit selbst zustande kommen. Bachmann et al. (3) betrachteten histologische Schnitte der Kollagenase-behandelten Sehnenpräparate im Vergleich zu den Kontrollpräparaten. An der Injektionsstelle des Enzyms konnten Degenerationszeichen, wie beispielsweise abgerissene Kollagenfasern, identifiziert werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der Anstieg von  $T_2^*$  in der bi-exponentiellen Kurvenanpassung tatsächlich durch die veränderte molekulare Struktur des Kollagens erzeugt wurde.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist das Auftreten von Kollagensignalen in der  $^1\text{H}$ -Spektroskopie nach der vollständigen enzymatischen Aufspaltung von tierischem Sehnenmaterial. Das Enzym Kollagenase bewirkt, dass das vorhandene Kollagen hydrolysiert und in Flüssigkeit aufgelöst wird. Dadurch wird Kollagen in STEAM-Spektren mit  $T_E = 5,4$  ms signalgebend.

## 6.3 Methodisches Vorgehen

Die verwendeten Messesequenzen waren im Wesentlichen geeignet für die zu untersuchende Fragestellung. Dennoch gehen mit den einzelnen Messmethoden gewisse Limitationen einher, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Mit der verwendeten UTE-Sequenz mit spiralförmigem Auslesen des Rohdatenraums wurden Messungen mit einer Serie variabler Echozeiten zwischen 0,05 ms und 17,75 ms durchgeführt, deren Abstand in der Regel 0,25 ms betrug. Sowohl dieses Zeitintervall als auch die kürzeste Echozeit  $T_E = 0,05$  ms ermöglichten bei den meisten Proben eine ausreichende Kontrastierung, obwohl Kollagen schnell relaxiert. Bei manchen Proben wären entweder zusätzliche längere Echozeiten oder kürzere Echozeiten als 0,05 ms hilfreich gewesen. Bei kortikalem Knochengewebe handelte es sich um eine Probe, die so schnell relaxiert, dass mit der verwendeten UTE-Sequenz keine Messungen mit einem akzeptablen Signal-Rausch-Verhältnis durchgeführt werden konnten. Während man unter Anpassung anderer Messparameter wie beispielsweise der Repetitionszeit  $T_R$  ohne größere Probleme in einem gewissen Rahmen Messungen mit längeren Echozeiten als 17,75 ms durchführen kann, gestaltet sich die Verkürzung der Echozeit auf unter 0,05 ms aus technischen Gründen schwieriger.

Bei den UTE-Messungen der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das Magnitudensignal aufgenommen und ausgewertet. Dabei handelt es sich nur um einen Teil der Informationen, welche mit dieser Messmethode gewonnen werden können. Im Rahmen weiterer Untersuchungen von Kollagen mittels UTE-Bildgebung würde es sich anbieten, auch die Phaseninformation bei der Auswertung der Daten zu berücksichtigen.

Bei der Untersuchung von tierischem Gewebe lieferte die UTE-Bildgebung in der Regel eine ausreichende Bildqualität, um geeignete ROIs für die Auswertung auszuwählen. Die Beschaffenheit von biologischem Gewebe unterliegt allerdings diversen Einflussfaktoren, so dass die Proben untereinander in einem gewissen Rahmen Unterschiede aufweisen.



Die volumenselektive STEAM-Spektroskopie kam insbesondere mit  $T_E = 5,4$  ms zum Einsatz und erzeugte für flüssige Proben  $^1\text{H}$ -Spektren mit guter Qualität. Bei nativem Sehngewebe hingegen gestaltete sich der Messprozess deutlich schwieriger und die STEAM-Spektren wiesen ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf. Bei der STEAM-Spektroskopie vergeht eine vergleichsweise lange Zeit zwischen der Erzeugung des Echos und dem Auslesen der Daten. Angesichts dessen, dass Kollagen in Sehngewebe sehr schnell relaxiert, würden STEAM-Spektren mit kürzeren Echozeiten eventuell zusätzliche Informationen über die spektralen Signalkomponenten liefern. Möglicherweise ließe sich das Messprotokoll in Zukunft diesbezüglich optimieren. Grundsätzlich ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Messmethode der Spektroskopie primär für Flüssigkeiten und weniger für Festkörper entwickelt wurde.

