

**Masterarbeit zur Erlangung des akademischen Grades  
„Master of Science“ (M. Sc.)**

**In vivo  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie an der  
pazifischen Felsenauster *Crassostrea Gigas***

**Marius Huckestein**

geb. am 26.05.1981

Matrikelnummer: 24806

Studiengang Medizintechnik

Fachbereich 1

Hochschule Bremerhaven

Betreuer / Einrichtung:

Dr. Christian Bock

*Alfred Wegener Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven*

Prof. Dr. Olaf Eick

*Hochschule Bremerhaven*

Dortmund, April 2013

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und ausschließlich mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln erstellt habe. Aus Veröffentlichungen wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vor.

Dortmund, April 2013

---

(Marius Huckestein)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	6
1.1. Motivation.....	6
1.2. Ziel.....	7
2. Theoretische Grundlagen.....	7
2.1. MRT.....	7
2.2. NMR Spektroskopie.....	11
2.3. Crassostrea Gigas.....	15
3. Materialien und Methoden.....	17
3.1. MRT-Komponenten.....	17
3.2. Phantom.....	18
3.3. Marker.....	18
3.4. Messparameterbestimmung.....	19
3.5. Versuchsaufbau.....	22
3.6. Versuchsdurchführung.....	26
4. Ergebnisse.....	27
4.1. <i>In vivo</i> Test der Methode an Crassostrea Gigas.....	27
5. Diskussion und Ausblick.....	32
Quellen.....	35
Anhang.....	37
Danksagung.....	47

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Präzessions-bewegung eines Atomkerns [6].....	8
Abbildung 2: Ablauf der longitudinalen Relaxation in z-Richtung [7] .....	9
Abbildung 3: Ablauf der Spin-Spin-Relaxation, a) Spins gekippt in der xy-Ebene b) Dephasierung des Spin-Kollektivs [4] .....	10
Abbildung 4: FID-Signal [5].....	10
Abbildung 5: Beispiel für ein Resonanzspektrum: <sup>31</sup> P-Spektrum von 85% Phosphorsäure [8] ...	11
Abbildung 6: Crassostrea Gigas [9] .....	15
Abbildung 7: Anatomie der Auster [10] .....	16
Abbildung 8: Vergleich der NMR-Signale von <sup>13</sup> C-Glucose bei verschiedenen Anregungspulsen bei gleichen Anregungsparametern.....	19
Abbildung 9: Verlauf Signalintensität von <sup>13</sup> C-Glucose bei Anregung mit einer Pulsdauer von 0,3 ms und einer Intensität von 23 bis 12 dB in Schritten von 0,5dB (von vorn nach hinten) .....	20
Abbildung 10: Vermessung der Versuchstiere mittels Flash-Bildgebung, A: Sagittaler Schnitt B: Coronaler Schnitt.....	22
Abbildung 11: Sagittaler Querschnitt durch ein Versuchstier. Rot markiert: Applikationsorte des Marker, links der Muskel, rechts der Verdauungstrakt.....	23
Abbildung 12: Sichtbereich der Oberflächenspule .....	23
Abbildung 13: Schematische Darstellung der unpräparierten Unterseite oberhalb der Oberflächenspule.....	24
Abbildung 14: Schematische Darstellung der geschliffenen Auster im Versuchsbehälter auf der Oberflächenspule aufgesetzt. ....	24
Abbildung 15: Geschliffene Unterseite einer Auster .....	25
Abbildung 16: Finaler Versuchsaufbau: Auster in Tüte mit Tuch.....	26
Abbildung 17: Vergleich der Resonanzspektren einer Auster : A) vor Injektion des Markers B) nach Injektion von 100ml 100mmol <sup>13</sup> C-Glucose mit einem klaren Peak bei 90 -60 ppm ..	27
Abbildung 18: Verlauf des Glucosesignals bei Versuch Verdauungstrakt Auster 3 .....	28
Abbildung 19: Verlauf des Glucosesignals bei den Austern 3,5,7,8 und 9 nach Injektion der Markerlösung in den Verdauungstrakt.....	29

Abbildung 20: Verlauf des Glucosesignals bei den Austern 2, 3,5,8 und 9 nach Injektion der  
Markerlösung in den Muskel..... 30

# 1. Einleitung

## 1.1. Motivation

Im Rahmen der Industrialisierung und Globalisierung sieht sich die Welt vor einem klimatischen Wandel. Der Ausstoß an Treibhausgasen und CO<sub>2</sub> hat sich in den letzten Jahrzehnten derart dramatisch erhöht, dass es zu einer Erwärmung und Veränderung der Zusammensetzung der Erdatmosphäre kommt. [1] Die biologischen und ökologischen Auswirkungen dieser Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Erhöhung werden vor allem in Gebieten sichtbar, die keinen großen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind. Das Ökosystem der Arktis ist einer dieser Bereiche.

Der Anstieg der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebung eines Lebewesens wirkt sich direkt auf die Physiologie aus. Das Alfred Wegener Institut in Bremerhaven untersucht die Auswirkungen dieses Vorgangs auf Flora und Fauna. Vor allem physiologische Veränderungen der dort beheimateten marinen Populationen sind das Objekt der Untersuchungen.

Unter diesen Voraussetzungen ist eine Fragestellung, wie sich die erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration auf den Kohlenstoffkreislauf von Lebewesen auswirkt. Eine Analyse größerer Kohlenstoffverbindungen ist unter anderem in der analytischen Chemie mit <sup>14</sup>C-Kohlenstoffisotopen markierten Stoffen möglich, jedoch kann dabei die Messung erst nach einer Sektion des Tieres und der Entnahme von Proben erfolgen. Ein anderer Ansatz für die Analyse des Abbaus von Kohlenstoffmolekülen ist die <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie. Dabei werden Marker injiziert oder verabreicht und später entweder entnommene Proben *in vitro* im hochauflösenden NMR-Spektrometer oder *in vivo* direkt minimalinvasiv im Kernspintomographen analysiert. Diese Methodik wird schon seit längerem in der Humanmedizin praktiziert, ein praktisches Beispiel ist die Analyse des Zellmetabolismus von Krebszellen durch hyperpolarisierte <sup>13</sup>C-Marker. Vorteil dieser Modalität ist die Verwendung von nicht-radioaktiven Isotopen und einer minimalinvasiven Bildgebungsmethodik, die schonend für den Patienten ist.

Diese <sup>13</sup>C-Spektroskopie findet auch Anwendung in der Biologie, im Jahr 2010 zeigten Lee et al. die erste Anwendung von Chemical Shift Imaging (CSI) mit 2-<sup>13</sup>C-Glycine an *Crassostrea virginica*. [2]

## 1.2. Ziel

Ziel der Arbeit war die Implementierung der *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie mittels einer Oberflächenspule an der pazifischen Felsenauster *Crassostrea Gigas* mit einem 4,7T Bruker Biospin Kernspintomographen. Zu diesem Zweck sollte zuerst ein MRT-Phantom mit einem  $^{13}\text{C}$ -markierten Stoff zur Optimierung der Messmethodik und –parameter verwendet werden. Anschließend sollte in einer *in vivo* Versuchsreihe mehreren Tieren der Art *Crassostrea Gigas* ein  $^{13}\text{C}$ -markiertes Metabolit zu verabreicht werden und eine spektroskopische Analyse der Versuchstiere in einem geeigneten Versuchsaufbau im Kernspintomographen durchgeführt werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. MRT

#### 2.1.1. Grundlagen Magnetresonanz

Die Basis der Magnetresonanztomographie bilden die speziellen magnetischen Eigenschaften von Atomen. Atome mit einer ungeraden Anzahl an Protonen besitzen einen „Spin“ oder „Kernspin“, der sich, vereinfacht gesehen, als Eigendrehimpuls aus den Drehimpulsen der sich im Kern befindlichen Protonen und Neutronen ergibt. Dies entspricht einer Drehbewegung um die eigene Achse.

Der Gesamtdrehimpuls  $\vec{I}$  des Atoms ist proportional zu seinem magnetischem Moment  $\vec{\mu}$

$$\vec{\mu} = \gamma * \vec{I} \quad (\text{Gl. 1})$$

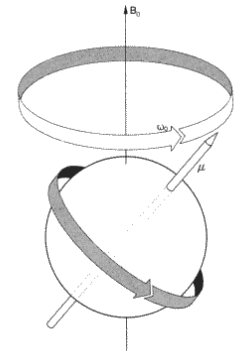
mit dem Proportionalitätsfaktor  $\gamma$ , dem gyromagnetische Verhältnis

$$\gamma = g \frac{\mu_N}{\hbar} \quad (\text{Gl. 2})$$

mit dem Kernmagneton

$$\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p} . \quad (Gl. 3)$$

Bringt man diesen Atomkern nun in ein externes Magnetfeld kommt es zu einer Präzessionsbewegung der Kreisellachse entlang des Magnetfeldes (s. Abbildung 1). Diese Präzessionsbewegung erfolgt mit einer bestimmten Frequenz. [3]



**Abbildung 1:** Präzessionsbewegung eines Atomkerns [6]

Die Drehfrequenz  $\omega_L$ , sog. Larmor-Winkelgeschwindigkeit oder auch Larmor-Frequenz, eines Spins in einem Magnetfeld  $\vec{B}$  ist abhängig vom chemischen Element und der Stärke des örtlichen Magnetfeldes und wird angegeben durch

$$\omega_L = -\gamma \vec{B} \quad (Gl. 4)$$

Die Magnetisierung  $\vec{M}$  des Körpers setzt sich zusammen aus seinen einzelnen magnetischen Momenten:

$$\vec{M} = \sum_n \vec{\mu}_n \quad (Gl. 5)$$

Innerhalb eines Magnetfeldes  $\vec{B}_z$  in z-Richtung ergibt sich ein statischer Gleichgewichtszustand:

$$\vec{M} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ M_0 \end{pmatrix} \quad (Gl. 6)$$

Diese Spins können durch einen HF-Radioimpuls, dessen Frequenz exakt der Larmorfrequenz entspricht, aus diesem Gleichgewicht gebracht werden, d.h. der Magnetisierungs-Vektor kippt in die x/y-Ebene.



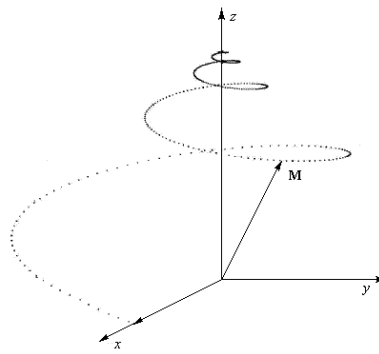
$$\vec{M}_{\text{Impuls}} = \begin{pmatrix} M_x \\ M_y \\ M_z \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die hierdurch hervorgerufene Auslenkung ist abhängig von der Dauer und Stärke des eingestrahlten Impulses. Der so genannte „Flip-Winkel“ lässt sich durch den Radioimpuls bestimmen. Ein so aus dem Gleichgewicht des magnetischen Grundfeldes gebrachter Magnetisierungsvektor sendet ein elektromagnetisches Signal aus, das gemessen werden kann und mit der Zeit immer schwächer wird. Hierfür gibt es zwei Ursachen:

1. Das Zurückkippen der angeregten Spins in Richtung des Grundfeldes entlang der z-Achse, die so genannte T1-Relaxation (s. Abbildung 2). Dieser Vorgang wird als longitudinale Relaxation oder auch Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Beschreiben lässt sich dieser Vorgang durch die Gleichung [3]

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (\text{Gl. 8})$$

mit der Zeitkonstanten  $T_1$ .

