

Aus der

Radiologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Sektion für Experimentelle Radiologie

**Quantitative Magnetresonanzuntersuchungen von  
Rinderlebergewebe im Verlauf des Fixiervorgangs bei  
Verwendung zweier unterschiedlicher Fixiermittel**

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

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

**vorgelegt von  
Fichtner, Anna-Karina**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. F. Schick

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Thomas Ethofer

Tag der Disputation: 12.04.2023

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Symbolverzeichnis .....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Grundlagen.....	4
1.1.1 Formaldehyd .....	4
1.1.1.1 Chemische Eigenschaften und Synthesereaktion.....	4
1.1.1.2 Chemische Reaktion von Formaldehyd in Lösungsmitteln .....	5
1.1.1.3 Fixiervorgang .....	5
1.1.1.4 Vorkommen und Verwendung von Formaldehyd .....	7
1.1.1.5 Grenzwerte und Gesundheitsschädlichkeit des Formaldehyds .....	7
1.1.1.6 Konsequenzen für das Medizinstudium .....	8
1.1.1.7 Auswirkungen der Formaldehyd-Fixierung in der Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie.....	8
1.1.2 Alkylderivat.....	10
1.2 Grundlagen der Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie .....	11
1.2.1 Physikalische Grundlagen .....	11
1.2.2 Der Kernspin und die Magnetisierung.....	11
1.2.3 Die Larmorfrequenz .....	12
1.2.4 Erzeugung transversaler Magnetisierung .....	12
1.2.5 Relaxationsprozesse.....	13
1.3 Magnetresonanztomographie .....	14
1.3.1 Schichtselektive Anregung, Frequenzkodierung, Phasenkodierung und k-Raum .....	14
1.3.2 Sequenzen in der MRT .....	15
1.4 Magnetresonanzspektroskopie .....	24
1.4.1 Die chemische Verschiebung .....	24
1.4.2 Spin-Spin-Kopplung .....	24
1.4.3 Magnetfeldhomogenisierung.....	25
1.4.4 Aufnahmetechniken eines Spektrums.....	25
1.4.5 Aufnahme eines Spektrums.....	28

1.4.6 Nachbearbeitungstechniken in der Magnetresonanzspektroskopie ..	30
1.5 Ziele der Dissertation .....	32
2. Material und Methoden.....	33
2.1 Experiment 1 - Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen – .....	35
2.1.1 Zusammensetzung der untersuchten Proben .....	35
2.1.2 Versuchsaufbau .....	38
2.1.3 Messparameter .....	39
2.1.4 Datenauswertung.....	39
2.2 Experiment 2 – <sup>1</sup> H-Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in- vivo Spektren – und Experiment 3 – Vergleich der Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen – .....	40
2.2.1 Versuchsaufbau .....	40
2.2.2 Messparameter .....	41
2.2.3 In vivo Vergleichsspektren für das Experiment 2 .....	42
2.2.4 Lokalisationsbilder und Messparameter.....	42
2.2.5 Methode der Spektrendarstellung und -auswertung .....	43
2.3 Experiment 4 – Fixierung von Rinderleber – .....	44
2.3.1 Versuchsaufbau .....	44
2.3.2 Messparameter .....	46
2.3.3 Datenauswertung.....	48
2.4 Histologische Aufarbeitung .....	50
2.4.1 Arbeitsschritte zur histologischen Aufarbeitung .....	50
3. Ergebnisse .....	55
3.1 Experiment 1 – Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen – .....	55
3.2 Experiment 2 – <sup>1</sup> H-Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in- vivo Spektren – .....	59
3.3 Experiment 3 – Vergleich der Spektren der wässrigen- und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen – .....	61
3.4 Experiment 4 – Fixierung von Rinderleber – .....	63
3.5 Histologische Aufarbeitung .....	86
4. Diskussion .....	90
4.1 Experiment 1 – Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen – .....	90

4.2 Experiment 2 – $^1\text{H}$ -Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in-vivo Spektren – .....	92
4.3 Experiment 3 – Vergleich der Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösung – .....	93
4.4 Experiment 4 – Fixierung von Rinderleber – .....	94
4.5 Histologische Aufarbeitung .....	106
4.6 Schlussfolgerung.....	108
5. Zusammenfassung.....	110
6. Literaturverzeichnis .....	113
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	118
7.2 Tabellenverzeichnis .....	121
8. Erklärung zum Eigenanteil.....	123
9. Danksagung .....	125

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Alkylderivat
AV	Averages
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
EPI	Echo-Planar-Imaging
FA	Formaldehyd
FID	Free Induction Decay
FLAIR	Fluid Attended Inversion Recovery
FM	Fließmittel
fmAD	fließmittelhaltige Alkylderivatlösung
fmFA	fließmittelhaltige Formaldehydlösung
FW	Flipwinkel
HF-Impuls	Hochfrequenzimpuls
IR	Inversion-Recovery
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Magnetisierungstransfer
NaCl	Natriumchlorid
PD	Protonendichte
ppm	parts per million
PRESS	point-resolved-spectroscopy
ROI	Region of interest
SE	Spinecho
STEAM	stimulated-echo-acquisition-mode
STIR	short time inversion recovery
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
VOI	Volume of interest
wAD	wässrige Alkylderivatlösung
wFA	wässrige Formaldehydlösung

## Symbolverzeichnis

$B_0$	statisches Magnetfeld (in T)
$B_1$	Hochfrequenz-Magnetfeld (in T)
$\text{CH}_2$	Methylengruppe
$\text{CH}_3$	Methylgruppe
$\gamma_0$	gyromagnetisches Verhältnis (in $\text{rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$^1\text{H}$	Wasserstoff
$M$	makroskopische Magnetisierung
$M_0$	Gleichgewichtszustand der makroskopischen Magnetisierung
$L$	Eigendrehimpuls/Kernspin (in $\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
$\mu$	magnetisches Moment (in $\text{A}\cdot\text{m}^2$ )
$\omega_0$	Larmorfrequenz (in $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ )

## **1. Einleitung**

In der Enzyklopädie für Medizingeschichte wird beschrieben, dass Formaldehyd seit 1839 für die Mikroskopie und die Konservierung von sowohl zoologischen als auch botanischen Präparaten genutzt wird. Zudem findet es von da an Verwendung in der Fixierung biologischer Materialien und von Leichen und wird als Mittel zur Fixierung und Konservierung am häufigsten verwendet (1). Seit ungefähr 135 Jahren ist die gesundheitsschädliche Wirkung des Formaldehyds bekannt, da O. Loew schon 1886 die zelltoxische Wirkung des Formaldehyds entdeckte. Des Weiteren empfahl er das Formaldehyd als Desinfektionsmittel zu nutzen (2, 3).

### **Motivation**

Für das Studium der Medizin ist das makroanatomische Praktikum in der vorklinischen medizinischen Ausbildung (Präparierkurs) ein wichtiger Bestandteil des Curriculums. Als problematisch stellt sich dar, dass nicht alle anatomischen Institute Deutschlands die vom Ausschuss für Gefahrstoffe festgelegten Arbeitsplatzgrenzwerte für Formaldehyd einhalten können (4, 5). Ein Artikel im Spiegel zeigt, dass bspw. an der Universität Frankfurt der Präparierkurs zeitweise nicht angeboten werden konnte, da die baulichen Gegebenheiten keine Einhaltung der Arbeitsplatzgrenzwerte gewährleisten konnten (6). Die wichtige Frage, die sich aus dieser Tatsache ergibt, ist, ob es zukünftig allen anatomischen Instituten weiterhin möglich sein wird, einen Präparierkurs, mit allen gegebenen Auflagen, anbieten zu können.

Die Forschungen zu dem Alkylderivat, die am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen in einem Projekt zur Fixierung von biologischen Materialien (Ganzkörperpräparate, Organe, Gewebe) unter Leitung von Professor Dr. Bernhard Hirt gegenwärtig durchgeführt werden, haben zum Ziel, ein weniger gesundheitsschädliches Fixiermittel für Gewebe verfügbar zu machen.

In dieser Dissertation werden das alte und etablierte Fixiermittel Formaldehyd und ein neu entwickeltes Alkylderivat bezüglich ihrer magnetresonanztomographischen- und magnetresonanzspektroskopischen Eigenschaften untersucht.

Zudem wird ein Fixiervorgang mit dem jeweiligen Fixiermittel an frisch geschlachtetem, tierischem Lebergewebe, über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet und verglichen, um eine Aussage über die Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser zu treffen. Die Untersuchung der Fixiervorgänge in tierischem Gewebe mittels Magnetresonanztomographie (MRT) bietet den Vorteil, während des Fixiervorganges das Innere des Gewebes darstellen zu können. In der MRT kann die Veränderung des Kontrastverhaltens in den Geweben während des Fixiervorganges dargestellt und dieser dadurch im Verlauf bildlich dokumentiert und die beiden unterschiedlichen Fixiermitteln verglichen werden. Mittels volumenselektiver Protonen-Magnetresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -MRS) können die Veränderung der Wasserstoffsignale durch die Fixierung spektroskopisch ermittelt und die Beobachtungen in der MRT somit zusätzlich nachvollzogen werden.

### **Gliederung**

Die Dissertation ist wie folgt aufgebaut: Im ersten Kapitel werden die Grundlagen der zu untersuchenden Fixiermittel sowie die theoretischen Grundlagen zur MRT und MRS aufgeführt und ein Überblick über die chemischen Eigenschaften und die Synthesereaktion, sowie die chemische Reaktion des Formaldehyds in Lösungsmitteln gegeben. Zudem werden zum Formaldehyd der Fixiervorgang, das Vorkommen und die Verwendung, die Gesundheitsschädlichkeit sowie die daraus folgenden Konsequenzen für das Medizinstudium behandelt. Bisherige aus der Literatur erfasste Eigenschaften des Formaldehyds in der MRT und MRS schließen das Kapitel zu Formaldehyd ab. Die Grundlagen der MRT beschreiben die Sequenzen zur Generierung eines MRT-Signals und die Signal- und Kontrastentstehung in der MRT. In den Grundlagen zur MRS wird beschrieben, mit welchen Sequenzen ein Spektrum aufgenommen werden kann, wie die Signale im Spektrum entstehen und wie die Spektren nachbearbeitet werden können.

Das zweite Kapitel der Dissertation stellt die Materialien, Methoden und Messparameter zur Datengenerierung und Datenauswertung, sowie die Beschreibungen zu den Versuchsaufbauten dar.

Im dritten Kapitel werden die Ergebnisse zu den einzelnen Experimenten beschrieben und in Grafiken und Tabellen dargestellt.

Die Ergebnisse werden im vierten Kapitel kritisch diskutiert. In der Schlussfolgerung werden neue Untersuchungsansätze für Experimente mit den beiden Fixierlösungen des Formaldehyds und des Alkylderivats auf Grund der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse behandelt.

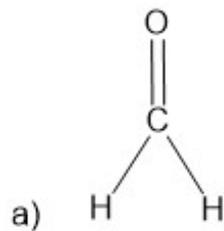
Im letzten Kapitel der Dissertation wird diese abschließend zusammengefasst.

## 1.1. Grundlagen

### 1.1.1 Formaldehyd

#### 1.1.1.1 Chemische Eigenschaften und Synthesereaktion

Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ist ein Gas, welches farblos und giftig ist (7). Es wird durch die Oxidation von Methanol synthetisiert, Abbildung 1 zeigt die Strukturformel des Formaldehyds und die Oxidationsreaktion von Methanol zu Formaldehyd (8). In reiner Form liegt Formaldehyd bei  $20^\circ\text{C}$  gasförmig vor und das Molekulargewicht beträgt  $30,03 \text{ g/mol}$  (5). Formaldehyd ist ein sehr leichtes und dadurch flüchtiges Gas, es lässt sich leicht in Wasser lösen (5). In wässriger Lösung wird Formaldehyd als Formalin bezeichnet (9). Um die Lösung zu stabilisieren, wird dem kommerziellen Formalin Methanol zugesetzt (9).



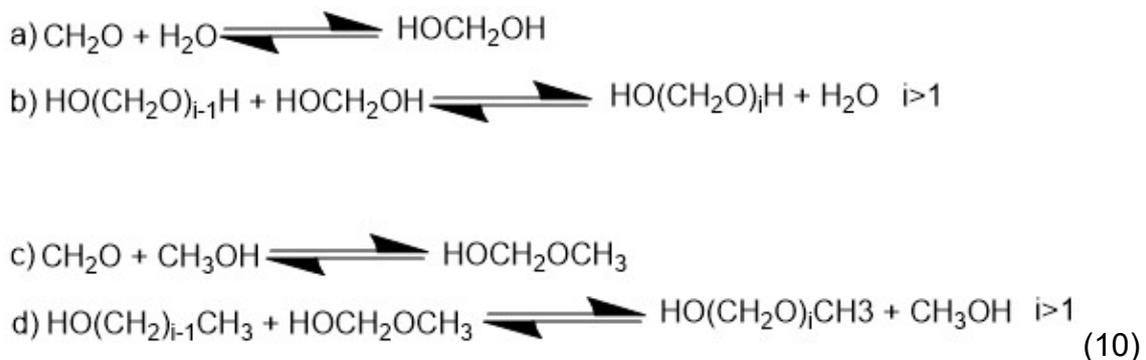
(7, 8)

**Abb. 1** Strukturformel und Synthesereaktion des Formaldehyds

**a)** Strukturformel des Formaldehyds (7). **b)** Oxidationsreaktion von 2 Molekülen Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) und Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zu 2 Formaldehydmolekülen ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) und 2 Wassermolekülen ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (8).

### 1.1.1.2 Chemische Reaktion von Formaldehyd in Lösungsmitteln

Formaldehyd ist sehr reaktiv und wird deshalb in wässriger oder methanolhaltiger Lösung verwendet (10). In den jeweiligen Lösungen bildet es mit den Lösungsmitteln Addukte<sup>1</sup>, Abbildung 2 zeigt die Reaktionen des Formaldehyds mit den jeweiligen Lösungsmitteln (10). Die Addukte Methylenglykol und Polymethylenglykol werden in wässriger Lösung gebildet und die Addukte Hemiformal und Polyoxymethylhemiformal werden in methanolhaltiger Lösung gebildet (10). Hemiformal bezeichnet die Halbacetale des Formaldehyds, die bei der Reaktion von Formaldehyd mit Alkohol entstehen (10, 12).



**Abb. 2:** Adduktbildung des Formaldehyds mit Lösungsmitteln

In Anlehnung an Hahnenstein et al. (10) **a)** Reaktion von Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) zu Methylenglykol ( $\text{HOCH}_2\text{OH}$ ) **b)** Reaktion von Methylenglykolmolekülen ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_{i-1}\text{H}$ ) und Methylenglykol ( $\text{HOCH}_2\text{OH}$ ) zu Polyoxymethylenglykol ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_i\text{H}$ ), **c)** Reaktion von Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) und Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) zu Hemiformal ( $\text{HOCH}_2\text{OCH}_3$ ) **d)** Reaktion von Hemiformalmolekülen ( $\text{HO}(\text{CH}_2)_{i-1}\text{CH}_3$ ) und Hemiformal ( $\text{HOCH}_2\text{OCH}_3$ ) zu Polyoxymethylhemiformal ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_i\text{CH}_3$ ) und Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (10).

### 1.1.1.3 Fixiervorgang

Thullner et al. (4) beschreiben, dass der Fixiervorgang eines Körperspenders eingeleitet wird, indem ca. 15-30 Liter der Fixierlösung über die Arteria femoralis oder die Arteria carotis eingebracht werden. Die Fixierlösung wird mittels einer Infusionslanze, die in die jeweilige Arterie gelegt wird, mit einem Druck von

<sup>1</sup> als Addukte werden Moleküle bezeichnet, die aus zwei oder mehr unterschiedlichen Molekülen entstehen und es bei der chemischen Reaktion der Ausgangsmoleküle zu keinem Verlust von Atomen der Ausgangsmoleküle kommt, 11. International Union of Pure and Applied Chemistry, Compendium of chemical terminology, Gold Book. Version 2.3.3 2014-02-24;528.

höchstens 0,5 bar in die Körperspender infundiert. Der Vorgang der Verabreichung der Fixierlösung kann mehrere Stunden benötigen. Nachdem die Fixierlösung infundiert wurde, werden die Körperspender mehrere Monate konserviert, bevor sie zur Präparation genutzt werden können. Für die Konservierung gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten: Einerseits können die Körperspender in der Thalheimer Wand<sup>2</sup> konserviert werden, dabei werden sie in regelmäßigen Abständen mit einer 4%igen Formaldehydlösung besprüht. Andererseits kann die Konservierung der Körperspender in einem Edelstahlbecken erfolgen, bei dieser Konservierungsmethode werden die Körperspender mehrere Monate in eine 4%ige Formaldehydlösung gelegt. Im Edelstahlbecken können die Körperspender auch in einer nicht-formaldehydhaltigen Lösung – z.B. in einer Lösung, die auf Phenoxyethanolbasis oder Ethanolbasis beruht – konserviert werden (4).

Lang et al. (14) stellen dar, dass Formaldehyd mit vielen „funktionellen Gruppen der zellulären und extrazellulären Makromoleküle“ (14) der Körperspender wechselwirkt, hierbei kommt es zu Reaktionen „mit Aminogruppen, Hydroxylgruppen (Acetale), mit Sulfhydrylgruppen (Sulfhydrylacetal-Analoga) und mit aromatischen Ringen“ (14). Der für die Gewebefixierung wichtige Prozess ist die Reaktion des Formaldehyds mit den Proteinen. Die Geschwindigkeit und das Optimum für diese Reaktion sind abhängig vom pH-Wert und der Temperatur (14). Bei Raumtemperatur und pH-Werten zwischen 3 und 9 findet die Reaktion zwischen Formaldehyd und Proteinen statt (15). Ungeladenen Aminogruppen, binden am besten an Formaldehyd. Bei dieser Reaktion entstehen Methylolgruppen (-C-OH) und durch die Abspaltung von H<sub>2</sub>O werden Imine – auch als Schiff'sche Basen - N=CH<sub>2</sub> bezeichnet – gebildet. Diese entstandenen chemischen Verbindungen sind reagibel und können Brücken zu weiteren Proteinen mit entsprechenden funktionellen Gruppen bilden. Das Fixiermittel Formaldehyd wird somit als additiv und quervernetzend charakterisiert (14).

Brenner et al. (16) berichten, dass Formaldehyd ein Antiseptikum ist und den Eintritt von Zerfallsorganismen verhindert. Die Zerstörung von fäulniserregenden

---

<sup>2</sup> Leichenkühlzellen der Firma Thalheimer, 13. Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG; <http://german.thalheimer-kuhlung.com/products/medical/forensic/mortuary-equipment/cell-type-single-door/fifteen-cells-mortuary-refrigeratorfreezer-15-cadavers/>, abgerufen am 04.09.2022.

Organismen durch die Fixierung mittels Formaldehyd und die neu entstehenden chemischen Verbindungen, die durch die Reaktion zwischen Proteinen und Formaldehyd entstehen, sind stabil und ungeeignet, um von Zerfallsorganismen verwertet zu werden. Die Verwendung von Formaldehyd zur Fixierung von Gewebe führt allerdings zu einigen Veränderungen der Körperspender in ihrem Aussehen und der Haptik. Einige Aspekte, die sich durch die Konservierung mittels Formaldehyds ergeben, sind folgende: es kommt zu einer starken Steifigkeit der Körperspender, das fixierte Gewebe nimmt bei der Vermischung mit Blut eine graue Farbe an, durch das Formaldehyd koaguliert das Blut in den Gefäßen und Kapillaren konstringieren. Des Weiteren fixiert Formaldehyd Verfärbungen, die im Gewebe vorhanden sind und führt zur Austrocknung des Gewebes (16).

#### **1.1.1.4 Vorkommen und Verwendung von Formaldehyd**

Swenberg et al. (17) beschreiben, dass Formaldehyd innerhalb verschiedener Stoffwechselwege entsteht und somit innerhalb der Körperzellen gebildet wird. Außerhalb des menschlichen Körpers kommt es bei industriellen Prozessen zur Anwendung und ist in verschiedensten Verbraucherprodukten enthalten. Formaldehyd findet dadurch weltweit eine sehr breite Verwendung (17). Eine globale jährliche Produktion von mehr als 20 Millionen Tonnen Formaldehyd zeigt die massive Verwendung dieser Chemikalie (18). Die wässrige Lösung des Formaldehyds, das Formalin, wird für die Konservierung und Desinfektion u.a. in biologischen und medizinischen Bereichen verwendet (9). Als Konservierungsmittel und als Fixiermittel kommt dem Formaldehyd in medizinischen Bereichen, bspw. in der Histologie und Pathologie, eine große Bedeutung zu (9).

#### **1.1.1.5 Grenzwerte und Gesundheitsschädlichkeit des Formaldehyds**

1995 wurde Formaldehyd von einer Arbeitsgruppe der International Agency for Research on Cancer als vermutlich kanzerogen eingestuft, 2004 wurde diese Einstufung von der Arbeitsgruppe in kanzerogen umgeändert (4). Im Jahr 2014 stufte auch die Europäische Union Formaldehyd als kanzerogen ein (19).

Thullner et al. (4) schildern, dass Formaldehyd giftig ist, wenn es eingeatmet oder verschluckt wird oder es zu Hautkontakt kommt. Es kann Hautverätzungen und Augenschäden verursachen sowie allergische Hautreaktionen hervorrufen.

Allergische Hautreaktionen können schon bei 0,2 %igen bis 4%igen Formaldehydlösungen entstehen, welche in den anatomischen Instituten verwendet werden. Möglicherweise kann es genetische Defekte auslösen (4).

Bei Formaldehydkonzentrationen von  $> 2\text{mg/m}^3$  in der Luft kann es vereinzelt zu lokalen Zellveränderungen und Tumorbildung kommen (5). Thullner et al. beschreiben, dass die Konzentration des Formaldehyds in Gemischen unterschiedliche Effekte auf die Haut, die Atemwege und die Augen hat: Eine Konzentration von  $\geq 0,2\%$  kann zu allergischen Hautreaktionen führen, eine Konzentration von  $\geq 5\%$  kann Atemwegsreizungen auslösen, eine Konzentration zwischen 5% und 25% verursacht schwere Augen- und Hautreizungen und eine Konzentration von  $\geq 25\%$  führt zu schweren Hautverätzungen und Augenschäden. Der Arbeitsplatzgrenzwert für Formaldehyd wurde auf  $0,37\text{mg/m}^3$  festgelegt (4).

#### **1.1.1.6 Konsequenzen für das Medizinstudium**

In den Präparierkursen des Medizinstudiums werden die Körperspender mit Formaldehyd fixiert. In der Stellungnahme der Anatomischen Gesellschaft „Zur Reduktion der Formaldehydbelastung im Präparierkurs“ wurde eine Frist zur Einhaltung des neuen Arbeitsplatzgrenzwertes von  $0,37\text{mg/m}^3$  bis zum 01.01.2016 gesetzt (20). Es müssen Messungen der Konzentration des Formaldehyds und Reduktionsmaßnahmen der Exposition durch Formaldehyd durchgeführt werden (20), was jedoch nicht an allen Anatomischen Instituten in Deutschland gewährleistet werden kann (4). Folglich werden einige Institute ihren Präparierkurs zeitweilig nicht fortführen können, bis die baulichen Maßnahmen zur Arbeitsplatzgrenzwertreduktion umgesetzt und abgeschlossen sind (6).

#### **1.1.1.7 Auswirkungen der Formaldehyd-Fixierung in der Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie**

Formaldehyd wurden bereits in einigen Arbeiten und Studien in der MR-Bildgebung und MR-Spektroskopie untersucht.

In der Studie von Ludescher et al. (21) wurde gezeigt, dass die Fixierung von Lebergewebe mittels Formalin in der MRT-Bildgebung und  $^1\text{H}$ -MRS nachvollzogen werden kann. Die Ergebnisse zeigten, dass die Formalinfixierung mit Hilfe der MRT darstellbar ist. Eine Randbildung, die im zeitlichen Verlauf tiefer in das

Gewebe eindrang, konnte in der MR-Bildgebung nachvollzogen werden. Die Kontrastierung wurde mit  $T_1$ -gewichteten und Protonendichte-gewichteten turbospinecho-Bildern am deutlichsten. Messungen, die die  $T_2$ -Kontrastierung nutzen, waren nicht so gut geeignet, um den Kontrast darzustellen. Auch durch die MRS konnte das Formalin nachgewiesen werden und die Randbildung, die in der MR-Bildgebung zu sehen war, spektroskopisch nachvollzogen werden. Im Inneren des Organs konnte zeitversetzt ebenfalls ein Konzentrationsanstieg des Formalins gezeigt und somit der Fixiervorgang dargestellt werden. Die Präparate wurden bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert, wobei die Temperaturunterschiede keine deutliche Veränderung während des Fixiervorgangs ergaben. Allerdings ist die Kühlung der Präparate auf  $5^\circ\text{C}$  von Vorteil, da es dadurch zu einer Unterdrückung der Fäulnisgasbildung kommt. Dadurch lassen sich die gekühlt fixierten Präparate für weitere Untersuchungen besser verwenden (21).

In einigen weiteren Arbeiten wurde die Veränderungen von Relaxationseigenschaften von Geweben durch die Fixierung mittels Formaldehyd untersucht.

Grodd und Schmitt (22) zeigten in ihrer Arbeit, dass sich bei den mit Formaldehyd fixierten Geweben eine Abnahme von  $T_1$  ergab. Die Gewebe wurden in unterschiedlich konzentrierte Formaldehydlösungen von 1% bis 9% gelegt und die Relaxationszeiten gemessen. Bei den geringer konzentrierten Formaldehydlösungen zeigt sich der stärkste Abfall von  $T_1$ . Grodd und Schmitt kamen zu dem Schluss, dass das freie Zellwasser bei geringen Formaldehydkonzentrationen zuerst abnimmt und zum größten Teil die subzellulären Strukturen aufrechterhalten bleiben, wodurch  $T_1$  stark abfällt. Bei weniger resistenten Bestandteilen der Zellen kommt es bei einer mittleren Formaldehydkonzentration zu einer osmotischen Zytolyse. Hierdurch ergibt sich ein weniger starker Abfall von  $T_1$  und ein sogenanntes  $T_1$ -Plateau, da hierbei intrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt wird. Bei hohen Formaldehydkonzentrationen kommt es zu einem weiteren Schwinden der Zellen und dadurch wieder zu einem nun etwas geringeren  $T_1$ -Abfall (22).

Den Effekt des  $T_1$ -Abfalls durch Fixierung konnten auch Schmierer et al. (23) in post mortem formalinfixierten Hirngeweben von Patienten mit Multipler Sklerose und Shepherd et al. (24) in chemisch fixiertem Nervengewebe zeigen. Shatil et

al. (25) stellten ebenfalls einen  $T_1$ -Abfall sowie einen  $T_2$ -Abfall in fixierten gesunden Hirngeweben, die in 10%ige Formalinlösung gelegt wurden, fest. Dawe et al. (26) untersuchten  $T_2$  in fixierten Geweben und schlussfolgerten, dass die chemische Fixierung von menschlichen Gehirnhälften post mortem die MR-Gewebeeigenschaften über die Zeit verändert (26). Zudem zeigen Rivlin et al. (9), dass ein chemischer Austausch der Hydroxylprotonen des Methylenglykols aus dem Formaldehyd mit Wasser eine Reduktion von  $T_2$  zur Folge hat (9).

In Bezug auf andere radiologische Untersuchungsmethoden mit Formaldehyd gibt es eine Arbeit von Fracasso et al. (27) in der versucht wurde, den Fixiervorgang mittels Ultraschall zu verbessern. Durch die ultraschallunterstützte Fixierung sollte gezeigt werden, dass das Gewebe dem Formaldehyd weniger lange ausgesetzt sein muss, um fixiert zu werden. Dies hatte eine bessere Analyse der Nukleinsäuren zum Ziel. Die Untersuchung konnte zeigen, dass durch die ultraschall-beschleunigte Fixierung die darauffolgende DNA-Extraktion und Analyse effizienter war als bei der herkömmlichen Fixierungsmethode (27).

### **1.1.2 Alkylderivat**

Die chemische Zusammensetzung und Herstellung des Alkylderivats können aus patentrechtlichen Gründen zu diesem Zeitpunkt in der Dissertation nicht beschrieben werden.

Das Alkylderivat wurde am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen in einem Projekt zur Fixierung von biologischen Materialien (Ganzkörperpräparate, Organe, Gewebe) unter Leitung von Professor Dr. Bernhard Hirt entwickelt und erforscht.

## **1.2 Grundlagen der Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie**

Der erstmalige Nachweis von Kernresonanzsignalen gelang den Arbeitsgruppen um F. Bloch (28) und E.M. Purcell (29) getrennt voneinander im Jahr 1946, dafür erhielten sie gemeinsam im Jahr 1952 den Physiknobelpreis.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) nutzt die Signale von Wasserstoffatomkernen für die Gewinnung morphologischer Schnittbilder der menschlichen Anatomie (30). Dadurch hat sich die MRT in der Medizin zu einem wichtigen diagnostischen Instrument der Radiologie entwickelt (31).

Mit der Magnetresonanzspektroskopie (MRS) können Informationen über biochemische Prozesse in Geweben gewonnen werden (30). Die MRS ermöglicht somit eine nichtinvasive Untersuchung des Stoffwechsels verschiedener Gewebe in vivo. Anders als in der MRT ist das Ergebnis einer MRS kein Bild. Bei der MRS entsteht ein Intensitätsspektrum von Frequenzen unterschiedlicher Signale. Mit diesem Intensitätsspektrum kann in ausgewählten Bereichen eines Gewebes die biochemische Zusammensetzung bestimmt werden (32).

### **1.2.1 Physikalische Grundlagen**

#### **1.2.2 Der Kernspin und die Magnetisierung**

In den Grundlagen der Magnetresonanztomographie (31) wird beschrieben, dass für die Funktionsweise der MRT der Kernspin eine grundlegende Eigenschaft der Atomkerne der meisten Isotope ist. Unter dem Kernspin versteht man klassischer Weise die Eigenschaft der Atomkerne, sich um die eigene Achse zu drehen. Diese Rotation führt durch die bewegte elektrische Ladung des Atomkerns zur Entstehung eines Magnetfeldes mit einer typischen Dipolcharakteristik. Die Symmetrieachse des Dipols verläuft entlang der Drehachse des Atomkerns. Im statischen Magnetfeld  $B_0$  eines Magnetresonanztomographen treten die Magnetfelder der Atomkerne mit diesem in eine Wechselwirkung. In der klinischen Diagnostik werden die Signale der Wasserstoffatomkerne ( $^1\text{H}$ -Kerne) für die Signalentstehung genutzt. Durch die Wechselwirkung des statischen Magnetfeldes mit den Magnetfeldern der Atomkerne können sich die Rotationsachsen der Atomkerne entlang des Magnetfeldes ausrichten. Der Überschuss, der entlang

des statischen Magnetfeldes ausgerichteten Atomkerne, hängt von der Feldstärke des Magnetresonanztomographen ab und ist sehr gering. Die Feldstärke in Ganzkörpertomographen liegt zwischen 0,2 und 3 Tesla (T). 1T kommt ungefähr einer 20.000-fachen Erdmagnetfeldstärke gleich. Mit einem Magnetfeld von 3T kann nur etwa ein 1/100.000 Überschuss an Atomkernen erreicht werden, die entlang des statischen Magnetfeldes ausgerichtet sind. Dieser Überschuss bewirkt die makroskopische Magnetisierung  $M$ . Im Gleichgewichtszustand  $M_0$ , dem ungestörten Zustand der makroskopischen Magnetisierung  $M$ , ist diese parallel zum statischen Magnetfeld  $B_0$  ausgerichtet (31).

### 1.2.3 Die Larmorfrequenz

Die Frequenz, mit der die Rotationsbewegung ausgeführt wird, heißt Larmorfrequenz (31). Sie ist abhängig von der Kernsorte und der Magnetfeldstärke und kann durch folgende Gleichung berechnet werden (31):

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

$\omega_0$  ist die Larmorfrequenz

$\gamma$  ist das gyromagnetische Verhältnis

$B_0$  ist die Magnetfeldstärke (33)

Die für die MR-Bildgebung genutzten Wasserstoffkerne haben eine Larmorfrequenz von ungefähr 42,6MHz pro Tesla (31).

### 1.2.4 Erzeugung transversaler Magnetisierung

In (31) wird erklärt, dass die Signalentstehung mit einem Nachweis der Magnetisierung erst erreicht werden kann, wenn die vektorielle Größe  $M$  aus dem Gleichgewichtszustand  $M_0$  ausgelenkt wird. Der Magnetisierungsvektor  $M$  kann in zwei Anteile unterteilt werden: in die Längsmagnetisierung oder auch longitudinale Magnetisierung  $M_l$  und die Quermagnetisierung oder auch transversale Magnetisierung  $M_t$ . Mit dem Einstrahlen eines Hochfrequenz-Magnetfeldes  $B_1$  senkrecht zum statischen Magnetfeld  $B_0$  entsteht aus der Längsmagnetisierung eine teilweise oder vollständig rotierende Quermagnetisierung, vorausgesetzt die eingestrahlte Hochfrequenz und die Larmorfrequenz sind nahezu identisch. Die Auslenkung der Längsmagnetisierung kann durch die Stärke und Dauer des

Hochfrequenz-Pulses (HF-Puls) gesteuert werden und wird mit dem Flipwinkel  $\alpha$  beschrieben. Ein Flipwinkel von  $90^\circ$  führt bspw. zu einer kompletten Auslenkung der Längsmagnetisierung in die Quermagnetisierung. Bei Verwendung eines  $180^\circ$ -Pulses wird die Längsmagnetisierung invertiert. Die Längsmagnetisierung nach einem HF-Puls kann mit einem Flipwinkel zwischen  $0^\circ$  und  $180^\circ$  variiert werden, dadurch können zwischen  $M_0$  und  $-M_0$  alle Zwischenwerte erreicht werden (31).

### **1.2.5 Relaxationsprozesse**

In (31) wird dargelegt, dass die Magnetisierung nach der Auslenkung durch einen HF-Puls wieder den Gleichgewichtszustand  $M_0$  anstrebt, dies wird als Relaxation bezeichnet. Sowohl für die Längs- als auch für die Quermagnetisierung erfolgen die Relaxationsvorgänge unterschiedlich schnell und sind in verschiedenen Geweben different. Diese unterschiedlichen Relaxationseigenschaften der Gewebe werden für die Erzeugung des Bildkontrastes in der MRT verwendet. Dem Gleichgewichtszustand  $M_0$  nähert sich die Längsmagnetisierung exponentiell an. Mit der Zeitkonstanten  $T_1$  wird die Dauer der Relaxation beschrieben, die die Gewebe brauchen, um bis auf 37% ( $1/e$ ) der anfänglichen Entfernung der Gleichgewichtsmagnetisierung in Längsrichtung zu kommen. Die Quermagnetisierung bildet sich exponentiell zurück. Mit der Zeitkonstanten  $T_2$  wird die Dauer der Relaxation auf 37% der anfänglichen Quermagnetisierung angegeben. Diese wird allmählich abgebaut, während die Längsmagnetisierung wieder aufgebaut wird. Die longitudinalen und transversalen Relaxationsvorgänge finden gleichzeitig statt. In Geweben sind die beiden Konstanten  $T_1$  und  $T_2$  überwiegend unabhängig voneinander, dabei ist  $T_1$  immer länger als  $T_2$ . Die  $T_1$ -Werte nehmen in Geweben mit zunehmendem Flüssigkeitsgehalt zu, bei einer Feldstärke von 1,5T relaxiert Fett mit einem  $T_1$  von ca. 300ms und freie Flüssigkeit mit ca. 3s. In Geweben, in denen die Wassermoleküle nicht frei vorliegen, sondern gebunden sind, wie bspw. in Knochen, sind  $T_2$ -Werte sehr kurz. Für Körperflüssigkeiten sind  $T_2$ -Werte mit ca. 1s wesentlich länger als von Knochen, allerdings immer noch wesentlich kürzer als  $T_1$ -Werte von Flüssigkeiten (31).

## **1.3 Magnetresonanztomographie**

### **1.3.1 Schichtselektive Anregung, Frequenzkodierung, Phasenkodierung und k-Raum**

#### **1.3.1.1 Schichtselektive Anregung**

In (31) und (34) wird beschrieben, dass ein ortskodiertes Signal in der MRT durch die Überlagerung des statischen Grundmagnetfeldes mit zeitlich variablen magnetischen Gradientenfeldern erreicht wird. Das Gradientenfeld ist ein statisches Magnetfeld, dieses kann von Gradientenspulensystemen angesteuert werden. Dadurch kann ein Feldgradient entlang einer Raumrichtung geschaltet werden. Mit der Ortskodierung ist der Vorgang gemeint, der für die Rekonstruktion der Signalherkunft nötig ist. Der erste Gradient, der zugeschaltet wird, ist der Schichtselektionsgradient, mit dem eine schichtselektive Anregung erfolgt. Dadurch wird die signalgebende Quermagnetisierung durch einen HF-Puls nur in der ausgewählten Schicht mit definierter Schichtdicke erzeugt. Mit dem Zuschalten des Schichtselektionsgradienten kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg (bzw. Abnahme) der Magnetfeldstärke und damit auch der Larmorfrequenz entlang einer Raumrichtung. Das Zuschalten des Schichtselektionsgradienten zu dem frequenzselektiven HF-Puls, führt zur schichtselektiven Anregung der gewünschten Schicht. Die Schichtdicke wird durch die Bandbreite des eingestrahlten HF-Pulses variiert: Umso kleiner die Anrege-Bandbreite ist, umso schmaler ist dementsprechend die Schichtdicke (31, 34).

#### **1.3.1.2 Frequenzkodierung**

Der schichtselektive HF-Puls führt, zu Anregung der Längsmagnetisierung innerhalb der kompletten Schicht, die es zu untersuchen gilt. Innerhalb dieser angeregten Schicht werden weitere Gradienten geschaltet, um die Signalherkunft genau erfassen zu können (31). Einer dieser Gradienten ist der Gradient zur Frequenzkodierung, auch Lesegradiant genannt (31). Dieser bewirkt, dass Protonen unterschiedlicher Lokalisationen mit verschiedenen Larmorfrequenzen entlang der frequenzkodierten Achse präzedieren (31). Durch den Frequenzkodiergradienten ist eine örtliche Zuordnung der gemessenen Signale möglich (31).

### **1.3.1.3 Phasenkodierung**

In (31) wird dargestellt, dass senkrecht zur Richtung der Frequenzkodierung die Phasenkodierung stattfindet, die zu einer Phasenverschiebung entlang der Richtung des Phasenkodiergradienten führt. Der Phasenkodiergradient wird nach dem HF-Puls und vor dem Frequenzkodiergradienten geschaltet. Die schichtselektive Anregung sowie die Frequenz- und Phasenkodierung werden mehrmals durchgeführt, wobei der Phasenkodiergradient immer verändert wird (31).

