

Aus dem Department für Anatomie Tübingen
Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik

**Untersuchung zur fixierenden Wirkung
des Stoffes Glucoprotamin®
in anatomischen Fixierungslösungen**

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

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

**vorgelegt von
Schauer, Jörg Michael**

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Bornemann

Tag der Disputation: 01.07.2019

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	IV
II. Tabellenverzeichnis	VI
III. Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Postmortale Zersetzung des menschlichen Körpers	3
1.2 Fixierung	4
1.3 Fixierungstechniken	4
1.3.1 Physikalische Fixierungstechniken	4
1.3.2 Chemische Fixierungstechniken	5
1.4 Fixierungslösungen	5
1.4.1 Formaldehydhaltige Fixierlösungen	5
1.4.2 Alkoholhaltige Fixierungslösungen	6
1.5 Der desinfizierende Wirkstoff Glucoprotamin®	6
1.6. Fragestellung	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Fixierungslösungen	9
2.1.2 Puffer	10
2.1.3 Geräte	10
2.1.4 Kits	11
2.1.5 Förster-Resonanzenergietransfer -(FRET-) Endoproteasenbibliothek	11
2.1.6 Tiere	11
2.1.7 Software	11
2.2 Methoden	12
2.2.1. Fixierung	12
2.2.2 Fotografie	12
2.2.3 Anwenderbefragung	13

2.2.4 Mikrobiologie	14
2.2.5 Enzymaktivitätsmessung mithilfe einer Förster-Resonanzenergietransfer- (FRET-) Endoproteasenbibliothek	14
2.2.6 Statistik.....	15
3. Ergebnisse	17
3.1. Identifizierung einer Glucoprotaminkonzentration für die Gewebefixierung	17
3.2 Fixierungsqualität verschiedener Glucoprotaminkonzentrationen an schwierig zu fixierendem Gewebe, wie zum Beispiel dem Gehirn	19
3.3 Die Fixierungswirkung von GPFL (26 g/l) fixierten Organen im Vergleich zu etablierten Fixierlösungen (FFL und EGFL) fixierten Organen.....	20
3.3.1 Gehirn	22
3.3.2 Herz.....	24
3.3.3 Lunge	26
3.3.4 Magen	28
3.3.5 Darm	30
3.3.6 Leber.....	32
3.3.7 Niere.....	34
3.3.8 Milz.....	36
3.3.9 Muskel.....	38
3.4. Haptische Beurteilung von GPFL fixierten Organen im Vergleich zu mit etablierten Fixierlösungen (FFL und EGFL) fixierten Organen.....	40
3.4.1 Gehirn	40
3.4.2 Lunge	40
3.4.3 Darm	41
3.5 Beurteilung der Fixierungseigenschaften vor dem Hintergrund der Nutzbarkeit der Fixierungen in studentischen und chirurgischen Kursen	43
3.5.1 Beurteilung von Gehirn, thorakalen Organen (Herz und Lunge) sowie des Muskels....	43
3.5.2 Beurteilung der Organe der Bauchhöhle (Magen, Darm, Leber, Niere und Milz)	46
3.6 Beurteilung makroskopisch sichtbarer Strukturen unterschiedlich fixierter Organe im Vergleich zu frisch entnommenen Organen.....	48
3.7 Beurteilung des Geruches unterschiedlich fixierter Organe.....	48

3.8 Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher Fixierungslösungen auf pathogene Mikroorganismen	50
3.9 Die Untersuchung einer enzymhemmenden Wirkung von GPFL.....	51
3.9.1 Proteasenaktivität von Gehirn, thorakalen Organen (Herz und Lunge) und Muskeln ...	54
3.9.2 Proteasenaktivität von Magen, Darm, Leber, Niere und Milz	55
4.Diskussion	57
4.1 Die Fixierungswirkung von Glucoprotamin.....	58
4.2 Einfluss von Glucoprotamin auf die Organstruktur, die haptischen und visuellen Eigenschaften	60
4.3 Beurteilung des Geruches verschiedener Fixierungslösungen.....	65
4.4 Weitere mögliche Vorteile der Verwendung des Stoffes Glucoprotamin in Fixierungslösungen	66
4.5 Abschließende Bemerkungen.....	68
5. Zusammenfassung.....	69
6.Literaturverzeichnis	71
7. Erklärung zum Eigenanteil	78

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln Glucoprotamin als Stoffgemisch aus A: Pyroglutamat B: Dodecylpropyldiamin/ Tetradecylpropyldiamin C: Kondensationsprodukt aus A und B (nach [44])	7
Abbildung 2: Vergleich unterschiedlich fixierter Gehirne nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	23
Abbildung 3: Vergleich unterschiedlich fixierter Herzen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	25
Abbildung 4: Vergleich unterschiedlich fixierter Lungen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	27
Abbildung 5: Vergleich unterschiedlich fixierter Magen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	29
Abbildung 6: Vergleich unterschiedlich fixierter Därme nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	31
Abbildung 7: Vergleich unterschiedlich fixierter Lebern nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	33
Abbildung 8: Vergleich unterschiedlich fixierter Nieren nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	35

Abbildung 9: Vergleich unterschiedlich fixierter Milzen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	37
Abbildung 10: Vergleich unterschiedlich fixierter Muskeln nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).....	39
Abbildung 11: Beurteilung des Geruchs unterschiedlich fixierter Organe durch eine Kontrollgruppe auf einer numerischen Rationalskala von 0=kein Geruch bis 10=angenehmer Geruch (ns=nicht signifikant, **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$; ****= $p<0,0001$).	49
Abbildung 12: Proteinnormierte relative Fluoreszenzaktivität verschieden fixierter Gehirne, Herzen, Lungen und Muskeln in Verhältnis zur jeweiligen unfixierten Kontrolle (n=3).	52
Abbildung 13: Proteinnormierte relative Fluoreszenzaktivität verschieden fixierter Magen, Därme, Lebern, Nieren und Milzen in Verhältnis zur jeweiligen unfixierten Kontrolle (n=3).	53
Abbildung 14: Verlauf der zur Proteinkonzentration normalisierten relativen Fluoreszenzintensität (RFU/ $\mu\text{g/ml}$ Protein) über 30 Minuten am Beispiel unterschiedlich fixierter Gehirnen, Herzen, Lungen und Muskeln über 30 min (n=3). Die Kinetikwerte der GPFL- und FFL-fixierten Gehirne überlagern sich. EGFL zeigt ein höheres Aktivitätsniveau.	54
Abbildung 15: Verlauf der zur Proteinkonzentration normalisierten relativen Fluoreszenzintensität (RFU/ $\mu\text{g/ml}$ Protein) über 30 Minuten am Beispiel unterschiedlich fixierter Magen, Därme, Lebern, Nieren und Milzen (GPFL 26 g/l, FFL, EGFL) und einer Kontrolle (dH ₂ O)..	56

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Lösungen, Volumenprozentanteil sowie die jeweilige Konzentration von Glucoprotamin	10
Tabelle 2: Auswirkungen verschiedener GP- Konzentrationen auf die optischen und haptischen Eigenschaften sowie den Geruch von fixierten Rattenkörper (Altersstufe P4).....	19
Tabelle 3: Übersicht über die haptischen Eigenschaften unterschiedlich fixierter Organe.	42
Tabelle 4: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung unterschiedlich fixierter und unfixierter Rattenkörper.	51

III. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ca.	circa
cm	Zentimeter
dH ₂ O / Aqua demin	Destilliertes Wasser
EGFL	Ethanol-Glycerin-Fixierungslösung
EU	Europäische Union
FFL	Formaldehydfixierungslösung
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
g	Gramm
GP	Glucoprotamin
GPFL	Glucoprotaminfixierungslösung
h	Stunde / Stunden
IARC	International Agency for Research on Cancer
kg	Kilogramm
l	Liter
LD	Letale Dosis
LD 50	Letale Dosis 50
m ³	Kubikmeter
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

mM	Millimol
mm	Millimeter
NRS	Numerische Rationalskala
OP	Operation/ Operations-
RFU	Relative Fluoreszenzintensität
RGB	Rot-Grün-Blau Farbraum
rpm	revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
s.a.	siehe auch

1. Einleitung

„Ärzte ohne Anatomie sind Maulwürfen gleich:
sie arbeiten im Dunkeln,
und ihrer Hände Tagewerk sind Erdhügel.“

Friedrich Tiedemann (1781-1861) [1]

Das Fach Anatomie und das Erlernen der Anatomie werden noch immer als unverrückbarer Eckpfeiler der ärztlichen Ausbildung angesehen [2]. Anatomisches Wissen wird in Vorlesungen, Seminaren und traditionell im Präparationskurs vermittelt. Hinzu kommt die Notwendigkeit von chirurgischem „Hands-on-Training“ zur ärztlichen Weiterbildung [3, 4]. Sowohl die studentische Ausbildung als auch das chirurgische Training in der ärztlichen Weiterbildung werden hauptsächlich an fixierten menschlichen Körperspendern durchgeführt [5, 6]. Eine große Herausforderung der heutigen Zeit sind neue chirurgische Techniken, die verbesserte Fortbildungsmöglichkeiten für Ärzte erfordern [7]. Diese führen zu einer steigenden Nachfrage nach möglichst lebensnahen Trainingsmöglichkeiten an menschlichen Körperspendern [8]. Somit ist der Bedarf an Fixierungstechniken und -methoden, welche die Präparate lebensnah erhalten und dabei ohne gesundheitliche Gefahren für den Präparierenden sind, verständlicherweise immens. Allerdings gibt es auf dem Feld der Fixierungstechniken und -lösungen noch viel Raum für Verbesserungen. Die in der ärztlichen Weiterbildung beliebte „Fresh-frozen“ Technik, bei der menschliche Körper nach dem Tode tiefgefroren werden und nach dem Auftauen als anatomische Präparate dienen, ist sehr realitätsnah [9-11]. Allerdings ist deren Verwendung durch die fortschreitende Autolyse des Gewebes deutlich limitiert [12], zudem geht von diesen Präparaten eine hohe Ansteckungsgefahr für den Präparierenden aus [5, 13-15]. Zusätzlich ist die natürliche Totenstarre weiterhin ausgeprägt [12]. Deshalb ist das Arbeiten an fixierten und damit nicht ansteckenden Präparaten aus gesundheitlichen Gründen zu bevorzugen. Die bisher bekannten Fixierungslösungen sind allerdings ebenfalls nicht ideal. Formaldehydhaltige Fixierungslösungen sind aufgrund des erhöhten Auftretens von Leukämien bei Anwendern in Anatomien, Pathologien und

in der Begräbnisindustrie in den Vereinigten Staaten [16] und durch nachgewiesene genotoxische Effekte [17] in Verruf geraten. Die Arbeitsgruppe der IARC hat im Jahr 2004 Formaldehyd als humankanzerogen eingestuft. Die EU stufte den Stoff 2014 als mutagen und kanzerogen ein [18]. Die Unfallkassen nahmen sich 2003 des Themas Formaldehyd im Gesundheitsdienst an und stellten hohe Formaldehydkonzentrationen in den anatomischen Präpariersälen fest [19-21]. 2015 wurde die maximale erlaubte Arbeitsplatzkonzentration (MAK) für Formaldehyd von 0,62 mg/m³ auf 0,37 mg/m³ gesenkt [22]. Infolgedessen wurden eine Verbesserung des technischen Arbeitsschutzes, im Sinne von Lüftungsanlagen, oder ein kompletter Ersatz des Formaldehyds notwendig [19, 20]. Die Verbesserung der Raumlüftung ist für die Anatomischen Institute aufwändig, kostenintensiv und teilweise aufgrund architektonischer Gegebenheiten unmöglich [23, 24]. Durch diese Verschärfungen in Bezug auf Formaldehyd sind die studentischen und chirurgischen Präparationskurse an den Anatomischen Instituten in Deutschland existenziell gefährdet. So wurde an der Universität Frankfurt bereits der Präparationskurs im Sommersemester 2015 abgesagt [25, 26]. Die Anatomische Gesellschaft veröffentlichte im April 2015 einen Brief des Vorstandes, in dem die Problematik der weitverbreiteten Nutzung von mit Formaldehydlösungen fixierten Körpern thematisiert wird [27]. Es wird darauf hingewiesen, dass die Möglichkeit der Schließung von Anatomischen Instituten durch die Landesunfallkassen besteht [27].

Andere Fixierungslösungen wie beispielsweise alkoholhaltige Fixierungen führen bei längerer Anwendung zu einer Schrumpfung und Härtung der Präparate [28], welche mit einer Verdampfung des Alkohols und daraus resultierend mit einem Verlust der Fixierungswirkung einhergehen [29, 30]. Bei alkoholhaltigen Fixierlösungen besteht zudem das Problem der Explosionsgefahr entstehender Dämpfe und damit des Brandschutzes [31]. Fixierungen, die weniger Formaldehyd enthalten, wie unter anderem die Fixierung nach Thiel [32, 33], sollen die Gesundheitsgefahr minimieren und bieten gleichzeitig eine haptisch verbesserte Gewebefixierung, die von vielen Chirurgen bevorzugt wird [4, 34-37]. Allerdings ist die Zusammensetzung dieser Fixierungen sowie deren Anwendung technisch sehr komplex. Zudem ist die Fixierungslösung nach Thiel sehr teuer [24]. Es gibt eine

Vielzahl von weiteren Fixierlösungen und Techniken, trotzdem ist die Suche nach einer kostengünstigen und nicht gesundheitsschädlichen Fixierungslösung, die das Gewebe lebensnah erhält, Gegenstand der aktuellen anatomischen Forschung [38-43]. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit nach einem ungiftigen Wirkstoff mit fixierender Wirkung gesucht. Hierbei geriet ein Stoff mit positiven antimikrobiellen Eigenschaften ins Blickfeld: Glucoprotamin[®], ein Tensid aus der Gruppe der Pyrrolidinderivate, das bisher nur im Zusammenhang mit einer stark antibakteriellen Wirkung publiziert wurde [44-50]. Der Wirkstoff Glucoprotamin ist durch die Firma Ecolab Healthcare markenrechtlich geschützt, aufgrund der besseren Lesbarkeit der Arbeit wird auf eine dem entsprechende gesonderte Kennzeichnung im Text verzichtet.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Glucoprotamin über die antibakterielle Wirkung hinaus eine fixierende Wirkung aufweist. Weiter sollen der genauere Wirkungsmechanismus und die Langzeitwirkung der Fixierung untersucht werden. Dabei stellt sich die Frage, ob Glucoprotamin eine fixierende Wirkung aufweist, die eine Hemmung der Gewebsautolyse und Veränderung der Proteinstrukturen mit sich bringt, oder ob es sich lediglich um eine Verzögerung des Gewebszerfalls als Zeichen bakteriellen Abbaus handelt. Bevor diese Fragestellung im Hinblick auf diese Arbeit detailliert dargestellt wird, sollen in den folgenden Kapiteln die weiteren Grundlagen der Fixierung, der Mechanismus des Gewebszerfalls und dessen Hemmung durch Fixierung, die Techniken der Fixierung und der im Zusammenhang mit Fixierung bisher unbekanntes Stoff Glucoprotamin besprochen werden.

1.1 Postmortale Zersetzung des menschlichen Körpers

Man unterscheidet frühe von späten Leichenveränderungen. Als frühe Leichenveränderungen gelten Totenflecken, Totenstarre und Totenkälte. Späte Leichenveränderungen sind Autolyse, Fäulnis und Verwesung. Autolyse bezeichnet den Prozess des Abbaus des Organismus durch körpereigene Enzyme. Hydrolytische Enzyme treten aus den Lysosomen ins Gewebe. Es kommt vor allem in

Organen, die wenig Bindegewebe enthalten, rasch zur Erweichung und zur Auflösung der Organstruktur (Gehirn, Milz). Fäulnis ist die Zersetzung von Gewebe durch anaerobe Bakterien. Dies geschieht überwiegend durch Reduktion. Des Weiteren kommt es zu oxidativen, aeroben Zersetzungs Vorgängen, vor allem durch Bakterien und Pilze. Diese Prozesse werden Verwesung genannt [51-53].

1.2 Fixierung

Außer der Verhinderung der postmortalen Veränderungen von Geweben werden an die anatomische Fixierung weitere Anforderungen gestellt. Nach Coleman und Kogan bedeutet Fixierung zum einen eine andauernde Erhaltung von Geweben und Organen ohne Deformation [54]. Zum anderen sollte die Beweglichkeit der inneren Organe weiter erhalten bleiben. Die Fixierungslösung darf nicht austrocknend wirken und sowohl vom Präparat als auch von der Fixierungslösung soll keine chemische oder mikrobiologische Gefahr für die Anwender ausgehen. Zudem soll das Gewebe in seiner natürlichen Farbe erhalten bleiben [54]. Eine weitere Anforderung, die an eine Fixierung gestellt wird, ist die Erhaltung des natürlichen, momentanen Zustands, bei dem die Eigenschaften Größe und Form des Gewebes unverändert bleiben [28]. In der Literatur werden zwei unterschiedliche Definitionen für die Erhaltung des Gewebes unterschieden [55]: Dabei ist die Fixierung der primäre Arrest der enzymatischen Aktivität, die für die körpereigene Autolyse und die mikrobielle Verwesung des Gewebes verantwortlich ist. Dagegen wird die Konservierung als Erhaltung des Fixierzustandes definiert [38].

1.3 Fixierungstechniken

1.3.1 Physikalische Fixierungstechniken

Unter den physikalischen Fixierungstechniken werden im Bereich der makroskopischen Anatomie nur das Kühlen bzw. das Gefrieren von Präparaten eingesetzt. Hierbei werden die Zersetzungs Vorgänge verlangsamt [29], so dass von einer Fixierung an sich keine Rede sein kann. Diese Methode wird bei den sogenannten Fresh-frozen-Präparaten angewandt. Diese Methode wird sehr häufig für

anatomisch-biomechanische Untersuchungen im Bereich der Orthopädie/Traumatologie verwendet [56-58] und wird als wertvoll in der plastischen Chirurgie angesehen [59]. Problematisch ist, dass die Zersetzung nicht gestoppt ist und dass der Zerfall des Gewebes weiter fortschreitet, sobald das Präparat aufgetaut wird [60, 61]. Die große Gefahr durch Keime, Viren und Prionen für den Anwender widerspricht der Anforderung an eine Fixierungstechnik [5, 13-15].

1.3.2 Chemische Fixierungstechniken

Wenn das zu fixierende Präparat in das Fixierungsmittel eingebracht wird, spricht man von Immersionsfixierung. Das Fixierungsmittel dringt von außen nach innen in das Präparat ein. Zudem können Fixierungsmittel auch durch Injektion eingebracht werden [28]. Kombinationen beider Techniken werden ebenfalls angewandt. Das Fixierungsmittel soll das Präparat komplett durchdiffundieren. So werden auch im Inneren des Präparates Verwesungsvorgänge gehemmt. Mit zunehmender Konzentration der Fixierlösung nimmt die Geschwindigkeit der Diffusion zu. So diffundiert eine 4 % Formaldehydlösung in 16 Stunden 4 mm tief, eine mit 10% in 16 Stunden 6 mm tief in das Gewebe ein [62].

1.4 Fixierungslösungen

1.4.1 Formaldehydhaltige Fixierlösungen

Die wässrige Lösung des Formaldehydgases wurde Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt. Ferdinand Blum und sein Vater beschrieben Ende des 19. Jahrhunderts zum ersten Mal den Einsatz von Formaldehyd als Fixierungsmittel [63-65]. Formaldehyd durchdringt Zellwände sehr gut und führt zur Ausbildung von stabilen Vernetzungen, sogenannten „Cross-Links“ zwischen Proteinen [66]. Des Weiteren wirkt es keimtötend und als Antioxidans [23]. Formaldehyd zeigt jedoch bei hohen Konzentrationen und längerer Lagerung die Tendenz zur Organhärtung und zum Farbverlust [67]. Bei zu niedrigen Konzentrationen kommt es zudem relativ schnell zu Pilzbefall [68]. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Formaldehyd stellt die Flüchtigkeit des Gases dar. Die 2015 nochmals reduzierte maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) ist streng geregelt [22] und führt dazu,

dass in Anatomischen Instituten aufwändige Absaugeinrichtungen eingebaut werden müssen [68, 69]. Die MAK-Grenzwerte können von den meisten Anatomischen Instituten in Deutschland nicht eingehalten werden [21]. Diese neue Problematik sorgt dafür, dass der Suche nach alternativen Fixiermethoden eine noch größere Bedeutung zukommt [16, 17]. Die EU klassifiziert Formaldehyd als kanzerogen und mutagen [18]. Die WHO erkennt bei Formaldehyd einen starken Zusammenhang zu dem Auftreten von Nasenrachen- sowie Nasennebenhöhlenneoplasien und sieht als Grund hierfür die genotoxischen Effekte des Formaldehyds. Weiter gibt es moderate Hinweise für gehäuftes Auftreten von Leukämien im Zusammenhang mit Formaldehyd [70]. Hinzu kommt, dass Formaldehyd die Atemwege reizt und Allergien hervorrufen kann [71].

1.4.2 Alkoholhaltige Fixierungslösungen

Alkoholhaltige Fixierungslösungen zählen zu den ältesten und etabliertesten Fixierungslösungen. Die Wirkung entfalten Alkohole, zumeist Ethanol, vor allem über den Entzug von Wasser aus Geweben, was gleichzeitig eine Schrumpfung des Präparates bewirkt [72]. Ferner verdunstet Alkohol leicht, dies kann man jedoch durch Zugabe von beispielsweise Glycerin verhindern [72]. Der weitverbreitetste Alkohol, Ethanol, kann zu einer Härtung der Präparate führen [28], was ebenfalls durch Zumischung von Glycerin verhindert werden soll [72]. Präparate bleiben so weicher als mit einer reinen Alkoholfixierung [72]. Solche Alkohol-Mischfixierungen sind teurer als die klassische Formaldehydfixierung [38]. Zudem wird beschrieben, dass Alkohole bei längerer Anwendung einen bleichenden Effekt auf Farben haben [72]. Alkoholdämpfe sind leicht entflammbar, daher müssen zusätzliche Schutzmaßnahmen bezüglich der Brand- und Explosionsgefahr eingehalten werden [38].

1.5 Der desinfizierende Wirkstoff Glucoprotamin®

Der Stoff Glucoprotamin wurde 1994 von K.H. Disch (Henkel Hygiene GmbH Düsseldorf) als „Neue antimikrobielle Substanz“ publiziert. Es gehört zu Gruppe der Pyrrolidinderivate. Das wachsartige, nicht flüchtige Glucoprotamin ist das

Umsetzungsprodukt von L-Glutaminsäure und Cocospropylen1,3-Diamin (Abbildung 1). Es ist wirksam gegen Bakterien, Pilze, Mykobakterien und behüllte [44, 45] sowie teilweise auch gegen unbehüllte Viren. Bezüglich der Toxizität gilt Glucoprotamin als weitgehend unkritisch. Bei Ratten ergab sich bei oraler Gabe eine letale Dosis (LD 50) von $>222 < 600$ mg/kg, bei dermalen Anwendung eine LD50 von >400 mg/kg [44]. Im Rahmen von Langzeittoxizitätstests an Ratten war bei einer täglichen Applikation von 10 mg/kg kein Effekt sichtbar [44]. Ferner wurde keine Sensibilisierung und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine Mutagenität nachgewiesen [44]. Bezüglich seiner ökologischen Wirkung gilt Glucoprotamin als biologisch abbaubar [44, 47]. Glucoprotamin ist schädlich für Wasserorganismen und kann in Gewässern längerfristig negative Wirkung haben [73]

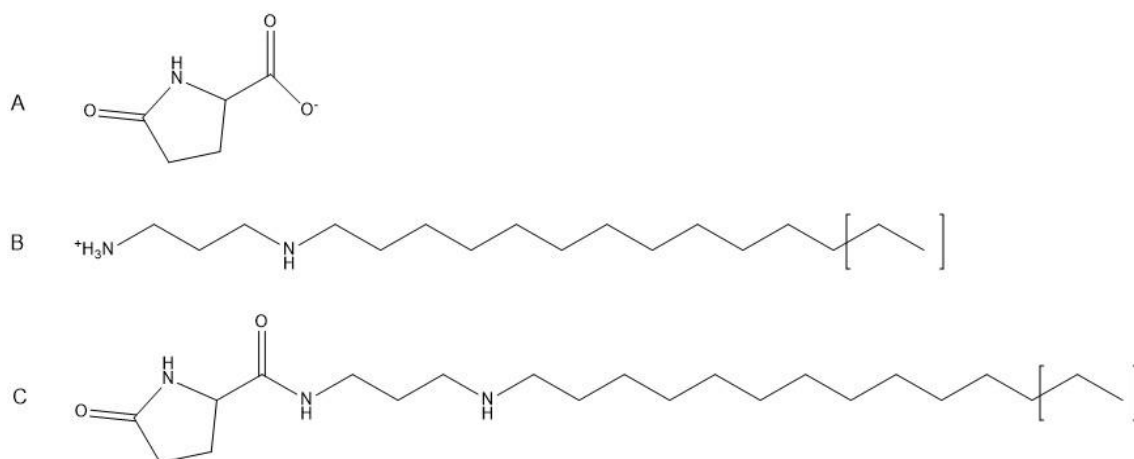


Abbildung 1: Strukturformeln Glucoprotamin als Stoffgemisch aus A: Pyroglutamat B: Dodecylpropyldiamin/ Tetracyclpropyldiamin C: Kondensationsprodukt aus A und B (nach [44])

1.6. Fragestellung

In dieser Arbeit soll die fixierende Wirkung des Stoffes Glucoprotamin untersucht werden. Hierzu sollen im Detail die untenstehenden Fragen besondere Berücksichtigung finden:

1. Hat der Wirkstoff Glucoprotamin eine ähnliche Fixierungswirkung wie die etablierten Fixierungslösungen Formaldehyd und Ethanol-Glycerin?