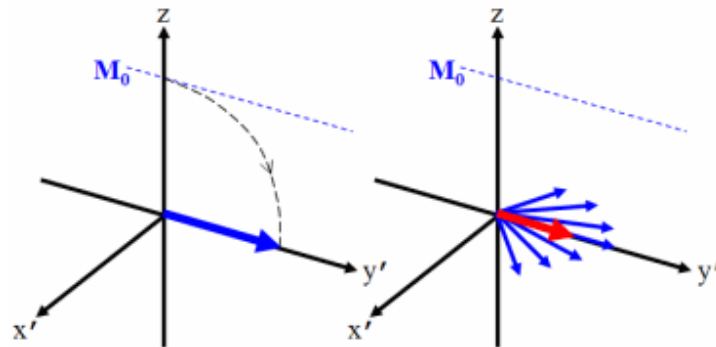


**Abbildung 2:** Ablauf der longitudinalen Relaxation in z-Richtung [7]

2. Die Dephasierung des gesamten angeregten und gekippten Spin-Kollektives innerhalb der xy-Ebene, genannt Spin-Spin- oder auch  $T_2$ -Relaxation (s. Abbildung 3), mathematisch beschreibbar durch

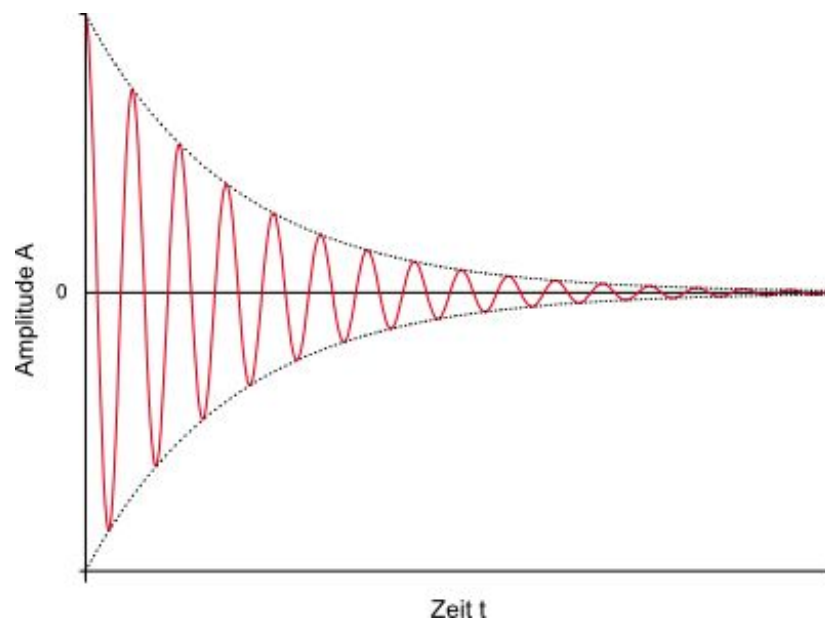
$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -\frac{M_{x,y}}{T_2} \quad (\text{Gl. 9})$$

mit der Zeitkonstanten  $T_2$



**Abbildung 3:** Ablauf der Spin-Spin-Relaxation, a) Spins gekippt in der xy-Ebene b) Dephasierung des Spinkollektivs [4]

Beide Zeiten,  $T_1$  und  $T_2$ , sind gewebeabhängig und werden zur Kontrastbestimmung in der Bildgebung benutzt. Detektiert wird über eine Spule, die senkrecht zum Grundmagnetfeld  $B_0$  liegt. Hier wird durch die Quermagnetisierung in der x-y-Ebene eine messbare Wechselspannung mit einer bestimmten Frequenz  $f_i$  induziert. Diese Wechselspannung beschreibt eine abklingende harmonische Schwingung (s. Abbildung 4), die als Free Induction Decay, kurz FID, bezeichnet wird. Die Intensität dieses Signals ist abhängig von der ortsabhängigen Anzahl an angeregten Atomen, der so genannten Protonendichte, und den beiden Konstanten  $T_1$  und  $T_2$ . Durch gezielte Manipulation der Anregungen lassen sich diese jeweiligen gewebspezifischen Konstanten hervorheben oder unterdrücken, dadurch sind unterschiedliche Signalintensitäten erzeugbar, was eine exakte Differenzierung der örtlichen Gewebzusammensetzung ermöglicht.



**Abbildung 4:** FID-Signal [5]

## 2.2. NMR Spektroskopie

In der NMR Spektroskopie wird zur chemischen Analyse eine Probe, z.B. eine Flüssigkeit oder ein Festkörper, in einem Spektrometer in ein homogenes Magnetfeld  $H_0$  gebracht. Dadurch verteilen sich die in der Probe befindlichen Protonen auf die Stationärzustände angeregt  $N_1$  und unangeregt  $N_2$ . Die Verteilung läßt wie folgt durch das Boltzmannsche Gesetz beschreiben:

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{\Delta E}{kT}$$

$N_1$  und  $N_2$  sind die Besetzungszahlen der Zustände,  $\Delta E$  ist die resultierende Energiedifferenz,  $k$  die Boltzmannsche Konstante und  $T$  die absolute Temperatur.  $\Delta E$  ist in der Regel sehr klein, damit herrscht in der Probe nur ein geringer Besetzungsüberschuss, der für die Empfindlichkeit des Experimentes maßgebend ist.

Wird die Probe nun in diesem angeregten Zustand einer elektromagnetischen Strahlung durch einer Spule eines Schwingkreises mit variabler Frequenz  $\omega_L$  ausgesetzt, so werden im Fall

$$\omega_L = \omega_0$$

einzelne Kerne angeregt. Diese Anregung ändert die Eigenschaften der Senderspule, die verstärkt und gemessen werden. Dadurch erhält man das Resonanzspektrum der Probe.

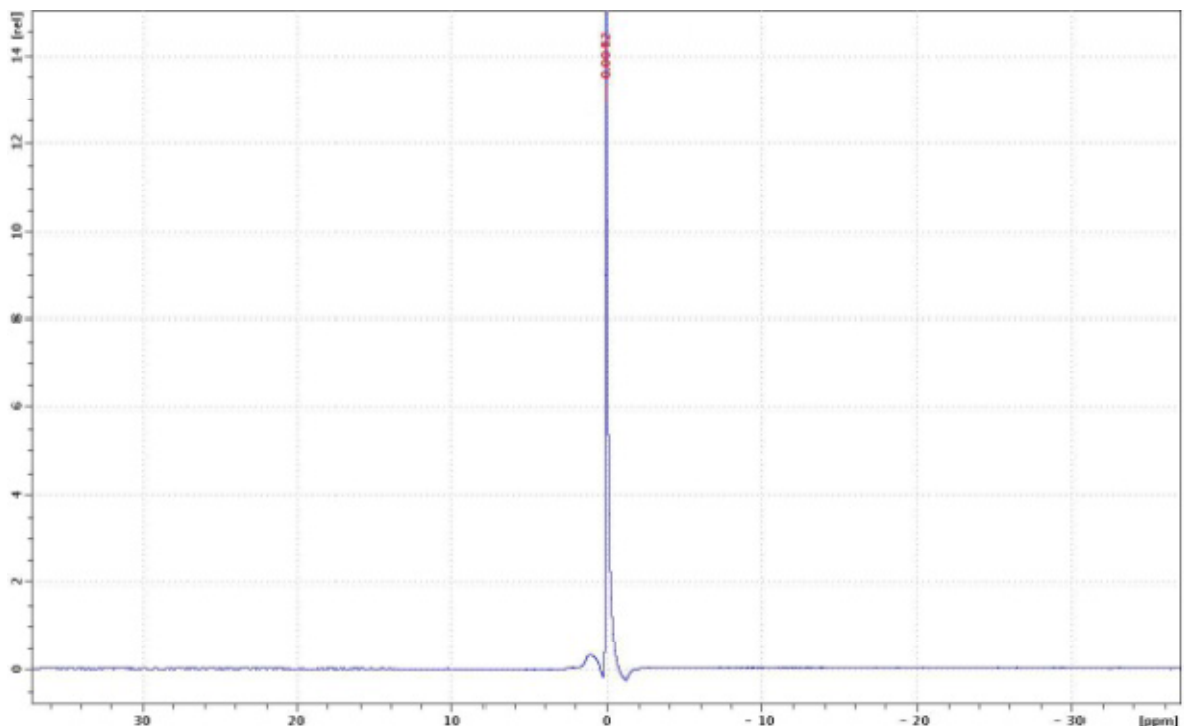


Abbildung 5: Beispiel für ein Resonanzspektrum:  $^{31}\text{P}$ -Spektrum von 85% Phosphorsäure [8]

Bei der Analyse einer Feststoffprobe muss die Wechselwirkung der magnetischen Dipole innerhalb der Probe berücksichtigt werden, in flüssigen Proben hebt sich diese Wechselwirkung durch die thermische Bewegung der Moleküle auf.

Das Kernresonanzexperiment erlaubt die Möglichkeit, bestimmte Isotope bezüglich ihrer Umgebung innerhalb eines Moleküls zu erkennen. Dies rührt daher, dass die Resonanzfrequenz der einzelnen Atomkerne durch die Position im Molekül und die Elektronenhülle der chemischen Bindung bestimmt wird, d.h. der Betrag der Resonanzfrequenz ist strukturabhängig. Damit erlaubt die Kernresonanzspektroskopie eine strukturelle Analyse von Molekülen. Diesen Effekt nennt man chemische Verschiebung. Damit wird die Resonanz des angeregten Kern innerhalb eines Moleküls nicht bei  $\nu_0$  gemessen, sondern bei  $\nu_0 + \Delta$ . Die chemische Verschiebung wird in der dimensionslosen Größe  $\delta$  in Bezug auf das Signal einer Standardprobe mit

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}}$$

gemessen.

Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wird bei Spektren, die unter vergleichbaren Bedingungen gemessen wurden, die Fläche unterhalb jedes Peaks durch Integration bestimmt. Die Fläche ist dabei abhängig von der Anzahl der Protonen innerhalb der Probe.

### 2.2.1. $^{13}\text{C}$ -NMR

Im Vergleich zu den meist in der Bildgebung genutzten Wasserstoffatomen besitzt das Isotop des Kohlenstoffs  $^{13}\text{C}$  eine sehr geringe natürliche Häufigkeit von ca. 1,1%. Hinzu kommt, dass das gyromagnetische Verhältnis von  $^{13}\text{C}$  nur etwa ein Viertel so groß ist wie das von Wasserstoff. [12] Daraus ergibt sich eine sehr viel geringere Signalintensität bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und verlangt zumeist die Verwendung von angereicherten Substraten als Marker in der Kernspintomographie und eine Summierung mehrerer Spektren, um ein stärkeres Signal für eine Analyse zu bekommen. Die Spektralbreite einer  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie ist im Vergleich zu einer Wasserstoffmessung viel größer, die Darstellung der Spektren erfolgt meist zwischen 225 und -20 ppm. In gemessenen  $^{13}\text{C}$ -Spektren sind meist nur Singulett vorhanden.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplungen werden durch die zur Signalverstärkung eingesetzten Breitbandentkopplung unterdrückt,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Bindungen sind aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit kaum vorhanden und magnetisch inaktive  $^{12}\text{C}$ -Kerne werden in der NMR-Spektroskopie nicht detektiert. Eine weitere Eigenschaft von  $^{13}\text{C}$ -Kernen sind sehr lange Relaxationszeiten. Um Messungen mit vollkommen relaxierten Spektren zu erhalten, müssen für die Messungen lange Repetitionszeiten verwendet werden.

#### Vergleich verschiedener Faktoren von $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Spektroskopie

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	<b>Empfindlichkeit der <math>^{13}\text{C}</math>-Spektroskopie im Vergleich zur <math>^1\text{H}</math>-Spektroskopie</b>
<b>natürliche Häufigkeit</b>	~ 100%	~ 1,1%	1%
$\gamma$ [ $10^8 \text{ radT}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	2,675	0,702	~ 1/4
<b><math>\delta</math>-Bereich</b>	~ 15 ppm	~ 250 ppm	bessere Signalverteilung

### 2.2.2. Decoupling & NOE

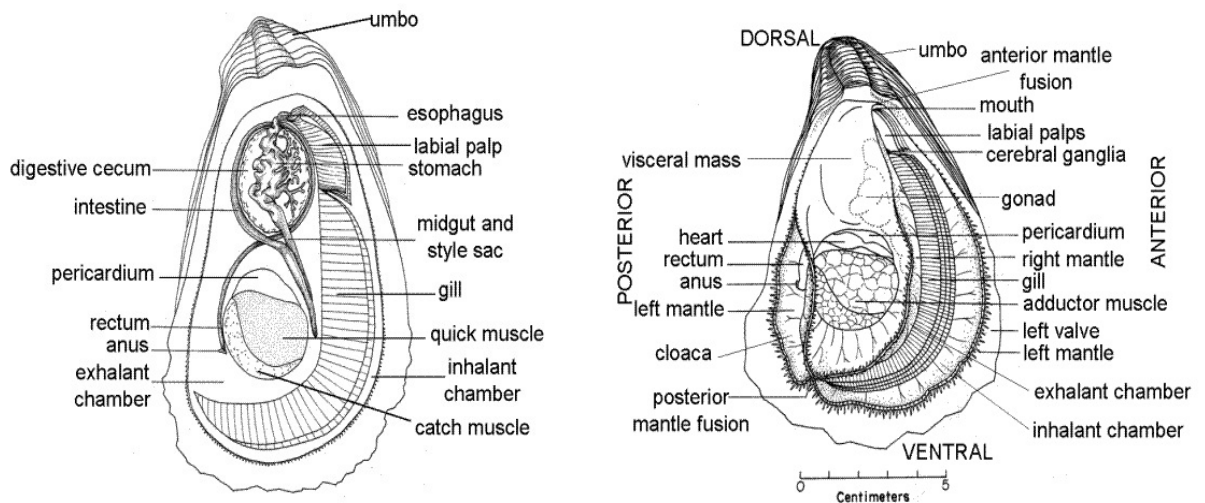
In der  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie wird oft die Methodik der heteronuklearen Entkopplung verwendet. Würde man ein  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ohne diese Form der Anregung verwenden, würden sämtliche  $^{13}\text{C}$ -Signale, die mit  $^1\text{H}$ -Protonen oder anderen Kernen (z.B. Phosphor oder Fluor) gebunden sind, als Multiplet im Spektrum erscheinen.  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen treten aufgrund der natürlichen Häufigkeit nur vermindert auf und können daher vernachlässigt werden. Bei der Breitbandentkopplung oder Decoupling wird eine Doppelresonanz von  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  Kernen erzeugt. Dabei wird nach Anregung der Kohlenstoffprotonen während der Akquisition des Signals ein Anregungspuls für Wasserstoffprotonen in die Probe eingestrahlt. Dadurch fallen alle Multiplet-Signale, die durch eine  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Bindung entstehen zu einem Singulett zusammen, d.h. für die Signale ist im finalen  $^{13}\text{C}$ -Spektrum nur ein einzelner Peak sichtbar. Strahlt man zusätzlich zum Anregungsimpuls während der  $^{13}\text{C}$ -Anregung und Messung einen schwachen Entkopplungspuls mit der Resonanzfrequenz der  $^1\text{H}$ -Kerne auf die Probe, wird die Signalintensität des resultierenden  $^{13}\text{C}$ -Signals deutlich verstärkt. Dieses Phänomen nennt man den Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, kurz NOE) [11]. Die Verstärkung des Kohlenstoffsignals bewegt sich dabei normalerweise um etwa 30-40%.