Die Methode der FID-Spektroskopie ermöglichte die Aufnahme von FID-Spektren mit einer zeitlichen Verzögerung von 0,1 ms ab dem Ende des HF-Pulses. Ein weiterer Vorteil der FID-Spektroskopie ist, dass man FID-Spektren aufgrund des ähnlichen Sequenzablaufs mit den Ergebnissen der UTE-Bildgebung vergleichen kann. Die Lösung von Kollagenpulver in Wasser wurde für die FID-Spektroskopie in einen Tischtennisball gefüllt, damit der Einfluss von Feldinhomogenitäten möglichst gering bleibt. Dieses Ziel im Hinblick auf die Messqualität war mit Festkörpern wie beispielsweise einer tierischen Sehne nicht zu erreichen. Daher wurde der einfacher durchzuführenden volumenselektiven STEAM-Spektroskopie in der vorliegenden Arbeit meist der Vorzug gegeben. Einen weiteren Erkenntnisgewinn könnte die Entwicklung einer volumenselektiven FID-Spektroskopie als Messmethode liefern.

Die meisten Messungen mit den beschriebenen Sequenzen wurden mit der Kopfspule durchgeführt. Dabei konnte in der Regel innerhalb einer akzeptablen Messzeit ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Es ist jedoch möglich, dass man mit der Handgelenksspule, welche für ein deutlich geringeres Volumen sensitiv ist, Messergebnisse mit einer besseren Qualität erhalten könnte. Dies würde jedoch die Verwendung kleinerer Probengefäße erforderlich machen.

## 6.4 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende neue Erkenntnisse zu den Signaleigenschaften von Kollagen in der UTE-Bildgebung, FID-Spektroskopie und STEAM-Spektroskopie gewonnen werden:

Das Signal von Lösungen von Kollagenpulver in  $H_2O$  und  $D_2O$  zeigt in der UTE-Bildgebung als Funktion der Echozeit ein charakteristisches Muster. Sowohl das FID-Spektrum als auch die STEAM-Spektren von in  $H_2O$  gelöstem Kollagenpulver zeigen mehrere charakteristische Signale. Diese liegen bei chemischen Verschiebungen von 0,8 ppm, 1,25 ppm, 1,8 ppm, 6,6 ppm, 7,1 ppm und 8,1 ppm relativ zum Signal von TMS. Die Signalkomponenten bei 6,6 ppm und 8,1 ppm sind teilweise nur schwach ausgeprägt vorhanden, wenn das Kollagenpulver in  $D_2O$  anstelle von  $H_2O$  gelöst wird. Daher ist davon auszugehen, dass diese beiden Signalkomponenten durch austauschbare Wasserstoffatome zustande kommen. Die  $T_2$ -Relaxation der Signalbereiche in den STEAM-Spektren erfolgt für Lösungen in  $H_2O$  jeweils langsamer, wenn die Konzentration niedrig ist, nach enzymatischer Verdauung mit einer Kollagenase und bei höherer Messtemperatur.

Die Signalintensität von Lösungen von Gelatinepulver in  $H_2O$  zeigt in der UTE-Bildgebung als Funktion der Echozeit einen Intensitätsabfall. Dieser weist ein charakteristisches Muster auf. Mittels STEAM-Spektroskopie können dieselben Signalkomponenten wie für in  $H_2O$  gelöstes Kollagenpulver dargestellt werden. Bei Gelatine ist das Signal-Rausch-Verhältnis jedoch schlechter. Behandelt man eine Gelatinelösung mit dem Enzym Kollagenase, so wird Gelatine zu kurzen Peptidfragmenten, wie sie in Kollagenpulver vorliegen, abgebaut. Das Produkt der enzymatischen Behandlung ist flüssig und weist in der UTE-Bildgebung und STEAM-Spektroskopie dieselben qualitativen Eigenschaften wie die Lösungen von Kollagenpulver in Wasser auf.

In organisiertem Sehngewebe, welches einen hohen Anteil an Kollagen Typ I enthält, zeigen die STEAM-Spektren neben dem Wassersignal lediglich ein Fett-

signal mit einer chemischen Verschiebung von 1,3 ppm zu TMS. Für die Signalintensität in der UTE-Bildgebung ist zu vermuten, dass hauptsächlich Wasser zum Magnitudensignal beiträgt und nur geringe Mengen an Kollagen. Kollagen weist in Sehngewebe eine tripelhelikale Struktur auf. Vermutlich relaxiert Kollagen in dieser Form zu schnell, um mit den verwendeten Methoden spektroskopisch detektiert werden zu können. Dieses Phänomen gilt es in Zukunft näher zu untersuchen. Ebenso ist noch unklar, ob bei der STEAM-Spektroskopie von Sehngewebe freies und gebundenes Wasser gegeneinander frequenzverschoben sind.