### **1.3.1.4 k-Raum**

Weishaupt et al. (33) beschreiben, dass die gemessenen Daten der Frequenz- und Phasenkodierung zuerst im sogenannten k-Raum vorliegen. Dieser kann als Daten-Matrix verstanden werden, der eine graphische Matrix der aufgenommenen Daten darstellt. Die horizontale Richtung im k-Raum stellt die Frequenzrichtung dar und die vertikale Richtung die Phasenrichtung. Mit jedem neu geschalteten Phasenkodiergradienten entsteht eine neue Zeile im k-Raum. Um ein Schnittbild aus den aufgenommenen Daten zu erhalten, muss der gesamte k-Raum mit Daten gefüllt sein und anschließend die Fourier-Transformation durchgeführt werden (33).

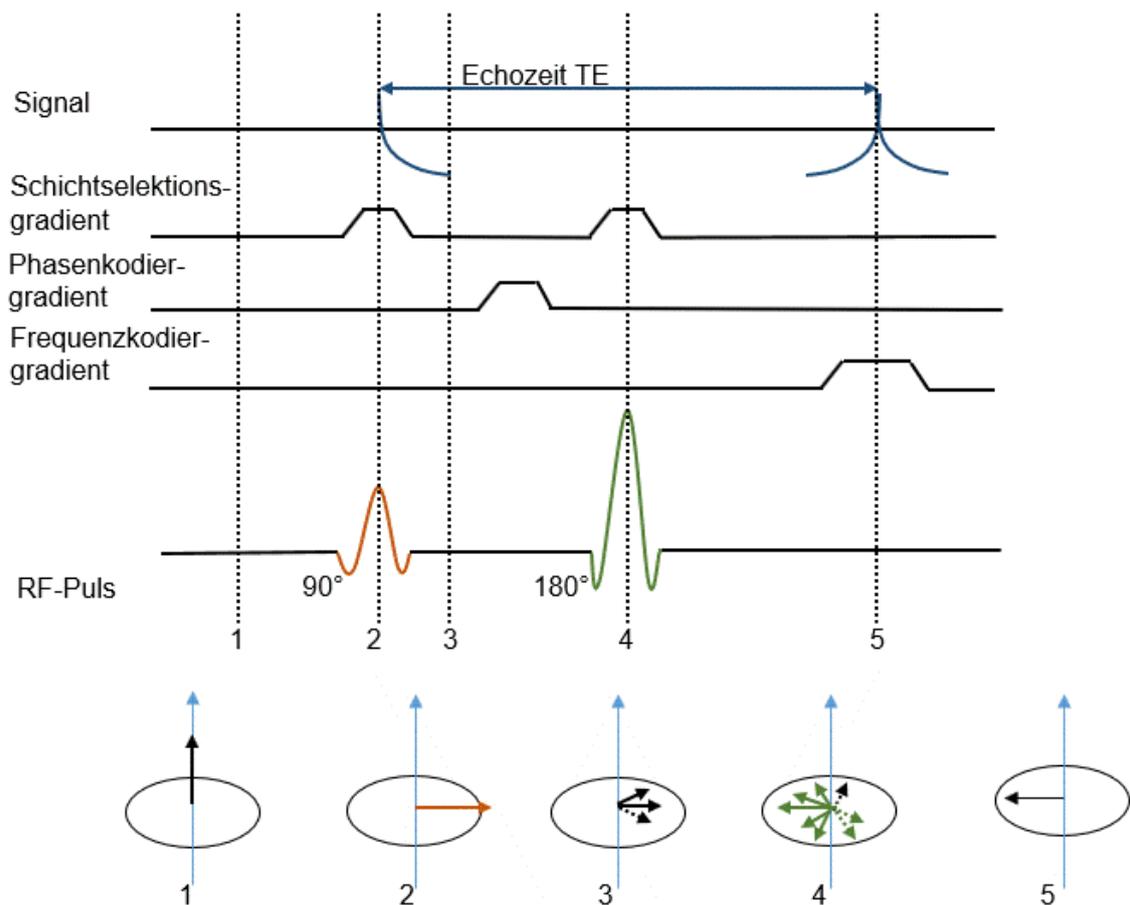
Durch die Fourier-Transformation wird die Matrix des k-Raumes in eine Matrix des MRT-Bildes überführt, mittels dieser gleichgroßen Matrix von komplexen Zahlen können die Grauwerte eines jeden Pixels aus den einzelnen Bildelementen angegeben werden (34).

### **1.3.2 Sequenzen in der MRT**

Als Sequenz bezeichnet man verschiedene Aufnahmeverfahren, die der Bildgebung dienen: darunter versteht man in der MRT die zeitliche Abfolge der HF-Impulse, der Gradientenfelder und der Signalaufnahme (34). In der klinischen MRT kommen viele unterschiedliche Sequenzen zum Einsatz, die je nach Fragestellung gewählt werden (34).

### **1.3.2.1 Spinecho-Sequenz**

Die Spinecho-Sequenz (SE-Sequenz) ist eine Basispulssequenz in der MR-Bildgebung (33). Mit einem ersten  $90^\circ$  HF-Impuls findet eine schichtselektive Anregung statt und die Magnetisierung präzediert in der transversalen Ebene (33). Durch Feldinhomogenitäten und den Effekt der chemischen Verschiebung kommt es zu einer Dephasierung der Magnetisierungsanteile, sodass die transversale Magnetisierung zerfällt (33, 35). Ein zweiter HF-Impuls, der Refokussierungspuls mit  $180^\circ$ , wird nach der Hälfte der gewünschten Echozeit eingestrahlt, durch diesen wird die Reihenfolge der Anteile umgekehrt (33, 35). Nach der zweiten Hälfte der Echozeit befinden sich alle Magnetisierungsanteile wieder in gleicher Phase und es kommt zum Echo, Abbildung 3 zeigt den Ablauf der SE-Sequenz schematisch (33).



(33)

**Abb. 3** Schematische Darstellung der Spinecho (SE) - Sequenz

In Anlehnung an Weishaupt et al. (33). Die SE-Sequenz ist eine Basispulssequenz. Vor dem Einstrahlen des  $90^\circ$ -Impulses liegt eine vollständige Längsmagnetisierung vor, siehe 1. Durch das Einstrahlen eines  $90^\circ$ -HF-Pulses präzedieren die verschiedenen Anteile der Magnetisierung in der transversalen Ebene, siehe 2, und beginnen zu dephasieren, siehe 3, hierdurch zerfällt das Signal. Nach der Hälfte der Echozeit wird ein  $180^\circ$ -HF-Puls eingestrahlt, siehe 4, es kommt zur Umkehrung der Magnetisierungskomponenten und nach der zweiten Hälfte der Echozeit zu einer Rephasierung der Magnetisierung, dadurch entsteht das Echo, siehe 5 (33).

### 1.3.2.2 Fastspinecho-/TurboSpinechosequenz

In einer Fastspinecho- oder auch als TurboSpinecho (FSE-/TSE-Sequenz) bezeichneten Sequenz werden während einer Repetitionszeit mehrere  $180^\circ$ -HF-Impulse geschaltet und der Phasenkodiergradient zwischen den Echos immer kurzzeitig eingeschaltet (33). Dadurch erhält man mit einer einzelnen Anregung eine Spinechoserie, die als Echozug bezeichnet wird. Vorteil der FSE-Sequenz

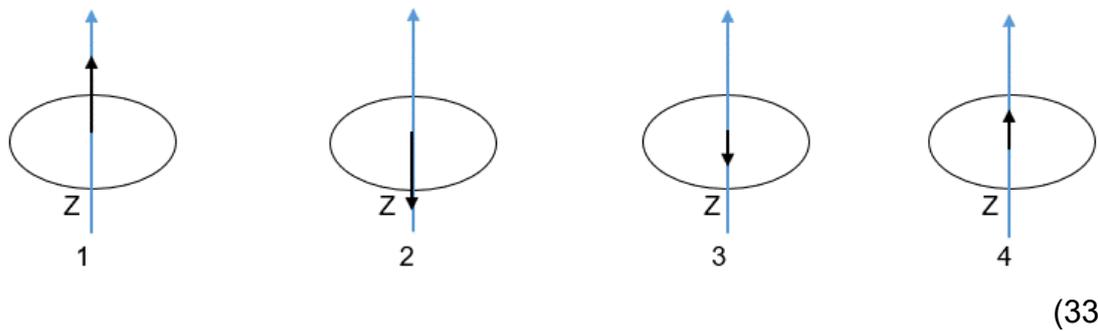
ist der zeitliche Gewinn, den man im Vergleich zu den SE-Sequenzen erhält (33), da nach jeder Anregung mehrere Zeilen in den k-Raum ausgelesen werden.

### **1.3.2.3 CPMG-Sequenz**

Die Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequenz (CPMG-Sequenz) zählt zu den Multi-Spin-Echo Sequenzen (36). Mittels der Signalaufnahme an mehreren Zeitpunkten des  $T_2$ -Abfalls können mit dieser Sequenz  $T_2$ -Bilder aufgenommen werden (36). Dem zuerst eingestrahlten  $90^\circ$  HF-Impuls folgen mehrere  $180^\circ$  HF-Impulse (37).

### **1.3.2.4 Inversion-Recovery-Sequenz**

In (33) wird beschrieben, dass bei der Inversion-Recovery-Sequenz (IR-Sequenz), die Magnetisierung zunächst durch einen  $180^\circ$ -HF-Impuls invertiert wird, siehe Abbildung 4. Dadurch den  $180^\circ$ -HF-Impuls wird die longitudinale Magnetisierung aus der positiven in die negative Z-Richtung gebracht. Der invertierte Längsmagnetisierungsvektor relaxiert von der negativen in die positive Z-Richtung. Nach der Inversion durch den  $180^\circ$ -Impuls erfolgt die Anregung der Magnetisierung in transversaler Richtung durch einen  $90^\circ$ -Puls. Das Zeitintervall zwischen Inversion und Anregung wird Inversionszeit TI (time of inversion) genannt. Der Bildkontrast kann durch die Veränderung der Inversionszeit variiert werden. Umso länger das Zeitintervall zwischen den beiden Impulsen ist, desto kleiner wird zunächst der Längsmagnetisierungsvektor und das Signal ist schwach. Wird das Zeitintervall sehr lang gewählt, kommt es zu einer kompletten Relaxation, so entsteht wieder ein stärkeres Signal (33). Durch die Wahl verschiedener TI kann der exponentielle  $T_1$ -Relaxationsprozess dargestellt und  $T_1$  quantifiziert werden.

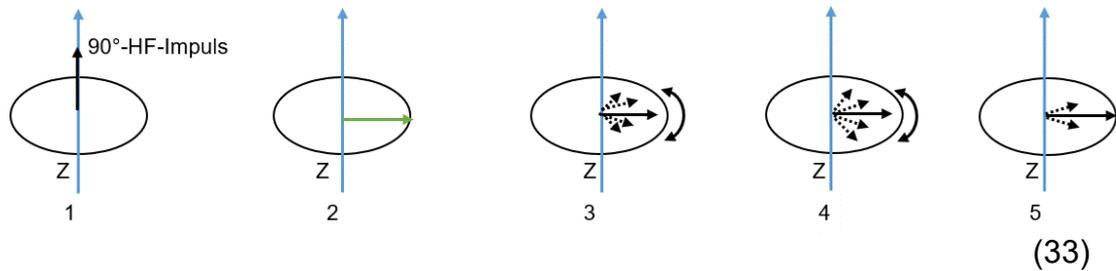


**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Inversion-Recovery-Sequenz

In Anlehnung an Weishaupt et al. (33). Die Abbildung zeigt schematisch die Inversion-Recovery-Sequenz. 1. Vor dem Aussenden des  $180^\circ$ -HF-Impulses liegt die Längsmagnetisierung in der positiven Z-Richtung vor. 2. Nach dem Einstrahlen des  $180^\circ$ -HF-Impulses klappt die Längsmagnetisierung von der positiven in die negative Z-Richtung. 3. und 4. Die Relaxation der Längsmagnetisierung aus der negativen Z-Richtung erfolgt in die positive Z-Richtung, ohne Einstrahlung eines HF-Impulses entsteht keine Quermagnetisierung und kein Signal, gezeigt ist hier ein Nulldurchgang (33).

### 1.3.2.5 Gradientenechosequenz

Für die Gradientenechosequenz wird im Gegensatz zu den vorangegangenen Sequenzen kein HF-Impuls zur Echoerzeugung genutzt (33, 35). Das Echo wird hier durch Gradientenfelder generiert (33). Die Magnetisierung wird dazu durch einen negativen Frequenzkodiergradienten zunächst dephasiert und dann mit umgekehrter Polarität wieder zu einem Echo rephasiert (33). Eine Dephasierung der Spins wird durch die negative Polarität des Frequenzgradienten erzeugt, durch das Umstellen auf die positive Polarität wird eine Rephasierung der Spins und die Entstehung des Echos erreicht. Abbildung 5 zeigt dies schematisch (33). Zu einer vollständigen Rephasierung kommt es auf Grund von gewebebedingten Feldinhomogenitäten nicht, dadurch bleibt eine Restdephasierung bestehen (35). Im Unterschied zu Spin-Echo-Sequenzen wird zur Anregung der Magnetisierung oft ein kleinerer Flipwinkel appliziert.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Gradientenechosequenz

In Anlehnung an Weishaupt et al. (33). Die Abbildung zeigt die Entstehung des Gradientenechos. 1. Vor dem Anregungsimpuls liegt in der XY-Ebene keine Magnetisierung vor. 2. Die horizontale Magnetisierung entsteht nach dem Anregungsimpuls (90°-HF-Impuls). 3. Das Anschalten der negativen Polarität des Frequenzgradienten führt zur Dephasierung der Spins. 4. Nach dem Umschalten des Frequenzgradienten zur positiven Polarität kommt es zur Rephasierung der Spins. 5. Durch die Rephasierung kommt es zum Echo (33). Eine gewisse Dephasierung bleibt auf Grund gewebebedingter Feldinhomogenitäten bestehen (35).

In (35) wird zu den Gradientenechosequenzen beschrieben, dass bei einer kurz gewählten Repetitionszeit nach einem abgelaufenen Repetitionszeit-Intervall sowohl Längs- als auch Quermagnetisierung besteht. Mittels gespoilter Gradientenechosequenz wird versucht die noch vorhandene Quermagnetisierung für den Kontrast des aufgenommenen Bildes wirkungslos zu machen. Dies kann beispielsweise durch die Fast Low Angle Shot (FLASH-) Sequenz erreicht werden. Die bewusste Dephasierung der Quermagnetisierung wird durch einen zusätzlichen Gradienten am Ende der FLASH-Sequenz erreicht (35).

### Echoplanare Bildgebung

In der Echoplanaren Bildgebung (Echo-planar-imaging (EPI)), wird nach einer Anregung durch einen HF-Impuls nicht nur eine Rohdatenzeile aufgenommen, sondern mehrere oder auch alle Zeilen der Rohdaten eines Bildes (35). Bei der EPI werden mehrere Gradientenechos aus einem Echozug erzeugt (38). Dies geschieht durch eine häufige und schnelle Amplitudenumkehr der Messgradienten, welche im Anschluss an die Anregung des freien Induktionsabfalls erfolgt (38).

### 1.3.3 Der Bildkontrast

#### 1.3.3.1 T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>- und Protonendichte-gewichtete Bilder

Der Bildkontrast und die Helligkeit eines MR-Bildes werden in Weishaupt et al. (33) erläutert und hängen von drei Gewebeparametern ab: der Protonendichte und der Relaxationszeiten T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub>. Zusätzlich zu den Gewebeparametern hängt der Bildkontrast von den Einstellungsparametern der Repetitionszeit (TR) und der Echozeit (TE) einer MR-Sequenz ab (bei Gradientenechosequenzen auch vom Flipwinkel), diese können variiert werden, sodass protonendichtegewichtete, T<sub>1</sub>-gewichtete oder T<sub>2</sub>-gewichtete MR-Bilder entstehen. Das absolute Signalmaximum eines Gewebes hängt von der Protonendichte und damit von der in einer Volumeneinheit befindlichen Spinanzahl, die angeregt werden kann, ab. Die Entstehung verschiedener Gewebekontraste wird durch die unterschiedliche Einstellung der Sequenzparameter beeinflusst, dies wird in Tabelle 1 gezeigt.

**Tab. 1:** Beeinflussung des Bildkontrastes durch die Einstellung der Repetitions- und Echozeit

<b>Bildkontrast</b>	<b>TR</b>	<b>TE</b>
<b>T<sub>1</sub>-gewichtete</b>	kurz	kurz
<b>T<sub>2</sub>-gewichtete</b>	lang	lang
<b>Protonendichtegewichtete</b>	lang	kurz

TR: Repetitionszeit, TE: Echozeit

(33)

Je nachdem, ob die TR und TE kurz oder lang eingestellt werden ergeben sich verschieden gewichtete Bildkontraste. Die T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Relaxationszeiten der Gewebe wirken sich auf die Helligkeit des MR-Bildes aus. Gewebe, die ein kurzes T<sub>1</sub> besitzen, sind auf den T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern hell und die Gewebe mit einem langen T<sub>1</sub> dunkel. Gewebe, die ein kurzes T<sub>2</sub> besitzen, sind auf den T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern dunkel und die mit einem langen T<sub>2</sub> hell. Bei hoher Protonendichte sind die protonendichtegewichteten Bilder signalstärker und somit heller als bei niedrigerer Protonendichte (33).

### **1.3.3.2 Magnetisierungstransfer**

In (33) wird beschrieben, dass im MRT die Signale für ein MR-Bild durch die frei beweglichen Wasserstoffprotonen entstehen. In Geweben, v.a. in Eiweißen, liegen gebundene Wasserstoffprotonen vor. Diese in makromolekularen Strukturen gebundenen Wasserstoffprotonen haben ein sehr kurzes  $T_2$  und daher eine sehr breite Resonanzlinie. Die breitere Resonanzlinie lässt eine Anregung der gebundenen Wasserstoffprotonen durch einen HF-Impuls zu, der eine andere Larmorfrequenz (sog. Off-Resonanzfrequenz) als die gebundenen Wasserstoffprotonen hat. Die alleinige Anregung der gebundenen Wasserstoffprotonen in makromolekularen Strukturen kommt durch einen HF-Impuls mit sehr hohem Flipwinkel, der als Präparation vor der eigentlichen Bildsequenz und mit einer anderen Larmorfrequenz als die der freien Wasserstoffprotonen (off-resonant) eingestrahlt wird, zustande. Dadurch kommt es zu einer Magnetisierungssättigung der gebundenen Wasserstoffprotonen. Das führt wiederum zu einem Magnetisierungstransfer von der Magnetisierung der gebundenen Wasserstoffprotonen auf die der freien Wasserstoffprotonen. Dieser sogenannte Magnetisierungstransfer führt zu einem Signalabfall im MR-Bild (33). Aus dem Abfall der Signalintensität in Tomogrammen mit MT-Präparation im Vergleich zum Signal ohne MT-Präparation kann der Anteil der Makromoleküle im Gewebe abgeschätzt werden.

### **1.3.3.3 Diffusionsgewichtete Bilder**

In der Diffusionsgewichteten Bildgebung werden meist schnelle EPI-Sequenzen genutzt (39). Nach einem  $90^\circ$ -Anregungsimpuls wird ein Diffusionsgradient geschaltet, diesem folgt ein  $180^\circ$ -Inversions-Impuls (39). Nach diesem wird erneut ein Diffusionsgradient geschaltet, bevor es zur Signalaufnahme kommt (39). In (33) wird erläutert, dass die Stärke von körpereigenen Flüssigkeitssignalen oder Gewebesignalen bei der diffusionsgewichteten Bildgebung von der mittleren Distanz abhängt, über die sich Wassermoleküle pro Zeiteinheit durch Selbstdiffusion bewegen. Ein Signalverlust entsteht durch die Verschiebung von Molekülen. Die Schnelligkeit, mit der sich die Moleküle entlang der Richtung des angelegten Diffusionsgradientenfeldes bewegen, beeinflusst die Signalintensität. Bewegen sich die Moleküle schnell in die Richtung des angelegten Diffusionsgradientenfeldes

kommt es zu einem Signalverlust. Mit der Auswahl der Stärke und der Richtung des Gradientenfeldes wird sowohl die Diffusionsrichtung als auch das Ausmaß des diffusionsgewichteten Bildkontrastes beeinflusst (33). Daraus kann der apparent diffusion coefficient (ADC) berechnet werden.

## 1.4 Magnetresonanzspektroskopie

### 1.4.1 Die chemische Verschiebung

Gleichartige Atomkerne besitzen in verschiedenen Molekülen unterschiedliche Resonanzfrequenzen (bzw. Larmorfrequenzen) (33). Unter der chemischen Verschiebung versteht man, dass die molekulare Umgebung eines Protons dessen Resonanzfrequenz beeinflusst (33). Dies ist die Grundlage für die Informationen, die in der MRS aus den molekular gebundenen Atomkernen gezogen werden können (30). Die einen Atomkern umgebenden Elektronen schirmen das Magnetfeld am Kernort etwas ab, dadurch kommt es zu unterschiedlich abweichenden Feldstärken vom äußeren Magnetfeld (32). Daraus ergeben sich geringe Frequenzunterschiede für die Signale ansonsten gleicher Kerne (40). Die Unterschiede der Frequenzen sind abhängig von der Molekülstruktur, die die Kerne umgibt (40). Die Änderung der Frequenz ist sehr gering und beträgt circa  $10^{-6}\omega_0$ , hierbei wird der Faktor  $10^{-6}$  meist als parts per million (ppm) geschrieben (30). Die absolute Resonanzfrequenzverschiebung  $\Delta\omega$ , die auf Grund von Abschirmung  $\sigma$  entsteht, ist der äußeren Magnetfeldstärke  $B_0$  proportional:

$$\Delta\omega = \sigma\omega_0 = \sigma\gamma B_0 \quad (32)$$

Die unterschiedlichen Resonanzfrequenzen verschiedener chemischer Metabolite lassen eine Identifizierung und Quantifizierung der Metabolite in einem Spektrum zu (32).

### 1.4.2 Spin-Spin-Kopplung

In dem Abschnitt zu der chemischen Verschiebung wurde festgehalten, dass die Resonanzfrequenzverschiebung proportional zum äußeren Magnetfeld ist. Im Gegensatz dazu beruht die Spin-Spin-Kopplung, die auch als J-Kopplung bezeichnet wird, auf magnetischen Wechselwirkungen, die durch die Elektronen der chemischen Bindungen in einem Molekül zwischen den einzelnen Kernen entstehen (40). Diese Wechselwirkung zwischen den Kernen ist nicht von der äußeren Magnetfeldstärke abhängig und kann zu einer Aufspaltung der Signale in einem Spektrum führen (40). Es entstehen sogenannte Dubletts oder Multipletts (40). Die Kopplungskonstante J gibt die Stärke der Linienaufspaltung an (40).

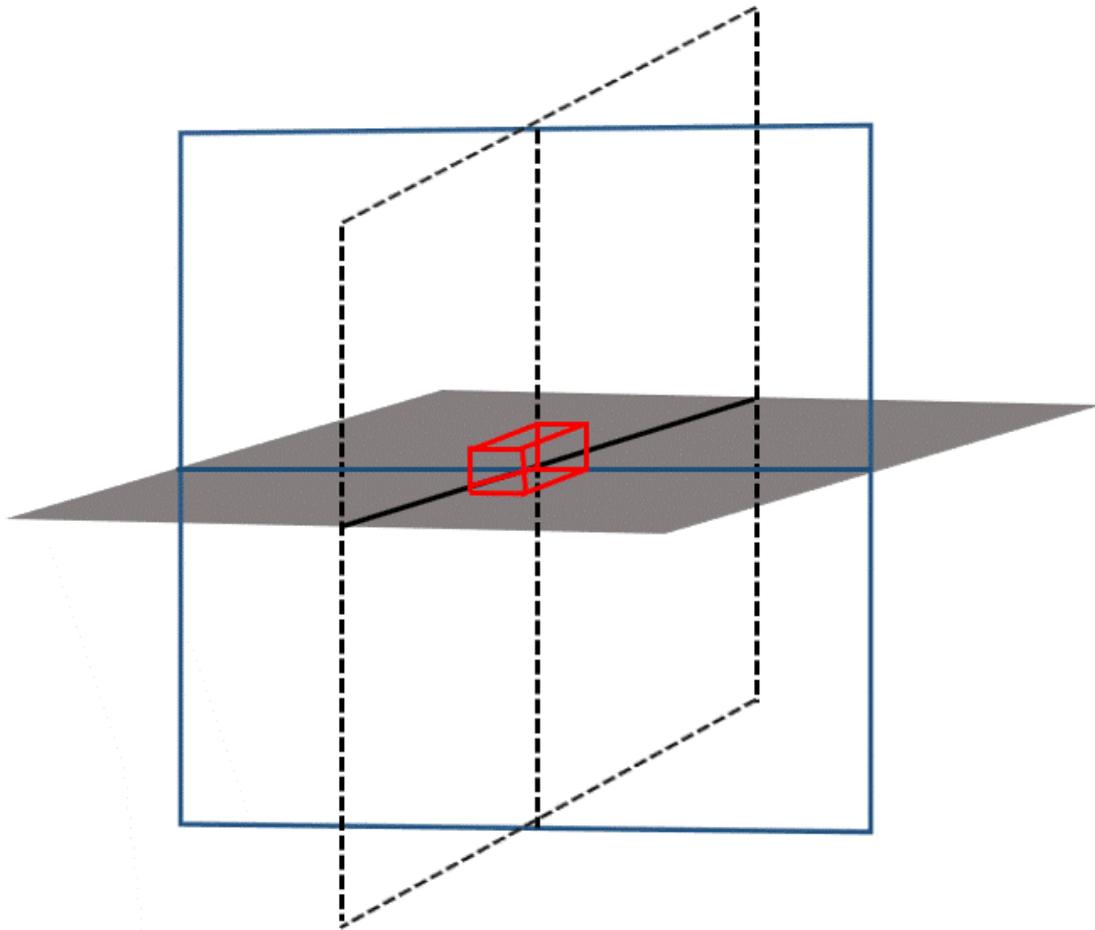
### **1.4.3 Magnetfeldhomogenisierung**

In (32) wird beschrieben, dass die Frequenzunterschiede der einzelnen Metabolite eines Moleküls sehr gering sind. Zur Differenzierung dieser geringen Unterschiede ist ein sehr homogenes äußeres Magnetfeld nötig. Bei der Aufnahme muss das Magnetfeld deshalb im ausgewählten Volumenelement optimiert werden. Der Vorgang zur Optimierung der lokalen Feldhomogenität wird als lokalisiertes Shimmen bezeichnet. Dabei werden mit der Justierung von Gradienten in alle drei Raumrichtungen Magnetfeldinhomogenitäten innerhalb des Volumens annähernd ausgeglichen. Dadurch wird die Linienbreite der detektierbaren Metaboliten schmaler und die Signale können gut voneinander getrennt werden (32).

### **1.4.4 Aufnahmetechniken eines Spektrums**

#### **1.4.4.1 Single-Voxel-Spectroscopy**

Für die Aufnahme eines Spektrums muss laut M. Backens (32) der Bereich, aus dem das Spektrum aufgenommen werden soll, genau lokalisiert werden. Die Aufnahme des Signals muss innerhalb des zu messenden Objekts in einem definierten Messvolumen, auch als Voxel oder volume of interest (VOI) bezeichnet, stattfinden. Signale außerhalb des VOI müssen so weit wie möglich unterdrückt werden. (30) Die Signalaufnahme aus dem gewünschten VOI erfolgt durch die Single-Voxel-Spektroskopie (SVS). Die Anregung dreier zueinander senkrecht stehender Schichten mittels HF-Pulsen und Schichtselektionsgradienten führt zur Selektion des Voxels. Das VOI stellt das Schnittvolumen der drei orthogonalen Schichten dar, siehe Abbildung 6 (32).



(32)

**Abb. 6:** Single Voxel Spectroscopy – Lokalisation des Voxels

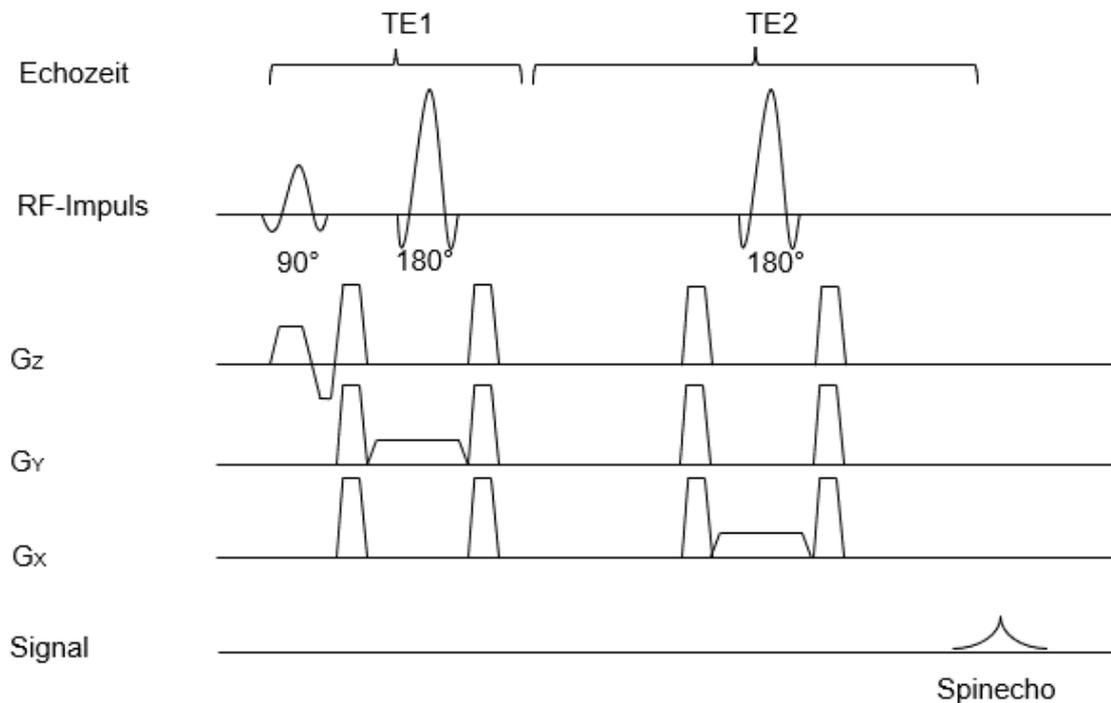
In Anlehnung an M. Backens (32). Im Schnittpunkt der drei orthogonalen Schichten (der blaue Kasten, der gestrichelte Kasten und die graue Fläche stehen für das Zentrum der orthogonalen Schichten) entsteht das Voxel (roter Kasten) als Schnittvolumen der drei Schichten, die senkrecht zueinanderstehen (32).

Die Sequenztechniken Point-resolved-spectroscopy-sequence (PRESS) und Stimulated-echo-acquisition-mode-sequence (STEAM) sind für die SVS etabliert (32).

**1.4.4.2 PRESS**

Die PRESS ist eine Doppelspinechosequenz, bei der drei Impulse von  $90^\circ - 180^\circ - 180^\circ$  für die Selektion des VOI appliziert werden (32). Jeder der drei Impulse regt mit Hilfe eines Gradienten eine Schicht in anderer orthogonaler

Raumrichtung an bzw. refokussiert (32). Der schematische Ablauf der PRESS Sequenz ist in Abbildung 7 dargestellt.



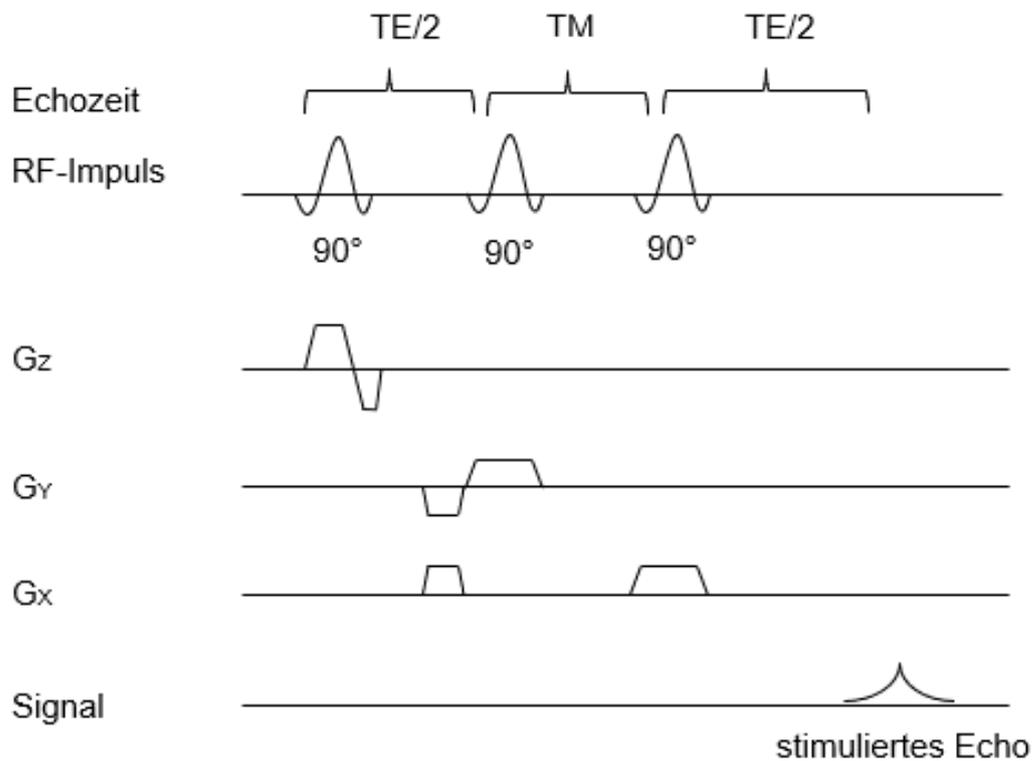
(41, 42)

**Abb. 7:** Schema einer PRESS-Sequenz

In Anlehnung an Bottomley und Griffiths (41) und Klose (42). Die point-resolved spectroscopy (PRESS) Sequenz besteht aus einem  $90^\circ$  HF-Impuls und zwei darauffolgenden  $180^\circ$  HF-Impulsen. Vor und nach den  $180^\circ$ -Impulsen werden Spoilergradienten geschaltet, um das detektierbare Signal nicht durch die Entstehung unerwünschter Magnetisierung durch die  $180^\circ$ -Impulse zu beeinflussen. TE1 und TE2 ergeben zusammen die gesamte Echozeit TE (41).  $G_x$ ,  $G_y$  und  $G_z$  stellen die Gradienten in allen drei Raumrichtungen dar (42).

#### 1.4.4.3 STEAM

Mit der STEAM-Sequenz wird durch drei  $90^\circ$ -Impulse eine schichtselektive Anregung bewirkt, die ein stimuliertes Echo erzeugt (32). In Abbildung 8 ist der Ablauf der STEAM Sequenz schematisch dargestellt:



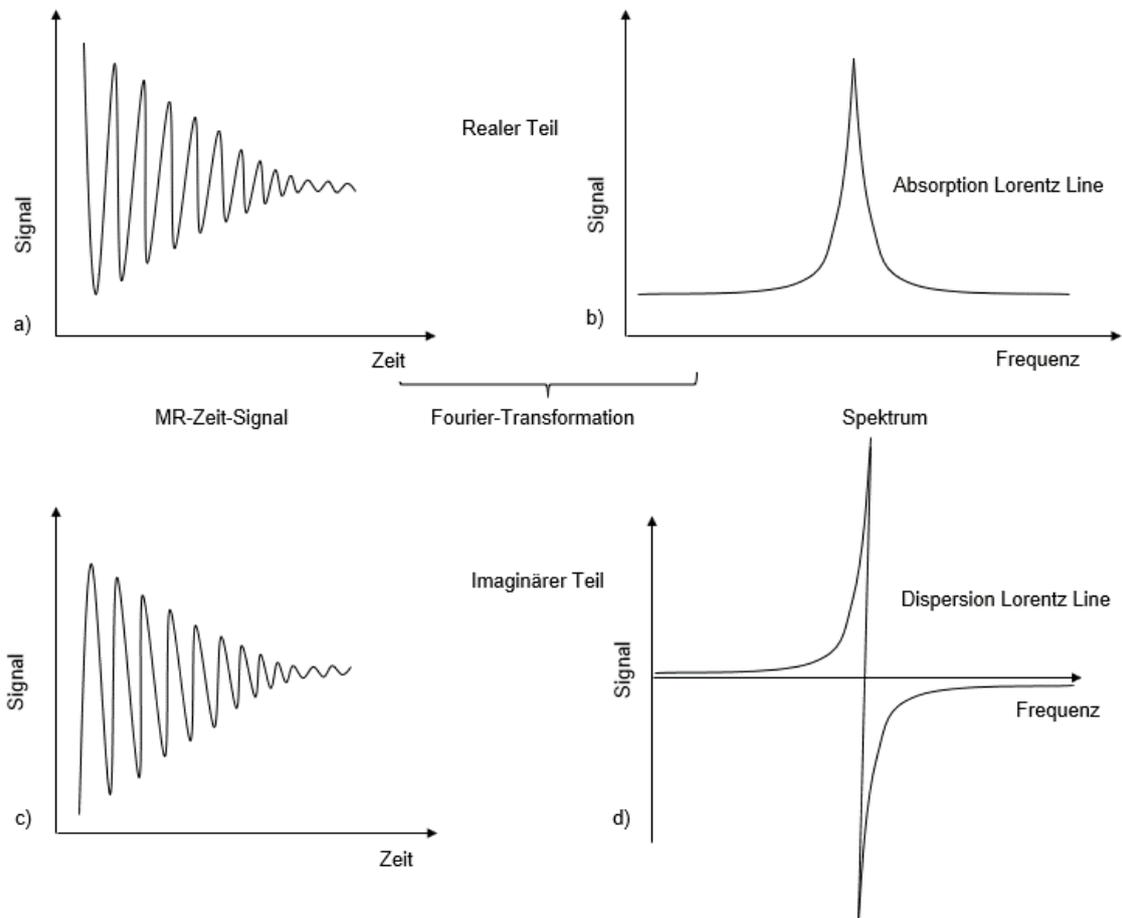
(41, 42)

**Abb. 8:** Schema einer STEAM-Sequenz

In Anlehnung an Bottomley und Griffiths (41) und Klose (42). Bei der stimulated echo acquisition mode (STEAM)-Sequenz werden drei HF-Impulse nacheinander geschaltet. Nach der ersten Hälfte der Echozeit ( $TE/2$ ) wird der zweite  $90^\circ$ -Impuls geschaltet. Zwischen dem zweiten und dritten  $90^\circ$ -Impuls liegt die mixing-time (TM). Nach dem Einstrahlen des dritten  $90^\circ$ -Impulses vergeht die zweite Hälfte der TE bis das Signal, also das stimulierte Echo, entsteht (41).  $G_x$ ,  $G_y$  und  $G_z$  stellen die Gradienten in allen drei Raumrichtungen dar (42).

