

Englisch

Plastination

In the traditional curriculum anatomy is thought and learned in the preclinical years. According to local circumstances more or less work is devoted to dissection or prosected specimen. Whereas this may be a method to acquire knowledge in systematic anatomy and topography it does not help very much in understanding applied aspects, f.i. x-ray anatomy.

With the rise of modern imaging methods the demand for correlated sections increased. Such specimen should be available in later phases of the curriculum when students deal with patient-oriented material. Plastination is a technique to preserve such specimen without any preserving fluids.

Specimen can easily be stored and handled by students according to their needs. Currently a set of plastinated sections is collected at our learning resource center for correlation with x-ray anatomy.

Plastination has been developed for teaching as well as for research. It had been invented about 20 years ago at Heidelberg by Dr. von Hagens and proved to be the superior method for preservation of gross specimen. Vienna was the first place to introduce this new method in the late 70ies. Nowadays the method is applied in more than 200 institutes for Human Anatomy, Clinical Pathology, Biology and Zoology worldwide. The „International Society for Plastination" was founded in 1986, the first issue of Journal of the International Society of Plastination appeared in 1987.

Plastination allows for preservation of specimen with completely visible surface and high durability. Plastinated specimen are odorless, not toxic and mechanically resistant to a high degree. Plastination is a procedure, during which water and fat of gross specimen are replaced by a polymerisable resin. First, specimen are dehydrated in an intermedium (f.e. acetone) with a boiling point below that of the resin. Then the intermedium is continuously evaporated under vacuum conditions. In this phase the resin replaces the intermedium. Finally, the resin is polymerised. Optical properties - opaque or transparent - and mechanical properties - smooth and flexible or hard - can be chosen by appropriate composition of plastination resins.

The three most important resins and hence plastination techniques are Silicone (**S-10**), Epoxy (**E-12**) and Polyester (**P-40**).

Principle of the Plastination Procedure

Fixation and dehydration

Most plastinated specimens start from fixed material and every established fixation method is applicable. We use formalin in concentrations between 5 and 20%. To enhance color preservation, the Kaiserling solution is suitable. Perfusion-fixed animals and arterially injected human cadavers yield well fixed organs in their correct anatomical positions. Organs removed at autopsy are fixed by immersion and infiltration, taking care to restore their natural shape.

Hollow organs have to be dilated during fixation, a step essential in heart plastination. All embalming fluids containing long chain alcohol (e.g., glycerol) have to be removed before dehydration, as they easily spoil the final specimens. Fixation can be omitted when epoxy resins are used (epoxy resins have fixing properties), resulting in better color preservation. However, care should be taken with respect to possible infections.

Dehydration and defatting are mandatory since water and lipids can not be exchanged directly against polymers. As known from histology, a proper dehydration procedure must avoid shrinkage. The degree of defatting is essential in plastination. The two methods used are stepwise dehydration in graded ethanol and freeze substitution with acetone.

Ethanol dehydration is used when a histological examination of the plastinated specimen is intended. The disadvantage of ethanol is its need for replacement by a low boiling intermediary solvent (acetone or methylene chloride). In addition, stepwise ethanol dehydration causes considerable shrinkage (roughly 50%) and is time consuming. Ethanol dehydration is advantageous for embalmed specimens, because it easily removes (especially after addition of H₂O₂) the long chain alcohol contained in the embalming fluid.

The standard dehydration procedure for plastination is freeze substitution in acetone at -25°C. This method saves time, requires less labor compared with ethanol dehydration, and causes only minor tissue shrinkage. It is the only way to dehydrate brain tissue with a tolerable (less than 10%) shrinkage. During freeze substitution, specimens (precooled to + 5°C) freeze immediately on immersion into the ice cold acetone (technical grade), thereby stabilizing the specimens shape instantly. Within the next 3-5 weeks (including 2-3 changes of the acetone), the specimens become completely dehydrated. The only disadvantage of freeze substitution is the formation of ice crystals in specimens which will also be used for histology. This can be overcome by processing specimens containing 20-100% formalin which acts as a freeze protecting agent.