Zerkleinert man Sehngewebe mechanisch und behandelt es anschließend mit dem Enzym Kollagenase, so wird auf molekularer Ebene die Kollagen-Tripelhelix zu kurzen Peptidfragmenten abgebaut. Makroskopisch sind keine festen Bestandteile mehr zu erkennen und der Aggregatzustand ist flüssig. Wie bei Kollagenhydrolysat zeigen die STEAM-Spektren Signalkomponenten bei chemischen Verschiebungen von 0,8 ppm, 1,25 ppm, 1,8 ppm, 6,6 ppm, 7,1 ppm und 8,1 ppm relativ zum Signal von TMS. Wenn man STEAM-Spektren mit unterschiedlichen Echozeiten aufnimmt, ist festzustellen, dass die einzelnen Signalkomponenten ähnliche  $T_2$ -Werte wie für die Lösungen von Kollagenpulver in Wasser aufweisen. Auch in der UTE-Bildgebung zeigt das mechanisch zerkleinerte, enzymatisch behandelte und anschließend in Wasser gelöste Sehngewebe dieselben Charakteristika wie Kollagenhydrolysat.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Kollagen in einer beliebigen Form durch die enzymatische Verdauung mit Kollagenase in eine Lösung von kurzen Kollagenpeptiden überführt werden kann. Die zugehörigen Signaleigenschaften in UTE-Bildgebung und STEAM-Spektroskopie entsprechen denen einer Lösung von Kollagenpulver in Wasser.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die  $^1\text{H}$ -Signaleigenschaften von Kollagen in der Magnetresonanztomographie und MR-Spektroskopie untersucht. Es wurden in-vitro-Experimente durchgeführt, um neue Informationen für die nichtinvasive Erkennung fibrotischer Erkrankungen zu gewinnen. Vernetztes Kollagen relaxiert sehr schnell und gibt bei Messungen mit Ganzkörper-MRT kein messbares Signal. Deshalb kamen Messprotokolle für UTE-Bildgebung, FID-Spektroskopie und STEAM-Spektroskopie mit kurzen Echozeiten zur Anwendung.

Mit gelöstem Kollagenpulver und Gelatine wurde Kollagen zunächst in hydrolysierte Form untersucht. Messungen von Kollagen in organisierter Form wurden mit tierischem Sehngewebe und kollagenhaltigen Bestandteilen von Skelettmuskelgewebe durchgeführt. Durch die Behandlung von mechanisch zerkleinertem Sehngewebe mit dem Enzym Kollagenase war es möglich, Kollagen aus der organisierten in die hydrolysierte Form zu überführen.

In der UTE-Bildgebung zeigt die Signalintensität von in Wasser aufgelöstem Kollagenpulver als Funktion der Echozeit ein charakteristisches Muster. Dieses erzeugen auch Gelatine und Sehngewebe, wenn sie mit dem Enzym Kollagenase in den flüssigen Zustand überführt werden. Bei Sehngewebe ist hauptsächlich das enthaltene Wasser signalgebend.

Kollagen in hydrolysierte Form zeigt charakteristische Signale von kollagengebundenen Atomen in  $^1\text{H}$ -Spektren, die mit Ganzkörper-MR-Tomographen aufgenommen wurden. Die Signalkomponenten entstehen teilweise durch austauschbare Wasserstoffkerne. Diese Signalbereiche sind bei gelöstem Kollagenpulver in  $\text{D}_2\text{O}$  weniger deutlich vorhanden als in  $\text{H}_2\text{O}$ .

In organisierter Form weist Kollagen eine tripelhelikale Struktur auf und relaxiert so schnell, dass auch bei kurzen Echozeiten keine kollagenspezifischen Signalkomponenten in den Spektren zu erkennen sind: Dies wird dadurch bestätigt,

dass die Spektren von unbehandeltem tierischem Sehngewebe hier kein Kollagensignal zeigen. Verarbeitet man das Sehngewebe mechanisch und enzymatisch zu einer Flüssigkeit und löst es in H<sub>2</sub>O, so entspricht das Spektrum danach weitgehend dem von Kollagenhydrolysat.