Ermittlung einer geeigneten Konzentration des Wirkstoffes Glucoprotamin für die Fixierung.

Untersuchung der Fixierungswirkung von Glucoprotamin an verschiedenen Organen

2. Wie ist die Qualität von Glucoprotamin-fixiertem Gewebe im Vergleich zu Formaldehyd- und Ethanol-Glycerin-fixiertem Gewebe?

Beurteilung der Eigenschaften von unterschiedlich fixiertem Gewebe im Vergleich zu unfixiertem, frischem Gewebe durch eine Anwendergruppe aus Ärzten, Anatomen und Medizinstudenten mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens.

3. Sind Glucoprotamin-fixierte Gewebe frei von Mikroorganismen?

Untersuchung des anti-mikrobiellen Effekts von Glucoprotamin im Vergleich zu Formaldehyd und Ethanol-Glycerin mit Hilfe von Abstrichen aus fixiertem Rattengewebe.

4. Inhibiert Glucoprotamin die Gewebsautolyse durch Enzymhemmung?

Untersuchung der enzymhemmenden Wirkung von Glucoprotamin mit Hilfe eines Försters-Resonanzenergietransfers (FRET)-basierten Enzymaktivitätstests.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Fixierungslösungen

Standardchemikalien wurden, soweit nichts anders angegeben, von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.1.1.1 Formaldehyd-Fixierungslösung des Anatomischen Institutes der Universität Tübingen (FFL)

Die FFL besteht zu 45,5% aus Ethanol (96%), zu 27,7% aus Glycerin (86%), zu 5,5% aus Formaldehyd (37%), zu 3,6 % aus Lysoformin (Dr. Hans Rosemann, Berlin, Deutschland) in Wasser.

2.1.1.2 Ethanol-Glycerin-Fixierungslösung (EGFL)

Die EGFL besteht zu 70% aus Ethanol (96%), zu 29,83% aus Glycerin (86%) und zu 0,17% aus Lysoformin (Dr. Hans Rosemann GmbH) in Wasser.

2.1.1.3 Glucoprotaminfixierungslösung (GPFL)

Premier Klercide-CR[®] Biozid T (Ecolab Healthcare Deutschland GmbH, Monheim, Deutschland)

Incidin[®] PLUS (Ecolab Healthcare Deutschland GmbH, Monheim, Deutschland).

Beide Produkte enthalten pro 100 ml Lösung 26 g Glucoprotamin und stellen zu verdünnende Konzentrate dar. Beide Lösungen wurden zur Herstellung der unterschiedlich konzentrierten Lösungen mit dH₂O entsprechend verdünnt. Des Weiteren enthalten diese Produkte die Stoffe 2-(2-Butoxyethoxy) Ethanol (10-20 Volumenprozent), 2-Phenoxyethanol (10-20 Volumenprozent) und Fettalkoholethoxylate (2-5 Volumenprozent).

GPFL	Volumenprozentanteil Glucoprotamin in der Endlösung	Glucoprotamin (g/l)
1	0,26%	2,6
2	0,39%	3,9
3	1,04%	10,4
4	2,08%	20,8
5	2,6%	26,0
6	3,12%	31,2
7	3,90%	39,0
8	13,00%	130,0
9	19,50%	195,0

Tabelle 1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Lösungen, Volumenprozentanteil sowie die jeweilige Konzentration von Glucoprotamin

2.1.2 Puffer

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS): PBS-Puffertabletten pH 7,4 für 1l (Appli-Chem).

Eine Tablette in einen Kolben oder ein Becherglas vorlegen. Bei RT ca. 50 % des Endvolumens entmineralisiertes Wasser zugeben und einige Minuten rühren. Mit Wasser auf Endvolumen auffüllen und bis zum vollständigen Lösen rühren.

Proteinlyse-Puffer: 20 mM Tris Base; 1% Triton-X-100, pH 8,0

2.1.3 Geräte

Reprosystem R1 (Kaiser Fototechnik GmbH, Buchen, Deutschland) Nikon D 300-Kamera (Nikon Cooperation, Tokyo, Japan)

Nikon AF-S VR Micro-Nikkor 105 mm Teleobjektiv (Nikon Cooperation, Tokyo, Japan)

Philips Mixer Pro Blend 6 HR 2093 (Koninklijke Philips N.V., Eindhoven, Niederlande)

Minilyse- Arbeitsplatz- Homogenisator (PeqLab, VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland)

Qubit (Life technologies/ Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

Infinite M200 Microplate Reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz)

10, 100 und 1000 µl Pipetten (Gilson Inc, Middleton WI, USA)

2.1.4 Kits

Qubit Protein Assay (PeqLab, VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland)

Precellys Keramik Kit 1.4 2.8 mm (PeqLab, VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland)

2.1.5 Förster-Resonanzenergietransfer -(FRET-) Endoproteasenbibliothek

Die FRET-Endoproteasenbibliothek wurde freundlicherweise von AOR Dr. Hubert Kalbacher, Interfakultäres Institut für Biochemie der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt [74].

2.1.6 Tiere

Die Wistarratten wurden von Charles-River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in der hauseigenen Tierhaltung gehalten. Nach der durch das Regierungspräsidium Stuttgart genehmigten Organentnahme (Tieranzeige Organentnahme vom 05.06.2014) für andere Forschungsprojekte wurden die verbleibenden Organe bzw. Tierkörper für diese Untersuchungen verwendet.

2.1.7 Software

Software i-control™ V1.3 (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz)

Adobe Photoshop CC (Adobe Systems, San Jose, USA 2015)

CorelDraw X6 (64-Bit) (Corel Corporation, Ottawa, Kanada 2013)

Graph Pad Prism for Windows (Version 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA 2014)

Microsoft Excel und Word 2016 (Microsoft Cooperation, Redmond USA)

2.2 Methoden

2.2.1. Fixierung

In elf unabhängigen Versuchen wurden Wistarrattenkörper und Organe der postnatalen Entwicklungsstufen Tag 4 (P4) und adulter Ratten (P31) in Formaldehyd-Fixierungslösung, Ethanol–Glycerin-Fixierungslösung sowie Glucoprotamin-Fixierungslösung unterschiedlicher Konzentrationen immersionsfixiert. Die Kontrollgruppe wurde in dH₂O verbracht. In den ersten drei Versuchen wurde das Glucoprotamin-haltige Flächendesinfektionsmittel Incidin® PLUS benutzt. Dieses Reinigungsmittel ist grün gefärbt, was eine Beurteilung der Farbe des fixierten Gewebes erschwerte bzw. unmöglich machte. Daher wurde in den darauffolgenden Versuchen das ungefärbte Reinraumdesinfektionsmittel Premier Klercide-CR® Biozid T als Konzentrat verwendet. Die Organe sowie die Tiere wurden in 50 ml der jeweiligen Lösung bei Raumtemperatur immersionsfixiert. Am zweiten Tag wurde die Fixierlösung gewechselt. Im weiteren Verlauf wurden die Tierkörper/Organe nach fünf bis sieben Tagen aus der Fixierlösung entnommen und in Petrischalen überführt. In diesen wurden die Präparate bis zu 131 Tage (im Durchschnitt 51 Tage) verwahrt, begutachtet und der Organ- bzw. Gewebeerhalt sowie die Fixierwirkung und -dauer wurde fotografisch dokumentiert. Da die Fixierungswirkung des Stoffes Glucoprotamin bisher völlig unbekannt war, wurden in ersten Versuchen unterschiedlich hohe Konzentrationen des Stoffes getestet. Im Laufe der darauffolgenden Versuche wurden dann drei Konzentrationen mit optimalen Ergebnissen gewählt und verwendet.

2.2.2 Fotografie

Die Fixierwirkung, -dauer sowie der Gewebezustand der fixierten Tierkörper und Organe wurden regelmäßig fotografisch dokumentiert. Hierzu wurden die fixierten Organe und Tiere aus den Petrischalen entnommen und mit einer Nikon D 300-Kamera und einem Nikon Micro-Nikkor 105 mm Teleobjektiv fotografiert. Die Blendenzahl betrug F/16, die Belichtungszeit 1/125 Sekunden, die Belichtungsempfindlichkeit betrug ISO 800 und der Abstand zum jeweiligen Objekt 55 cm.

2.2.3 Anwenderbefragung

Vierzehn Probanden (Chirurgen, Anatomen und Medizinstudenten) wurden gebeten die unterschiedlich fixierten Organe mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Anhang 8.1) mit frisch entnommenen Organen zu vergleichen. Folgende Organe aus adulten Wistarratten (P31) wurden evaluiert: Gehirn, Herz, Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere, Milz und Muskel.

Der Fragebogen enthielt drei Fragestellungen mit jeweils vier bzw. fünf verschiedenen Items. Die erste Fragestellung bezog sich auf allgemeine Gewebeeigenschaften. Mit einer 7-Punkt-Ratingskala wurden die Items Farbe, Abgrenzbarkeit topografischer Strukturen, Festigkeit und Elastizität von fixierten adulten Wistarratten-Organen (eine Woche in jeweils Formaldehyd-Fixierungslösung, Ethanol-Glycerin-Fixierungslösung, Glucoprotamin-Fixierungslösung) im Vergleich zu frisch entnommenen adulten Organen abgefragt. Zusätzlich zu den Extremen „Nicht erhebbar“ (=0) sowie „Wie Frisch“ (=6) und den 5 Punkten dazwischen wurde noch die Antwortmöglichkeit „Nicht untersucht“ angeboten. Die zweite Fragestellung bezog sich auf die Identifikationsqualität von Strukturen. Hier wurde die Vergleichbarkeit der Items Muskel, Faszien, Bänder, Blutgefäße und Nerven von fixierten adulten Wistarratten-Organen (eine Woche Fixierung in Formaldehyd-Fixierungslösung, Ethanol-Glycerin-Fixierungslösung, Glucoprotamin-Fixierungslösung) im Vergleich zu frisch entnommenen adulten Organen abgefragt. Ebenso wurde zu den Extremen „Nicht erhebbar“ (=0) sowie „Wie Frisch“ (=6) und den 5 Punkten dazwischen wurde noch die Antwortmöglichkeit „Nicht untersucht“ angeboten. Die letzte Fragestellung zielte mit einer 11-Punkt-Ratingskala auf den Geruch ab. Es wurden zu den Extremen „unangenehm“ (=1) und „angenehm“ (=10) noch die Möglichkeit „kein Geruch“ (=0) angeboten.

Zur Auswertung wurde vor der Erstellung des Fragebogens ein Scoring-Modell entwickelt, über das die Befragten nicht informiert waren. Dieses gab den verschiedenen Items eine unterschiedliche Gewichtung, basierend auf der Bedeutung von Fixiereigenschaften für die Nutzung in studentischen Kursen und chirurgischen Trainingskursen. So wurde den Items Farbe und Abgrenzbarkeit topografischer Strukturen einfach, das Item Festigkeit doppelt und das Item Elasti-

zität dreifach bewertet. Die Eigenschaften Elastizität und Festigkeit wurden deshalb höher gewertet, weil diese für ein realitätsnahes Präparieren und Operieren an fixierten Präparaten die wichtigste Voraussetzung darstellen.

2.2.4 Mikrobiologie

Zehn Tierkörper von Wistarratten (P4) wurden in einem Mixer zerkleinert und das Gewebe gleichmäßig mit je 50 ml Formaldehyd-, Ethanol-Glycerin und Glucoprotaminfixierungslösung versetzt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Aqua demin. gewählt. Die Tierkörper wurden zerkleinert um einen besseren Aufschluss der keimtragenden Körperregionen wie beispielsweise des Gastrointestinaltrakts zu erreichen. Nach einer Fixierungsdauer von drei Tagen wurden mikrobiologische Abstriche aus dem Gemisch entnommen und im Labor Niebecker, Gynmedlab, Ochtrup, Deutschland auf sechs Nährböden ausgestrichen (Blutagar, McConkey-Agar, Chrom-Agar, Kochblutagar, Schaedler-Blut-Agar und Schaedler-Kochblutagar). Ebenso wurden eine anaerobe und eine aerobe Bouillon beimpft. Alle Proben wurden 48 Stunden bebrütet. Die aeroben Medien wurden in einem CO₂-Brutschrank verwahrt. Mit den anaeroben Medien wurde gleich verfahren, allerdings unter O₂-Entzug. Die aeroben Nährmedien wurden nach 24 Stunden begutachtet. Nach 48 Stunden wurden alle Proben abschließend beurteilt. Somit wurde das komplette Keimspektrum inklusive Pilzen erfasst.

2.2.5 Enzymaktivitätsmessung mithilfe einer Förster-Resonanzenergietransfer- (FRET-) Endoproteasenbibliothek

2.2.5.1 Messprinzip

Um den Effekt von Glucoprotamin auf die Enzymaktivität von Endoproteasen zu bestimmen, wurde ein Tecan Spectra Fluorometer (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) und eine Förster-Resonanzenergietransfer- (FRET-) Endoproteasenbibliothek, die über 2,5 Millionen Peptide enthält und auf der Fmoc/t-Bu Strategie basiert, verwendet [74]. Das Prinzip dieses Hochdurchsatzmessverfahrens basiert auf dem MCA-Fluorophor als Donor und dem 2,4-dinitrophenyl-Rest als Quencher, die an die Peptide gekoppelt sind. Sobald die Protease die Peptide

spaltet, werden der Donor und der Quencher voneinander getrennt und es kommt zu einem starken Fluoreszenzsignal. Die Proteasenaktivität ist somit direkt proportional zum Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität.

2.2.5.2 Ablauf

Für die Durchführung der Enzyminhibierungstests wurden je drei verschiedene Organe (Gehirn, Herz, Lunge, Magen, Darm, Niere, Milz, Muskel) der juvenilen Wistarratten (P3) entweder mit Glucoprotaminfixierungslösung 26 g/l, Formaldehydfixierungslösung oder Ethanol-Glycerin-Fixierungslösung inkubiert. Der Lösungswechsel fand nach 3 Tagen statt. Nach 7 Tagen wurden 50 mg der jeweiligen Organe dreimal in 1x PBS und einmal mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Precellys Keramik-Kit in einem Minilyser-Homogenisator in Proteinlysepuffer für dreimal 30 s bei 5000 rpm homogenisiert. Als Positivkontrolle dienten unfixiertes, frisch präparierte Rattenorgane (n=3). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Qubit Protein Assay wurden die Ansätze zentrifugiert und 10 µl des Lysatüberstands mit 80 µl Tris-Puffer (100mM, pH 7,4) und 10 µM der FRET-basierten Peptid-Bibliothek (2,5 x 10⁻⁶ Peptide; [74]) versetzt. Der Enzymtest wurde somit mit einem Endvolumen von 100 µl pro Well in schwarzen Mikroliterplatten durchgeführt. Drei technische Replikate wurden von jeder einzelnen Probe gemessen. Drei Replikate der Negativkontrolle ohne Lysatüberstand wurden ebenfalls in jedem Experiment mitbestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität (RFU) wurde sofort mit Hilfe eines Infinite M200 Microplate Reader (Tecan) bei einer Exzitation von 320 nm und einer Emission von 405 nm bestimmt. Für jedes Experiment wurden 30 Zyklen mit einem Kinetikintervall von 60 s, bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte normalisiert zur jeweilig vorher gemessenen Proteinkonzentration.

2.2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm GraphPad PRISM (Version 5) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit Hilfe des D'Agostino-Pearson Test auf Normalverteilung überprüft.

Die Daten waren nicht normalverteilt. Die Differenzen zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe der Kruskal-Wallis One Way Varianzanalyse ermittelt. *P* Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung einer Glucoprotaminkonzentration für die Gewebefixierung

Zur Ermittlung einer geeigneten Fixierungs-Konzentration von Glucoprotamin wurden unterschiedlich konzentrierte GPFL eingesetzt (GP in dH₂O siehe Kapitel 2.1.1.3). In GPFL mit GP-Konzentrationen von 2,6 g/l, 3,9g/l, 10,4 g/l, 20,8 g/l, 26,0 g/l, 31,2 g/l, 39,0 g/l, 130,0 g/l, 195,0 g/l sowie in dH₂O als Kontrolle wurden insgesamt 14 Rattenkörper (postnatal Tag 14) eingebracht. Nach sieben Tagen wurden die Körper aus der Fixierlösung entnommen und weiter trocken im offenen Gefäß bei RT gelagert. Innerhalb von drei Wochen wurden im Abstand von jeweils zwei Tagen die GP-behandelten Körper begutachtet und mit den dH₂O-behandelten Kontrollen verglichen. Nach vier Tagen in GPFL 2,6 g/l konnten keine Anzeichen der Verwesung, wie Lyse des Gewebes, Fäulnis, Schimmelbefall und Gasbildung, der Rattenkörper festgestellt werden. Auch die in den GPFL-Lösungen mit anderer Konzentration inkubierten Tierkörper zeigten keine Anzeichen von Verwesung. Mit allen verwendeten GPFL, von 2,6 g/l bis 195,0 g/l, konnte somit eine Fixierung der Tierkörper erzielt werden. Im Gegensatz dazu waren die Kontrollen bereits nach zwei Tagen unter starker Gasbildung komplett verwest. Die Fixierungswirkung war nach drei Wochen Lagerung bei RT bei allen mit unterschiedlichen GP-Konzentrationen behandelten Körpern vorhanden Die Tierkörper wiesen jedoch alle eine deutliche Grünfärbung, abhängig von der Konzentration der GPFL (je höher die Konzentration, desto grüner das Gewebe), auf. Die Ursache hierfür war, dass das Reinigungs- und Flächendesinfektionsmittel Incidin® Plus grün gefärbt ist.

Zwischen den mit unterschiedlich konzentrierten GPFL fixierten Tierkörpern zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Gewebequalität, der Farbe, der Elastizität der Haut und der Beweglichkeit der Extremitäten. Die niedrig GP-konzentrierten GPFL 2,6 g/l, 3,9g/l und 10,4 g/l zeigten eine Fixierungswirkung. Optisch war das Gewebe bei diesen Konzentrationen gräulich verfärbt, ohne dass Schrumpfarmefakte zu erkennen waren. Alle mit GPFL fixierten Gewebe waren überwiegend weich und elastisch. Allerdings war bei Fixierung mit GPFL 10,4 g/l die Elastizität des Gewebes reduziert und der Darm bei GPFL 2,6 g/l schleimig

und deutlich aufgebläht (siehe Tabelle 2). Außerdem zeigten sich beim Lösungswechsel bei diesen niedrig konzentrierten GPFL eine deutliche Trübung und viele Schwebstoffe in der Fixierlösung. Die mit GPFL 20,8 g/l und 26,0 g/l fixierten Tierkörper waren bezüglich ihrer haptischen und visuellen Eigenschaften des Gewebes ähnlich der *in vivo* Situation. Das Gewebe war weich und elastisch ohne Anzeichen von Schrumpffartefakten (siehe Tabelle 2). Aus der Fixierung mit GPFL 130,0 g/l und 195,0 g/l resultierte eine deutliche Schrumpfung und Härtung des Gewebes und eine Versteifung der Extremitäten. Der Geruch war bei allen Fixierlösungen in Abhängigkeit von der Konzentration durch die Parfümierung des Incidin® Plus sehr angenehm (siehe Tabelle 2).

GP –Konzentration (g/l)	Optik	Haptik	Geruch
2,6	graue Verfärbung, keine Schrumpfung	weich, elastisch	angenehm
3,9	blasse Farbe, keine Schrumpfung	weich, elastisch	angenehm
10,4	graue Verfärbung, keine Schrumpfung	sehr weich, keine Elastizität mehr	angenehm
20,8	ähnlich <i>in-vivo</i>	weich, elastisch	angenehm
26,0	ähnlich <i>in-vivo</i>	weich, elastisch	angenehm
31,2	grüne Verfärbung, keine Schrumpfung	fest, Extremitäten steif	angenehm
39,0	Grüne Verfärbung, Gewebeschrumpfung	fest, Extremitäten steif	angenehm
130,0	grüne Verfärbung, starke Gewebeschrumpfung	fest, Extremitäten steif	angenehm
195,0	grüne Verfärbung, starke Gewebeschrumpfung	fest, Extremitäten steif	angenehm

Tabelle 2: Auswirkungen verschiedener GP- Konzentrationen auf die optischen und haptischen Eigenschaften sowie den Geruch von fixierten Rattenkörper (Altersstufe P4).

3.2 Fixierungsqualität verschiedener Glucoprotaminkonzentrationen an schwierig zu fixierendem Gewebe, wie zum Beispiel dem Gehirn

Das Gehirn stellt aufgrund seines hohen Lipidanteils und seiner bereits *in vivo* großen Vulnerabilität ein schwierig zu fixierendes Organ dar [54]. Zur Ermittlung einer geeigneten GP-Konzentration für die Fixierung des Gehirns wurden sagittal halbierte Gehirnhälften von Ratten (P4) in GPFL 2,6 g/l, 10,4 g/l, 20,8 g/l, 26,0

g/l, 39,0 g/l, GP-Konzentration) und dH₂O (Kontrolle) eingebracht. Die Lösungen wurden jeweils nach zwei Tagen gewechselt, die Organe nach sieben Tagen aus der Lösung entnommen und die Fixierungswirkung und Gewebequalität über einem Zeitraum von zwei Wochen im Abstand von zwei Tagen dokumentiert. Innerhalb dieses Zeitraums zeigte sich bei allen GP-Konzentrationen eine Fixierungswirkung mit deutlichem Strukturerehalt des Gewebes, ohne Lyse des Gewebes, Schimmelbefall, Fäulnis und Gasbildung. Alle GPFL-Konzentrationen führten zu einer gewissen Entfärbung der Organe, allerdings mit weniger stark grüner Färbung durch Incidin[®] Plus als bei der Fixierung der vollständigen Tierkörper beobachtet wurde (siehe 3.1.1). Im Gegensatz dazu waren die Kontrollgehirne nach fünf Tagen fast aufgelöst und nicht mehr identifizierbar. Die mit GPFL 2,6 g/l fixierten Gehirnhälften waren nach einer Woche ebenfalls komplett zersetzt. Die mit GPFL 10,4 g/l fixierten Gehirnhälften wurden nach zwei Wochen bröckelig, trocken und zerfielen beim Anfassen mit der Pinzette. Die mit GPFL 20,8 g/l fixierten Gehirnhälften zeigten nach knapp zwei Wochen deutliche Trocknungserscheinungen und waren nicht mehr als Gehirn zu erkennen. Die mit GPFL 26 g/l fixierten Gehirnhälften waren nach zwei Wochen elastisch, weich und makroskopisch als Gehirn zu erkennen. Die mit GPFL 39 g/l fixierten Gehirnhälften waren nach zwei Wochen sehr klebrig und weich.

Als Resultat der Versuche in Kapitel 3.1. wurde im weiteren Verlauf nur noch GPFL 26 g/l verwendet. Diese GP-Konzentration zeigte in Bezug auf die visuellen und haptischen Kriterien des fixierten Gewebes die beste Fixierungsqualität.