In ethanol dehydration, the defatting is accomplished simultaneously with the dehydration procedure. In freeze substitution, defatting requires an additional acetone bath at room temperature. For lipid-rich specimens (containing bones, subcutaneous or subserous adipose tissue), defatting may be achieved in a final bath of methylene chloride. For plastination purposes, acetone is ideal because it acts as dehydration agent, defatting agent and intermediary solvent all at the same time and readily mixes with all the different resins used for plastination.

Forced impregnation

The central and most important step in plastination is re-placement of the intermediary solvent (which occupies the spaces originally filled with water and lipids) by curable polymers. This is achieved by means of a vacuum during forced impregnation. The specimen, soaked within a volatile intermediary solvent (acetone or methylene chloride), is placed into the polymer solution. The intermediary solvent has a high vapor pressure and a low boiling point (acetone: + 56°C, ethylene chloride: + 40°C), while the polymer solution has a low vapor pressure and a high boiling point. Therefore, when a vacuum is applied, only the intermediary solvent is continuously extracted out of the specimen and through the surrounding polymer solution in the form of gaseous bubbles. The surrounding resin is also eventually cleared completely of the intermediary solvent, and therefore only one impregnation bath is needed. Thus, the quantity of polymer consumed is very small and approximates, for silicone, at most to the volume of the specimens.

The speed of impregnation depends both, on the specimen and on the class of polymer used. Generally, polymers with a higher viscosity require a longer impregnation time than polymers of lower viscosity. The larger and denser the specimen, the slower an impregnation should be preferably with a low viscosity resin. To accomplish impregnation, any small oil driven vacuum vane pump is sufficient, speed must be adjusted by varying the vacuum by means of an air bypass valve. Gas bubble formation, easily observed through a window, is a useful indicator of the speed of impregnation. A too rapid extraction of the intermediary solvent causes a collapse of the structural framework of the specimens (i.e., shrinkage) and must be prevented. Very delicate specimens are preferably processed via methylene chloride. Its high specific gravity (1.3) ensures that the specimens will sink to the bottom of the impregnation bath (specific gravity about 1) and therefore they must not be weighted down.

Forced impregnation is carried out either at room temperature when using epoxy and polyester resin or at - 25°C in a deep freezer when working with silicone rubber. In the cold, the gas bubbles will rise slowly to the surface, without splashing. A final vacuum in the range between 2 and 15 mm Hg is necessary. At room temperature forced impregnation generally goes faster and with strong bubbling, since the polymers are less viscous and have a shorter processing time.

Curing (hardening)

The curing of the specimens is carried out after removal from the impregnation bath; the residual polymer of the bath should stay fluid for reuse. Three specific techniques are applied, which differ markedly from the usual curing of polymers cast in molds.

A gas curing procedure, specially developed for plastination is used for silicone specimens. In this technique, the decisive crosslinking curing agent is not a constituent of the impregnation bath, but is applied later to the specimens in a gaseous form. In a closed chamber, the impregnated specimens are exposed to an atmosphere which is continuously saturated with the gaseous hardener evaporating from a stock solution inside the chamber. Continuous evaporation and circulation of the gas is achieved by a small membrane pump speeding up the curing process.

The curing of specimens impregnated with epoxy resin (E 12) or polymerizing emulsion (PEM) takes advantage of the tissue amines contained within the specimens. Amines are effective accelerators. Together with anhydrides, used as hardeners for epoxy resins or PEM impregnation mixtures, they are sufficient to fully cure the specimens at +50°C. Curing of polyester-copolymers can be initiated by UVA-light followed by a heat treatment (+50°C). The inherent advantages are a long manufacturing time in the dark, and a lower temperature peak during their markedly exothermic curing.

Deutsch

Plastination

Im traditionellen Lehrplan wird die Anatomie in den vorklinischen Jahren behandelt und gelernt. Je nach den örtlichen Gegebenheiten wird mehr oder weniger an Sektionen oder präparierten Präparaten gearbeitet. Dies mag zwar eine Methode zum Erwerb von Kenntnissen in systematischer Anatomie und Topographie sein, ist aber für das Verständnis der angewandten Aspekte, z. B. der Röntgenanatomie, nicht sehr hilfreich.

