

In vitro T₁- und T₂-Relaxationszeiten von gerinnendem Blut und Thromben

In vitro T₁ and T₂ Relaxation Times of Coagulating Blood and Thrombuses

U. M. Landler, K. Hergan, E. Justich

Universitätsklinik für Radiologie Landeskrankenhaus Graz

und

H. Sterk

Institut für Organische Chemie, Karl Franzens Universität, Heinrichstraße 28, A-8010 Graz

Z. Naturforsch. **42c**, 1135–1139 (1987); received March 25, 1987

¹H Relaxation of Blood, ²³Na Relaxation of Blood, ¹H Relaxation of Thrombuses, ²³Na Relaxation of Thrombuses

A comparison between blood and thrombuses is made on behalf of T₁ and T₂ relaxation data. Thereby, the time interval between the withdrawal and the measurement of blood forms a parameter of investigation. Among the thrombuses the surgically removed ones are compared with those aggregated in blood during course of time. As the most outstanding result one can see that the formation of thrombuses changes significantly the T₁ and T₂ relaxation times of ¹H and ²³Na. The values of the relaxation times obtained for those thrombuses which have aggregated within the blood are thereby comparable with those relaxation times found for the surgically removed ones.

Einleitung

Die Kernspintomographie hat sich in kurzer Zeit in der Diagnostik verschiedener pathologischer Krankheitszustände außerordentlich bewährt [1–3]. Vor allem bei der Erkennung von Fremdgeweben und deren Differenzierung sowie bei der Darstellung von Erkrankungen im zentralen Nervensystem konnten erstaunliche Erfolge verzeichnet werden. Aber auch auf dem Gebiet der vaskulären Krankheiten wie Thrombosen und Durchblutungsstörungen dürften interessante diagnostische und im weiteren klinische Fortschritte zu erwarten sein [4, 5].

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung bestand darin, herauszufinden, ob ein Thrombus je nach Alter seinen Wassergehalt bzw. seine Natriumionen-Konzentration und damit die ¹H- bzw. ²³Na-Relaxationszeiten ändert.

Instrumente und Meßmaterial

Das Meßsystem bestand aus einem Varian XL-200 NMR-Spektrometer mit einer Feldstärke von 4.7 Tesla. Trotz der niedrigeren Feldstärken (ca. 1.5 Tesla) bei den herkömmlichen Kernspintomographen sind keine wesentlichen Unterschiede in den Meßergebnissen zu erwarten, da erst dann, wenn die

Resonanzfrequenzen von Wasserstoff um Zehnerpotenzen variieren, Differenzen signifikant werden [6, 7]. Die Untersuchung hinsichtlich der Spin-Gitter-Relaxationszeit T₁ erfolgte unter Verwendung der inversion recovery Methode [8], die Spin-Spin-Relaxationszeit T₂ wurde mit Hilfe der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Methode [9] bestimmt. Die Standardabweichung überschritt in keinem Fall +/– 7%. Die in den Abbildungen sowie Tabellen ersichtlichen größeren Abweichungen erklären sich aus der Messung unterschiedlicher Blutproben. Die Gesamtzahl der Proben für ¹H-Untersuchungen belief sich auf 36 Stück. Davon entfielen auf:

1. Langzeitmessungen ($n = 15$): Messungen zwei Stunden nach Blutabnahme und wöchentlich bis zur 5. Woche;
2. Frischblutmessungen ($n = 6$): Messungen sofort nach Blutabnahme und stündlich bis zur fünften Stunde;
3. Thromben aus frischem Operationsmaterial ($n = 9$);
4. Blutproben für sonstige Untersuchungen ($n = 6$).

Im Hinblick auf das Relaxationsverhalten des Natriums wurden:

1. Frischblutmessungen ($n = 5$) wie oben;
2. Langzeitmessungen ($n = 6$) wie oben;
3. Thromben aus frischem Operationsmaterial ($n = 4$) untersucht.