3.3 Die Fixierungswirkung von GPFL (26 g/l) fixierten Organen im Vergleich zu etablierten Fixierlösungen (FFL und EGFL) fixierten Organen

Um genauere Kenntnis über die Fixiereigenschaften und –qualität von Glucoprotamin auf unterschiedliche Organe und Gewebe zu erhalten, wurden verschiedene Rattenorgane entnommen und direkt nach der Entnahme fotografiert. Anschließend wurden die Organe mit GPFL 26 g/l, Formaldehyd-Lösung (FFL) oder Alkohol-Glycerin-Lösung (EGFL) über sieben Tage immersionsfixiert, dann entnommen und über einen Zeitraum von bis zu 131 Tagen bei Raumtemperatur in Petrischalen gelagert. In den vorausgegangenen Versuchen (siehe 3.1 und 3.2)

hatte sich gezeigt, dass Incidin® Plus durch seine Grünfärbung das Gewebe verfärbt. Um eine exakte Beurteilung der visuellen Eigenschaften von GP-fixiertem Gewebe durchführen zu können, wurde in den folgenden Untersuchungen das Produkt Premier Klercide-CR Biozid T® gewählt. Dieses käufliche Produkt ist in seiner GP-Konzentration und sonstigen Zusammensetzung (siehe 2.1.1.3) identisch mit Incidin® Plus, ist aber als Reinraumdesinfektionsmittel nicht grün eingefärbt, sondern als klare Lösung erhältlich. Als Negativkontrolle dienten in dH₂O eingelegte Organe. Die einzelnen Organe wurden haptisch und visuell mindestens einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 131 Tagen beurteilt und dokumentiert. Zusätzlich wurde die Fixierungswirkung von Tag sieben (Entnahme aus der Fixierlösung) bis zum Tag 32, also sieben Tage in der Fixierlösung und 25 Tage bei Raumtemperatur, fotografisch dokumentiert. Die Fotodokumentation erlaubte eine visuelle Beurteilung der unterschiedlich fixierten Organe im Vergleich zu frisch entnommenem Gewebe. Bei den Negativkontrollen kam es ausnahmslos innerhalb der ersten Woche zur Lyse, begleitet vom Entstehen von Fäulnisgasen. Zusammenfassend zeigte sich, dass GPFL fixiertes Gewebe bis zu 131 Tage (maximaler Beobachtungszeitraum) in einer Petrischale bei Raumtemperatur aufbewahrt werden konnte. Die Qualität der Fixierung und der Erhalt der Gewebeeigenschaften der mit den unterschiedlichen Lösungen fixierten Organe unterschieden sich jedoch deutlich voneinander. So zeigte mit GPFL fixiertes Gewebe im Gegensatz zur Fixierung mit FFL und EGFL keine Schrumpfung des Gewebes im Vergleich zu frischem Gewebe. Bei Gehirn, Darm und Magen kam es zu einer Größenzunahme der GPFL-fixierten Organe im Vergleich zu frisch entnommenem Gewebe. Der Farberhalt des GPFL ist im Vergleich zu FFL bei den meisten Organen schlechter. Die mit EGFL fixierten Organe verfärbten sich ebenfalls nach der Fixierung, allerdings nicht wie bei GPFL grau-weißlich, sondern braun-gelblich. Die Fixierwirkung auf den Darm und die Lunge war durch GPFL nicht ausreichend. Der Darm war nach der Fixierung mit GPFL weich und aufgedunsen und die Lunge zerfiel bereits nach Entnahme aus der Fixierlösung. Im Folgenden wird auf die Organe einzeln eingegangen.

3.3.1 Gehirn

Nach sieben Tagen in GPFL 26 g/l war das fixierte Gehirn makroskopisch gut erhalten. Es kam im Vergleich zu frisch entnommenem Gewebe (Tag 0) zu einer kompletten Entfärbung des Gewebes. Nach sieben Tagen in Lösung sowie weiteren 25 Tagen bei Raumtemperatur war die Struktur des Organes noch erhalten. Das Gehirn war im Vergleich zum frisch entnommenen Gewebe aufgequollen und die charakteristische Furchung des Gehirns war kaum noch erkennbar. Die Blutgefäße waren visuell nicht mehr zu erkennen. Mit FFL fixiertes Gewebe war makroskopisch gut erhalten. Nach Entnahme aus der Fixierlösung (Tag 7) war das Gehirn im Vergleich zu frisch entnommenem Gewebe geschrumpft, diese Schrumpfung war nach weiteren 25 Tagen an Luft bei RT noch deutlicher zu erkennen. Das Gehirn war nach Entnahme aus der Fixierungslösung im Vergleich zu frisch entnommenem Gehirn ebenfalls stark entfärbt, im Vergleich zu GPFL-fixiertem Gehirn aber nicht komplett weiß verfärbt. Während der Lagerung bei RT verfärbte sich das Gehirn gelblich. Die Blutgefäße waren nur noch undeutlich zu erkennen. Das mit EGFL fixierte Gewebe war makroskopisch gut erhalten. Es zeigte sich nach Entnahme aus der Fixierlösung an Tag 7 im Vergleich zu den anderen Fixierungslösungen und zu frischem Gewebe eine deutliche Schrumpfung des Gehirns, die sich nach weiteren 25 Tagen noch verstärkte. Das Gewebe entfärbte sich nach der Fixierung ebenfalls, allerdings nicht wie bei den beiden anderen Fixierungen ins Weißliche, sondern deutlich braun. Die Blutgefäße waren wie bei GPFL fixiertem Gewebe fast nicht mehr zu erkennen (Abbildung 2).

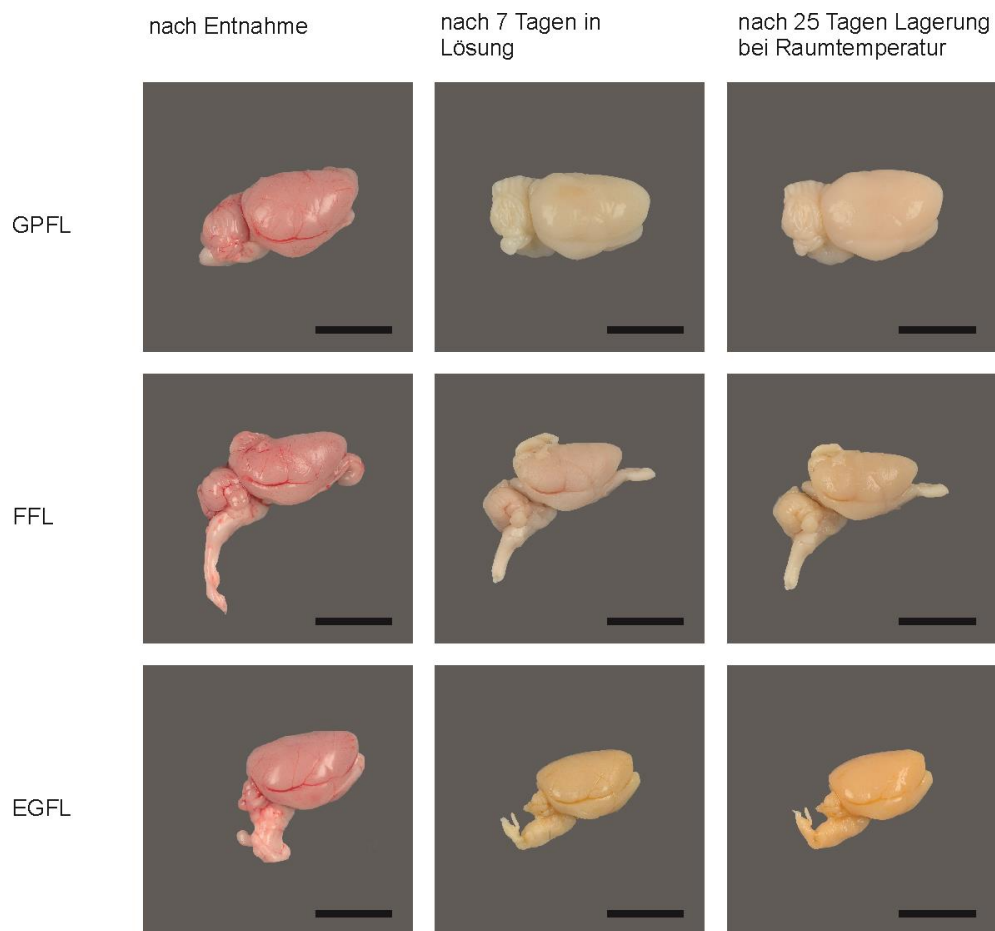


Abbildung 2: Vergleich unterschiedlich fixierter Gehirne nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.2 Herz

Die Fixierung mit GPFL führte zu einer braun-blässen Entfärbung des Präparates. Nach 25 Tagen hatte das Herz eine beige Farbe angenommen. Die Farbunterschiede der Gefäße und des Myokardes waren im Verlauf der Lagerung weniger deutlich ausgeprägt als beim frisch entnommenen Organ. Die Struktur des Organs blieb über die Zeit erhalten. Die Abgänge der Gefäße waren nach Entnahme aus der Fixierungslösung weiter erkennbar. FFL führte zu einer makroskopisch guten Fixierung des Organs, allerdings kam es zu einer Verringerung der Organgröße. Auch im weiteren Verlauf der Lagerung konnte eine Schrumpfung festgestellt werden. Die Fixierung mit FFL entfärbte das Gewebe im Vergleich zum frisch entnommenen Gewebe, nach längerer Lagerung kam es zu einer braunen Verfärbung. Die primäre Entfärbung durch FFL war allerdings nicht so ausgeprägt wie bei GPFL. Die Strukturen des Herzens waren nach der Entnahme aus der Fixierungslösung sowie während der weiteren Lagerung gut erkennbar. Die Fixierung mit EGFL führte bereits nach sieben Tagen in Lösung im Vergleich zum frischen Präparat zu einer deutlichen Schrumpfung. Diese war bei EGFL im Vergleich zu den beiden anderen Fixierungslösungen am deutlichsten ausgeprägt. Nach Entnahme aus der Fixierungslösung zeigte das EGFL-fixierte Herz dunkle Flecken, die sich im Verlauf der weiteren Lagerung jedoch zurückbildeten. Die Abgänge der Gefäße waren nach der sieben Tage dauernden Fixierung in EGFL und auch im Verlauf der Lagerung gut zu identifizieren (Abbildung 3).

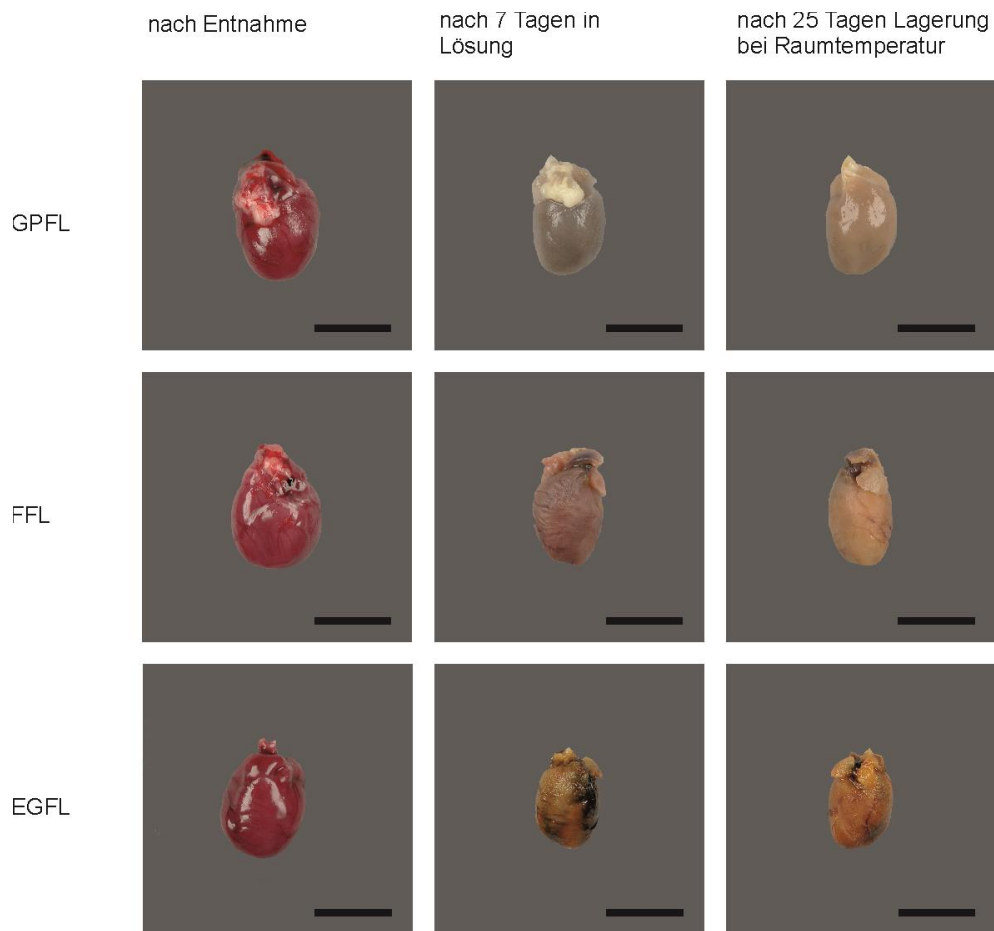


Abbildung 3: Vergleich unterschiedlich fixierter Herzen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.3 Lunge

Eine sieben Tage andauernde Immersionsfixierung der Lunge in GPFL hatte eine deutliche Veränderung des Gewebes zur Folge. Die makroskopische Struktur des Organes war nicht mehr zu erkennen. Eine Identifizierung der Lungenlappen war nicht möglich. Durch die weitere trockene Lagerung der fixierten Organe für 25 Tage bei RT verschlechterte sich die Morphologie nochmals, die Lunge war makroskopisch als solche nicht mehr zu identifizieren, es verblieb ein schleimiger Klumpen. Die Fixierungswirkung des Lungengewebes durch GPFL war somit nicht befriedigend. FFL führte zu einer guten Fixierung. Die makroskopische Struktur der Lunge blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum gut erhalten. Die Lunge verfärbte sich durch die FFL-Fixierung bräunlich, diese Verfärbung veränderte sich im weiteren Beobachtungszeitraum nicht mehr. Die FFL-Fixierung führte zu keiner Organschrumpfung. Die Behandlung der Lungen mit EGFL führte zu einer dauerhaften Fixierung. Die makroskopische Struktur der Lunge mit ihren Lappen blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr gut erhalten. Es kam durch die Fixierung mit EGFL zu einer deutlichen Verfärbung des Organs. Die nach Entnahme rötlich erscheinende Lunge war nach sieben Tagen in EGFL braun-schwarz verfärbt, nach weiteren 25 Tagen an Luft änderte sich diese deutliche Verfärbung in helles Braun. Bei der Fixierung der Lunge mit EGFL trat eine deutliche Schrumpfung des Organes auf (Abbildung 4).

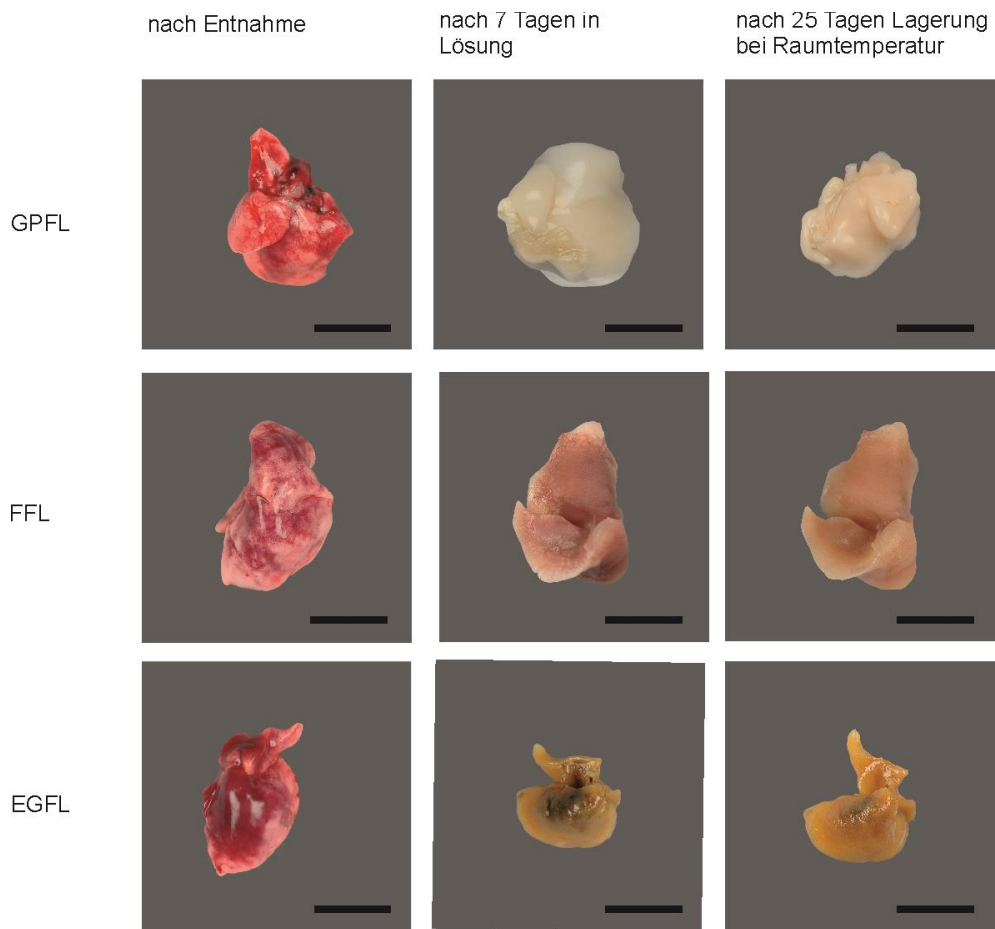


Abbildung 4: Vergleich unterschiedlich fixierter Lungen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.4 Magen

Nach sieben Tagen in GPFL war der Magen gut fixiert. Es zeigte sich eine Entfärbung des Gewebes im Vergleich zum frisch entnommenen Präparat, diese Entfärbung änderte sich mit der Lagerung nicht. Bei der Lagerung in der Fixierlösung konnte eine starke Vergrößerung des Magens im Vergleich zum frisch entnommenen Organ beobachtet werden, der Mageninhalt wurde weiter im Organ gehalten. Nach der Entnahme aus der Fixierungslösung fiel das Organ ein wenig in sich zusammen, der Mageninhalt verblieb weiter im Magen. Anders als kurz nach der Entnahme, waren Blutgefäße nach Entnahme aus der Fixierungslösung nicht mehr zu erkennen. Der Magen, der mit FFL fixiert wurde, war makroskopisch gut erhalten. Es kam im Vergleich zum frisch entnommenen Magen sowohl nach sieben Tagen in Lösung als auch nach weiterer Zeit an der Luft nicht zu einer wesentlichen Schrumpfung oder Schwellung. Allerdings entfärbte sich der Magen stark. Die nach Entnahme aus dem Tierkörper deutlich erkennbaren Blutgefäße waren bereits nach sieben Tagen nicht mehr zu identifizieren. Der Mageninhalt verblieb über den ganzen Beobachtungszeitraum im Organ. EGFL führte ebenfalls zu einer makroskopisch guten Erhaltung des Magens. Es zeigte sich eine geringe Größenabnahme nach Entnahme aus der Fixierungslösung, die über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht fortschritt. Das Organ verfärbte sich bis Tag 7 sowie im weiteren Verlauf zunehmend ins Bräunliche. Auch bei EGFL führte die Fixierung dazu, dass kein Mageninhalt austrat und das Organ weiter prall und gefüllt war (Abbildung 5).

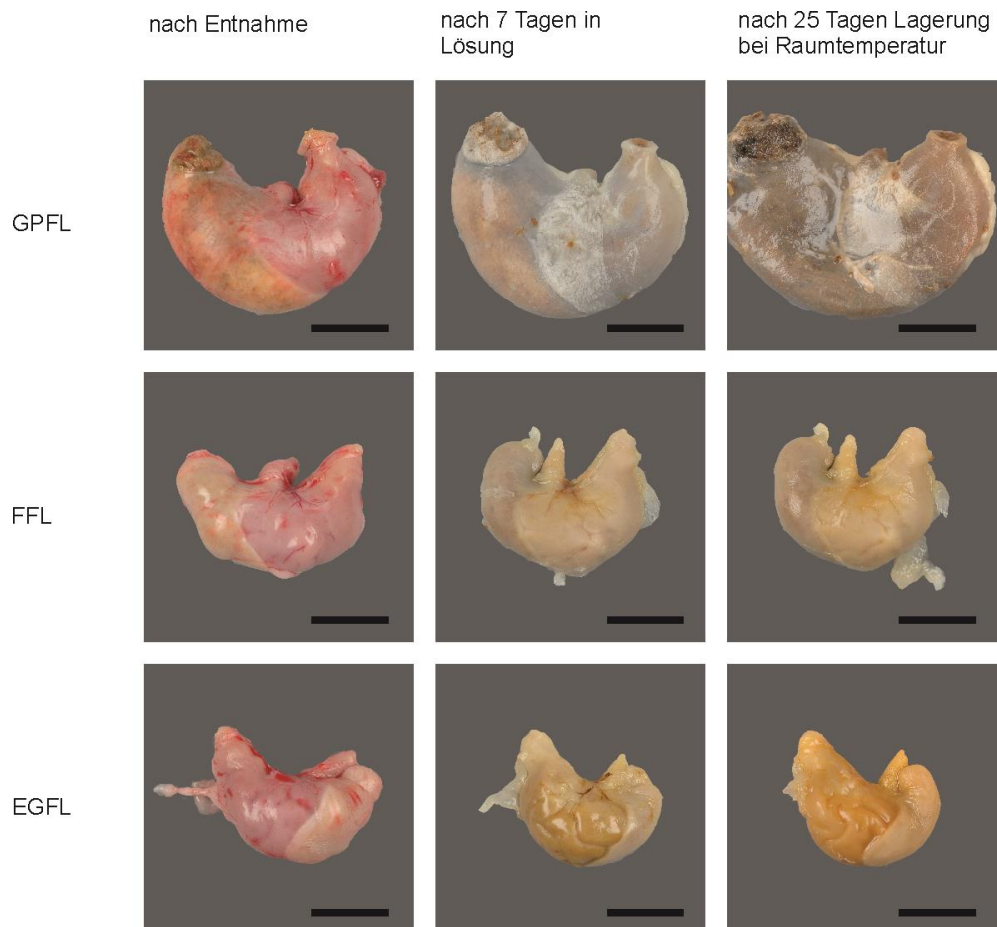


Abbildung 5: Vergleich unterschiedlich fixierter Magen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.5 Darm

Die sieben Tage andauernde Immersion in GPFL 26 g/l führte am Darm zu einer schleimigen Auftreibung des Gewebes während der Zeit in der Fixierungslösung und auch im weiteren Verlauf an der Luft. Die Struktur des Gewebes war nach Entnahme aus der Lösung schlecht erhalten. Dieser Prozess hielt auch im Verlauf an. Die Farben des Organes waren bis zur Entnahme aus der Fixierungslösung blass und grau. Während der Zeit bei RT trat eine bräunliche Verfärbung ein. Die einzelnen Darmabschnitte konnten nach der Entnahme aus der Fixierungslösung und im weiteren Beobachtungszeitraum nicht mehr eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Fixierung des Darmes durch GPFL war mangelhaft. FFL führte zu einem besseren Erhalt der makroskopischen Struktur des Organes. Nach Entnahme aus der Fixierungslösung zeigte sich das Organ im Vergleich zum frisch entnommenen entfärbt. Die Farbe war im weiteren Verlauf und der Lagerung in der Petrischale bei RT gleichbleibend. Die Darmabschnitte konnten während des gesamten Zeitraums identifiziert werden. Bei der Fixierung mit FFL kam es nach einer anfänglichen Schrumpfung im weiteren Beobachtungszeitraum zu keiner weiteren Änderung der Präparatgröße. EGFL führte zu einem makroskopisch guten Erhalt der Organstruktur. Das Darmpaket war nach Entnahme aus der Lösung geschrumpft, jedoch kam es im weiteren Verlauf zu keiner Größenänderung. Das Präparat verlor im Vergleich zum frisch entnommenen Gewebe an Farbe. Die unterschiedliche Färbung des Dün- und Dickdarmes war sowohl nach Entnahme aus der Fixierungslösung als auch nach 25 Tagen bei RT gut zu erkennen und die Unterscheidung von Dün- und Dickdarmabschnitten somit möglich (Abbildung 6).