### 2.3. *Crassostrea Gigas*



Abbildung 6: *Crassostrea Gigas* [9]

Die Pazifische Felsenauster *Crassostrea Gigas* (auch Pazifische Riesenauster oder Portugiesische Auster) aus der Ordnung der Muscheln gehört zu der Familie der Austern. Sie war ursprünglich im Pazifik an den Küsten Japans und Koreas beheimatet, ist aber mittlerweile durch gezielte Zucht für den Verzehr und durch Einschleppung weltweit zu finden.



**Abbildung 7:** Anatomie der Auster [10]

*C. gigas* gehört zu den größten Austernarten. Sie wird bis zu 40cm lang und weist eine längliche, leicht gekrümmte Form auf und besitzt wie fast alle Bivalven eine zweiklappige Schale, die durch ein elastisches Ligament verbunden sind. Sie ist ein Suspensionsfiltrierer und konsumiert Mikroalgen und Detritus aus dem umgebenden Wasser. *C.gigas* lebt in Tiefen bis zu 50 Metern und bildet große Kolonien aus.

Die Muschel wird seit Mitte der 80er Jahre im Wattenmeer auf Aquakulturfarmen gezüchtet und breitete sich von dort invasiv über die gesamte Nordsee aus. *C. gigas* wurde Anfang der 90er Jahre das erste Mal im Nordfriesischen Wattenmeer freilebend gesichtet. Zu den betroffenen Ländern gehören unter anderem Deutschland, die Niederlande, Dänemark, Norwegen und Schweden. Derzeit wird das hohe Aufkommen der Auster an deutschen Küsten zusammen mit dem Rückgang der Miesmuschel *Mytilus Edulis* als eine der auffälligsten Veränderung der Muschelpopulation im deutschen Wattenmeer diskutiert.

Die Pazifische Felsenauster gehört mittlerweile zu der kommerziell meist genutzten Austernart und wird von Feinschmeckern für ihren hohen, festen Fleischanteil geschätzt. Zumeist wird sie in Aquakultur gezüchtet, wofür sie sich auf Grund ihrer hohen Robustheit und ihres schnellen Wachstums besonders gut eignet.



### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. MRT-Komponenten

Die wichtigsten Komponenten des MRT-Systems und deren Spezifikation werden im Folgenden genannt:

- Magnet (BIOSPEC 47/40 DBX; Firma Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen): supraleitende Spule (Elektromagnet) mit einer horizontalen Magnetbohrung ( $B = 4,7 \text{ T}$ ,  $ID = 400 \text{ mm}$ )
- Shim-System (Bruker Shim Power Supply; B-SPS-12-80-3; Firma Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen)
- Gradientensystem (BGA 26; Firma Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen): aktiv abgeschirmt, wassergekühltes Gradientensystem mit:  $ID = 258 \text{ mm}$ ; maximale Gradientenstärke bei maximalem Strom von  $50 \text{ mT} \cdot \text{m}^{-1}$  ( $I_{\text{maxG}} = 100 \text{ A}$ ;  $U_{\text{maxG}} = 160 \text{ V}$ ); Anstiegszeit:  $250 \mu\text{s}$  bis  $450 \mu\text{s}$
- Senderleistung:  $^1\text{H}$ -RF-power Amplifier ( $P = 2000 \text{ W}$ , Bandbreite:  $180 \text{ MHz}$  bis  $205 \text{ MHz}$ ) und Breitband RF-power Amplifier zur Anregung verschiedener Kerne ( $P = 1000 \text{ W}$ , Bandbreite:  $10 \text{ MHz}$  bis  $110 \text{ MHz}$ )
- Sende- und Empfangsspule (Firma Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen): Bio-Res-200 HP, Durchmesser:  $20 \text{ cm}$ , Länge:  $31,4 \text{ cm}$
- Sende- und Empfangsspule  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Oberflächenspule (Firma Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen): , Durchmesser:  $36 \text{ mm}$ , Länge:  $99 \text{ mm}$

Die Steuerung des MRT-Gerätes und die Auswertung der Experimente erfolgte durch das Programm ParaVision V4.0 (Firma Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen) an einer Linux Workstation (HP / Bruker XW 5000, Firma Silicon Graphics, Santa Barbara, CA, USA).

### 3.2. Phantom

Zu Versuchszwecken und Bestimmung der zu verwendenden Pulswinkel wurde ein einfaches NMR-Phantom erstellt. Dabei handelte es sich um eine 100ml Lösung 100mmol  $^{13}\text{C}$ -D-Gukose gelöst in Seewasser in einer Glasflasche.

### 3.3. Marker

Als eingesetzter Marker wurde uniform markierte D-Glucose ([U- $^{13}\text{C}$ ]-D-Glucose der Firma Cambridge) verwendet. Für die Tests am Phantom wurde eine Lösung von 100ml Seewasser und 100mmol  $^{13}\text{C}$ -Glucose verwendet. Für die *in vivo* wurde eine 100mmol Lösung  $^{13}\text{C}$ -Glucose versetzt mit einer physiologisch auf die Tiere angepassten Ringer-Lösung verwendet.

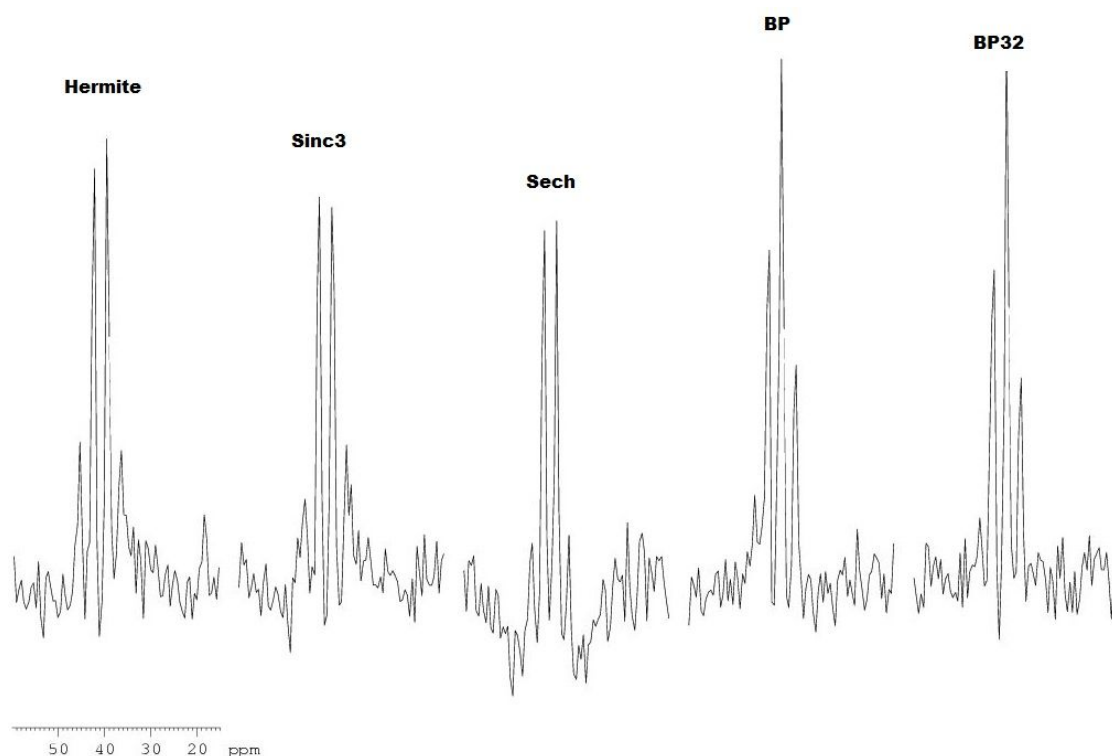
#### Zusammensetzung der Ringerlösung

Stoff	Menge [mmol]
NaCl	440
KCl	10
CaCl <sub>2</sub>	10
MgCl <sub>2</sub>	30
MgSO <sub>4</sub>	14
Imidazol C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	20

### 3.4. Messparameterbestimmung

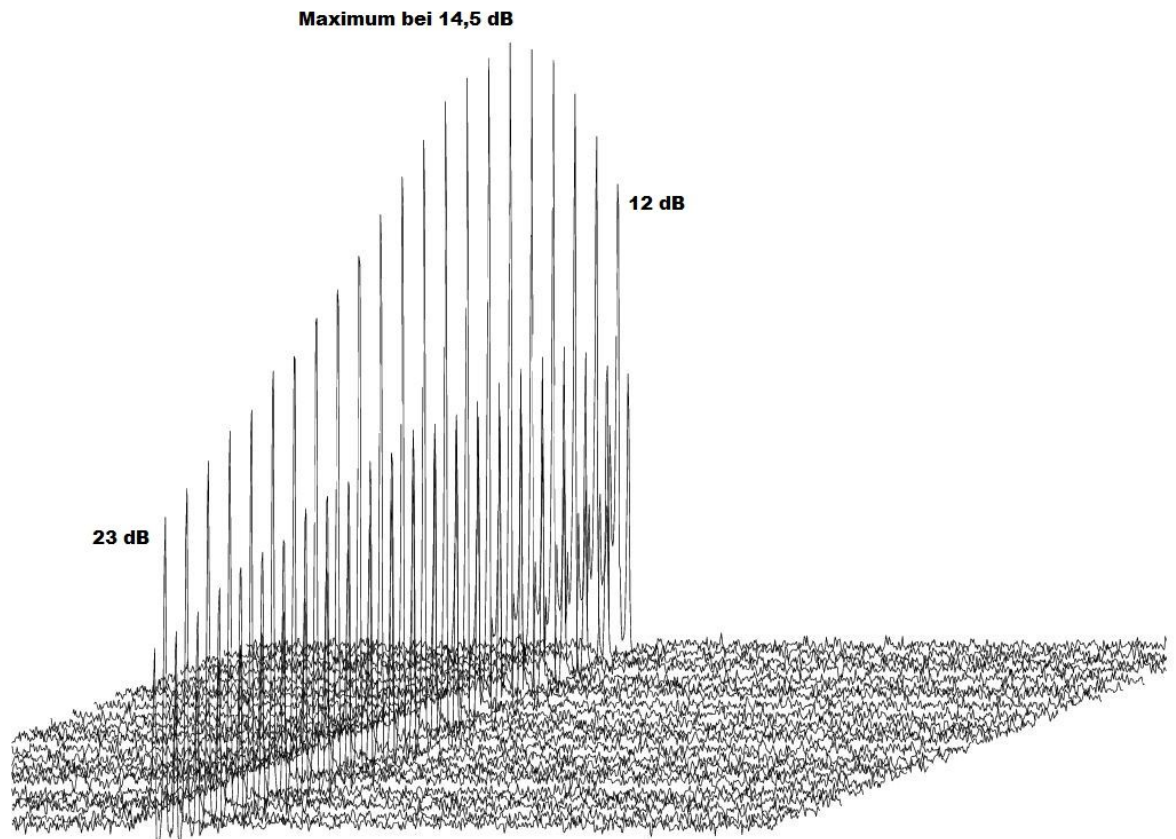
Zur Optimierung der Signalintensität wurden in mehreren Vorversuchen verschiedene Anregungssequenzen, Pulswinkel und Decouplingsequenzen getestet.

An die maximal einzusetzende Intensität musste sich in mehreren Versuchsreihen langsam herangetastet werden. Die zulässige maximale Leistung für die Spule betrug 20 Watt. Die vom System auf die Spule abgegebene Leistung konnte nicht direkt gemessen werden. Die tatsächlich ausgestrahlte Leistung des Senders, die an die Spule abgegeben wurde, schien nicht mit der theoretisch errechneten übereinzustimmen. Die eingestrahelte Leistung des Senders wurde in mehreren Versuchsreihen in kleinen Schritten stetig erhöht, bis sich ein Signal im Spektrum zeigte. Danach wurde bei gleicher Leistung die Pulsart verändert. Als Anregungspulse wurden Sech, Hermite, BP, Sinc3 und BP32-Pulse genutzt. Es zeigte sich, dass die Probe das beste Signal nach Anregung mit einem regulären BP-Pulse zeigte (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Vergleich der NMR-Signale von  $^{13}\text{C}$ -Glucose bei verschiedenen Anregungspulsen bei gleichen Anregungsparametern

Anschließend wurden Pulsdauer und Leistung in weiteren Versuchsreihen so moduliert, bis eine Auslenkung der  $^{13}\text{C}$ -Spins von  $90^\circ$  und somit die maximale Anregung und Signalintensität erreicht wurde (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Verlauf Signalintensität von  $^{13}\text{C}$ -Glucose bei Anregung mit einer Pulsdauer von 0,3 ms und einer Intensität von 23 bis 12 dB in Schritten von 0,5 dB (von vorn nach hinten)

Damit wurde die optimale Anregungssequenz für normale  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie mit dem verwendeten Setup ermittelt. Der Offset der Messung wurde dann zentral auf das Signal gelegt, d.h. der Nullpunkt des Messbereiches von -120 bis 120 ppm wurde auf den maximalen Peak des Glucosesignals gesetzt.