#### 1.4.5 Aufnahme eines Spektrums

MR-Signale sind Hochfrequenzschwingungen, die exponentiell abnehmen und als Funktion der Zeit dargestellt werden (32). Das detektierte Signal wird komplex aufgenommen und besteht aus einem Real- und einem Imaginärteil (43). Das MR-Zeit-Signal wird durch Fourier-Transformation in die einzelnen Komponenten der aufgenommenen Frequenzen aufgeteilt (32). Die Intensität der einzelnen Frequenzkomponenten lässt sich dann als Linienspektrum darstellen (30, 40), siehe Abbildung 9.



(43)

**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Spektrenentstehung

In Anlehnung an Bachert und Schröder (30) und F. Jiru (43). Dargestellt ist ein Schema der Spektrenentstehung. Gezeigt sind das a) MR-Zeit-Signal und das durch die Fourier-Transformation entstandene b) Frequenzspektrum (30). a) und b) zeigen den realen Teil des MR-Zeit-Signals und des Spektrums und c) und d) den imaginären Teil des MR-Zeit-Signals und des Spektrums (43).

In (32) wird beschrieben, dass die relative Frequenzverschiebung  $\delta = \Delta\omega/\omega_0$  angegeben wird, um für die chemische Verschiebung magnetfeldunabhängige Werte zu erhalten. Die Werte der Frequenzverschiebung für  $^1\text{H}$ -Kerne liegen in Bereichen von nur einigen ppm. Frequenzen der Kernspins werden durch die sie umgebenden chemischen Strukturen verändert. Der Stoff Tetramethylsilan wurde für die  $^1\text{H}$ -MRS als Referenzwert von 0ppm für die chemische Verschiebung definiert. Auf diesen Referenzwert werden alle chemischen

Verschiebungen in der  $^1\text{H}$ -MRS bezogen.  $^1\text{H}$ -Atome in Wassermolekülen haben einen Wert der chemischen Verschiebung von ca. 4,7ppm. Die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ -Atome der Methylenprotonen von Fett liegt bei ca. 1,3ppm (32).

#### **1.4.6 Nachbearbeitungstechniken in der Magnetresonanzspektroskopie**

In (43) wird beschrieben, dass das Erreichen einer hohen Spektrenqualität, v.a. in in-vivo Spektren, limitiert ist. Diese Limitation hat verschiedene Gründe, meist ist die Feldhomogenität gering, das Signal zu Rausch Verhältnis niedrig und die Konzentrationen der zu untersuchenden Metaboliten sind oft sehr niedrig. Daher dienen verschiedene Nachbearbeitungstechniken der Qualitätsverbesserung der aufgenommenen Spektren. Zu den Nachbearbeitungstechniken gehören u.a. die Wirbelstromkorrektur, die Filterung von Signalen in der Zeitdomäne (bspw. mittels Gaussian Funktion), das Zero Filling und die Phasen- und Baselinekorrektur (43).

In den Ausführungen F. Jirus (43) wird beschrieben, dass jegliche Magnetfeldveränderung einen Strom, in dem der Feldveränderung ausgesetztem Bereich, erzeugt. In den leitenden Teilen des MR-Geräts bezeichnet man diese Ströme als Wirbelströme. Wirbelströme führen dazu, dass ein zusätzliches zeitabhängiges magnetisches Feld zu den Gradientenfeldern hinzukommt und mit den gemessenen Signalen interagiert. Dies führt zu Amplitudenveränderungen in dem FID und zu einer Verschlechterung in dem Schichtprofil. Mit der Wirbelstromkorrektur werden zusätzliche zeitabhängige Phasenverschiebungen des FID`s beseitigt. Die Entfernung ausgewählter Signale verringert die Komplexität der Signalanalyse. Zudem werden Artefakte ebenfalls mit der Signalintensität skaliert wie die echten Signale. Dadurch können Signale anderer Resonanzen mit geringerer Intensität gestört werden. In Bezug auf das Wassersignal kann dieses bspw. angeglichen werden und von dem FID subtrahiert werden, durch spezielle Filter eliminiert werden oder durch die Baselinekorrektur entfernt werden. Filtern oder Fenstern bedeutet in Zusammenhang mit der Nachbearbeitung, dass Eigenschaften des FID`s mit speziellen Funktionen (bspw. der Gaussian Funktion) multipliziert werden. Hierdurch kann mittels Unterdrückung oder Verstärkung verschiedener Teile des FID`s die Signalqualität verbessert werden. Durch das

Filtern können die Sensitivität und die Auflösung verbessert werden und wellige Verläufe (apodization) im Spektrum reduziert werden. Bei der FID-Aufnahme wird das Signal Punkt für Punkt aufgenommen. Die gewählte Bandbreite bei der Spektrenaufnahme begrenzt den zeitlichen Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Punkten. Die Anzahl der Punkte wird durch den FID-Abfall limitiert. Die Diagrammerstellung der FID's und der Spektren wird durch die Verknüpfung der aufgenommenen Punkte möglich. Ist diese Anzahl an Punkten für eine Verknüpfung nicht ausreichend, scheitert die Darstellung des Signals. Mittels Zero Filling kann die Anzahl an Punkten im FID nachträglich erhöht werden. Hierdurch entstehen keine neuen Informationen, sondern nur die Möglichkeit das Signal in einem Diagramm darzustellen. Eine Phasenkorrektur des Spektrums wird notwendig, wenn die initiale Phase des Spektrums nicht bei null liegt. Dadurch vermischen sich der reale und imaginäre Teil des Spektrums innerhalb eines dargestellten Spektrums. Um den realen und imaginären Teil des Spektrums wieder getrennt voneinander darstellen zu können bedarf es der Phasenkorrektur. Im Schluss seiner Abhandlung beschreibt F. Jirus (43) die Baselinekorrektur. Die Baseline bezeichnet einen unbekanntem Hintergrund in den aufgenommenen Spektren. Dieser kann bspw. durch Hardwarefehler oder durch Signale aus der untersuchten Probe entstehen. Die Baseline führt oft dazu, dass die Signale nicht auf einer geraden Linie liegen, wodurch die Analyse der Spektren erschwert wird. Das Entfernen dieses Hintergrundsignals nach der Spektrenaufnahme wird als Baselinekorrektur bezeichnet (43).

## **1.5 Ziele der Dissertation**

Die Ziele dieser Dissertation sind es, die für die Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie relevanten Eigenschaften des Alkylderivats und des Formaldehyds, das Relaxationsverhalten und Kontrastverhalten sowie das Signalverhalten und die chemische Verschiebung mit charakteristischen Resonanzlinien, konzentrationsabhängig zu ermitteln und diese Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Das Anatomische Institut Tübingen stellt dazu Lösungen des Alkylderivats und Formaldehyds in unterschiedlichen Konzentrationen für die Untersuchungen zur Verfügung.

Nachdem die MR-Eigenschaften des Alkylderivats und Formaldehyds charakterisiert worden sind, wird Lebergewebe vom Rind in die beiden Fixierlösungen gelegt. Hierbei soll vergleichend untersucht werden, wie die unterschiedlichen Fixierlösungen in das Gewebe eindringen.

Während des Fixiervorgangs der tierischen Gewebeproben werden mehrere MR-Untersuchungen durchgeführt. Einerseits wird dabei untersucht, wie gut das Eindringen des Fixiermittels in verschiedene Gewebekompartimente mittels MRT und MRS gemessen werden kann. Des Weiteren wird ermittelt, wie sich das Signalverhalten der Gewebe durch die Fixierung ändert und welche MRT-Methoden auch nach der Fixierung einen passenden Weichteilkontrast in den Gewebeproben erbringen.

## 2. Material und Methoden

Alle MR-Messungen wurden an einem 3 Tesla Magnetresonanztomographen (MAGNETOM Prisma<sup>Fit</sup>, Siemens Healthcare, Erlangen) durchgeführt. Das Signal der Proben wurde mittels einer 20-Kanal Head/Neck Spule mit einem Innendurchmesser von 23cm, einer Länge von 25cm und einer Höhe von 25cm im inneren Teil detektiert.

Aus patentrechtlichen Gründen wird das neu entwickelte Fixiermittel aus dem Anatomischen Institut in Tübingen nicht näher beschrieben. Im Folgenden wird dieses als wässrige Alkylderivatlösung und fließmittelhaltige Alkylderivatlösung bezeichnet. Analog dazu werden die Lösungen des Formaldehyds als wässrige und fließmittelhaltige Fixierlösungen benannt. Die Fixierlösungen wurden vom Anatomischen Institut Tübingen zur Verfügung gestellt. Vor neuen Messungen wurden neu angesetzte Lösungen zur Verfügung gestellt.

Die Experimente 1 bis 3 haben die Charakterisierung der MRT- und MRS-Eigenschaften der wässrigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen, sowie der fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen zum Ziel. In Experiment 1 – *Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen* – wurden  $T_1$  und  $T_2$  der wässrigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen sowie der fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen bestimmt. In Experiment 2 – *<sup>1</sup>H-Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in vivo Spektren* – wurden Vergleichsspektren des Hirngewebes, des Muskulaturgewebes und des Fettgewebes mit den Spektren der wässrigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen übereinandergelegt, um im Spektrum der wässrigen Alkylderivatlösung ein alkylderivat-spezifisches Signal zu detektieren. In Experiment 3 – *Vergleich der Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehyd-Lösungen* – wurden die aufgenommenen Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen übereinandergelegt, um vergleichen zu können, ob das Zusatzes des Fließmittels zu einer Veränderung eines spezifischen Peaks des Alkylderivats und Formaldehyds führt.

Die MR-Bildgebung für die  $T_1$ -Bestimmung wurde mit einer IR-TSE-Sequenz aufgenommen, die MR-Bildgebung für die  $T_2$ -Bestimmung mit einer CPMG-

Sequenz. Die Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehyd-Lösung wurden mittels der STEAM-Sequenz aufgenommen.

Das Experiment 4 – *Fixierung von Rinderleber* – hat die Untersuchung des Kontrastverhaltens von alkylderivat- und formaldehydfixiertem Rinderlebergewebe und des Relaxationsverhaltens zum Ziel. Des Weiteren soll das Fixiermitteleindringen, in die Lebergewebemitte, mittels  $^1\text{H}$ -MRS nachvollzogen werden.

Zur Darstellung des Kontrastverhaltens wurden  $T_1$ -gewichtete,  $T_2$ -gewichtete und PD-gewichtete MR-Bilder mit einer TSE-Sequenz aufgenommen. Die MR-Bildgebung für die  $T_1$ -Bestimmung wurde mit einer IR-TSE-Sequenz aufgenommen, die MR-Bildgebung für die  $T_2$ -Bestimmung mit einer multi-echo Spinecho-Sequenz. Zudem wurden Tomogramme mittels einer 3D-Gradientenechosequenz und einer diffusionsgewichteten Echo-Planar-Imaging-Sequenz (EPI-Sequenz) aufgenommen, um die Magnetisierungstransferrate bzw. den Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Die Spektren wurden mit der STEAM-Sequenz aufgenommen.

## **2.1 Experiment 1 - Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen –**

Im ersten Experiment wurden die wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen hinsichtlich der Fragestellung untersucht, wie sich die Relaxationszeiten der wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen des Alkylderivats und des Formaldehyds unterscheiden. Zudem sollte geklärt werden, welche Auswirkungen unterschiedliche Konzentrationen der beiden Fixiermittel auf die Relaxationszeiten haben.

### **2.1.1 Zusammensetzung der untersuchten Proben**

Das Fließmittel macht 70% der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehyd-Lösungen aus. Aufgefüllt wurden die fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen mit destilliertem Wasser. Das verwendete Formaldehyd stammt von der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland. Auf die weiteren genutzten Chemikalien kann aus patentrechtlichen Gründen nicht eingegangen werden.

## Wässrige und fließmittelhaltige Alkylderivatlösungen

Von den wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen wurden, die in Tabelle 2 aufgeführten Lösungen untersucht.

**Tab. 2:** Lösungszusammensetzung der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung der wässrigen Lösungen</b>	<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung der fließmittelhaltigen Lösungen</b>
<b>1</b>	10%-wässrige Alkylderivatlösung	<b>10</b>	10%-fließmittelhaltige Alkylderivatlösung
<b>2</b>	3%-wässrige Alkylderivatlösung	<b>11</b>	3%-fließmittelhaltige Alkylderivatlösung
<b>3</b>	1%-wässrige Alkylderivatlösung	<b>12</b>	1%-fließmittelhaltige Alkylderivatlösung
<b>4</b>	0,5%-wässrige Alkylderivatlösung		
<b>5</b>	0,25%-wässrige Alkylderivatlösung		
<b>6</b>	0,1%-wässrige Alkylderivatlösung		
<b>7</b>	0,05%-wässrige Alkylderivatlösung		
<b>8</b>	0,025%-wässrige Alkylderivatlösung		
<b>9</b>	0,01%-wässrige Alkylderivatlösung		

Das Fließmittel macht 70% der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen aus.

## Wässrige und fließmittelhaltige Formaldehydlösungen

Von den wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen wurden, die in Tabelle 3 aufgeführten Lösungen untersucht.

**Tab. 3:** Lösungszusammensetzung der wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung der wässrigen Lösungen</b>	<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung der fließmittelhaltigen Lösung</b>
<b>13</b>	4%-wässrige Formaldehydlösung	<b>22</b>	4%-fließmittelhaltige Formaldehydlösung
<b>14</b>	2%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>15</b>	1%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>16</b>	0,5%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>17</b>	0,25%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>18</b>	0,1%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>19</b>	0,05%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>20</b>	0,025%-wässrige Formaldehydlösung		
<b>21</b>	0,01%-wässrige Formaldehydlösung		

Das Fließmittel macht 70% der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung aus.

## Referenzlösungen

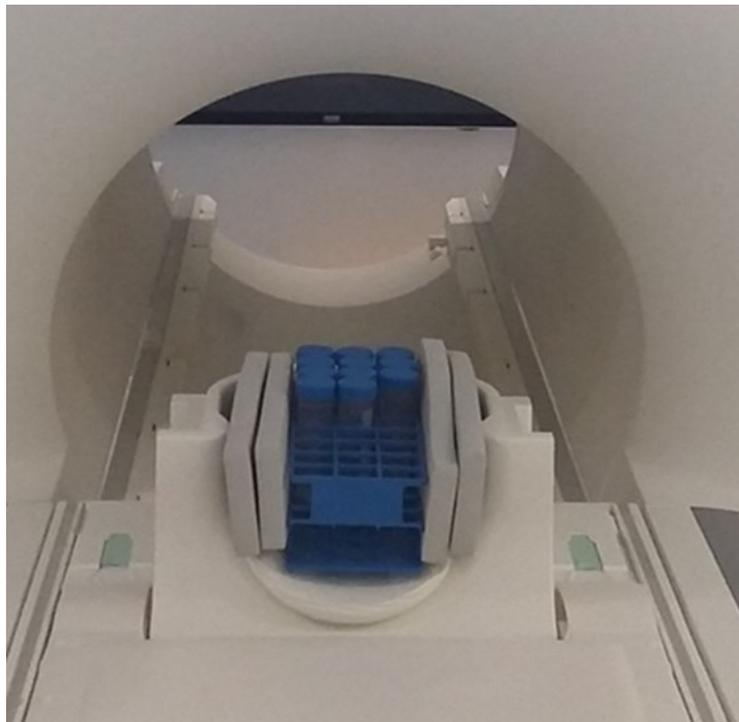
Als Referenzlösungen wurden die Lösungen 23 und 24 untersucht, siehe Tabelle 4.

**Tab. 4:** Lösungszusammensetzung der Referenzlösungen

<b>Lösung</b>	<b>Lösungszusammensetzung</b>
<b>23</b>	100% destilliertes Wasser
<b>24</b>	70% Fließmittel, 30% destilliertes Wasser

### 2.1.2 Versuchsaufbau

Die wässrigen und fließmittelhaltigen Lösungen des Alkylderivats und des Formaldehyds wurden in Blue-Caps, die 55ml der Lösungen fassen, gefüllt und in einen Blue-Capständer gestellt. Dieser wurde in einer Kopfspule positioniert und mit Schaumstoffpolstern rechts und links fixiert, um ein Verwackeln bei den Messungen zu verhindern. Zu den wässrigen Fixierlösungen wurde als Referenzlösung das 100%ige destillierte Wasser gestellt und zu den fließmittelhaltigen Lösungen die Referenzlösung mit 70% Fließmittel und 30% destilliertem Wasser sowie das 100%ige destillierte Wasser. Die Lösungen wurden im Isozentrum des Magnetresonanztomographen gemessen. Abbildung 10 zeigt den Versuchsaufbau exemplarisch.



**Abb. 10:** Versuchsaufbau zu Experiment 1

Die Lösungen in den Blue-Caps wurden in den Blue-Capständer gestellt, dieser wurde in der Kopfspule auf dem Untersuchungstisch des MRT positioniert und von rechts und links mit Schaumstoffpolstern fixiert. Die rechteckigen Schaumstoffpolster haben eine Länge von 25cm, eine Breite von 9cm und eine Höhe von 1,7cm.

### 2.1.3 Messparameter

Für die T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Bestimmung der unterschiedlich konzentrierten wässrigen und 70%-fließmittelhaltigen Lösungen des Alkylderivats und des Formaldehyds, wurden folgende Sequenzen und Parameter, dargestellt in Tabelle 5, bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer Lösungstemperatur von ebenfalls 20°C eingesetzt.

**Tab. 5:** Sequenzen und Messparameter zur T<sub>1</sub>-und T<sub>2</sub>-Bestimmung der wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen

Sequenz	TI (ms)	TE (ms)	TR (ms)	Schichtdicke (mm)	Pixelgröße (mm)	Matrix (mm)
<b>T<sub>1</sub>-Mapping</b>						
TSE IR	25	9,9	10.000	5,0	1,2x1,3	160x128
	100					
	500					
	1000					
	2000					
	4000					
	8000					
<b>T<sub>2</sub>-Mapping</b>						
SE -CPMG		20-640 Inkrement 20 ms	5000	5,0	1,3x1,3	160x128

TI – Inversionszeit, diese wurde mit jeder neuen TSE Sequenz erhöht, TE – Echozeit, TR – Repetitionszeit, TSE – Turbo Spin Echo, IR – Inversion Recovery, SE – Spin Echo. Es wurde mit einer Mittelung gemessen.

### 2.1.4 Datenauswertung

Zur Ermittlung der T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Zeiten wurden die MR-Bilder der Lösungen mittels MATLAB R2019b (MathWorks, Natick, MA, USA) in ausgewählten Bereichen (ROI, Region of interest), ausgewertet (44). T<sub>1</sub> wurde mit folgender Funktion,  $S(TI) = S_0 (1 - A \exp(-TI/T_1) + \exp(-TR/T_1))$ , gefittet. T<sub>2</sub> wurden mit der Funktion  $S(TE_i) = S_0 e^{-TE_i/T_2} + N$  gefittet.

## **2.2 Experiment 2 – <sup>1</sup>H-Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in-vivo Spektren – und Experiment 3 – Vergleich der Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen –**

Experiment 2 untersucht, ob es ein fixiermittelspezifisches <sup>1</sup>H-Signal in alkylderivatfixiertem Lebergewebe gibt. Ludescher et al. (21) konnten ein formaldehydspezifisches <sup>1</sup>H-Signal in tierischem Lebergewebe nachweisen. Gäbe es analog dazu ein sicher zu identifizierendes alkylderivatspezifisches <sup>1</sup>H-Signal, könnte die Fixierung des Lebergewebes mittels <sup>1</sup>H-MRS nachgewiesen werden.

Experiment 3 untersucht, ob es durch das Zugeben des Fließmittels in die Fixierlösungen ein spezifisches <sup>1</sup>H-Signal in der Alkylderivat- und der Formaldehydlösung weiterhin nachvollziehbar ist.

### **2.2.1 Versuchsaufbau**

Der Aufbau für die Experimente 2 und 3 ist nahezu gleichermaßen konzipiert. Experiment 2 für die Messung der Spektren des Alkylderivats und des Formaldehyds wurde folgendermaßen aufgebaut. Die 10%ige wässrige Alkylderivatlösung wurde im Blue-Cap auf einem Schaumstoffkeil von ca. 20° Neigung (relativ zur horizontalen Achse) mit Klebeband fixiert, damit die Luft im Blue-Cap nach oben zum Verschluss steigt und dadurch weniger Artefakte bei der Spektroskopie entstehen. Dieser Schaumstoffkeil und das Blue-Cap wurden auf ein Schaumstoffpolster in der Kopfspule positioniert und rechts und links ebenfalls mit einem Schaumstoffpolster fixiert, um messbedingte Vibrationen zu minimieren, siehe Abbildung 11 a und b. Die Kopfspule wurde in das Isozentrum des Sanners gefahren. Die 4%ige wässrige Formaldehydlösung wurde im Kugelphantom, das ca. 150ml der Lösung fasst, auf einem Korkuntersetzer und zwei Schaumstoffpolstern in der Kopfspule positioniert und rechts und links mit Schaumstoffpolstern fixiert, um messbedingte Vibrationen zu minimieren, siehe Abbildung 11 c.

Für das Experiment 3 wurden die 10%ige wässrige Alkylderivatlösung, die 10%ige fließmittelhaltige Alkylderivatlösung, die 4%ige wässrige Formaldehydlösung und die 4%ige fließmittelhaltige Formaldehydlösung analog zu dem Blue-Cap Aufbau in Experiment 2, siehe Abbildung 11 a, im Scanner positioniert.



**Abb. 11:** Versuchsaufbau zu Experiment 2.

a) zeigt ein Blue-Cap, gefüllt mit ca. 55ml der 10%igen wässrigen Alkylderivatlösung, fixiert mit Klebeband auf einem Schaumstoffkeil mit einer Neigung von ca. 20°. b) zeigt wie der Schaumstoffkeil, mit den Maßen  $x = 15\text{cm}$ ,  $y = 6,2\text{cm}$  und  $z = 16\text{cm}$ , mit dem fixierten Blue-Cap auf einem Schaumstoffpolster in der Kopfspule positioniert und rechts und links mit Schaumstoffpolstern fixiert wurde. c) zeigt das mit ca. 150ml 4%iger wässriger Formaldehydlösung gefüllte Kugelphantom auf einem Korkring, dieses wurde auf zwei Schaumstoffpolstern in der Kopfspule positioniert und rechts und links mit Schaumstoffpolstern fixiert. Der Korkring hat einen Außendurchmesser von 11cm, einen Innendurchmesser von 6cm und eine Höhe von 3cm.

### 2.2.2 Messparameter

Die Akquisition der Spektren erfolgte mittels einer STEAM-Sequenz. Unter 1 in der Tabelle 6 sind die Parameter für die 10%ige wässrige Alkylderivatlösung aus Experiment 2, sowie für die 10%ige wässrige Alkylderivatlösung, 10%ige fließmittelhaltige Alkylderivatlösung, die 4%ige wässrige Formaldehydlösung und die 4%ige fließmittelhaltige Formaldehydlösung aus Experiment 3 aufgeführt. Unter 2 sind die Parameter für die 4%ige wässrige Formaldehydlösung, gemessen im Kugelphantom, aus Experiment 2 aufgeführt, siehe Tabelle 6. Für die unter 2

aufgeführten Parameter wurde eine WIP-STEAM (work in progress) mit kurzer TE verwendet (45, 46).

**Tab. 6:** Messparameter der Spektren der 10%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und der 4%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen

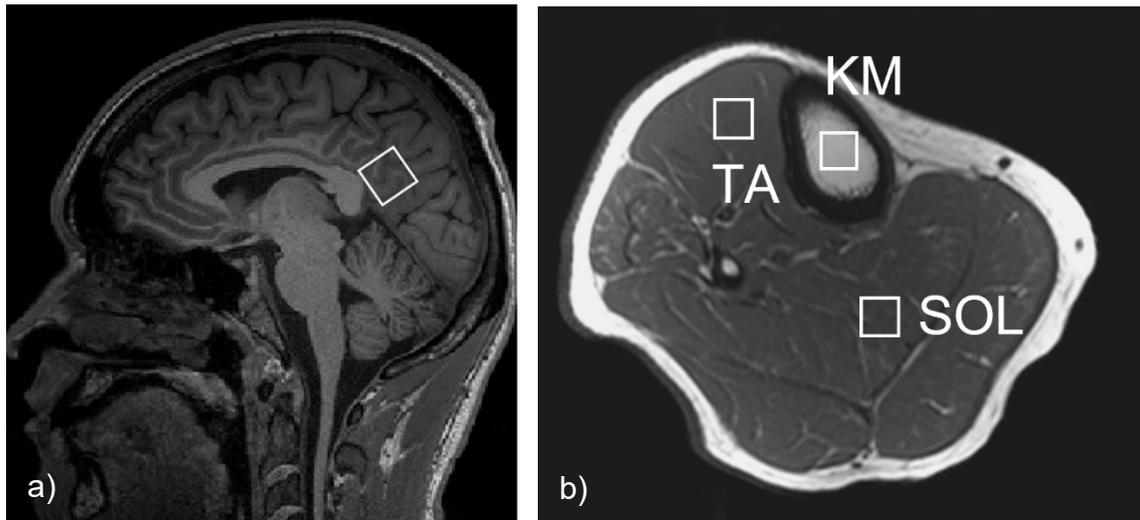
	<b>Sequenz</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>TR (ms)</b>	<b>VOI (mm)</b>	<b>Akquisitionen</b>
<b>1</b>	STEAM	10	5000	10x10x20	100
<b>2</b>	STEAM	5,4	2000	20x20x20	8

STEAM – stimulated-echo-acquisition-mode-sequence, TE – Echozeit, TR – Repetitionszeit, VOI – volume of interest.

### **2.2.3 In vivo Vergleichsspektren für das Experiment 2**

#### **2.2.4 Lokalisationsbilder und Messparameter**

Die Signale der aufgenommenen Spektren der Fixiermittel des Alkylderivats und des Formaldehyds wurden mit in vivo Spektren von Hirngewebe, Muskelgewebe (M. tibialis anterior und M. soleus) und gelben Knochenmark verglichen. Abbildung 12 zeigt die Lokalisationsbilder, die zur Aufnahme der Vergleichsspektren genutzt wurden.



**Abb. 12:** Lokalisationsbilder und Messparameter der in vivo Spektren

**a)** Das Lokalisationsbild des Gehirns zeigt den Bereich (weißer Kasten), in dem das in vivo Vergleichsspektrum des Hirngewebes aufgenommen wurde. Das Spektrum wurde mit einer PRESS-Sequenz und folgenden Messparametern aufgenommen: TE 30ms, TR 2000ms, VOI 20x20x20 mm, AV80, BW 1200Hz. **b)** Das Lokalisationsbild der Muskulatur und des gelben Knochenmarks zeigt den jeweiligen Bereich (weißer Kasten), in dem die in vivo Vergleichsspektren aufgenommen wurden. Das Vergleichsspektrum des gelben Knochenmarks (KM) wurde mit einer STEAM-Sequenz und folgenden Messparametern aufgenommen: TE 20ms, TR 4s, VOI 10x10x20, AV 48, BW 1200Hz. Die Vergleichsspektren des M. tibialis anterior (TA) und des M. soleus (SOL) wurden mit einer STEAM-Sequenz und folgenden Messparametern aufgenommen: TE 20ms, TR 2000ms, VOI 11x11x20mm, AV 32. TE – Echozeit, TR – Repetitionszeit, VOI – Volume of interest, AV – Anzahl der Signalmittelungen, BW – Aufnahmebandbreite

### 2.2.5 Methode der Spektrendarstellung und -auswertung

Die Spektren wurden mit Hilfe des Grafikprogramms Grafik-Layout-Engine (GLE) graphisch dargestellt (47). Auf die Signale bei 1,3 ppm und 3,5ppm wurden die einzelnen Spektren referenziert und mittels Zero Filling und Gaußfunktion bearbeitet. Die Spektren wurden graphisch übereinandergelegt und durch Vergleichen der Signale in den Geweben und in den Lösungen ausgewertet.

## **2.3 Experiment 4 – Fixierung von Rinderleber –**

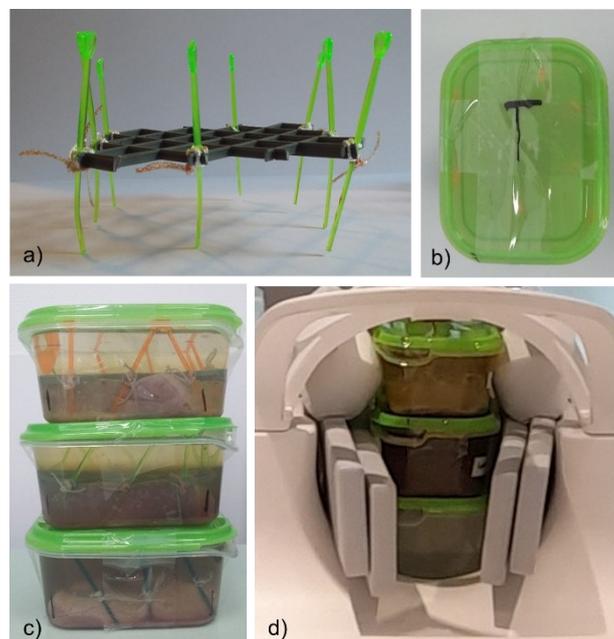
Das Experiment 4 untersucht, ob es durch die Fixiermittel zu Veränderungen des Kontrastverhaltens und der Relaxationszeiten im Rinderlebergewebe kommt. Die Untersuchungen in diesem Experiment werden hinsichtlich der Fragestellung, ob durch das Experiment Rückschlüsse auf eventuell unterschiedliche Fixiereigenschaften geschlossen werden können und diese magnetresonanztomographisch und magnetresonanzspektroskopisch nachgewiesen werden können, analysiert.

### **2.3.1 Versuchsaufbau**

Das Experiment 4 wurde folgendermaßen konzipiert. Drei gleichgroße Stücke der Rinderleber wurden mit den Maßen von 10cm Länge, 7cm Breite und 4cm Höhe zugeschnitten. Die drei zugeschnittenen Lebergewebestücke wurden in 750ml fassende Plastikbehälter gelegt. Die Behälter mit den Gewebestücken wurden mit 400ml der Fixierlösung gefüllt. Jeweils ein Behälter mit Lebergewebe wurde mit 400ml 4%iger fließmittelhaltiger Formaldehydlösung und 400ml 3%iger fließmittelhaltiger Alkylderivatlösung gefüllt. Als Referenzversuch wurde ein Behälter mit Lebergewebe mit 400ml 0,9%iger Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung), der Firma Braun und Fresenius, gefüllt. Die Lagerung der Gewebe sowie die Messungen fanden bei einer Temperatur von 20-21°C statt. Die drei Behälter mit den Lebergeweben wurden übereinandergestellt, der Behälter mit der Formaldehydlösung stand oben, in der Mitte der Behälter mit der Alkylderivatlösung und der Behälter mit der 0,9%igen NaCl-Lösung stand unten. In dieser Anordnung wurden die Behälter in der Kopfspule positioniert und rechts und links mit Schaumstoffpolstern fixiert. Die in die Fixierlösungen eingelegten Gewebe, wurden an Tag 0 direkt nach dem Einlegen, nach 2,5h, 5,0h und 7,5h gemessen und im Folgenden an Tag 1, 4, 11, 18, 25, 46, 67, 110 und 187.

Die Gewebestücke wurden mit einem Plastikgitter in der Plastikbox fixiert, das auf die Größe des Inneren der Plastikbox zugeschnitten wurde. An das Plastikgitter wurden acht Plastikstäbe mit Polypropylenband befestigt. Diese wurden zwischen dem Boden und dem Deckel der Plastikbox eingeklemmt, wodurch das Plastikgitter auf dem Lebergewebe auflag und ein Schwimmen und Drehen des Lebergewebes verhindert und das Verrutschen des Lebergewebes bis auf

wenige Millimeter minimiert wurde. Das Laserkreuz zur Positionierung der Plastikboxen im Isozentrum des MRT wurde auf der obersten Plastikbox markiert, sodass bei jeder Messung das Laserkreuz auf diese Markierung eingestellt werden konnte. Die Position der Plastikboxen wurde markiert. Zudem wurde von außen markiert an welcher Stelle die Lebergewebe liegen. Für eine gute Positionierung des Voxels für die Spektrenaufnahme wurden die Lebergewebestücke auf eine Dicke von 4cm zugeschnitten. Im liegenden Zustand hatten die Lebergewebe noch eine Dicke von 3,3cm, da das Lebergewebe im Liegen geringfügig nach außen gedrückt hat und die Stücke dadurch etwas an Höhe verloren. In die 3,3cm hohen Lebergewebe konnten Voxel der Größe 10x10x10mm positioniert werden. An Tag 0 wurde direkt nach dem Einlegen der Gewebe in die Lösungen und dann nach 2,5h, 5h und 7,5h gemessen, um die Eindringgeschwindigkeit ungefähr abschätzen zu können. Nach Tag 25 wurden die Messzeitintervalle verlängert, um zu untersuchen, ob sich die Kontraste und die Spektren nach dem kompletten Durchdringen der Gewebe mit Fixiermittel weiter verändern. Abbildung 13 zeigt den Versuchsaufbau.



**Abb. 13:** Versuchsaufbau zu Experiment 4

**a)** zeigt das zugeschnittene Plastikgitter mit den daran befestigten Plastikstäben mittels Polypropylenband. **b)** zeigt die Markierung der Laserposition auf der obersten Plastikbox. **c)** zeigt die Markierung der Leberposition am Äußeren der Plastikboxen. **d)** zeigt die Positionierung der drei Plastikboxen in der Kopfspule und die Befestigung mittels Schaumstoffpolstern.

### 2.3.2 Messparameter

Zur Darstellung der Kontrastveränderungen der Leber über die Zeit wurden T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>-, PD- und Diffusionsgewichtete Bilder, sowie MT-Bilder der Lebergewebe mit den in Tabelle 7 aufgelisteten Parametern aufgenommen.

Tab. 7: Messparameter für die Bildgebung zur Darstellung der Kontrastveränderung

Sequenz	Gewichtung	TR (ms)	TE (ms)	Schichtdicke (mm)	Pixelgröße (mm)	Matrix (mm)	FW
TSE	T1	550	8,7	5	0,4x0,4	256x320	k.A
TSE	T2	5000	87	5	0,4x0,4	256x320	k.A
TSE	PD	5000	8,7	5	0,4x0,4	256x320	k.A
EPI	Diffusion b-Werte: 0 s/mm <sup>2</sup> und 1000 s/mm <sup>2</sup>	4000	TE 39	5	2,0x2,0	256x128	k.A
Flash 3D	MT	30	2,87	1	1,0x1,0	256x256	6°

TSE – Turbo Spin Echo, EPI – Echo-Planar-Imaging –, FLASH – Fast-Low-Angle-Shot –, TR – Repetitionszeit, TE – Echozeit, FW – Flipwinkel

Zur Durchführung des T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>- Mappings für die T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Bestimmung des nativen Lebergewebes sowie des über die Zeit mit Fixierlösung angereicherten Lebergewebes wurden folgende Sequenzen und Parameter, dargestellt in Tabelle 8, bei einer Raumtemperatur von 20°C – 21°C gemessen.

**Tab. 8:** Sequenzen und Messparameter zur T<sub>1</sub>-und T<sub>2</sub>-Bestimmung im Lebergewebe

<b>Sequenz</b>	<b>TI (ms)</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>TR (ms)</b>	<b>Schicht- dicke (mm)</b>	<b>Pixel- größe (mm)</b>	<b>Matrix (mm)</b>
<b>T1-Mapping</b>						
<b>TSE IR</b>	25 100 500 1000 2000 4000 8000	8,5	10.000	5,0	1,0x1,0	256x256
<b>T2-Mapping</b>						
<b>SE (CPMG)</b>		10- 320	3000	5,0	1,0x1,0	256x256

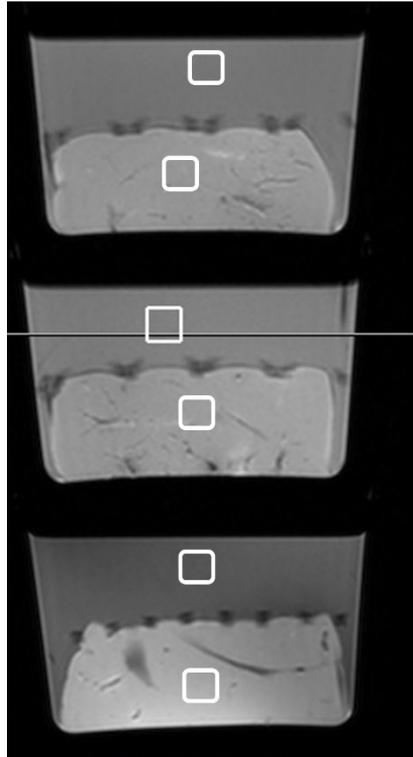
TI – Inversionszeit, diese wurde mit jeder neuen IR-TSE-Messung erhöht, TE – Echozeit, TR – Repetitionszeit, TSE – Turbo Spin Echo, IR – Inversion Recovery, SE – Spin Echo, CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill. Beim T<sub>2</sub>-Mapping wurden 32 Echos mit äquidistanten TE von 10ms bis 320ms aufgenommen.

Zur Nachvollziehbarkeit des Eindringens der Fixiermittel in die Gewebe wurden, neben der Bildgebung zur Darstellung der Kontrastveränderung, Spektren des nativen Lebergewebes an Tag 0 0h, sowie Spektren des Lebergewebes an Tag 0 2,5h , Tag 0 5,0h, Tag 0 7,5h, Tag 1, Tag 4, Tag 11, Tag 18, Tag 25, Tag 46, Tag 67, Tag 110 und Tag 187 mit den in Tabelle 9 aufgeführten stellten Parametern aufgenommen. Abbildung 14 zeigt die Voxelpositionen für die Spektrenaufnahme in den Fixierlösungen und Lebergeweben.

