

Protonenspinrelaxation und Wasserbeweglichkeit in Muskelgewebe

Proton Spin Relaxation and Mobility of Water in Muscle Tissue

G. HELD und F. NOACK

Physikalisches Institut der Universität Stuttgart
und

V. POLLAK und B. MELTON

Department of Physics, University of North Carolina at Charlotte, USA

(Z. Naturforsch. 28 c, 59—62 [1973]; eingegangen am 19. September 1972)

Magnetic relaxation, frog muscles, water mobility, two-phase model, continuum model

The frequency dependence of the proton spin relaxation in muscle tissue shows that the mobility of the muscle water must be described by a continuous distribution of jumping times instead of the usually assumed two-phase model. Measurements on frog muscles (*rana esculenta* and *rana pipiens*, gastrocnemius) in the Larmor frequency range 3 kHz to 75 MHz can be understood quantitatively by a log-gaussian distribution, which supports a close relation to protein solutions.

1. Problemstellung und Zielsetzung

Der trotz zahlreicher Bemühungen ungeklärte Ordnungszustand und die Beweglichkeit von Wassermolekülen in Muskelgewebe¹ wurden in jüngster Zeit auch mehrfach mit Methoden der magnetischen Kernspinresonanz²⁻⁸ untersucht. Dabei diskutierte man im wesentlichen die Vorstellung, wonach das sich auf knapp 80 Gewichtsprozent belaufende Muskelwasser in zwei durch unterschiedliche Beweglichkeiten charakterisierten, gegenüber der freien Flüssigkeit höher geordneten Konfigurationen vorliegen soll, während die alternative Hypothese einer kontinuierlichen Struktur- und Sprungzeit-Verteilung zwar mehrfach angedeutet^{2, 5}, mangels experimenteller Kontrollmöglichkeiten jedoch nicht näher verfolgt wurde. Beide Modelle sind im Rahmen der gesicherten Hydratation von Proteinen, die etwa 20 Gewichtsprozent des Muskels ausmachen, denkbar.

Die in den letzten Jahren verfeinerten Methoden der magnetischen Relaxationsspektroskopie⁹ zum Studium von molekularen Bewegungen mittels der Magnetfeld- bzw. Larmorfrequenzabhängigkeit der Kernspinrelaxationszeiten boten uns eine Chance, die

Gültigkeit des Zweiphasen- oder Kontinuummodells zu überprüfen; auf die Notwendigkeit solcher Dispersionsmessungen hatten bereits BRATTON und Mitarb.² hingewiesen.

2. Meßtechnik und Ergebnisse

Unsere Relaxationsuntersuchungen erfolgten an Froschmuskeln (*rana esculenta* und *rana pipiens*, Gastrocnemius-Gewebe) mit an anderer Stelle⁹⁻¹¹ beschriebenen frequenzvariablen Kernresonanz-Impulsspektrometern. Dazu wurden die Muskeln unverletzt aus frisch getöteten Tieren herausseziert und in schließbare Glasgefäße eingebracht, in denen sie während der Dauer eines Meßprogramms von einigen Tagen mit ihrem eigenen Wasserdampfdruck im Gleichgewicht standen. Zur Bestimmung der Dispersion der Protonenspinrelaxation im verfügbaren Larmorfrequenzbereich, nämlich $3 \text{ kHz} \leq \nu_{\text{proton}} = \omega_{\text{proton}}/2\pi \leq 75 \text{ MHz}$, mußten drei Probengrößen zwischen 1 und 15 cm³ hergestellt werden, die einen, zwei bzw. zwölf Gastrocnemius-Muskeln enthielten und deren gleiches Relaxationsverhalten durch Kontrollmessungen sichergestellt werden konnte. Mit unserem Spektrometer durchaus mögliche Untersuchungen bei noch höheren Larmorfrequenzen wurden unterlassen, da die Muskeln hierzu wegen der im Hochfeld magnetbedingt kleineren Probenkammern

Sonderdruckanforderungen an Dr. F. NOACK, Physikalisches Institut der Universität D-7000 Stuttgart, Wiederholdstr. 13.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

hätten zerschnitten werden müssen. Um Alterungsprozesse hinauszuzögern, lagerten die Proben in den zur Umjustierung der Apparatur erforderlichen Meßpausen in einem Kühlgefäß bei $+5^\circ\text{C}$; über einen Zeitraum von 0,5 Stdn. bis zu 10 Tagen traten im Relaxationsverlauf keine nennenswerten Änderungen auf.