# Literaturverzeichnis

1. Altersberger I. Wie werden Kollagenpeptide hergestellt? 2019 [07.04.2020]. URL: <https://bioaktive-kollagenpeptide.de/herstellung/>.
2. Araujo ECA, Azzabou N, Vignaud A, Guillot G, Carlier PG. Quantitative ultrashort TE imaging of the short-T(2) components in skeletal muscle using an extended echo-subtraction method. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2017;78(3):997-1008.
3. Bachmann E, Roskopf AB, Gotschi T, Klarhofer M, Deligianni X, Hilbe M, et al. T1- and T2\*-Mapping for Assessment of Tendon Tissue Biophysical Properties: A Phantom MRI Study. *Investigative Radiology*. 2019;54(4):212-220.
4. Berendsen H. Nuclear Magnetic Resonance Study of Collagen Hydration. *The Journal of Chemical Physics*. 1962;36:3297-3305.
5. Bydder M, Rahal A, Fullerton GD, Bydder GM. The magic angle effect: a source of artifact, determinant of image contrast, and technique for imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2007;25(2):290-300.
6. Chang EY, Du J, Iwasaki K, Biswas R, Statum S, He Q, et al. Single- and bi-component T2\* analysis of tendon before and during tensile loading, using UTE sequences. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2015;42(1):114-120.
7. Chang EY, Du J, Statum S, Pauli C, Chung CB. Quantitative bi-component T2\* analysis of histologically normal Achilles tendons. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. 2015;5(2):58-62.
8. Deutzmann R, Bruckner P. Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 931-951.
9. Diaz E, Chung CB, Bae WC, Statum S, Znamirovski R, Bydder GM, et al. Ultrashort echo time spectroscopic imaging (UTESI): an efficient method

- for quantifying bound and free water. *NMR in Biomedicine*. 2012;25(1):161-168.
10. Du J, Pak BC, Znamirovski R, Statum S, Takahashi A, Chung CB, et al. Magic angle effect in magnetic resonance imaging of the Achilles tendon and enthesis. *Magnetic Resonance Imaging*. 2009;27(4):557-564.
  11. Du J, Diaz E, Carl M, Bae W, Chung CB, Bydder GM. Ultrashort echo time imaging with bicomponent analysis. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2012;67(3):645-649.
  12. Friebolin H. Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie. In: Friebolin H (Hrsg.). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 3. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 1999. S. 1-42.
  13. Fullerton GD, Cameron IL, Ord VA. Orientation of tendons in the magnetic field and its effect on T2 relaxation times. *Radiology*. 1985;155(2):433-435.
  14. Fullerton GD, Rahal A. Collagen structure: the molecular source of the tendon magic angle effect. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2007;25(2):345-361.
  15. Grosse U, Springer F, Hein T, Grozinger G, Schabel C, Martirosian P, et al. Influence of physical activity on T1 and T2\* relaxation times of healthy Achilles tendons at 3T. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2015;41(1):193-201.
  16. Harris RK, Becker ED, Cabral de Menezes SM, Goodfellow R, Granger P. *NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts*. IUPAC Recommendations 2001. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2002;22(4):458-483.
  17. Henkelman RM, Stanisz GJ, Kim JK, Bronskill MJ. Anisotropy of NMR properties of tissues. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1994;32(5):592-601.
  18. Hodgson RJ, Evans R, Wright P, Grainger AJ, O'Connor PJ, Helliwell P, et al. Quantitative magnetization transfer ultrashort echo time imaging of the Achilles tendon. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2011;65(5):1372-1376.

19. Hollmach S, Kruschke J. Gelatine – Eigenschaften, Herstellung und molekulare Struktur 2016 [07.04.2020]. URL: <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/gelatine/gelatine.htm>.
20. Huster D. Solid-state NMR investigations of the hydration and molecular dynamics of collagen in biological tissue. In: Webb GA (Hrsg.). Modern Magnetic Resonance. Cham: Springer International Publishing; 2018. S. 363-380.
21. Jerban S, Ma Y, Dorthe EW, Kakos L, Le N, Alenezi S, et al. Assessing cortical bone mechanical properties using collagen proton fraction from ultrashort echo time magnetization transfer (UTE-MT) MRI modeling. Bone Reports. 2019;11:100220.
22. Jerban S, Ma Y, Namiranian B, Ashir A, Shirazian H, Wei Z, et al. Age-related decrease in collagen proton fraction in tibial tendons estimated by magnetization transfer modeling of ultrashort echo time magnetic resonance imaging (UTE-MRI). Scientific Reports. 2019;9(1):17974.
23. Juras V, Zbyn S, Pressl C, Valkovic L, Szomolanyi P, Frollo I, et al. Regional variations of T(2)\* in healthy and pathologic achilles tendon in vivo at 7 Tesla: preliminary results. Magnetic Resonance in Medicine. 2012;68(5):1607-1613.
24. Juras V, Apprich S, Szomolanyi P, Bieri O, Deligianni X, Trattng S. Bi-exponential T2 analysis of healthy and diseased Achilles tendons: an in vivo preliminary magnetic resonance study and correlation with clinical score. European Radiology. 2013;23(10):2814-2822.
25. Kafak-Hachulska A, Samoson A, Kolodziejcki W. 1H MAS and 1H --> 31P CP/MAS NMR study of human bone mineral. Calcified Tissue International. 2003;73(5):476-486.
26. Kalbitzer HR. Proteine – Struktur und Funktion. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 61-85.
27. Kijowski R, Wilson JJ, Liu F. Bicomponent ultrashort echo time T2\* analysis for assessment of patients with patellar tendinopathy. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2017;46(5):1441-1447.