**Tab. 9:** Sequenz und Messparameter für die Spektrenaufnahme in den Fixierlösungen und im Lebergewebe

<b>Sequenz</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>TR (ms)</b>	<b>VOI (mm)</b>	<b>Akquisitionen</b>
<b>STEAM</b>	10	5000	10x10x10	64

STEAM – stimulated-echo-acquisition-mode-sequence, TE – Echozeit, TR – Repetitionszeit, VOI – Volume of interest.



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der Voxelpositionen für die Spektrenaufnahmen in den Fixierlösungen und den Lebergeweben

Gezeigt sind exemplarisch die Voxelpositionen für die Spektrenaufnahmen in den Fixierlösungen und den Lebergeweben für alle Aufnahmen über den gesamten Messzeitraum. Die Positionen der Voxel mussten über den Messzeitraum angepasst werden, da durch geringgradige Positionsveränderungen der Gewebe die nahezu gleiche Voxelposition händisch korrigiert werden musste

### 2.3.3 Datenauswertung

Zur Ermittlung der  $T_1$  und  $T_2$ -Werte wurden die MR-Bilder des Lebergewebes mit dem MATLAB Programm R2019b (MathWorks, Natick, MA, USA) ausgewertet. In dem Programm wurde  $T_1$  ausgewählter Bereiche (ROI, Region of interest) mit folgender Funktion  $S(TI) = S_0 (1 - A \exp(-TI/T_1) + \exp(-TR/T_1))$  gefittet. Die ROIs von  $T_2$  wurden mit der Funktion  $S(TE_i) = S_0 e^{-TE_i/T_2} + N$  gefittet.

Für die Bestimmung des MT-Effektes im Lebergewebe wurden MTR-Bilder mit dem MATLAB Programm berechnet, basierend auf der Formel  $(S_0 - S_{MT})/S_0$ , wobei  $S_0$  und  $S_{MT}$  Bilder sind, die jeweils ohne und mit dem MT-Impuls aufgenommen wurden. Die MTR ausgewählter ROIs wurden daraus berechnet.

Zur Ermittlung der Diffusions-Werte wurden die von der Scanner-Software berechneten ADC-Bilder mit dem MATLAB Programm ausgewertet.

Die Auswahl der ROIs orientierte sich an der Lage des VOI der MRS-Messungen. Die ROI Positionierung musste manuell vorgenommen werden. Bei einer automatischen Übertragung der ROI Positionen an den verschiedenen Messtagen lagen die ROIs in unterschiedlichen Höhen in den Bildern, sodass nicht die gleiche Region garantiert werden konnte. Durch leichte Positionsveränderungen im Versuchsaufbau und die leichte Abnahme des Lebergewebedurchmessers ist dieses Problem erklärbar. Die manuelle Auswahl der ROIs schließt geringfügig abweichende Positionen der ROIs sowie ein Abweichen der ROI Größe (Varianz von  $16\text{mm}^2$  bis  $36\text{mm}^2$ ) nicht aus.

Die Spektren wurden auf das Signal des Fließmittels bei 2,2ppm referenziert, und mittels Zero Filling und Gaußfilter postprozessiert, eine Referenzierung der Amplituden war nicht möglich, da in keinem der aufgenommenen Spektren eine Referenzamplitude in der Signalintensität konstant geblieben ist. Daher sind Aussagen zu Veränderungen der Amplituden über den Verlauf der Messzeit nicht sicher möglich. Mit Microsoft Excel wurden die Spektren graphisch dargestellt.

## **2.4 Histologische Aufarbeitung**

Mit Unterstützung des Anatomischen Instituts der Universität Tübingen wurden die fixierten Lebergewebe histologisch aufgearbeitet. Anhand der histologischen Aufarbeitung wird untersucht, inwieweit die makroskopisch fixierten Rinderlebergewebe auf der Zellebene fixiert wurden und ob die fixierten Gewebe durch die verschiedenen Fixiermittel Unterschiede aufweisen.

### **2.4.1 Arbeitsschritte zur histologischen Aufarbeitung**

Die alkylderivatfixierten Lebergewebe wurden auf der Oberfläche mit schwarzer Tusche markiert, um in den Präparaten eine Orientierung zu behalten. Aufgrund von Gewebeunregelmäßigkeiten an der Leberoberfläche wurde diese Markierung in den formaldehydfixierten Lebergeweben an der Unterseite vorgenommen. Daher ist eine Tuschemarkierung in den formaldehydfixierten Lebergeweben nicht zu erkennen. Die jeweils in Formaldehyd und Alkylderivat fixierten Leberstücke wurden aufgeschnitten und aus der aufgeschnittenen Schicht wurde ein Stück zur Paraffineinbettung extrahiert, siehe Abbildung 15. Die in Paraffin eingebetteten Leberschnitte wurden in 5µm dünne Schichten geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Jeweils zwei Schnitte des Lebergewebes in Formaldehydlösung und in Alkylderivatlösung wurden mit den Übersichtsfärbungen Azan und Hämatoxylin-Eosin gefärbt, siehe Abbildung 16. Die vier Objektträger wurden mit einem Mikroskop kachelweise abfotografiert und digitalisiert. Im digitalisierten Format wurden aus dem oberen, mittleren und unteren Drittel der jeweiligen Lebergewebe die Zellen abfotografiert und vergrößert. Für die Bildverarbeitung der aufgenommenen Bilder der Leberzellen wurde die Software Zeiss ZEN 3.4 blue edition (Carl Zeiss) verwendet.

Die für die histologischen Färbungen verwendeten Chemikalien und deren Hersteller sind in der Tabelle 10 aufgeführt und der Ablauf der Färbungen anschließend erklärt.

**Tab. 10:** Verwendete Chemikalien und deren Hersteller für die histologischen Färbungen

<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Anilinblau	Choma Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart, Deutschland
Anilinöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Azocarmin G	Choma Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart, Deutschland
DePeX (Polystyrol + Xylol)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin G Microscopy, use: 1% (v/v)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure Molekulargewicht: 60,05 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, 99.99% (v/v)	Apotheke der Universität Tübingen
Kaliumchlorid, Molekulargewicht: 74.56 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, Molekulargewicht: 136,09 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, Molekulargewicht: 58.44 g/mol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat, Molekulargewicht: 177.95 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Choma Gesellschaft Schmid & Co, Stuttgart, Deutschland
Wolframatophosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

### **Absteigende Alkoholreihe nach Paraffineinbettung**

Die Lebergewebe wurden in Paraffin eingebettet und in ca. 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Anschließend folgte die Entparaffinierung der eingebetteten Gewebe mittels einer absteigenden Alkoholreihe, siehe Tabelle 11, um diese auf die Hämatoxylin-Eosin- sowie Azan-Färbung vorzubereiten.

**Tab. 11:** Absteigende Alkoholreihe nach Paraffineinbettung

Zeit in Minuten	10	5	5	5	5	5
Behandlung mit:	Xylol	50% Xylol/ 50 % Ethanol	99% Ethanol	96% Ethanol	70% Ethanol	H <sub>2</sub> O

### **Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst für 5 Minuten in destilliertem Wasser und anschließend für 10 Minuten in Hämatoxylin bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine jeweils fünfminütige Waschung der Schnitte mit Leitungswasser sowie destilliertem Wasser, bevor diese für weitere 10 Minuten in Eosin inkubiert wurden. Nach einem abschließenden Waschschrift mit destilliertem Wasser über 5 Minuten und Behandlung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, siehe Tabelle 12, wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckelt.

### **Azan-Färbung**

Für die Azan-Färbung wurden die Paraffinschnitte zuerst 10 Minuten in Anilinalkohol inkubiert und anschließend bei einer Temperatur von 56°C für 15 Minuten mit Azocarmin gefärbt. Es folgte ein kurzer Spülschritt mit destilliertem Wasser und eine Differenzierung in Anilinalkohol. Anschließend erfolgte für mehrere Minuten eine Waschung in Essigsäurealkohol und eine einstündige Inkubation in Wolframatophosphorsäure. Nach einer weiteren Spülung mit destilliertem Wasser folgte eine 30-minütige Inkubation in Anilinblau-Orange-Essigsäure und eine abschließende Spülung mit destilliertem Wasser, sowie Differenzierung mit 96%igem Alkohol. Vor dem Eindeckeln mittels DePex wurden die Schnitte mit der in Tabelle 12 dargestellten, aufsteigenden Alkoholreihe behandelt.

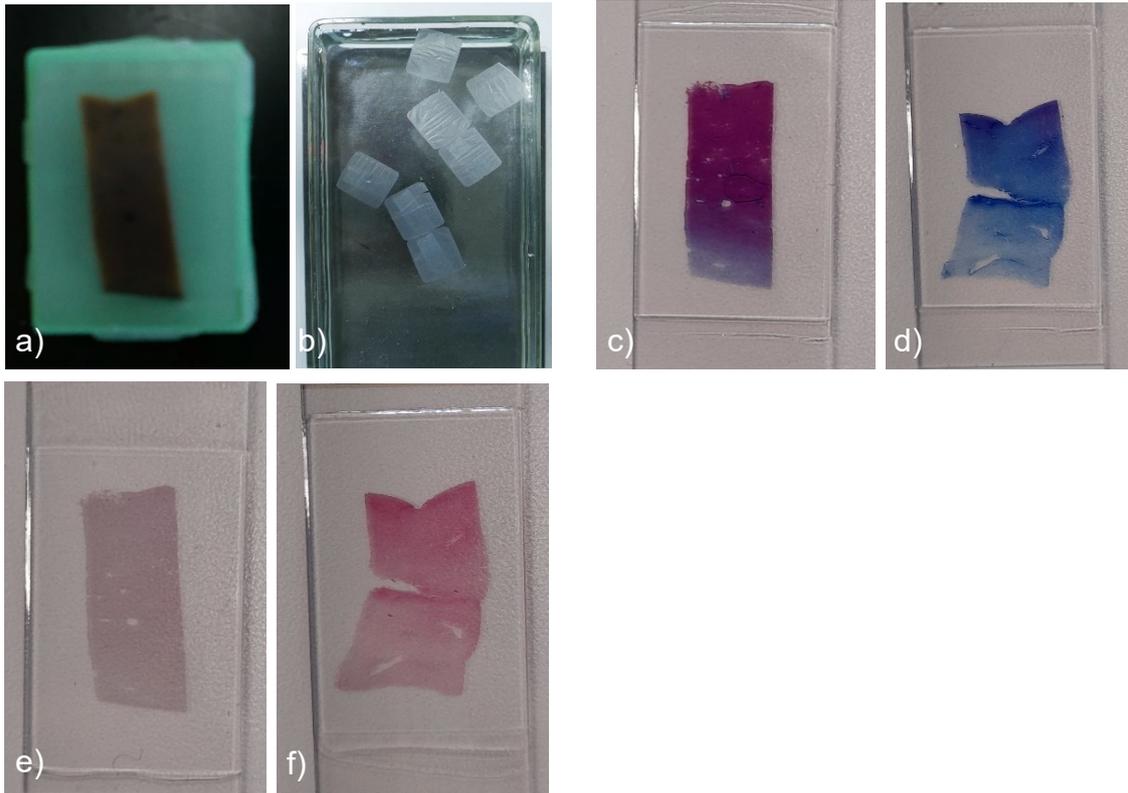
**Tab. 12:** Aufsteigende Alkoholreihe für Paraffinschnitte

Zeit in Minuten	5	< 1	< 1	5	5	5
Behandlung mit:	H <sub>2</sub> O	70% Ethanol	96% Ethanol	99% Ethanol	50% Xylol/ 50 % Ethanol	Xylol



**Abb. 15:** Makroskopische Aufsicht auf aufgeschnittener formaldehyd- und alkylderivatfixierter Lebergewebe

Links ist eine Schicht des formaldehydfixierten Lebergewebes dargestellt. Rechts ist eine Schicht des alkylderivatfixierten Lebergewebes dargestellt. Die Schichten wurden aus dem jeweiligen Leberstück herausgeschnitten. Die orangene Markierung zeigt die Schnittführung für den Zugschnitt der Lebergewebe, der für die Paraffineinbettung genutzt wurde.



**Abb. 16:** Arbeitsschritte zur histologischen Aufarbeitung

**a)** zeigt exemplarisch ein in Paraffin eingebettetes Lebergewebestück. **b)** zeigt exemplarisch die auf 5µm zugeschnittenen Lebergewebe. **c)** zeigt eins der formaldehydfixierten Präparate in Azanfärbung. **d)** zeigt eins der alkylderivatfixierten Präparate in Azanfärbung. **e)** zeigt eins der formaldehydfixierten Präparate in der Hämatoxylin-Eosinfärbung. **f)** zeigt eins der alkylderivatfixierten Präparate in der Hämatoxylin-Eosinfärbung.

### 3. Ergebnisse

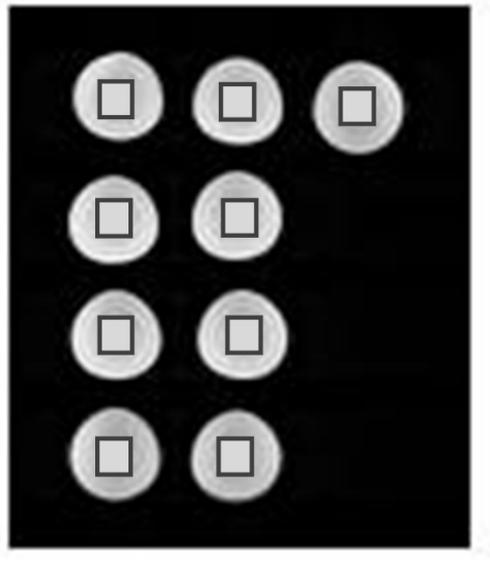
#### 3.1 Experiment 1 – Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen –

In Abbildung 17 sind die farblich markierten ROIs schematisch und stellvertretend für alle ausgewählten Messbereiche für das  $T_1$ - und  $T_2$ -Fitting der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen dargestellt. Im Folgenden zeigt die Abbildung 18 exemplarisch die  $T_1$ - und  $T_2$ -Fit-Kurven der verschiedenen konzentrierten fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen. In den Tabellen 13 und 14 sind  $T_1$  und  $T_2$  zusammengefasst aufgeführt.

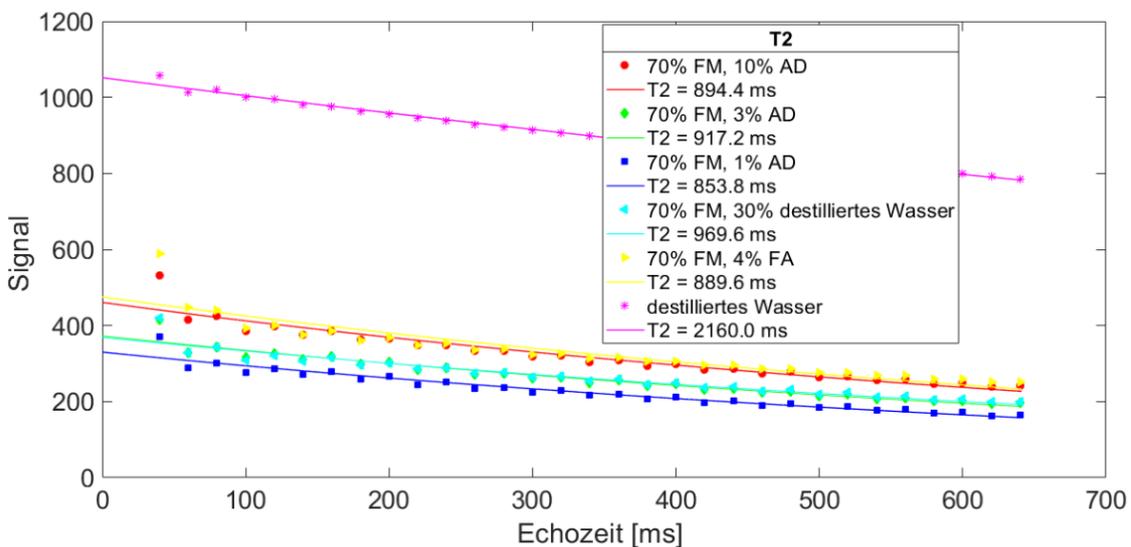
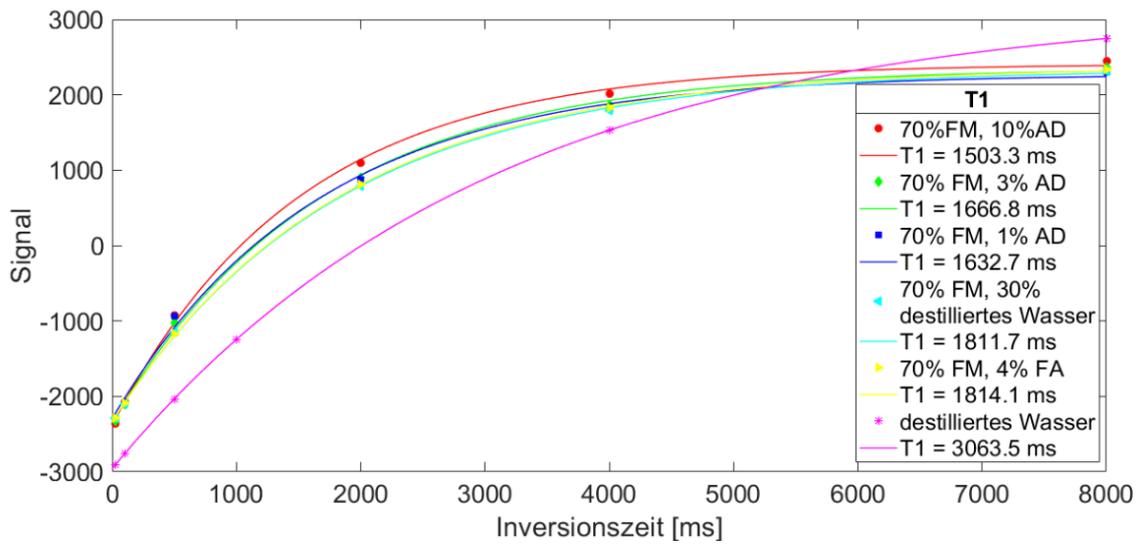
$T_1$  der wässrigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen liegen bis auf die 10%ige und 3%ige wässrige Alkylderivatlösung alle ungefähr in dem Bereich der  $T_1$ -Relaxationszeit von destilliertem Wasser. Die  $T_2$ -Werte der wässrigen Alkylderivatlösung befinden sich in Bereichen über 1300ms, davon ausgenommen ist die 10%ige wässrige Alkylderivatlösung, die ein  $T_2$  unter 400ms hat. Ab einer Konzentration von 0,01% wässriger Alkylderivatlösung und niedriger nähert sich die  $T_2$  stark dem destillierten Wasser an. Die  $T_2$ -Werte der 4%igen, 2%igen, 1%igen, 0,5%igen und 0,025%igen wässrigen Formaldehydlösung haben im Vergleich zu destilliertem Wasser, ein mit zunehmender Konzentration kürzeres  $T_2$ . Die 0,1 bis 0,01%igen wässrigen Formaldehydlösungen annähernd ähnliche  $T_2$ -Werte wie destilliertes Wasser.  $T_1$  und  $T_2$  der wässrigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen nehmen mit abfallender Konzentration der Fixiermittel zu und nähern sich mit abfallender Konzentration dem Referenzwert des destillierten Wassers an.

$T_1$  und  $T_2$  der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehyd-Lösungen sind den  $T_1$ - und  $T_2$ -Werten der Referenzlösung mit 70%igem Fließmittel und 30%igem destilliertem Wasser sehr ähnlich. Umso höher die Konzentration des Alkylderivats in der fließmittelhaltigen Lösung ist, umso stärker fallen  $T_1$  und  $T_2$  im Vergleich zu der Referenzlösung mit 70% Fließmittel und 30% destilliertem Wasser ab. Im Vergleich zur Referenzlösung des destillierten Wassers fallen die  $T_1$ -Werte der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen um ca. die Hälfte ab.  $T_2$  der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösung fällt im

Vergleich zur Referenzlösung des destillierten Wassers um ca. das 2,5fache ab.  $T_1$  und  $T_2$  der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen nehmen mit abfallender Konzentration der Fixiermittel zu und nähern sich mit abfallender Konzentration der Referenzlösung mit 70% Fließmittel und 30% destilliertem Wasser an.



**Abb. 17:** Schematische Darstellung für die ROI Auswahl für die  $T_1$ - und  $T_2$ -Bestimmung  
Die Abbildung zeigt schematisch die Auswahl der ROIs für die  $T_1$ - und  $T_2$ -Bestimmung der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen



**Abb. 18:** T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Bestimmung der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen  
 Die Grafik zeigt exemplarisch die angepassten Kurven für T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub> der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen. Die 3%ige fließmittelhaltige Alkylderivatlösung und die 4%ige fließmittelhaltige Formaldehydlösung wurden für den Fixiervorgang des Lebergewebes genutzt. FM – Fließmittel, AD – Alkylderivat, FA - Formaldehyd

**Tab. 13:** T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub> der wässrigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen

<b>wässrige Alkylderivatlösungen</b>	<b>T<sub>1</sub>(ms)</b>	<b>T<sub>2</sub>(ms)</b>	<b>wässrige Formaldehydlösungen</b>	<b>T<sub>1</sub>(ms)</b>	<b>T<sub>2</sub>(ms)</b>
<b>10%</b>	2000	388	<b>4%</b>	2700	427
<b>3%</b>	2523	1128	<b>2%</b>	2789	476
<b>1%</b>	2737	1370	<b>1%</b>	2859	500
<b>0,5%</b>	2798	1497	<b>0,5%</b>	2899	493
<b>0,25%</b>	2788	1553	<b>0,25%</b>	2888	665
<b>0,1%</b>	2827	1772	<b>0,1%</b>	2896	1359
<b>0,05%</b>	2852	1859	<b>0,05%</b>	2912	1709
<b>0,025%</b>	2882	1926	<b>0,025%</b>	2928	1842
<b>0,01%</b>	2866	1960	<b>0,01%</b>	2923	1959
<b>Destilliertes Wasser</b>	2866	2097			

**Tab. 14:** T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub> der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen

<b>70%ige-fließmittelhaltige Alkylderivatlösungen</b>	<b>T<sub>1</sub>(ms)</b>	<b>T<sub>2</sub>(ms)</b>	<b>fließmittelhaltige Formaldehydlösungen</b>	<b>T<sub>1</sub>(ms)</b>	<b>T<sub>2</sub>(ms)</b>
<b>10%</b>	1503	894	<b>4%</b>	1814	889
<b>3%</b>	1666	917			
<b>Referenz</b>					
<b>70% FM 30% Destilliertes Wasser</b>	1814	969			
<b>Destilliertes Wasser</b>	3063	2160			

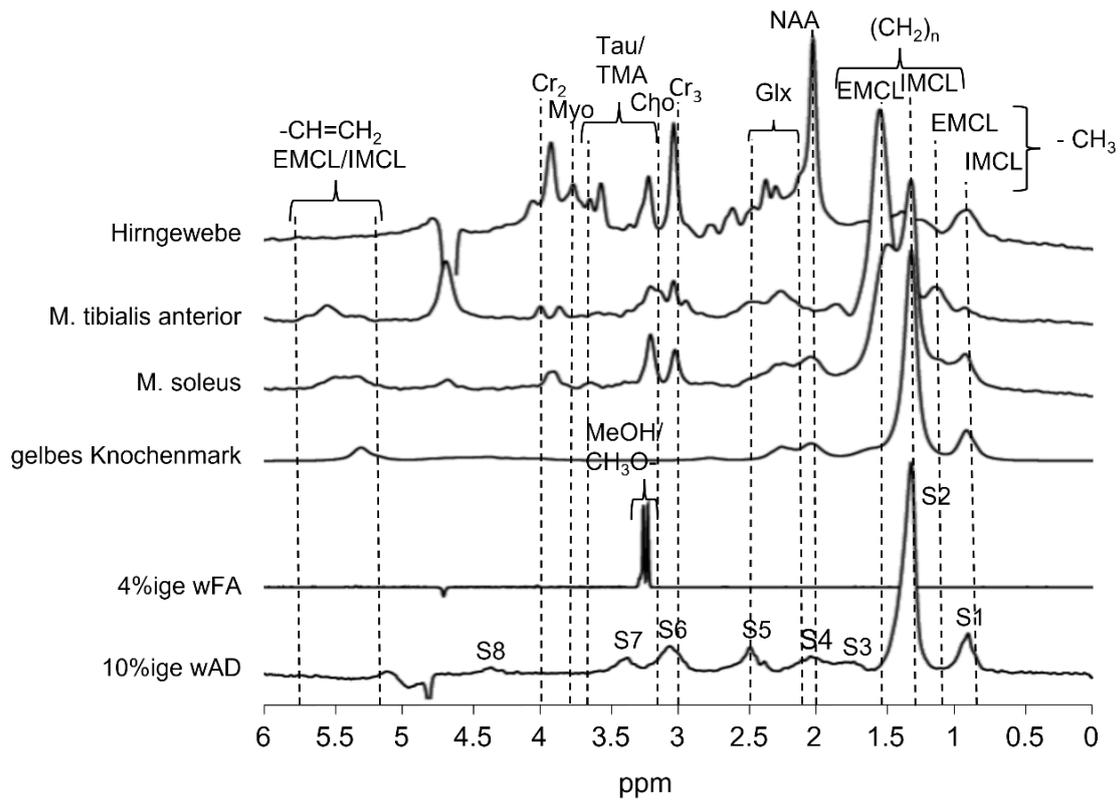
### **3.2 Experiment 2 – <sup>1</sup>H-Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in-vivo Spektren –**

Aus (48) geht hervor, dass bei 0,9ppm die Methylprotonen (-CH<sub>3</sub>) und bei 1,3 ppm die Methylenprotonen (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> ein Signal in der Spektroskopie generieren. Kreatin (Cr<sub>2</sub> und Cr<sub>3</sub>) liegt in den Bereichen von 3 und 3,9ppm. Taurin (TAU) liegt bei 3,2ppm und Trimethyl-Ammonium (TMA) bei 3,4ppm. Das unterdrückte Wassersignal (rest. H<sub>2</sub>O) in allen Spektren liegt bei ca. 4,7ppm (48).

Im Bereich von 5,2 bis 5,7ppm liegen die Signale der Vinylgruppen (-CH=CH<sub>2</sub>) (49). Die Signale des N-Acetylaspartats (NAA) liegen bei 2,02 ppm, des Cholins (Cho) bei 3,22ppm, des Myoinositols (Myo) bei 3,6ppm und des Glutamats und Glutamins (Glx) bei 2,05 – 2,5ppm (50). Bei den Spektren aus der Muskulatur ist zu beachten, dass die Fettsignale aufgrund von Suszeptibilitätseffekten in Signale von intra- (IMCL) und extramyozellulären Lipiden (EMCL) aufgespalten sind.

In dem Spektrum des Formaldehyds liegen zwischen ca. 3,2 und 3,4 ppm die Signale des Methanols (MeOH) und der Methoxygruppe (-CH<sub>3</sub>O) (49, 51).

Die 10%ige wässrige Alkylderivatlösung hat acht erkennbare Signale siehe Abbildung 19.



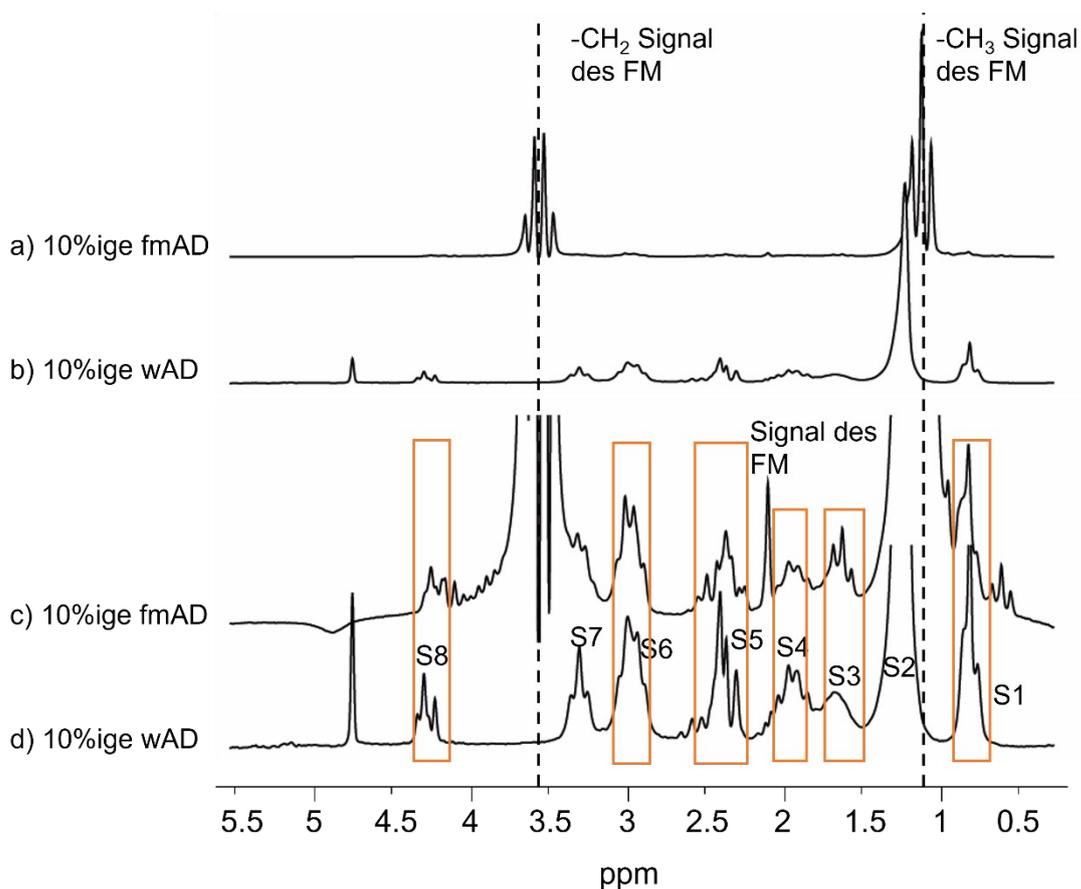
**Abb. 19:** <sup>1</sup>H-Signale der Fixierlösungen und der in vivo Spektren

Die Spektren der 10%igen wässrigen Alkylderivatlösung und der 4%igen wässrigen Formaldehydlösung wurden unter die in-vivo Vergleichsspektren gelegt, um die Signale der Fixiermittel mit den Signalen gewebespezifischer Peaks zu vergleichen.

**-CH=CH<sub>2</sub>** – Vinylgruppe, **EMCL** – Extramyozelluläres Fett, **IMCL** – intramyozelluläres Fett, **Cr<sub>2</sub>** – Kreatinin, **Myo** – Myosin, **Tau** – Taurin, **TMA** – Trimethyl-Ammonium, **Cho** – Cholin, **MeOH** – Methanol, **CH<sub>3</sub>O-** – Methoxygruppe, **Cr<sub>3</sub>** – Kreatinin, **Glx** – Glutamat, Glutamin, **NAA** – N-Acetylaspartat, **-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>** Methylengruppe, **-CH<sub>3</sub>** – Methylgruppe (48-51), wFA – wässrige Formaldehydlösung, wAD – wässrige Alkylderivatlösung, S1 bis S8 – Signale 1 bis 8.

### 3.3 Experiment 3 – Vergleich der Spektren der wässrigen- und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen –

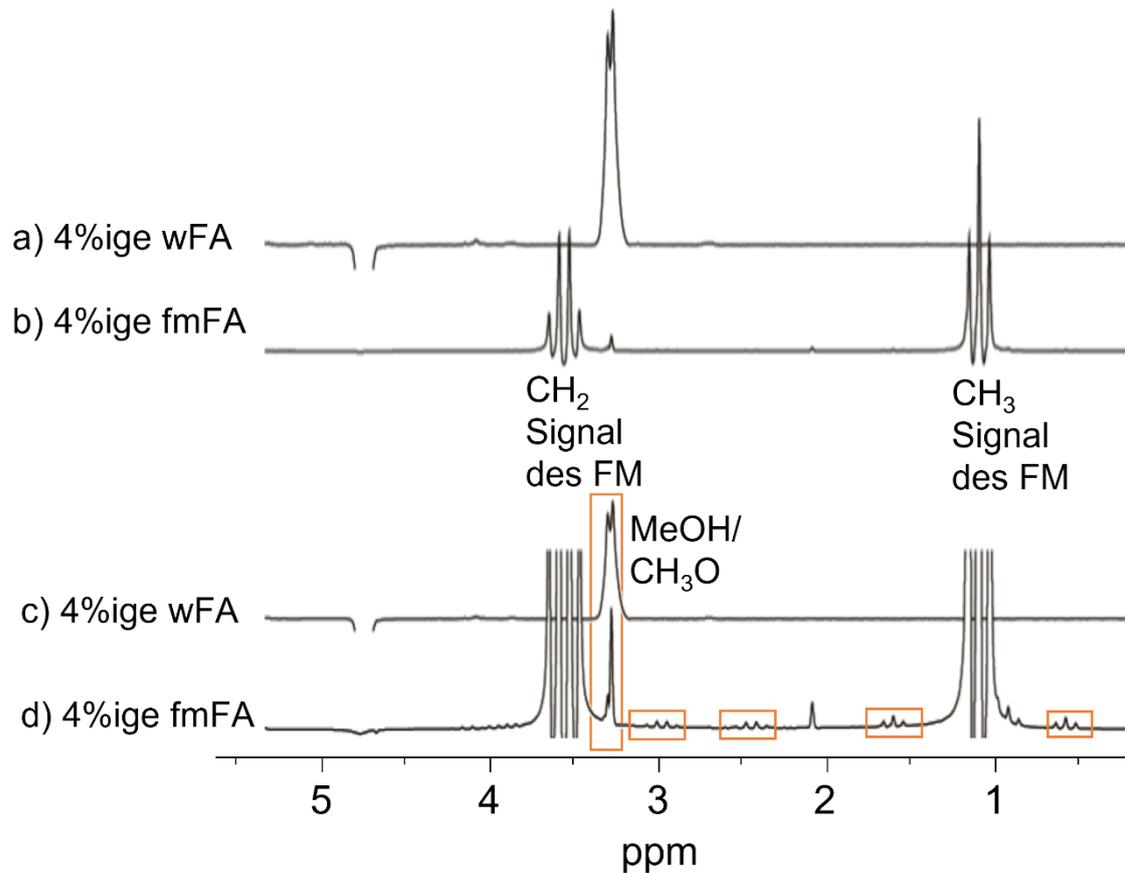
Die Signale bei 0,8ppm, 1,8ppm, 2,5ppm, 3,0ppm und 4,4ppm sind sowohl in der 10%igen wässrigen- als auch in der 10%igen fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung vorhanden. In den Formaldehydlösungen sind die Signale bei 3,1 bis 3,3ppm sowohl in der wässrigen als auch in fließmittelhaltigen Lösungen vorhanden. In der 4%igen fließmittelhaltigen Formaldehydlösung sind vier Triplettsstrukturen bei 0,5ppm, 1,5ppm, 2,5ppm, 3ppm und 4ppm auffällig, siehe Abbildung 20 und 21.



**Abb. 20:** Spektrenvergleich der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung

Die Spektren der 10%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung wurden zum Vergleich der Signale übereinandergelegt, um die Signale des reinen Alkylderivats von denen des Fließmittels abzugrenzen. Die Spektren der 10%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung wurden mit einer STEAM-Sequenz, TE 10ms, TR 5000ms, AV 100 aufgenommen. Die orangenen Kästen zeigen die Signale, die in der wässrigen- und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung annähernd gleich sind.

fmAD – fließmittelhaltige Alkylderivatlösung, wAD – wässrige Alkylderivatlösung, CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub> – Methylgruppe, S1 bis S8 – Signal 1 bis 8.



**Abb. 21:** Spektrenvergleich der wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen  
 Die Spektren der 4%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösung wurden zum Vergleich der Signale übereinandergelegt, um die Signale des reinen Formaldehyds von denen des Fließmittels abzugrenzen. Die Spektren der 4%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösung wurden mit einer STEAM-Sequenz, TE 10ms, TR 5000ms, AV 100 aufgenommen. In den orangenen Kästen sind die regelmäßig auftretenden Triplets im fließmittelhaltigen Formaldehydspektrum markiert.  
 fmFA – fließmittelhaltige Formaldehydlösung, FM – Fließmittel, MeOH – Methanol, CH<sub>3</sub>O – Methoxygruppe, CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub> – Methylgruppe.

### **3.4 Experiment 4 – Fixierung von Rinderleber –**

#### **3.4.1 Kontrastveränderung in der T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub> und PD-gewichteten Bildgebung**

Die Ergebnisse zu der Kontrastveränderung in der T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>- und PD-gewichteten Bildgebung der Fixierlösungen und der Lebergewebe über den Zeitraum von 187 Tagen ist in Abbildung 22 für T<sub>1</sub>-gewichtete Bildgebung, in Abbildung 23 für die T<sub>2</sub>-gewichtete Bildgebung und in Abbildung 24 für die PD-gewichtete Bildgebung dargestellt.

In den T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern ist eine Kontrastveränderung im Laufe des Eindringens der Fixierlösungen zu erkennen. Durch das Eindringen des Fixiermittels kommt es zu einer helleren Randbildung des Lebergewebes im Vergleich zu dem noch dunkleren Leberinneren. Im Vergleich zu der nativen Leber an Tag 0 wird das Leberinnere über den Zeitraum der Fixierung ebenfalls heller. In den T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern ist der Verlauf des Eindringens der Fixierlösungen nicht nachvollziehbar. Die Intensität des gesamten Lebergewebes von Tag 0 0h, in nativem Lebergewebe, bis Tag 187, in komplett fixiertem Lebergewebe, verändert sich allerdings. Die Gewebe stellen sich im Verlauf heller dar als zu Beginn der Messreihe. Dabei ist ein geringer Unterschied zwischen dem formaldehydfixierten und dem alkylderivatfixierten Lebergewebe festzustellen. In den T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern ist eine Kontrastveränderung des vollständig alkylderivatfixierten Lebergewebes ab Tag 4 zu erkennen. Hier kommt es zu einer helleren Randbildung und ab Tag 46 ist die hellere Kontrastierung im gesamten alkylderivatfixierten Lebergewebe festzustellen. Im formaldehydfixierten Lebergewebe ist keine Randbildung zu erkennen, sondern nur eine hellere Darstellung des ganzen Lebergewebes über den Messzeitraum. In den PD-gewichteten Bildern ist eine Kontrastveränderung zwischen dem reinen Lebergewebe an Tag 0 0h und dem fixierten Lebergewebe ab Tag 25 im formaldehydfixierten Lebergewebe und ab Tag 18 im alkylderivatfixierten Lebergewebe erkennbar. Die formaldehydfixierten Gewebe stellen sich im Verlauf dunkler dar und die alkylderivatfixierten Gewebe heller, ein Eindringverlauf der jeweiligen Fixiermittel ist auch in der PD-gewichteten Bildgebung nicht zu erkennen.