Danach wurde die Breitbandentkopplung optimiert. Dabei wurden sowohl die verwendete Decoupling-Sequenz als auch die Parameter der Entkopplungssequenz wie Entkopplungspulsintensität, eingestrahler Puls, Dauer der Entkopplung und Bandbreite optimiert. Bei einem Versuch wurde der Potentiometer zur Abstimmung der Spule auf  $^1\text{H}$ -Kerne beschädigt und lies sich nicht mehr verstellen. Dies passierte, als der finale Versuchsaufbau verwendet wurde. Somit war die Abstimmung der Oberflächenspule festgelegt. Spätere Überprüfungen zeigten jedoch, dass die Spule in allen späteren Versuchen für Wasserstoffkerne *on resonance* abgestimmt war, das Messergebnis wurde dadurch also nur minimal beeinflusst. Für die abschließenden Versuche wurde mit folgenden Einstellungen die maximale Signalintensität am Glucose-Phantom erreicht:

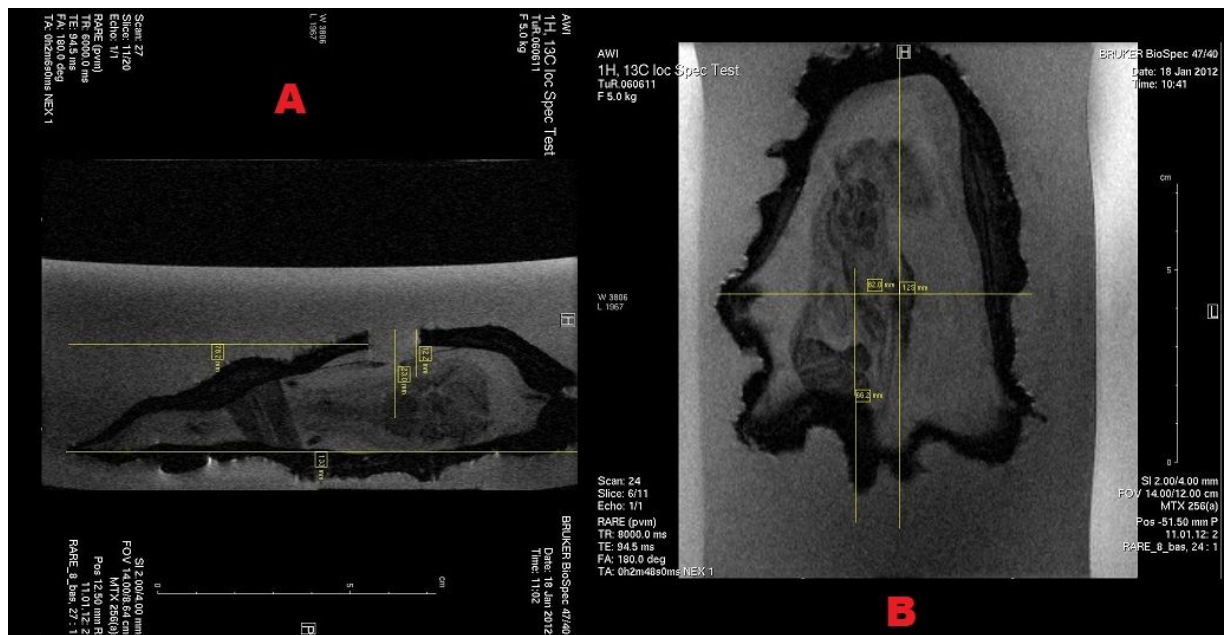
#### Parameter der finalen Messmethode

Pulsart	BP
Repetitionszeit TR	5000ms
Anzahl der Messungen, aus denen gemittelt wird (Averages)	256
Pulslänge	0,75ms
Pulsintensität	12 dB
Basisfrequenz	50,371479 MHz
Breitbandentkopplungssequenz	Waltz_16
Entkopplungsdauer	650ms
Intensität	14,8 dB

Diese Konfiguration wurde dann in den abschließenden *in vivo* Versuchen eingesetzt

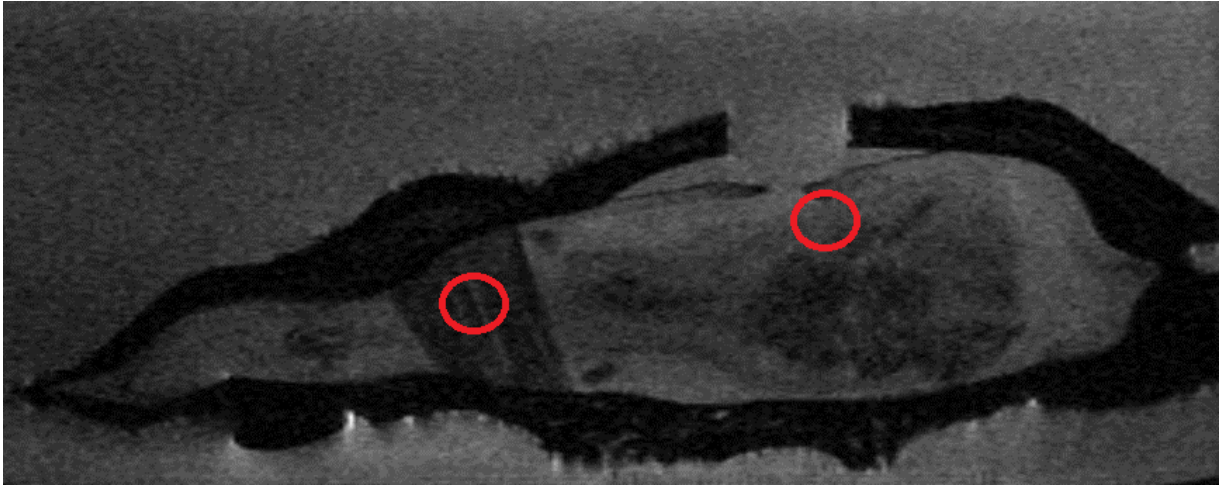
### 3.5. Versuchsaufbau

In ersten Testversuchen bestand der Aufbau aus einer handelsüblichen Frischhaltedose mit verschließbarem Deckel, die mit einem Ventil für Seewasserzu- und ablauf, sowie einem Einlass zur Belüftung präpariert wurde. Die Kammer wurde zu Beginn des Versuchs komplett mit Seewasser gefüllt, es gab keine kontinuierliche Frischwasserzufuhr oder Belüftung, um Störartefakte während der Messung zu vermeiden.



**Abbildung 10:** Vermessung der Versuchstiere mittels Flash-Bildgebung, **A:** Sagittaler Schnitt **B:** Coronaler Schnitt

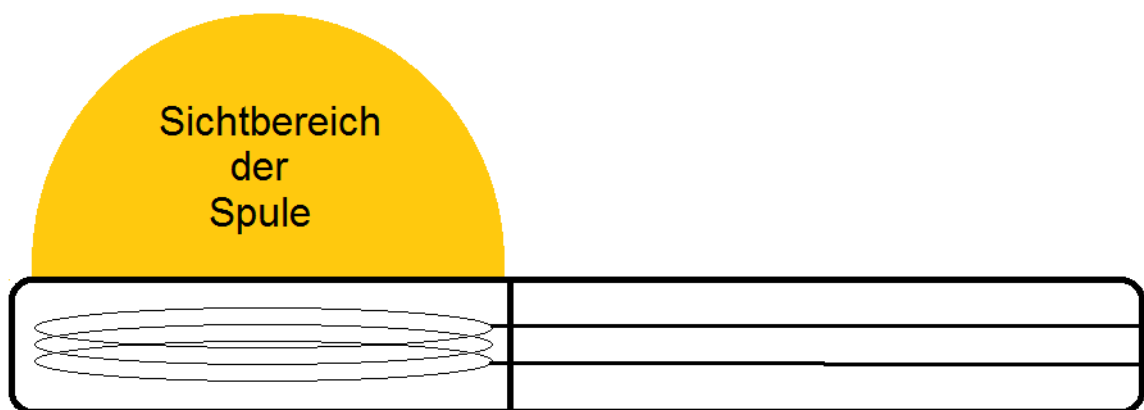
Zur Applikation des Markers wurden mit einem Drehschleifer ca. 5x5mm große Öffnungen oberhalb des Verdauungstraktes in die Schale der Auster geschnitten. Die Position der Öffnung wurde vorher für jede Auster individuell mittels Kernspintomographie bestimmt und ausgemessen (Abbildung 10). Die Applikation des Markers erfolgte mit einer Spritze in den Verdauungstrakt und Muskel der Auster. Der Verdauungstrakt wurde durch die vorher geschaffene Öffnung erreicht, der Muskel konnte direkt durch die Schalenöffnung erreicht und gespritzt werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Sagittaler Querschnitt durch ein Versuchstier. Rot markiert: Applikationsorte des Marker, links der Muskel, rechts der Verdauungstrakt

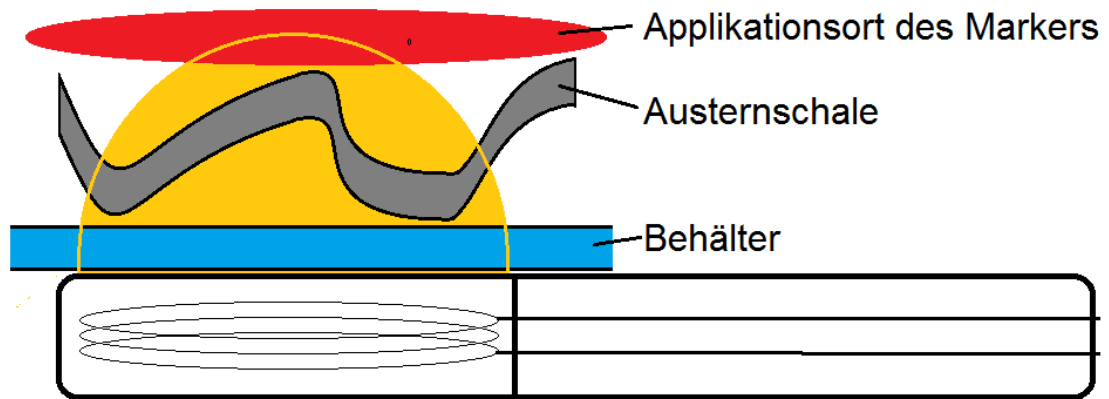
Erste Versuche mit unpräparierten Austern zeigten, dass der gewünschte Bereich, in dem die Messung erfolgen sollte, außerhalb des Sichtbereiches der Spule lag. Die Spule besitzt einen Durchmesser von ca. 3 cm. Von der Mitte der Spule erstreckt sich der Signalerfassungsbereich halbkreisförmig oberhalb der Oberseite der Spule (vgl. Abbildung 12).

Dabei liegt der sensitivste Bereich der Spule direkt im Zentrum der Messspule, reel also bauteilbedingt im Zentrum des Halbkreises direkt an der Oberfläche des Gehäuses der Spule.