Abbildung 6: Vergleich unterschiedlich fixierter Därme nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.6 Leber

Die siebentägige Immersionsfixierung mit GPFL führte bei der Leber zu einem guten Erhalt der Struktur. Die Leberlappen waren sowohl nach Entnahme aus der Lösung als auch nach 25 Tagen Lagerung gut zu unterscheiden. Das nach Entnahme kräftig braun-rot gefärbte Organ wurde während der Immersion deutlich blasser. Im weiteren Verlauf blieb die Farbe annähernd konstant. Die Größe der Leber nahm während der Immersion geringfügig zu. Die FFL-fixierte Leber zeigte nach sieben Tagen in Lösung einen ebenfalls guten Erhalt der Struktur. Es kam zum bleibenden Erhalt der lebereigenen Lappenstruktur. FFL führt zu einer Entfärbung, die jedoch im Vergleich zu GPFL weniger ausgeprägt war. Nach 25 Tagen Lagerung zeigte die FFL-fixierte Leber eine homogene braune Farbe. Die Größe der FFL-fixierten Leber war über den Beobachtungszeitraum konstant. Das EGFL Präparat der Leber zeigte einen guten Strukturerhalt. Über die Zeit kam es zu einer bleibend guten Abgrenzbarkeit der Leberlappen. Die Farbe zeigte sich nach Entnahme aus dem Fixierungsmittel braun mit dunkleren Bereichen. Im weiteren Verlauf der Beobachtungen wurde die Farbe homogener. Die Größe dieses Präparates war über die Zeit konstant (Abbildung 7).

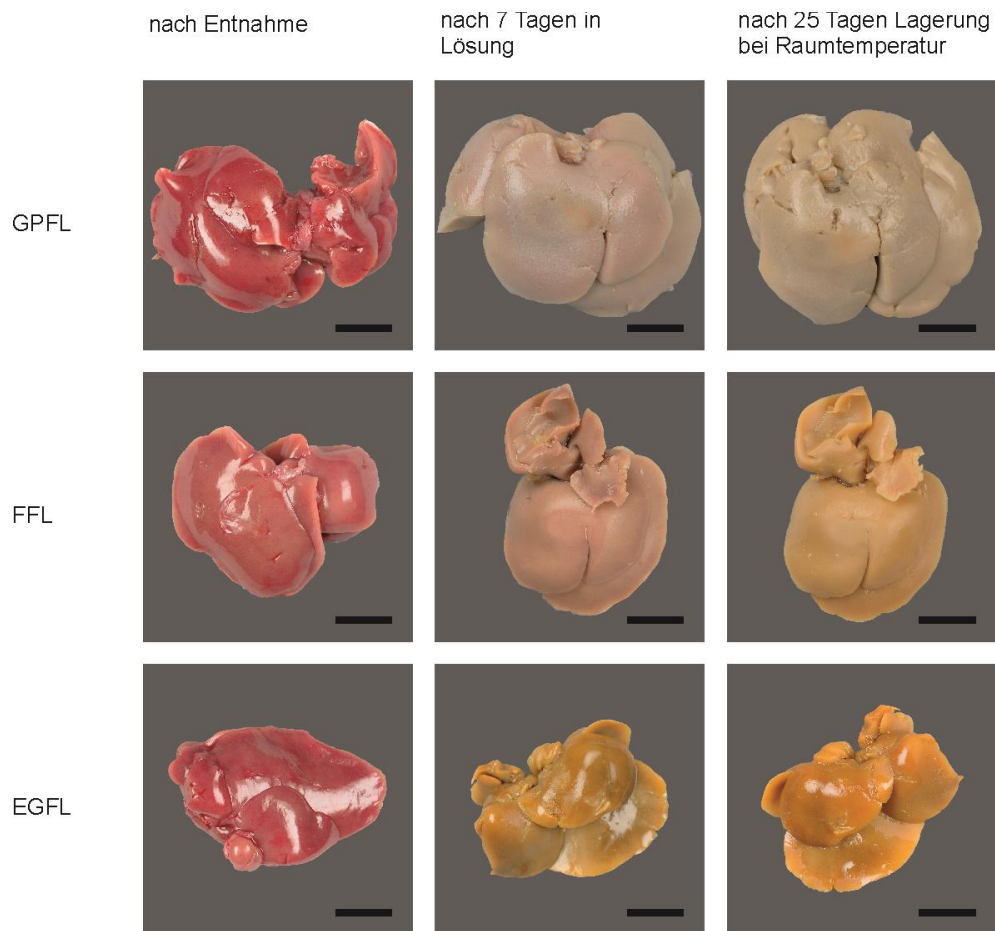


Abbildung 7: Vergleich unterschiedlich fixierter Lebern nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.7 Niere

GPFL führte zur einer makroskopisch guten Erhaltung des Organs. Es kam bei der Niere zu einer Entfärbung verglichen mit dem frischen Gewebe. Anfänglich zeigte sich das Organ in einer eher grauen Farbe, die sich in der weiteren Zeit in der Petrischale in braun veränderte. Das die Niere umgebende Fettgewebe blieb über die gesamte Dauer weiß. Allerdings kam es zu einer Vergrößerung des Organs im Verlauf der sieben Tage andauernden Immersionsfixierung, im Verlauf der weiteren Lagerung blieb die Organgröße jedoch konstant. FFL fixierte die Niere mit guten Strukturhalt über die gesamte Dokumentationsdauer. Die Fixierung ging mit einem Farbverlust einher. In der weiteren Zeit bei Raumtemperatur zeigte sich die Farbe jedoch unverändert. Die Farbe war nach der Fixierung braun. Das Umgebungsfett zeigte im gesamten Verlauf keine Veränderung und die Größe des Präparates war über die Zeit konstant. EGFL führte an der Niere, ähnlich den beiden vorgenannten Fixierungslösungen, zu einem guten Strukturhalt. Allerdings hatte die Fixierung mit EGFL eine Schrumpfung des Organs während und nach der Immersion zur Folge. Die Größe blieb im weiteren Verlauf jedoch konstant. Das Organ wurde durch EGFL bräunlich verfärbt und wurde blasser. Die an der Niere nach Entnahme anhaftenden Strukturen waren nach den 25 Tagen in der Petrischale weniger deutlich zu erkennen (Abbildung 8).

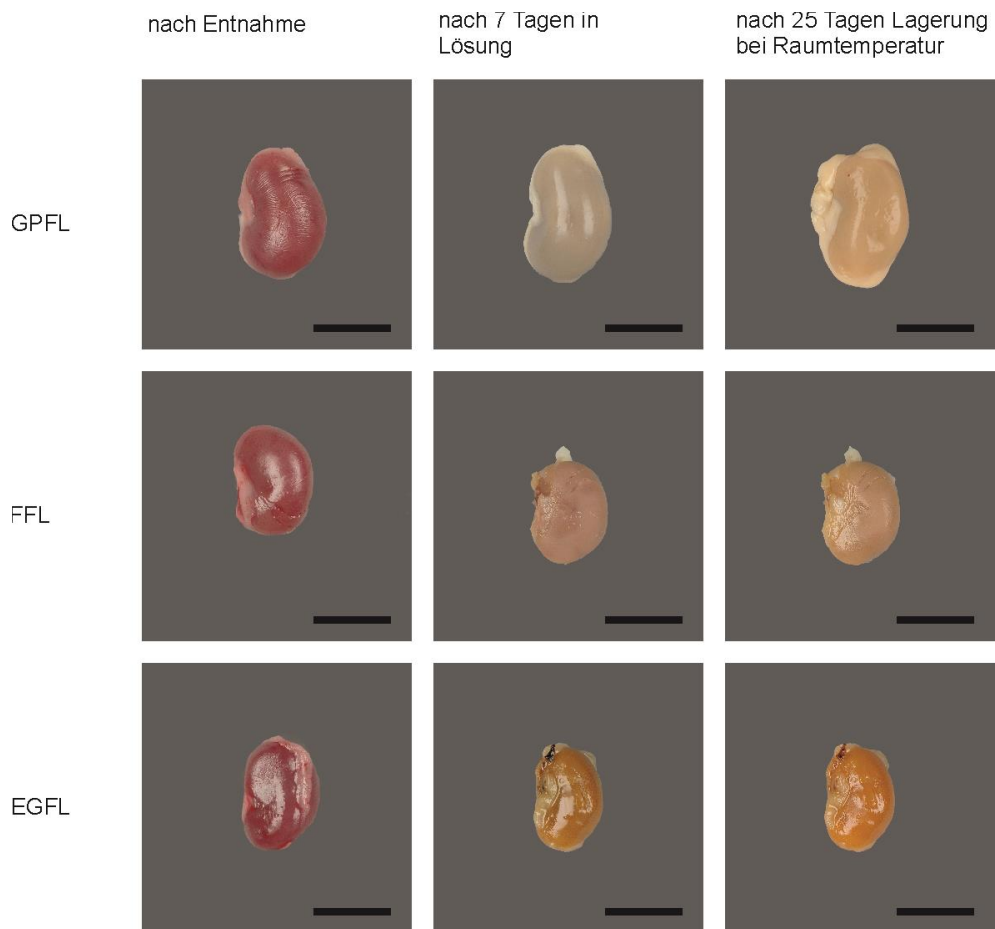


Abbildung 8: Vergleich unterschiedlich fixierter Nieren nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.8 Milz

Die Milz wurde durch die siebentägige Immersionsfixierung in GPFL in ihrer Struktur gut erhalten. Es kam jedoch zu einer ausgeprägten Entfärbung verglichen mit dem frisch entnommenen Organ. Das anfänglich kräftig rotbraune Organ war im weiteren Verlauf und der Lagerung in der Petrischale bei Raumluft blass entfärbt. Die Größe des Organes blieb nach Entnahme aus der Fixierungslösung und nach der weiteren Lagerung konstant. Die mit FFL fixierte Milz zeigte ebenfalls einen guten Strukturerehalt über die gesamte Beobachtungsdauer. Die Farberhaltung war verglichen mit GPFL deutlich besser. Das Organ zeigte nach Entnahme aus der Fixierungslösung eine bräunliche Farbe. Das der Milz anhängende Gewebe war während der gesamten Dauer farblich und strukturell von der Milz gut abgrenzbar. EGFL bewirkte nach sieben Tagen eine gute Erhaltung des Gewebes. Diese zeigte sich über die weitere Beobachtungszeit konstant. Das Organ schrumpfte während der Immersion und zog sich zusammen. Die Farbe veränderte sich bei der Fixierung verglichen mit dem frisch entnommenen Organ ins leicht Bräunliche (Abbildung 9).

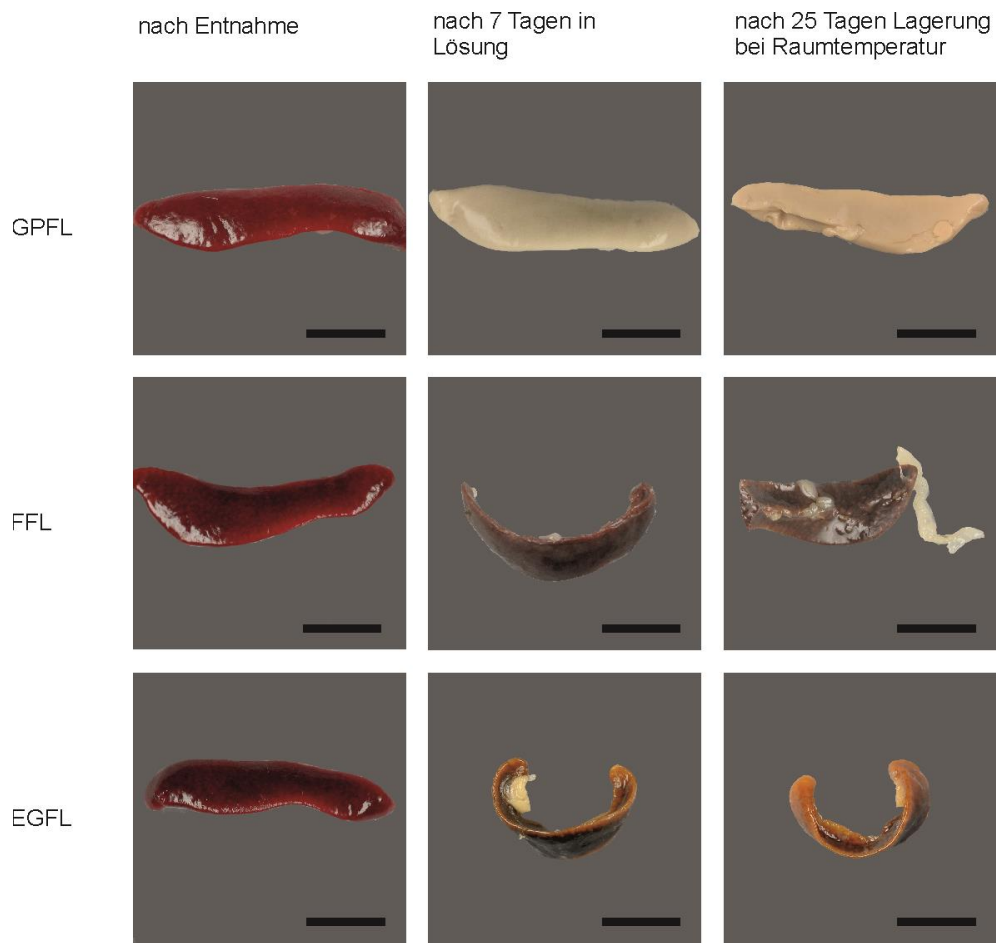


Abbildung 9: Vergleich unterschiedlich fixierter Milzen nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.3.9 Muskel

Am GPFL fixierten Muskel ließ sich eine andauernde Fixierungswirkung erkennen. Der Muskel behielt nach der Entnahme aus der Lösung seine Struktur. Im weiteren Beobachtungszeitraum blieb die Struktur konstant erhalten. Die beim frischen Organ zartrosa Färbung wurde in der Lösung nach sieben Tagen blasser und der Muskel nahm im Verlauf und während der Lagerung bei Raumtemperatur eine blass-braune Farbe an. Die Sehnen und die Struktur des Muskels waren im gesamten Beobachtungszeitraum zu erkennen. Die Größe wurde durch die GPFL Fixierung nicht verändert. FFL führte zu einem konstanten Erhalt der Organstruktur. Wie GPFL führte FFL zu einem Verblässen der Organfarbe. Bei FFL war eine eher hellbraune Verfärbung sichtbar. Die Strukturen des Muskels sowie die Sehnen waren im gesamten Verlauf gut abzugrenzen. Die Größe blieb im gesamten Beobachtungszeitraum konstant. EGFL führte zu einem guten Strukturhalt des Muskels und nach der Immersion zu einer Schrumpfung des Organes. Nach sieben Tagen zeigte sich eine bräunliche Verfärbung. Nach Lagerung wurde diese bräunliche Verfärbung heller. Die Strukturen des Muskels blieben im gesamten Verlauf identifizierbar (Abbildung 10).

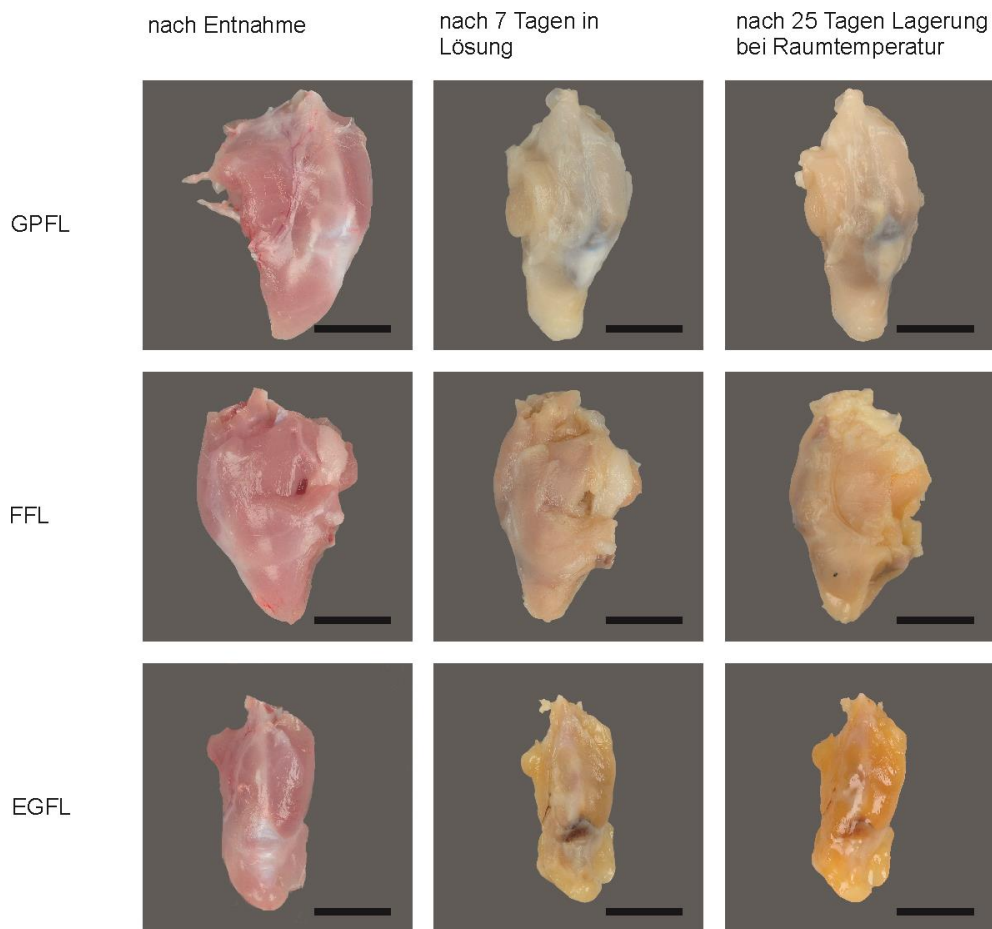


Abbildung 10: Vergleich unterschiedlich fixierter Muskeln nach Entnahme aus dem Tierkörper, nach sieben Tagen in der jeweiligen Fixierlösung (GPFL, FFL und EGFL) und nach 25 Tagen in einer Petrischale bei RT (Maßstabsbalken = 1 cm).

3.4. Haptische Beurteilung von GPFL fixierten Organen im Vergleich zu mit etablierten Fixierlösungen (FFL und EGFL) fixierten Organen

Das mit GPFL fixierte Gewebe wies ähnliche haptische Eigenschaften wie frisches, unfixiertes Gewebe auf: das Gewebe blieb weich und elastisch. Allerdings war die Gewebeelastizität etwas geringer als die von frischem Gewebe. Die organspezifischen haptischen Unterschiede (Bsp.: Muskel - fester oder Darm - weicher) blieben bei der Fixierung mit GPFL erhalten. Im Gegensatz dazu führte die Fixierung mit FFL zu einer ausgeprägten Härtung der Organe. Das Gewebe wurde fest, unelastisch und brach beim Berühren mit der Pinzette auseinander. Ebenso war mit EGFL fixiertes Gewebe deutlich härter als frisches Gewebe und GPFL-fixiertes Gewebe, brach aber bei Berührung mit der Pinzette nicht in Stücke (Tabelle 3). Im Folgenden wird auf die kritisch zu fixierenden Organe oder die Organe, die in der Fixierqualität deutlich von den meisten Organen abwichen, eingegangen:

3.4.1 Gehirn

Das mit GPFL 26 g/l fixierte Gehirn zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 131 Tagen eine weiche und elastische Gewebequalität, die der Haptik frisch entnommener Organe sehr ähnlich war. Die Fixierungen mit FFL und EGFL führten jedoch dazu, dass die Organe deutlich härter als die frischen Organe wurden. Diese Härtung war bei EGFL weniger stark ausgeprägt als bei FFL. Beide Fixierlösungen führten im Gegensatz zu GPFL dazu, dass die Organe im Post-Fixierverlauf austrockneten und spröde wurden (Tabelle 3).

3.4.2 Lunge

Die GPFL-fixierte Lunge zeigte in Bezug auf die Haptik ein schlechtes Fixierungsergebnis: Das Gewebe veränderte sich bereits nach kurzer Zeit deutlich, es wurde sehr weich und schleimig. Im Gegensatz dazu wurde das mit EGFL und FFL fixierte Gewebe sehr hart und spröde (Tabelle 3).

3.4.3 Darm

Am Darm zeigte sich durch GPFL eine schlechte Fixierungsqualität. Der Darm zeigte sich schleimig und sehr weich. Die haptischen Eigenschaften des Darmes waren sehr verschieden von der *in-vivo* Situation. Das Gewebe wurde durch die Fixierungslösung deutlich weicher und schleimiger. FFL zeigte hier ein besseres Ergebnis. Die Fixierung mit FFL führte dazu, dass der Darm fest und elastisch wurde. EGFL zeigte ebenfalls ein besseres Ergebnis als GPFL. Hier wurde das Gewebe fest, wenngleich weniger elastisch als bei der Fixierung mit FFL (Tabelle 3).

	GPFL	FFL	EGFL
Gehirn	weiche, elastische Gewebequalität, ähnlich <i>in vivo</i>	feste, elastische Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	feste, spröde Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation
Herz			
Lunge	sehr weiche, schleimige Gewebestruktur, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	feste, elastische Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	feste, spröde Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation
Magen	weiche, elastische Gewebequalität, ähnlich <i>in vivo</i>	feste, elastische Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	feste, spröde Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation
Darm	sehr weiche, schleimige Gewebestruktur, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	feste, elastische Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	feste, spröde Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation
Leber			
Niere	Weiche, elastische Gewebequalität, ähnlich <i>in vivo</i>	Feste, elastische Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation	Feste, spröde Organhaptik, deutlicher Unterschied zur <i>in-vivo</i> -Situation
Milz			

Tabelle 3: Übersicht über die haptischen Eigenschaften unterschiedlich fixierter Organe.

3.5 Beurteilung der Fixierungseigenschaften vor dem Hintergrund der Nutzbarkeit der Fixierungen in studentischen und chirurgischen Kursen

Um genauere Kenntnisse über die Qualitätseigenschaften von mit Glucoprotamin fixiertem Gewebe zu erhalten, wurden die haptischen und visuellen Eigenschaften mithilfe eines Fragebogens von einer Personengruppe (14 Personen: Ärzte, Anatomen und Studenten der Humanmedizin in höheren Fachsemestern) beurteilt. Es sollten frisch entnommene adulte Rattenorgane mit GPFL-, FFL-, und EGFL-fixierten Organen verglichen werden. Die zu beurteilenden Organe waren: Gehirn, Herz, Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere, Milz und der Oberschenkelmuskel. Der maximale Score von 72 Punkten („wie frisch“) konnte von keiner der Fixierungen bei keinem Organ erreicht werden. Jedes GPFL-Präparat erreichte mindestens einen Score von 21 Punkten, dies entspricht der Bewertung „vergleichbar“. Der Durchschnittswert aller GPFL-fixierten Organe und einzelnen Items betrug 26,17. FFL-fixierte Organe hingegen erreichten einen niedrigeren Score. Der Durchschnitt betrug hier 13,67 Punkte. Bei EGFL-fixierten Organen wurde im Durchschnitt ein Score von 11,07 erreicht.

3.5.1 Beurteilung von Gehirn, thorakalen Organen (Herz und Lunge) sowie des Muskels

GPFL-fixiertes Gehirn erreichte im Vergleich zu frisch entnommenen Organen einen maximalen Score von 38. Der minimale Score beträgt 9, der Median 25,5 Scoringpunkte. Das FFL-fixierte Gehirn erreichte einen maximalen Score von 25. Das Minimum 10 Scoringpunkte. Das mit EGFL fixierte Gehirn erreichte ein Maximum von 14 Scoringpunkten. Der Minimalwert betrug 2 und der Median 9,5 Scoringpunkte. Das Scoring des Gehirns lag bei allen Befragten bei GPFL-fixiertem Gehirn signifikant höher als der von FFL- und EGFL -fixierten Gehirnen. Das GPFL-fixierte Herz erreichte ein maximales Scoring von 37 Punkten. Der minimale Wert lag bei 18, der Median bei 26. Das Formalin-fixierte Gehirn wurde mit einem Maximum von 30 Punkten bewertet, das Minimum betrug 5 und der Median 10 Punkte. EGFL erreichte niedrigere Werte. Hier betrug das Maximum 16, das Minimum 7 und der Median 10 Scoringpunkte. Die Werte bei der Fixierung mit GPFL waren signifikant höher als die bei der Fixierung mit FFL und EGFL.