28. Krasnosselskaia LV, Fullerton GD, Dodd SJ, Cameron IL. Water in tendon: orientational analysis of the free induction decay. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2005;54(2):280-288.
29. Krasnosselskaia LV. Mechanisms for Short T2 and T2\* in Collagen-Containing Tissue. In: Young IR, Bydder GM, Fullerton GD (Hrsg.). *MRI of Tissues with Short T2s or T2\*s*. Chichester, West Sussex: Wiley; 2012. S. 31-41.
30. Li T, Mirowitz SA. Manifestation of magic angle phenomenon: comparative study on effects of varying echo time and tendon orientation among various MR sequences. *Magnetic Resonance Imaging*. 2003;21(7):741-744.
31. Liu G, Qin Q, Chan KW, Li Y, Bulte JW, McMahon MT, et al. Non-invasive temperature mapping using temperature-responsive water saturation shift referencing (T-WASSR) MRI. *NMR Biomed*. 2014;27(3):320-331.
32. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Binde- und Stützgewebe. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E (Hrsg.). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2019. S. 147-210.
33. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Muskelgewebe. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E (Hrsg.). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2019. S. 268-298.
34. Ma YJ, Chang EY, Bydder GM, Du J. Can ultrashort-TE (UTE) MRI sequences on a 3-T clinical scanner detect signal directly from collagen protons: freeze-dry and D<sub>2</sub>O exchange studies of cortical bone and Achilles tendon specimens. *NMR in Biomedicine*. 2016;29(7):912-917.
35. Qian Y, Boada FE. Acquisition-weighted stack of spirals for fast high-resolution three-dimensional ultra-short echo time MR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2008;60(1):135-145.
36. Schick F. Bone marrow NMR in vivo. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1996;29(3):169-227.
37. Schick F. Grundlagen der Magnetresonanztomographie. *Der Radiologe*. 2007;47 Suppl 1:S7-23; quiz S24-25.

38. Schiller J, Naji L, Huster D, Kaufmann J, Arnold K. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C HR-MAS NMR investigations on native and enzymatically digested bovine nasal cartilage. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 2001;13(1):19-27.
39. Sherlock CE, Mair TS. Magic angle effect on low field magnetic resonance images in the superficial digital flexor tendon in the equine proximal pastern region. *Veterinary Journal*. 2016;217:126-131.
40. Siu AG, Ramadeen A, Hu X, Morikawa L, Zhang L, Lau JY, et al. Characterization of the ultrashort-TE (UTE) MR collagen signal. *NMR in Biomedicine*. 2015;28(10):1236-1244.
41. Springer F, Martirosian P, Machann J, Schwenzler NF, Claussen CD, Schick F. Magnetization transfer contrast imaging in bovine and human cortical bone applying an ultrashort echo time sequence at 3 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2009;61(5):1040-1048.
42. Springer F, Steidle G, Martirosian P, Grosse U, Syha R, Schabel C, et al. Quick water-selective excitation of fast relaxing tissues with 3D UTE sequences. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2014;71(2):534-543.
43. Syha R, Springer F, Grozinger G, Wurslin C, Ipach I, Ketelsen D, et al. Short-term exercise-induced changes in hydration state of healthy Achilles tendons can be visualized by effects of off-resonant radiofrequency saturation in a three-dimensional ultrashort echo time MRI sequence applied at 3 Tesla. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2014;40(6):1400-1407.
44. Weishaupt D. Bildgebung jenseits von Morphologie und Struktur. In: Weishaupt D, Marincek B, Köchli VD (Hrsg.). *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 105-108.
45. Weishaupt D. Bildkontrast. In: Weishaupt D, Marincek B, Köchli VD (Hrsg.). *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 11-19.
46. Weishaupt D. Determinanten des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. In: Weishaupt D, Marincek B, Köchli VD (Hrsg.). *Wie funktioniert MRI? Eine*

Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 29-40.