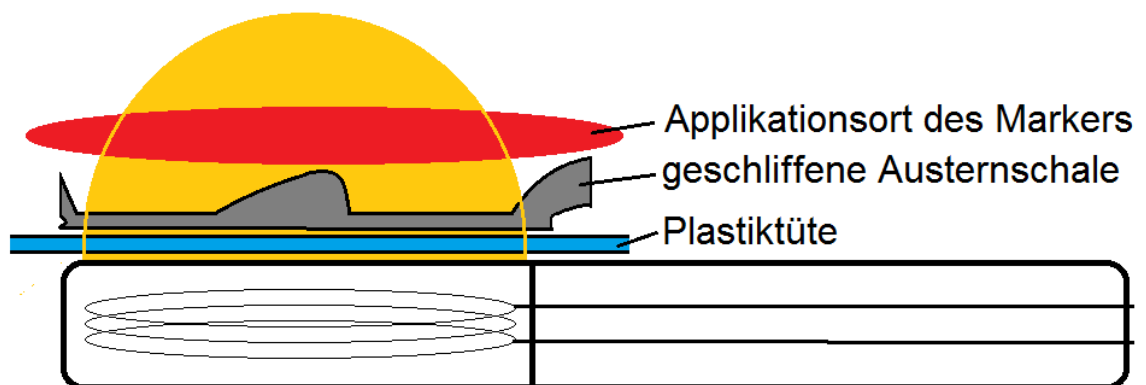
**Abbildung 12:** Sichtbereich der Oberflächenspule

Die untere Schalenhälfte von *Crassostrea Gigas* ist sehr bauchig ausgeprägt. Dazu kommt, dass die Schalenoberfläche zumeist tiefe Riefen aufweist. Damit entfernt sich der versuchstierinterne Applikationsort des Markers aus dem sensitiven Bereich der Oberflächenspule (Abbildung 13). Dazu kommt noch die Unterseite des Behälters, die in diesem Fall ca. 1 mm dick war.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der unpräparierten Unterseite oberhalb der Oberflächenspule

Vorsorglich wurden schon Versuchstiere ausgewählt, die eine flachere Ausprägung der unteren Schalenhälfte aufwiesen, jedoch war auch dort der Messort zu weit außerhalb des sensitiven Bereichs. Daraufhin wurden die Unterseiten der Versuchstiere mit einem handelsüblichen Exzentrerschleifer bearbeitet. Die Dicke der Schale wurde mit dem MRT im Bildgebungsverfahren mit einem  $^1\text{H}$ -Resonator vermessen. Anschließend wurde unter Wasserkühlung so viel Schale abgetragen, dass die Schale unterhalb des Verdauungstraktes möglichst dünn war, die Schale aber nicht perforiert wurde. (Abbildung 15)



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der geschliffenen Auster im Versuchsbehälter auf der Oberflächenspule aufgesetzt.



Die Tiere überstanden die Prozedur problemlos und waren nach einer Erholungsphase direkt einsetzbar. Durch den Eingriff konnte der für die Untersuchung interessante Bereich des Verdauungstraktes und des Muskels je nach Exemplar um ca. 1-2 cm weiter in den Messbereich der Spule gerückt werden.



**Abbildung 15:** Geschliffene Unterseite einer Auster

Zusätzlich zu dieser Prozedur wurde die Frischhaltebox durch eine gewöhnliche Plastiktüte ersetzt. Die Tiere wurden in die Tüte eingesetzt und mit einem mit Seewasser getränkten Tuch bedeckt, um die langfristige Dehydration der Versuchstiere zu reduzieren. (Abbildung 16). Die Tüte wurde auf der Oberflächenspule mit Klebeband fixiert und der Versuch durchgeführt. Durch diese Abwandlung konnte der Messbereich weitere 2-3 Millimeter an den sensitiven Bereich der Spule herangeführt werden.



**Abbildung 16:** Finaler Versuchsaufbau: Auster in Tüte mit Tuch

### 3.6. Versuchsdurchführung

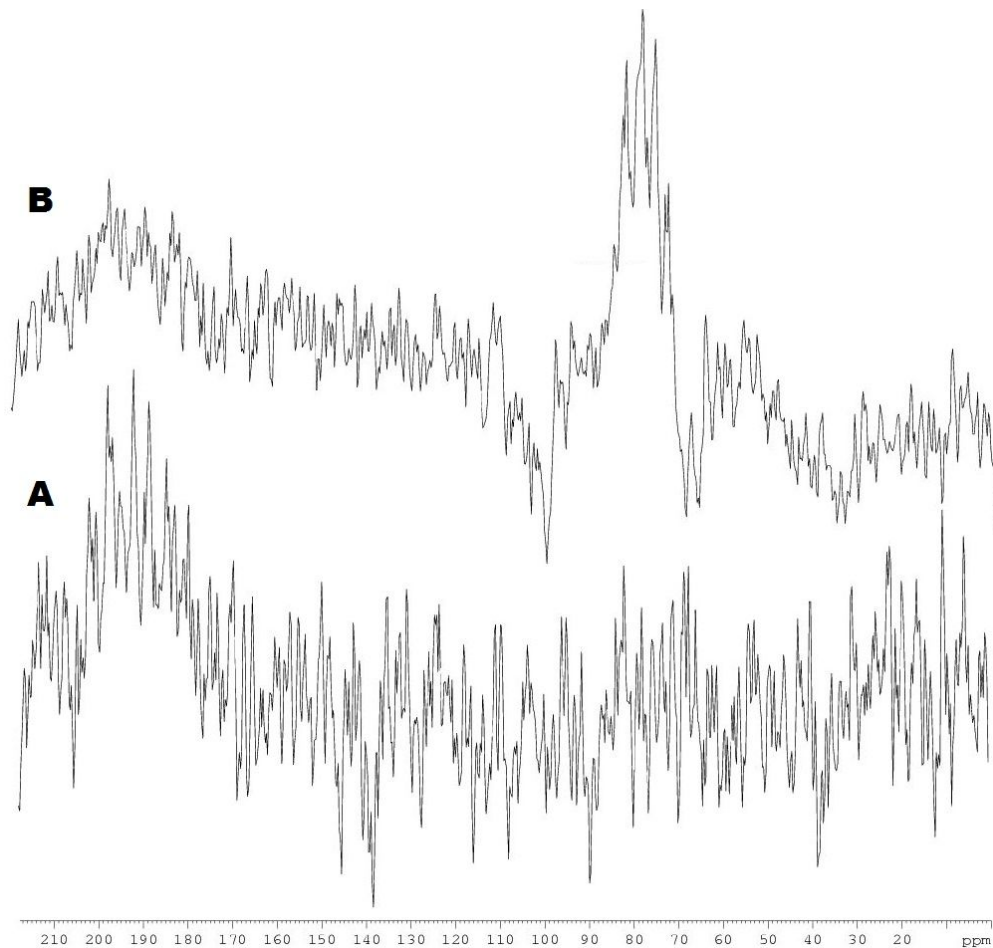
Alle Versuchstiere wurden vor den Versuchen geschliffen, mit mindestens 24h Ruhezeit nach der Präparation. Die Tiere wurden dann mit 100ml 100mmol  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucoselösung in einer der Physiologie angepassten Ringerlösung in den Verdauungstrakt gespritzt. Danach wurden die Austern im Versuchsaufbau auf der Oberflächenspule platziert. Die Messung erfolgte mit den vorher ermittelten Parametern. Ein Versuch dauert insgesamt zwischen 23 und 25 Stunden pro Applikationsort. Eine einzelne Messung dauerte dabei ca. 42 Minuten.

Die zweite Versuchsreihe verlief exakt wie die erste, nur dass diesmal der Marker in den Muskel der Austern gespritzt wurde.

## 4. Ergebnisse

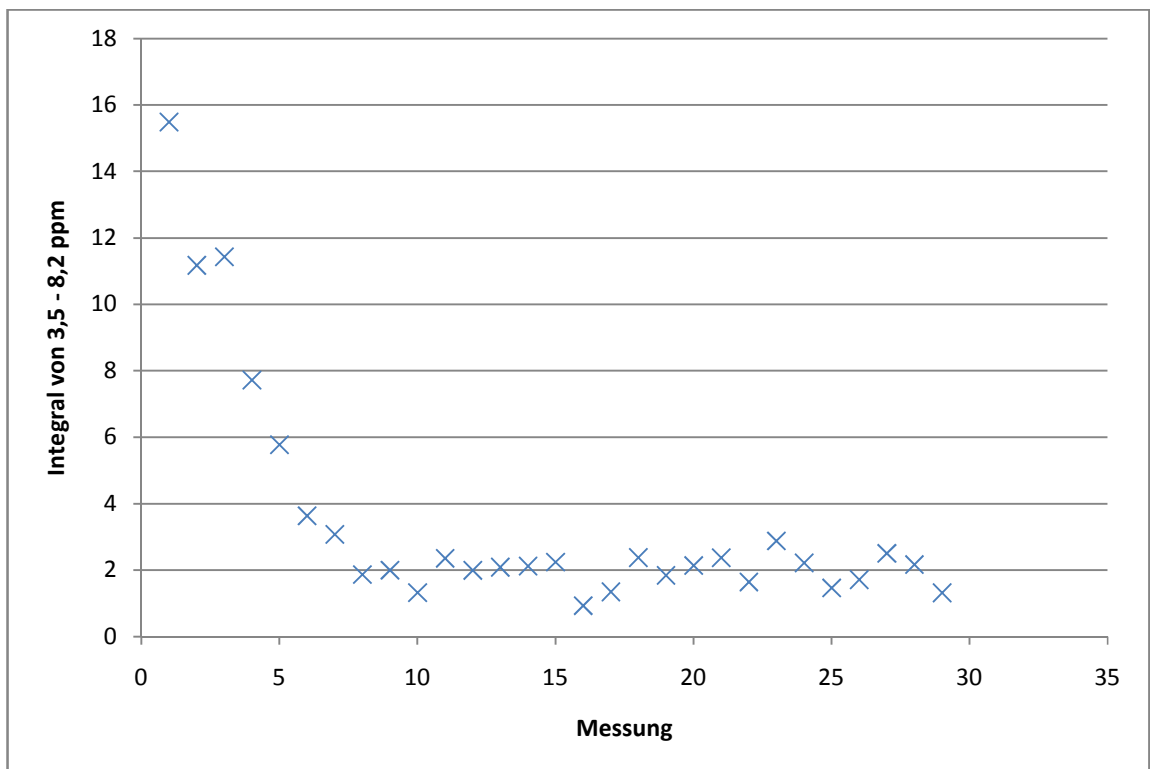
### 4.1. *In vivo* Test der Methode an *Crassostrea Gigas*

Alle Versuchstiere überstanden die gesamte Prozedur ohne Anzeichen von langfristigen Schäden. Über eine Versuchsdauer von bis zu 26 Stunden wurden die Tiere außerhalb von Seewasser ohne spezielle Belüftung gehalten. Die Tiere hielten die Schale über die Dauer des Versuches geschlossen. Nach Einsetzen in die Hälterungsbecken und eine anschließende Ruhephase von mindestens 24 Stunden zeigten die Tiere normale Aktivität und Schließreflex.



**Abbildung 17:** Vergleich der Resonanzspektren einer Auster : A) vor Injektion des Markers B) nach Injektion von 100ml 100mmol  $^{13}\text{C}$ -Glucose mit einem klaren Peak bei 90 -60 ppm

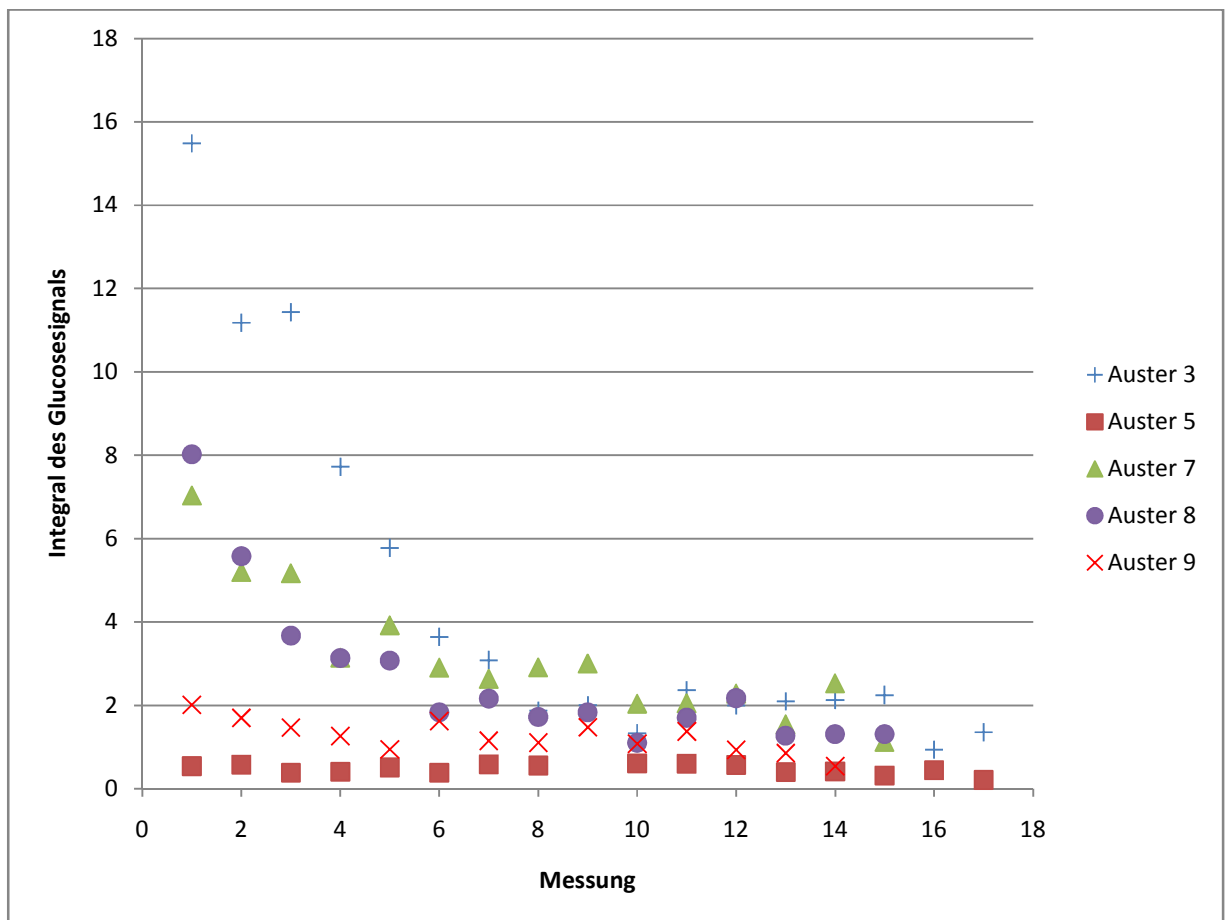
Direkt nach der Injektion zeigte sich im gemessenen Spektrum ein klares Signal des eingesetzten Markers (Abbildung 17). Zum Vergleich der einzelnen Messungen im Muskel und im Verdauungstrakt wurden die Integrale des gemessenen Glucosesignals verwendet. Über den Verlauf jedes einzelnen Versuches hinweg zeigt sich eine Abnahme der Signalintensität des Glucosesignals sowohl im Muskel als auch im Verdauungstrakt.