Das Scoring der mit GPFL fixierten Lunge erreichte ein Maximum von 37 Punkten, das Minimum betrug 14, der Median 26. FFL wurde mit einem Maximum von 35 bewertet, das Minimum betrug 8 und der Median 18,5. Die EGFL-fixierte Lunge erreichte ein maximales Scoring von 20, das Minimum betrug 3 und der Median 8 Punkte. Die Ergebnisse der Fixierung mit GPFL und der FFL unterschieden sich nicht signifikant. GPFL wurde signifikant höher bewertet als EGFL. Der mit GPFL fixierte Muskel wurde mit einem Maximum von 37 Punkten bewertet. Das Minimum betrug 6 Scoringpunkte und der Median 26,5. FFL wurde mit maximal 24 Punkten bewertet, das Minimum betrug 9 und der Median 10,5. EGFL erreichte ein Scoring von maximal 16 Punkten, das Minimum war 7 und der Median betrug 8,5 Punkte. Das Scoring der GPFL-Fixierung lag somit signifikant über dem Scoring der FFL- und EGFL-Fixierung (Abbildung 11).

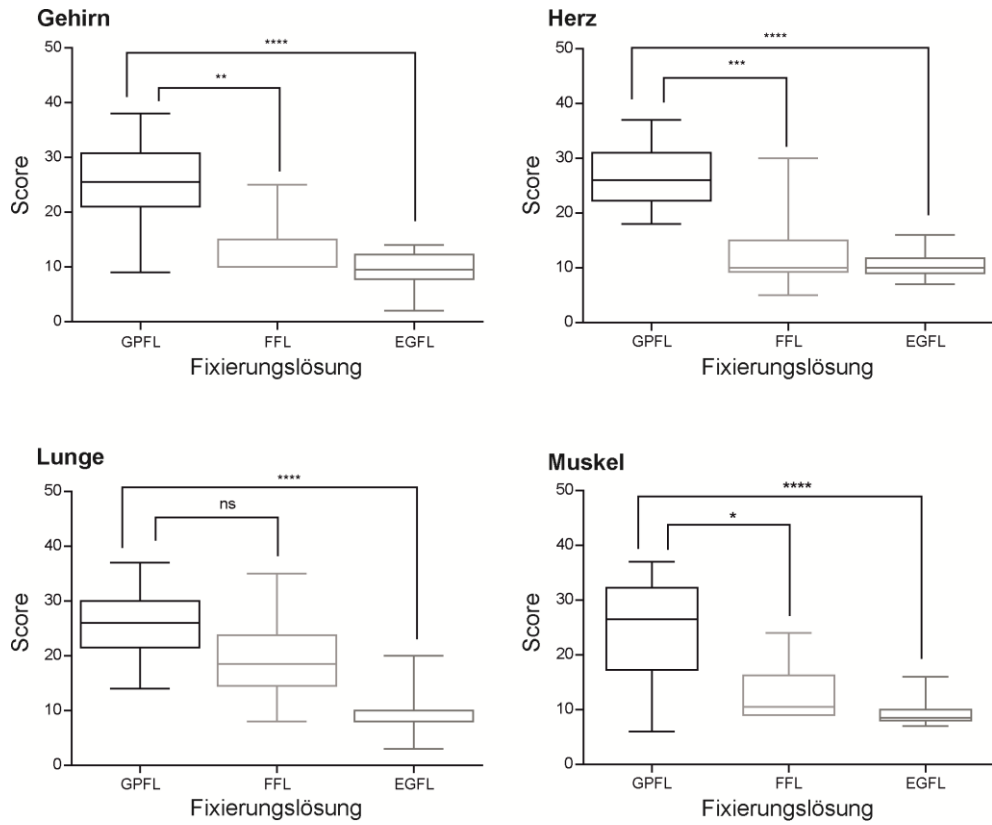


Abbildung 11: Darstellung des Scorings verschiedener Organeigenschaften (Elastizität, Festigkeit, Farbe, Abgrenzbarkeit topografischer Strukturen) der unterschiedlichen Fixierungslösungen (GPFL, FFL, EGFL) im Vergleich zu frisch entnommenen abdominalen Organen der adulten Ratte (P31; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$)

3.5.2 Beurteilung der Organe der Bauchhöhle (Magen, Darm, Leber, Niere und Milz)

Der GPFL-fixierte Magen erreichte ein maximales Scoring von 33, das Minimum betrug 13 und der Median 23 Punkte. FFL erreichte ein Maximum von 22, das Minimum war 22 und der Median 10 Scoringpunkte. EGFL wurde mit maximal 22 Punkten bewertet, das Minimum betrug 8 Punkte und der Median 10. Die Werte der Fixierung mit GPFL waren signifikant höher als bei der Fixierung mit FFL und EGFL. Der GPFL-fixierte Darm wurde mit einem Maximum von 38 Punkten bewertet, das Minimum betrug 15 und der Median 25. FFL wurde beim Darm mit maximal 26 Punkten bewertet. Das Minimum betrug 11 und der Median 16. EGFL erreichte ein Maximum von 16, ein Minimum von 6 und einen Median von 11 Punkten. Die Ergebnisse der Fixierung des Darmes mit GPFL waren signifikant höher als die der Fixierung mit FFL und EGFL. Das maximale Scoring betrug bei der GPFL-fixierten Leber 34, das minimale 9 und der Median 24. FFL erreichte an der Leber einen Maximalwert von 17 Punkten, der Minimalwert betrug 7 und der Median 10. EGFL wurde bei der Leber mit maximal 17 Punkten bewertet, das Minimum betrug 7 und der Median 10. Die Werte der Fixierung mit GPFL unterschieden sich signifikant von den Werten der Fixierung mit FFL sowie mit EGFL. Die mit EGFL fixierte Niere wurde mit einem Maximum von 39 Punkten bewertet. Das Minimum betrug 21 und der Median 28,5 Scoringpunkte. FFL wurde an der Niere deutlich niedriger bewertet, das Maximum betrug 24, das Minimum 1 und der Median 4 Punkte. Die EGFL-fixierte Niere wurde mit maximal 28 Punkten bewertet, das Minimum betrug hier 11 und der Median war 16 Punkte. Auffällig bei der Bewertung der Niere ist, dass FFL niedrigere Werte als EGFL erreichte. Die Werte der Fixierung der Niere mit GPFL unterschieden sich signifikant von den Werten der Fixierung mit FFL und EGFL. Das Scoring der GPFL-fixierten Milz erreichte einen maximalen Wert von 37, das Minimum betrug 20 und der Median 30,5. FFL wurde an der Milz mit maximal 25 Scoringpunkten bewertet, das Minimum und der Median betragen 10. Die mit EGFL fixierte Milz erhielt ein Scoring von maximal 19 Punkten, das Minimum hier war 7 und der Median lag bei 10 Punkten. Die Bewertungen der Fixierung der Niere mit GPFL lagen somit signifikant über der Bewertung der Fixierung mit FFL und EGFL (Abbildung 12).

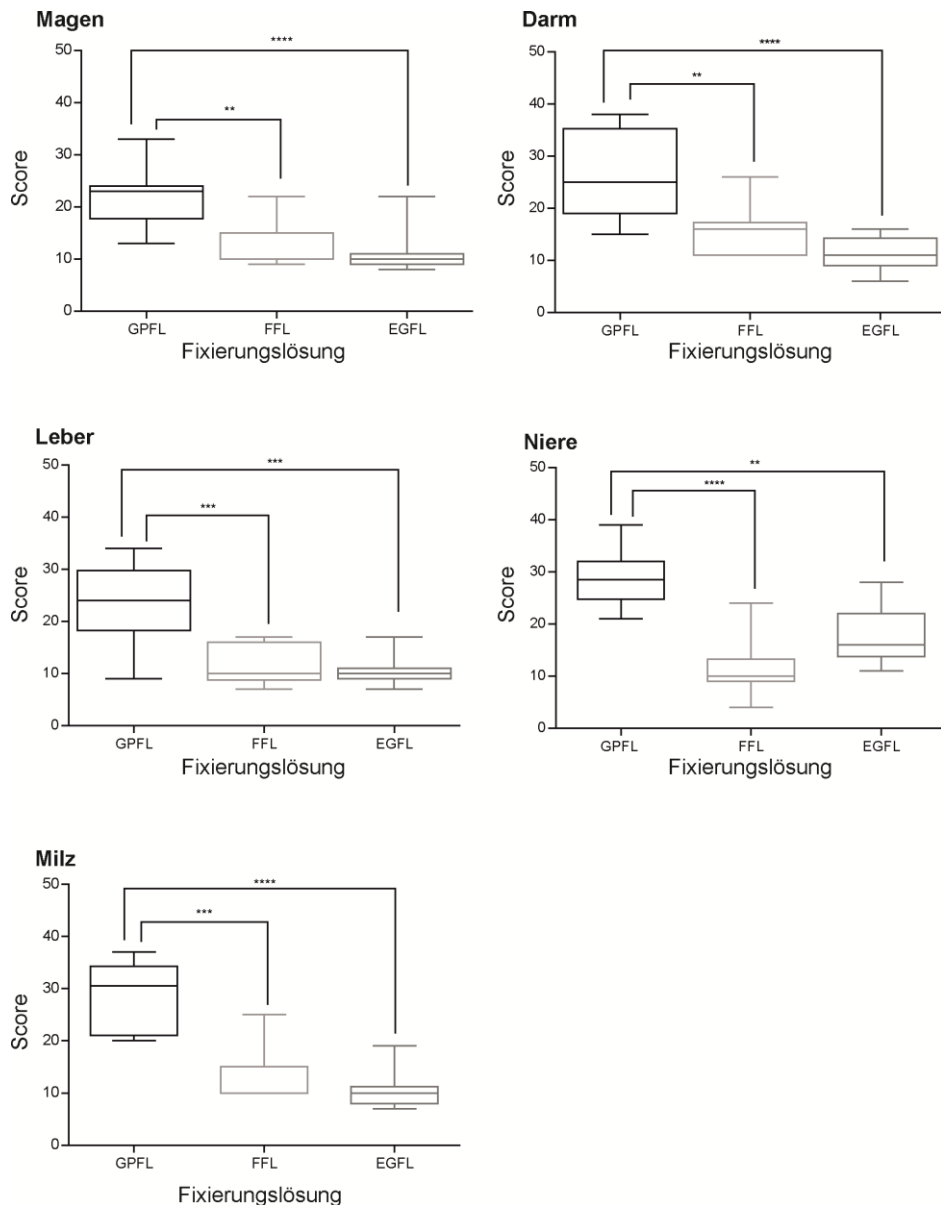


Abbildung 12: Scoring verschiedener Organeigenschaften (Elastizität, Festigkeit, Farbe, Abgrenzbarkeit topografischer Strukturen) der unterschiedlichen Fixierungslösungen im Vergleich zu frisch entnommenen abdominalen Organen am Beispiel des Magens, des Darmes, der Leber, der Niere und der Milz (Altersstufe p 31) (**= p<0,01; ***= p<0,001; ****=p<0,0001).

3.6 Beurteilung makroskopisch sichtbarer Strukturen unterschiedlich fixierter Organe im Vergleich zu frisch entnommenen Organen

Im zweiten Teil des Fragebogens wurden dieselben Befragten gebeten, die makroskopisch sichtbaren Strukturen der unterschiedlich fixierten Organe (GPFL, FFL, EGFL) mit frisch entnommenen Organen zu vergleichen. Die zu identifizierenden Strukturen waren: Muskeln, Faszien, Bänder, Blutgefäße und Nerven. Die Antwortmöglichkeiten von „nicht erhebbar (0)“ bis „sehr gut vergleichbar (6)“ wurden vorgegeben. Zudem die Möglichkeit „Nicht untersucht“. Es zeigte sich, dass häufig die Antwortmöglichkeiten „nicht erhebbar“ bzw. „nicht untersucht“ angegeben wurden. Aus den Daten der Häufigkeitsverteilung ließ sich dadurch keine Auswertung generieren. Der Fragebogen war in der Retrospektive ungünstig oder missverständlich formuliert. Es wurden bei allen Organen alle Strukturen abgefragt, obwohl diese nicht immer vorhanden oder sichtbar waren. Die richtige Organdiagnose wurde nur von 89% der Befragten genannt.

3.7 Beurteilung des Geruches unterschiedlich fixierter Organe

Der Geruch der unterschiedlich fixierten Organe wurde auf einer numerischen Rationalskala bewertet. Diese umfasste die Werte: 0 = kein Geruch, 1 = unangenehmer Geruch bis 10 = angenehmer Geruch. Die mit GPFL fixierten Organe erreichten einen Mittelwert von 7 (SD 2,032), die mit FFL fixierten Organe einen Mittelwert von 4 (SD 1,968) und die mit EGFL fixierten Organe einen Mittelwert von 3 (SD 1,709). Die mit GPFL fixierten wurden ausnahmslos als angenehmer im Geruch beurteilt als FFL- und EGFL-fixierte. Es unterschieden sich die GPFL-fixierten Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere, Milz und Muskel signifikant von den jeweiligen mit FFL-fixierten Organen. Lediglich die Bewertung des Gehirns und des Herzens ergab keine signifikanten Unterschiede. Jedes der GPFL-fixierten Organe (Gehirn, Herz, Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere, Milz und Muskeln) wurde signifikant höher bewertet als die jeweiligen mit EGFL fixierten Organe (Abbildung 19).

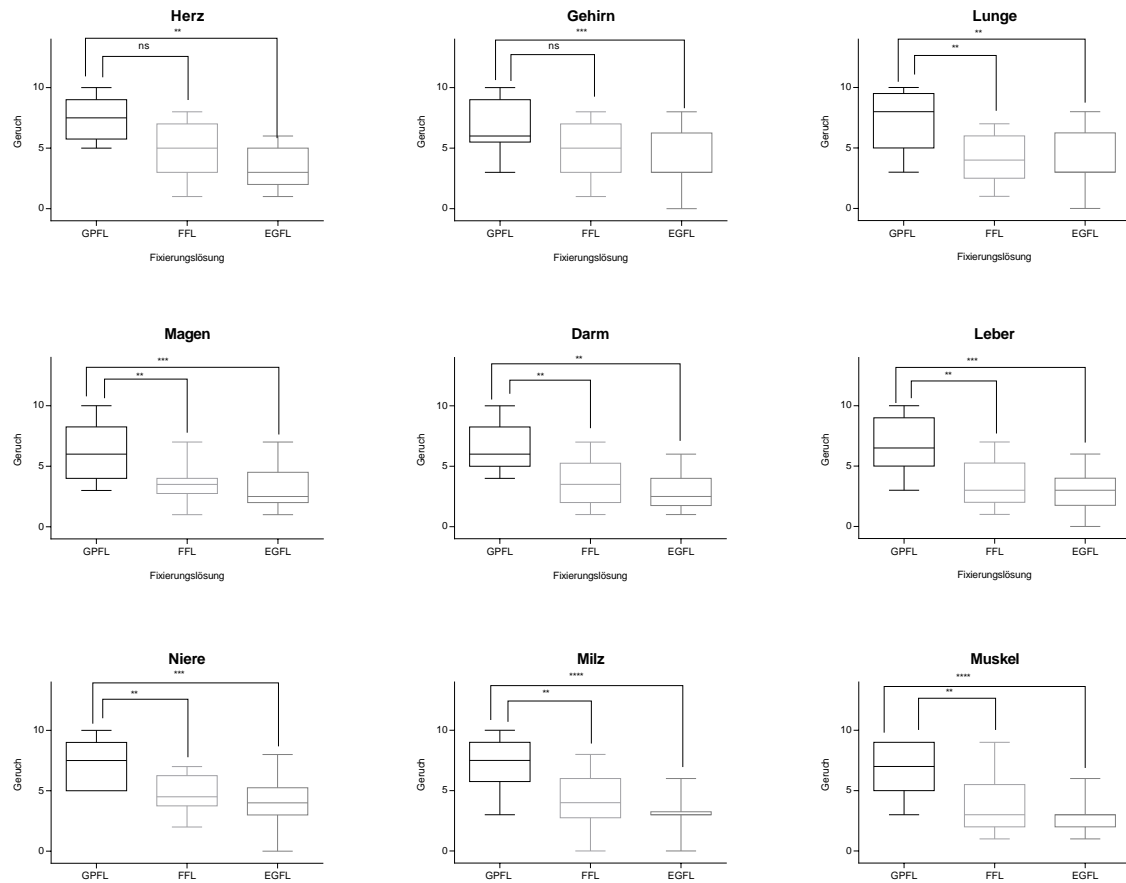


Abbildung 11: Beurteilung des Geruchs unterschiedlich fixierter Organe durch eine Kontrollgruppe auf einer numerischen Rationalskala von 0=kein Geruch bis 10=angenehmer Geruch (ns=nicht signifikant, ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

3.8 Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher Fixierlösungen auf pathogene Mikroorganismen

Zur Untersuchung der Wirkung auf pathogene mikrobielle Keime durch die unterschiedlichen Fixierlösungen wurden 10 fixierte und 3 unbehandelte Rattenkörper nach zwei Tagen in Lösung und sieben Tagen Lagerung an Luft bei RT maschinell zerkleinert. Im Anschluss wurden bakterielle Abstriche entnommen und im Labor Niebecker, Gynmedlab, Ochtrup, Deutschland auf sechs Nährböden ausgestrichen (Blutagar, McConkey-Agar, Chrom-Agar, Kochblutagar, Schaedler-Blut-Agar und Schaedler-Kochblutagar). Ebenso wurden eine anaerobe und eine aerobe Bouillon beimpft. Alle Proben wurden 48 h bebrütet. Die aeroben Medien wurden in einem CO₂-Brutschrank verwahrt. Mit den anaeroben Medien wurde gleich verfahren, allerdings unter O₂-Entzug. Die aeroben Nährmedien wurden nach 24 h begutachtet. Nach 48 h wurden alle Proben abschließend beurteilt. Die Testung erfolgte auf das Wachstum jeglicher Keime, das besondere Augenmerk lag auf humanpathogenen Keimen. GPFL zeigte keinerlei Wachstum von Bakterien und Sprosspilzen. Ebenso konnte bei FFL und EGFL keinerlei derartiges Wachstum nachgewiesen werden. Bei der Kontrolle zeigte sich ausgeprägtes Wachstum von *Proteus mirabilis*, sowie nach Anreicherung Wachstum von *Enterococcus spp.* und *Escherichia coli* (Tabelle 3).

Fixierungslösung	Kulturelle Anzucht
GPFL 26 g/l	kein Wachstum nach 48 Stunden Bebrütung, kein kultureller Nachweis von Sprosspilzen.
Formaldehyd-Fixierungslösung	kein Wachstum nach 48 Stunden Bebrütung, kein kultureller Nachweis von Sprosspilzen.
Ethanol-Glycerin-Fixierungslösung	kein Wachstum nach 48 Stunden Bebrütung, kein kultureller Nachweis von Sprosspilzen.
Aqua demin (Kontrolle)	Wachstum von: <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Proteus mirabilis</i> ausgeprägtes Wachstum 2. <i>Enterococcus spp</i> nach Anreicherung 3. <i>Escherichia coli</i> nach Anreicherung Kein Nachweis von Sprosspilzen

Tabelle 4: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung unterschiedlich fixierter und unfixierter Rattenkörper.

3.9 Die Untersuchung einer enzymhemmenden Wirkung von GPFL

Mit Hilfe einer FRET-gekoppelten Endoproteasenbibliothek wurde die Inhibierung von Proteasen in GPFL-, FFL- und EGFL-fixierten Organen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Endoproteasen-Aktivität in mit GPFL-fixiertes Gewebe bei den meisten Organen im Vergleich zu der Endoproteasen-Aktivität aus unfixiertem Gewebe vollständig inhibiert wurde. Dieses Ergebnis zeigt sich auch bei FFL-fixiertem Gewebe. Lediglich im Darm konnte bei beiden Fixierungen nach 20 min eine verbleibende geringe Endoproteasen-Aktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde die Enzymaktivität bei EGFL fixierten Herzen, Nieren und dem Darm nicht vollständig inhibiert. Generell zeigt sich bei der Fixierung mit EGFL eine höhere verbleibende Proteasenaktivität als bei FFL und GPFL (siehe Abbildungen 14 und 15).

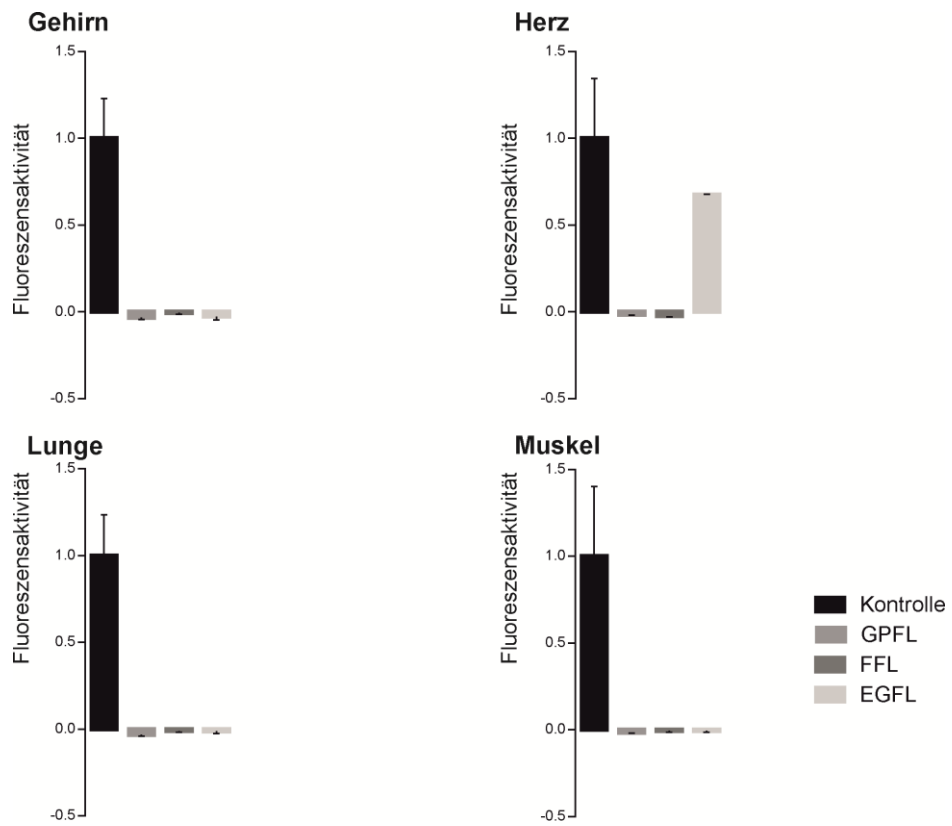


Abbildung 12: Proteinnormierte relative Fluoreszenzaktivität verschieden fixierter Gehirne, Herzen, Lungen und Muskeln in Verhältnis zur jeweiligen unfixierten Kontrolle (n=3).