47. Weishaupt D. Relaxation. In: Weishaupt D, Marincek B, Köchli VD (Hrsg.). Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 7-10.
48. Winkler T, Martirosian P, Schleicher E, Stemmer A, Schick F. Behaviour of the signal components of collagen solutions in vitro using UTE-MRI and MRS sequences. International Society of Magnetic Resonance in Medicine 27th Annual Meeting; 11.05.2019 - 16.05.2019; Montréal.
49. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018 [04.07.2021]. URL: <https://www.hmdb.ca/>.
50. Wurzinger LJ. Bewegungssystem. In: Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, et al. (Hrsg.). Duale Reihe Anatomie. 5., korrigierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2020. S. 243-515.
51. Young IR. An Introduction to Short and Ultrashort T2/T2\* Echo Time (UTE) Imaging. In: Young IR, Bydder GM, Fullerton GD (Hrsg.). MRI of Tissues with Short T2s or T2\*s. Chichester, West Sussex: Wiley; 2012. S. 3-14.
52. Zhu Y, Cheng X, Ma Y, Wong JH, Xie Y, Du J, et al. Rotator cuff tendon assessment using magic-angle insensitive 3D ultrashort echo time cones magnetization transfer (UTE-Cones-MT) imaging and modeling with histological correlation. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2018;48(1):160-168.

# Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Kollagen-Tripelhelix.....	7
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Gelatine .....	12
Abbildung 3:	Aufbau von Kollagen in Pulverform.....	14
Abbildung 4:	Graphische Darstellung der $T_1$ -Relaxation nach $90^\circ$ -Anre- gung.....	20
Abbildung 5:	Graphische Darstellung der $T_2$ -Relaxation nach $90^\circ$ -Anre- gung.....	21
Abbildung 6:	Sequenzablauf zur Rohdatenaufnahme einer Zeile im k- Raum .....	24
Abbildung 7:	Ablauf einer 3D-„stack-of-spirals“-UTE-Sequenz.....	30
Abbildung 8:	Ablauf einer STEAM-Sequenz .....	34
Abbildung 9:	Ablauf einer FID-Spektroskopie .....	35
Abbildung 10:	Leeres 50-ml-Polypropylen-Röhrchen .....	40
Abbildung 11:	Sehnenpräparat .....	42
Abbildung 12:	Muskelpräparat .....	42
Abbildung 13:	Schneidmühle .....	43
Abbildung 14:	Zerkleinertes Sehngewebe .....	43
Abbildung 15:	Zerkleinertes Sehngewebe mit Pufferlösung .....	44
Abbildung 16:	Enzymatisch abgebautes Sehngewebe in flüssiger Form .....	45
Abbildung 17:	Schematische Darstellung der Auflösung der Kollagen-Tri- pelhelix durch das Enzym Kollagenase .....	46
Abbildung 18:	Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 50%ige Lö- sung von Kollagenpulver in Wasser mit Lokalisation der ROI .....	48

Abbildung 19:	Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 25%ige Lösung von Kollagenpulver in Wasser mit Lokalisation der ROI .....	48
Abbildung 20:	Kurvenanpassung der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O .....	50
Abbildung 21:	FID-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser (mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	51
Abbildung 22:	STEAM-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	53
Abbildung 23:	Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O .....	55
Abbildung 24:	FID-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O (mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	57
Abbildung 25:	STEAM-Spektrum einer 50%igen Lösung von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	58
Abbildung 26:	STEAM-Spektren 50%iger Lösungen von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O und H <sub>2</sub> O ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	59
Abbildung 27:	Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität der charakteristischen Kollagen-Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O .....	61
Abbildung 28:	Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität weiterer Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O .....	61
Abbildung 29:	Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität der charakteristischen Kollagen-Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O .....	62
Abbildung 30:	Zeitlicher Abfall der Intensität weiterer spektraler Frequenzbereiche im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O .....	62