Mit dem Aufkommen der modernen bildgebenden Verfahren stieg der Bedarf an korrelierten Schnitten. Solche Präparate sollten in späteren Phasen des Lehrplans zur Verfügung stehen, wenn die Studenten mit patientenorientiertem Material arbeiten. Die Plastination ist eine Technik zur Konservierung solcher Proben ohne Konservierungsflüssigkeiten.

Die Präparate können von den Studierenden leicht gelagert und nach ihren Bedürfnissen gehandhabt werden. Derzeit wird in unserem Lernzentrum eine Reihe von plastinierten Schnitten gesammelt, um sie mit der Röntgenanatomie in Beziehung zu setzen.

Die Plastination wurde sowohl für die Lehre als auch für die Forschung entwickelt. Sie wurde vor etwa 20 Jahren in Heidelberg von Dr. von Hagens erfunden und erwies sich als die beste Methode zur Konservierung von Präparaten. Wien war der erste Ort, an dem diese neue Methode in den späten 70er Jahren eingeführt wurde. Heute wird die Methode in mehr als 200 Instituten für Humananatomie, klinische Pathologie, Biologie und Zoologie weltweit angewendet. Die „Internationale Gesellschaft für Plastination“ wurde 1986 gegründet, die erste Ausgabe der Zeitschrift der Internationalen Gesellschaft für Plastination erschien 1987.

Die Plastination ermöglicht die Konservierung von Präparaten mit vollständig sichtbarer Oberfläche und hoher Haltbarkeit. Plastinierte Präparate sind geruchlos, ungiftig und in hohem Maße mechanisch widerstandsfähig. Die Plastination ist ein Verfahren, bei dem das Wasser und das Fett des Rohmaterials durch ein polymerisierbares Harz ersetzt werden. Zunächst werden die Proben in einem Intermedium (z. B. Aceton) mit einem Siedepunkt unter dem des Harzes dehydriert. Anschließend wird das Intermedium unter Vakuumbedingungen kontinuierlich verdampft. In dieser Phase ersetzt das Harz das Intermedium. Schließlich wird das Harz polymerisiert. Die optischen Eigenschaften - undurchsichtig oder durchsichtig - und die mechanischen Eigenschaften - glatt und flexibel oder hart - können durch eine geeignete Zusammensetzung der Plastinationsharze gewählt werden.

Die drei wichtigsten Harze und damit Plastinationsverfahren sind Silikon (S-10), Epoxid (E-12) und Polyester (P-40).

Das Prinzip des Plastinationsverfahrens

Fixierung und Entwässerung

Die meisten plastinierten Präparate gehen von fixiertem Material aus, und jede etablierte Fixierungsmethode ist anwendbar. Wir verwenden Formalin in Konzentrationen zwischen 5 und 20%. Zur Verbesserung der Farberhaltung ist die Kaiserling-Lösung geeignet. Perfusionsfixierte Tiere und arteriell injizierte menschliche Kadaver ergeben gut fixierte Organe in ihrer korrekten anatomischen Lage. Bei der Autopsie entnommene Organe werden durch Eintauchen und Infiltration fixiert, wobei darauf zu achten ist, dass ihre natürliche Form wiederhergestellt wird. Hohlgänge müssen während der Fixierung gedehnt werden, ein Schritt, der bei der Herzplastination. Alle Einbalsamierungsflüssigkeiten, die langkettige Alkohole (z. B. Glycerin) enthalten, müssen vor der Dehydratisierung entfernt werden, da sie die fertigen Präparate leicht verderben. Die Fixierung kann entfallen, wenn Epoxidharze verwendet werden (Epoxidharze haben fixierende Eigenschaften), was zu einer besseren Farberhaltung führt. Allerdings ist im Hinblick auf mögliche Infektionen Vorsicht geboten.