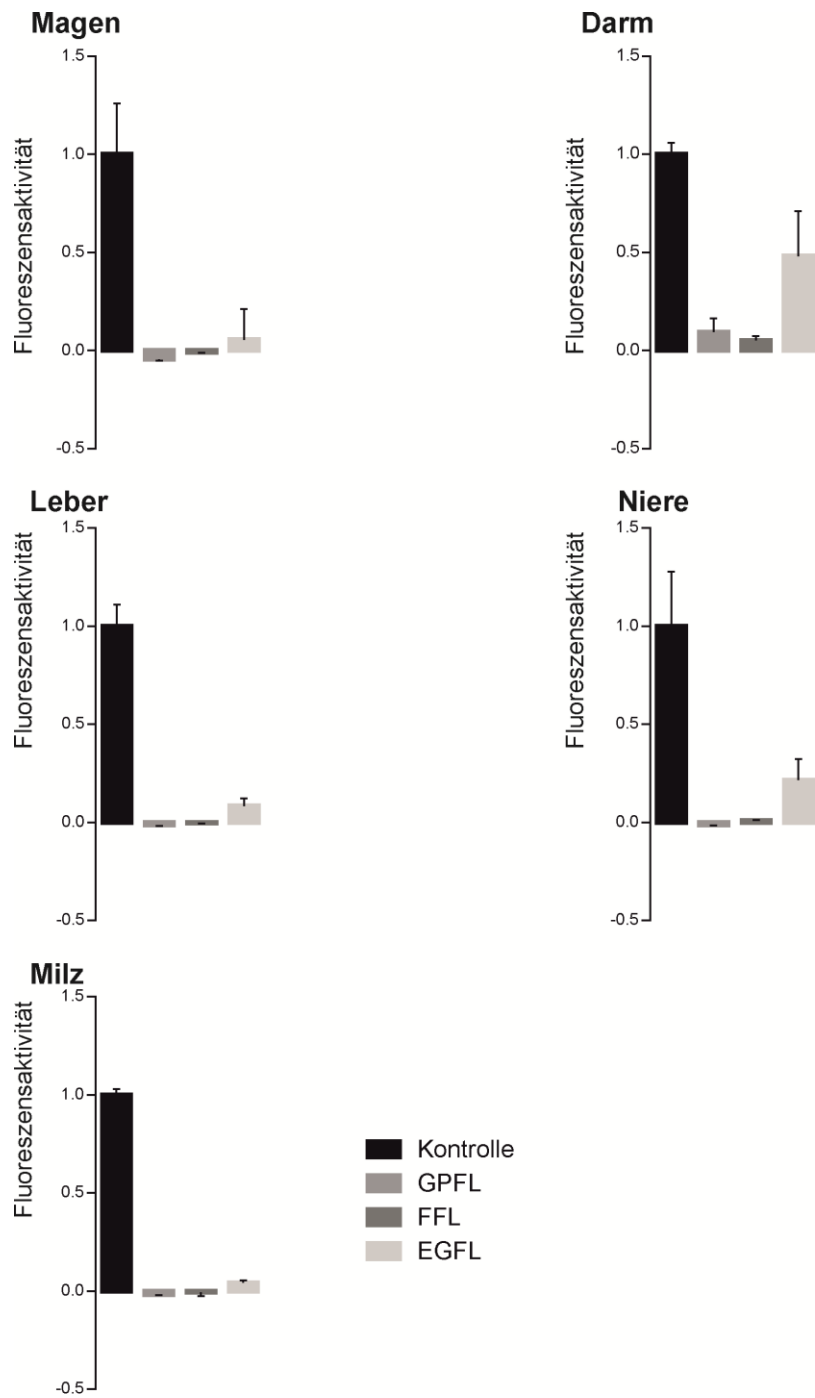


Abbildung 13: Proteinnormierte relative Fluoreszenzaktivität verschieden fixierter Magen, Därme, Lebern, Nieren und Milzen in Verhältnis zur jeweiligen unfixierten Kontrolle (n=3).

3.9.1 Proteasenaktivität von Gehirn, thorakalen Organen (Herz und Lunge) und Muskeln

In den Kontrollen konnte im Beobachtungszeitraum von 30 Minuten ein deutlicher Anstieg der zur Proteinkonzentration normalisierten relativen Fluoreszenzintensität gezeigt werden. Dieser Anstieg blieb bei den mit GPFL 26 g/l, FFL sowie bei EGFL fixierten Gehirnen, Herzen, Lungen und Muskeln aus. Die Aktivität war bei GPFL und FFL auf ähnlich niederem Niveau. Beim EGFL fixierten Organen konnte dagegen eine insgesamt höhere Endproteasenaktivität festgestellt werden als bei den beiden anderen Fixierungslösungen (siehe Abbildung 14).

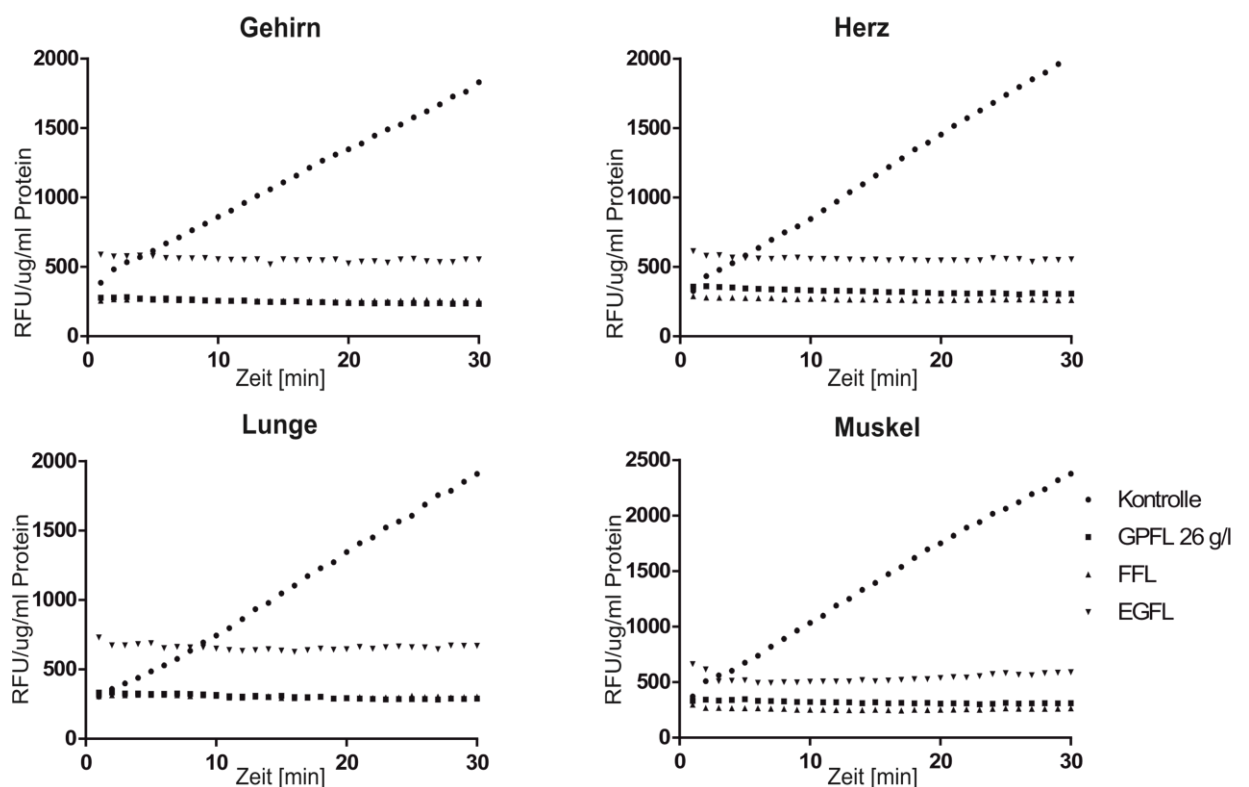


Abbildung 14: Verlauf der zur Proteinkonzentration normalisierten relativen Fluoreszenzintensität (RFU/ μ g/ml Protein) über 30 Minuten am Beispiel unterschiedlich fixierter Gehirnen, Herzen, Lungen und Muskeln über 30 min (n=3). Die Kinetikwerte der GPFL- und FFL-fixierten Gehirne überlagern sich. EGFL zeigt ein höheres Aktivitätsniveau.

3.9.2 Proteasenaktivität von Magen, Darm, Leber, Niere und Milz

Im Beobachtungszeitraum von 30 Minuten zeigte sich bei der Kontrolle der Magen, des Darmes, der Lebern und der Milzen ein Anstieg der zur Proteinkonzentration normalisierten relativen Fluoreszenzintensität. Die Proteasenaktivität von Magen, Lebern und Milzen zeigte bei GPFL und FFL eine ähnlich niedere Aktivität im Beobachtungszeitraum, während bei EGFL eine höhere Aktivität detektierbar war. Beim mit GFPL 26 g/l fixierten Darm kam es zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität. FFL zeigte am Darm ebenfalls einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität, dieser war mit dem Anstieg bei GPFL vergleichbar. EGFL zeigte am Darm einen deutlicheren Anstieg der Fluoreszenzintensität als GPFL und FFL, wenngleich dieser auch weniger ausgeprägt als bei der Kontrolle war. Bei den Nieren zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Därmen. Bei GPFL und FFL war ein leichter Anstieg der Fluoreszenzaktivitäten festzustellen, bei EGFL jeweils ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzaktivität. Insgesamt war die Fluoreszenzintensität der Därme und Nieren auf einem deutlich höheren Niveau als bei den anderen Organen (siehe Abbildung 15).

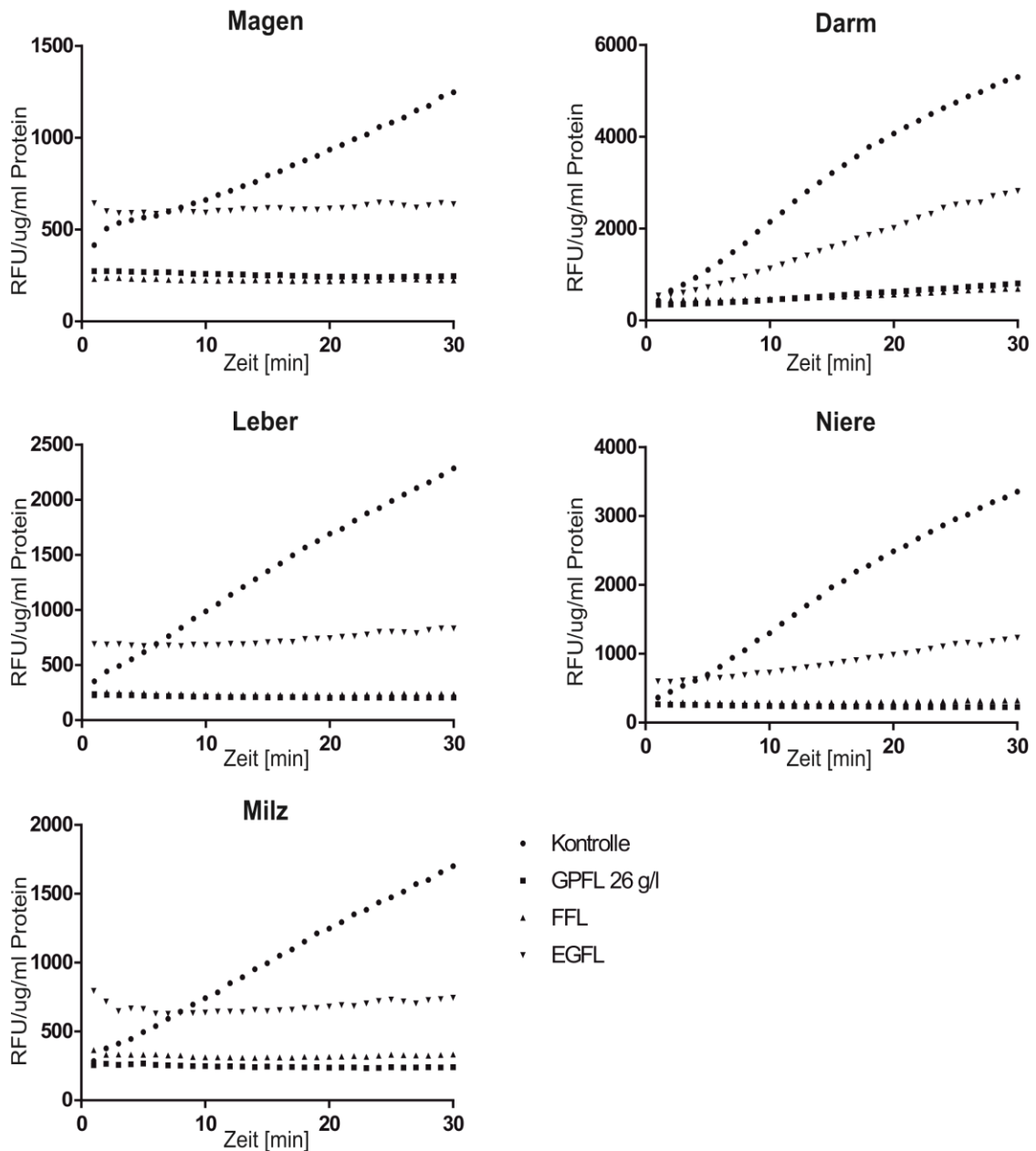


Abbildung 15: Verlauf der zur Proteinkonzentration normalisierten relativen Fluoreszenzintensität (RFU/ $\mu\text{g/ml}$ Protein) über 30 Minuten am Beispiel unterschiedlich fixierter Magen, Därme, Lebern, Nieren und Milzen (GPFL 26 g/l, FFL, EGFL) und einer Kontrolle (dH_2O). Es zeigte sich bei der Kontrolle ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei den mit Fixierungslösungen behandelten Organen kam es zu einer vergleichbaren Hemmung der Endoproteasenaktivität. Jedoch konnte bei EGFL ein insgesamt höheres Niveau der Endoproteasenaktivität gezeigt werden.

4. Diskussion

Das Fach Anatomie ist einer der Eckpfeiler der Ausbildung von Ärztinnen und Ärzten [55, 75, 76]. Einen wichtigen Teil der Wissensvermittlung stellt hierbei das Präparieren und Operieren an meist fixierten menschlichen Körpern dar [77-79]. Auch in Zukunft wird es weiter notwendig sein, Präparate für anatomische Zwecke zu fixieren [55]. Allerdings ist in vielen der bekannten und verwendeten Fixierungslösungen bis zum heutigen Tag Formaldehyd enthalten [33, 67, 80, 81, 82, 83]. Die heute noch immer weit verbreitete und geschätzte sogenannte Thiel Fixierung [84-86] enthält auch in ihrer neuesten Rezeptur Formaldehyd [67, 83]. Die strengen Richtlinien Formaldehyd betreffend machen die Verwendung dieses Stoffes aus gesundheitlicher Sicht zunehmend unmöglich [81, 87]. Die Europäische Kommission und die WHO stufen Formaldehyd als krebserregend und mutagen ein [18, 88]. Zudem wurde 2015 die maximale erlaubte Arbeitsplatzkonzentration (MAK) für Formaldehyd gravierend von $0,62 \text{ mg/m}^3$ auf $0,37 \text{ mg/m}^3$ gesenkt [22]. Zahlreiche Anatomische Institute in Deutschland sind daher von der Schließung bedroht [27]. Die notwendige technische Umrüstung von Anatomien ist teuer und teilweise aufgrund baulicher Limitationen nicht möglich [24]. Es wurden bereits studentische Präparationskurse wegen Nichteinhaltung der MAK-Grenzwerte abgesagt [25, 31, 89]. Zur Diskussion um die Qualität von Fixierungen und deren Eignung für Aus- und Weiterbildung tritt vermehrt die Frage nach den gesundheitlichen Risiken [38, 81, 87]. Aufgrund der breiten Nutzung von Formaldehyd [33, 38, 67, 81, 87, 90] in Fixierungslösungen kommt der Suche nach neuen, geeigneteren und vor allen Dingen ungiftigeren Stoffen eine große Bedeutung zu [54]. Die hier vorgelegte Arbeit soll den Stoff Glucoprotamin auf Anwendbarkeit in Fixierungslösungen untersuchen und einen Beitrag zur aktuellen Diskussion um Fixierungslösungen leisten.

4.1 Die Fixierungswirkung von Glucoprotamin

Bisher ist Glucoprotamin als Wirkstoff in Desinfektionsmitteln beschrieben [44-50]. Nach Wissen des Autors sind die durchgeführten Untersuchungen die ersten in Bezug auf die Verwendung des Stoffes in Fixierungslösungen. Glucoprotamin fixierte die verwendeten Rattenorgane über einen Zeitraum von 18 Wochen, wobei sich die Wirkstoffkonzentration von 26 g/l bezüglich des Organerhalts, der visuellen und haptischen Eigenschaften als am besten geeignet erwies. Bei dieser Konzentration kam es zu keinerlei Anzeichen von Verwesung. Damit hat Glucoprotamin neben der fixierenden auch eine konservierende Wirkung. Dieser konservierende Effekt von Glucoprotamin auf die Organe konnte, durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen bestätigt werden. Es kam bei Glucoprotamin sowie FFL und EGFL zu keinerlei Wachstum von Keimen oder Sprosspilzen. Im unfixierten Kontrollgewebe kam es zum Wachstum von *Proteus mirabilis*, *Enterococcus spp.* und *Escherichia coli*. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Glucoprotamin ein etablierter Wirkstoff in diversen kommerziellen Desinfektionsmitteln ist [44-50]. Inwieweit diese antimikrobielle Wirkung von Glucoprotamin beim fixierten Körperspender erhalten bleibt, ist noch zu untersuchen. Es ergäben sich durch die Verwendung von Glucoprotamin jedoch vor allen Dingen gegenüber Ethanol-Fixierungen einige Vorteile. Ethanol hat Schwächen in der Wirkung gegen Viren [71], insbesondere unbehüllte Viren, Bakteriensporen und Prionen [5]. Es besteht der Verdacht, dass beim Ethanol-fixierten Körperspender die für eine bakterizide Wirkung benötigten Konzentrationen von 60-95% Ethanol [5] nicht erreicht werden [91]. Die Folge wäre eine unzureichende bakterizide Wirkung von EGFL am humanen Präparat und daraus resultierend eine Gefährdung der Arbeitssicherheit bei den Anwendern durch humanpathogene Keime.

Im Gegensatz dazu ist Formaldehyd gut wirksam gegen Viren und Bakterien (auch Mycobakterien) [92]. Problematisch bei der Verwendung von FFL, vor allem während längerer Kurse, ist das Wachstum von Schimmel [23]. Mit großer Wahrscheinlichkeit hat Glucoprotamin aufgrund seiner hervorragenden Desinfektionswirkung Vorteile gegenüber den etablierten Fixierungen. So haben Studien unter Mitarbeitern in Anatomien ein erhöhtes Risiko für Infektionen unter

anderem mit *Mycobacterium tuberculosis* nachgewiesen [93]. In Desinfektionsmitteluntersuchungen konnte eine besonders gute Wirksamkeit von Glucoprotamin gegen Mykobakterien nachgewiesen werden [45]. Darüber hinaus zeigte Glucoprotamin in Lösung eine gute antivirale Wirkung [49]. Inwieweit diese Ergebnisse in die Fixierungstechnik übertragen werden können, muss noch untersucht werden. Weitere Untersuchungen besonders unter Berücksichtigung der Anwendersicherheit in Bezug auf das Wachstum von humanpathogenen Keimen, Viren und Prionen am fixierten menschlichen Präparat im Sinne der Anwendersicherheit, wären wünschenswert.

Die Verwendung von niedrigeren Konzentrationen Glucoprotamin (2,6 g/l, 3,9 g/l und 10,4 g/l) in der Fixierlösung zeigte keine ausreichend fixierende Wirkung, es kam zu einer Eintrübung der Fixierungslösungen, und die Tierkörper verweseten nach kurzer Zeit. Höhere Konzentrationen von Glucoprotamin in der Fixierlösung (130,0 g/l und 195,0 g/l) zeigten ebenfalls keine fixierende Wirkung auf das Gewebe. Eine Erklärung hierfür könnte in der wachsartigen Grundstruktur [44] des Stoffes liegen, der somit wahrscheinlich nicht in das Gewebe eindringen kann.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Glucoprotamin-fixiertes Gewebe an Raumluft sehr schnell austrocknet. Dies ist auch bei weiteren in der Praxis verwandten und etablierten Fixierungslösungen wie FFL und EGFL ein bekanntes Problem. Ursächlich hierfür sind meist Verdunstungsvorgänge [54, 94, 95]. Um diesen entgegenzuwirken, wird bei Alkoholfixierungen z.B. Glycerin zugegeben [94]. Glycerin wirkt aufgrund seiner hydrophilen Struktur der Verdunstung entgegen und ist bei Raumtemperatur viskös, neigt also selbst nicht zum Verdunsten [96]. Es wäre in weiteren Versuchen zu untersuchen, ob eine Mischung von Glycerin und Glucoprotamin möglich ist und dadurch die Verdunstung des Fixierungsmittels verringert werden kann. In den beiden verwendeten glucoprotaminhaltigen Produkten Incidin® PLUS und Premier Klercide-CR® Biozid T sind laut Sicherheitsdatenblatt folgende weiteren Stoffe beigegeben: Fettalkoholethoxylat, 2-Phenoxyethanol sowie 2-2-Butoxyethoxy-Ethanol [73]. Fettalkoholethoxylat ist ein Konservierungsmittel und nur in Konzentrationen unter 1 % als solches zugelassen. 2-Phenoxyethanol ist ebenfalls wie 2-2-Butoxyethoxy-Ethanol ein Lösungsmittel [97]. Die spezifische Wirkung dieser Stoffe auf die Präparate wurde

nicht untersucht. Phenoxyethanol wurde in der Vergangenheit als mögliches Lagerungsmittel für anatomische Präparate [98] beschrieben. Jedoch wurde zur eigentlichen Fixierung der Präparate zunächst eine klassische 2%ige Formaldehydfixierungslösung verwandt, zur dauerhafteren Lagerung dagegen eine 1%ige Phenoxyethanollösung. Mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann eine Wirkung nicht, daher wären für die Zukunft Untersuchungen mit dem Reinstoff Glucoprotamin sinnvoll.