### **3.4.2 Kontrastveränderung in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung – Lebergewebe in Formaldehydlösung –**

Im Zeitraum von Tag 0 0h bis Tag 0 7,5h ist im Lebergewebe, fixiert in der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung, eine beginnende Kontrastveränderung im oberen, rechten und linken Randbereich der Leber in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung zu erkennen. Der kontrastveränderte Rand nimmt innerhalb von 7,5h an Tag 0 zu, ab 2,5h nach dem Einlegen des Gewebes ist ein kontrastveränderter Rand zu erkennen, der nach 5,0h und 7,5h weiter zunimmt. An Tag 1 hat die kontrastveränderte Randbildung weiterhin zugenommen und ist klar von dem darunterliegenden Lebergewebe abzugrenzen. An Tag 4 sind ca. 1/3 des Lebergewebes von der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung durchdrungen, die kontrastveränderte Randbildung hat weiter zugenommen und ist weiterhin klar zum restlichen Lebergewebe abgrenzbar. An Tag 11 sind ca. 2/3 des Lebergewebes von der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung durchdrungen. Eine klare Grenze zum unteren Drittel des Lebergewebes ist nachvollziehbar. Ab Tag 25 ist das gesamte Lebergewebe von der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung durchdrungen, ein Fortschreiten der Randbildung ist nicht mehr zu erkennen. Von Tag 46 bis Tag 187 ändert sich der Kontrast nicht mehr.

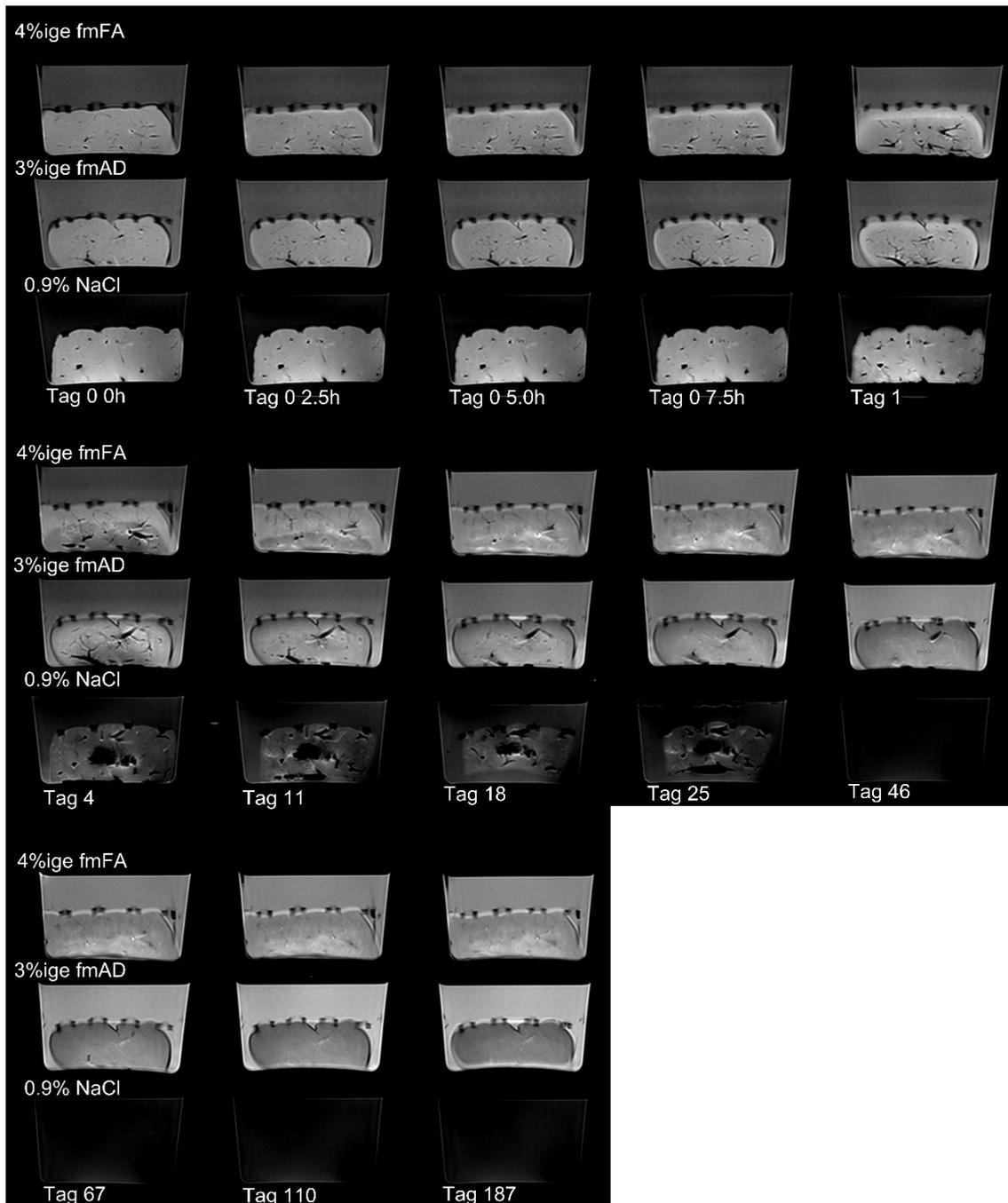
### **3.4.3 Kontrastveränderung in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung – Lebergewebe in fließmittelhaltiger Alkylderivatlösung –**

Im Zeitraum von Tag 0 0h bis Tag 0 7,5h ist in dem Lebergewebe, fixiert in der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung, eine beginnende Kontrastveränderung im oberen, rechten und linken Randbereich der Leber in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung zu erkennen. Der kontrastveränderte Rand nimmt innerhalb von 7,5h an Tag 0 zu, ab 5,0h nach dem Einlegen in die Fixierlösung ist ein kontrastveränderter Bereich zu erkennen. Dieser hat nach 7,5h weiter zugenommen. An Tag 1 hat die kontrastveränderte Randbildung weiterhin zugenommen und ist klar vom darunterliegenden Lebergewebe abzugrenzen. An Tag 4 ist ca. die Hälfte des Lebergewebes von der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung diffus durchdrungen, die kontrastveränderte Randbildung hat weiter zugenommen. An Tag 11 ist das ganze Lebergewebe von der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung durchdrungen. An Tag 18 und Tag 25 ist der äußere Rand des Lebergewebes

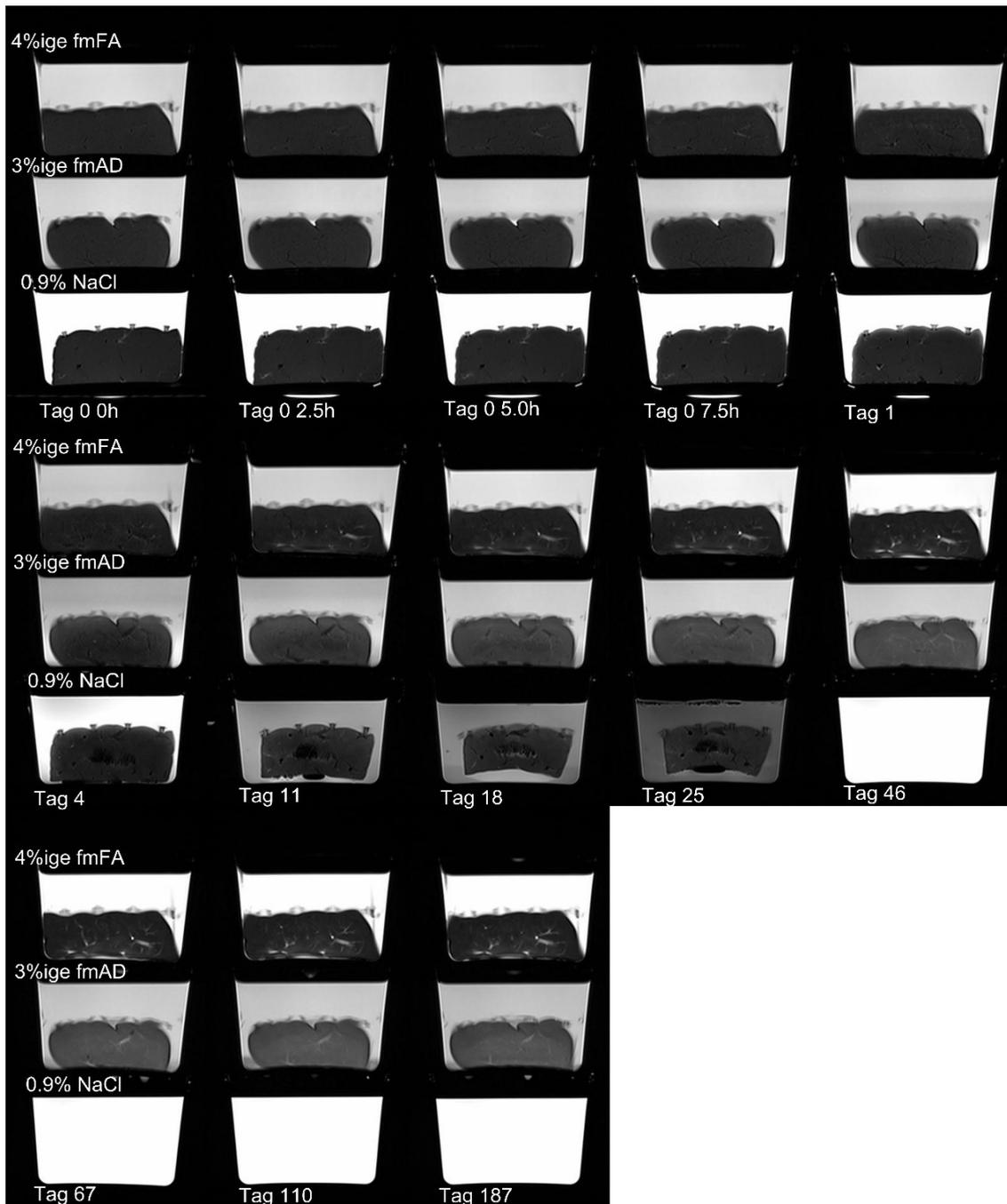
dunkler als das restliche Lebergewebe. An Tag 46 hat der dunklere Randbereich zugenommen und das zentrale Lebergewebe ist heller als der Randbereich. Von Tag 67 bis Tag 187 ist der zentrale Bereich der Leber dunkler geworden.

#### **3.4.4 Kontrastveränderung in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung – Lebergewebe in NaCl-Lösung –**

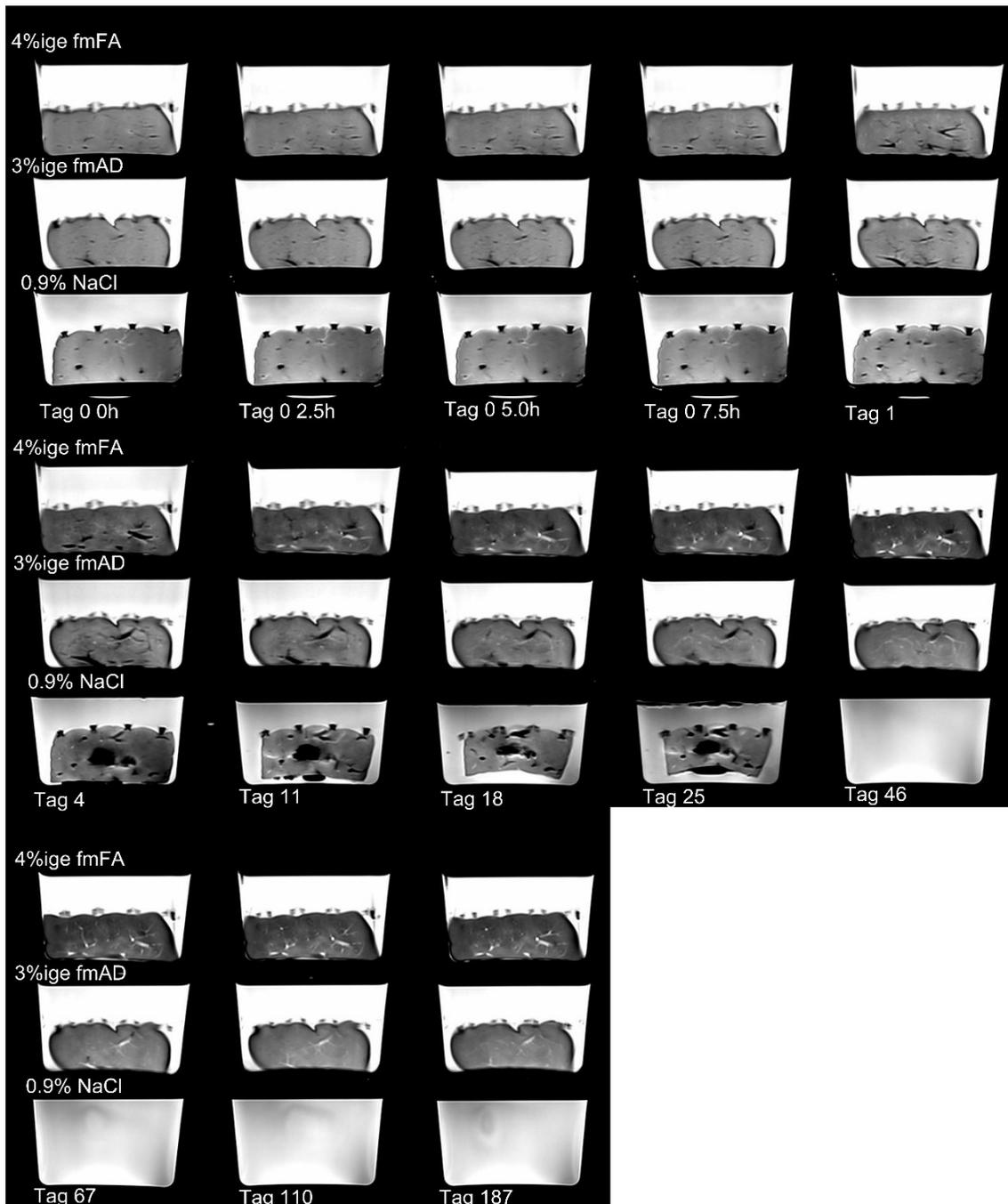
Das Lebergewebe, eingelegt in der NaCl-Lösung, ändert sein Kontrastverhalten über die Zeit nicht. Ab Tag 4 ist zentral in der Leber ein dunkler Bereich zu erkennen, der an Tag 11, Tag 18 und Tag 25 ebenfalls vorhanden ist. An Tag 11 und 25 ist am Boden des Lebergewebes ein weiterer dunkler Bereich zu erkennen. Der Referenzversuch des eingelegten Lebergewebes in NaCl-Lösung, konnte nach dem 25. Tag aufgrund von Maden- und Fäulnisgasentwicklung nicht fortgeführt werden.



**Abb. 22:** T<sub>1</sub>-gewichtete Bildgebung der Lebergewebe  
 Dargestellt sind die T<sub>1</sub>-gewichteten Bilder der fixierten Lebergewebe über den Messzeitraum von 187 Tagen. Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.



**Abb. 23:** T<sub>2</sub>-gewichtete Bildgebung der Lebergewebe  
 Dargestellt sind die T<sub>2</sub>-gewichteten Bilder der fixierten Lebergewebe über den Messzeitraum von 187 Tagen. Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.



**Abb. 24:** PD-gewichtete Bildgebung der Lebergewebe  
 Dargestellt sind die PD-gewichteten Bilder der fixierten Lebergewebe über den Messzeitraum von 187 Tagen. Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.

### 3.4.5 Quantitative Messungen der $T_1$ Relaxationszeiten und deren Veränderungen

Die Ergebnisse zu  $T_1$  in den Lebergeweben und den Fixierlösungen sind in der Abbildung 25, Tabelle 15 und Abbildung 26 dargestellt. Für den genaueren Verlauf der Relaxationszeitveränderung wurden in den  $T_1$ -Maps ROIs, orientierend an den Voxelpositionen der Spektrenaufnahmen, in den Fixierlösungen, dem Lebergeweberand und der Lebergewebemitte gewählt, siehe Abbildung 25. Die beschriebene ROI Auswahl gilt auch für die Ergebnisse zu  $T_2$ , MTR und ADC. Über die Zeit zeigt sich ein Verlauf des Eindringens der Fixiermittel in den Lebergewebe, die in die Fixierlösungen eingelegt wurden. Eine Randbildung durch das Eindringen der Fixiermittel ist zu erkennen. Die Fixiermittel dringen sowohl von oben als auch von rechts und links in die Lebergewebe ein, siehe Abbildung 26.  $T_1$  verändert sich mit dem Eindringen der Fixierlösungen im Lebergewebe und in den Fixierlösungen über den Messzeitraum von 187 Tagen, siehe Tabelle 15.

In der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung nimmt  $T_1$  in der ROI über die Zeit stetig ab.

$T_1$  in der formaldehydfixierten Leber nimmt sowohl in der ROI am Leberrand als auch in der Lebermitte über die Zeit ab. Am Leberrand ist ein sprunghafter  $T_1$  Abfall von Tag 0 7,5h auf Tag 1 zu erkennen. Ab Tag 1 bleibt  $T_1$  in der ROI am Leberrand, bis zur letzten Messung an Tag 187, bei konstanten Werten. Die sprunghafte Abnahme von  $T_1$  ist in der ROI in der Lebermitte von Tag 4 auf Tag 11 zu erkennen. Ab Tag 11 bleibt  $T_1$  in der Lebermitte ebenfalls konstant.  $T_1$  in der ROI am Leberrand und in der Lebermitte hat über alle Messungen hinweg vergleichbare  $T_1$  Werte und bleibt nach dem jeweiligen  $T_1$  Abfall bei konstanten Werten.

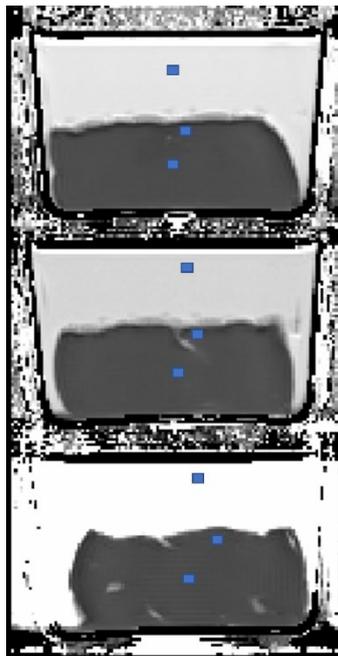
In der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung liegt  $T_1$  in der ROI von Tag 0 0h bis Tag 0 7,5h bei relativ konstant Werten. Ab Tag 1 bis zu Tag 187 nimmt  $T_1$  in der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung kontinuierlich ab.

$T_1$  in der ROI der alkylderivatfixierten Leber nimmt am Leberrand von Tag 0 0h bis zum Tag 1 kontinuierlich ab. Ab dem Tag 4 steigt  $T_1$  leicht an und erreicht ab Tag 11 bis zum Tag 187 ein vergleichsweise konstantes Werteplateau. In der

ROI in der Lebermitte hat  $T_1$  von Tag 0 0h bis Tag 0 7,5h relativ konstante Werte. Ab Tag 1 bis zu Tag 11 fallen die  $T_1$  Werte ab und steigt von Tag 18 bis zu Tag 187 kontinuierlich wieder an.

In der NaCl-Lösung liegt  $T_1$  in der ROI von Tag 0 0h bis Tag 1 bei ähnlichen  $T_1$  Werten. Ab Tag 4 bis zu Tag 25 nimmt die  $T_1$ -Relaxationszeit in der NaCl-Lösung ab.

$T_1$  in der ROI der NaCl-fixierten Leber liegt von Tag 0 0h bis zu Tag 0 7,5h bei annähernd gleichbleibenden  $T_1$  Werten. Ab dem Tag 1 bis zum Tag 25 steigt  $T_1$  stetig an. In der ROI in der Lebermitte liegt  $T_1$  von Tag 0 0h bis Tag 1 bei ähnlichen Werten. Ab Tag 4 bis zu Tag 25 steigt  $T_1$  kontinuierlich an.

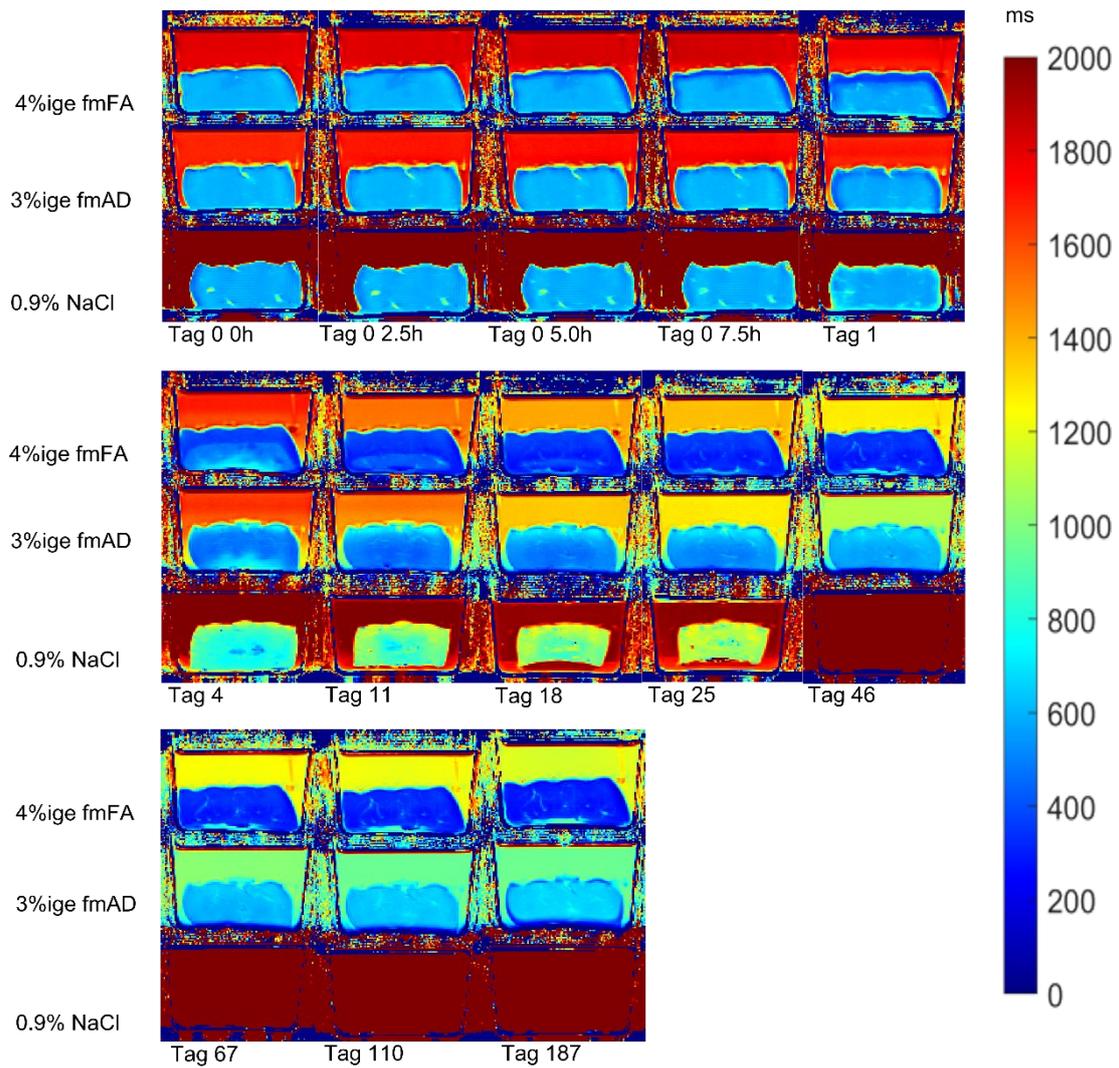


**Abb. 25:** Schematische ROI Auswahl zur Bestimmung von  $T_1$ ,  $T_2$ , des Magnetisierungstransfers und des Diffusionskoeffizienten

Die Abbildung zeigt die schematische Auswahl der ROIs für die Bestimmung der  $T_1$  und  $T_2$ , des Magnetisierungstransfers und des Diffusionskoeffizienten.

**Tab. 15:** T<sub>1</sub> (in ms) gewählter Regions of Interest (ROI)

<b>ROI Position</b>	<b>Tag 0 0h</b>	<b>Tag 0 2,5h</b>	<b>Tag 0 5,0h</b>	<b>Tag0 7,5h</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 4</b>	<b>Tag 11</b>
fließmittelhaltige Formaldehydlösung	1806	1809	1820	1829	1763	1689	1522
Leberrand	556	524	467	429	380	387	378
Lebermitte	589	589	585	592	587	570	339
Fließmittelhaltige Alkylderivatlösung	1675	1704	1720	1735	1698	1645	1525
Leberrand	585	572	551	543	490	569	690
Lebermitte	596	601	609	605	584	512	448
NaCl-Lösung	3100	3189	3299	3498	3210	2495	2014
Leberrand	569	590	575	581	609	949	1087
Lebermitte	576	596	585	599	572	741	829
<b>ROI Position</b>	<b>Tag 18</b>	<b>Tag 25</b>	<b>Tag 46</b>	<b>Tag 67</b>	<b>Tag 110</b>	<b>Tag 187</b>	
fließmittelhaltige Formaldehydlösung	1412	1366	1280	1234	1210	1154	
Leberrand	381	368	375	357	354	311	
Lebermitte	331	333	351	346	349	334	
fließmittelhaltige Alkylderivatlösung	1345	1274	1102	1008	952	954	
Leberrand	675	682	655	640	647	664	
Lebermitte	480	522	576	606	656	695	
NaCl-Lösung	1960	1973					
Leberrand	1161	1141					
Lebermitte	949	977					



**Abb. 26:** T<sub>1</sub>-Maps der Lebergewebe in den Fixierlösungen über den gesamten Messzeitraum. Gezeigt sind die T<sub>1</sub>-Maps der Lebergewebe in den fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen sowie der Referenzversuch mit 0,9%iger NaCl-Lösung, von oben nach unten. Von links nach rechts ist der Verlauf in Tagen gezeigt. Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.

### 3.4.6 Quantitative Messungen der T<sub>2</sub> Relaxationszeiten und deren Veränderungen

Die Ergebnisse zu T<sub>2</sub> in den Lebergeweben und den Fixierlösungen sind in der Tabelle 16 und in der Abbildung 27 dargestellt. Eine Randbildung durch das Eindringen der Fixiermittel ist zu erkennen. T<sub>2</sub> verändert sich mit dem Eindringen der Fixierlösungen im Lebergewebe über die Zeit und in den Fixierlösungen selbst verändert sich T<sub>2</sub> ebenfalls.

T<sub>2</sub> in der ROI der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung steigt in den ersten 2,5h an Tag 0 an und liegt nach 5,0h und 7,5h an Tag 0 bei relativ konstanten T<sub>2</sub> Werten. An Tag 1 fällt T<sub>2</sub> ab und steigt ab Tag 4 bis Tag 187 kontinuierlich an.

In der formaldehydfixierten Leber nimmt T<sub>2</sub> in der ROI am Leberrand von Tag 0 0h bis zu Tag 11 kontinuierlich zu. Ab Tag 18 nimmt T<sub>2</sub> bis zu Tag 187 ab, wobei von Tag 46 bis Tag 110 ein konstantes T<sub>2</sub> besteht. In der ROI in der Lebermitte liegt T<sub>2</sub> von Tag 0 0h bis zu Tag 0 7,5h bei ähnlichen Werten. An Tag 1 und Tag 4 sinken die Werte ab und nehmen von Tag 11 bis zu Tag 67 kontinuierlich zu. Von Tag 110 bis Tag 187 nimmt T<sub>2</sub> wieder ab.

T<sub>2</sub> in der ROI der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung steigt von Tag 0 0h innerhalb von 2,5h an und bleibt bis an Tag 0 7,5h konstant. An Tag 1 und Tag 4 sinkt T<sub>2</sub> ab. Von Tag 11 bis Tag 25 steigt T<sub>2</sub> wieder an und fällt von Tag 46 bis zu Tag 187 kontinuierlich ab.

In der alkylderivatfixierten Leber nimmt T<sub>2</sub> in der ROI am Leberrand von Tag 0 0h bis zum Tag 18 kontinuierlich zu. Ab dem Tag 25 sinkt T<sub>2</sub> leicht und bleibt bis zum Tag 187 vergleichsweise konstant. In der ROI in der Lebermitte liegt T<sub>2</sub> von Tag 0 0h bis Tag 1 bei konstanten Werten. An Tag 4 sinkt T<sub>2</sub> einmalig ab und steigt von Tag 4 bis Tag 187 kontinuierlich an.

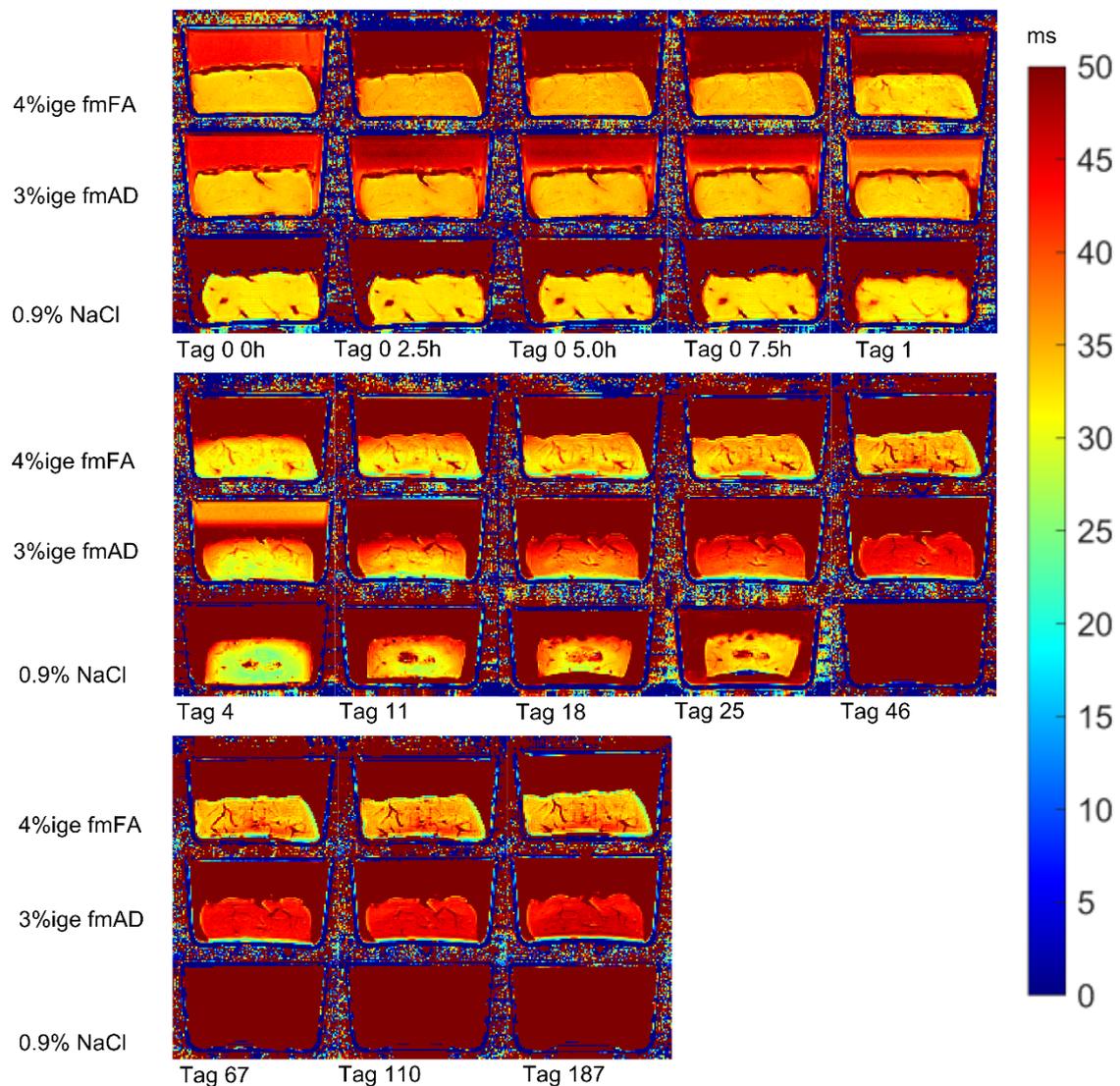
T<sub>2</sub> in der ROI der NaCl-Lösung steigt von Tag 0 0h bis Tag 1 kontinuierlich an und sinkt an Tag 1 ab. Ab Tag 4 bis Tag 25 sinkt T<sub>2</sub> kontinuierlich.

In dem NaCl-fixierten Lebergewebe liegt T<sub>2</sub> in der ROI am Leberrand von Tag 0 0h bis zu Tag 0 7,5h nahezu bei konstanten Werten. Ab dem Tag 1 steigt T<sub>2</sub> bis zum Tag 18 kontinuierlich an und fällt an Tag 25 ab. In der ROI in der Lebermitte

liegt  $T_2$  von Tag 0 0h bis Tag 1 bei gleichbleibenden Werten. An Tag 4 sinkt  $T_2$  ab und steigt ab Tag 11 bis zu Tag 25 kontinuierlich an.

**Tab. 16:**  $T_2$  (in ms) gewählter Regions of Interest (ROI)

<b>ROI Position</b>	<b>Tag 0 0h</b>	<b>Tag 0 2,5h</b>	<b>Tag 0 5,0h</b>	<b>Tag 0 7,5h</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 4</b>	<b>Tag11</b>
fließmittelhaltige Formaldehydlösung	42	53	53	51	47	51	66
Leberrand	32	35	34	35	36	39	39
Lebermitte	33	34	34	34	32	31	33
fließmittelhaltige Alkylderivatlösung	43	47	47	46	40	35	50
Leberrand	33	34	34	35	36	40	44
Lebermitte	33	34	34	33	33	30	33
NaCl-Lösung	617	663	666	702	868	294	102
Leberrand	32	31	32	32	33	38	44
Lebermitte	32	32	32	32	31	26	31
<b>ROI Position</b>	<b>Tag 18</b>	<b>Tag 25</b>	<b>Tag 46</b>	<b>Tag 67</b>	<b>Tag 110</b>	<b>Tag 187</b>	
fließmittelhaltige Formaldehydlösung	84	98	122	130	138	141	
Leberrand	37	36	34	34	34	32	
Lebermitte	35	37	40	42	37	36	
fließmittelhaltige Al- kylderivatlösung	71	77	77	72	69	67	
Leberrand	45	44	44	43	43	43	
Lebermitte	37	39	42	42	44	46	
NaCl-Lösung	82	51					
Leberrand	43	35					
Lebermitte	37	39					



**Abb. 27:** T<sub>2</sub>-Maps der Lebergewebe in den Fixierlösungen über den gesamten Messzeitraum. Gezeigt sind die T<sub>2</sub>-Maps der Lebergewebe in den fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen sowie der Referenzversuch mit 0,95%iger NaCl-Lösung, von oben nach unten. Von rechts nach links ist der Verlauf in Tagen gezeigt. Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.

### **3.4.7 Effekte der Fixierungen auf den Magnetisierungstransfer**

Die Ergebnisse zu den Effekten des Magnetisierungstransfers in den Lebergeweben und den Fixierlösungen sind in Tabelle 17 und Abbildung 28 dargestellt. Die Magnetisierungstransferratio (MTR) verändert sich im Verlauf des Eindringens der Fixiermittel über den Messzeitraum. Die Magnetisierungstransferratio ist einheitslos.

Die MTR in der ROI der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung bleibt von Tag 0 0h bis zu Tag 1 konstant. Ab Tag 4 steigen die Werte an.

Die MTR im formaldehydfixierten Lebergewebe nimmt in der ROI am Leberrand, von Tag 0 0h bis zu Tag 11 kontinuierlich ab. Von Tag 18 bis Tag 46 nimmt die MTR zu und sinkt von Tag 67 bis zu Tag 187 wieder ab. In der ROI in der Lebermitte bleibt die MTR von Tag 0 0h bis zu Tag 4. Ab Tag 11 sinkt die MTR ab und liegt bis zu Tag 187 zwischen annähernd konstanten Werten.

Die MTR in der ROI der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung liegt von Tag 0 0h bis Tag 0 7,5h bei relativ konstanten Werten. Ab Tag 1 bis zu Tag 187 steigt die MTR kontinuierlich an.