Die mit Standardverfahren⁹ parallel und senkrecht zu vorgelegten Zeemanfeldern registrierten Relaxationsfunktionen (longitudinal: Hahnsche Sättigungsmethode; transversal: Carr-Purcell und Gill-Meiboom Technik) zeigten bei einer für unser Flüssigkeitsspektrometer typischen Zeitauflösung von etwa einer Millisekunde im Rahmen der Meßgenauigkeit jeweils einen einfach exponentiellen Verlauf, d. h. nach dieser Totzeit genügten die Relaxationszeiten T_1 bzw. T_2 über mehrere Zeitkonstanten hinweg zu ihrer Festlegung. Dies steht einerseits im Einklang mit Beobachtungen an Rattenmuskeln⁵ und bedeutet andererseits, daß die an Nervengewebe⁴ im Millisekundenbereich gefundene Nichtexponentialität des Kernsignalabfalls nicht ohne weiteres auf Muskeln zu übertragen ist.

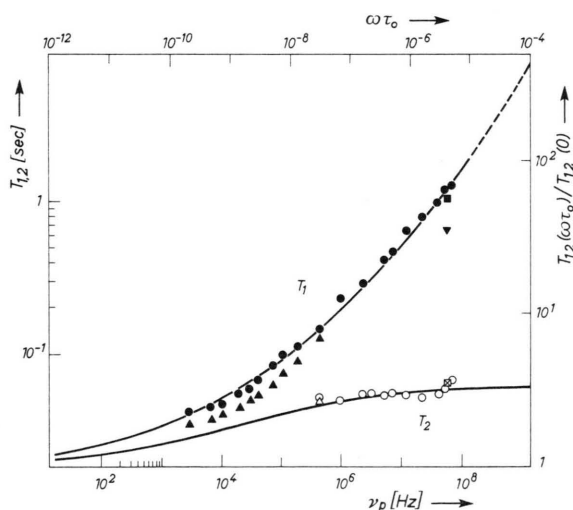


Abb. 1. Abhängigkeit der longitudinalen und transversalen Protonenspinrelaxationszeiten (T_1 , T_2) in Froschmuskelgewebe (*rana esculenta* und *rana pipiens*, gastrocnemius) von der Protonenlarmorfrequenz (ν_p) bzw. dem Dispersionsprodukt ($2\pi\nu_p \cdot \tau_0 \equiv \omega\tau_0$).

- (a) *rana esculenta*: ● T_1 bei 25°C , ○ T_2 bei 25°C , ▲ T_1 bei 0°C , △ T_2 bei 0°C ;
 (b) *rana pipiens*: ■ T_1 bei 25°C , ▼ T_1 bei 0°C , ☒ T_2 bei 25 und 0°C ;
 (c) ——— Theoretischer Verlauf nach Gl. (3a–3c) mit $\tau_0 = 1,1 \cdot 10^{-14}$ sec, $\alpha = 0,15$ sowie $T_1(0) = T_2(0) = 1,8 \cdot 10^{-2}$ sec.

Unsere Ergebnisse sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Diese Zeichnung veranschaulicht unter anderem (linke und untere Skala) die an *rana esculenta*, gastrocnemius, bei 25°C gemessene Abhängigkeit der Relaxationszeiten T_1 und T_2 von der Protonenlarmorfrequenz ν_p . Ersichtlich sind beide Größen erheblich kürzer als in reinem Wasser^{12, 13}, besonders bei kleinen Abszissenwerten, wobei schon bei den niedrigsten zugänglichen Frequenzen im kHz-Gebiet eine geringe Dispersion von T_1 besteht, die oberhalb 100 kHz die Form $T_1 \sim (\nu_p)^{0,4}$ annimmt. Insgesamt verläuft damit der $T_1(\nu_p)$ -Anstieg ähnlich wie in diamagnetischen Proteinlösungen^{14–16}, aber anders als in vielen paramagnetischen Lösungen^{9, 17, 18} außerordentlich flach; ein Abbiegen der T_1 -Dispersionskurve auf den in freiem Wasser zu erwartenden Grenzwert hin, der unter Normalbedingungen je nach Sauerstoffgehalt 2–3,5 sec beträgt¹² und der die Existenz ungebundener H_2O -Moleküle anzeigen würde, ist wegen der Meßgrenze bei 75 MHz nicht erkennbar, kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Anders als T_1 nimmt T_2 im erfaßten Frequenzintervall von 450 kHz bis 75 MHz nur wenig zu, nämlich um knapp 30%, was den Meßfehler kaum übertrifft. Denn die etwa 10 mm langen Gewebeschnitte ragten bei den Untersuchungen im höheren Megahertzbereich stets aus dem homogenen Zentrum der verwendeten Spektrometerspulen heraus und erschwerten eine genaue Justierung der Apparatur.