4.2 Einfluss von Glucoprotamin auf die Organstruktur, die haptischen und visuellen Eigenschaften

Die Fixierung mit Glucoprotamin führte bei den meisten Organen zu einer dauerhaften Erhaltung der Organstruktur. Die Haptik war zu weich. Mit Ausnahme des Gehirns, der Lunge und des Darmes waren die anderen untersuchten Organe während des gesamten Beobachtungszeitraums als solche zu erkennen. Die Erweichung der Präparate ist möglicherweise durch die polare Struktur des Glucoprotamin verursacht. Glucoprotamin hat eine hydrophile funktionelle Gruppe und einen hydrophoben Kohlenstoffschwanz und wirkt somit als Detergens. Ein Detergens reduziert Grenzflächenspannungen. Offenbar wird auch die Oberflächenspannung der Organe und Präparate durch den Wirkstoff Glucoprotamin herabgesetzt. Im Gegensatz dazu waren die Formaldehyd-fixierten Organe deutlich gehärtet. Dies ist bekannt, da Formaldehyd irreversible, starre Verbindungen zwischen Proteinen, sogenannte Cross-links, ausbildet [38, 63, 64]. Es gibt recht wenig Literatur über die Wirkung von Ethanol in Fixierungslösungen [55]. Der Wirkmechanismus von Alkoholen allgemein und Ethanol im Besonderen besteht über eine Denaturierung der Proteine und durch Störung von Wasserstoffbrückenbindungen [38]. Chemische Bindungen, welche die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen festigen, werden aufgebrochen [71]. Gleichzeitig kommt es durch Entzug von Wasser zu einer Härtung der Präparate [28]. Diese Härtung ist abhängig von der Dauer des Kontaktes mit Alkoholen [28]. In Ethanol-haltigen Fixierungslösungen wird aus diesem Grund so wie in der vorliegenden Arbeit Glycerin beigemischt, wodurch das fixierte Gewebe realitätsnäher und weicher wird [24, 38]. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch EGFL-fixiertes Gewebe ähnlich

hart wie FFL-fixiertes Gewebe[44]. Dies mag durch die lange Einwirkzeit des Ethanols und die daraus folgende starke Entwässerung der Organe verursacht sein. Beim Darm war das Fixierungsergebnis durch GPFL nicht zufriedenstellend. Die hohe Konzentration an Verdauungsenzymen im Gastrointestinaltrakt [99] könnte für die mangelhafte Wirkung von Glucoprotamin verantwortlich sein. Es wäre für die weiteren Versuche an menschlichen Körperspendern eine Lösung für den Gastrointestinaltrakt mit höherer Glucoprotamin-Konzentration zu untersuchen, die rektal in den Darm injiziert wird[32, 83]. Zu bedenken wäre jedoch der daraus resultierende erhöhte technische Aufwand [100]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Hemmung der enzymatischen Autolyse durch die Fixierungslösungen mittels einer FRET-Endoproteasenbibliothek zeigte jedoch für Glucoprotamin- und Formaldehyd-fixiertes Gewebe eine nahezu vollständige Inhibierung der Enzymaktivität, auch für das Darmgewebe. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass das für die enzymatische Testung verwendete Gewebe vor der Fixierung stark mechanisch zerkleinert wurde und damit auch der Darminhalt komplett mit der Fixierlösung in Verbindung stand. Bei der Organfixierung für die visuelle und haptische Untersuchung hingegen, wurde der Darm *in toto* fixiert und der Darminhalt nicht vorher durch Spülung entfernt. Interessanterweise waren die haptischen und visuellen Fixiereigenschaften von EGFL-fixiertem Darm im Gegensatz zu GPFL-fixiertem Darm besser, obwohl die EGFL-Fixierung im Darm und in der Niere nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der Endoproteasen, sondern lediglich zu einer Reduktion der Proteasenaktivität führte. Offenbar dringt GPFL weniger gut in das komplette Organ ein. Hier scheinen die etablierten Fixierungslösungen gegenüber GPFL im Vorteil. Dabei mag die Molekülgröße eine Rolle spielen, Ethanol- und Formaldehydmoleküle [96] sind deutlich kleiner als Glucoprotamin. Ob die polare Struktur des Glucoprotamins ebenfalls eine Rolle in Bezug auf die Flusseigenschaften spielt, wäre in weiteren Untersuchungen zu klären. Formalinhaltige Fixierungslösungen sind bereits lange bekannt, aber es gibt einige Aspekte, vor allem in der chemischen und physikalischen Theorie, die nicht untersucht sind [101, 102]. Zum Beispiel die direkte Wirkung auf die Endoproteasenaktivität. Formaldehyd wirkt auf Proteine und bildet mit ihnen feste Verbindungen. Es kommt zu einer Denaturierung

und folglich zum Verlust der Funktion der Enzyme [103]. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht direkt überprüft, ob Glucoprotamin ebenfalls eine Wirkung auf die Strukturproteine ausübt. Jedoch scheint es aufgrund seiner polaren Struktur, die Wirkung eines Detergens aufzuweisen [44]. Eine Wirkung auf die Sekundär- und Tertiärstruktur ist anzunehmen. Daher scheint auch bei Glucoprotamin eine Denaturierung von Proteinen wahrscheinlich. Eine Aufgabe zukünftiger Forschung wäre, die Wirkung des Stoffes Glucoprotamin auf ebenjene Strukturen zu untersuchen. Geeignet erscheinen hierzu die CD - und die NMR– Spektroskopie, mit denen Veränderungen in der Proteinstruktur durch Fixierungslösungen sichtbar gemacht werden könnten. Auch an der Lunge war die Fixierung durch GPFL mangelhaft. Das Gewebe zeigte sich schon während der Zeit in der Fixierungslösung zusammengefallen. Mit weiterer Lagerung zersetzte sich die Lunge weitgehend. Die Untersuchung der Enzymaktivität an GPFL-fixiertem Lungengewebe führte jedoch zu einer vollständigen Hemmung der Proteasen, sodass Autolyse als Grund für den schlechten Gewebeerhalt unwahrscheinlich ist. Eine deutliche Veränderung des Lungengewebes durch Fixierung ist schon lange bekannt. In früheren Studien zeigte sich bei Fixierung mit vor allem Formaldehyd-haltigen Fixierungslösungen die Neigung zum Kollabieren der Lunge [104, 105]. Als Grund werden die Retraktionskräfte der elastischen Fasern der Lunge genannt [106]. Ein weiterer Grund mag ein Auswaschen des Surfactant mit konsekutivem Kollaps der Atemwege sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Organe entnommen und dann fixiert. Die Wirkung der Fixierung, speziell auf die Lunge, bei Fixierung eines ganzen Präparates, wäre in Zukunft zu untersuchen. Möglicherweise spielen auch hier die bereits beim Darm angesprochenen Molekülgrößen und die Penetrationsgeschwindigkeiten eine Rolle. Interessant wäre, in weiteren Versuchen die Wirkung von Fixierungslösungen auf die Struktur der Proteine zu klären.

Die Erhaltung der natürlichen, physiologischen Farbe eines Gewebes ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Qualität einer Fixierung. Im Rahmen dieser Arbeit konnten vorherige Untersuchungen bestätigt werden, die zeigen, dass alle Fixierungslösungen die natürlichen Farben von Organen, Präparaten und Gewe-

ben verändern [7, 107]. GPFL führte zu einem deutlichen Ausbleichen der Präparate. Die Veränderungen der Farbe der Organe durch GPFL sind teilweise durch einen nicht zu verhindernden Blutverlust verursacht. Zum anderen kann es durch die lytische Detergenzienwirkung von Glucoprotamin auf Membranen von Erythrozyten [108] zu einer Hämolyse und damit zu einer starken Entfärbung gekommen sein. Dem Blutverlust unterliegen jedoch auch die mit anderen Fixierungslösungen (FFL und EGFL) fixierten Organe. FFL-fixiertes Gewebe zeigte eine Farbveränderung ins eher Bräunliche. Dies resultiert aus einer raschen Blutgerinnung durch Koagulation der Blutproteine [40]. EGFL verfärbte die Organe in der vorliegenden Arbeit ebenfalls braun. Als Gründe hierfür werden, neben dem Blutverlust in der Literatur, häufig oxidative Vorgänge genannt [54].

In der anatomischen Forschung ist es üblich die Güte von Fixierungsqualität durch Anwender in standardisierten Fragebögen zu überprüfen [109-113]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gruppe von Anwendern (Ärzte, Anatomen, Studenten der Humanmedizin) mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens befragt. Es wurden die haptischen, visuellen und olfaktorischen Eigenschaften von Glucoprotamin-, Formaldehyd-, und Ethanol-Glycerin-fixierten Rattenorganen im Vergleich zu frisch entnommenen, unfixierten Rattenorganen abgefragt. Die standardisierten Fragebögen basierten auf einer numerischen Rationalskala, ein gängiges und besonders in der Schmerzevaluation oft benutztes und validiertes Hilfsmittel [114, 115]. Auch in der anatomischen Forschung werden zu der Beurteilung von Fixierungen Rationalskalen verwendet [113]. Vorteile der verwendeten Skala sind die Möglichkeit einer Rangordnung [116] und die Messung von subjektiven Eindrücken, beispielsweise von der Farbe. In der anatomischen Forschung gibt es eine Vielzahl von Methoden der Evaluation von Fixierungsqualität. Teilweise werden dichotome Fragen (ja /nein) gestellt [116], diese sind lediglich nominalskaliert und lassen somit keine Rangbildung zu. Mitunter mangelt es an standardisierten Fragebögen und die Menge der Probanden variiert stark [117]. Teilweise bleibt unklar, wie viele Personen die Güte einer Fixierung beurteilen [34]. Es fehlt an objektiven Vergleichsmethoden von fixierten anatomischen Präparaten und der *in vivo* Situation. Die Beurteilung der Fixierungsqualität hängt demnach hauptsächlich von der Meinung von weniger Anatomen ab [76, 109].

Im ersten Teil des in dieser Arbeit verwendeten Fragebogens wurden die Kriterien Farbe, Abgrenzbarkeit topografischer Strukturen, Festigkeit und Elastizität abgefragt. Die Kriterien Elastizität und Festigkeit wurden in der vorliegenden Arbeit höher als die Kriterien Farbe und Abgrenzbarkeit topografischer Strukturen bewertet und wurden mithilfe eines vorher festgelegten Scores ermittelt. Dies geschah aus der Überlegung heraus, dass FFL und EGFL eine Tendenz zur Härtung der Präparate zeigen [38] und dass für realitätsnahes Präparieren eine weiche Fixierung wünschenswert ist [38, 63, 64, 95]. Für chirurgische Kurse ist ebenfalls eine weiche, lebensechte Fixierung notwendig, um realistisches Training zu ermöglichen. Die Farberhaltung war bei FFL und EGFL deutlich besser als bei GPFL. Der Score legt jedoch weniger Wert auf Farbe, da der Fokus vor allem auf wirklichkeitsnaher Haptik in chirurgischen Trainingskursen lag. Die Elastizität dagegen wurde bei GPFL deutlich besser bewertet. Keines der untersuchten Organe erreichte im Scoring das Maximum an Punkten, was in allen Kategorien „wie frisch“ entsprochen hätte. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Fixierungslösungen entnommenes Gewebe verändern und zu einer Veränderung der Struktur, der Farbe und der biomechanischen Eigenschaften führen [87, 109, 118, 119]. Die GPFL-Fixierung wurde jedoch bei jedem Organ höher bewertet als die mit FFL und EGFL fixierten Organe.

Im zweiten Teil des Fragebogens wurden die Befragten gebeten, die makroskopisch sichtbaren Strukturen der unterschiedlich fixierten Organe (GPFL, FFL, EGFL) mit frisch entnommenen Organen zu vergleichen. Es zeigte sich, dass die Probanden mit der Anatomie der verwendeten Rattenorgane nicht vertraut waren, da die Organe in 11 % der Fälle nicht richtig erkannt wurden. Der Fragebogen war in der Retrospektive ungünstig und missverständlich formuliert. Es wurden bei allen Organen alle Strukturen abgefragt, obwohl diese nicht immer vorhanden oder sichtbar waren. Ein generelles Problem der Beurteilung ist die doch mitunter sehr subjektive und folglich unterschiedliche Wahrnehmung und Beurteilung von Kriterien wie Elastizität oder Farbe [117]. Vor allem in der Beurteilung feiner anatomischer Strukturen zeigten auch Fragebögen in anderen Studien Schwächen [117]. Erschwerend kam hinzu, dass die untersuchten Organe eine Größe von wenigen Zentimetern hatten, ein deutlicher Unterschied zu der, den

Untersuchern bekannten, Anatomie der menschlichen Organe. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass es im Bereich der Forschung an objektiven Standards in der Beurteilung von Fixierungsqualität mangelt. Dieses Ergebnis entspricht der Beurteilung in der Literatur [76].

Um zu genaueren Aussagen über die Vergleichbarkeit von Veränderungen der Präparate durch Fixierungen zu kommen, könnten in Zukunft Geräte zur Materialprüfung eingesetzt werden [112, 120]. Es gibt bereits Versuche mit dem Cutometer® [117], einem in der Dermatologie verwendeten Messgerät von Hautelastizität [121, 122]. Hiermit könnten Unterschiede und Veränderungen der Elastizität von Haut und Organen durch Fixierungslösungen objektiviert werden. Ein weiteres Gerät zur Messung der Beweglichkeit von Gelenken ist das Goniometer, welches auch im Bereich der Fixierungsbeurteilung angewandt wird [40, 123]. Mit dem Goniometer können die Bewegungsausmaße der Gelenke von fixierten Körpern gemessen werden. Zudem kann die Farbe über Messung der Rot-, Gelb- und Blauanteile (RGB) in Fotografien beurteilt und verglichen werden [123]. Allerdings stellt die Suche nach weiteren objektiven Messmethoden von Fixierungsqualität eine Aufgabe für die Zukunft dar [76].

4.3 Beurteilung des Geruches verschiedener Fixierungslösungen

Der Geruch von fixiertem Gewebe und auch der Fixierlösungen ist ein weiteres wichtiges Kriterium. Formaldehyd gilt als schlecht riechend und beißend [111, 124], teilweise auch als störend. Der Geruch des Formaldehyds wird neben der Gesundheitsgefahr als problematisch angesehen [125]. Weiterhin gilt er als sehr einprägsam, teilweise wird er mit den Erinnerungen an das erste Präparieren an menschlichen Körpern in Verbindung gebracht [126]. Der Geruch von ethanolhaltigen Fixierungen wird demgegenüber als allgemein weniger stark und angenehmer als Formaldehyd angegeben [38]. Der Geruch des Ethanol wird als würzig beschrieben [96]. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde der Geruch von GPFL bei allen Organen signifikant besser beurteilt als FFL und EGFL. Jedoch wurden FFL und EGFL insgesamt weniger negativ als in der Literatur bewertet. Dies wäre durch den aus dem Anatomischen Institut und dem Präparationskurs

vertrauten und eher positiv besetzten Geruch zu erklären [126]. Zur Herstellung der GPFL wurde das glucoprotaminhaltige Desinfektionsmittel Premier Klercide-CR® Biozid T verwendet. Dieses Reinraumdesinfektionsmittel enthält laut Herstellerangaben Parfüme und Duftstoffe. Diese Parfüme und Duftstoffe führen dazu, dass die mit GPFL fixierten Rattenorgane einen ungewöhnlich guten Geruch aufweisen. Der direkte Vergleich mit den herkömmlichen Fixierungslösungen ist somit nicht möglich, da diesen keine Duftstoffe oder Parfüme zugesetzt wurden. Aus diesem Grund wäre, wie bereits für die Beurteilung der anderen Eigenschaften erwähnt, eine weitere Studie mit dem Reinstoff Glucoprotamin notwendig. In der Literatur gibt es bereits weitere Fixierungslösungen, die mit Geruchsstoffen wie beispielsweise Thymol versetzt sind [38]. Hier werden neben dem angenehmen Geruch nach Thymian, die bakteriziden Eigenschaften des Stoffes hervorgehoben. Auch der Einsatz von Geruchsstoffen mit positiven Eigenschaften wie Hemmung von Keimwachstum macht Mischfixierungen mit beispielsweise Thymol interessant.

4.4 Weitere mögliche Vorteile der Verwendung des Stoffes Glucoprotamin in Fixierungslösungen

4.4.1 Gesundheitliche Aspekte

Die Gesundheitsgefahr durch Fixierungslösungen für Anwender ist in den letzten Jahren mehr in den Fokus der Forschung gerückt [21, 81, 87, 124, 127-129]. Die Suche nach Methoden ohne Gefahr für den Anwender ist deshalb ein zentraler Gegenstand der aktuellen Forschung. Besonders hier ist Glucoprotamin mit seinen relativ geringen gesundheitsschädlichen Eigenschaften interessant. Glucoprotamin führt zu keiner Bildung von Aerosolen [130]. Diese positive Eigenschaft bewirkt, dass von dem Stoff keine Gefahr beim Einatmen ausgeht [131]. Es sollte lediglich der direkte Kontakt mit dem Stoff vermieden werden. Glucoprotamin ist bei seiner Verwendung als Desinfektionsmittel gering toxisch und von geringer Gefahr für den Anwender [49]. Die Gesundheitsgefahren von Formaldehyd wurden bereits ausführlich dargelegt. Es gilt als krebserregend und mutagen [18 ,

88] und neigt zur Aerosolbildung, sodass häufig die geforderten Messwerte überschritten werden [21]. Ethanol gilt als mögliches Kokarzinogen [132], jedoch als weniger gesundheitsschädlich als Formaldehyd [24, 38, 133-135]. Problematisch bei Ethanol in Fixierungslösungen ist zudem die nicht vorhandene Abtötung von Bakteriensporen sowie eine eingeschränkte Wirksamkeit auf Viren [71]. Es besteht die Gefahr der Übertragung von Krankheiten. Eine Gefahr geht zusätzlich von den brennbaren Dämpfen des Ethanols aus, daher müssen die Räumlichkeiten explosionsgeschützt sein [38].

4.4.2 Kosten

Die zunehmenden finanziellen Zwänge, denen sich auch Universitäten und Kliniken nicht entziehen können, werfen auch die Frage nach den Kosten von Fixierungslösungen auf [24, 38, 39, 61]. Im Folgenden werden nur die Kosten für Chemikalien erörtert.

Die Anforderungen an technische Ausstattung, die GPFL, FFL und EGFL stellen und die sich auch auf die Kosten auswirken, sind unterschiedlich. So ist beispielsweise die Lagerung von Formaldehyd und die Absaugung von Formaldehyddämpfen sehr aufwändig, teuer und teilweise, aufgrund gestiegener Anforderungen, nicht mehr durchführbar [24]. Für die Lagerung von Ethanol gibt es aufgrund seiner Explosionsgefahr spezielle Erfordernisse [38]. Glucoprotamin ist diesbezüglich unproblematisch und durch die Verwendung wären etwaige Umbaumaßnahmen unnötig. Dies könnte enorme, hier in der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigte Kosten einsparen. Die Kosten für 15-20 Liter EGFL, wie es für einen Körperspender im Anatomischen Institut der Universität Tübingen genutzt wird, betragen ca. 30-40 €. Die Chemikalien für einen mit 20-28 Litern FFL fixierten Körperspender betragen rund 55-77€. Im Vergleich hierzu stellt GPFL aktuell die teuerste Fixierungslösung dar. Durch das relativ teure Reinraumdesinfektionsmittel Premier Klercide-CR Biozid T würden die Kosten pro fixiertem Körper (15-20 Liter) 450-600€ betragen. Das Produkt Incidin Plus kostet rund 23€ pro Liter [136]. Bei Verwendung dieses Produktes in der hier optimalen Konzentration von 26 g/l wären die Kosten im Bereich der vorbekannten Fixierungslösun-

gen. Es könnte auch versucht werden die GP-Konzentration in Fixierungslösungen zu reduzieren, was folglich ebenfalls eine Kostenreduktion nach sich ziehen würde.

4.4.3 Mögliche Verwendung von Glucoprotamin in der Histologie

Auch im Bereich der Histologie und Histopathologie ist der Ersatz von Formaldehyd aufgrund seiner bisher breiten Verwendung ein Thema [137]. Formaldehydhaltige Fixierungslösungen sind im Bereich der Routinepathologie die am breitesten eingesetzten Fixierungslösungen [138]. Immer wieder werden Versuche unternommen das Formaldehyd zu ersetzen [137-139]. Interessant wäre vor diesem Hintergrund die Testung von Glucoprotamin auf dessen Eignung in Fixierungslösungen der Histopathologie.

4.5 Abschließende Bemerkungen

Das Pyrrolidinderivat Glucoprotamin zeigte eine eingeschränkte fixierende Wirkung auf Rattenpräparate. Aufgrund der hier in der Arbeit vorgestellten Ergebnissen scheinen jedoch weitere Versuche, nach Möglichkeit mit dem Reinstoff, an menschlichen Körperspendern gerechtfertigt. Der Farberhalt der Fixierung mit GPFL war nicht optimal. GPFL hatte beim Darm und der Lunge unzureichende Fixierung zur Folge, eventuell wären Mischfixierungen mit z.B. Ethanol in weiteren Versuchen zu untersuchen. Auch die Eignung von glucoprotaminhaltigen Fixierungslösungen in Präparationskursen sollte untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass GPFL, ähnlich wie die bekannten Fixierungslösungen, zum Austrocknen neigt. Durch konsequentes Abdecken und Beimischung von Glycerin in die Fixierungslösung könnte diesem Vorgang begegnet werden. Aufgrund der enzymhemmenden Eigenschaften erscheinen Pyrrolidinderivate jedoch als Inhaltsstoff in möglichen zukünftigen Fixierungslösungen geeignet.

5. Zusammenfassung

Das Erlernen der menschlichen Anatomie gilt als unverrückbarer Grundpfeiler der ärztlichen Ausbildung. Die Vermittlung anatomischen Wissens wird in Kursen und Seminaren bis zum heutigen Tag an fixierten menschlichen Körpern durchgeführt. Fixierungslösungen, welche den menschlichen Körper in möglichst lebensechtem Zustand erhalten sollen, beinhalten häufig Formaldehyd. Formaldehyd gilt als kanzerogen und die Grenzwerte wurden in den letzten Jahren dahingehend verschärft, dass ein weiterer Gebrauch in Anatomien aus gesundheitlicher und finanzieller Sicht zunehmend untragbar wird. Die Suche nach Fixierungslösungen, die den menschlichen Körper möglichst nahe an der *in vivo*-Situation erhalten und gleichzeitig ohne gesundheitliche Gefahren für Anwender sind, ist Gegenstand aktueller Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Tiermodell in standardisierten Testreihen die fixierenden Eigenschaften des antimikrobiell wirksamen Pyrrolidinderivats Glucoprotamin[®] an ganzen Rattenkörpern und unterschiedlichen Rattenorganen untersucht. Für diese Analysen wurden *post mortem* Rattenkörper und resektierte Rattenorgane in Glucoprotamin[®]-Fixierungslösung unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert und für bis zu 131 Tage bei Raumtemperatur an Luft gelagert. Ausgewertet wurde das generelle Erscheinungsbild der fixierten Rattengewebe, die Beurteilung der haptischen und visuellen Gewebeeigenschaften durch mehrere Anatomen, Chirurgen und Medizinstudenten und die mikrobiologische Belastung der jeweiligen Rattenkörper. Dabei stellten sich mit 26g/l Glucoprotamin[®]-fixierte Rattenkörper und -organe, mit Ausnahme von Lunge und Darm, im Gegensatz zu den unnatürlich gehärteten Formalinpräparaten als gut fixierte Präparate mit einer realitätsnahen Haptik heraus. Im Vergleich zu Ethanol-fixiertem Gewebe und frischem Gewebe waren Glucoprotamin[®]-fixierte Rattenorgane jedoch deutlich zu weich. Auch war der Farberhalt des Gewebes schlechter als bei den etablierten Fixierlösungen. Ferner wurde die antimikrobielle Wirkung von Glucoprotamin[®] überprüft; nach Fixierung der Rattenkörper mit Glucoprotamin[®] konnten keine Keime im Gewebe nachgewiesen werden. Zu einer ersten Analyse der möglichen fixierenden Wirkungsweise von Glucoprotamin[®] wurde ein FRET-

basierter Endopeptidase-Assay durchgeführt. Dieser ergab eine komplette Hemmung der Enzymaktivität durch Glucoprotamin®.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist Glucoprotamin® nur bedingt als Fixierungsmittel geeignet. Die neu identifizierte Wirkungsweise der Enzymaktivitätshemmung von Glucoprotamin® stellt jedoch einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung neuer fixierender und konservierender Wirkstoffe aus der Gruppe der Pyrrolidinderivate dar.

6.Literaturverzeichnis

1. Doll, S. *Friedrich Tiedemann (1781-1861)*. 2015 [cited 2016 13.01.2016]; Available from: <http://www.ub.uni-heidelberg.de/helios/digi/anatomie/tiedemann.html>.
2. Papa, V. and M. Vaccarezza, *Teaching Anatomy in the XXI Century: New Aspects and Pitfalls*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 310348.
3. Barton, D.P., et al., *Dissection of soft-preserved cadavers in the training of gynaecological oncologists: report of the first UK workshop*. Gynecol Oncol, 2009. **113**(3): p. 352-6.
4. Holzle, F., et al., *Thiel embalming technique: a valuable method for teaching oral surgery and implantology*. Clin Implant Dent Relat Res, 2012. **14**(1): p. 121-6.
5. Demiryurek, D., A. Bayramoglu, and S. Ustacelebi, *Infective agents in fixed human cadavers: a brief review and suggested guidelines*. Anat Rec, 2002. **269**(4): p. 194-7.
6. Reznick, R.K. and H. MacRae, *Teaching Surgical Skills — Changes in the Wind*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(25): p. 2664-2669.
7. Kerckaert I, V.H.T.P.P., D'Herde K., *Endogent: Centre for Anatomy and Invasive Techniques*. Anatomy (International Journal of Exoerimental and Clinical Anatomy), 2008 **2**: p. 28-33.
8. Sheckter, C.C., et al., *Incorporation of fresh tissue surgical simulation into plastic surgery education: maximizing extraclinical surgical experience*. J Surg Educ, 2013. **70**(4): p. 466-74.
9. Ahmed, K., et al., *A Novel Cadaveric Simulation Program in Urology*. J Surg Educ, 2015.
10. Sharma, M., et al., *Construct Validity of Fresh Frozen Human Cadaver as a Training Model in Minimal Access Surgery*. JSLS : Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons, 2012. **16**(3): p. 345-352.
11. Jansen, S., et al., *Fresh frozen cadaver workshops for advanced vascular surgical training*. ANZ Journal of Surgery, 2014. **84**(11): p. 877-880.
12. Benkhadra, M., et al., *Comparison of fresh and Thiel's embalmed cadavers according to the suitability for ultrasound-guided regional anesthesia of the cervical region*. Surgical and Radiologic Anatomy, 2009. **31**(7): p. 531-535.
13. Miller, D., *Creutzfeldt-Jakob disease in histopathology technicians*. N Engl J Med, 1988. **318**(13): p. 853-4.
14. de Craemer, D., *Postmortem viability of human immunodeficiency virus--implications for the teaching of anatomy*. N Engl J Med, 1994. **331**(19): p. 1315.
15. Shoja, M.M., et al., *A historical perspective: infection from cadaveric dissection from the 18th to 20th centuries*. Clin Anat, 2013. **26**(2): p. 154-60.
16. Hauptmann, M., et al., *Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(21): p. 1615-23.
17. Viegas, S., et al., *Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production*. J Occup Med Toxicol, 2010. **5**(1): p. 25.
18. Kommission, E., *Verordnung (EU) Nr. 605/2014 der Kommission vom 5. Juni 2014*. 2014: Amtsblatt der Europäischen Union p. 47.
19. R, K., *Formaldehydexpositionen in Pathologien und Anatomien Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 2003*. **Nr. 7/8**(Juli/August).