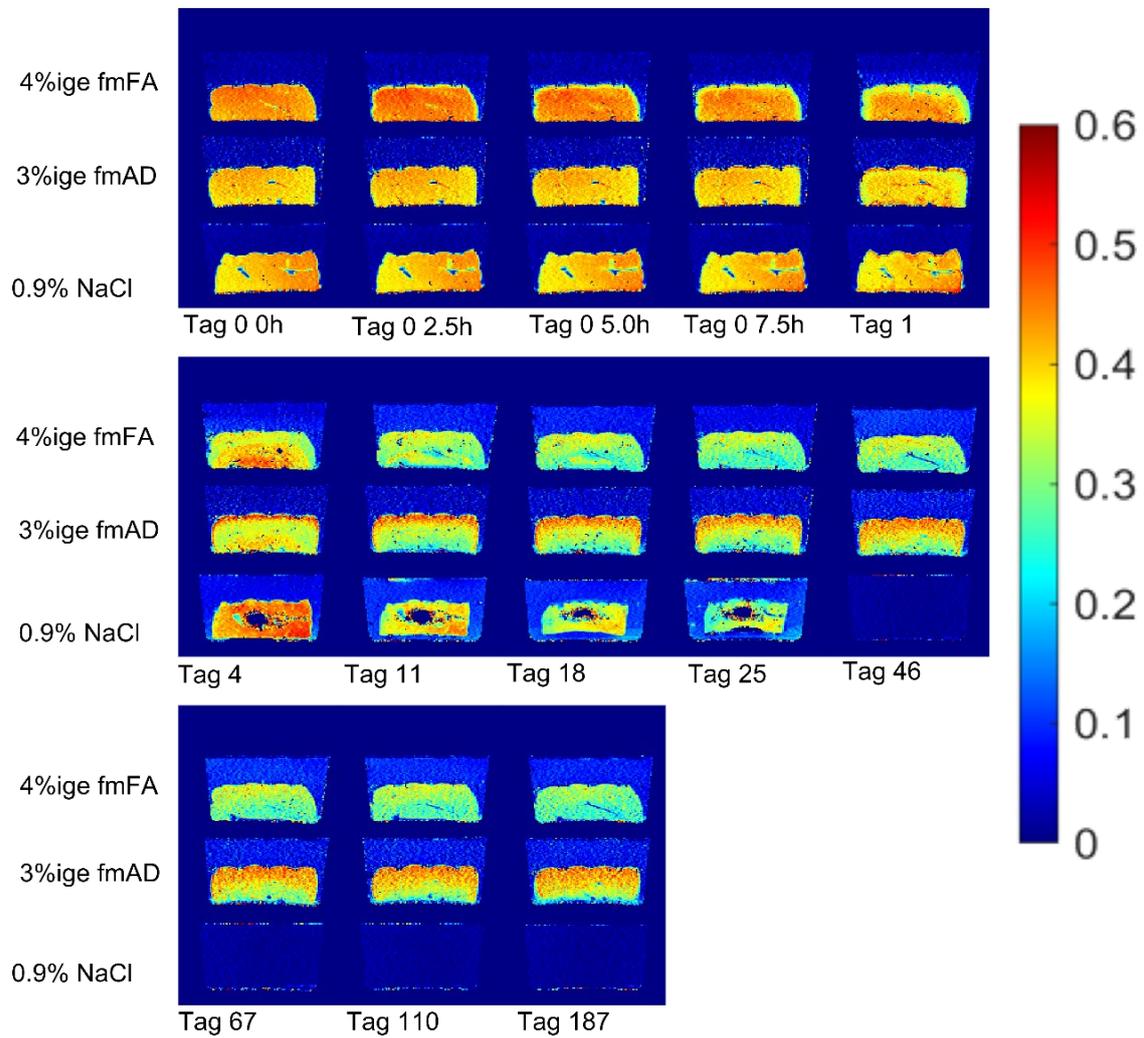
Die MTR in der ROI der alkylderivatfixierten Leber nimmt am Leberrand von Tag 0 0h bis zum Tag 1 kontinuierlich ab. Von Tag 4 bis zu Tag 187 bleiben die Werte konstant. In der ROI in der Lebermitte sinkt die MTR von Tag 0 0h bis Tag 4 kontinuierlich ab. Von Tag 11 bis Tag 25 bildet sich ein stabiles Plateau der MTR. Ab dem Tag 46 steigt die MTR an.

Die MTR in der ROI der NaCl-Lösung liegt von Tag 0 0h bis Tag 1 zwischen Werten von 0,0077 bis 0,02. Ab Tag 4 bis Tag 25 steigt die MTR an und liegt zwischen Werten von 0,06 und 0,09.

In der NaCl-fixierten Leber liegt die MTR in der ROI am Leberrand von Tag 0 0h bis zu Tag 4 bei konstanten Werten. Ab Tag 11 bis Tag 25 fällt die MTR ab. In der ROI in der Lebermitte ist die MTR von Tag 0 0h bis Tag 1 relativ gleichbleibend. Von Tag 4 bis Tag 25 schwanken die MTR-Werte.

**Tab. 17:** Magnetisierungstransferratio (MTR) gewählter Regions of Interest (ROI)

ROI Position	Tag 0 0h	Tag 0 2,5h	Tag 0 5,0h	Tag 0 7,5h	Tag 1	Tag 4	Tag11
fließmittelhaltige Formalde- hydrlösung	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,05	0,1
Leberrand	0,43	0,43	0,4	0,38	0,35	0,35	0,34
Lebermitte	0,44	0,45	0,45	0,44	0,43	0,42	0,26
fließmittelhaltige Alkylder- ivatlösung	0,01	0,009 6	0,006 5	0,01	0,02	0,02	0,04
Leberrand	0,42	0,41	0,41	0,39	0,38	0,45	0,46
Lebermitte	0,41	0,41	0,41	0,4	0,4	0,39	0,3
NaCl Lösung	0,02	0,009 6	0,01	0,007 7	0,01	0,06	0,09
Leberrand	0,43	0,43	0,42	0,42	0,4	0,41	0,32
Lebermitte	0,42	0,42	0,42	0,42	0,41	0,33	0,17
ROI Position	Tag 18	Tag 25	Tag 46	Tag 67	Tag 110	Tag 187	
fließmittelhaltige Formalde- hydrlösung	0,09	0,06	0,11	0,1	0,1	0,09	
Leberrand	0,36	0,36	0,37	0,35	0,35	0,32	
Lebermitte	0,29	0,27	0,25	0,25	0,27	0,25	
fließmittelhaltige Alkylder- ivatlösung	0,05	0,06	0,08	0,08	0,09	0,08	
Leberrand	0,44	0,44	0,43	0,45	0,45	0,44	
Lebermitte	0,31	0,31	0,36	0,34	0,34	0,35	
NaCl Lösung	0,09	0,08					
Leberrand	0,32	0,25					
Lebermitte	0,3	0,14					



**Abb. 28:** MTR-Maps der Lebergewebe in den Fixierlösungen über die gesamte Messzeit. Gezeigt sind die MTR Werte der Lebergewebe in den fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen sowie der Referenzversuch mit 0,95%iger NaCl-Lösung, von oben nach unten. Von rechts nach links ist der Verlauf in Tagen gezeigt. Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.

### **3.4.8 Bestimmung der Wasserdiffusion und Veränderungen des Apparent Diffusion Coefficient (ADC)**

Die Ergebnisse zu der Veränderung der Diffusion in den Fixierlösungen und den Lebergeweben sind in der Tabelle 18 und in der Abbildung 29 dargestellt. Die ADC-Werte haben im Folgenden die Einheit  $10^{-6} \text{ mm}^2/\text{sec}$ .

Der ADC in der ROI der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung schwankt über den Messzeitraum und zeigen keine Kontinuität, sondern ein permanentes Ansteigen und Abfallen der Werte zu jedem nächsten Messtag.

In dem formaldehydfixierten Lebergewebe verändert sich der ADC in der ROI am Leberrand sowie in der ROI in der Lebermitte durchgehend von Tag 0 0h bis zu Tag 187. Eine Kontinuität oder Tendenzen sind dadurch nicht erkennbar.

Der ADC in der ROI der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung sinkt und steigt von Tag 0 0h bis Tag 25 bei jeder erneuten Messung. Ab Tag 46 fallen die ADC-Werte kontinuierlich ab.

In der alkylderivatfixierten Leber fällt der ADC in der ROI am Leberrand nahezu kontinuierlich bis zu Tag 11 ab. Außer an Tag 4, an diesem Tag steigt der ADC leicht an, ist von Tag 0 0h bis zu Tag 11 ein Absinken der ADC-Werte zu erkennen. Von Tag 18 bis zu Tag 187 steigen die ADC-Werte annähernd stetig an. In diesem Verlauf des Anstiegs ist allerdings an Tag 67 und an Tag 110 ein leichter Abfall der ADC-Werte zu messen. In der ROI in der Lebermitte sinkt und steigt der ADC-Wert von Tag 0 0h bis Tag 187 unregelmäßig, mit einer insgesamt sinkenden Tendenz des Wertes über den Messzeitraum.

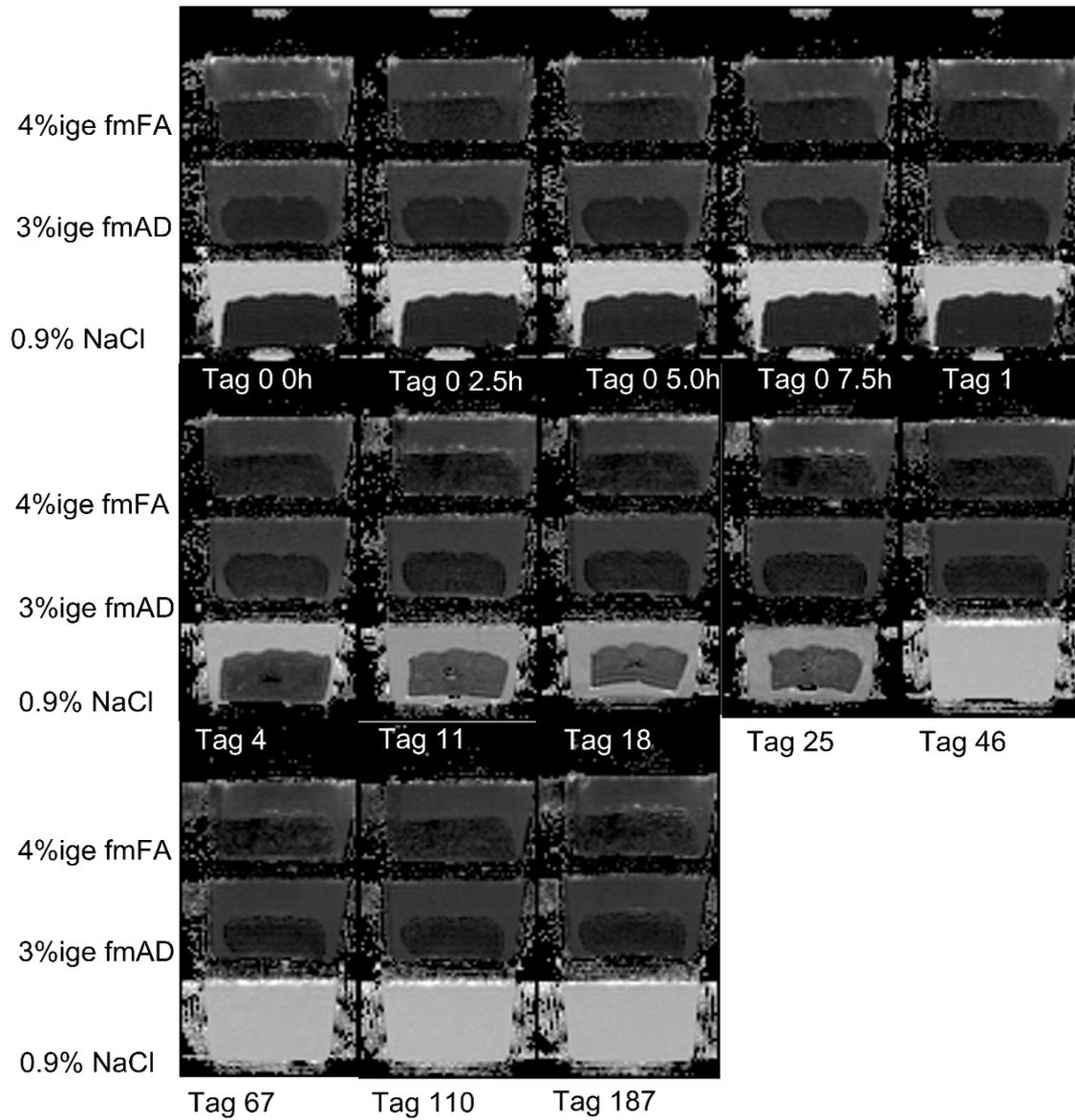
Der ADC in der ROI der NaCl-Lösung steigt innerhalb der ersten 7,5h an Tag 0 kontinuierlich an. Ab Tag 1 ist ein kontinuierlicher Abfall des ADC-Wertes bis zum letzten Messzeitpunkt erkennbar.

In dem NaCl-fixierten Lebergewebe steigt der ADC in der ROI am Leberrand von Tag 0 0h bis zu Tag 1, bis auf einen stärkeren sprunghaften Anstieg an Tag 0 2,5h, kontinuierlich an. Ab Tag 4 kommt es zu einem starken Anstieg des ADC-Wertes, dieser bleibt bis zu dem letzten Messzeitpunkt an Tag 25 gleichermaßen erhöht. In der ROI in der Lebermitte steigt der ADC innerhalb der ersten 7,5h an

Tag 0 zu jeder Messung an. An Tag 1 fällt er im Vergleich zu Tag 0 7,5h ab um ab Tag 4 bis zu Tag 18 kontinuierlich anzusteigen. Bei der letzten Messung an Tag 25 fällt der ADC in der Lebermitte um ca. die Hälfte im Vergleich zu Tag 18 ab.

**Tab. 18:** Apparent diffusion coefficient (ADC in  $10^{-6}$  mm<sup>2</sup>/sec.) ausgewählter Regions of Interest (ROI)

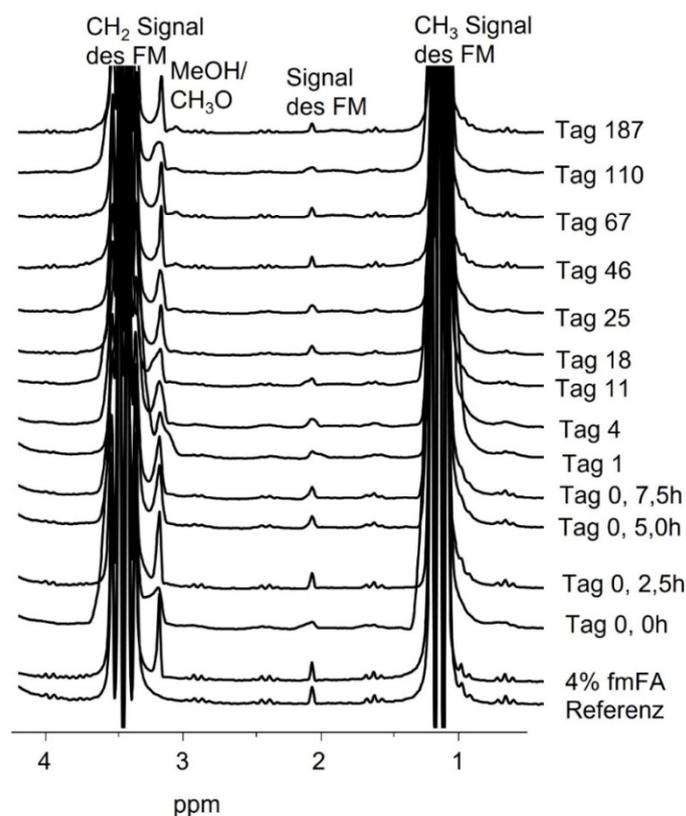
<b>ROI Position</b>	<b>Tag 0 0h</b>	<b>Tag 0 2,5h</b>	<b>Tag 0 5,0h</b>	<b>Tag 0 7,5h</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 4</b>	<b>Tag 11</b>
Fließmittelhaltige Formaldehydlösung	656	626	645	647	670	631	650
Leberrand	377	416	386	363	296	266	383
Lebermitte	394	336	328	434	318	470	322
Fließmittelhaltige Alkylderivatlösung	655	642	614	668	641	611	650
Leberrand	392	390	360	338	331	344	306
Lebermitte	411	418	391	437	383	482	416
NaCl Lösung	2159	2207	2234	2252	2143	1916	1660
Leberrand	426	501	455	452	469	934	1076
Lebermitte	378	403	407	427	364	372	514
<b>ROI Position</b>	<b>Tag 18</b>	<b>Tag 25</b>	<b>Tag 46</b>	<b>Tag 67</b>	<b>Tag 110</b>	<b>Tag 187</b>	
Fließmittelhaltige Formaldehydlösung	591	642	573	521	569	557	
Leberrand	410	547	374	458	447	560	
Lebermitte	259	265	406	288	371	345	
Fließmittelhaltige Alkylderivatlösung	641	653	595	588	581	577	
Leberrand	331	397	402	369	396	496	
Lebermitte	374	323	306	361	354	269	
NaCl Lösung	1696	1629					
Leberrand	1041	1071					
Lebermitte	938	480					



**Abb. 29:** Diffusionsbildgebung über den gesamten Messzeitraum  
 Dargestellt sind die Diffusionsbilder, die für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten genutzt wurden (verwendete b-Werte: 0 s/mm<sup>2</sup> und 1000 s/mm<sup>2</sup>). Ab Tag 46 musste der Referenzversuch in der NaCl-Lösung aufgrund von Madenentwicklung vorzeitig beendet werden.

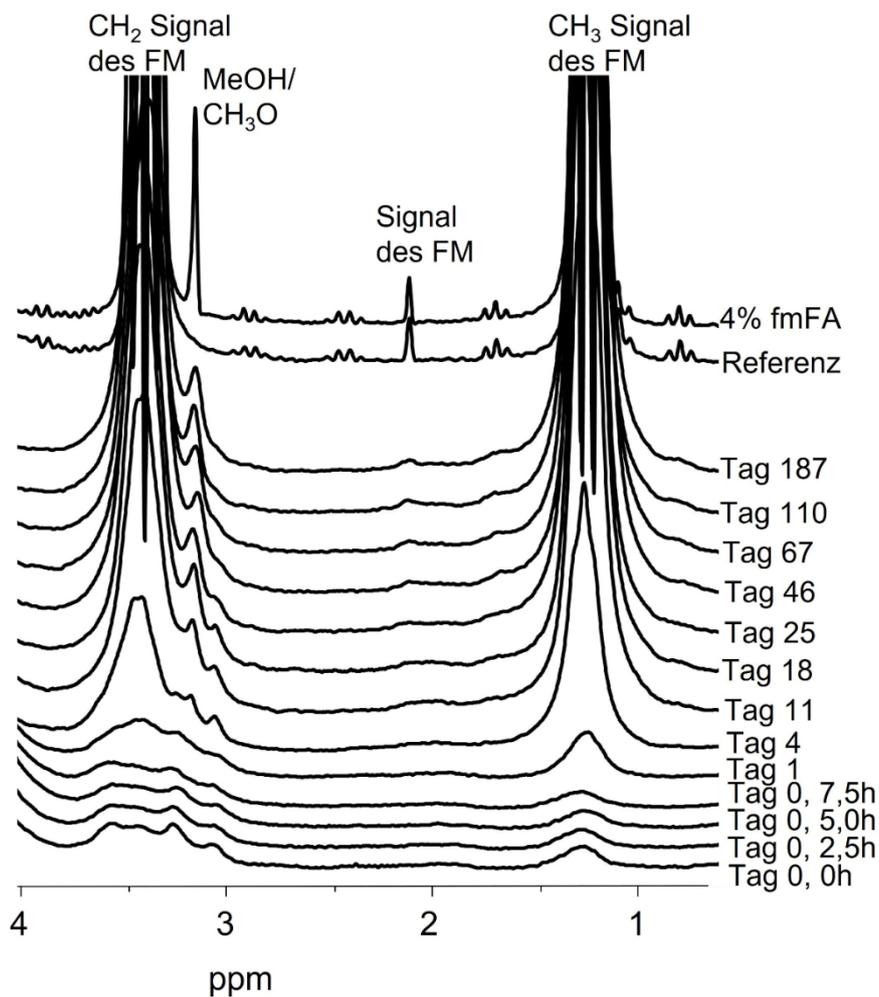
### 3.4.9 Spektroskopie der Fixierlösungen und der fixierten Lebergewebe im Verlauf

In der Abbildung 30 sind die Spektren, die in der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung aufgenommen wurden, von Tag 0 0h bis Tag 187 gezeigt. Die 30%ige H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und die 4%ige fließmittelhaltige Formaldehydlösung sind zum Vergleich des Formaldehydsignals und der Fließmittelsignale unter den Spektrenverlauf der zeitlichen Messungen über die 187 Tage gelegt. Die Spektren an Tag 0 0h, Tag 0 7,5h und Tag 110 haben durch einen schlechteren Shim eine größere Linienbreite als die Spektren an den anderen Messzeitpunkten. Die Signalintensität des Fließmittelsignals bei 2,2ppm scheint von Tag 0 bis zu Tag 187 abgenommen zu haben, ebenso wie die Signalintensität des Formaldehydsignals bei 3,3ppm.



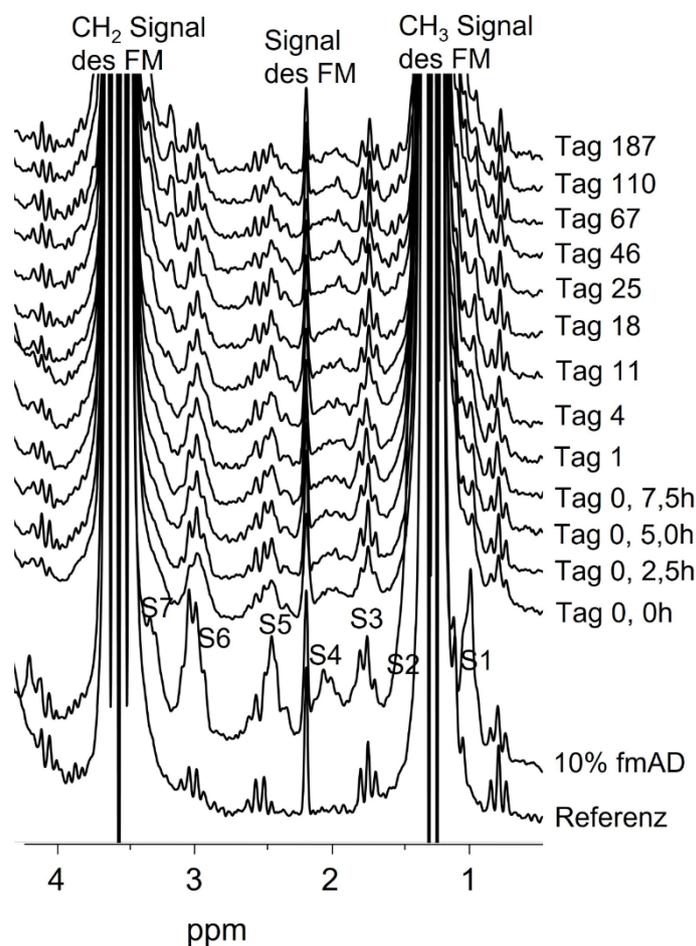
**Abb. 30:** Spektren der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung im Verlauf  
Gezeigt sind die Spektren der 4%igen fließmittelhaltigen Formaldehydlösung, in der das Lebergewebe fixiert wurde. Der zeitliche Verlauf von Tag 0 0h bis Tag 187 ist von unten nach oben gezeigt. Unter dem zeitlichen Verlauf der Spektren der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung sind zum Vergleich die 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und die 4%ige fließmittelhaltige Formaldehydlösung aufgeführt. fmFA – fließmittelhaltige Formaldehydlösung; Referenz - 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung

In der Abbildung 31 sind die Spektren, die in dem formaldehydfixierten Leberge-  
 webe aufgenommen wurden, von Tag 0 0h bis Tag 187 gezeigt. Die 30%ige-  
 H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und die 4%ige fließmittelhaltige Formalde-  
 hydylösung sind zum Vergleich des Formaldehydsignals und der Fließmittelsig-  
 nale über den Spektrenverlauf der zeitlichen Messungen über die 187 Tage ge-  
 legt. Die Signale des Fließmittels bei 1,3ppm und bei 3,5ppm nehmen ab Tag 1  
 scheinbar in der Signalintensität zu. Das Formaldehydsignal scheint bei 3,3ppm  
 ab Tag 4 in der Amplitude zuzunehmen und das Fließmittelsignal bei 2,2ppm ist  
 ab Tag 46 in den Spektren zu erkennen.



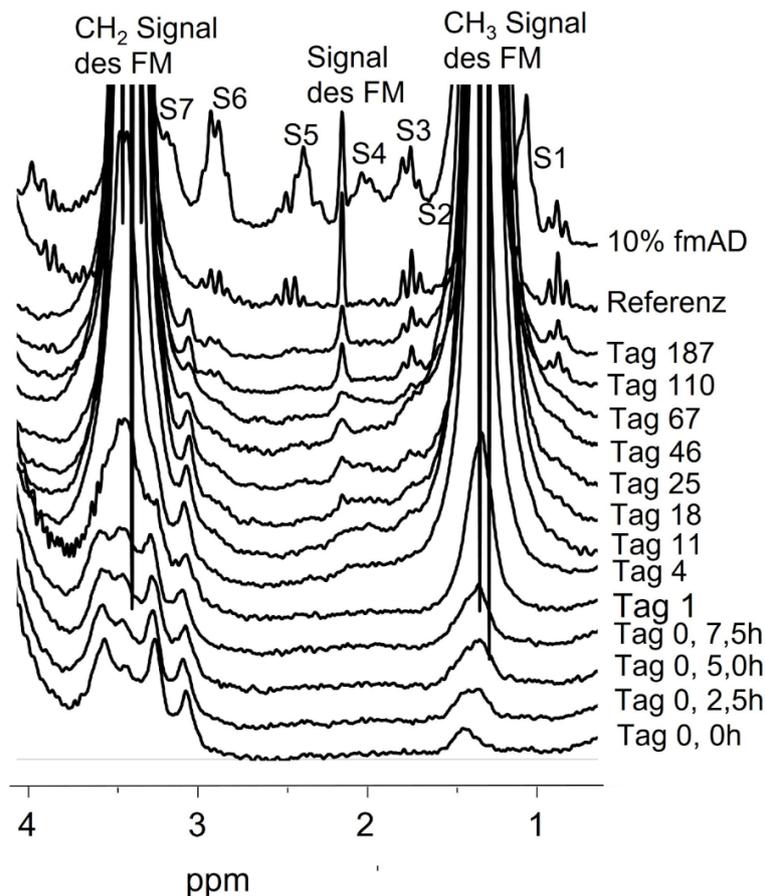
**Abb. 31:** Spektren der formaldehydfixierten Leber im Verlauf  
 Gezeigt sind die Spektren der formaldehydfixierten Leber im Verlauf. Der zeitliche Verlauf von  
 Tag 0 0h bis Tag 187 ist von unten nach oben gezeigt. Über dem zeitlichen Verlauf der Spektren  
 der formaldehydfixierten Leber sind zum Vergleich die 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lö-  
 sung und 4%ige fließmittelhaltige Formaldehydlösung aufgeführt. fmFA – fließmittelhaltige For-  
 maldehydlösung; Referenz - 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung

In der Abbildung 32 sind die Spektren, die in der fließmittelhaltigen Alkylderivat-lösung aufgenommen wurden, von Tag 0 0h bis Tag 187 gezeigt. Die 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und die 10%ige fließmittelhaltige Alkylderivat-lösung sind zum Vergleich der Alkyderivatsignale und der Fließmittelsignale unter den Spektrenverlauf der zeitlichen Messungen über die 187 Tage gelegt. Die Alkyderivatsignale bei 1,8ppm, bei 2,5ppm und bei 3,0ppm sind in der Fixier-lösung über den Messzeitraum von 187 Tagen erkennbar und scheinen in der Signalintensität, über den zeitlichen Verlauf von 187 Tagen, abzunehmen.



**Abb. 32:** Spektren der fließmittelhaltigen Alkylderivat-lösung im Verlauf  
Gezeigt sind die Spektren der 3%igen fließmittelhaltigen Alkylderivat-lösung, in der das Leberge-webe fixiert wurde. Der zeitliche Verlauf von Tag 0 0h bis Tag 187 ist von unten nach oben ge-zeigt. Unter dem zeitlichen Verlauf der Spektren der 3%igen fließmittelhaltigen Alkylderivat-lösung sind zum Vergleich die 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und 10%ige fließmittelhaltige Alkylderivat-lösung aufgeführt. fmAD – fließmittelhaltige Alkylderivat-lösung; Referenz - 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung

In der Abbildung 33 sind die Spektren, die in der alkyderivatfixierten Leber aufgenommen wurden, von Tag 0 0h bis Tag 187 gezeigt. Die 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und die 10%ige fließmittelhaltige Alkyderivatlösung sind zum Vergleich der Alkyderivatsignale und der Fließmittelsignale über den Spektrungsverlauf der zeitlichen Messungen über die 187 Tage gelegt. Die Signale des Fließmittels scheinen bei 1,3ppm ab Tag 0 2,5h zuzunehmen und das Fließmittelsignal bei 3,5ppm ab Tag 4 in der Signalintensität zuzunehmen. Das Fließmittelsignal bei 2,2ppm nimmt ab Tag 18 scheinbar in der Amplitude zu. Die Alkyderivatsignale bei 0,8ppm, bei 1,7ppm und bei 2,8ppm sind ab Tag 110 in den Spektren zu erkennen.



**Abb. 33:** Spektren der alkyderivatfixierten Leber im Verlauf

Gezeigt sind die Spektren der alkyderivatfixierten Leber im Verlauf. Der zeitliche Verlauf von Tag 0 0h bis Tag 187 ist von unten nach oben gezeigt. Über dem zeitlichen Verlauf der Spektren der alkyderivatfixierten Leber sind zum Vergleich die 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung und 10%ige fließmittelhaltige Alkyderivatlösung aufgeführt. fmAD – fließmittelhaltige Alkyderivatlösung; Referenz - 30%ige-H<sub>2</sub>O-70%ige-fließmittelhaltige Lösung

### 3.5 Histologische Aufarbeitung

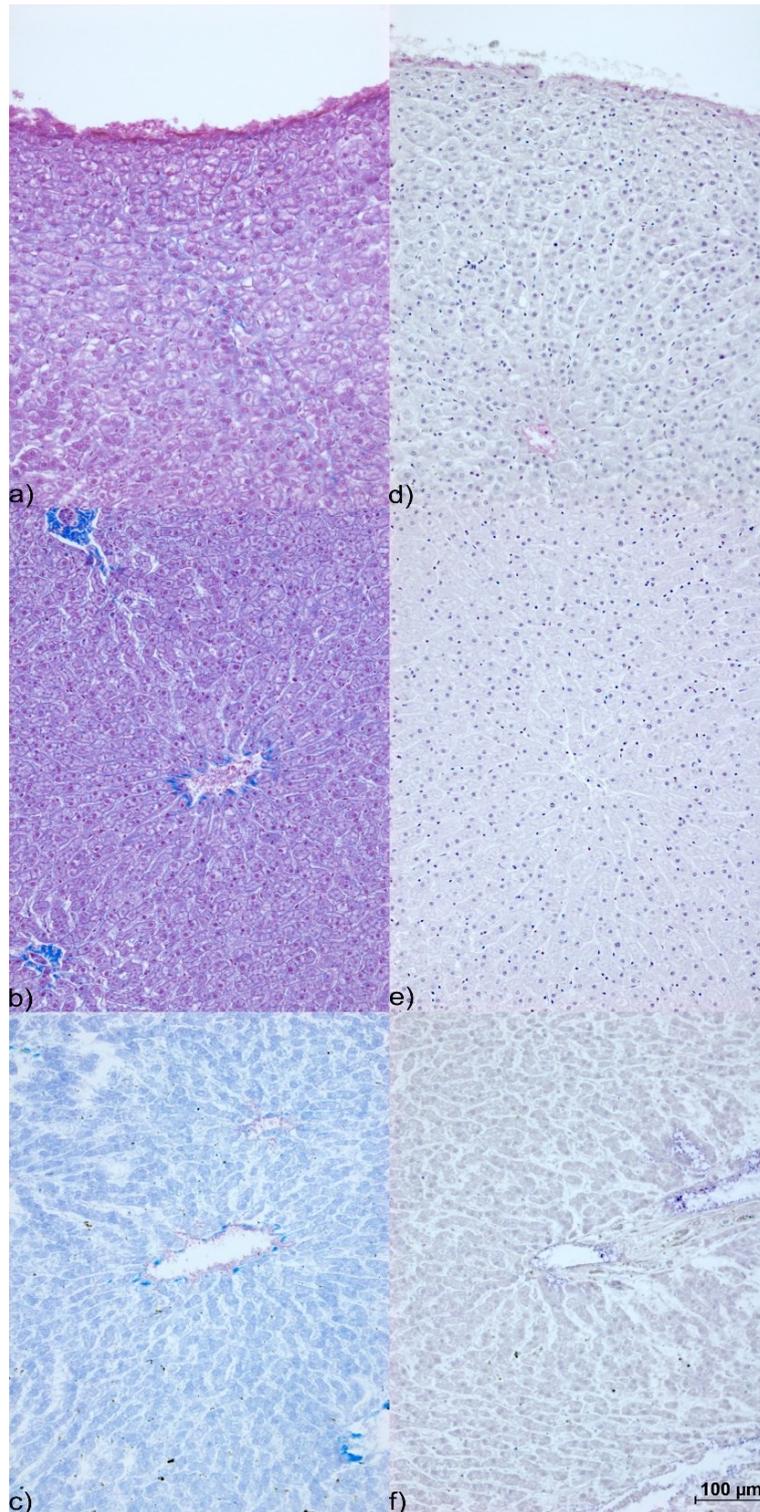
In der histologischen Aufarbeitung wurden die fixierten Lebergewebe mit der Azan- und Hämatoxylin-Eosinfärbung angefärbt. Die Ergebnisse der Färbungen sind in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt. In den Abbildungen sind die herausvergrößerten Zellen im Lebergewebe von oben nach unten dargestellt. Das oberste Bild repräsentiert den oberen Bereich des Lebergewebes, das mittlere Bild den Bereich in der Lebermitte und das untere Bild den unteren Teil des Lebergewebes.

Die Azanfärbung des formaldehydfixierten Lebergewebes zeigt im oberen und mittleren Bereich des Lebergewebes mit Azan angefärbte erhaltene Leberzellen und Zellkerne, (siehe Abbildung 34a) und b). Die in Bälkchen<sup>3</sup> angeordnete Struktur der Leberzellen ist im oberen und unteren Bereich des Lebergewebes erkennbar. Im mittleren Bild des Lebergewebes ist eine Zentralvene zu erkennen sowie die radiär darauf zu laufenden Leberzellbälkchen. In Abbildung 34c) ist der untere Bereich des Lebergewebes dargestellt. Die Zellen sind schwach gefärbt. Eine Zentralvene ist in der Mitte des Bildes zu erkennen und die radiäre Ausrichtung der Leberzellbälkchen auszumachen. Die Leberzellen sind weniger dicht angeordnet, die Zellkerne kaum angefärbt.

In der Hämatoxylin-Eosinfärbung (H.E.) des formaldehydfixierten Lebergewebes sind im oberen Bereich des Lebergewebes H.E.-angefärbte erhaltene Leberzellen und Zellkerne zu erkennen. Eine Zentralvene mit radiär darauf zulaufenden Leberzellbälkchen ist zu erkennen, (siehe Abbildung 34d). Im mittleren Bereich der Leber ist im zentralen Bereich des Bildes eine Zentralvene, mit radiär darauf zulaufenden Leberzellen zu erkennen. Die Leberzellen und Zellkerne sind mit H.E. angefärbt und die Zellen sind erhalten, (siehe Abbildung 34e). Im unteren Bereich des Lebergewebes ist mittig im Bild eine Zentralvene zu erkennen, die Leberzellbälkchen laufen radiär auf die Zentralvene zu. Die Zellen sind weniger dicht angeordnet, die Zellkerne sind nicht stark angefärbt und die Leberzellen wirken aufgelockert, (siehe Abbildung 34f).

---

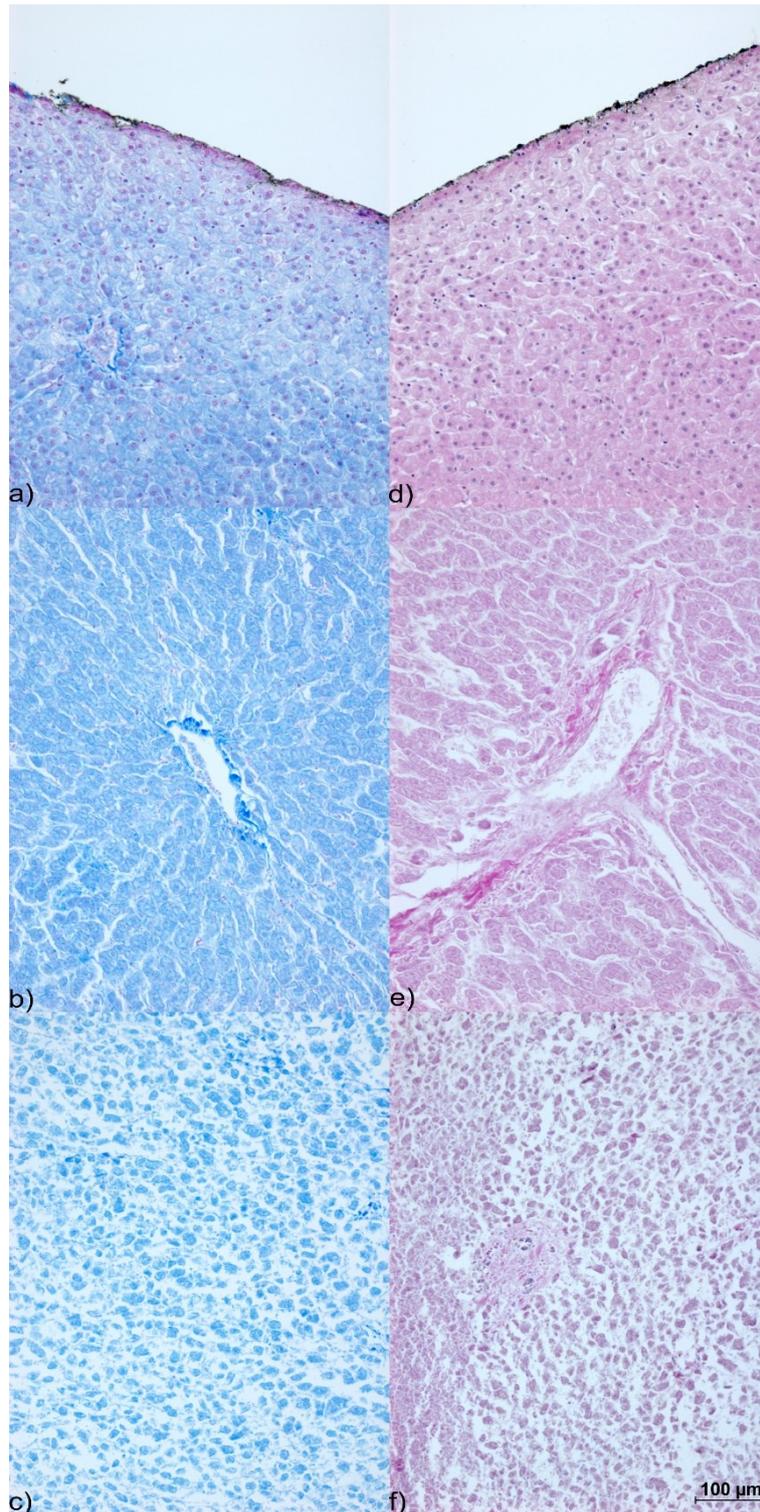
<sup>3</sup> Leberzellbälkchen – hintereinander liegende, in Reihen angeordnete Leberzellen



**Abb. 34:** Azan- und Hämatoxylin-Eosinfärbung der formaldehydfixierten Leber  
a), b) und c) zeigen das formaldehydfixierte Lebergewebe in der Azanfärbung. a) repräsentiert das obere Drittel des Lebergewebes, b) das mittlere Drittel und c) das untere Drittel. d), e) und f) zeigen das formaldehydfixierte Lebergewebe in der H.E.-Färbung. d) repräsentiert das obere Drittel des Lebergewebes, e) das mittlere Drittel und f) das untere Drittel.