**Abbildung 18:** Verlauf des Glucosesignals bei Versuch Verdauungstrakt Auster 3

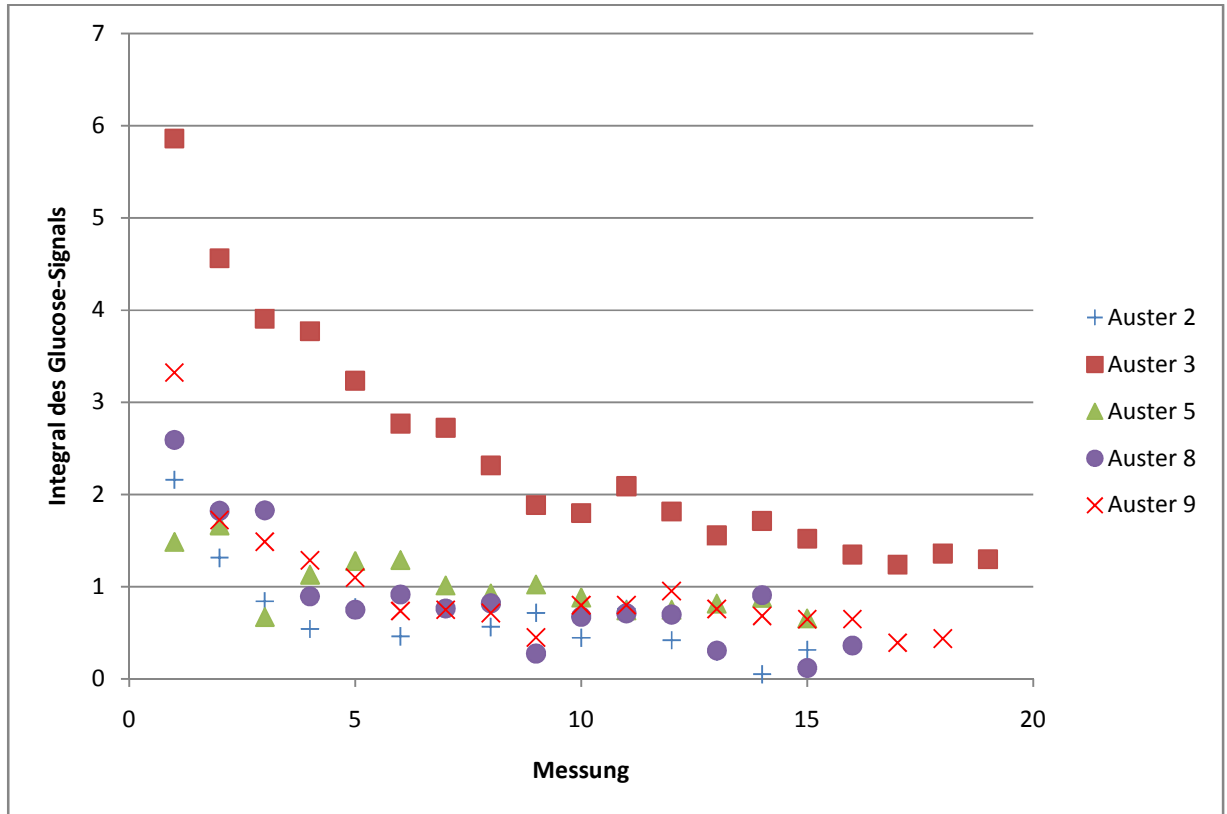
Je nach Intensität des Signals am Anfang der Versuche verändert sich der Zeitraum, über den das Signal hinweg kleiner wird, bis es sich über einen langen Zeitraum hinweg auf einen konstanten Wert einstellt. Dieser Zeitraum dauert im Muskel von knapp 6 Stunden bei Auster 9 bis hin zu 13 Stunden bei Auster 3. Bei der Injektion in den Verdauungstrakt dauert dieser Zeitraum 5 (Auster 8 nach ca. Messungen) bis 6 Stunden (Auster 3 nach ca. 9 Messungen).

Bei beiden unterschiedlichen Versuchsreihen zeigte sich bei Auster 3 die größte Signalintensität. Dies rührt möglicherweise daher, dass bei dieser Auster anatomisch bedingt der Injektionsort näher an der Spule liegt. Mit einer extrem flachen und geschliffenen Unterseite wäre somit mehr Marker im sensitiven Bereich der Spule befindlich gewesen als bei anderen Austern, obwohl in alle Austern die gleiche Menge Marker injiziert wurde.



**Abbildung 19:** Verlauf des Glucosesignals bei den Austern 3,5,7,8 und 9 nach Injektion der Markerlösung in den Verdauungstrakt

Vergleicht man die in den unterschiedlichen Regionen größten gemessenen Signale, sowohl im Muskel als auch im Verdauungstrakt die Versuchsreihe mit Auster 3, so zeigt sich, dass die Intensität im Verdauungstrakt deutlich schneller abnimmt als im Muskel. So ist im Muskel ein konstanter Wert erst nach ca. 10 Stunden erreicht, während im Verdauungstrakt bereits nach knapp 6 Stunden ein konstanter Wert erreicht ist.



**Abbildung 20:** Verlauf des Glucosesignals bei den Austern 2, 3, 5, 8 und 9 nach Injektion der Markerlösung in den Muskel

Ausnahmen stellen dabei die Versuche mit Auster 5 und 9 dar. Bei diesen Versuchstieren zeigte sich nur ein sehr schwaches Signal nach Injektion in den Verdauungstrakt, bei dem fast gar keine Abnahme des Integrals über die einzelnen Messreihen festgestellt werden konnte (vgl. Abbildung 19). Eine Vermutung für diesen Verlauf ist, dass der Marker möglicherweise nicht direkt in den Verdauungstrakt des Tieres injiziert wurde, sondern in eine Kavität innerhalb der Auster, die sich außerhalb des Messbereiches der Spule befand. Somit konnte kein Verlauf des Glucosesignals bei diesen Tieren gemessen werden. Eine andere Erklärung wäre, dass trotz einer korrekten Injektion der relevante Bereich des Tieres anatomisch bedingt außerhalb des Messbereichs der Spule lag, oder dass das Tier falsch auf der Spulenoberfläche platziert wurde.

Die Austern wurden zu einem späteren Zeitpunkt erneut an beiden Injektionsorten spektroskopisch untersucht, jedes Mal konnte kein Restsignal von  $^{13}\text{C}$ -markierten Stoffen nachgewiesen werden. Auch eine Untersuchung des Kondenswassers in der Tüte zeigte kein Spuren eines  $^{13}\text{C}$ -Signals, d.h. der injiziert Stoff wurde während des Versuches nicht direkt ausgeschieden oder dauerhaft eingelagert. Dies kann bedeuten, dass die injizierte Glucose außerhalb des sensitiven Bereichs der Spule transportiert wurde und zu einem späteren Zeitpunkt, z.B. nach Zurückbringen in die Hälterungsbecken, ausgeschieden wurde. Eine weitere Erklärung wäre ein Abbau der Glucose innerhalb des Tieres. Bei keinem Versuch konnte jedoch ein Signal von Stoffwechselprodukten, die aus einem Abbau der Glucose resultieren könnten, nachgewiesen werden. Auf Grund der geringen Sensitivität der Messung ist es möglich, dass diese im Rauschen der Spektren nicht sichtbar werden.

## 5. Diskussion und Ausblick

In der Versuchsvorbereitung wurde ein  $^{13}\text{C}$ -Phantom erstellt und daran die Messparameter für eine *in vivo*-Versuchsdurchführung an der Pazifischen Felsenauster bestimmt. Es wurde eine geeignete Pulssequenz mit Decoupling gewählt und die Parameter für die maximal mögliche Signalintensität bestimmt.

Es wurde ein für das Experiment geeigneter Versuchsaufbau gewählt. Dieser zeichnete sich durch einfache Bauweise, Wiederverwendbarkeit für andere Versuche und geringe Kosten aus. Desweiteren wurden eine geeignete Methode zur Präparation der Versuchstiere gewählt. Durch Abschleifen der unteren Schalenhälfte konnte der applizierte Marker innerhalb des Versuchstieres in den sensitiven Bereich der Spule gebracht werden. Die kleine Öffnung der Schale an der Oberseite der Muschel ermöglichte eine direkte Applikation der Markerlösung in den Verdauungstrakt der Muschel. Keines der Tiere wies eine negative Beeinflussung nach der Präparation auf.

In mehreren Versuchen konnte die *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie an der Pazifischen Felsenauster *Crassostrea Gigas* erfolgreich durchgeführt werden. Eine lokale Selektion konnte dabei nur durch die geringe Größe der Oberflächenspule und eine Platzierung unterhalb verschiedener anatomischer Strukturen des Tieres erfolgen. Lokalisierte spektroskopische Messungen konnten nicht durchgeführt werden. Über mehrere Versuche konnte eine Abnahme der Konzentration des Markers im gemessenen Bereich gezeigt werden.

Der Versuchsaufbau war für die Versuche sehr geeignet. Keines der verbauten Materialien war paramagnetisch, weder die Bildgebung noch die spektroskopischen Messungen wurden durch den Versuchsaufbau beeinflusst. Dadurch, dass die Tiere nur in einer Plastiktüte eingesetzt wurden, konnte die Beladung mit Seewasser gering gehalten werden und die Beeinflussung des Messergebnisses durch diesen Parameter verringert werden. Eine Belüftung oder Bewässerung erwies sich für die Tiere bei einer Versuchsdauer unter 26 Stunden als nicht notwendig.



Die Versuchstiere erwiesen sich während der Arbeit als äußerst robust. Beide äußerst invasive Präparationen der Schale (Zugang an der Oberseite, Abschleifen der Unterseite) wurden von den Tieren ohne Auftreten von negativen Vitalitätszeichen aufgenommen. Alle Versuchstiere zeigten nach Erholungszeiten von ca. 24 Stunden einen unauffälligen Schließreflex. Die Öffnung der Oberseite hätte kleiner ausfallen können. Eine kleine Bohrung würde zur Applikation des Markers in den Verdauungstrakt mit einer Spritze ausreichen. Zur Sicherheit kann die Schalendicke vorher mit Flash-Bildgebung im MRT bestimmt werden, dadurch sollte das Risiko einer Verletzung des Tieres minimiert werden.

Das erreichte Signal-Rauschen-Verhältnis lässt nur eine Aussage über hochkonzentrierte  $^{13}\text{C}$ -Signale zu. Damit ist mit der erreichten Signalqualität im verwendeten Aufbau nur eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Konzentration des applizierten Markers möglich. Das Auftreten von Signalen aus natürlichen Quellen wird ausgeschlossen, mögliche Abbauprodukte resultierend aus der Verstoffwechslung der verabreichten Glucose konnten in den vorliegenden Spektren nicht identifiziert werden. Dies kann zum einen daran liegen, dass vorhandene Signale im Rauschen untergehen oder nicht vorhanden sind. Um eine Aussage darüber treffen zu können, muss die Signalstärke weiter optimiert werden. Eine höhere Konzentration des verwendeten Markers wäre möglich, muss aber vorher auf Verträglichkeit durch das Versuchstier getestet werden. Eine weitaus bessere Lösung wäre jedoch eine weitere Optimierung des Signal-Rauschen-Verhältnisses durch weitere Optimierung der Anregung. Exakte Messung der tatsächlich abgegeben Leistung auf die Oberflächenspule kann Aufschluss darüber geben, ob hier bereits die maximale Leistung erreicht wurde. Die Versuchsreihe zur Sequenzoptimierung lässt schließen, dass bereits eine Auslenkung mit einem Flipwinkel von  $90^\circ$  bei dem verwendeten BP-Puls erreicht wurde. Jedoch könnte eine höhere eingestrahelte Leistung bei einem anderen Anregungspuls eine höhere Signalstärke erreichen. Die Entkopplung wurde mit einer großen  $^1\text{H}$ -Resonator mit 30cm Bohrung durchgeführt. Eine lokale Anregung der Wasserstoff-Atome, z.B. mit einer  $^1\text{H}$ -Oberflächenspule könnte ein besseres Ergebnis erzielen.