20. Eickmann, U.T., *Berufliche Exposition gegenüber Formaldehyd im Gesundheitsdienst Umweltmedizin in Forschung und Praxis*, 2006: p. 363-368.
 21. Thullner, I.S., R.; Hohenberger, L., *Formaldehyd in der vorklinischen medizinischen Ausbildung (Anatomie)*. Gefahrstoffe- Reinhaltung der Luft, 2015. **6/2015**: p. 219-228.
 22. Soziales, B.f.A.u., *Technischen Regeln für Gefahrstoffe (TRGS)*. Gemeinsamen Ministerialblatt (GMBL) des Bundesministerium für Arbeit und Soziales (BMAS) 2015
- p. S 28.
23. Janczyk, P., et al., *Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy—A study based on histo- and microbiological analyses*. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 2011. **193**(1): p. 71-75.
 24. Hammer, N., et al., *Comparison of modified thiel embalming and ethanol-glycerin fixation in an anatomy environment: Potentials and limitations of two complementary techniques*. Anatomical Sciences Education, 2015. **8**(1): p. 74-85.
 25. Kramer, B. *Zu hohe Formalinwerte: Uni Frankfurt stoppt Präparierkurse für Medizinstudenten*. 2015 21.04.2015 – 13:18 Uhr [cited 2015 28.04.2015]; Available from: <http://www.spiegel.de/unispiegel/studium/uni-frankfurt-praep-kurse-fallen-wegen-zu-hoher-formalinwerte-aus-a-1029569.html>.
 26. Pfeilschifter, J., *Betreff: Arbeitsplatzgrenzwerte für Formaldehyd*. 2015.
 27. Gesellschaft, A., *Formalinbelastung-Brief an die Kollegen*. 2015.
 28. Aescht, E., et al., eds. *Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. ed. 2010, Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg. XII, 551 S.
 29. Steinmann, W., *Grundzüge der Konservierung und Erhaltung organischer Objekte* Der Präparator, 1969. **15**: p. 37-41.
 30. Steinmann, W., *Die Konservierung medizinischer und zoologischer Präparate*. Der Präparator, 1975. **21**: p. 8-11.
 31. Schmidt, T.J., *Zu hohe Formalin-Werte Anatomie-Kurs ohne Körper, in Frankfurter Neue Presse*. 2015: Frankfurt.
 32. Thiel, W., [*The preservation of the whole corpse with natural color*]. Ann Anat, 1992. **174**(3): p. 185-95.
 33. Thiel, [*Supplement to the conservation of an entire cadaver according to W. Thiel*]. Ann Anat, 2002. **184**(3): p. 267-9.
 34. Alberty, J., et al., [*Thiel method fixed cadaver ears. A new procedure for graduate and continuing education in middle ear surgery*]. HNO, 2002. **50**(8): p. 739-42.
 35. Wolff, K.D., et al., *Thiel embalming technique: a valuable method for microvascular exercise and teaching of flap raising*. Microsurgery, 2008. **28**(4): p. 273-8.
 36. Eisma, R., et al., *A comparison of Thiel and formalin embalmed cadavers for thyroid surgery training*. Surgeon, 2011. **9**(3): p. 142-6.
 37. Prasad Rai, B., et al., *A qualitative assessment of human cadavers embalmed by Thiel's method used in laparoscopic training for renal resection*. Anat Sci Educ, 2012. **5**(3): p. 182-6.
 38. Hammer, N., et al., *Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming*. Anat Sci Educ, 2012. **5**(4): p. 225-33.
 39. Goyri-O'Neill, J., et al., *Improvement of the embalming perfusion method: the innovation and the results by light and scanning electron microscopy*. Acta Med Port, 2013. **26**(3): p. 188-94.
 40. Hayashi, S., et al., *Saturated salt solution method: a useful cadaver embalming for surgical skills training*. Medicine (Baltimore), 2014. **93**(27): p. e196.

41. Willaert, W., et al., *Lifelike Vascular Reperfusion of a Thiel-Embalmed Pig Model and Evaluation as a Surgical Training Tool*. Eur Surg Res, 2016. **56**(3-4): p. 97-108.
42. Kennel, L., et al., *Learning anatomy through Thiel- vs. formalin-embalmed cadavers: Student perceptions of embalming methods and effect on functional anatomy knowledge*. Anatomical Sciences Education: p. n/a-n/a.
43. Lone, M., et al., *Assessment of Thiel-Embalmed Cadavers as a Teaching Tool for Oral Anatomy and Local Anesthesia*. J Dent Educ, 2017. **81**(4): p. 420-426.
44. Disch, K., *Glucoprotamine--a new antimicrobial substance*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1994. **195**(5-6): p. 357-65.
45. Meyer, B. and C. Kluin, *Efficacy of Glucoprotamin®containing disinfectants against different species of atypical Mycobacteria*. Journal of Hospital Infection, 1999. **42**(2): p. 151-154.
46. Widmer, A.F.M.D.M.S. and R.M.D.F. Frei, *Antimicrobial Activity of Glucoprotamin: A Clinical Study of a New Disinfectant for Instruments* • Infection Control and Hospital Epidemiology, 2003. **24**(10): p. 762-764.
47. Tyski, S., et al., *Antimicrobial activity of glucoprotamin-containing disinfectants*. Pol J Microbiol, 2009. **58**(4): p. 347-53.
48. Meinke, R., et al., *Equal efficacy of glucoprotamin and an aldehyde product for environmental disinfection in a hematologic transplant unit: a prospective crossover trial*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2012. **33**(11): p. 1077-80.
49. Zeitler, B. and I. Rapp, *Surface-Dried Viruses Can Resist Glucoprotamin-Based Disinfection*. Applied and Environmental Microbiology, 2014. **80**(23): p. 7169-7175.
50. Chojecka, A., et al., *Glucoprotamin antimicrobial activity against selected standard antibiotic-resistant bacteria and reference strains used in the assessment of disinfection efficacy*. Roczn Panstw Zakl Hig, 2015. **66**(3): p. 281-8.
51. Fallert-Müller, A.R., *A bis I*. Lexikon der Biochemie. 1999, Heidelberg: Spektrum. VIII, 512.
52. Brinkmann, B.H.M., Burkhard [Hrsg.] *Mit ... 190 Tabellen*. Handbuch gerichtliche Medizin, ed. B. Brinkmann. 2004, Berlin: Springer. XXXVII, 1344.
53. Madea, B., ed. *Praxis Rechtsmedizin : Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung ; mit ... 173 Tabellen*. 2., aktualis. Aufl. ed. 2007, Springer-Medizin-Verl.: Heidelberg. XIX, 701 S.
54. Coleman, R. and I. Kogan, *An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching*. J Anat, 1998. **192 (Pt 3)**: p. 443-6.
55. Brenner, E., *Human body preservation - old and new techniques*. J Anat, 2014. **224**(3): p. 316-44.
56. Awogni, D., et al., *Button Fixation Technique for Achilles Tendon Reinsertion: A Biomechanical Study*. The Journal of Foot and Ankle Surgery, 2014. **53**(2): p. 141-146.
57. Lädermann, A., et al., *Injury to the axillary nerve after reverse shoulder arthroplasty: An anatomical study*. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2014. **100**(1): p. 105-108.
58. Mayer, S.W., D.S. Ruch, and F.J. Leversedge, *The Influence of Thumb Metacarpophalangeal Joint Rotation on the Evaluation of Ulnar Collateral Ligament Injuries: A Biomechanical Study in a Cadaver Model*. The Journal of Hand Surgery, 2014. **39**(3): p. 474-479.
59. Turner, A.J., A. Mellington, and F. Ali, *Fresh cadaver dissection for training in plastic surgery*. Br J Plast Surg, 2005. **58**(5): p. 742-3.
60. Anderson, S.D., *Practical light embalming technique for use in the surgical fresh tissue dissection laboratory*. Clin Anat, 2006. **19**(1): p. 8-11.

61. Eisma, R. and T. Wilkinson, *From "Silent Teachers" to Models*. PLoS Biol, 2014. **12**(10): p. e1001971.
62. W, S., *Über die Fixierung und Konservierung in Flüssigkeiten*. Der Präparator, 1972. **18**: p. 3-18.
63. Blum, F., *Der Formaldehyd als Härtungsmittel*. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik, 1893. **10**, **1893**: p. 314-315.
64. Blum, F., *Notiz über die Anwendung des Formaldehyds (Formol) als Härtungs- und Konservierungsmittel*. Anatomischer Anzeiger, 1894. **bd. 10 (1894-1895)**: p. 229-231.
65. Blum, F., *Über Wesen und Wert der Formolhärtung*. Anatomischer Anzeiger, 1896. **bd. 11 (1896)**: p. 718-727.
66. Sutherland, B.W., J. Toews, and J. Kast, *Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(6): p. 699-715.
67. Thiel, W., *[An arterial substance for subsequent injection during the preservation of the whole corpse]*. Ann Anat, 1992. **174**(3): p. 197-200.
68. Anderhuber, F., *Waldeyer - Anatomie des Menschen : Lehrbuch und Atlas in einem Band*. 19., vollst. überarb. und aktualis. Aufl. ed. De Gruyter Studium, ed. F. Anderhuber. 2012, Berlin [u.a.]: de Gruyter. XIX, 1176.
69. Forschungsgemeinschaft, D., *Stoffliste*, in *MAK- und BAT-Werte-Liste 2013*. 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 78.
70. Baan, R., et al., *A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations*. The Lancet Oncology, 2009. **10**(12): p. 1143-1144.
71. Assadian, O., K.H. Wallhäußer, and A. Kramer, eds. *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung : Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin ; 208 Tabellen*. 2008, Thieme: Stuttgart [u.a.]. XL, 984 S.
72. W., S., *Makroskopische Präparationsmethoden in der Medizin*. 1982: Thieme Verlag.
73. GmbH, E.D., *Sicherheitsdatenblatt Incidin plus*. 2013.
74. Kapprell, H.P., et al., *Development of a fluorescence resonance energy transfer peptide library technology for detection of protease contaminants in protein-based raw materials used in diagnostic assays*. Assay Drug Dev Technol, 2011. **9**(5): p. 549-53.
75. Sawhney, C., et al., *Benefits and Pitfalls of Cadavers as Learning Tool for Ultrasound-guided Regional Anesthesia*. Anesthesia, Essays and Researches, 2017. **11**(1): p. 3-6.
76. Balta, J.Y., et al., *Human preservation techniques in anatomy: A 21st century medical education perspective*. Clin Anat, 2015.
77. Pabst, R. and H.-J. Rothkötter, *Retrospective evaluation of undergraduate medical education by doctors at the end of their residency time in hospitals: Consequences for the anatomical curriculum*. The Anatomical Record, 1997. **249**(4): p. 431-434.
78. Hofer, M., M. Jansen, and S. Soboll, *Verbesserungspotenzial des Medizinstudiums aus retrospektiver Sicht von Facharztprüflingen*. Dtsch med Wochenschr, 2006. **131**(08): p. 373-378.
79. Bockers, A., et al., *The gross anatomy course: an analysis of its importance*. Anat Sci Educ, 2010. **3**(1): p. 3-11.
80. Whitehead, M.C., *Methods to reduce formaldehyde levels of cadavers*. Clin Anat, 2009. **22**(3): p. 421.
81. Salthammer, T., *The formaldehyde dilemma*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2015. **218**(4): p. 433-436.

82. Whitehead, M.C. and M.C. Savoia, *Evaluation of methods to reduce formaldehyde levels of cadavers in the dissection laboratory*. Clin Anat, 2008. **21**(1): p. 75-81.
83. Thiel, W., [Supplement to the conservation of an entire cadaver according to W. Thiel]. Ann Anat, 2002. **184**(3): p. 267-9.
84. Mayne, A.I.W., et al., *Stability of Lisfranc injury fixation in Thiel Cadavers: Is routine fixation of the 1st and 3rd tarsometatarsal joint necessary?* Injury, 2017. **48**(8): p. 1764-1767.
85. Völlner, F., et al., *Stability of knee ligament complex of Thiel-embalmed cadaver compared to in vivo knee*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2017. **71**(Supplement C): p. 392-396.
86. Giussani, C., et al., *Brain ultrasound rehearsal before surgery: A pilot cadaver study*. Clinical Anatomy, 2017. **30**(8): p. 1017-1023.
87. Lombardero, M., et al., *Saturated salt solution: a further step to a formaldehyde-free embalming method for veterinary gross anatomy*. Journal of Anatomy, 2017. **231**(2): p. 309-317.
88. Organization, W.H., *WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants*, in *WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants*. 2010: Geneva. p. 103-156

89. Waschke, J., *Bedeutung von Formaldehyd für die anatomische Lehre*, http://www.dguv.de/medien/ifa/de/vera/2016_fg_formaldehyd/vortrag_waschke.pdf, Editor. 2016: http://www.dguv.de/medien/ifa/de/vera/2016_fg_formaldehyd/vortrag_waschke.pdf.
90. Shi K., S.S., Yin W., *An improved non-formaldehyde tissue preservative*. Advanced Materials Research 2012. **Vols. 356-360**: p. pp 360-363.
91. Gleiser, C., *Persönliche Kommunikation über unveröffentlichte Untersuchungen der Wirkung von Fixierungslösungen auf humanpathogene Keime*. 2017.
92. Klaus Aktories, U.F., Franz Hofmann, Klaus Starke ; begründet von W. Forth, D. Henschler und W. Rummel ; mit Textbeiträgen von: K. Aktories [und vielen weiteren] *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker / Vol. 12*. Auflage. 2017-08-21.
93. Correia, J.C., J.L. Steyl, and H.C. De Villiers, *Assessing the survival of Mycobacterium tuberculosis in unembalmed and embalmed human remains*. Clin Anat, 2013.
94. Steinmann, W.F., *Makroskopische Präparationsmethoden in der Medizin*. 1982, Stuttgart ; New York: Thieme.
95. Hirt, B., *Persönliches Gespräch über die Praxis der Fixierung am Anatomischen Institut der Universität Tübingen*. 2016.
96. *Römpp online : der effizientere Zugriff auf das Wissen der Chemie*. Stuttgart: Thieme.
97. *Römpp*. 2001, Stuttgart: Thieme.
98. Frølich, K.W., et al., *Phenoxyethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes*. The Anatomical Record, 1984. **208**(2): p. 271-278.
99. *14.7 Pankreas, in Physiologie*, H.-C. Pape, S. Silbernagl, and R. Klinke, Editors. 2005, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
100. *12.6 Anatomische Besonderheiten bei der Ratte (Rattus norvegicus)*, in *Anatomie für die Tiermedizin*, F.-V. Salomon, H. Geyer, and U. Gille, Editors. 2008, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 747.

101. Thavarajah, R., et al., *Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation*. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP, 2012. **16**(3): p. 400-405.
102. Lang, G., *Formaldehydfixierung, Teil 1 und 2*. Biomed Austria, 2008.
103. Kiernan, J.A., *Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do*. Microscopy Today, 2000. **08**(01): p. 8–12.
104. Rahn, J., *Zur Bedeutung der sektionsbedingten Lungenretraktion für die pathologisch-anatomische Beurteilung von Atelektase, Emphysem und normaler Lunge*. Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin, 1961. **334**(2): p. 107-117.
105. Hausmann, R., et al., *Influence of lung fixation technique on the state of alveolar expansion—a histomorphometrical study*. Legal Medicine, 2004. **6**(1): p. 61-65.
106. *Die mechanischen Eigenschaften von Lunge und Thorax*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2014, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 340 ff.
107. Hubbell, D.S., et al., *Teaching gross anatomy using living tissue*. Clinical Anatomy, 2002. **15**(2): p. 157-159.
108. de Freitas, M.V., et al., *Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate*. Hematology, 2014. **19**(7): p. 424-430.
109. Balta, J.Y., et al., *The utility of cadaver-based approaches for the teaching of human anatomy: A survey of British and Irish anatomy teachers*. Anatomical Sciences Education, 2017. **10**(2): p. 137-143.
110. Prasad Rai, B., et al., *A qualitative assessment of human cadavers embalmed by Thiel's method used in laparoscopic training for renal resection*. Anatomical Sciences Education, 2012. **5**(3): p. 182-186.
111. Reed, A.B., et al., *Back to basics: use of fresh cadavers in vascular surgery training*. Surgery, 2009. **146**(4): p. 757-62; discussion 762-3.
112. Turan, E., et al., *The mixture of liquid foam soap, ethanol and citric acid as a new fixative–preservative solution in veterinary anatomy*. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 2017. **209**(Supplement C): p. 11-17.
113. Eisma, R., et al., *A comparison of Thiel and formalin embalmed cadavers for thyroid surgery training*. The Surgeon, 2011. **9**(3): p. 142-146.
114. Haefeli, M. and A. Elfering, *Pain assessment*. European Spine Journal, 2006. **15**(1): p. S17-S24.
115. Mannion, A.F., et al., *Pain measurement in patients with low back pain*. Nat Clin Pract Rheum, 2007. **3**(11): p. 610-618.
116. Bilge, O. and S. Celik, *Cadaver embalming fluid for surgical training courses: modified Larssen solution*. Surgical and Radiologic Anatomy, 2017. **39**(11): p. 1263-1272.
117. Rieth S. , G.C., Schauer J. ,Krimmel M. ,Reinert S. ,Hirt B., *Cutometer based measurements – an objective method to evaluate the tissue quality of microvascular flaps raised from cadavers*, in *109 Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft*. 2014: Salzburg.
118. Wang, L., et al., *Biomechanical Evaluation of a Novel Autogenous Bone Interbody Fusion Cage for Posterior Lumbar Interbody Fusion in a Cadaveric Model*. Spine (Phila Pa 1976), 2014.
119. Verstraete, M.A., et al., *Impact of drying and thiel embalming on mechanical properties of achilles tendons*. Clin Anat, 2015. **28**(8): p. 994-1001.
120. Ari, H.H. and S. Çınaroğlu, *A new approach to preservation of some organs using alkyd resin*. Research in Veterinary Science, 2011. **90**(1): p. 16-19.
121. Dobrev, H.P., *A study of human skin mechanical properties by means of Cutometer*. Folia Med (Plovdiv), 2002. **44**(3): p. 5-10.

122. Bonaparte, J.P., D. Ellis, and J. Chung, *The effect of probe to skin contact force on Cutometer MPA 580 measurements*. Journal of Medical Engineering & Technology, 2013. **37**(3): p. 208-212.
123. Jaung, R., P. Cook, and P. Blyth, *A comparison of embalming fluids for use in surgical workshops*. Clin Anat, 2011. **24**(2): p. 155-61.
124. Elshaer, N.S.M. and M.A.E. Mahmoud, *Toxic effects of formalin-treated cadaver on medical students, staff members, and workers in the Alexandria Faculty of Medicine*. Alexandria Journal of Medicine, 2017.
125. Balta, J.Y., C. Lamb, and R.W. Soames, *A pilot study comparing the use of Thiel- and formalin-embalmed cadavers in the teaching of human anatomy*. Anatomical Sciences Education, 2015. **8**(1): p. 86-91.
126. Bajracharya, S. and A. Magar, *Embalming: an art of preserving human body*. Kathmandu Univ Med J (KUMJ), 2006. **4**(4): p. 554-7.
127. Pabst, R., *Exposure to formaldehyde in anatomy: an occupational health hazard?* Anat Rec, 1987. **219**(2): p. 109-12.
128. Raja, D.S. and B. Sultana, *Potential health hazards for students exposed to formaldehyde in the gross anatomy laboratory*. J Environ Health, 2012. **74**(6): p. 36-40.
129. Hayashi, S., et al., *History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method*. Anat Sci Int, 2016. **91**(1): p. 1-7.
130. Eickmann, U., ed. *Chemische Gefährdungen im Gesundheitsdienst : Hilfestellungen für die Praxis*. 2014, ecomed Medizin: Heidelberg ; München ; Landsberg ; Frechen ; Hamburg. 464 S. Seite 78.
131. Kramer, A., *Gespräch über unveröffentlichte Untersuchungen Glucoprotamin betreffend*. 2017.
132. Organization, W.H., *IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans- Alcohol Drinking*. 1988: Lyon.
133. Hammer, N., C. Schroder, and S. Schleifenbaum, *On the suitability of Thiel-fixed samples for biomechanical purposes: Critical considerations on the articles of Liao et al. "Elastic Properties of Thiel-Embalmed Human Ankle Tendon and Ligament" and Verstraete et al. "Impact of Drying and Thiel Embalming on Mechanical Properties of Achilles Tendons"*. Clin Anat, 2015.
134. Good, D.W., et al., *Tissue quality assessment using a novel direct elasticity assessment device (the E-finger): a cadaveric study of prostatectomy dissection*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112872.
135. Hammer, N., et al., *Substitution of formaldehyde in cross anatomy is possible*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(7): p. 610-1.
136. HygienePartner24.de.
<https://www.hygienepartner24.de/Desinfektionsmittel/Flaechendesinfektionsmittel/Ecolab-Incidin-PLUS---aldehydfrei.html>. 2018 [cited 2018 14.06.2018].
137. Buesa, R.J., *Histology without formalin?* Annals of Diagnostic Pathology, 2008. **12**(6): p. 387-396.
138. Groelz, D., et al., *Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: A comparison of histology and RNA quality*. Experimental and Molecular Pathology, 2013. **94**(1): p. 188-194.
139. Zanini, C., et al., *Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible*. Environ Health, 2012. **11**: p. 59.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde durch Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen betreut. Sie wurde durch Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt, Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser und mich konzipiert.

Die Dekapitation der Ratte und die Organentnahmen wurden von Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser im Rahmen der weiteren Versuche am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen durchgeführt. Die Organe und Tiere wurden anschließend durch mich in den jeweiligen Fixierungslösungen eingebracht. Die haptische Beurteilung sowie die fotografische Dokumentation erfolgten durch mich.

Der Fragebogen wurde durch Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser und mich erdacht. Die Durchführung der Befragung und Auswertung der Fragebögen erfolgte durch mich.

Die Abstriche für die Mikrobiologische Begutachtung wurden von mir durchgeführt, die Untersuchung selbst erfolgte im Labor Niebecker, Gynmedlab, Ochtrup, Deutschland.

Die Untersuchung der Enzymaktivität mittels FRET erfolgte nach Einarbeitung durch Herrn Dr. med. Claus Zeyher im Interfakultären Zentrum für Biochemie durch mich. Die Proteinkonzentrationsbestimmungen wurde von Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser und von mir durchgeführt. Durch Frau Diplom-Statistikerin Aline Naumann vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie wurde ich bei der Erstellung des Scores und in Bezug auf die Statistik beraten. Von mir erfolgte die Auswertung.

Ich versichere hiermit, dass ich das Manuskript selbstständig verfasst habe und keine zusätzlichen Quellen als die von mir in dieser Arbeit angegebenen verwendet habe. Professor Dr. med. Bernhard Hirt und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser haben diese Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Tübingen, den

Jörg Michael Schauer

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Professor Dr. med. B. Hirt für die Überlassung des Themas danken. Frau Dr. rer. nat. C. Gleiser möchte ich für die Unterstützung während der vergangenen Jahre meinen Dank aussprechen. Beiden bin ich zudem für ihre freundlich zugewandte Art während der Erstellung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Dank gilt auch Frau Diplom-Statistikerin A. Naumann vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie für die Beratung in Bezug auf die Statistik, Herrn Dr. med. C. Zeyher für die Hilfe bei den Untersuchungen der Proteasen-Aktivität sowie Herrn Dr. rer. nat. H. Kalbacher für die Bereitstellung der Endoproteasenbibliothek.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen, meiner Familie und allen Unterstützern von Herzen für ihre Hilfe danken.