Reprint requests to Prof. Dr. H. Sterk.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/87/0900-1135 \$ 01.30/0

Ergebnisse

Zeitliche Veränderungen von Blut und Gerinnungsthromben

Änderungen der T_1 Relaxationszeit

Zur Festlegung der zeitlichen Veränderung von Gerinnungsthromben ist das Blut im Anschluß an die Abnahme in 5-mm-Meßröhren abgefüllt worden. Die erste Messung erfolgte sofort, die weiteren im Abstand von jeweils einer Stunde. Nach zwei Stunden war in der Regel ein Gerinnungsthrombus zu erkennen, die Veränderungen dieser Gerinnungsthromben wurden durch weitere Messungen zunächst bis zur fünften Stunde verfolgt. Für Langzeituntersuchungen ist Blut nach 2 Std. und dann allwöchentlich bis zur 5ten Woche vermessen worden. Die Vermessung getrennter Proben für Kurzzeit- und Langzeituntersuchungen sollte allfällige Veränderungen, die im Magnetfeld bei der Aufnahme stattfinden könnten, hintanhalten. In allen Fällen gelangten im Rahmen der ^1H -Untersuchungen die Gerinnungsthromben, die sich im Meßröhren gebildet hatten, zusammen mit dem abgeschiedenen Serum zur Vermessung. Die Proben sind weder mechanisch noch in einer anderen Art und Weise während dieser Zeit verändert worden. Der Mittelwert der Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 aus den 15 bzw. 6 Messungen zeigte die nachstehenden zeitabhängigen Veränderungen (siehe Abb. 1, 2).

Die erste Messung, sofort nach der Blutabnahme, ergab im Durchschnitt als T_1 -Zeit 1,2 Sec., was mit Messungen über Blut bzw. Hämatomen von Brown *et al.* [4] korreliert. Bis zur fünften Stunde konnte man bei T_1 nur eine geringfügige Verkürzung um etwa 20% beobachten.

Bei den Langzeitmessungen fällt auf, daß in den ersten beiden Wochen nach der Blutentnahme ein rascher Abfall der T_1 -Werte einsetzt: Abnahme: 1. Woche: 500 msec, 2. Woche: 300 msec. Danach erfolgt ein Anstieg um etwa 200 msec und ab der 3. Woche fallen die T_1 -Werte wieder stetig ab. Die Ursache des zwischenzeitlichen Anstieges liegt vermutlich darin, daß einerseits der Thrombus von innen durch Plasmin aufgelöst wird und andererseits sich ein Gleichgewicht zwischen dem Thrombusinneren und dem Außenraum durch einen osmotisch bedingten Flüssigkeitsstrom einstellt. Letztlich aber sinkt der Thrombus in sich zusammen und verfestigt sich weiter, so daß die T_1 -Werte wieder abfallen. *In vivo* wird ein stetiger Abfall zu erwarten sein, da dort

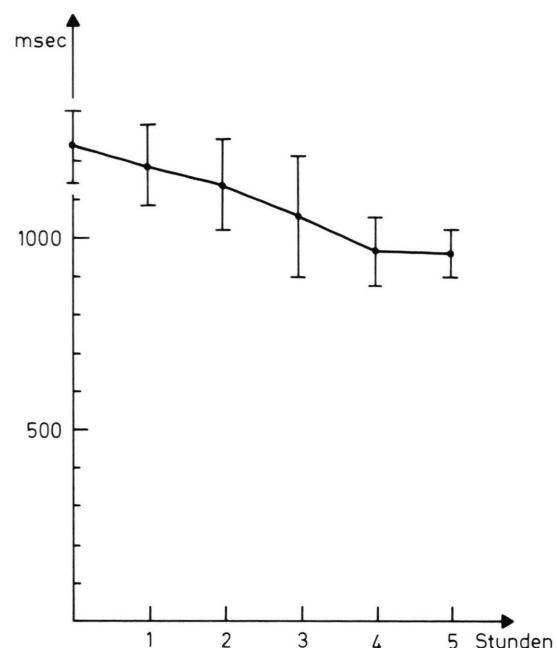


Abb. 1. Verlauf der ^1H - T_1 -Relaxationszeit in den ersten 5 Stunden. Die Balken symbolisieren den Ergebnisbereich der einzelnen Messungen.