Neben den zuvor erläuterten Daten enthält Abb. 1 einige Angaben zur Temperaturabhängigkeit der Relaxation. Sie verdeutlichen bei 0°C gegenüber 25°C eine T_1 -Verkürzung um durchschnittlich 20% ohne wesentliche Änderung der Form der Dispersion, während die zugehörige T_2 -Abnahme überraschenderweise merklich kleiner ist bzw. im Rahmen der Meßgenauigkeit völlig verschwindet. Letzteres war schon bei früheren Experimenten¹⁹ mit dem amerikanischen Laborfrosch *rana pipiens* aufgefallen; ein umfassender Vergleich zwischen *rana pipiens* und *rana esculenta* Muskeln mußte leider unterbleiben, da die hierfür vorgesehenen Proben beim Transit offenbar gelitten hatten und nurmehr qualitativ ein zu Abb. 1 passendes Relaxationsverhalten erkennen ließen.

Die von BRATTON², ABETSEDARSKAYA³ und CHANG⁷ bei einzelnen Larmorfrequenzen für Muskelgewebe veröffentlichten T_1 -Werte weichen von unseren Daten in Abb. 1 bis zu einem Faktor zwei ab, wohingegen die T_2 -Ergebnisse gut übereinstimmen. Diese insgesamt relativ geringe Streuung bestätigt die in der Literatur^{7, 8} oft betonte Feststellung, daß die Kernresonanz

an biologischen Systemen trotz der Gewebevielfalt der Größenordnung nach meist auf ähnliche Resultate führt; für quantitative Vergleiche ist jedoch eine identische Probenpräparation unabdingbar. Insbesondere besteht eine starke Abhängigkeit der Relaxationszeiten vom Wassergehalt der Muskeln¹⁹, weshalb bei den vorliegenden Untersuchungen auf die häufige Praxis einer Gewebetränkung mit der Ringerschen Lösung⁴ verzichtet wurde.

3. Diskussion

Unsere experimentellen Ergebnisse erlauben eine Entscheidung zwischen dem Brattonschen Zweiphasen- und Kontinuummodell². Anhand des überaus flachen T_1 -Anstiegs in Funktion der Protonenlarmorfrequenz ν_p kann man ersteres, wonach Muskelwasser mit den Häufigkeitsdichten f_1 und f_2 in zwei durch diskrete Sprungzeiten τ_1 bzw. τ_2 gekennzeichneten, schnell austauschenden Konfigurationen ('solid-like' und 'liquid-like') vorliegen soll und die Protonenspins durch magnetische dipolare Wechselwirkung relaxieren, leicht ausschließen. Denn die hiernach zu erwartende Dispersion der longitudinalen Relaxationsrate $1/T_1$, nämlich

$$\frac{1}{T_1(\nu_p)} = \frac{1}{T_1(o)} \sum_i^2 \frac{1}{5 f_i \tau_i} \times \left[\frac{f_i \tau_i}{1 + (2\pi \nu_p \tau_i)^2} + \frac{4 f_i \tau_i}{1 + (4\pi \nu_p \tau_i)^2} \right] \quad (1)$$

die als Grenzfall eine charakteristische quadratische Hochfrequenzasymptote

$$T_1(\nu_p) \xrightarrow{2\pi \nu_p \tau_i \gg 1} \sim (\nu_p)^2 \quad (2)$$

enthält, tritt entgegen den Brattonschen Vorstellungen nicht auf. Dagegen gelingt eine befriedigende Beschreibung der Frequenzabhängigkeit beider Relaxationszeiten unter der Annahme einer Protonenbeweglichkeit im Muskel mit Sprungzeitverteilung vom Log-Gaußschen Typ, d. h. mit dem zuerst von ODAJIMA eingeführten und begründeten Formalismus^{20, 21}

$$\frac{1}{T_1(\nu_p)} = \frac{1}{T_1(o)} \frac{J(2\pi \nu_p) + 4J(4\pi \nu_p)}{5J(o)} \quad (3a)$$

$$\frac{1}{T_2(\nu_p)} = \frac{1}{T_2(o)} \frac{3J(o) + 5J(2\pi \nu_p) + 2J(4\pi \nu_p)}{10J(o)} \quad (3b)$$

und

$$J(n\pi \nu_p) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\tau_0 \exp(x - \alpha x^2)}{1 + (n\pi \nu_p \tau_0)^2 \exp(2x)} dx \quad (3c)$$