Die Azanfärbung des alkylderivatfixierten Lebergewebes zeigt im oberen Bereich des Lebergewebes mit Azan angefärbte erhaltene Leberzellen und Zellkerne sowie eine Zentralvene, die von radiär angeordneten Leberzellbälkchen umgeben ist, (siehe Abbildung 35a). Im mittleren Bereich des Lebergewebes ist eine Zentralvene in der Mitte des Bildes zu erkennen. Die Leberzellbälkchen sind radiär um die Zentralvenen angeordnet. Die Leberzellen sind weniger dicht angeordnet, schwächer gefärbt und wenige Zellkerne sind erkennbar, (siehe Abbildung 35b). Im unteren Bereich des Lebergewebes sind die Leberzellen aufgelockert, Leberzellbälkchen und Zellkerne sind nicht zu erkennen, (siehe Abbildung 35c).

In der Hämatoxylin-Eosinfärbung (H.E.) des alkylderivatfixierten Lebergewebes sind im oberen Bereich angefärbte, erhaltene Leberzellen und Zellkerne sowie die Anordnung der Leberzellbälkchen zu erkennen. Am oberen Rand ist die schwarze Tuschemarkierung zu erkennen, (siehe Abbildung 35d). Im mittleren Bereich des Lebergewebes ist mittig im Bild eine Zentralvene zu erkennen, die von Leberzellbälkchen umgeben ist. Die Zellen sind weniger dicht gelagert, die Zellkerne sind nicht angefärbt und die Zellen wirken aufgelockert, (siehe Abbildung 35e). Im unteren Bild des Lebergewebes sind keine Leberzellbälkchen und Zellkerne zu erkennen. Die Zellen sind komplett aufgelockert und bilden keine Einheit mehr, (siehe. Abbildung 35f).



**Abb. 35:** Azan- und Hämatoxylin-Eosinfärbung der alkylderivatfixierten Leber  
 a), b) und c) zeigen das alkylderivatfixierte Lebergewebe in der Azanfärbung. a) repräsentiert das obere Drittel des Lebergewebes, b) das mittlere Drittel und c) das untere Drittel. d), e) und f) zeigen das alkylderivatfixierte Lebergewebe in der H.E.-Färbung. d) repräsentiert das obere Drittel des Lebergewebes, e) das mittlere Drittel und f) das untere Drittel.

## 4. Diskussion

### 4.1 Experiment 1 – Relaxationszeiten wässriger und fließmittelhaltiger Fixierlösungen –

$T_1$  und  $T_2$  der wässrigen Formaldehydlösung nehmen mit steigender Konzentration des Formaldehyds ab, wobei in der Verdünnungsreihe die Erhöhung der Formaldehydkonzentration eine Abnahme der hinzufügbaren Wassermenge zu Folge hat. Reines Wasser beeinflusst  $T_1$  und  $T_2$  insofern, dass bei zunehmender Wasserkonzentration in den Lösungen  $T_1$  und  $T_2$  ansteigen. Dadurch ist erklärbar, dass bei abnehmender Wasserkonzentration die Relaxationszeiten abnehmen. Zudem zeigen Rivlin et al. (9), dass ein chemischer Austausch der Hydroxylprotonen des Methylenglykols aus dem Formaldehyd mit Wasser eine Reduktion von  $T_2$  zur Folge hat, dabei war  $T_1$  zu den Werten von Wasser vergleichbar (9).

In der wässrigen Alkylderivatlösung nehmen  $T_1$  und  $T_2$  mit steigender Alkylderivatkonzentration ebenfalls ab. Die Erhöhung der Alkylderivatkonzentration in der Verdünnungsreihe hat eine Abnahme der hinzufügbaren Wassermenge zu Folge. Dadurch sind die abnehmenden Relaxationszeiten bei steigenden Alkylderivatkonzentrationen erklärbar. Ein chemischer Austausch von Wasser mit chemischen Strukturen des Alkylderivats kann nur vermutet werden. Analog zu Rivlin et al. (9) ist ein chemischer Austausch von Wasser mit chemischen Gruppen im Alkylderivat möglich, wodurch die abnehmenden  $T_2$ -Werte bei steigender Alkylderivatkonzentration zusätzlich erklärbar wären (9).

Im Vergleich zu  $T_1$  der wässrigen Formaldehydlösung ist  $T_1$  der 4%igen fließmittelhaltigen Formaldehydlösung deutlich reduziert. Dies ist durch den hohen Fließmittelgehalt in der Lösung erklärbar. Die  $T_1$  der 4%igen fließmittelhaltigen Formaldehydlösung ist im Vergleich zur 30%igen-H<sub>2</sub>O-70%igen-fließmittelhaltigen Referenzlösung nicht reduziert. Dementsprechend bleibt es unklar, ob die Veränderung von  $T_1$  nur von dem Fließmittel ausgeht oder ob das Formaldehyd hierbei ebenfalls eine Rolle spielt.

$T_2$  der 4%igen fließmittelhaltigen Formaldehydlösung ist im Vergleich zu destilliertem Wasser um mehr als die Hälfte reduziert. Dies erklärt sich durch einen

möglichen chemischen Austausch von Wasser mit chemischen Gruppen des Methylenglykols des Formaldehyds, vgl. Rivlin et al (9). Somit lässt sich vermuten, dass sowohl das Fließmittel als auch das Formaldehyd  $T_2$  der Fixierlösung reduzieren.

Eine Konzentrationsreihe der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung wäre zukünftig anzustreben, um herauszufinden, ob eine andere Formaldehydkonzentration in der fließmittelhaltigen Lösung die Relaxationszeiten beeinflusst.

$T_1$  der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen ist im Vergleich zu  $T_1$  der wässrigen Alkylderivatlösungen deutlich reduziert. Dies ist durch den hohen Fließmittelgehalt in den Lösungen erklärbar.  $T_1$  der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen ist im Vergleich zur 30%igen-H<sub>2</sub>O-70%igen-fließmittelhaltigen Referenzlösung ebenfalls leicht reduziert. Dementsprechend hat das Vorhandensein des Alkylderivats und des Fließmittels innerhalb einer Lösung einen stärkeren  $T_1$  reduzierenden Effekt als das alleinige Alkylderivat in wässriger Lösung. Daraus lässt sich schließen, dass in der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung sowohl das Fließmittel als auch das Alkylderivat  $T_1$  reduzieren.

$T_2$  der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung ist im Vergleich zu destilliertem Wasser um mehr als die Hälfte reduziert. Welche chemischen Austauschprozesse zwischen Wasser und den chemischen Gruppen des Fließmittels und des Alkylderivats die Abnahme von  $T_2$  induzieren ist nicht genau erklärbar. Ein chemischer Austausch zwischen Wasser und den chemischen Gruppen des Alkylderivats ist mutmaßlich ausschlaggebend für die Abnahme von  $T_2$ , vgl. Rivlin et al. (9).

## **4.2 Experiment 2 – <sup>1</sup>H-Signale wässriger Formaldehyd-, Alkylderivat- und in-vivo Spektren –**

In der wässrigen Formaldehydlösung kann bei ca. 3,3ppm das spezifische Signal des Methanols und der Methoxygruppe des Formaldehyds ausgemacht werden, vgl. Gaca et al (51). In diesem ppm-Bereich liegen in den in-vivo Spektren keine gewebespezifischen Signale, sodass das Formaldehydsignal an dieser Stelle als spezifisch für die verglichenen Gewebe bezeichnet werden kann. Das in seiner Linienbreite sehr schmale Formaldehydsignal ist sehr charakteristisch und lässt eine Differenzierung zu den gewebespezifischen Signalen zu.

Die acht erkennbaren Signale in der wässrigen Alkylderivatlösung liegen überwiegend an gleichen Stellen, an denen auch Signale im gelben Knochenmark, den Musculi soleus und tibialis anterior und dem Hirngewebe liegen. Dies lässt auf Grund eines fehlenden alkyderivatspezifischen Signals keine Differenzierung zwischen den Signalen ausgehend von den Geweben und den Signalen der alkyderivathaltigen Fixierlösung zu. Das Hirngewebe bildet hierbei eine Ausnahme, da im Hirngewebe bei 1,3ppm kein prominentes Signal liegt. Daher kann man das Alkyderivat-Signal bei 1,3ppm für das Hirngewebe als spezifisch betrachten. Ein universell für die verglichenen Gewebe nutzbares alkyderivatspezifisches Signal kann man nicht definieren. Das Spektrum von Lebergewebe, siehe Experiment 4, ähnelt dem des gelben Knochenmarks. Da Lebergewebe spezifische Signale bei ca. 1,3ppm und bei 3,5 bis 4,0ppm aufweist, können in dem Bereich zwischen 1,7ppm und 3,0ppm bei einer Alkyderivatfixierung von Lebergewebe eventuell alkyderivatspezifische Signale nachgewiesen werden.

### **4.3 Experiment 3 – Vergleich der Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösung –**

Das Hinzufügen des Fließmittels lässt in der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung die Signale S1, S3 bis S6 und S8, die ebenfalls in der wässrigen Alkylderivatlösung vorhanden sind, erkennen. Allerdings lässt sich nicht sicher differenzieren wie viel der Signalintensität von dem Alkylderivat und dem Fließmittel stammt. Somit können die Signale in der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung bei Gewebefixierungen nicht sicher als Nachweis für das Eindringen des Alkylderivats genutzt werden.

Das Zugeben des Fließmittels hat in der Formaldehydlösung keine Veränderung des formaldehydspezifischen Signals zur Folge. In beiden Formaldehydlösungen liegt das Signal an der gleichen Stelle, bei 3,3ppm, und wird in der fließmittelhaltigen Lösung nicht von den Signalen des Fließmittels überlagert. Somit ist das Signal in beiden Formaldehydlösungen spezifisch für die Vergleichsgewebe aus Experiment 2. Die vier Triplettsstrukturen bei 0,5ppm, 1,5ppm, 2,5ppm, 3ppm und 4ppm sind durch J-Kopplungseffekte erklärbar.

#### **4.4 Experiment 4 – Fixierung von Rinderleber –**

##### **4.4.1 Kontrastveränderung in der T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>-, und PD-gewichteten Bildgebung**

In der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung ist eine Kontrastveränderung im Verlauf des Eindringens der formaldehyd- und alkylderivathaltigen Fixiermittel über den Zeitraum von 187 Tagen zu erkennen. Sowohl das formaldehydhaltige Fixiermittel als auch das alkylderivathaltige Fixiermittel verändern den Kontrast während des Eindringprozesses zwischen fixiertem (hell) und noch unfixiertem (dunkel) Lebergewebe stark, vgl. Ludescher et al. (21). Im Gegensatz zu Ludescher et al. konnten in dieser Untersuchung die Verläufe der Fixiervorgänge in der Rinderleber nur in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung mittels einer deutlichen Kontrastveränderung erkannt werden. In den T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern kann der Verlauf der formaldehyd- und alkylderivathaltigen Fixierung nicht dargestellt werden. In diesen Aufnahmen ist nur eine Intensitätsveränderung der vollständig fixierten Lebergewebe im Verlauf zu erkennen. Die formaldehydfixierte Leber stellt sich im Verlauf dunkler dar als die alkylderivatfixierte Leber. In der PD-gewichteten Bildgebung kann der Verlauf des Eindringens der Fixiermittel, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Ludescher et al. (21), nicht durch eine Kontrastveränderung beobachtet werden. Eine Intensitätsveränderung zwischen dem reinen Lebergewebe an Tag 0 0h und dem fixierten Lebergewebe ab Tag 25 im formaldehydfixierten Lebergewebe und ab Tag 18 im alkylderivatfixierten Lebergewebe ist aber auch in der PD-gewichteten Bildgebung erkennbar. Die formaldehydfixierte Leber stellt sich im Verlauf dunkler dar als die alkylderivatfixierte Leber. Dagegen konnten Ludescher et al. (21) auch in den PD-gewichteten Bildern den Verlauf des Eindringens formaldehydhaltiger Fixierlösungen darstellen. In der Untersuchung zur Kontrastveränderung durch Fixierung zeigt sich das deutlichste Ergebnis in den T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern, sowohl für die formaldehydfixierte als auch für die alkylderivatfixierte Leber. Die Veränderung des Kontrastverhaltens ist in beiden Fixierlösungen vergleichbar. An Tag 0 der Messreihe nimmt die kontrastveränderte Randbildung durch die unterschiedlichen Fixiermittel annähernd gleich zu. In der formaldehydfixierten Leber nimmt die kontrastveränderte Randbildung ab Tag 4 langsamer zu als in der alkylderivatfixierten Leber. Die Eindringgeschwindigkeit der beiden Fixierlösungen unterscheidet sich, die Kontrastveränderung der

Gewebe ist sehr ähnlich. In der T<sub>2</sub>- und PD-gewichteten Bildgebung unterscheiden sich die Intensitätsveränderungen der beiden unterschiedlich fixierten Lebergewebe dahingehend, dass das formaldehydfixierte Lebergewebe dunkler erscheint als das alkylderivatfixierte. Die beiden Fixiermittel haben unterschiedliche T<sub>2</sub>- und PD-intensitätsverändernde Eigenschaften, die durch Folgendes erklärbar wären: Optisch und haptisch unterschieden sich die beiden Lebergewebe nach der sechsmonatigen Fixierung dahingehend, dass das formaldehydfixierte Lebergewebe eine gräuliche Farbe angenommen hat und das Gewebe sehr steif war. Das alkylderivatfixierte Lebergewebe hingegen hatte eine wesentlich physiologischere Farbe beibehalten und das Gewebe ist weicher geblieben, vgl. die histologische Aufarbeitung. Das Formaldehyd hat dem Gewebe somit wahrscheinlich mehr Wasser während des Fixiervorgangs entzogen, wodurch die T<sub>2</sub>-Intensität in dem formaldehydfixierten Lebergewebe dunkler wurde. Zudem scheinen die Crosslinks, die zwischen dem Formaldehyd und dem Lebergewebe entstanden sind, zu weniger freien <sup>1</sup>H-Protonen geführt zu haben. Daraus resultierte eine dunkler werdende PD-Intensität. Im Gegensatz dazu scheint das Alkylderivat dem Gewebe weniger Wasser entzogen zu haben, wodurch es zu einer weicheeren Haptik des Gewebes kam und die T<sub>2</sub>-Intensität im Vergleich zu der T<sub>2</sub>-Intensität des formaldehydfixierten Lebergewebes heller blieb. Die weichere Haptik des alkylderivatfixierten Lebergewebes lässt ebenfalls auf ein anderes Crosslinking zwischen dem Alkylderivat und dem Lebergewebe schließen, wodurch womöglich mehr freie <sup>1</sup>H-Protonen in dem Gewebe vorliegen und die PD-Intensität ebenfalls heller blieb.

#### **4.4.2 Veränderungen des Relaxationsverhaltens**

Die longitudinale Relaxationszeit in der formaldehydhaltigen Fixierlösung nimmt über den zeitlichen Verlauf von 187 Tagen kontinuierlich ab. Zu Beginn der Gewebefixierung dringt das Fließmittel vermutlich schneller in das Gewebe ein als das Formaldehyd, vgl. Experiment 4. Dadurch steigt mutmaßlich die Konzentration des Formaldehyds in der Fixiermittellösung zu Beginn der Messreihe im Verhältnis zum Fließmittelgehalt an. Wie in Experiment 1 gezeigt wurde, nimmt T<sub>1</sub> mit steigender Formaldehydkonzentration in wässriger Lösung ab. Transferiert man diese Ergebnisse auf die fließmittelhaltige Formaldehydlösung, kann der

Rückgang von  $T_1$  mit der im Verhältnis zur Fließmittelkonzentration steigenden Formaldehydkonzentration erklärt werden. Dafür muss allerdings angenommen werden, dass das Formaldehyd einen stärkeren  $T_1$  reduzierenden Effekt als das Fließmittel hat. Ab dem Tag 46 sinkt  $T_1$  langsamer. Dies lässt eine weniger starke Konzentrationsveränderung der Fixierlösung vermuten, da die Leber zu diesem Zeitpunkt vollständig von der Fixierlösung durchdrungen ist. Zudem zeigen Grodd und Schmitt (22), dass das freie Zellwasser bei geringen Formaldehydkonzentrationen zuerst abnimmt und zum größten Teil die subzellulären Strukturen aufrechterhalten bleiben, wodurch  $T_1$  stark abfällt. Bei weniger resistenten Bestandteilen der Zellen kommt es bei einer mittleren Formaldehydkonzentration zu einer osmotischen Zytolyse. Hierdurch ergibt sich ein weniger starker Abfall von  $T_1$  und ein sogenanntes  $T_1$ -Plateau, da hierbei intrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt wird. Bei hohen Formaldehydkonzentrationen kommt es zu einem weiteren Schwinden der Zellen und dadurch wieder zu einem nun etwas geringeren  $T_1$ -Abfall (22).

$T_1$  in der formaldehydfixierten Leber nimmt am Rand des Lebergewebes und in der Mitte des Lebergewebes über die Zeit ab. Am Rand des Lebergewebes nimmt  $T_1$  bis zu Tag 4 schneller ab als  $T_1$  in der Lebermitte. Das Fixiermittel entzieht dem Lebergewebe die Gewebsflüssigkeit, dadurch wird  $T_1$  reduziert. Der Entzug der Gewebeflüssigkeit findet am Geweberand eher statt als in der Lebermitte, wodurch es zu dem späteren Abfall von  $T_1$  ab Tag 11 in der Lebermitte kommt, vgl. Grodd et al. (22). Zudem beschreiben Schmierer et al (23), Shepherd et al (24) und Birkl et al. (52), dass ein Crosslinking zwischen dem Methylenglykol, welches durch die Reaktion von Formaldehyd mit  $H_2O$  entsteht, und den Gewebeproteinen entsteht. Dieses Crosslinking scheint  $T_1$  im Gewebe zu verkürzen, da es zu einer Verschiebung der freien Wasserstoffprotonen in den makromolekularen Raum kommt und ein reduzierterer, transmembranärer Wasseraustausch stattfindet, vgl. Schmierer et al (23), Shepherd et al (24) und Birkl et al. (52).

$T_1$  in der alkylderivathaltigen Fixierlösung nimmt über den zeitlichen Verlauf von 187 Tagen kontinuierlich ab. Zu Beginn der Gewebefixierung dringt das Fließmittel vermutlich schneller in das Gewebe ein als das Alkylderivat, vgl. Experiment

4. Dadurch steigt die Konzentration des Alkylderivats zu Beginn der Messreihe im Verhältnis zum Fließmittelgehalt mutmaßlich an. Wie in Experiment 1 gezeigt wurde, nimmt  $T_1$  mit steigender Alkylderivatkonzentration in wässriger Lösung ab. Transferiert man diese Ergebnisse auf die fließmittelhaltige Alkylderivatlösung kann der Abfall von  $T_1$  mit der im Verhältnis zur Fließmittelkonzentration steigenden Alkylderivatkonzentration erklärt werden. Dafür muss allerdings angenommen werden, dass das Alkylderivat einen stärkeren  $T_1$ -reduzierenden Effekt als das Fließmittel hat. Ab Tag 110 sinkt  $T_1$  langsamer, dies lässt eine weniger starke Konzentrationsveränderung der Fixierlösung vermuten, da die Leber zu diesem Zeitpunkt komplett von der Fixierlösung durchdrungen ist. Die formaldehydhaltige und die alkylderivathaltige Fixierlösung zeigen ein vergleichbares  $T_1$  Verhalten.

In der alkylderivatfixierten Leber nimmt  $T_1$  im Randbereich des Lebergewebes und in der Mitte der Leber zuerst ab und steigt anschließend wieder an. Die Abnahme von  $T_1$  zu Beginn der Messreihe bis zum Tag 1 erklärt sich vermutlich durch den fließmittelbedingten Flüssigkeitsentzug aus dem Lebergewebe. Der Entzug der Gewebeflüssigkeit benötigt in der Mitte des Lebergewebes länger, wodurch der längere Abfall von  $T_1$  erklärt werden kann. Birkl et al. (52) beschreiben, dass bei Formalinfixierung die Permeabilität der mikroskopischen Strukturen durch Methylenbrückenbildung reduziert wird (52). Übertragen auf die alkylderivathaltige Fixierlösung lässt sich vermuten, dass es zwischen den Proteinen der Leber und den chemischen Gruppen des Alkylderivats ebenfalls zu einer Brückenbildung kommt. Diese Brückenbildung im alkylderivatfixierten Gewebe könnte somit, ebenso wie im formaldehydfixierten Gewebe, zu einer Reduktion von  $T_1$  führen. Der kontinuierliche Anstieg von  $T_1$  ab Tag 18 ist nicht sicher zu erklären.

Die transversale Relaxationszeit in der formaldehydhaltigen Fixierlösung nimmt an Tag 0 0h innerhalb von 2,5h zu, dies ist erklärbar durch eine eventuelle Schichtbildung der chemischen Bestandteile in der Fixierlösung. Bis zu Tag 1 sinkt  $T_2$  ab, da zu Beginn der Gewebefixierung das Fließmittel vermutlich schneller in das Gewebe eindringt als das Formaldehyd, vgl. Experiment 4. Dadurch steigt die Konzentration des Formaldehyds zu Beginn der Messreihe im

Verhältnis zum Fließmittelgehalt vermutlich an. Wie in Experiment 1 gezeigt wurde, nimmt  $T_2$  mit steigender Formaldehydkonzentration in wässriger Lösung ab. Transferiert man diese Ergebnisse auf die fließmittelhaltige Formaldehydlösung, kann der Abfall von  $T_2$  bis zu Tag 1 mit der im Verhältnis zur Fließmittelkonzentration steigenden Formaldehydkonzentration erklärt werden. Dafür muss allerdings angenommen werden, dass das Formaldehyd einen stärkeren  $T_2$ -reduzierenden Effekt hat als das Fließmittel. Das Eindringen des Fließmittels führt im Lebergewebe zu einem Entziehen des Gewebewassers, welches die Fixierlösung möglicherweise verdünnt und  $T_2$  erhöht. Erklärbar ist die Zunahme von  $T_2$  zudem durch das Eindringen des Formaldehyds in das Lebergewebe ab Tag 4, vgl. Experiment 4. Die Formaldehydsignalintensität nimmt in den Spektren des formalinfixierten Lebergewebes ab Tag 4 scheinbar kontinuierlich zu, wodurch in der Fixierlösung die Formaldehydkonzentration kontinuierlich abnehmen muss und hierdurch die Zunahme von  $T_2$  erklärt werden könnte. Zudem zeigen die Ergebnisse zu Experiment 1, dass  $T_2$  bei abnehmender Formaldehydkonzentration in wässriger Lösung zunimmt. Überträgt man diese Ergebnisse auf die fließmittelhaltige Formaldehydlösung in Experiment 4, lässt dies die Erklärung für die Zunahme von  $T_2$  zu. Die Methode der Datenauswertung zu den Veränderungen von  $T_2$  wird der Komplexität der Fixierlösungen nicht gerecht. Durch die Auswertung von  $T_2$  mittels einer monoexponentiellen Funktion sind Fehler in den berechneten  $T_2$ -Werten in Experiment 4 nicht auszuschließen. Die chemischen Metabolite der Fixierlösungen müssten zuerst einzeln auf ihre  $T_2$  verändernde Wirkung bei Fixierung untersucht werden. Die  $T_2$  Auswertung der unterschiedlichen chemischen Bestandteile innerhalb einer Fixierlösung müsste mit einer bi- oder sogar multiexponentiellen Funktion erfolgen. Die Vermutung, dass der Wasseranteil in der Fixierlösung über den Zeitraum der Fixierung durch das Austreten von Gewebewasser aus der Leber ansteigt, lässt das sinkende  $T_1$  und steigende  $T_2$  nicht logisch erklären.

Die Zunahme von  $T_2$  in der formaldehydfixierten Leber innerhalb der ersten 2,5h an Tag 0 am Leberrand der formalinfixierten Leber ist vermutlich auf das beginnende Eindringen des Fließmittels in das Lebergewebe zurückzuführen. Das  $T_2$ -Plateau bis Tag 1 lässt vermuten, dass bis zum Tag 1 die maximal erreichbare

Fließmittelkonzentration erreicht ist. Das Ansteigen von  $T_2$  an Tag 11 lässt sich mit dem zuerst am Geweberand beginnenden Eindringen des Formaldehyds erklären. Der kontinuierliche Abfall von  $T_2$  ab Tag 18 ist durch einen formaldehydinduzierten Gewebewasserverlust und einen geringeren transmembranären Wasseraustausch des schon fixierten Gewebes zu erklären, vgl. Birkl et al. (52).

$T_2$  der formaldehydfixierten Leber in der Gewebemitte liegt innerhalb der ersten 7,5h bei konstanten Werten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass innerhalb des Tages 0 keine Fixierlösung bis in die Gewebemitte eingedrungen ist. An Tag 1 und Tag 4 sinkt  $T_2$ , dies ist laut Dawe et al. (26) durch die Fixierung des Gewebes mittels Formaldehyd erklärbar. Ab Tag 11 bis Tag 67 steigt  $T_2$  wieder an, Dawe et al. (26) beschreiben in tief gelegenem formalinfixierten Hirngewebe ebenfalls zuerst einen  $T_2$ -Abfall gefolgt von einem Anstieg. Begründet wird dieser Anstieg von  $T_2$  damit, dass die Fixierlösung bis in die tieferen Schichten des Gewebes längere Zeit benötigt und es dadurch zu einem beginnenden Zerfall der Zellen und einem damit verbundenen Wasseraustritt aus den Zellen kommt (26). Dieser Prozess ist in der histologischen Aufarbeitung des Lebergewebes nachvollziehbar.

$T_2$  nimmt in der Alkylderivathaltigen Fixierlösung an Tag 0 innerhalb der ersten 2,5h zu. Das ist durch eine eventuelle Schichtbildung der chemischen Bestandteile in der Fixierlösung erklärbar. Bis zu Tag 4 sinkt  $T_2$  ab, da das Fließmittel zu Beginn der Gewebefixierung schneller in das Gewebe eindringt als das Alkylderivat, vgl. Experiment 4. Dadurch steigt die Konzentration des Alkylderivats zu Beginn der Messreihe im Verhältnis zum Fließmittelgehalt an. Wie in Experiment 1 gezeigt wurde, nimmt  $T_2$  mit steigender Alkylderivatkonzentration in wässriger Lösung ab. Transferiert man diese Ergebnisse auf die fließmittelhaltige Alkylderivatlösung kann der Abfall von  $T_2$  bis zu Tag 4 mit der im Verhältnis zur Fließmittelkonzentration steigenden Alkylderivatkonzentration erklärt werden. Dafür muss allerdings angenommen werden, dass das Alkylderivat einen stärkeren  $T_2$ -reduzierenden Effekt hat als das Fließmittel. Das Eindringen des Fließmittels führt im Lebergewebe zu einem Entzug des Gewebewassers, welches die Fixierlösung verdünnt und  $T_2$  ab Tag 11 erhöht. Erklärbar ist die Zunahme von  $T_2$  durch das wahrscheinliche Eindringen des Alkylderivats in das Lebergewebe ab Tag

11, dies ist in den Spektren des alkylderivatfixierten Lebergewebes nicht genau nachvollziehbar. In den Spektren ist erst ab Tag 46 bei ca. 1,7ppm ein mögliches Alkylderivatsignal nachvollziehbar, vgl. Experiment 4. In den Spektren der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung, vgl. Experiment 4, ist über den Verlauf von 187 Tagen eine Abnahme der möglicherweise alkylderivatbedingten Signale in der Lösung zu erkennen. Diese Abnahme der Alkylderivatsignale in der Fixierlösung sowie die Zunahme von  $T_2$  in der Fixierlösung sprechen für eine Abnahme von  $T_2$  auf Grund des Eindringens des Alkylderivats in das Lebergewebe. Zudem zeigen die Ergebnisse zu Experiment 1, dass  $T_2$  bei abnehmender Alkylderivatkonzentration in wässriger Lösung zunimmt. Überträgt man diese Ergebnisse auf die fließmittelhaltige Alkylderivatlösung in Experiment 4, lässt dies die Erklärung für die Zunahme von  $T_2$  bis zu Tag 46 zu. Ab Tag 67 sinken die Werte wieder ab.

$T_2$  steigt am Leberrand der alkylderivatfixierten Leber bis zum Tag 1 kontinuierlich an, dies lässt sich vermutlich mit dem beginnenden Eindringen des Fließmittels in das Lebergewebe erklären. Der sprunghafte Anstieg von  $T_2$  ab Tag 4 lässt das Beginnen des Alkylderivateindringens vermuten, das bis zu Tag 18 sein Maximum erreicht. Ab Tag 25 fällt  $T_2$  kontinuierlich ab. Der Abfall von  $T_2$  ist bei formaldehydfixierten Geweben durch einen formaldehydinduzierten Gewebewasserverlust und einen geringeren transmembranären Wasseraustausch durch die Fixierung zu erklären, vgl. Birkl et al. (52). Übertragen auf die alkylderivathaltige Fixierlösung lässt dies vermuten, dass es zwischen den Proteinen der Leber und den chemischen Gruppen des Alkylderivats ebenfalls zu einer Brückenbildung kommt. Diese Brückenbildung könnte somit, ebenso wie im formaldehydfixierten Gewebe, im alkylderivatfixierten Gewebe zu einer Reduktion von  $T_2$  führen. Die Brückenbildung und die dadurch entstehende Gewebefixierung führt laut Dawe et al. (26) in formaldehydfixierten Geweben zu einer Reduktion von  $T_2$  (26).

$T_2$  in der Lebermitte, des alkylderivatfixierten Lebergewebes, liegt innerhalb der ersten 7,5h bei konstanten Werten. Dies ist dadurch erklärbar, dass innerhalb des Tages 0 keine Fixierlösung bis in die Gewebemitte eingedrungen ist. An Tag 1 und Tag 4 sinkt  $T_2$ , dies ist laut Dawe et al. (26) durch die Gewebefixierung mittels Formaldehyd erklärbar (26). Überträgt man die  $T_2$  verkürzende Wirkung des Formaldehyds auf das alkylderivatfixierte Lebergewebe, lässt sich der Abfall

von  $T_2$  bis zum Tag 4 erklären. Dawe et al. (26) beschreiben in tief gelegenem formalinfixiertem Hirngewebe ebenfalls zuerst einen  $T_2$ -Abfall gefolgt von einem  $T_2$ -Anstieg. Begründet wird dieser Anstieg damit, dass die Fixierlösung bis in die tieferen Schichten des Gewebes längere Zeit benötigt und es dadurch zu einem beginnenden Zerfall der Zellen und einem damit verbundenen Wasseraustritt aus den Zellen kommt (26). Dieser Prozess ist in der histologischen Aufarbeitung des alkylderivatfixierten Lebergewebes nachvollziehbar und erklärt die Zunahme von  $T_2$  ab Tag 11 in der Mitte des alkylderivatfixierten Lebergewebes.

#### **4.4.3 Magnetisierungstransfer**

Die MTR-Werte in der formaldehydhaltigen Fixierlösung bleiben konstant niedrig und ändern sich wenig, da es in Flüssigkeiten kaum zu einem Magnetisierungstransfer kommt.

Die MTR im Randbereich des formaldehydfixierten Lebergewebes nimmt innerhalb des Zeitintervalls von 187 Tagen ab. Schmierer et al. (23) beschreiben in ihrer Arbeit, dass sich die  $T_1$  und die MTR in formalinfixierten Gewebe in einem ähnlichen Verhalten verändern. Sie erklären die Reduzierung der MTR mit dem Verschieben der Wasserstoffprotonen aus dem Raum des freien Wassers in den makromolekularen Raum. Die Vernetzung von Proteinstrukturen mit dem Formaldehyd führt laut Schmierer et al. (23) zu einer räumlichen Verschiebung der Wasserstoffprotonen. Die Ergebnisse zur MTR in Experiment 4 zeigen, dass die MTR mit zunehmender Fixierungsdauer abnimmt und anschließend ein Plateau erreicht. Das Erreichen des Plateaus ist mit dem Zustand des durchfixierten Leberandes vereinbar. In den Ergebnissen kann durch die sinkende MTR über den Messzeitraum nachvollzogen werden, dass das Fortschreiten der Fixierung das Verhältnis von gebundenem zu freien Wasserstoffprotonen verändert.

Die MTR in der Lebermitte zeigt einen ähnlichen Verlauf wie am Leberrand. Es kommt auf Grund der erst später beginnenden Fixierung zu einem späteren Abfall der MTR. Die sprunghafte Abnahme der MTR von Tag 4 auf Tag 11 ist damit zu erklären, dass innerhalb dieses Zeitraums eine Durchfixierung des

Lebergewebes stattgefunden hat. Mit der kompletten Fixierung des Lebergewebes auch in der Lebermitte stellt sich nach dem Abfallen der MTR ein Plateau der MTR ebenso wie am Leberrand ein.

Die MTR-Werte in der alkylderivathaltigen Fixierlösung bleiben konstant niedrig und ändern sich nur wenig, da es in Flüssigkeiten kaum zu einem Magnetisierungstransfer kommt.

Die MTR im Randbereich des alkylderivatfixierten Lebergewebes nimmt zu Beginn ebenso ab wie im formaldehydfixierten Lebergewebe. Dies lässt, wie in den vorangegangenen Diskussionen ausgeführt, die Vermutung einer Brückenbildung von Proteinen und chemischen Bestandteilen des Alkylderivats zu, vgl. Birkl et al. (52). Das alkylderivathaltige Fixiermittel scheint zu Beginn denselben Effekt durch die Fixierung des Gewebes auf die MTR zu haben wie das formaldehydhaltige Fixiermittel. Wasserstoffprotonen aus dem Raum des freien Wassers gelangen durch den Fixiervorgang, offensichtlich genau wie im formalinfixierten Gewebe, in den makromolekularen Raum und reduzieren dadurch das Verhältnis des Magnetisierungstransfers, vgl. Schmierer et al. (23). Im Gegensatz zum formaldehydfixierten Lebergewebe steigen die MTR-Werte im alkylderivatfixierten Lebergewebe ab Tag 4 wieder an und bleiben dann ebenfalls auf einem Plateau stehen.

Die MTR in der Lebermitte zeigt einen konstanten MTR-Wert bis Tag 4, da bis zu diesem Messzeitpunkt das Fixiermittel nicht bis in die Mitte der Leber eingedrungen ist und somit noch keinen Effekt auf die MTR haben konnte. An Tag 11 fällt die MTR ab und bleibt auf einem ähnlichen Niveau bis zu Tag 25. Dieser Abfall ist wie schon im Teil zu dem alkylderivatfixierten Rand des Lebergewebes beschrieben, durch eine mutmaßliche Brückenbildung von Proteinen und Alkylderivat zu erklären, vgl. Birkl et al. (52). Ab Tag 46 steigen die MT-Werte etwas an und bleiben bis zum Ende der Messreihe auf einem konstanten Niveau.

#### **4.4.4 Diffusion**

Die starke Schwankung der gemessenen ADC-Werte über die Zeit scheint möglicherweise damit zusammenzuhängen, dass die Fixierlösungen zusammengesetzte Flüssigkeiten sind, die jeweils unterschiedliche Diffusionseigenschaften haben. Zudem kann in den Lebergewebe das Eindringen der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung und der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung die Diffusion von Wasser beeinflussen.

#### **4.4.5 T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>-, MT- und ADC-Wertveränderung im Referenzversuch mit NaCl**

Der Referenzversuch mit Rinderlebergewebe in 0,9%iger NaCl-Lösung lässt sich nur dahingehend auswerten, dass die jeweiligen T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>-, MT-, und ADC-Werte von Tag 0 0h bis zu Tag 1 konstant bleiben, da hier jeweils das native Lebergewebe und die reine NaCl-Lösung gemessen wurden. Die Werte ab Tag 4 bis zu Tag 25 sind nicht verwertbar, da es ab Tag 4 zu einer beginnenden Fäulnisgasentwicklung kam und das Lebergewebe lytisch wurde. Die gemessenen Werte entstehen somit aus einem Gemisch von Lebergewebe, Fäulnisgasen und der NaCl-Lösung und sind dadurch nicht auszuwerten. Das Lebergewebe musste auf Grund von Madenentwicklung und fortschreitender Verwesung am Tag 33 nach Beginn der Messreihe verworfen werden. Die unterste Box wurde wieder mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt und weiterhin im Versuchsaufbau belassen, um den gleichen Versuchsaufbau für die weiteren Messungen gewährleisten zu können.

#### **4.4.5 Spektroskopie der Fixierlösungen und der fixierten Lebergewebe**

Eine Referenzierung der Signalintensität auf ein bestimmtes Signal war nicht möglich, da die Signalintensitäten der ermittelten Signale nicht konstant blieben. Dies erschwert in der Interpretation der Ergebnisse, die Zu- oder Abnahme von einzelnen Signalen zu bewerten. Somit ist ein Rückschluss auf das mögliche Eindringen von Fixiermitteln in das Lebergewebe nicht sicher nachweisbar. In den Spektren der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung scheint über den Messzeitraum von 6 Monaten das Formaldehydsignal abzunehmen. Dies lässt vermuten, dass Formaldehyd neben dem Fließmittel in das Lebergewebe eingedrungen

sein muss. Diese Schlussfolgerung lässt sich nachvollziehen, da in den Spektren des formaldehydfixierten Lebergewebes ab Tag 4 ein Formaldehydsignal zu erkennen ist. Das Signal des Fließmittels bei 1,3ppm steigt ab Tag 0 2,5h an und das Signal bei 3,5ppm steigt in der Signalintensität bereits ab dem 4. Tag an.

Im Vergleich dazu lässt sich auch in den Spektren der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung ein scheinbarer Abfall der Signale bei 1,8ppm, 2,5ppm und 3,0ppm erkennen. Hierbei ergibt sich das Problem, dass man kein alkylderivatspezifisches Signal detektieren kann. Die Signale, die scheinbar bei 1,8ppm, 2,5ppm und 3,0ppm an Konzentration abnehmen, beinhalten sowohl Signale des Fließmittels sowie des Alkylderivats, vgl. die Spektren der 10%igen fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung und der 30%igen H<sub>2</sub>O-70%igen-fließmittelhaltigen Lösung. Aus diesem Vergleich ist abzuleiten, dass eine Verringerung der Amplitude v.a. an den o.g. Signal-Positionen ein Eindringen von Fließmittel und Alkylderivat in das Lebergewebe bedeutet.