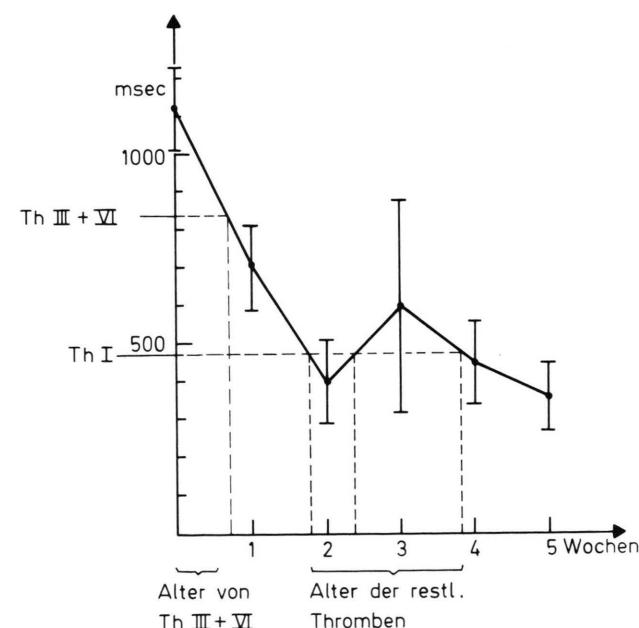


Abb. 2. Verlauf der ^1H - T_1 -Relaxationszeit innerhalb von 5 Wochen. Die Balken symbolisieren den Ergebnisbereich der einzelnen Messungen. Die versuchte Altersbestimmung der operativ entfernten Thromben ist strichliert eingezeichnet.

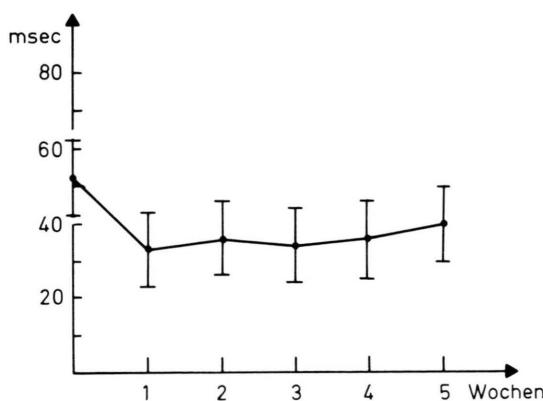


Abb. 3. Verlauf der ^1H - T_2 -Relaxationszeit während der ersten 5 Stunden. Der Ergebnisbereich ist durch Balken symbolisiert.

Verfestigungs- und Durchwanderungsprozesse von den Gefäßwänden ausgehen.

Die Na-Untersuchungen zeigen nur geringfügige zeitlich bedingte Unterschiede hinsichtlich T_1 , die auch durch die versuchsweise Abtrennung von Serum und Thrombus nicht wesentlich an Signifikanz gewinnen. Das bedeutet, daß das Na (zumindest das im NMR nachweisbare) auch im Thrombus uneingeschränkt, wie im Serum, beweglich ist. Die Aufschlüsselung in T_{1s} und T_{1b} erfolgte aufgrund der Linienform [10, 11]. Aufgrund der Tatsache, daß ^{23}Na eine Spinquantenzahl von $3/2$ aufweist, ist das Relaxationsverhalten nur mehr unter der Bedingung, daß die Korrelationszeit $\tau_c \ll \omega^{-1}$ ist, monoexponentiell. Bei längeren Korrelationszeiten sowie für die Analyse der T_2 -Werte muß man annehmen, daß das Relaxationsverhalten durch 2 Relaxationszeiten und zwar T_s und T_b beschrieben werden muß.

$$\langle I_z^s(t) \rangle - 2/5 \langle I_z^T \rangle = 2/5 \langle I_z^T \rangle (2 \exp(-2 J_2 t) - \exp(-2 J_1 t)) \quad (1)$$

$$\langle I_z^b(t) \rangle - 3/5 \langle I_z^T \rangle = 3/5 \langle I_z^T \rangle (\exp(-2 J_1 t)). \quad (2)$$

$\langle I_z^s \rangle$: schmale Komponente der z-Magnetisierung,
 $\langle I_z^b \rangle$: breite Komponente der z-Magnetisierung,
 $\langle I_z^T \rangle$: I_z^T im thermischen Gleichgewicht, J_1 - und J_2 -Komponenten der spektralen Dichtefunktionen.

Wie von Lynden-Bell [12] für composite spin particles – (CH_3 -Gruppen) – gezeigt worden ist, erlaubt die inversion recovery Relaxationsuntersuchung in dem Zeitbereich von t , in welchem die Intensität durch Null geht [13], die Festlegung beider Relaxationszeiten. Dieselbe Beobachtungsmethode kann auch für das Na [14] mit Erfolg angewandt werden (Abb. 4).