Abbildung 31:	Mono-exponentielle Kurvenanpassung für die maximale Intensität des Frequenzbereichs bei 0,8 ppm im STEAM-Spektrum für die 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O .....	63
Abbildung 32:	Zeitkonstanten T <sub>2</sub> für den Signalabfall der maximalen Intensität der Kollagen-Frequenzbereiche in der STEAM-Spektroskopie für Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O .....	65
Abbildung 33:	Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in DPBS nach der enzymatischen Behandlung und als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung .....	68
Abbildung 34:	Signalintensität von 25%iger Gelatinelösung in einer UTE-Sequenz mit Lokalisation der ROI .....	70
Abbildung 35:	Kurvenanpassung der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für eine 25%ige Lösung von Gelatinepulver in H <sub>2</sub> O .....	71
Abbildung 36:	STEAM-Spektrum einer 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser (T <sub>E</sub> = 5,4 ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	72
Abbildung 37:	STEAM-Spektren einer 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser und einer 25%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser (T <sub>E</sub> = 5,4 ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	74
Abbildung 38:	STEAM-Spektrum einer auf 65 °C erwärmten 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser (T <sub>E</sub> = 5,4 ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	75
Abbildung 39:	STEAM-Spektren einer auf 65 °C erwärmten und einer nicht erwärmten 25%igen Lösung von Gelatinepulver in Wasser (T <sub>E</sub> = 5,4 ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	76
Abbildung 40:	Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 25%ige Lösung von Gelatinepulver in DPBS nach der enzymatischen Behandlung und als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung .....	78
Abbildung 41:	STEAM-Spektren für die mit Kollagenase behandelte 25%ige Lösung von Kollagenpulver in DPBS und die nicht	

	enzymatisch behandelte Kontrolle ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	79
Abbildung 42:	Signalintensität von Sehngewebe in einer UTE-Sequenz mit Lokalisation der ROI .....	80
Abbildung 43:	Kurvenanpassung der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe .....	81
Abbildung 44:	STEAM-Spektrum von Sehngewebe ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen .....	83
Abbildung 45:	Signalintensität von Sehngewebe in einer UTE-Sequenz nach 14 Tagen mit Lokalisation der ROI.....	84
Abbildung 46:	STEAM-Spektrum von Sehngewebe nach 21 Tagen ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) .....	85
Abbildung 47:	Signalintensität einer Sehne in unterschiedlicher Orientierung zum Magnetfeld in einer UTE-Sequenz.....	86
Abbildung 48:	MR-Bild des mit Collagenase B behandelten Sehnenpräparats.....	88
Abbildung 49:	Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 1 vor und nach der enzymatischen Behandlung mit Lokalisation der ROIs .....	89
Abbildung 50:	Verlauf der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 2 als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung .....	90
Abbildung 51:	STEAM-Spektrum von Sehngewebe mit OVS (Outer Volume Suppression) bei $T_E = 5,4$ ms und mit Wasserunterdrückung mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen .....	92
Abbildung 52:	Zeitlicher Abfall der maximalen Intensität des Frequenzbereichs bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für Sehngewebe .....	93
Abbildung 53:	STEAM-Spektrum des mechanisch zerkleinerten und enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 1 ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	97
Abbildung 54:	STEAM-Spektrum des mechanisch zerkleinerten und enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 3 ( $T_E = 5,4$ ms, mit	

	Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	98
Abbildung 55:	Abfall der maximalen Intensität der Kollagen-Signalbereiche für im STEAM-Spektrum das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 3 .....	99
Abbildung 56:	Intensitätsabfall weiterer Signalbereiche im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 3 .....	99
Abbildung 57:	Signalintensität des vollständig enzymatisch verdauten Sehnenpräparats 3 in einer UTE-Sequenz .....	102
Abbildung 58:	STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdautem Sehngewebe in flüssiger Form ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen und Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	103
Abbildung 59:	STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdautem Sehngewebe in flüssiger Form im Vergleich zum Zustand vor der enzymatischen Behandlung mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	106
Abbildung 60:	STEAM-Spektrum von vollständig enzymatisch verdautem Sehngewebe in flüssiger Form im Vergleich zu 6%iger Lösung von Kollagenpulver in Wasser ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) mit Nummerierung von sechs charakteristischen Signalkomponenten .....	107
Abbildung 61:	Zuordnung der spektralen Komponenten in den STEAM-Spektren ( $T_E = 5,4$ ms, mit Wasserunterdrückung) von vollständig enzymatisch verdautem Sehngewebe und 6%iger Lösung von Kollagenpulver in Wasser zu bestimmten Aminosäuren.....	108
Abbildung 62:	Signalintensität eines Muskelseptums in einer UTE-Sequenz mit Lokalisation der ROI.....	110
Abbildung 63:	STEAM-Spektrum des Muskel-Sehnen-Übergangs ( $T_E = 5,4$ ms, ohne Wasserunterdrückung) mit Positionierung des Voxels in drei Raumrichtungen .....	111