In den Spektren des alkylderivatfixierten Lebergewebes lässt sich schon ab Tag 0 2,5h ein Anstieg des Fließmittelsignals bei 1,3ppm im Lebergewebe erkennen. Das Fließmittelsignal bei 3,5ppm beginnt ab Tag 4 anzusteigen. Im alkylderivatfixierten Lebergewebe nimmt ebenso wie im formaldehydfixierten Lebergewebe zuerst die Signalintensität des Fließmittels zu. Ab Tag 18 ist das Signal des Fließmittels bei 2,2ppm erkennbar. Ab Tag 110 sind die Signale bei ca. 1,8ppm und 2,5ppm erkennbar. Diese Signale können, wie zuvor beschrieben, nicht sicher zwischen dem Fließmittel und dem Alkylderivat differenziert werden. Daher lässt sich aus diesem Anstieg nur vermuten, dass das Alkylderivat in die Leber eingedrungen ist. Ein Grund für die mangelnde Erkennbarkeit der Alkylderivatsignale bei den ppm Bereichen von 1,8ppm, 2,5ppm und 3,0ppm kann die möglicherweise sehr geringe Konzentration des eindringenden Alkylderivats sein. Bei einer 3%igen Alkylderivatkonzentration in der Fixierlösung kann der eindringende Teil des Alkylderivats durch das Gewebewasser und das eindringende Fließmittel in dem Lebergewebe so verdünnt worden sein, dass diese Konzentration bei 3 Tesla in der MR-Spektroskopie nicht detektierbar ist.

Diese Interpretation der Signalintensitäten der einzelnen Signale in den Fixierlösungen und den fixierten Geweben ist kritisch zu betrachten und kann nicht zur exakten Beschreibung einer Signalintensitätsabnahme in den Fixierlösungen und einer Signalintensitätszunahme in den fixierten Lebergeweben genutzt werden. Dadurch, dass keines der Signale konstant in seiner Intensität bleibt, konnte die Signalintensität auf keines der vorhandenen Signale referenziert werden. Diese fehlende Referenzierbarkeit kann eine fehlerhafte Interpretation der Ergebnisse nicht ausschließen. Betrachtet man Spektren gemeinsam mit der Kontrastveränderung in den  $T_1$ -gewichteten Bildern kann eine Veränderung der Konzentrationsverhältnisse während des Fixiervorgangs in den Fixierlösungen und Geweben nur vermutet werden. Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden ist der sichere, quantitative Nachweis von eingedrungenen Fixiermitteln nicht möglich.

#### **4.5 Histologische Aufarbeitung**

##### **Azan- und H.E.-Färbung der formaldehyd- und alkylderivatfixierten Lebergewebe**

In der Azan- und H.E.-Färbung des formaldehydfixierten Lebergewebes ist zu erkennen, dass die Leberzellen im oberen und mittleren Bereich des Lebergewebes durch die Fixierung gut erhalten wurden. Das Eindringen des Fixiermittels, welches in der T<sub>1</sub>-gewichteten Bildgebung nachvollzogen werden kann, hat die Zellen des Lebergewebes bis zum mittleren Bereich des Leberstücks vor dem beginnenden lytischen Prozess fixiert. Im Vergleich zu dem oberen und mittleren Bereich der Leber, sind die Zellen im unteren Bereich der Leber nicht mehr vollständig erhalten. Die fehlende bzw. schwache Anfärbung der Zellkerne sowie die geringe Anfärbung der Leberzellen und die aufgelockerte Struktur der Leberzellen zeigt eine beginnende Lyse, bevor das Fixiermittel die noch intakten Leberzellen fixiert hat. Durch die beginnende Lyse kommt es zwischen den Zellen zur Ausbildung von Schrumpfarmefakten.

In der Azan- und H.E.-Färbung des alkylderivatfixierten Lebergewebes ist zu erkennen, dass die Leberzellen im oberen Bereich des Lebergewebes durch die Fixierung gut erhalten wurden. Die Fixierung hat die Zellen im oberen Drittel der Leber vermutlich vor dem Beginn des lytischen Prozesses fixiert. Im Vergleich zum oberen Drittel des Lebergewebes sind die Zellen im mittleren und unteren Bereich des Lebergewebes nicht mehr vollständig erhalten. Im mittleren Bereich ist noch die Struktur der Leberzellbälkchen sowie eine Zentralvene erkennbar. Die Zellkerne sind jedoch nicht mehr angefärbt und die Zellen liegen lockerer vor als im oberen Bereich. Zwischen den Zellen kommt es durch den beginnenden Zelluntergang zu Schrumpfarmefakten. Im unteren Drittel des Lebergewebes ist keine Leberzellbälkchenstruktur mehr erkennbar, die Zellen sind stark aufgelockert. Im Vergleich zu dem formalinfixierten Lebergewebe ist das alkylderivatfixierte Lebergewebe schon ab dem mittleren Drittel in beginnendem lytischem Prozesse fixiert worden. Das alkylderivathaltige Fixiermittel scheint langsamer in das Gewebe eingedrungen zu sein, wodurch es später im mittleren Bereich des Lebergewebes wirken konnte als das formaldehydhaltige Fixiermittel. Dadurch unterscheiden sich die beiden Lebergewebe in dem Erhalt der Leberzellen und

Zellkerne. Das formaldehydhaltige Fixiermittel fixierte das Lebergewebe bei noch gut erhaltenen Leberzellen schneller als das alkylderivathaltige Fixiermittel. Erst im unteren Bereich des Lebergewebes fixierte auch das formaldehydhaltige Fixiermittel die Zellen im schon beginnenden lytischen Prozess. Die T<sub>1</sub>-gewichtete Bildgebung, sowie die T<sub>1</sub>-Maps, suggerierten, dass das alkylderivathaltige Fixiermittel optisch schneller in das Lebergewebe eindrang als das formaldehydhaltige Fixiermittel. Die Histologie zeigt aber, dass in dem formaldehydfixierten Lebergewebe die Leberzellen bis in die Mitte des Lebergewebes erhalten geblieben sind und im alkylderivatfixierten Lebergewebe nicht. Daher scheint die Kontrastveränderung, sowie die T<sub>1</sub> Veränderung nicht mit dem Fixieren vitaler Leberzellen übereinzustimmen. Dies unterstützt die schon beschriebene Vermutung, dass das Fließmittel schneller in die Gewebe eindringt und damit zu der gegebenen Kontrastveränderung, sowie der T<sub>1</sub> Veränderung führt. Die Fixiermittel scheinen allerdings unterschiedlich schnell in die Gewebe eingedrungen zu sein, was zu der unterschiedlichen Fixierung noch vitaler Leberzellen geführt haben kann.

Für eine Fixierung der Leberzellen über die gesamte Dicke von 3,3cm des Lebergewebes müsste ein optimierter Versuchsaufbau erfolgen. Damit das Lebergewebe von allen Seiten von den Fixierlösungen umgeben sein kann, müsste das Lebergewebe schwebend in der Plastikbox fixiert werden. Das Lebergewebe dürfte keine der vier Wände der Plastikbox berühren, um ein Eindringen der Fixierlösungen von allen Seiten gewährleisten zu können.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Die Messungen der Relaxationszeiten der reinen Lösungen zeigen ein ähnliches Verhalten in der wässrigen Formaldehydlösung, der wässrigen Alkylderivatlösung, der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung und der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung. In den Spektren der wässrigen und der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung lässt sich, im Gegensatz zu den Spektren der Formaldehydlösungen, kein alkylderivatspezifisches Signal zuordnen. Im Vergleich zu den in vivo Spektren ist erkennbar, dass die Signale des Alkylderivats in den meisten Fällen mit den Signalen der Gewebespektren überlappen.

In den MRT-Messungen der Lebergewebe zeigt sich, dass die  $T_1$ -gewichtete MR-Bildgebung zur Kontrastdarstellung und zu der zeitlichen Kontrastveränderung über die 6 Monate im Lebergewebe gut geeignet ist. Die  $T_2$ - und PD-gewichtete Bildgebung eignet sich nicht für die Darstellung des Kontrasts und einer Kontrastveränderung über die Zeit.

Die Veränderungen der Relaxationszeiten in den Fixierlösungen und in den fixierten Lebergeweben über die Zeit von 6 Monaten sind im  $T_1$ - und  $T_2$ -Mapping nur bedingt interpretierbar.  $T_1$  der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung sowie der formaldehydfixierten Leber sind durch die Effekte des Formaldehyds mittels Literaturvergleiche erklärbar. Bei der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung und der alkylderivatfixierten Leber ist der Anstieg von  $T_1$  in den letzten Messungen nicht sicher erklärbar.  $T_2$  der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung und der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung sowie der formaldehyd- und alkylderivatfixierten Leber müssten in einer weiteren Auswertung mit einer bi- oder sogar multiexponentiellen Funktion gefittet werden, da durch die verschiedenen chemischen Komponenten in den Fixierlösungen der monoexponentielle Fit für die genaue Berechnung von  $T_2$  nicht ausreicht.

Die MTR verändert sich in den Fixierlösungen über den 6-monatigen Messzeitraum kaum und korreliert in den Lebergeweben nahezu mit den Veränderungen von  $T_1$ . Die ADC-Werte schwanken stark und es ist keine Tendenz nachvollziehbar. Dies ist wahrscheinlich durch die verschiedenen Diffusionseigenschaften der einzelnen Fixierlösungsbestandteile bedingt.

In den Spektren der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung und der formaldehydfixierten Leber ist im Verlauf der 6 Monate zu erkennen, dass Formaldehyd in das Lebergewebe eingedrungen ist. Die Spektren der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung und der alkylderivatfixierten Leber zeigen im Verlauf der 6 Monate kein eindeutiges Eindringen des Alkylderivats in das Lebergewebe an.

Die histologische Aufarbeitung der verschiedenen fixierten Lebergewebe zeigte einen Unterschied in der makroskopischen Aufsicht und in dem Zellerhalt. Das alkylderivatfixierte Lebergewebe war nach der Fixierung farbechter und in der Haptik weicher als das formaldehydfixierte Lebergewebe. In der Histologie zeigte sich, dass die formaldehydfixierten Leberzellen bis zur Mitte des Lebergewebes gut erhalten sind und die Leberzellen des alkylderivatfixierten Lebergewebes nur im oberen Drittel gut erhalten sind. Auch wenn die Spektroskopie in der alkylderivatfixierten Leber kein eindeutiges Eindringen des Alkylderivats nachvollziehen lässt, zeigt sowohl die Bildgebung als auch die Histologie, dass die fließmittelhaltige Formaldehydlösung und ebenso die fließmittelhaltige Alkylderivatlösung in die Gewebe eingedrungen sind.

Für zukünftige Untersuchungen der beiden untersuchten Fixiermittel empfiehlt es sich, die Experimente kleinschrittiger aufzubauen und begrenztere Fragestellungen zu untersuchen. Es erscheint sinnvoller, die Gewebe nicht direkt mit einer fließmittelhaltigen Fixierlösung zu fixieren. Besonders in Bezug auf das noch neue Alkylderivat empfiehlt sich ein Experiment, in dem Lebergewebe in reinem Alkylderivat fixiert wird, um zuerst das Fixierverhalten des reinen Alkylderivats zu untersuchen. Zudem wäre ein Vergleich von rein formaldehydhaltigen, alkylderivathaltigen und fließmittelhaltigen Leberfixierungen zukünftig sinnvoll, um zuerst die Fixiereigenschaften der einzelnen Chemikalien zu untersuchen. Erst danach ist ein Zugabe von Fließmittel in die reinen Fixierlösungen sinnvoll.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurden das etablierte Fixiermittel Formaldehyd und das in der Anatomie der Universität Tübingen neu entwickelte Fixiermittel eines Alkylderivats vergleichend in der Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie untersucht. Diese Untersuchungen hatten zum Ziel, die MR-spezifischen Eigenschaften der beiden Fixiermittel zu charakterisieren und den Verlauf des Eindringens der Fixiermittel in der MRT und MRS über sechs Monate zu dokumentieren und diese Ergebnisse zu vergleichen.

Zuerst wurden die Relaxationszeiten von Verdünnungsreihen wässriger Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen gemessen. Die Ergebnisse zeigten in den wässrigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösungen einen vergleichbaren Effekt. Die Relaxationszeiten nahmen bei zunehmender Konzentration der Fixiermittel ab. Im nächsten Schritt wurden  $T_1$  und  $T_2$  der fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösung gemessen, die auch im späteren Gewebeexperiment verwendet wurden. In beiden fließmittelhaltigen Fixierlösungen führt das hinzugesetzte Fließmittel zu einer weiteren Abnahme von  $T_1$  und  $T_2$  im Vergleich zu den wässrigen Fixiermittellösungen. Im Anschluss daran wurden MR-Spektren der wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen aufgenommen. Die Spektren der wässrigen Fixiermittellösungen wurden mit in vivo Spektren verschiedener Gewebe verglichen. Hierbei ergab der Vergleich, dass das Formaldehyd im Spektrum ein spezifisches und wieder erkennbares Signal aufzeigt. Das Spektrum der wässrigen Alkylderivatfixierlösung hingegen weist viele verschiedene Signale auf, die mit gewebeeigenen Signalen überlappen. Somit konnte kein alkylderivatspezifisches Signal bestimmt werden. Die Spektren der jeweiligen wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen wurden ebenfalls verglichen. Hierbei zeigte sich in den formaldehydhaltigen Lösungen, dass sowohl in der wässrigen als auch in der fließmittelhaltigen Lösung das Formaldehydsignal identifiziert werden kann. In den alkylderivathaltigen Lösungen zeigte sich, dass die Signale des Fließmittels mit einigen Signalen des Alkylderivats an denselben Positionen des Spektrums lagen und sich eine Differenzierung zwischen Fließmittel und Alkylderivat als schwierig herausstellte.

Im Anschluss an die Charakterisierung MRT- und MRS-spezifischer Merkmale der reinen Fixierlösungen wurde Rinderlebergewebe in der fließmittelhaltigen Formaldehyd- und Alkylderivatlösung fixiert. In den Experimenten zur Fixierung von Rinderlebergewebe wurden die Kontrastveränderungen mittels  $T_1$ -,  $T_2$ - und PD-gewichteter MR-Bildgebung untersucht. Hierbei ergab sich die ausgeprägteste Kontrastveränderung und damit Visualisierung des Fixiervorganges in den  $T_1$ -gewichteten Bildern. Im Folgenden wurden die Veränderungen von  $T_1$  und  $T_2$ , des Magnetisierungstransfers und der Diffusion untersucht. Im Vergleich der etablierten und der neuen Fixierlösung ergab sich, dass sich  $T_1$  und der Magnetisierungstransfer in den beiden Fixierlösungen ähnlich verhalten. Der  $T_2$ -Wert der verschiedenen Fixierlösungen war nicht mit monoexponentiellen Fitprozeduren bestimmbar. Die in der Diffusionsbildgebung ermittelten ADC-Werte unterliegen starken Schwankungen und zeigen im Verlauf keine eindeutige Tendenz. Die verschiedenen chemischen Bestandteile innerhalb der jeweiligen Fixierlösungen erschweren durch verschiedene Diffusionseigenschaften die Bestimmung der ADC-Werte in den Fixierlösungen und den fixierten Lebergeweben. Im Verlauf von sechs Monaten wurden die Fixiermittel sowohl in der leberumgebenden Fixierlösung als auch in dem Lebergewebe spektroskopisch untersucht. Die nicht einfach referenzierbare Signalintensität, daraus resultierend, dass es kein in seiner Signalintensität konstantes Signal gab, lässt eine quantitative Aussage über die abnehmende Konzentration des Formaldehyds und des Alkylderivats in den Lösungen sowie die Zunahme der Formaldehyd- und Alkylderivatkonzentration in den fixierten Lebergeweben nicht zu.

Nach Abschluss des Fixiervorgangs erfolgte mit Hilfe des Anatomischen Instituts in Tübingen eine histologische Aufarbeitung der fixierten Lebergewebe. In der Histologie des formaldehydfixierten Lebergewebes lässt sich ein Zellerhalt bis in die Mitte des Lebergewebes nachweisen. Die Histologie des alkylderivatfixierten Lebergewebes lässt einen Nachweis des Zellerhalts im oberen Drittel der Leber zu. Makroskopisch waren beide Lebergewebe nach der Fixierung in ihrer Struktur erhalten, unterschieden sich allerdings in ihrer Farbe und Haptik. Das formaldehydfixierte Lebergewebe zeigte eine gräuliche Farbe und eine starre feste Haptik. Das alkylderivatfixierte Lebergewebe zeigte eine bräunlich-rosafarbene Farbe

und eine weichere Haptik. Somit müssen die Fixiermittel in die Lebergewebe eingedrungen sein und diese unterschiedlich fixiert haben, da es in der Makroskopie und Mikroskopie sonst nicht zu den genannten Unterschieden gekommen wäre.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Gerabek Werner E., Haage Bernhard D., Keil Gundolf, Wegner Wolfgang. Enzyklopädie Medizingeschichte: De Gruyter; 2011: 410.
2. Loew O. Ueber formaldehyd und dessen Condensation. Journal für praktische Chemie. 1886;33(1):321-51.
3. Hoppe B. Chemische und biochemische Erkenntnisse in der frühen Photosyntheseforschung: Die Beiträge von Oscar Loew (1844-1941). Institut für Geschichte der Naturwissenschaften der Ludwig-Maximilians-Universität München Deutsches Museum, Museumsinsel 1, 8000 München 26. Mitteilungen, Gesellschaft Deutscher Chemiker / Fachgruppe Geschichte der Chemie (Frankfurt/Main), Bd 3 (1989)
4. Thullner I, Stockmann R, Hohenberger L. Formaldehyd in der vorklinischen medizinischen Ausbildung (Anatomie). Gefahrstoffe Reinhaltung Luft. 2015;75(6):219-28.
5. Eickmann U, Thullner I. Tätigkeiten mit Formaldehyd im Gesundheitsdienst. Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie. 2017;67(1):22-31.
6. Spiegel Online, Zu hohe Formalinwerte, Uni Frankfurt stoppt Präparierkurse für Medizinstudenten (online). 2015: abgerufen von: <https://www.spiegel.de/lebenundlernen/uni/uni-frankfurt-praep-kurse-fallen-wegen-zu-hoher-formalinwerte-aus-a-1029569.html>, am 17.07.2022 um 17:49 Uhr
7. PubChem, Nationales Zentrum für Informationen über Biotechnologie (2022). PubChem Compound Summary für CID 712, Formaldehyd. Abgerufen von: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formaldehyde>, am 23. Mai 2022.
8. Wang ZC, Dietl N, Kretschmer R, Ma JB, Weiske T, Schlangen M, et al. Direkte Umwandlung von Methan zu Formaldehyd durch kationisches  $[Al_2O_3]^+$  bei Raumtemperatur. Angewandte Chemie. 2012;124(15):3763-7.
9. Rivlin M, Eliav U, Navon G. NMR studies of proton exchange kinetics in aqueous formaldehyde solutions. Journal of Magnetic Resonance. 2014;242:107-12.
10. Hahnenstein I, Albert M, Hasse H, Kreiter CG, Maurer G. NMR Spectroscopic and Densimetric Study of Reaction Kinetics of Formaldehyde Polymer Formation in Water, Deuterium Oxide, and Methanol. Industrial & Engineering Chemistry Research. 1995;34(2):440-50.
11. International Union of Pure and Applied Chemistry, Compendium of chemical terminology, Gold Book. Version 2.3.3 2014-02-24;528.

12. RÖMpp Redaktion, Hemiformale (online), abgerufen von <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-08-00833>, am 31.07.2022 [Internet]. Thieme Gruppe. 2014.
13. Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG; <http://german.thalheimerkuhlung.com/products/medical/forensic/mortuary-equipment/cell-type-single-door/fifteen-cells-mortuary-refrigeratorfreezer-15-cadavers/>, abgerufen am 04.09.2022.
14. Lang G. Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. SpringerLink. Zweite, überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Vienna: Springer; 2013. p. 444, 48-57.
15. Puchtler H, Meloan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry*. 1985;82(3):201-4.
16. Brenner E. Human body preservation—old and new techniques. *Journal of anatomy*. 2014;224(3):316-44.
17. Swenberg JA, Moeller BC, Lu K, Rager JE, Fry RC, Starr TB. Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment. *Toxicol Pathol*. 2013;41(2):181-9.
18. Pressemitteilung Ludwig-Maximilians-Universität München LMU, Formaldehyd-Herstellung - Fünffmal effektiver mit Machine Learning (online), abgerufen von, <http://idw-online.de/de/news726991>, am 25.05.2022. . 2019.
19. Verordnung (EU) 2015/491 der Kommission vom 23. März 2015 zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 605/2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen zwecks Einfügung von Gefahren- und Sicherheitshinweisen in kroatischer Sprache und zwecks Anpassung an den technischen und wissenschaftlichen Fortschritt. *ABl. EU L 78*, 24. März 2015, 12-13.
20. Paulsen Prof. Dr. med. F., Stellungnahme und Empfehlung der Arbeitsgruppe „Formalin“ zur Reduktion der Formaldehyd-Belastung im Präparierkurs. *Anatomische Gesellschaft*. 2015:1.
21. Ludescher B, Machann J, Graf H, Wietek B, Subke J, Claussen C, et al., editors. Beobachtung und Kontrolle von Fixiervorgängen in Leberpräparaten mittels MRT und MRS. *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*; 2004: 597-604: (© Georg Thieme Verlag Stuttgart· New York).
22. Grodd W, Schmitt W.G.H., editor Protonenrelaxationsverhalten menschlicher und tierischer Gewebe in vitro, Änderungen bei Autolyse und Fixierung. *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der*

bildgebenden Verfahren; 1983: 233-240: (© Georg Thieme Verlag Stuttgart· New York).

23. Schmierer K, Thavarajah JR, An SF, Brandner S, Miller DH, Tozer DJ. Effects of formalin fixation on magnetic resonance indices in multiple sclerosis cortical gray matter. *J Magn Reson Imaging*. 2010;32(5):1054-60.

24. Shepherd TM, Thelwall PE, Stanisz GJ, Blackband SJ. Aldehyde fixative solutions alter the water relaxation and diffusion properties of nervous tissue. *Magnetic resonance in medicine*. 2009;62(1):26-34.

25. Shatil AS, Uddin MN, Matsuda KM, Figley CR. Quantitative Ex Vivo MRI Changes due to Progressive Formalin Fixation in Whole Human Brain Specimens: Longitudinal Characterization of Diffusion, Relaxometry, and Myelin Water Fraction Measurements at 3T. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:1-15.

26. Dawe RJ, Bennett DA, Schneider JA, Vasireddi SK, Arfanakis K. Postmortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. *Magnetic resonance in medicine*. 2009;61(4):810-8.

27. Fracasso T, Heinrich M, Hohoff C, Brinkmann B, Pfeiffer H. Ultrasound-accelerated formalin fixation improves the preservation of nucleic acids extraction in histological sections. *International Journal of Legal Medicine*. 2009;123(6):521.

28. Bloch F. Nuclear Induction. *Physical Review*. 1946;70(7-8):460-74.

29. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*. 1946;69(1-2):37-8.

30. Bachert P, Schröder L. Magnetresonanzspektroskopie. *Der Radiologe*. 2003;43(12):1113-28.

31. Schick F. Grundlagen der Magnetresonanztomographie (MRT). *Der Radiologe*. 2005;45(1):69-88.

32. Backens M. Grundlagen der MR-Spektroskopie. *Der Radiologe*. 2010;50(9):767-74.

33. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. SpringerLink Bücher. 7., überarb. u. erg. Aufl. 2014 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.

34. Schick F. Sequenzen in der MRT Teil I. *Der Radiologe*. 2006;46(7):615-30.

35. Schick F. Sequenzen in der MRT Teil II. *Der Radiologe*. 2006;46(9):803-20.

36. Juras V, Bohndorf K, Heule R, Kronnerwetter C, Szomolanyi P, Hager B, et al. A comparison of multi-echo spin-echo and triple-echo steady-state T2 mapping for in vivo evaluation of articular cartilage. *Eur Radiol.* 2016;26(6):1905-12.
37. Meiboom S, Gill D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments.* 1958;29(8):688-91.
38. Bunke J. Echo Planar Imaging (EPI). In: Adamek HE, Lauenstein T, editors. *MRT in der Gastroenterologie.* 1. Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2009.
39. Backens M. Grundlagen und Technik der diffusionsgewichteten MR-Bildgebung und der Diffusions-Tensor-Bildgebung. *Der Radiologe.* 2015;55(9):762-70.
40. Backens M. Technik der Protonen- und Phosphor-MR-Spektroskopie. *Der Radiologe.* 2017;57(6):428-37.
41. Paul A. Bottomley, Griffiths JR. *Handbook of magnetic resonance spectroscopy in vivo: MRS theory, practice and applications* John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom. 2016:p. 1193.
42. Klose U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *European journal of radiology.* 2008;67(2):194-201.
43. Jiru F. Introduction to post-processing techniques. *European journal of radiology.* 2008;67(2):202-17.
44. MATLAB. version 9.7.0.1586710 (R2019b ). Natick MTMI.
45. Tkáč I, Starčuk Z, Choi IY, Gruetter R. In vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine.* 1999;41(4):649-56.
46. Marjańska M, McCarten JR, Hodges J, Hemmy LS, Grant A, Deelchand DK, et al. Region-specific aging of the human brain as evidenced by neurochemical profiles measured noninvasively in the posterior cingulate cortex and the occipital lobe using <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Neuroscience.* 2017;354:168-77.
47. Pugmire, C. et al., Graphics layout engine gle 4.2.5f, abgerufen von: <https://glx.sourceforge.io/main/sponsors.html>, am 29.05.2022.
48. Krssak M, Lindeboom L, Schrauwen-Hinderling V, Szczepaniak LS, Derave W, Lundbom J, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in skeletal muscle: Experts' consensus recommendations. *NMR Biomed.* 2020:e4266.

49. Lambert JB, Marsmann H. Spektroskopie Strukturaufklärung in der Organischen Chemie. 2., aktualisierte Aufl. ed. München [u.a.]: Pearson Higher Education; 2012. 732 p.
50. Soares DP, Law M. Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Clinical Radiology*. 2009;64(1):12-21.
51. Gaca KZ, Parkinson JA, Lue L, Sefcik J. Equilibrium Speciation in Moderately Concentrated Formaldehyde–Methanol–Water Solutions Investigated Using <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014;53(22):9262-71.
52. Birkl C, Langkammer C, Golob-Schwarzl N, Leoni M, Haybaeck J, Goessler W, et al. Effects of formalin fixation and temperature on MR relaxation times in the human brain. *NMR Biomed*. 2016;29(4):458-65.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Strukturformel und Synthesereaktion des Formaldehyds .....	4
<b>Abb. 2:</b> Adduktbildung des Formaldehyds mit Lösungsmitteln .....	5
<b>Abb. 3</b> Schematische Darstellung der Spinecho (SE) - Sequenz .....	17
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der Inversion-Recovery-Sequenz .....	19
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung der Gradientenechosequenz.....	20
<b>Abb. 6:</b> Single Voxel Spectroscopy – Lokalisation des Voxels .....	26
<b>Abb. 7:</b> Schema einer PRESS-Sequenz.....	27
<b>Abb. 8:</b> Schema einer STEAM-Sequenz .....	28
<b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung der Spektrenentstehung .....	29
<b>Abb. 10:</b> Versuchsaufbau zu Experiment 1.....	38
<b>Abb. 11:</b> Versuchsaufbau zu Experiment 2.....	41
<b>Abb. 12:</b> Lokalisationsbilder und Messparameter der in vivo Spektren .....	43
<b>Abb. 13:</b> Versuchsaufbau zu Experiment 4.....	45
<b>Abb. 14:</b> Schematische Darstellung der Voxelpositionen für die Spektrenaufnahmen in den Fixierlösungen und den Lebergeweben.....	48
<b>Abb. 15:</b> Makroskopische Aufsicht aufgeschnittener formaldehyd- und alkylderivatfixierter Lebergewebe .....	53
<b>Abb. 16:</b> Arbeitsschritte zur histologischen Aufarbeitung.....	54
<b>Abb. 17:</b> Schematische Darstellung für die ROI Auswahl für die T <sub>1</sub> - und T <sub>2</sub> -Bestimmung .....	56

<b>Abb. 18:</b> T <sub>1</sub> - und T <sub>2</sub> -Bestimmung der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen .....	57
<b>Abb. 19:</b> <sup>1</sup> H-Signale der Fixierlösungen und der in vivo Spektren .....	60
<b>Abb. 20:</b> Spektrenvergleich der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung .....	61
<b>Abb. 21:</b> Spektrenvergleich der wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen .....	62
<b>Abb. 22:</b> T <sub>1</sub> -gewichtete Bildgebung der Lebergewebe .....	66
<b>Abb. 23:</b> T <sub>2</sub> -gewichtete Bildgebung der Lebergewebe .....	67
<b>Abb. 24:</b> PD-gewichtete Bildgebung der Lebergewebe .....	68
<b>Abb. 25:</b> Schematische ROI Auswahl zur Bestimmung von T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , des Magnetisierungstransfers und des Diffusionskoeffizienten .....	70
<b>Abb. 26:</b> T <sub>1</sub> -Maps der Lebergewebe in den Fixierlösungen über den gesamten Messzeitraum .....	72
<b>Abb. 27:</b> T <sub>2</sub> -Maps der Lebergewebe in den Fixierlösungen über den gesamten Messzeitraum .....	75
<b>Abb. 28:</b> MTR-Maps der Lebergewebe in den Fixierlösungen über die gesamte Messzeit .....	78
<b>Abb. 29:</b> Diffusionsbildgebung über den gesamten Messzeitraum .....	81
<b>Abb. 30:</b> Spektren der fließmittelhaltigen Formaldehydlösung im Verlauf .....	82
<b>Abb. 31:</b> Spektren der formaldehydfixierten Leber im Verlauf .....	83
<b>Abb. 32:</b> Spektren der fließmittelhaltigen Alkylderivatlösung im Verlauf .....	84
<b>Abb. 33:</b> Spektren der alkylderivatfixierten Leber im Verlauf .....	85
<b>Abb. 34:</b> Azan- und Hämatoxylin-Eosinfärbung der formaldehydfixierten Leber .....	87

**Abb. 35:** Azan- und Hämatoxylin-Eosinfärbung der alkylderivatfixierten Leber<sup>89</sup>

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Beeinflussung des Bildkontrastes durch die Einstellung der Repetitions- und Echozeit.....	21
<b>Tab. 2:</b> Lösungszusammensetzung der wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivatlösungen .....	36
<b>Tab. 3:</b> Lösungszusammensetzung der wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen .....	37
<b>Tab. 4:</b> Lösungszusammensetzung der Referenzlösungen .....	37
<b>Tab. 5:</b> Sequenzen und Messparameter zur T <sub>1</sub> -und T <sub>2</sub> -Bestimmung der wässrigen und fließmittelhaltigen Fixierlösungen .....	39
<b>Tab. 6:</b> Messparameter der Spektren der 10%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Alkylderivat- und der 4%igen wässrigen und fließmittelhaltigen Formaldehydlösungen .....	42
<b>Tab. 7:</b> Messparameter für die Bildgebung zur Darstellung der Kontrastveränderung .....	46
<b>Tab. 8:</b> Sequenzen und Messparameter zur T <sub>1</sub> -und T <sub>2</sub> -Bestimmung im Lebergewebe.....	47
<b>Tab. 9:</b> Sequenz und Messparameter für die Spektrenaufnahme in den Fixierlösungen und im Lebergewebe .....	47
<b>Tab. 10:</b> Verwendete Chemikalien und deren Hersteller für die histologischen Färbungen .....	51
<b>Tab. 11:</b> Absteigende Alkoholreihe nach Paraffineinbettung .....	52
<b>Tab. 12:</b> Aufsteigende Alkoholreihe für Paraffinschnitte .....	53
<b>Tab. 13:</b> T <sub>1</sub> und T <sub>2</sub> der wässrigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen...	58
<b>Tab. 14:</b> T <sub>1</sub> und T <sub>2</sub> der fließmittelhaltigen Alkylderivat- und Formaldehydlösungen .....	58
<b>Tab. 15:</b> T <sub>1</sub> (in ms) gewählter Regions of Interest (ROI) .....	71

<b>Tab. 16:</b> T <sub>2</sub> (in ms) gewählter Regions of Interest (ROI) .....	74
<b>Tab. 17:</b> Magnetisierungstranferratio (MTR) gewählter Regions of Interest (ROI) .....	77
<b>Tab. 18:</b> Apparent diffusion coefficient (ADC in 10 <sup>-6</sup> mm <sup>2</sup> /sec.) ausgewählter Regions of Interest (ROI) .....	80

## 8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Dissertation wurde in der Sektion für experimentelle Radiologie der Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsklinik für Radiologie in Tübingen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Fritz Schick durchgeführt.

Die Konzeption der Dissertation und die Versuchsaufbauten erfolgten in Zusammenarbeit mit der Sektion für experimentelle Radiologie der Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsklinik für Radiologie in Tübingen, unter der Leitung von Herrn Prof. Schick und dem Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Hirt (Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen).

Herr Prof. Schick, Dr. sc. hum. Dipl.-Phys. Petros Martirosian (Sektion für experimentelle Radiologie der Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsklinik für Radiologie in Tübingen), PD Dr. Jürgen Machann (Sektion für experimentelle Radiologie der Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsklinik für Radiologie in Tübingen), sowie Herr Prof. Dr. med. Bernhard Hirt, Prof. Dr. rer. nat. Lothar Just (Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen), Dr. rer. nat. Gerhard Feil (Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen), Dr. rer. nat. Peter Neckel (Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen), Frau Karin Seid (Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen) und Ulrich Mattheus (Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik des Departments für Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen) konzipierten die Dissertation und die Versuchsaufbauten mit und standen mir während der Zeit der Dissertation beratend zur Seite.

Die magnetresonanztomographischen Messeinstellungen erfolgten durch Dr. Petros Martirosian und die magnetresonanzspektroskopischen

Messeinstellungen durch Dr. Jürgen Machann. Die in vivo Vergleichsspektren zu Experiment 2 wurden von Dr. Jürgen Machann zur Verfügung gestellt. Die Datenaquirierung und sämtliche Versuche erfolgten, nach Einarbeitung durch Dr. Petros Martirosian und Dr. Jürgen Machann, eigenständig durch mich. Nach Anleitung von Herrn Prof. Schick, Dr. Petros Martirosian und Dr. Jürgen Machann wertete ich die Daten selbstständig aus.

Die verwendeten Fixierlösungen wurden von Frau Karin Seid hergestellt und von dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen für die Dissertation zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der histologischen Präparate erfolgte durch Herrn Dr. rer. nat. Peter Neckel, Frau Karin Seid und Herrn Ulrich Mattheus. Die Digitalisierung der histologischen Schnitte wurde von Herrn Dr. rer. nat. Peter Neckel vorgenommen.

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation nach Anleitung von Herrn Prof. Schick und Herrn Prof. Hirt, Dr. Petros Martirosian, Dr. Jürgen Machann, Prof. Just, Dr. Feil, Dr. Neckel, Frau Karin Seid und Herrn Ulrich Mattheus selbstständig verfasst habe und ich keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Tübingen, den

Anna-Karina Fichtner

## 9. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Fritz Schick für die Möglichkeit der fächerübergreifenden Promotion, wodurch ich, zwei mir sehr wichtige Fächer der Radiologie und Anatomie in der Dissertation verbinden konnte. Ich möchte mich herzlich für die stets freundliche, hilfsbereite und geduldige Unterstützung während dieser Zeit, sowie die jederzeit möglichen Gespräche, Ratschläge und die mir frei einteilbare Zeit, bedanken.

Ganz herzlich danke ich meinem Betreuer Dr. Petros Martirosian für seinen unermüdlichen Einsatz und seine Geduld sowie Zeit für Erklärungen, Fragen und Gespräche. Für die Unterstützung und die viel investierte Zeit bei den MR-Messungen, den Versuchsaufbauten, der Datenauswertung und den technischen Problemlösungen bin ich sehr dankbar.

Ich bedanke mich bei Dr. Jürgen Machann für seine Unterstützung bei der Spektroskopie, sowie der Hilfe bei der Datenauswertung und der zur Verfügung gestellten in-vivo Spektren, die für den Signalvergleich mit den Fixierlösungen in dem Experiment 2 dieser Dissertation dienten. Bei Dr. Günther Steidle möchte ich mich für die Unterstützung und Lösung computertechnischer Probleme bedanken. Ich bedanke mich bei Anja Fischer, die mir bei einigen meiner Messungen unterstützend zur Seite stand.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hirt, der den Brückenschlag für die Dissertation zwischen der Anatomie und der Radiologie möglich machte. Da durch das zur Verfügung gestellte neu entwickelte Alkylderivat und das etablierte Formaldehyd die vergleichende Untersuchung in der Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie der beiden Fixiermittel möglich wurde. Zudem bedanke ich mich für den regen Austausch bei den Besprechungen über den Fortschritt der Dissertation.

Frau Karin Seid danke ich für die Zusammenstellung der Fixierlösungen und den stetigen Austausch. Ich danke Herrn Dr. Feil für die geduldige Beantwortung meiner Fragen und den Informationsaustausch sowohl während gemeinsamer Besprechungen als auch außerhalb fester Termine. Herrn Dr. Neckel danke ich für die Hilfe bei dem Zuschnitt der Lebergewebe für die histologische Aufarbeitung

und bei der Digitalisierung der histologischen Schnitte, sowie der Hilfe bei der Benutzung des Programms ZEN 3.4 (blue edition) für die Bearbeitung der histologischen Bilder und den stetigen Austausch während und zwischen Besprechungsterminen. Herrn Prof. Just danke ich für den Austausch während der Besprechungen zu der Dissertation. Herrn Ulrich Mattheus danke ich herzlich für die Herstellung der histologischen Schnittbilder und der Färbung dieser.

Ich danke meinen Eltern, Heidi Fichtner und Uwe Teßmann-Fichtner, von ganzem Herzen mich in meinem bisherigen Weg immerzu unterstützt zu haben. Meiner Mutter, Heidi Fichtner, bin ich für die immerwährende Bestätigung meinen Weg beizubehalten und meinen Traum nicht aufzugeben, unendlich dankbar. Ich bedanke mich sehr herzlich bei meiner Schwester, Annelene Fichtner, meinem Vater, Uwe Teßmann-Fichtner und bei Christoph Weik für die Unterstützung während dieser Zeit und den hilfreichen Austausch.

Anerkennung möchte ich an dieser Stelle gegenüber, Edward J. Auerbach, Ph.D. und Małgorzata Marjańska, Ph.D. (Center for Magnetic Resonance Research and Department of Radiology, University of Minnesota, USA) für die Pulssequenzentwicklung für die Siemensplattform, die von der Universität von Minnesota unter einer C2P Vereinbarung zur Verfügung gestellt wurden, äußern.