Dehydratisierung und Entfettung sind obligatorisch, da Wasser und Lipide nicht direkt gegen Polymere ausgetauscht werden können. Wie aus der Histologie bekannt, muss ein ordnungsgemäßes Dehydratisierungsverfahren eine Schrumpfung vermeiden. Der Grad der Entfettung ist bei der Plastination von entscheidender Bedeutung. Die beiden verwendeten Methoden sind die schrittweise Dehydratisierung in abgestuftem Ethanol und die Gefriersubstitution mit Aceton.

Die Dehydratisierung mit Ethanol wird verwendet, wenn eine histologische Untersuchung des plastinierten Präparats vorgesehen ist. Der Nachteil von Ethanol ist, dass es durch ein niedrig siedendes Zwischenlösungsmittel (Aceton oder Methylenchlorid) ersetzt werden muss. Außerdem verursacht die schrittweise Dehydratisierung mit Ethanol eine beträchtliche Schrumpfung (etwa 50 %) und ist zeitaufwendig. Die Dehydratisierung mit Ethanol ist bei einbalsamierten Proben vorteilhaft, da der in der Einbalsamierungsflüssigkeit enthaltene langkettige Alkohol leicht entfernt werden kann (insbesondere nach Zugabe von H₂O₂).

Das Standard-Dehydratisierungsverfahren für die Plastination ist die Gefriersubstitution in Aceton bei -25°C. Diese Methode ist zeitsparend, erfordert weniger Arbeitsaufwand als die Dehydratisierung mit Ethanol und verursacht nur eine geringe Gewebeschrumpfung. Es ist die einzige Möglichkeit, Hirngewebe mit einer tolerierbaren Schrumpfung (weniger als 10 %) zu dehydrieren. Bei der Gefriersubstitution gefrieren die (auf + 5 °C vorgekühlten) Proben sofort beim Eintauchen in das eiskalte Aceton (technische Qualität), wodurch die Form der Proben sofort stabilisiert wird. Innerhalb der nächsten 3 bis 5 Wochen (einschließlich 2 bis 3 Wechsel des Acetons) werden die Proben vollständig dehydriert. Der einzige Nachteil der Gefriersubstitution ist die Bildung von Eiskristallen in Proben, die auch für die Histologie verwendet werden sollen. Dieser Nachteil lässt sich umgehen, indem die Proben mit 20-100 % Formalin behandelt werden, das als Gefrierschutzmittel wirkt.

Bei der Ethanoltrocknung wird die Entfettung gleichzeitig mit dem Trocknungsvorgang durchgeführt. Bei der Gefriersubstitution erfordert die Entfettung ein zusätzliches Acetonbad bei Raumtemperatur. Bei lipidreichen Proben (mit Knochen, subkutanem oder subserösem Fettgewebe) kann die Entfettung in einem abschließenden Bad mit Methylenchlorid erfolgen. Für die Plastination ist Aceton ideal, da es gleichzeitig als Dehydratisierungsmittel, Entfettungsmittel und Zwischenlösungsmittel fungiert und sich leicht mit den verschiedenen für die Plastination verwendeten Harzen mischen lässt.

Erzwungene Imprägnierung

Der zentrale und wichtigste Schritt bei der Plastination ist die Verdrängung des intermediären Lösungsmittels (das die ursprünglich mit Wasser und Lipiden gefüllten Räume einnimmt) durch härtbare Polymere. Dies wird durch ein Vakuum während der Zwangsimprägnierung erreicht. Die in einem flüchtigen Zwischenlösungsmittel (Aceton oder Methylenchlorid) getränkte Probe wird in die Polymerlösung gelegt. Das Zwischenlösungsmittel hat einen hohen Dampfdruck und einen niedrigen Siedepunkt (Aceton: + 56°C, Ethylenchlorid: + 40°C), während die Polymerlösung einen niedrigen Dampfdruck und einen hohen Siedepunkt hat. Daher wird beim Anlegen eines Vakuums nur das Zwischenlösungsmittel kontinuierlich aus der Probe und durch die umgebende Polymerlösung in Form von Gasblasen abgesaugt. Auch das umgebende Harz wird schließlich vollständig vom Zwischenlösungsmittel befreit, so dass nur ein einziges Imprägnierbad benötigt wird. Die Menge des verbrauchten Polymers ist daher sehr gering und entspricht bei Silikonen höchstens dem Volumen der Probekörper.