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Sequenzparameter der verwendeten UTE-Sequenz .....	38
Tabelle 2:	Sequenzparameter der verwendeten STEAM-Sequenz ...	39
Tabelle 3:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O .....	50
Tabelle 4:	Chemische Verschiebungen der Signalkomponenten der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser im FID-Spektrum .....	52
Tabelle 5:	Signal-Rausch-Verhältnis der Signalbereiche der 50%igen Lösung von Kollagenpulver in Wasser in STEAM-Spektren mit unterschiedlicher Anzahl an Mittlungen (T <sub>E</sub> = 5,4 ms).	54
Tabelle 6:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in D <sub>2</sub> O .....	56
Tabelle 7:	Ermittelte Zeitkonstanten T <sub>2</sub> für den transversalen Signalabfall der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum von 50%iger Lösung von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O und D <sub>2</sub> O .....	64
Tabelle 8:	T <sub>2</sub> -Werte für die maximale Intensität der Kollagen-Signalbereiche in der STEAM-Spektroskopie für Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von Kollagenpulver in H <sub>2</sub> O	66
Tabelle 9:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 50%ige Lösung von Kollagenpulver in DPBS nach der enzymatischen Behandlung (Kollagenprobe 1) und als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung (Kollagenprobe 2).....	69
Tabelle 10:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für 25%ige Lösung von Gelatine in H <sub>2</sub> O .....	71
Tabelle 11:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe.....	82
Tabelle 12:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe nach 14 Tagen.....	84

Tabelle 13:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für Sehngewebe in unterschiedlicher Orientierung zum Magnetfeld.....	87
Tabelle 14:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 1 vor und nach der enzymatischen Behandlung .....	89
Tabelle 15:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Sehnenpräparat 2 als Kontrolle ohne enzymatische Behandlung .....	91
Tabelle 16:	Ermittelter $T_2$ -Wert der spektralen Komponente bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für Sehngewebe .....	93
Tabelle 17:	Ermittelte $T_2$ -Werte des Frequenzbereichs bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für zerkleinertes Sehngewebe.....	95
Tabelle 18:	Ermittelte $T_2$ -Werte der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 3 .....	100
Tabelle 19:	Ermittelte $T_2$ -Werte der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte und enzymatisch verdaute Sehnenpräparat 1 .....	101
Tabelle 20:	Ermittelter $T_2$ -Wert des Signals bei 1,3 ppm im STEAM-Spektrum für das zerkleinerte Sehnenpräparat 2 .....	101
Tabelle 21:	Ermittelte $T_2$ -Werte der spektralen Komponenten im STEAM-Spektrum für das Sehnenpräparat 3 in flüssiger Form .....	105
Tabelle 22:	Berechnete Signalparameter des Verlaufs der Signalintensität in einer UTE-Sequenz für das Muskelseptum.....	110

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Sektion für Experimentelle Radiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Fritz Schick durchgeführt.

Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dr. Fritz Schick.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Petros Martirosian) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 28.06.2022

Tobias Michael Lober

# Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Dr. Fritz Schick bedanken für die Überlassung des Promotionsthemas, für die Möglichkeit, in der Sektion für Experimentelle Radiologie im Rahmen meiner Promotion eigenständig zu forschen, für die hervorragende Betreuung in allen Phasen meiner Arbeit und für die tatkräftige Unterstützung bei größeren und kleineren Herausforderungen.

Vielen Dank auch an Dr. Petros Martirosian und alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Sektion für Experimentelle Radiologie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Denkanstöße mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch all denjenigen, die mich bei der Auswahl der zu untersuchenden Proben beraten haben, mir die benötigten Proben zur Verfügung gestellt haben und dadurch die Messungen überhaupt erst ermöglicht haben.

Namentlich erwähnen möchte ich Simone Breitmaier aus dem Sekretariat der Sektion für Experimentelle Radiologie, Prof. Dr. Erwin Schleicher aus der Inneren Medizin IV des Universitätsklinikums Tübingen, Prof. Dr. Dominique Lunter und Klaus Weyhing aus der Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie der Universität Tübingen, PD Dr. Sabrina Ehnert aus dem Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen, Prof. Dr. Fabian Springer aus der Radiologie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen sowie die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Städtischen Schlachthofs Balingen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie ganz herzlich für die große Unterstützung während der Arbeit an meiner Dissertation und während des gesamten Studiums bedanken.