Änderung der T_2 -Relaxationszeit

Die Untersuchung der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 (^1H und ^{23}Na) zeigte folgendes Bild: Bei den Protonen beobachtet man zunächst keine Veränderung; während der 1. Woche tritt aber eine deutliche Verkürzung der T_2 -Zeit von 52 msec auf 32 msec ein. Danach bleiben die Werte konstant. Dasselbe Bild ist auch für das T_2 -Verhalten des Na-Ions zu erkennen (Tab. I).

Relaxationszeiten von Operationsthromben (siehe Abb. 2)

Nach der Thrombektomie wurden die Thromben in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt (bzw. für die Na-Spektroskopie in Paraffinöl (DAB6)), um eine Austrocknung und Strukturveränderung zu verhindern. Die Thromben wurden anschließend, ohne sie zu zerstören, aus der Kochsalzlösung in ein 10-mm-Meßröhrchen überführt und trotz der augenscheinlichen Inhomogenität innerhalb der Meßröhr-

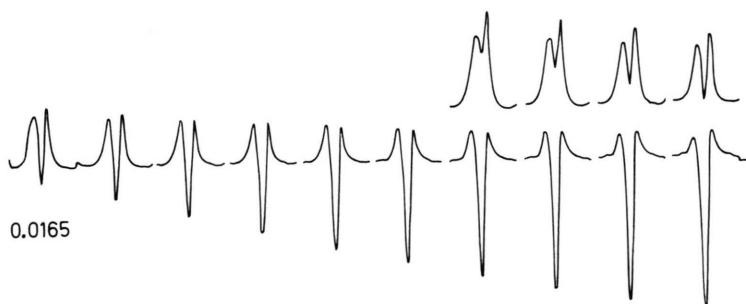


Abb. 4. Messung der ^{23}Na - T_1 -Relaxationszeit an Thrombus 2. Die schmale Absorptionslinie entspricht T_{1s} ; die breite Linie T_{1b} . Der dargestellte Bereich umfaßt die Delayzeiten von 0,012 msec bis 0,0185 msec in Schritten von 0,005 msec.

Tab. I. Mittelwerte der T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten des Natriums.

	T_1	T_{1s}	T_{1b}	T_2
Frischblut	0,032	0,032	0,029	0,023
1. Stunde	0,032	0,032	0,030	0,029
4. Stunde	0,032	0,032	0,029	0,026
4. Stunde T	0,033	0,033	0,031	0,019
4. Stunde S	0,032	0,033	0,031	0,022
1. Woche	0,030	0,031	0,028	0,021
1. Woche T	0,028	0,031	0,025	0,015
1. Woche S	0,032	0,032	0,029	0,024
2. Woche	0,029	0,030	0,027	0,020
2. Woche T	0,027	0,029	0,025	0,014
2. Woche S	0,031	0,030	0,029	0,023
Thrombus 1, 4	0,014			0,012
Thrombus 2	0,018	0,022	0,009	0,016
Thrombus 3	0,012			0,012

S steht für Serum, T für Thrombus. Die Thromben 1–4 waren operativ entfernt worden. Eine Analyse von T_{1s} und T_{1b} war wegen der Inhomogenität zum Teil nicht möglich. Die Messungen von Blut nach der 2. Woche erbrachten keine Änderungen der Relaxationszeiten.

chen (leere Bereiche wechseln mit Volumsbereichen, in denen sich der Thrombus befindet, ab) wie eine high resolution Probe vermessen.

Vor allem die T_1 -Messungen zeigten eine signifikante Korrelation zu den Messungen der Gerinnungsthromben, so daß mit Hilfe einer Graphik (Abb. 2) eine ungefähre Altersbestimmung der Operationsthromben erfolgen konnte. Inwieweit nun diese Altersangabe mit dem tatsächlichen Alter des Thrombus übereinstimmt, bedarf vor allem weiterer *in vivo* Versuche.