Die Geschwindigkeit der Imprägnierung hängt sowohl von der Probe als auch von der Klasse des verwendeten Polymers ab. Im Allgemeinen benötigen Polymere mit einer höheren Viskosität eine längere Imprägnierzeit als Polymere mit einer niedrigeren Viskosität. Je größer und dichter die Probe ist, desto langsamer sollte die Imprägnierung vorzugsweise mit einem niedrigviskosen Harz erfolgen. Für die Imprägnierung ist jede kleine ölbetriebene Vakuum-Flügelzellenpumpe ausreichend, wobei die Geschwindigkeit durch Variieren des Vakuums mit Hilfe eines Luft-Bypass-Ventils eingestellt werden muss. Die Bildung von Gasblasen, die sich leicht durch ein Fenster beobachten lässt, ist ein nützlicher Indikator für die Geschwindigkeit der Imprägnierung. Eine zu schnelle Extraktion des Zwischenlösungsmittels führt zu einem Zusammenbruch des strukturellen

Gerüsts der Proben (d. h. Schrumpfung) und muss verhindert werden. Sehr empfindliche Proben werden vorzugsweise mit Methylenchlorid bearbeitet. Sein hohes spezifisches Gewicht (1,3) sorgt dafür, dass die Proben auf den Boden des Imprägnierbades (spezifisches Gewicht ca. 1) sinken und daher nicht beschwert werden dürfen.

Die Zwangsimprägnierung erfolgt entweder bei Raumtemperatur, wenn Epoxid- und Polyesterharz verwendet wird, oder bei - 25°C in einer Tiefkühltruhe, wenn mit Silikonkautschuk gearbeitet wird. In der Kälte steigen die Gasblasen langsam an die Oberfläche, ohne zu spritzen. Ein Endvakuum im Bereich zwischen 2 und 15 mm Hg ist erforderlich. Bei Raumtemperatur verläuft die forcierte Imprägnierung im Allgemeinen schneller und mit starker Blasenbildung, da die Polymere weniger zähflüssig sind und eine kürzere Verarbeitungszeit haben.

Aushärtung (Härtung)

Die Aushärtung der Probekörper erfolgt nach der Entnahme aus dem Imprägnierbad; das Restpolymer des Bades sollte für die Wiederverwendung flüssig bleiben. Es werden drei spezifische Techniken angewandt, die sich deutlich von der üblichen Aushärtung der in Formen gegossenen Polymere unterscheiden.

Für Silikonproben wird ein speziell für die Plastination entwickeltes Gashärtungsverfahren eingesetzt. Bei dieser Technik ist der entscheidende Vernetzungshärter nicht Bestandteil des Imprägnierbades, sondern wird später in gasförmiger Form auf die Proben aufgebracht. In einer geschlossenen Kammer werden die imprägnierten Proben einer Atmosphäre ausgesetzt, die kontinuierlich mit dem gasförmigen Härter gesättigt ist, der aus einer Stammlösung im Inneren der Kammer verdunstet. Die kontinuierliche Verdunstung und Zirkulation des Gases wird durch eine kleine Membranpumpe erreicht, die den Aushärtungsprozess beschleunigt.

Bei der Aushärtung von Proben, die mit Epoxidharz (E 12) oder Polymerisationsemulsion (PEM) imprägniert sind, werden die in den Proben enthaltenen Gewebeamine genutzt. Amine sind wirksame Beschleuniger. Zusammen mit Anhydriden, die als Härter für Epoxidharze oder PEM-Imprägniermischungen verwendet werden, reichen sie aus, um die Proben bei +50°C vollständig auszuhärten. Die Aushärtung von Polyester-Copolymeren kann durch UVA-Licht und eine anschließende Wärmebehandlung (+50°C) eingeleitet werden. Die damit verbundenen Vorteile sind eine lange Verarbeitungszeit im Dunkeln und eine geringere Temperaturspitze während der stark exothermen Aushärtung.