Die Intensitätsfunktion $J(n\pi \nu_p; \tau_0, \alpha)$, die durch einen Mittenparameter τ_0 und einen Breitenparameter $1/\alpha$ die Sprungzeitstatistik festlegt ($n = 2$ bzw. 4), übernimmt hier die Rolle der vier Konstanten (f_1, f_2, τ_1, τ_2) aufweisenden Summe von Debye-spektren in Gl. (1); sie gestattet es durch Verbreiterung der Verteilung von $1/\alpha = 0$ ausgehend, die T_1 -Dispersion gegenüber dem Zweiphasenmodell drastisch abzuflachen, was dem Experiment nahekommt. Eine Computerauswertung des Integrals (3c) ergab mit dem Wertetripel

$$\begin{aligned} \tau_0 &= 1,1 \cdot 10^{-14} \text{ sec} \\ \alpha &= 0,15 \\ T_1(o) &= T_2(o) = 1,8 \cdot 10^{-2} \text{ sec} \end{aligned} \quad (4)$$

den in Abb. (1) eingezeichneten Verlauf der Relaxationszeiten als bestmögliche Anpassung des Kontinuummodells an die bei 25 °C vorliegenden Messungen. Bei 0 °C führte eine entsprechende Analyse auf $\tau_0 = 3,5 \cdot 10^{-14}$ sec, $\alpha = 0,16$ und $T_1(o) = T_2(o) = 1,75 \cdot 10^{-2}$ sec, wobei jedoch wegen der verschiedenen Temperaturabhängigkeiten von T_1 und T_2 Grenzen des Ansatzes (3) unverkennbar blieben.

Derartige Sprungzeitverteilungen sind aus der Kernspinrelaxation von adsorbierten Flüssigkeiten²²⁻²⁴ sowie speziell wäßriger Proteinlösungen¹⁴⁻¹⁶ wohl bekannt und haben dort ihre Ursache in örtlichen Schwankungen der für die molekularen Bewegungsmechanismen maßgeblichen Aktivierungsenthalpie und -entropie²¹. Sie überraschen daher in unserem Fall nicht wenn man bedenkt, daß neben dem dominierenden Wasser die beiden Proteine Myosin und Aktin die Hauptkomponenten des Muskelgewebes ausmachen¹. Die T_1 -Frequenzabhängigkeit einer hochkonzentrierten wäßrigen Serumalbumin- oder Ovalbumin-Lösung¹⁶ entspricht in ihrer Form weitgehend dem in Abb. 1 für Froschmuskeln wiedergegebenen Verlauf; allerdings mit dem bemerkenswerten Unterschied, daß Proteinlösungen unter vergleichbaren Bedingungen gerade noch einen schwachen Wendepunkt im T_1 -Anstieg erkennen und dadurch zwei Ursachen der Verteilung trennen lassen: langsame Proteinumlagerungen neben schnellen Hydratwasser- und Kettensegmentbewegungen. Da sich die Aufspaltung der Dispersion in zwei Stufen mit zunehmender Konzentration der Lösungen

verwischt^{15, 16}, ist das Ausbleiben des für eine entsprechende Analyse entscheidenden Wendepunktes im Relaxationsdiagramm von Muskelgewebe nicht verwunderlich, zumal die Art der Meßproben eine zusätzliche Unsicherheit ins Spiel bringt.

Die unvollständige Analogie zwischen Muskelgewebe und Proteinlösungen beläßt damit die Frage unbeantwortet, ob und inwieweit das zuvor verworfene Zweiphasenmodell in neuer Form in das für gut befundene Kontinuummodell mit einzubeziehen ist, so daß aus der eingangs gestellten Alternative eine Synthese werden könnte. Nach den Erfahrungen an reinen Proteinen liegt es jedoch nahe, auch in Muskeln als Relaxationszentren zweierlei Protonengruppen zu vermuten, die im Hydratwasser bzw. Proteingerüst, also keinesfalls in unterschiedlichen Wasserphasen lokalisiert sind und die sich durch differierende Sprungzeitverteilungen auszeichnen. Stützen hierfür erbrachten an einem Festkörperspektrometer¹¹ durchgeführte er-