Eine Aussage über die Wahl der Applikationsorte lässt sich schlecht treffen. Zum einen wurde die Abnahme des Markers in beiden Applikationsorten nachgewiesen, zum anderen lässt sich keine Aussage darüber treffen, wieso das Signal abnimmt. Der Marker kann abtransportiert und vom Tier an einem anderen Ort verstoffwechselt oder einfach ausgeschieden worden sein. Eine spektroskopische Analyse des Behälterwassers und seziiertem Gewebes der Versuchstiere im hochauflösenden NMR-Spektroskop auf ausgeschiedene  $^{13}\text{C}$ -markierte Glucose oder andere Stoffwechselprodukte könnte darüber Aufklärung geben. Aus zeitlichen Gründen war dies am Ende dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.

Die *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie kann zukünftig detaillierte Auskünfte über den Stoffwechsel von marinen Lebewesen geben. Die hier vorgestellte Arbeit zeigt, dass die *in vivo* Messung an marinen Lebewesen im 4,7 Tesla MRT möglich ist. Eine weitere Optimierung der Signalqualität kann detaillierte Aufschlüsse über die Verstoffwechselung größerer Kohlenstoffmoleküle und deren Abbauprodukte geben. Die Auswahl an  $^{13}\text{C}$ -Markern, die zur Verfügung stehen ist groß, einen Ansatz zur Untersuchung des Energiehaushalts zeigten Lee et al. im Jahre 2010 [13]. weitere Optionen sind die Begasung der Versuchstiere mit  $^{13}\text{CO}_2$  oder eine Fütterung mit  $^{13}\text{C}$ -markierte Algen

## Quellen

- [1] Kursunogamalu, Behram N., Mintz, Stephan L. und Perlmutter, Arnold. 2001. *Global Warming and Energy Policy*. Berlin: Springer, 2001. 978-0-306-46635-9
- [2] Lee H., Tikunow A., Stoskopf M., MacDonald J., *Applications of Chemical Shift Imaging to Marine Sciences*, Mar. Drugs 2010, 8, 2369-238
- [3] H. Schascher, *Kleine Theorie zur Kernspintomographie*, ISBN: 3-86541-090-1, Lehmanns Media -LOB.de, 2005
- [4] <http://www.fmri-easy.de/relaxation-Dateien/image017.gif>, 14.09.2009
- [5] <https://lp.uni-goettingen.de/get/image/2267>, 14.09.2009
- [6] [http://www.iftm.de/elearning/vmri/mr\\_einfuehrung/images/spin\\_340.gif](http://www.iftm.de/elearning/vmri/mr_einfuehrung/images/spin_340.gif), 14.09.2009
- [7] <http://www.faidherbe.org/site/cours/dupuis/images25/rmnspr.gif>, 14.09.2009
- [8] Felicitas Charlotte Wermter, *Entwicklung einer kontrastmittelgestützten in vivo <sup>31</sup>P-NMR Methode zur simultanen Quantifizierung von extra- und intrazellulären pH-Werten*, Diplomarbeit HS Bremerhaven, 2009
- [9] [http://www.lestaxinomes.org/IMG/jpg/Crassostrea\\_gigas\\_Maud\\_8.jpg](http://www.lestaxinomes.org/IMG/jpg/Crassostrea_gigas_Maud_8.jpg), 25.04.2013
- [10] <http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/crassostrea.html>, 25.04.2013
- [11] Levitt M., *Spin Dynamic – Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2002, ISBN 0-471-48921-2
- [12] Herzog W.-D., Messerschmidt M., *NMR-Spektroskopie für Anwender*, 1995, VCH-Verlag, ISBN: 3-527-28690-X
- [13] Lee H., Tikunow A., Stoskopf M., MacDonald J., *Applications of Chemical Shift Imaging to Marine Sciences*, Mar. Drugs 2010, 8, 2369-238

- 
- [14] Basil Künnecke, *Application of  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy to Metabolic Studies on Animals*, Biocenter of the University Basel, Switzerland
- [15] Freeman R., Kupce E., *Decoupling: Theory and Practice I. Current Methods and Recent Concepts*, 1997, NMR in Biomedicine, Vol. 10, 372-380
- [16] Althaus M., *Entwicklung und Optimierung von Pulssequenzen und Rekonstruktionsalgorithmen zur  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Bildgebung mit reduzierter Messzeit*, 2004, Cuvillier Verlag Göttingen, ISBN 3-86537-311-9
- [17] Williams D., Fleming I., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 1971, Georg Thieme Verlag, ISBN 313-437202-9
- [18] Günther H., *NMR-Spektroskopie Eine Einführung*, 1973, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-487501-2

# Anhang

## Ergebnisse Messungen Muskel

### Auster 2

ppm-Bereich	115,4 - 95,5	78,1 - 74,8	42,4 - 37,8	35,8 - 32,9	9,2 - 6,5	2,2 - -11,3	-25,2 - 28	-63,8 - -70,1	-62,2 - -78,9	Uhrzeit
Scan										
4	1	0,038	0,198	-0,0134	0,1897	2,1585	0,039	0,0297	0,0988	11:50
5	0,9022	0,0487	0,0313	0,1785	0,0313	1,3128	0,0921	0,0838	0,1393	12:32
6	0,7964	-0,0636	-0,0177	-0,0617	-0,077	0,842	0,03	0,1195	0,3249	13:15
7	1,1583	-0,0688	-0,0591	0,0304	-0,0144	0,5406	0,0963	0,2463	0,358	13:58
8	0,829	0,0021	0,1165	0,0701	0,1176	0,7764	0,1027	0,2878	0,5058	14:40
9	0,988	0,0125	0,0705	-0,0019	-0,0545	0,4616	0,0937	0,176	0,333	15:23
10	0,6763	-0,0499	-0,0443	0,0711	-0,0687	0,7584	0,0821	0,2146	0,272	16:06
11	0,7323	-0,0456	0,0464	0,0337	-0,0097	0,563	0,158	0,1175	0,2631	16:48
12	0,6765	-0,0239	-0,0464	0,0189	0,0834	0,7168	0,1053	0,13	0,251	17:31
13	0,9232	0,0198	-0,0503	0,0563	-0,0617	0,4449	0,1069	0,2861	0,6046	18:14
14	0,9279	-0,0142	-0,0179	0,0396	-0,0314	0,7592	0,0393	0,1255	0,3172	18:56
15	1,0059	0,0458	0,0847	-0,0079	-0,0274	0,4194	0,142	0,2085	0,3581	19:39
16	1,119	-0,0439	0,0876	0,02	-0,0057	0,2975	0,0892	0,0654	0,2191	20:22
17	1,3921	-0,0387	0,0478	0,0347	0,031	0,05122	0,0858	0,2099	0,3698	21:04
18	0,9689	-0,0834	0,0615	0,0736	0,055	0,3128	0,1127	0,3151	0,5431	21:47

## Auster 3

ppm-Bereich	118,1 - 102,1	100,4 - 96,1	29,8 - 26,3	2,6 - -11,3	-26,3 - -31,4	-67,5 - -74,3	-64,1 - -83,9	Uhrzeit
<b>Scan</b>								
20	1	0,1757	0,223	5,8574	0,5548	0,1488	0,5036	00:30
21	1,275	0,2393	-0,1069	4,5609	0,5328	0,1658	0,5483	01:12
22	1,8576	0,1593	0,0856	3,9054	0,3225	0,4147	0,7282	01:55
23	1,2478	0,0713	-0,0339	3,7701	0,4085	0,3115	0,4091	02:38
24	1,4877	0,2386	0,0238	3,2331	0,245	0,4103	0,9986	03:20
25	1,5038	0,0981	0,1024	2,7695	0,5825	0,4546	0,8136	04:03
26	1,163	0,2513	0,0294	2,7227	0,2211	0,2689	0,47	04:46
27	1,0789	0,2114	0,1871	2,3141	0,5004	0,2064	0,5724	05:28
28	1,0979	0,3315	0,2407	1,8863	0,3585	0,2066	0,7153	06:11
29	1,2192	0,083	0,1317	1,7974	0,1986	0,4965	0,7529	06:54
30	1,3075	0,313	0,1296	2,0896	0,4235	0,5427	0,9408	07:36
31	1,1807	0,2253	0,009	1,8146	0,2708	0,3681	0,8218	08:19
32	0,5465	0,1496	0,0939	1,5563	0,2916	0,4888	0,9096	09:02
33	1,6429	0,1286	0,1816	1,7136	0,4195	0,1846	1,0833	09:44
34	1,3018	0,3665	0,0186	1,5218	0,5082	0,578	1,1054	10:27
35	1,1022	0,3489	-0,134	1,3497	0,3839	0,1689	0,484	11:10
36	1,3882	0,1526	-0,0549	1,2413	0,5383	0,6555	0,7699	11:52
37	1,2075	0,3179	0,0422	1,3608	0,317	0,3618	0,9037	12:35
38	1,3174	0,2261	0,1316	1,2972	0,4847	0,4007	0,6705	13:18

Auster 5

ppm-Bereich	119 - 94	49,7 - 28,2	14,6 - -6	-16,5 - -27,9	-57,9 - -69	-53,5 - 84,2	Uhrzeit
Scan							
5	1	-0,3904	1,4835	-0,1722	0,4084	1,1017	10:23
6	0,4802	0,3131	1,6634	0,0306	0,3527	0,2602	11:05
7	1,0261	-0,3018	0,6701	-0,3007	0,3883	0,9016	11:48
8	0,424	0,224	1,1291	0,1056	0,2629	0,4362	12:31
9	0,6856	0,2246	1,2756	-0,0503	0,208	0,4803	13:13
10	0,5987	0,0965	1,2887	-0,0385	0,2631	0,3389	13:56
11	0,6291	0,157	1,0116	-0,101	0,2819	0,4706	14:39
12	0,4289	0,0001	0,9254	0,1896	0,4594	0,643	15:21
13	0,5003	0,0419	1,0218	-0,0744	0,2336	0,4372	16:04
14	0,5315	0,0963	0,8804	0,0281	0,4123	0,5073	16:47
15	0,4617	0,3452	0,7417	0,0306	0,2996	0,4701	17:29
16	0,6131	0,2217	0,749	0,137	0,3418	0,5749	18:12
17	0,5394	-0,0383	0,815	0,074	0,2941	0,4881	18:55
18	0,6963	0,0089	0,8786	0,0813	0,5183	0,7251	19:37
19	0,7465	0,2418	0,6545	-0,0653	0,3845	0,5175	20:20

Auster 8

ppm-Bereich	117 - 101,6	101 - 96,1	38,9 - 33,1	24,1 - 11,6	5,2 - -10,2	-11 - -20	-22,1 - -29,3	-30,8 - -47,9	-62,1 - -69,7	Uhrzeit
<b>Scan</b>										
56	1	0,1862	0,0185	-0,7474	2,5912	-0,0792	0,1438	-0,4834	-0,0672	01:59
57	1,0191	0,2172	0,1319	-0,3669	1,8234	-0,09	0,2267	-0,5704	0,0575	02:41
58	0,6565	0,2823	0,083	-0,2622	1,8282	-0,0428	0,0899	-0,8995	0,2993	03:24
59	0,6138	0,2876	0,2	-0,1369	0,8948	-0,2227	0,2297	-0,7712	0,3769	04:07
60	1,0203	0,3454	0,0878	-0,1512	0,7507	0,0739	0,2137	-0,8798	0,2285	04:49
61	0,8982	0,321	-0,0074	-0,2287	0,9158	-0,4118	0,4145	-0,7855	0,3395	05:32
62	1,3625	0,3527	0,0681	-0,2932	0,7644	-0,2649	0,268	-0,8772	0,5297	06:15
63	0,9497	0,4418	0,1865	-0,1024	0,819	-0,3085	0,3891	-0,4904	0,7396	06:57
64	1,1806	0,3636	0,1318	0,1286	0,2752	-0,4786	0,3801	-0,8105	0,4441	07:40
65	1,1295	0,31	0,0415	0,1477	0,6741	-0,265	0,6567	-0,6509	0,2132	08:23
66	0,9546	0,7499	-0,0443	-0,0633	0,71126	-0,0911	0,4564	-1,2071	0,5895	09:05
67	0,9957	0,3711	-0,0752	-0,1633	0,6976	-0,5202	0,4194	-0,949	0,5853	09:48
68	1,0835	0,4472	-0,0627	-0,0388	0,3078	-0,5667	0,2194	-0,595	0,4813	10:31
69	2,785	0,8754	0,2541	0,1306	0,9094	0,0427	0,7137	0,2515	1,3269	11:13
70	0,715	0,2736	0,1412	0,3013	0,119	-0,4668	0,4789	-0,8777	0,864	11:56