In der Na-Spektroskopie zeigen die operativ entfernten Thromben eine wesentlich geringere T_1 -Relaxationszeit. Bei der Bewertung der vorliegenden Untersuchungen sowie der vorstehend angeführten Frischblut- und Langzeituntersuchungen muß von der Annahme ausgegangen werden, daß im Blut bzw. im Thrombus Na-Ionen in mindestens drei unterschiedlichen Formen auftreten können und zwar als freies Na*, als gebundenes Na**, welches jedoch mit dem freien Na in einem Austausch steht und einer Beschreibung nach dem MWG zugänglich ist, sowie als Membranen fixiertes Na, das nicht bzw.

nicht zu einem raschen Austausch befähigt ist. Das Vorhandensein letzterer Form ist aus zwei experimentellen Befunden ableitbar. Vergleicht man den integrierten Gesamtgehalt an Na mit einem inneren Na-Standard [15] so stellt man fest, daß in denaturiertem Blut (Denaturierung durch Tiefkühlung auf -170°C) um ca. 6% mehr Na vorhanden ist als in nicht denaturiertem. Auf der anderen Seite ist – wie aus Tab. I ersichtlich – die Relaxationszeit einer 0,1 mol NaCl-Lösung [16] praktisch gleich derjenigen von Blut. Substitution in Gleichung (3) unter der Annahme, daß die Relaxationsrate von freiem Na unabhängig davon ist ob es sich um Na in Blut oder Wasser handelt würde unter Einbeziehung der erwähnten 6% immobilisierten Na's eine nur unwesentliche Vergrößerung der Relaxationsrate für das gebundene Na liefern [17, 18].

$$R_1 \equiv T_1^{-1} = p_f R_f + p_g \frac{\pi^2 \chi_g^2}{5} \left(\frac{1}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{1}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \tau_c \quad (3)$$

p_f ist der Molenbruch des freien, p_g derjenige des gebundenen Natriums. ω ist die Larmorfrequenz, τ_c die Korrelationszeit, χ_g die quadrupolare Kopplungskonstante. R_f die Relaxationsrate des freien Na's, R_g jene des gebundenen Na.

Aus vergleichenden Betrachtungen [19] an anderen Systemen ist jedoch eine Änderung der Relaxationsrate um mindestens 2–3 Zehnerpotenzen zu erwarten. Dies bedeutet, daß die erwähnten 6% Na tatsächlich nicht in einem raschen Austausch mit dem freien Na stehen können. Daß im Blut aber auch Na vorliegt, das einen Austausch zwischen einem freien und adsorptiv gebundenem Zustand aufweist, ist für Blut und insbesonders für Thromben auf der Basis von T_1 -Messungen eindeutig nachweisbar. Wie erwähnt, ist in Thromben – hier vor allem in postoperativen Thromben – die Relaxationszeit deutlich geringer. Unter der Annahme [19] einer Relaxationsrate für adsorptiv gebundenes Na von ca. 10^3 – 10^4 c/s (R_g), berechnet man auf Basis von Gleichung (3) unter Zugrundelegung der entsprechenden gemessenen Relaxationsraten, Werte zwischen 0,01 bis 0,001 mol/l als Menge des adsorptiv gebundenen Na's. Noch klarer ist die Tatsache, daß Austausch zwischen freiem und adsorptiv gebundenen Na im Blut stattfindet, aus dem Verhalten der T_2 -Werte ableitbar. Für quadrupolare Kerne in isotopen Lösungen gilt bekannterweise, daß $T_1^{-1} = T_2^{-1}$ [18] ist. Für

* Als freies Na werden im folgenden Na^+ mit Solvathülle bezeichnet.

** Als gebundenes Na werden Na^+ bezeichnet die entweder komplex gebunden sind, oder zumindest den diversen Polyelektrolyten des Blutes so nahe sind, daß sie deren langsame Bewegung aufmoduliert bekommen.

Blut zeigt sich jedoch ein Unterschied zwischen T₁ und T₂ entsprechend der Gl. (4).

$$R_{(1,2)\text{ex}} = R_{(1,2)\text{obs}} - R_{(1,2)\text{f}} = p_g / R_{(1,2)g}^{-1} + \tau_g \quad (4)$$

$R_{(1,2)\text{ex}}$ ist die R₁- bzw. R₂-Überschußrelaxationsrate; τ_g die Korrelationszeit des gebundenen Na's. R_{obs} die jeweilige beobachtete Relaxationsrate.