gänzende T_2 -Messungen, die neben der in Abschnitt 2 erwähnten exponentiellen Relaxation im Millisekundenbereich eine bei Zimmertemperatur in knapp 20 μsec zerfallende zweite Kernsignalkomponente aufzeigen, was für Proteinlösungen charakteristisch war^{16, 25} und dort letztlich zur Hypothese einer Zweiphasen-Verteilungsfunktion führte. Auch die ungleichen Temperaturabhängigkeiten von T_1 und T_2 in Abb. 1 weisen in diese Richtung. Es darf allerdings nicht übersehen werden, daß Sprungzeitverteilungen mitunter einen Phasensprung vortäuschen^{22, 23} und im vorliegenden Fall ohne weitere Hinweise über die T_1 -Dispersion keine eindeutige Zerlegung des Bewegungsmodells zulassen.

Wir danken Herrn Dipl. Phys. G. PREISSING und Herrn Dipl. Phys. L. GRÖSCH für ihre Mitarbeit sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die zur Verfügung gestellten Mittel.

- ¹ E. ERNST, Biophysik des Muskels, Thieme Verlag Leipzig 1970.
- ² C. BRATTON, A. HOPKINS u. J. WEINBERG, Science [Washington] **147**, 738 [1965]; C. BRATTON, Ph. D. Thesis, Western Reserve University 1964.
- ³ L. ABETSEDARSKAYA, F. MIFTAKHUTDINOVA u. V. FEDOTOV, Biophysics **13**, 750 [1968].
- ⁴ T. SWIFT u. O. FRITZ, Biophysical J. **9**, 54 [1969].
- ⁵ F. COPE, Biophysical J. **9**, 303 [1969].
- ⁶ C. HAZLEWOOD, B. NICHOLS u. N. CHAMBERLAIN, Nature [London] **222**, 747 [1969].
- ⁷ D. CHANG, C. HAZLEWOOD, B. NICHOLS u. H. RORSCHACH, Nature [London] **235**, 170 [1972].
- ⁸ W. DERBYSHIRE u. J. PARSONS, J. Magnetic Resonance **6**, 344 [1972].
- ⁹ F. NOACK, NMR — Basic Principles and Progress **3**, 83 [1971].
- ¹⁰ R. KIMMICH u. F. NOACK, Z. angew. Physik **29**, 248 [1970].
- ¹¹ U. HAEBERLEN, Z. angew. Physik **23**, 341 [1967].
- ¹² R. HAUSSE u. F. NOACK, Z. Naturforsch. **20a**, 1668 [1965].
- ¹³ K. KRYNICKI, Physica **32**, 167 [1966].
- ¹⁴ S. KOENIG u. W. SCHILLINGER, J. biol. Chemistry **244**, 3283 [1969].
- ¹⁵ B. BLICHARSKA, Z. FLORKOWSKI, J. HENNEL, G. HELD u. F. NOACK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **207**, 381 [1970].
- ¹⁶ R. KIMMICH u. F. NOACK, Z. Naturforsch. **25a**, 299 [1970], Z. Naturforsch. **25a**, 1680 [1970]; Ber. Bunsenges. physik. Chem. **75**, 269 [1971].
- ¹⁷ R. KIMMICH, Dissertation, Universität Stuttgart 1971.
- ¹⁸ R. HAUSSE u. F. NOACK, Z. Physik **182**, 93 [1964].
- ¹⁹ G. HELD u. F. NOACK, Proc. of the XVIth Congress AM-PERE, S. 620 f., Bukarest 1970.
- ²⁰ V. POLLAK, unveröffentlichte Ergebnisse.
- ²¹ A. ODAJIMA, Progr. Theoret. Phys. (Kyoto), Suppl. **10**, 142 [1959].
- ²² A. NOWICK u. B. BERRY, IBM J. Res. Develop. **5**, 297 [1961].
- ²³ H. RESING, Advances in Mol. Relaxation Processes **1**, 109 [1968], J. chem. Physics **43**, 669 [1965].
- ²⁴ L. LYNCH, K. MARSDEN u. E. GEORGE, J. chem. Physics **51**, 5673 [1969]; J. chem. Physics **51**, 5681 [1969].
- ²⁵ H. PFEIFER, NMR — Basic Principles and Progress **7**, 55 [1972].
- ²⁶ L. GRÖSCH, Diplomarbeit, Universität Stuttgart 1972.