## Auster 9

ppm-Bereich	117 - 101,6	101 - 96,1	38,9 - 33,1	24,1 - 11,6	5,2 - -10,2	-11 - -20	-22,1 - -29,3	-30,8 - -47,9	-62,1 - -69,7	Uhrzeit
Scan										
74	1	0,1805	-0,0842	-0,2809	3,322	-0,3973	0,0857	-0,5835	0,4851	18:45
75	1,0281	0,0232	-0,0408	-0,2664	1,7229	-0,3309	-0,0925	-0,6495	0,1993	19:27
76	1,0139	0,1608	-0,0214	-0,4526	1,4859	-0,0354	0,097	-0,3979	0,5638	20:10
77	0,8958	0,1141	0,0279	-0,2293	1,2855	-0,1065	0,0527	-0,6736	0,3124	20:53
78	0,5595	-0,0039	-0,0351	-0,0162	1,0966	-0,1227	-0,0242	-0,6263	0,1991	21:35
79	0,5067	0,1008	-0,0934	0,0124	0,7358	-0,1295	0,0224	-0,5624	0,3136	22:18
80	0,6961	0,1046	0,0184	-0,2197	0,7483	-0,1066	0,0362	-0,7457	0,3307	23:01
81	0,577	0,2007	0,0681	-0,19	0,7133	-0,0512	0,1486	-0,6285	0,32	23:43
82	0,485	0,158	0,0365	-0,182	0,4482	0,0248	0,1099	-0,7933	0,3801	00:26
83	0,9991	0,2124	-0,0039	-0,0099	0,7985	0,012	0,0512	-0,7245	0,386	01:09
84	0,6974	0,3291	0,0251	0,092	0,7991	-0,1055	0,0669	-0,8694	0,2193	01:51
85	0,824	0,0055	0,063	-0,1993	0,953	-0,0938	-0,0273	-0,5074	0,2256	02:34
86	0,8422	0,1112	0,0932	-0,0723	0,7572	-0,0428	0,0118	-0,7607	0,2496	03:17
87	0,8276	0,0906	0,0344	0,124	0,6824	-0,2274	0,0975	-0,667	0,3092	03:59
88	0,8797	0,2775	0,0412	0,0474	0,6462	0,0067	0,075	-0,7547	0,1869	04:42
89	0,8125	-0,0084	-0,0047	-0,0502	0,6471	-0,2038	-0,0208	-0,8244	-0,316	05:25
90	0,4419	0,1842	0,1457	-0,0083	0,3911	-0,1687	0,0267	-0,8371	0,241	06:07
91	0,7772	0,227	-0,0542	-0,0943	0,4362	-0,2167	0,0875	-0,5152	0,2124	06:50

**Ergebnisse Messungen Verdauungstrakt****Auster 3**

ppm-Bereich	115,2 - 94	70,3 - 68,7	3,5 - -8,2	-22,8 - -27,2	-44 - -71,9	-57,3 - -64,6	Uhrzeit
Scan							
69	1	0,04	15,4845	0,3557	2,8368	0,5285	11:53
70	0,8219	-0,034	11,178	-0,0531	0,7329	0,5519	12:35
71	2,3677	0,3494	11,4298	0,8342	2,5625	1,5245	13:18
72	2,6126	-0,1983	7,7195	0,5295	2,0736	0,6817	14:01
73	2,0336	-0,018	5,7744	0,4515	1,5051	0,7996	14:43
74	5,313	0,1768	3,6371	0,08	3,8854	0,7144	15:26
75	1,3645	-0,0644	3,0817	-0,3939	2,3571	1,248	16:09
76	1,3228	-0,2722	1,8679	0,5897	1,4866	0,1542	16:51
77	1,4251	0,0003	2,0003	0,0639	2,4956	0,6401	17:34
78	3,1058	-0,0527	1,324	-0,001	0,0965	0,2413	18:17
79	0,5853	0,0235	2,3599	0,1099	1,0938	0,957	18:59
80	0,8306	0,0641	1,9968	0,3138	0,9877	-0,0998	19:42
81	1,1811	-0,0944	2,0897	0,5278	2,7672	0,5738	20:25
82	1,5361	0,3086	2,1201	0,3209	2,8222	0,4836	21:07
83	2,1006	-0,0257	2,2447	0,5731	1,3554	0,9254	21:50
84	0,595	-0,0993	0,9335	0,0348	1,8398	0,4794	22:33
85	1,0684	0,1884	1,3507	0,3335	3,2606	0,5983	23:15
86	2,1735	-0,2344	2,3793	-0,5917	2,6007	1,4514	23:58
87	1,2912	-0,1428	1,8476	0,0941	1,3459	0,215	00:41
88	2,5904	0,4547	2,1441	0,3592	1,9086	0,8464	01:23
89	1,6551	-0,1423	2,3784	0,1759	1,0599	0,5196	02:06
90	1,1603	-0,1998	1,6474	0,4268	1,1438	1,0833	02:49
91	0,806	-0,0218	2,8834	0,3649	1,3134	0,7493	03:31
92	0,5766	0,3904	2,221	0,1838	2,1281	-0,2343	04:14
93	0,6137	0,1758	1,465	0,2953	1,4153	0,5607	04:57
94	1,6678	0,6636	1,7149	0,4349	0,7881	0,4037	05:39
95	1,0757	0,2367	2,509	0,4062	1,8776	0,961	06:22
96	2,4685	-0,331	2,1716	0,6374	3,0599	0,7886	07:05

## Auster 5

ppm-Bereich	119,5 - 101,4	100,9 - 94,3	51,1 - 43,0	19,8 - 12,1	6,5 --7,8	-9,4 --16,2	-17 --19,4	-24,9 --26,9	-52 --57,3	Uhrzeit	
Scan											
4	1	0,1369	0,2222	0,5365	5,1065	-0,8953	0,2602	0,1464	0,9075	10:52	
5		0,2602	0,3716	0,573	3,9167	-0,9268	0,1427	0,0537	0,6435	11:34	
6		0,1412	0,3376	0,3825	4,4264	-1,069	0,0173	0,0664	0,4545	12:17	
7		1,1337	0,0671	0,3989	4,1587	-0,6455	0,0548	0,1523	0,6463	13:00	
8		0,9485	-0,0114	0,5057	4,1127	-1,1903	0,1789	0,0448	0,5383	13:42	
9		1,3357	0,049	0,3165	4,181	-1,081	0,027	0,061	0,4574	14:25	
10		0,5143	0,2749	0,5833	4,1618	-1,2726	0,0201	0,0775	0,4607	15:08	
11		0,9917	0,112	0,5902	4,2247	-0,9782	0,0751	0,0023	0,5865	15:50	
12				Error: Spule 31P/1H/13C verlangt							16:33
13		0,9924	0,1808	0,4978	4,0228	-0,8754	0,0193	-0,0031	0,4129	17:16	
14		1,2755	0,1575	0,4435	4,0291	-0,908	0,0503	0,0093	0,4724	17:58	
15		1,0772	0,1169	0,2159	4,13	-0,8989	0,0293	0,0541	0,5395	18:41	
16		0,8474	0,1898	0,1535	3,5998	-0,9331	0,0308	0,1088	0,4593	19:24	
17		0,8445	0,0596	0,1997	4,1102	-1,0802	0,0221	0,0135	0,6113	20:06	
18		1,0781	0,0465	0,3156	4,4035	-1,2056	0,0237	0,0854	0,6697	20:49	
19		0,9208	0,0868	0,3732	4,1697	-0,7692	0,0626	-0,0535	0,6096	21:32	
20		0,7321	0,1631	0,3102	4,1172	-0,919	0,1018	0,0628	0,593	22:14	

## Auster 7

ppm-Bereich	113,7 - 102,4	96,1 - 92,5	50,2 - 40,2	21,8 - 9,7	8,5 - -13,1	-23,8 - -29,8	-52,33 - -55
Scan							
22	1	0,1085	0,4962	0,6443	7,0369	0,6444	0,5589
23	0,917	0,2223	0,1108	0,2582	5,198	-0,0833	0,2953
24	0,8437	0,3307	0,3057	0,2239	5,1669	0,0682	0,3728
25	1,4325	0,1175	0,4862	0,3463	3,1429	-0,124	0,3219
26	0,9615	0,0857	0,2861	0,0286	3,9216	0,1058	0,2572
27	1,0095	0,3582	0,4279	-0,0095	2,9042	-0,0386	0,2741
28	1,0129	0,2034	0,1716	-0,0235	2,6309	0,1955	0,3862
29	1,2083	0,168	0,371	-0,0952	2,9095	0,2662	0,3203
30	1,1752	0,3074	0,4611	-0,0565	3,0009	0,1021	0,3437
31	1,2775	0,3032	0,3058	-0,4515	2,0376	0,0806	0,1381
32	0,8998	0,157	0,4096	-0,1785	2,0493	0,0951	0,2969
33	1,1255	0,2071	0,2205	0,058	2,2802	0,1503	0,377
34	0,8757	0,3379	0,4218	0,1506	1,543	0,3169	0,3412
35	1,0508	0,2759	0,5463	-0,0729	2,5288	0,2139	0,2698
36	1,1193	0,1789	0,3622	-0,01	1,1218	0,1366	0,1694

## Auster 8

ppm-Bereich	104,8 - 107,1	106,4 - 96	73,1 - 79,7	15,3 - 13,1	3,1 - 10,9	-17 - -19,6	-24,4 - -26,9	-63,2 - 70,2
Scan								
38	1	0,7278	-0,1493	0,367	8,0192	0,7507	0,1512	0,4143
39	1,1545	0,475	0,0346	0,2178	5,5754	0,4201	0,1095	0,2382
40	0,7936	0,3826	0,1373	0,1843	3,6689	0,3391	0,1091	0,4129
41	0,9117	0,6275	-0,1934	0,1486	3,1275	0,1686	0,1192	0,0814
42	0,7719	0,8386	0,3463	-0,0574	3,068	0,2773	-0,0021	0,667
43	1,3294	0,729	-0,0988	-0,0586	1,829	0,0429	0,2322	0,8091
44	1,5588	0,9237	-0,3374	0,1997	2,1578	0,107	0,2311	0,3872
45	0,9073	1,0027	-0,1863	0,0291	1,7157	-0,1174	0,1187	0,8791
46	0,7758	1,2203	-0,0263	0,2586	1,8272	-0,0204	0,1118	0,3958
47	0,9408	0,4162	0,2209	0,0742	1,097	-0,0509	0,1136	0,3891
48	1,4629	0,3604	-0,2258	0,2525	1,6973	0,0507	0,1284	0,6762
49	1,1639	0,8861	-0,124	-0,0673	2,1685	0,1799	0,2889	0,6826
50	1,1719	0,3312	-0,2184	-0,0599	1,2674	-0,0226	0,0462	0,8159
51	0,9903	0,6615	-0,1494	-0,0093	1,304	-0,0112	0,0269	0,765
52	0,9903	0,6615	-0,1494	-0,0093	1,304	-0,0112	0,0269	0,765

## Auster 9

ppm-Bereich	115.2 - 104.8	102.6 - 91,9	78,1 - 75,9	69,6 - 67,3	13,1 - 4,4	4,1 - -8,9	-19,9 - 22,3	-24,0 - -27,4	-54,9 - -56,9	-65,3 - -68	Uhrzeit
54	1	0,4117	-0,1383	0,1163	2,0054	5,6164	-0,0416	0,167	0,4364	0,2864	00:10
55	1,4535	0,5497	0,0638	-0,077	1,6937	5,0301	-0,0721	0,2261	0,3544	0,2675	00:52
56	1,1769	0,5915	-0,0143	0,0509	1,4634	5,4502	-0,0018	0,0864	0,356	0,5758	01:35
57	1,1899	0,6366	0,1783	-0,0192	1,2583	5,3304	0,0703	0,0935	0,4374	0,1173	02:18
58	1,6377	0,588	0,0081	-0,0979	0,9395	4,776	0,103	0,09	0,1617	0,1751	03:00
59	1,568	0,9226	0,0053	-0,0781	1,617	4,3621	0,1839	0,0505	0,2311	0,1958	03:43
60	0,9737	1,1324	-0,1761	0,1268	1,1464	5,0002	0,2252	0,2085	0,5145	0,2935	04:26
61	1,3022	0,4938	-0,0324	0,0251	1,1011	4,1362	-0,1253	0,0905	0,3315	0,5186	05:08
62	1,025	0,3838	-0,0516	-0,0407	1,4704	4,8503	-0,0306	-0,1526	0,4888	0,4476	05:51
63	1,0882	0,7556	-0,1372	0,0231	1,0738	3,9045	0,1441	0,1266	0,0402	0,2519	06:34
64	1,4751	0,9419	-0,1072	-0,1987	1,3698	3,4509	0,1619	0,1883	0,2756	0,2022	07:16
65	1,1153	0,9837	-0,047	0,1198	0,9281	3,1139	-0,1665	0,1336	0,3858	0,4181	07:59
66	0,6301	0,7682	-0,0892	0,0736	0,8492	2,8993	0,0255	-0,0564	0,4008	0,4908	08:42
67	0,8606	0,4638	0,3308	-0,0018	0,5386	3,0388	0,0408	0,1339	0,1872	0,6266	09:24

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuern, Prof. Dr. Olaf Eick für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit und Dr. Christian Bock für die ausgezeichnete Betreuung am AWI.

Bei meinen Kollegen im AWI, besonders bei Felizitas Wermter, Rolf Wittig und Matthias Schmidt. .

Dank auch meiner Familie und Freundin für die fortwährende Unterstützung.