Die Unterschiedlichkeit zwischen R₁ und R₂ muß dabei aus R₂ und hier wieder aus Beiträgen, die von J(0) moduliert sind, herrühren. Prinzipiell gilt auch für das Wasser, das bei der Relaxationsuntersuchung mehrere Zustände (freies Wasser, assoziativ gebundenes Wasser an Zellwände etc.) eine Rolle spielen. Im Gegensatz zum Na ist jedoch bei den Protonen eine einfache Unterscheidung nicht möglich. Für die von Pintar vorgeschlagene Methode der T₁-Separation [21, 22] sind die Relaxationszeitunterschiede jedenfalls zu gering, um sichere Aussagen zu ermöglichen.

Zusammenfassung

Anhand der Untersuchungen konnte eindeutig bewiesen werden, daß die Relaxationszeiten von gerinnendem Blut und Thromben sowohl hinsichtlich ¹H wie auch ²³Na (vor allem bei Thromben) innerhalb von Wochen abnehmen. Diese Änderungen sind, im Falle des Na, durch zusätzliche Konzentrationsunterschiede begleitet. Auf die Tomographie angewandt, könnte dies bedeuten, daß es vielleicht in Zukunft möglich ist, nicht nur ein thrombotisch verschlossenes Gefäß zu erkennen, sondern sogar den Zeitpunkt der Entstehung und somit das Alter des Thrombus festzulegen, was in der Therapie vorteilhafte Konsequenzen zur Folge hätte, da man sich mit Hilfe dieser Information rascher zu einer chirurgischen oder internistischen Intervention entscheiden könnte.

- [1] NMR in Medicine, Ed. R. Damadian, Springer Verlag, Berlin, New York 1981.
- [2] Magnetic Resonance in Medicine and Biology, Ed. M. A. Foster, Pergamon Press, Oxford 1984.
- [3] An Introduction to Biomedical Nuclear Magnetic Resonance (S. B. Petersen, R. N. Muller und P. Rinck, ed.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1985.
- [4] J. J. Brown, E. van Sonnenberg, K. H. Gerber, G. Strich, G. R. Wittich und R. A. Slutsky, Radiology **154**, 727 (1985).
- [5] Y. F. Lam, K. Allison, L. C. Lin und Ho Chein, Blood **54**, 196 (1979).
- [6] F. Winter, R. Kimmich und W. Nusser, XXII Ind Congress Ampere on Magnetic Resonance and Related Phenomena Proceedings, pp. 477–478, Schippert & Co. Verlag, Zürich 1984.
- [7] G. J. Bene, B. Bocard, P. Magnin, G. Landrivon, S. Guiband und M. Capella Bonnet, XXII Ind Congress Ampere on Magnetic Resonance and Related Phenomena Proceedings, pp. 479–480, Schippert & Co. Verlag, Zürich 1984.
- [8] R. Freeman und H. D. W. Gill, J. Chem. Phys. **53**, 4103 (1970).
- [9] Y. H. Carr und E. M. Purcell, Phys. Rev. **94**, 630 (1954), S. Meiboom und D. Gill, Rev. Sci. Instrum. **29**, 688 (1958).
- [10] L. G. Werbelow und A. G. Marshall, J. Magn. Res. **43**, 443 (1981).
- [11] C. E. M. Fouques und L. G. Werbelow, Can. J. Chem. **57**, 2329 (1979).
- [12] R. M. Lynden Bell, Mol. Phys. **22**, 837 (1971).
- [13] E. Haslinger und W. Robien, J. Am. Chem. Soc. **102**, 1237 (1980).
- [14] H. Schrunner, Diplomarbeit, Universität Graz 1983.
- [15] Innerer Standard: 0.1 mol NaCl in 0.2 mol 12-Kronenether-6.
- [16] M. Eisenstadt und H. L. Friedman, J. Chem. Phys. **46**, 2182 (1967).
- [17] P. Halle und H. Wennerstöm, J. Magn. Res. **44**, 89 (1981).
- [18] W. H. Braunlein, H. J. Vogel und S. Forsen, Eur. J. Biochem. **142**, 139 (1984).
- [19] H. Sterk, H. Schrunner und A. Sax, J. Mol. Liquides **30**, 171 (1985).
- [20] H. G. Hertz, M. Holz, G. Keller, H. Versmold und C. Yoon, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **78**, 24 (1974).
- [21] H. Peemoeller, R. K. Shenoy und M. M. Pintar, J. Magn. Res. **45**, 193 (1981).
- [22] H. Peemoeller und M. M. Pintar, J. Magn. Res. **41**, 358 (1980).